



HAL
open science

Rôle oncogénique des fragments de p65/RelA Nf-kB générés par l'activité de RIPK3

Céline Latreche-Carton

► **To cite this version:**

Céline Latreche-Carton. Rôle oncogénique des fragments de p65/RelA Nf-kB générés par l'activité de RIPK3. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2017. Français. NNT : 2017LIL2S048 . tel-01864360

HAL Id: tel-01864360

<https://theses.hal.science/tel-01864360>

Submitted on 29 Aug 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.

UNIVERSITE DE LILLE 2
Unité INSERM UMR1172, JPArc Equipe BQ, IRCL
Facteurs de persistance des cellules leucémiques

Thèse de Doctorat
Biologie-Santé

Présentée par Céline LATRECHE-CARTON

**Rôle oncogénique des fragments de
p65/RelA NF- κ B générés par l'activité
de RIPK3**

Soutenance le 15 Décembre 2017

Devant le jury composé de :

Pr. MARCHETTI Philippe
Dr. IDZIOREK Thierry
Pr. GALMICHE Antoine
Pr. NICOLINI Franck-Emmanuel
Dr. CHOPIN Valérie

Université LILLE 2
Université LILLE 2
Université d'AMIENS
Université de LYON
Université d'AMIENS

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Je souhaite adresser mes remerciements dans un premier temps au Professeur Bruno Quesnel, Directeur de l'équipe « facteurs de persistance des cellules leucémiques » de l'Unité Inserm UMR1172 de m'avoir accueilli au sein de son équipe mais aussi de m'avoir encadré.

Je tiens dans un deuxième temps à remercier le Docteur Thierry Idziorek, mon directeur de thèse, de m'avoir encadré, dirigé dans ce projet avec rigueur, disponibilité en partageant ses compétences et ses connaissances dans le domaine. Je remercie tout particulièrement pour votre soutien dans la rédaction de cette thèse. Sans votre aide précieuse, je n'aurais pas pu y arriver.

Je souhaite adresser mes remerciements au Pr Philippe Marchetti d'avoir accepté de présider mon Jury. Je tiens à remercier également les Pr Antoine Galmiche et Franck Emmanuel Nicolini d'avoir accepté d'être mes rapporteurs. De même, je remercie aussi le Dr Valérie Chopin d'avoir accepté d'être l'examinatrice de ma thèse.

Je souhaite remercier Hassiba El-Bouazzati pour tout ton travail, ton soutien, ta bonne humeur. Merci pour tous ces bons moments de rigolade passés et de m'avoir suivi dans la production en chaîne des MTS. Continue comme tu es. Tu es une superbe assistante ingénieur. Je te souhaite une belle carrière et plein de bonheurs familiaux.

Je tiens également à remercier aussi Yasmine Touil pour ton dynamisme, ton optimisme, ton soutien et ton sourire. Merci de nous avoir suivi dans cette folle aventure pour ton investissement complet dans ce projet. Tu emmenais avec toi Pascaline Segard, Bernadette Masselot. Merci à elles aussi pour leur aide et disponibilité technique.

Je remercie aussi Isabelle Briche pour ses aides en renfort et sa gentillesse. Je remercie Nathalie Jouy pour m'avoir formé aux différents cytomètres, permis d'encadrer différents stagiaires sur le projet, pour toutes les longues heures passées à tester de nouveaux protocoles. Merci à Emilie Floquet pour ta bonne humeur sur le plateau de cytométrie.

Je souhaite aussi remercier la plateforme de microscopie confocale. Merci à toi Meryem Tardivel de m'avoir formé à la microscopie en douceur et avec beaucoup de gentillesse. Merci à toi Antonino pour m'avoir aidé l'analyse des données et pour ta disponibilité. Je tiens

également remercier la plateforme de génomique pour leur disponibilité, leur gentillesse et leur savoir-faire. Sans eux le travail de transcriptomique n'aurait pu se faire ni la suite qui en découlait. Merci Martin Figeac, Frédéric Leprêtre, Céline Villenet.

Je remercie également le Dr Sylvie Zouitina pour toutes nos longues discussions, tes précieux conseils et ton soutien. Merci pour tout ce que tu as pu faire pour moi. Tu as joué un rôle très important.

Merci aux membres du bureau t'avoir contribué à la bonne ambiance Soizic Guihard, Anne Lucie Nugues, Elisabeth Bertrand et Katarina Jovanovic.

Je vous remercie également Dominique Héтуin pour son travail au préalable dans la construction des plasmides. Merci pour ces jolis « bébés ». Bonne route et profite bien de cette retraite bien méritée.

Je tiens tout particulièrement à remercier l'IRCL pour son accueil, son soutien financier. Je vous remercie donc le président Michel d'Orgeval, l'ancienne directrice Maud Collyn et le nouveau directeur Pr. Pierre Formstecher. Merci à vous Micheline Magdelon, Corinne Merckx, Matthias Gérard. Continuez votre belle action.

Je veux également remercier l'ensemble de l'équipe BQ de l'unité Inserm UMR1172.

Je remercie aussi Pauline Ostyn, Mélanie Lambert, Julie Berthe, Alexia Mopin pour nos petits instants de détente et nos conversations interminables en culture ou ailleurs dans les différents labos ou couloirs. Merci d'avoir contribué à cette bonne humeur.

Je tiens aussi à remercier Carine Brinster pour nos discussions, tes conseils de ton expérience professionnelle.

Je remercie l'ensemble des membres de l'IRCL qui ont rendu ces années agréables dans une ambiance conviviale.

Je remercie également l'ensemble de ma famille, de mes ami(e)s qui m'ont soutenu dans ce projet de près ou de loin.

Enfin, je tiens remercier particulièrement ma mère pour ton aide précieuse, ton soutien indéfectible au cours de toutes mes études. Je remercie aussi tout particulièrement mon mari

pour tes bons conseils scientifiques issus de nos discussions, ton aide toute aussi précieuse. Merci à toi pour ton soutien au quotidien, tes mots de réconfort, pour ta patience qui a été mise à l'épreuve. Mon début de thèse est synonyme de notre mariage. Mais notre route à deux se poursuivra bien au-delà de cette thèse. Alors accroche-toi pour de nouvelles aventures. A mon tour d'être à fond derrière toi.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
I) Le cancer	1
A) Processus de cancérisation	1
B) Cancer et système immunitaire	3
C) Développement du cancer	5
1) Angiogénèse	5
2) Dissémination des cellules cancéreuses	6
II) La leucémie	6
A) Différentes phases de la leucémie	7
1) Les leucémies aiguës	7
2) Les leucémies blastiques	7
3) Les leucémies chroniques	7
B) La leucémie lymphoïde chronique	8
C) La leucémie myéloïde chronique	9
1) Point de cassure	9
2) Mécanismes moléculaires	10
a) MAPK Kinases	10
b) PI3K/AKT/mTOR	12
c) JAK/STAT	13
d) NF- κ B	14
3) Traitement	15
a) Chimiothérapie	15
b) Greffes	15
c) Thérapie ciblée	16
d) Résistances aux inhibiteurs de tyrosine kinase	16
❖ Résistances indépendantes de la protéine de fusion BCR-ABL	17
❖ Résistances dépendantes de la protéine de fusion BCR-ABL	17
e) Surmonter les résistances	18
❖ Nouvelle génération d'inhibiteurs de tyrosine kinase	18
❖ Inhibiteurs des voies de signalisation induites par la protéine BCR-ABL	19
III) Le Mélanome	20
A) Développement	20
B) Traitement	23
1) Chirurgie	23
2) Chimiothérapie	24
3) Thérapie cellulaire	24
4) Immunothérapie	24
IV) Les cellules souches	25
A) Généralités	25
B) Cellules souches hématopoïétiques	25
1) Cellules souches saines	25

2) Cellules souches leucémiques	31
C) Cellules souches de la peau	33
1) Cellules souches saines	33
2) Cellules souches de mélanome	33
V) L'apoptose	34
A) Processus biochimique et morphologique de l'apoptose	34
B) Acteurs de l'apoptose	35
1) Protéines effectrices de l'apoptose : les caspases	36
a) Caspases 3 ; 6 ; 7	39
C) Voies d'induction de l'apoptose	39
1) Voie intrinsèque	40
2) Voie extrinsèque	41
VI) La nécroptose	42
A) Caractéristiques de la nécroptose et de la nécrose	42
B) Induction de la nécroptose	43
C) Récepteurs de mort	44
D) Protéines effectrices de la nécroptose	45
1) Protéine RIP1	45
2) Protéine RIP3	46
E) Régulation de la nécroptose	46
VII) La voie de signalisation de NF-κB	48
A) Famille NF- κ B	48
1) Structure des monomères	48
2) Formation de dimères	51
3) Activation du complexe NF- κ B	52
B) Régulation de la voie NF- κ B	52
1) Famille des protéines I κ B	52
2) Famille IKK	54
C) Différentes voies d'activation de NF- κ B	55
1) Voie canonique	56
2) Voie non canonique	58
3) Interactions entre les deux voies	60
D) Rôle de NF- κ B dans le développement tumoral	62
1) Maladies hématologiques	62
a) NF- κ B dans la leucémie myéloïde chronique	62
b) NF- κ B dans la leucémie myéloïde aigüe	63
2) Dans le mélanome	64
E) Modifications post-traductionnelles de p65/RelA	67
1) Phosphorylation	68
2) Acétylation	72
3) Méthylation	75
4) Ubiquitinylation	76
5) Clivages de p65/RelA	77

OBJECTIFS	82
MATERIELS & METHODES	83
I) Modèles cellulaires	83
II) Culture cellulaire	83
A) Modèle leucémique	83
B) Modèle de mélanome	84
III) Obtention des mutants	84
IV) Transfection	86
V) Extraction de protéines totales	87
VI) Extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques	87
VII) Dosage des protéines	88
VIII) Western blot	88
IX) Extraction d'ARN	89
X) Dosage de l'ARN	90
XI) Transcriptome	90
XII) Rétrotranscription	90
XIII) PCR quantitative	90
XIV) Etude protéique cytométrique	91
XV) Etude des cellules souches	92
A) Formation de sphères	92
B) Test Aldefluor	92
C) Etude des cellules souches par cytométrie en flux	92
XVI) Etude des cellules en différenciation en cytométrie en flux	93
XVII) Etude du pH intracellulaire en cytométrie en flux	94
XVIII) Mesure de l'activité de liaison à des éléments de réponse	95
XIX) Mesure du taux de phosphorylation de NF-kB p65/RelA	95
XX) Etude de la localisation nucléaire par microscopie confocale	96
XXI) Etude de la sensibilité aux drogues	97
XXII) Etude de l'activité promotrice	98
XXIII) Etude <i>in vivo</i>	99
A) Souris syngénique	99
1) Souris C3H	99
2) Souris C57Black56	99
B) Souris "nude"	99
RESULTATS	100
I) Création des lignées	100

A) Modèle leucémique	100
B) Modèle de mélanome	104
II) Etude de la survie <i>in vivo</i>	104
A) Etude de l'évolution naturelle de la maladie	105
1) Souris syngéniques dans le modèle leucémique	106
2) Souris nude	106
3) Modèle de mélanome murin syngénique	107
4) Bilan de l'évolution tumorale	107
B) Evolution de la maladie chez les souris traité	108
1) Souris syngéniques	109
2) Souris nues	109
3) Bilan du développement tumoral sous traitement	110
III) Etude du rôle fonctionnel de p65/RelA et des différents mutants	111
A) Prolifération	111
B) Cycle cellulaire	112
C) Localisation nucléaire	113
1) Western blot	113
2) Microscopie confocale	115
3) Bilan de la localisation nucléaire	117
D) Fixation à un élément de réponse	118
1) p65/RelA	120
2) p50	120
3) p52	124
4) RelB	125
5) Bilan de la fixation des membres de la famille NF- κ B à un élément de réponse	121
E) Mesure de l'activité promotrice	122
❖ <i>Bilan de l'activité promotrice</i>	124
F) Etude des phosphorylations de p65/RelA	124
IV) Etude de l'activité de p65/RelA	127
A) Etude de la résistance aux drogues	127
B) Modulation de l'expression de gènes	129
1) Transcriptome	130
2) Validation des cibles	131
a) RT-qPCR	132
b) Western blot	137
c) Cytométrie en flux	138
C) Etude du rôle du bicarbonate de sodium	139
❖ <i>Bilan du rôle du bicarbonate de sodium</i>	141
D) Mesure du pH intracellulaire	141
E) Caractérisation des cellules souches	142
1) Mesure de l'activité aldéhyde déshydrogénase	143
❖ <i>Bilan de l'activité ALDH⁺</i>	143

2) Phénotypage des cellules	144
a) Marqueurs des caractéristiques des cellules souches	144
b) Marqueurs de différenciation	145
3) Capacité à former des sphères	145
❖ <i>Bilan de la capacité à former des sphères par les cellules de mélanome</i>	146
F) Immunoévasion	147
1) Expression basale de PDL1	147
2) Expression de PDL1 en présence de 5'Azacytidine	148
3) Expression de PDL1 en présence d'un agent inhibiteur de NF-κB	149
❖ <i>Bilan de l'expression de PDL1</i>	150
DISCUSSION	151
CONCLUSION	162
PERSPECTIVES	164
RESUME	167
BIBLIOGRAPHIE	169

ABBREVIATIONS

ABCB : ATP Binding Casette subfamily B

ABL : Abelson

ADN : Acide DésoxyriboNucléotide

AIF : Apoposis Inducing Factor

AKT (ou PKB) : Protéine Kinase B

ALDH : Aldéhyde DésHydrogenase

AML : Acute Myeloid Leukemia

Apaf : Apoptotic Peptidase Activating Factor

APC : AlloPhycoCyanin

APO : APOprotein

ARD : Ankyrin Repeat Domain

ARF : ADP Ribosylation Factor

ARN : Acide RiboNucléique

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

ATP : Adénosine TriPhosphate

BAFF : B-cell Activating Factor

Bcl : B- Cell Lymphoma

BCA : BiCinchoninic acid Assay

B-CR : B-Cells Receptor

BCR : Breakpoint Cluster Region

BMP : Bone Morphogenetic Protein

BRAF : B-Raf

BSA : Bovine Serum Albumine

BTK : Bruton Tyrosine Kinase

CAD : Caspase Activated nuclease DNase

CARD : CAspase Recruitment Domain

CARM : Coactivator Associated arginine Methyltransferase

CBP : CREB Binding Protein

CD : Cluster of Differentiation

CDK : Cyclin Dependant Kinase

Chk : Checkpoint Kinase

c-IAP : cellular-Inhibitor of Apoptosis Protein

CK : Casein Kinase

CLP : Lymphoid Progenitors Cells

CMH : Complexe majeur d'Histocompatibilité

CMP : Myeloid Progenitors Cells

CMV : CytoMegalovirus

COMMD : COpper MetabolisM Domain containing

COX : Cyclo OXYgenase

CPAF : Chlamydia Protease like Activity Factor

CTLA4 : Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4

CXCL : Chemokine C-X-C motif Ligand

CYPA : CYcloPhilin A

DAI : DNA Activator of Interferon

DAMP : Dangers Associated Molecular Patterns

DBD : DNA Binding Domain

DD : Death Domain

DD : Dimerization Domain

DED : Death Effector Domain

DIABLO : Direct IAP Binding protein with Low PI

DISC : Death Inducing Signaling Complex

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA : DesoxyriboNucleic Acid

DR : Death Receptor

eIF : eukaryotic Initiation Factor

ELAM : Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule

EPO : Erythropoïétine

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

FADD : Fas Associated protein with Death Domain

FBXL11 : F-BoX Leucine rich repeat protein 11

FGF : Fibroblast Growth Factor

FLIP : FLICE Like Inhibitory Protein

FLT : Fms Like Tyrosine kinase

FN : FibroNectin

GAPDH : GlycérAldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase

GCN : General Control Non derepressible

GDP : Guanosine DiPhosphate

GFP : Green Fluorescent Protein

GILZ : Glucocorticoid Induced Leucine Zipper

Grb2 : Growth factor Receptor Bound protein 2

GRR : Glycin Rich Region

GSK : Glycogen Synthase Kinase

GTP : Guanosine TriPhosphate

H3K36 : Histone H3 Lysine 36

HAT : Histone Acetyl Transferase

HDAC : Histone DésACétylase

HIF : Hypoxia Inducible Factors

HIV : Human Immunodeficiency Virus

HLA : Human Leukocyte Antigen

HLH : Helix-Loop-Helix

HNE : Human Neutrophil Elastase

HRP : HorseRadish Peroxidase

HSP : Heat Shock Protein

HTLV : Human T Lymphotropic Virus

IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein

ICAM : InterCellular Adhesion Molecule

IGF : Insulin-like Growth Factor

IKK : Inhibitor Kappa B Kinase

IL : Interleukine

IP : Iodure de Propidium

IPTG : IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside

IRES : Internal Ribosome Entry Site

IT-HSC : Intermediate Term Hematopoietic Stem Cell

I κ B : Inhibitor kappa B

JAK : Janus Kinase

JH : JAK Homology

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

KD : KInase Domain

LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde

LMC : Leucémie Myéloïde Chronique

LPS : LipoPolySaccharid

LT-HSC : Long Term Hematopoietic Stem Cell

LTβR : LymphoToxin β Receptor

Ly-HSC : Lymphoid Hematopoietic Stem Cell

LZ : Leucine Zipper

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases

M-bcr : Major-breakpoint cluster region

Mcl : Myeloid cell Leukemia

MCP : Methyl accepting Chemotaxis Protein

MDR : MultiDrug Resistance

MEK : MAPK Extracellular signal-regulated Kinase

MES : 2-(N-Morpholino)EthaneSulfonic

miARN : microAcide Ribu Nucleotide

MIP : Macrophage Inflammatory Protein

MKK (ou MEKK) : Mitogen-activated protein Kinase Kinase

MLKL : Mixed Lineage Kinase Like

MLL : Mixed Lineage Leukemia

MMP : Matrix MetalloProteinase

MOMP : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization

MPP : Multiple Potents Progenitors

MSK : Mitogen and Stress activated protein Kinase

mTORC : mammalian Target Of Rapamycin Complex

My-HSC : Myeloid Hematopoietic Stem Cell

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate

NAK : Numb-Associated Kinase

NBD : NEMO Binding Domain

NES : Nuclear Export Sequence

NF- κ B : Nuclear Factor- kappa B

NIK : Nuclear factor kappa B Inhibitor Kinase

NK : Natural Killer

NKG2D : Natural Killer Group 2, member D

NLS : Nuclear Localisation Signal

NOS : Nitric Oxyde Synthase

NSD1 : Nuclear receptor binding SET Domain containing protein 1

NTD : NTerminal Domain

OCT : Organic Cation Transporter

P/CAF : P300/CBP Associated Factor

PAK : p21-Activated Kinases

PAMP : Pathogens Associated Molecular Patterns

PARP : Poly ADP Ribose Polymerase

PBL : Peripheral Blood Lymphocyte

PBS : Phosphate Buffered Saline

PD : Programmed Death

PKD : 3'Phosphoinositide Dependent Kinase

PDL1 : Programmed Death Ligand 1

PDLIM2 : PDZ LIM domain protein 2

PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase

PIDD : p53 Induced Death Domain

PIP : Phosphatidyl Inositol Phosphate

PIP2 : PhosphatidylInositol-4,5-bisPhosphate

PIP3 : PhosphatidylInositol-3-Phosphate

PKC : Protein Kinase C

PKD : Protein Kinase D

PLA2 : PhosphoLipase A2

PLC : PhosphoLipase C

PMA : Phorbol 12-Myristate 13 Acetate

PP2A : Protein Phosphatase 2A

PR : Pathogenesis Related

PRAS40 : Proline-Rich AKT Substrate of 40 kDa

PRMT1 : PRotein arginine MethylTransferase

Protor : PROTein Observed with Raptor

RAG : Recombination Activating Genes

RANKL : Receptor Activator of NF- κ B Ligand

Raptor : Regulatory Associated Protein Of mTOR

RGP : Radial Growth Phase

RHD : Region Homology Domain

RHIM : RIP Homotypic Interaction Motif

RHR : Rel Homology Region

Rictor : Rapamycin Insensitive Companion Of mTOR

RIP : Receptor Interacting Protein

ROCK : Rho-associated protein kinase

ROS : Reactives Oxygen Species

RSK : Ribosomal Subunit Kinase

RSV : Respiratory Syncytial Virus

RT-qPCR : Real Time- quantitative Polymerase Chain Reaction

SCF : Stem Cell Factor

SDF : Stroma cell Derived Factor

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SH : Src Homology

SIDA : Syndrome ImmunoDeficiencie Acquis

siRNA : short interfering RiboNucleic Acid

SIRT: SIRTuin

SLC : SoLute Carrier

SMRT : Silencing Mediator for Retinoic acid receptor and Thyroid hormone receptor

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SOCS : Suppressors Of Cytokine Signalling

SOS : Son Of Sevenless

STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription

ST-HSC : Short Term Hematopoietic Stem Cell

SYK : Spleen tYrosine Kinase

TAD : TransActivation Domain

TAK : Tat Associated Kinase

Tax : TransActivator of pX

TBK : TANK Binding Kinase

TCR : T-Cell Receptor

TGF : Transforming Growth Factor

TKI : Tyrosine Kinase Inhibitor

TLR : Toll-Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TPA : Tissue Plasminogen Activator

TPO : ThyroPerOxydase

TRADD : TNF-R Associated Death Domain

TRAF : TNF Receptor Associated Factor

TRAIL : TNF Related Apoptosis Inducing Ligand

ULD : Ubiquityn Like Domain

UV : Ultra Violet

VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecular

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGF-R : Vascular Endothellium Growth Factor-Receptor

VGP : Vertical Growth Phase

VLA : Very Late Antigen

WB : Western Blot

WIP1 : Wild-type p53 induced Phosphatase 1

WNK : With No lysine/K

WT : Wild Type

XIAP : X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

5AZA : 5'-AZAcytidine

βTrCP : β-Transducin Repeat Containing Protein

κB : kappa B

INTRODUCTION

I) Le cancer

Le cancer est une pathologie due à la dynamique du matériel génétique. Le processus tumorigène est composé de plusieurs étapes transformant une cellule saine en une cellule cancéreuse. La majorité des cancers apparaissent donc de façon tardive nécessitant l'accumulation de mutations pour se déclencher.

A) Processus de cancérisation

On peut en compter deux. Au cours du temps, certaines cellules acquièrent des modifications génétiques. Différents facteurs physiques, chimiques, environnementaux peuvent engendrer des mutations (changement de bases, insertion, délétion) de l'ADN et/ou des anomalies chromosomiques.

La majorité de ces mutations ont peu d'impacts sur les gènes ou sur les protéines issues, et en général, les mécanismes de réparation sont très efficaces pour limiter le nombre de mutations dans l'ADN. Néanmoins, face à un nombre important de mutations, les systèmes de réparation, eux-mêmes susceptibles à des mutations, peuvent devenir défaillants et entraîner l'accumulation d'anomalies génétiques entraînant une efficacité moindre. Les mutations alors présentes sur l'ADN ne sont pas ou mal réparées conduisant à un risque de cancer élevé. En outre, les mutations présentes dans des gènes proto-oncogènes les transforment en oncogènes favorisant le développement de cellules cancéreuses constituant une masse tumorale. Par ailleurs, les gènes suppresseurs de tumeurs peuvent également être mutés favorisant une instabilité génétique.

Par ailleurs, des événements épigénétiques interviennent et modifient l'expression des gènes comme la déméthylation, la modification des histones, siRNA (Kanwal R. et Gupta S., 2012). Dans ce cas, un dysfonctionnement des mécanismes épigénétiques entraîne une instabilité génétique causant des mutations sur des gènes suppresseurs de tumeurs ou proto-oncogènes (Kanwal R. et Gupta S., 2012). La méthylation de l'ADN joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité de l'ADN mais aussi dans la régulation transcriptomique. L'ajout d'un groupement méthyl par les méthyltransférases sur les cytosines des îlots CpG va éteindre l'expression du gène. Dans certaines cellules, certains gènes sont méthylés ce qui entraîne la suractivation ou l'extinction du gène. La modification des histones joue également

un rôle important. Après la traduction, les histones subissent des modifications covalentes telles que des acétylations, méthylations, phosphorylations, ubiquitinations, sumoylations, isomérisations de proline (Kanwal R. et Gupta S., 2012). La présence ou non des modifications post-traductionnelles des histones influence le degré de compaction de la chromatine modulant l'expression des gènes. Le dysfonctionnement des enzymes responsables de ces modifications modifie l'expression de gènes. L'altération des mécanismes épigénétiques peut être aussi due au stress oxydatif (Hanahan D. et Weinberg RA., 2000). Certaines mutations peuvent toucher des gènes proto-oncogènes qui deviennent des gènes oncogènes. L'accumulation des mutations et des modifications épigénétiques permet aux cellules d'acquérir des propriétés tumorigènes favorisant une prolifération incontrôlée notamment en produisant ses propres facteurs de croissance (Hanahan D et Weinberg RA., 2000). Les cellules cancéreuses créent une boucle de rétrocontrôle positif conduisant à une stimulation autocrine. Elles deviennent alors de plus en plus indépendantes de leur microenvironnement en sécrétant des facteurs de croissance. Les récepteurs des facteurs de croissance peuvent être, eux aussi, surexprimés et suractivés (tels les récepteurs de tyrosine kinase). Les cellules cancéreuses échappent aussi aux facteurs suppresseurs de tumeurs, chargés de réguler la quiescence et l'homéostasie cellulaire. Ils bloquent la mitose en plaçant les cellules dans un état de quiescence, mais également arrêtent les cellules à un stade donné de différenciation. Cependant, la surexpression d'oncogènes tel que *c-myc* peut surpasser les systèmes de régulation de la différenciation pour que les cellules, au lieu de se différencier, prolifèrent anormalement (Hanahan D. et Weinberg RA., 2000).

Normalement, l'homéostasie crée l'équilibre entre les cellules qui prolifèrent et celles qui partent en apoptose. Or les cellules cancéreuses sont capables de résister aux facteurs induisant l'apoptose qui entraînent un déséquilibre de la balance homéostatique. Par exemple, la surexpression du facteur anti-apoptique *Bcl2* associée à une surexpression de l'oncogène *c-myc* favorisent à la fois respectivement une résistance à l'apoptose et une prolifération accrue dans les lymphomes. La perte d'expression du facteur suppresseur de tumeur *p53* chez les cellules cancéreuses leur permet d'échapper à l'apoptose. La survie des cellules cancéreuses est en général maintenue par la surexpression de signaux extracellulaires (tel que IGF-1 ; -2 ; IL3) ou intracellulaires (notamment *Ras*). Les cellules cancéreuses peuvent non seulement résister à l'induction de la mort mais aussi libérer des facteurs pro-apoptotiques dans l'environnement cellulaire pour provoquer la mort programmée des cellules saines (Elza C. de Bruin et Medema JP., 2008 ; Hanahan D. et Weinberg RA., 2000).

Les cellules saines prolifèrent de façon limitée dans le temps. En effet, les télomères présents à chaque extrémité de chromosomes diminuent à chaque phase de réplication. Au fur à mesure de cette érosion, les chromosomes ne sont plus protégés par les télomères les fragilisant et entraînant une perte de l'information génétique. En perdant ces régions protectrices, les ADN polymérases n'arrivent plus à répliquer les extrémités 3' entraînant progressivement une perte de l'information génétique conduisant inévitablement à la mort des cellules. Ainsi, le nombre de cycles cellulaires est limité dans le temps. Puis les cellules saines partent en apoptose. Au contraire, les cellules cancéreuses sont capables de proliférer de façon illimitée. Pour permettre ce phénomène, une surexpression de la télomérase est retrouvée dans les cellules cancéreuses permettant l'ajout d'une séquence de 6 nucléotides à la fin de chaque région télomériques. Un deuxième mécanisme existe, par recombinaisons intrachromosomiques à échanger de l'information génétique. Ainsi grâce à ces mécanismes, les télomères maintiennent leur longueur pour permettre à la cellule de se répliquer de façon illimitée (Shay JW. et Wright WE., 2011 ; Jafr, MA. *et al.*, 2016 ; Hanahan D. et Weinberg RA., 2000). Cette caractéristique de prolifération illimitée sera ensuite transmise aux générations futures.

Ainsi, les cellules cancéreuses prolifèrent plus que les cellules saines. Leur nombre augmente fortement formant une masse tumorale de plus en plus grande.

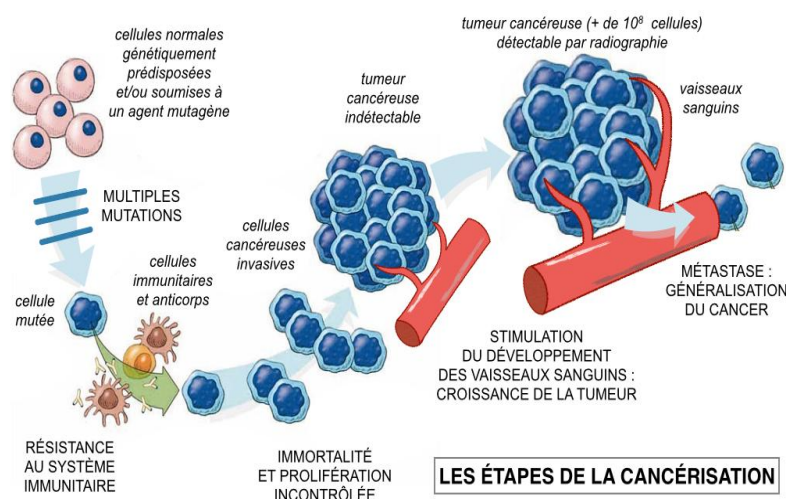


Figure 1 : *Processus de cancérisation :* Les cellules saines acquièrent des mutations devenant résistantes au système immunitaire. Ces cellules cancéreuses prolifèrent anormalement et deviennent immortelles. La tumeur grossit tandis que les vaisseaux sanguins se développent autour. Puis quelques cellules cancéreuses se détachent de la tumeur pour migrer vers d'autres organes et former des métastases.

(<http://svtolycce.blogspot.fr/2016/12/partie-iii-b-variations-genétiques-et.html>)

B) Cancer et système immunitaire

Le système immunitaire qui comprend les cellules tueuses (comme les lymphocytes T cytotoxiques, lymphocytes NK Natural Killer) est capable de détecter des cellules cancéreuses

afin de les éliminer et ainsi de limiter le risque de cancer. En effet, les cellules tumorales peuvent présenter des antigènes spécifiques reconnus par le système immunitaire. La réponse immunitaire innée active rapidement une réponse immune adaptative dirigée contre les antigènes spécifiques exprimés par les cellules tumorales. Ainsi, les cellules T contrôlent le développement de la tumeur. L'immunité innée constitue la première ligne de défense mais le contrôle à long terme dépend de la réponse immune adaptative ultérieure et des cellules mémoires qui protègent à long terme contre les pathogènes. Les molécules-clés de l'immunosurveillance des tumeurs comme l'interféron γ , IL-12, la perforine, TRAIL (Tumor necrosis factor Related Apoptosis-Inducing Ligand, récepteurs DR4 et DR5), RAG1 et RAG2 (Recombination Activating Genes) sont acquises au cours du développement des cellules T ainsi que les récepteurs des cellules T et les récepteurs NKG2D des cellules activatrices NK (Bruttel VS., 2014). La perte de l'une de ces molécules aboutit à une tumorigenèse plus fréquente ou spontanée ou induite plus rapidement par les cancérrogènes. La capacité d'échapper au système immunitaire a donc été reconnue comme une caractéristique supplémentaire de cancer (Hanahan D. et Weinberg RA, 2000). Les tumeurs peuvent être « continues » mais ne peuvent pas être éliminées par le système immunitaire. Ce dernier peut contrôler la croissance tumorale sans pouvoir éradiquer chaque cellule maligne et prévenir de lésions pré-malignes dans un état de dormance plutôt que d'éliminer complètement toutes les cellules transformées (Sosa MS. *et al.*, 2014). L'immunosurveillance de la tumeur repose sur la caractéristique d'une transformation maligne pouvant être reconnue par les cellules immunitaires adaptatives et innées. De plus, la tumeur peut échapper au contrôle du système immunitaire (Hanahan D. et Weinberg RA, 2000). L'expression de protéines PDL1 masque les cellules cancéreuses au système immunitaire empêchant la lyse par les cellules cytotoxiques T. Les antigènes vers lesquels une réponse immunitaire cellulaire des lymphocytes T spécifiques a été mise en place peuvent être perdus. En effet, les tumeurs agressives sont souvent caractérisées par des expressions basses de molécules I de classe HLA. En étant peu exprimés, ces antigènes tumoraux évitent aux cellules tumorales d'être la cible des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺. Une perte complète du CMH du non soi rend les cellules moins sensibles à la lyse des cellules NK. La suppression active des cellules NK et des cellules T a lieu dans le microenvironnement tumoral où sont abondantes les hormones ou les cytokines suppressives. L'expression à la surface cellulaire et/ou la sécrétion des molécules de HLA de classe immunitaire inhibitrice telles que HLA-G et HLA-E contribuent à la paralysie immune locale. Les cellules altérées sont alors éliminées. Cette même tolérance

induit des stratégies utilisées par les cellules cancéreuses qui échappent alors à l'immunosurveillance. En outre, les taux d'expression importants de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-xL ou la Survine ne font pas que protéger les cellules souches cancéreuses contre les drogues chimiothérapeutiques mais augmentent aussi la résistance face à l'apoptose induite par les cellules immunitaires effectrices comme les lymphocytes T et les cellules NK (Bruttel VS., 2014).

Ainsi, une suractivation d'oncogènes, une inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs, un système de réparation défaillant et l'échappement au système immunitaire permettent le développement du cancer.

C) Développement du cancer

1) Angiogénèse

La masse tumorale augmente donc progressivement. Mais pour les cellules cancéreuses se trouvant au cœur de la tumeur, l'apport de nutriments et d'oxygène est faible voire nul. L'accès limité aux vaisseaux sanguins plonge les cellules cancéreuses dans des phases d'hypoxie aiguë. L'altération de phases de normoxie et d'hypoxie entraîne une instabilité génétique (accumulation des erreurs de réplication, mutations, inefficacité des enzymes de réparation de l'ADN...), une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène favorisant le développement de l'angiogénèse. Cet environnement hypoxique favorise l'expression de HIF1 α mais aussi une suractivation des voies de signalisation PI3K/AKT, MAPK, NF- κ B, favorisant une progression accrue des cellules cancéreuses, la survie et la résistance à l'apoptose et aux drogues (Muz B. *et al.*, 2015 ; Lin Z. *et al.*, 2016 ; Hanahan D. et Weinberg RA., 2000). Pour permettre l'accès aux nutriments et à l'oxygène, les cellules endothéliales libèrent des facteurs vasculaires tels que Vascular Endothelium Growth Facteur (VEGF) et son récepteur (VEGF-R) et Fibroblast Growth Factor (FGF). Normalement, les cellules saines expriment également des inhibiteurs à l'angiogénèse tel que l'intégrine, la thrombospondine 1. Ces inhibiteurs de la vascularisation des tissus permettent d'établir une balance régulant l'angiogénèse. L'expression de la thrombospondine 1 est stimulée par la protéine p53. La protéine p53 est sous exprimé dans les cellules cancéreuses. Donc le niveau d'expression de la thrombospondine 1 est faible. Alors que l'on observe une augmentation de l'expression de VEGF et de FGF dans les cellules cancéreuses. La balance est alors

déséquilibrée en faveur d'un développement important de l'angiogénèse. Ainsi, des petits capillaires sanguins se forment pouvant apporter les nutriments et l'oxygène aux cellules cancéreuses présentes au cœur de la tumeur. L'étape de l'angiogénèse est présente dès le développement d'une petite tumeur afin de permettre un développement tumoral plus rapide (Muz B. *et al.*, 2015 ; Hanahan D. et Weinberg RA., 2000).

2) Dissémination des cellules cancéreuses

Après ces différents stades, les cellules cancéreuses présentent une instabilité génétique de plus en plus importante. Cette instabilité génétique varie d'une cellule à une autre même si ces cellules sont issues de la même tumeur mère. Elle permet aux cellules cancéreuses d'acquérir des profils métastatiques différents. Une métastase peut être issue d'une seule cellule cancéreuse ou de plusieurs cellules cancéreuses. Le développement de métastases dans d'autres organes ne possédant pas de tumeur initialement ne dépend pas uniquement des propriétés de ces cellules cancéreuses mais aussi des caractéristiques du microenvironnement d'accueil (récepteurs de surface, facteurs de croissance...). Ainsi, quelques cellules cancéreuses peuvent se détacher de la tumeur afin d'envahir d'autres organes conduisant à un stade métastatique. Des altérations des interactions cellules-environnement sont observées. Par exemple, dans les tissus endothéliaux, la molécule E-cadherine participe aux relations cellule-cellule en formant les jonctions serrées. Mais lorsque la E-cadherine n'est plus fonctionnelle, les cellules présentes perdent l'inhibition de contact (qui les empêchait de proliférer davantage). De plus, la rupture des jonctions serrées permet la migration et l'invasion d'autres tissus. Un deuxième mécanisme est mis en jeu faisant appel aux protéases extracellulaires. Ces protéases surexprimées et suractivées vont dégrader la matrice extracellulaire permettant à quelques cellules cancéreuses de migrer et envahir d'autres tissus. La contribution de chacun de ces mécanismes permet le développement de métastases (Hanahan D. et Weinberg RA., 2000 ; Clark AG. *et al.*, 2015). On se retrouve alors à un stade critique : le dernier stade de la maladie avant le décès du patient.

II) La leucémie

La leucémie est un syndrome myéloprolifératif dû à une prolifération non contrôlée des cellules sanguines et de la moelle osseuse. Il existe différentes catégories de leucémies. Elles

sont classées en fonction soit de leur état clinique (aiguë ou chronique ou blastique) soit de l'origine des cellules cancéreuses (lymphoïde ou myéloïde).

A) Différentes phases de la leucémie

1) Les leucémies aiguës

Les leucémies aiguës présentent une évolution rapide. La production de cellules hématopoïétiques saines est altérée entraînant un désordre clonal malin avec plus de 10% de blastes dans le sang et dans la moelle osseuse (mais moins de 20%). La phase aiguë est caractérisée par une augmentation des basophiles, des globules blancs, des plaquettes dans le sang. Les patients peuvent présenter des symptômes tels que de la fièvre, un manque d'appétit et une perte de poids.

Les leucémies aiguës touchent principalement les enfants et les jeunes adultes. Différents traitements peuvent être mis en place afin de ralentir le développement de la pathologie et la migration des cellules tumorales vers d'autres organes (Prada-Arismendy J., 2016).

2) Les leucémies blastiques

La phase blastique se caractérise par une augmentation du nombre de blastes dans la moelle et le sang et une diminution du nombre de globules rouges et des plaquettes. Elle est mise en évidence par une augmentation de plus de 20% de blastes dans le myélogramme.

Les cellules hématopoïétiques immatures, appelées blastes, prolifèrent anormalement et très rapidement. En effet, la différenciation cellulaire est inhibée alors que la prolifération est induite conduisant à leur accumulation. Elles prennent la place des cellules saines conduisant à l'apparition d'une cytopénie et s'accumulent d'abord dans la moelle osseuse puis dans le sang sans terminer leur processus de différenciation (Heerema-McKenney A. et Arber DA., 2009). Ensuite elles peuvent atteindre les ganglions lymphatiques, la rate, le foie, le système nerveux central.

3) Les leucémies chroniques

Les leucémies chroniques évoluent lentement sur plusieurs mois voire plusieurs années (Short NJ. et Ravandi F., 2005). Les cellules cancéreuses sont matures et présentes en plus

faible quantité au début de la maladie. Au fur à mesure des mois, des années, elles prolifèrent anormalement et s'accumulent dans le sang atteignant 30% de blastes dans le myélogramme. Les leucémies chroniques sont les plus fréquentes chez l'adulte.

Il existe deux types de leucémies chroniques : les leucémies lymphoïdes chroniques et les leucémies myéloïdes chroniques

B)La leucémie lymphoïde chronique

La leucémie lymphoïde chronique est caractérisée par une prolifération maligne des cellules B CD5⁺ entraînant l'accumulation de cellules matures dans le sang, la moelle osseuse et les tissus lymphatiques (Kater AP. *et al.*, 2007). Ces leucémies touchent principalement les adultes. Elle est diagnostiquée par la détection d'un taux anormal de lymphoïdes lors d'une numération complète sanguine. Les signes cliniques non spécifiques de la leucémie sont une asthénie, une perte de poids, une sudation nocturne excessive, des ballonnements, une diminution de l'appétit, une augmentation de la fréquence des infections, une cytopénie auto-immune.

Les cellules lymphoïdes leucémiques montrent une grande variabilité génétique favorisant l'acquisition de SNP (Single Nucleotide Polymorphism) qui touchent de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs tel que p53, ou codant pour des protéines participant à la formation des miARNs, à la modification des chromatines (dont la protéine ATM) et aux voies de signalisation (suractivation des voies de l'inflammation Notch (favorisant la survie et la résistance de l'apoptose via la surexpression de Mcl1, NF-κB, de l'apoptose Bcl2, B-CR (B-Cells Receptors)). Ces modifications génétiques peuvent aussi altérer les chromosomes, notamment entraîner la dégradation des télomères.

La leucémie lymphoïde chronique est aussi associée à des altérations des ARN non codants tel que les miRNA15a, miRNA16-1, miRNA29a/b, miRNA29c, miRNA34b, miRNA181b et particulièrement miRNA155 qui suractive la voie de signalisation B-CR augmentant la prolifération et la survie des cellules B matures. Le profil épigénétique se caractérise par une hypométhylation générale de l'ADN avec des régions d'hyperméthylation. Cette instabilité favorise une adaptation des clones à leur environnement. Les interactions avec leur microenvironnement (cytokines, chimiokines, intégrines, facteurs de croissance (TNF)) favorisent aussi la prolifération des cellules B, la migration et donc un développement tumoral plus rapide et voire une résistance au traitement (Parker H. et Strefford JC., 2016).

Différents types de traitements sont possibles. La chimiothérapie est composée d'analogues de purines (Fludarabine, Pentostatine, Cladaribine...), des agents alkylants (Chlorambucil, Cyclophosphamide, Bendamustine...) permettant une myélosuppression. L'immunothérapie cible CD20 à l'aide d'anticorps monoclonaux tels que le Rituximab, l'Obinutuzumab, l'Ofatumumab, utilisés seuls ou en association avec la chimiothérapie. Les thérapies ciblées touchent principalement la voie suractivée B-CR (B Cells Receptors) avec des inhibiteurs BTK (Bruton Tyrosine Kinase) (l'Ibrutinib, l'Acalabrutinib), PI3K (Idelalisib, Duvelisib), SYK (Spleen tYrosine Kinase) (Fostamatinib, Entosplentinib), Bcl2 (Venetoclax) (Pettijohn EM. et Ma S., 2017).

C) La leucémie myéloïde chronique

La leucémie myéloïde chronique est due à un syndrome myéloprolifératif. Elle a été caractérisée par la découverte du chromosome de Philadelphie en 1960 (Gonon-Demoulian. R. *et al.*, 2014) Ce chromosome est le résultat de la translocation réciproque entre la région Breakpoint Cluster Region (BCR) du chromosome 22 et la protéine protooncogène Abelson (ABL) du chromosome 9 donnant l'oncogène de fusion *bcr-abl*. Ce dernier code pour la protéine de fusion P210 BCR-ABL avec une activité constitutive de tyrosine kinase.

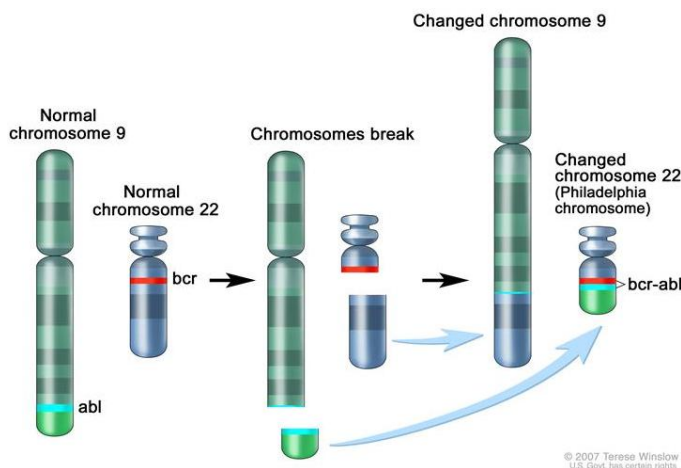


Figure 2 : *Le Chromosome Philadelphie* : Le chromosome Philadelphie est obtenu suite à la translocation réciproque d'un fragment du bras long du chromosome 9 sur le bras long du chromosome 22

1) Points de cassure

Le gène codant pour la protéine ABL est clivé en un seul point dans l'intron précédant l'exon 2 pour venir fusionner derrière la partie 5' du gène bcr. Par contre, il existe deux points de cassure sur le gène bcr. Le point majeur M-bcr (Major Breakpoint Cluster Region) est situé après l'exon 13 (e13 ou b2) ou l'exon 14 (e14 ou b3) obtenant la protéine de fusion P210 : la

forme majoritaire retrouvée chez les patients LAM. Le point mineur m-bcr (Minor Breakpoint Cluster Region) est situé après l'exon 1 (e1) obtenant la protéine de fusion P190 : la forme minoritaire (Bennour A. *et al.*, 2016). Le transcrypt e14a2 est majoritairement retrouvé chez les patients âgés tandis que le transcrypt e13a2 chez les patients jeunes (Figure 3).

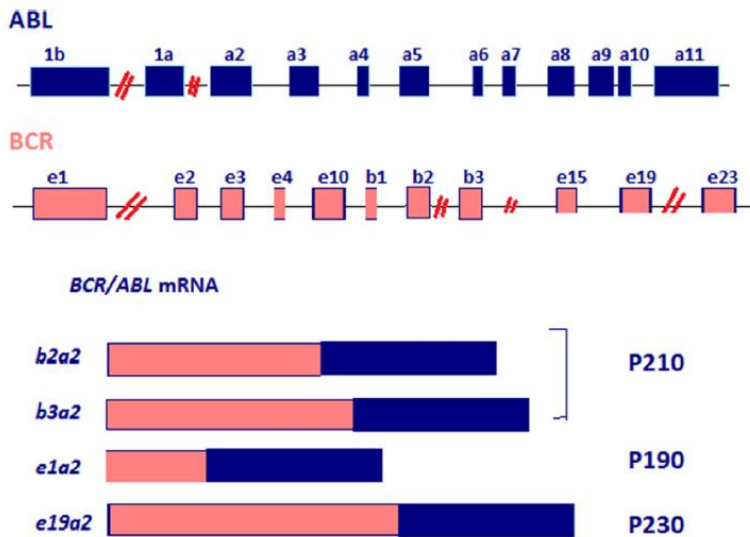


Figure 3 : Structures des gènes *abl*, *bcr* et les différentes fusions *bcr-abl* : le gène *abl* possède deux exons alternatifs (1a et 1b) séparés par un intron de 200 kb, et dix exons numérotés de a2 à a11. Le gène *bcr* comprend 23 exons. Les différentes fusions *bcr-abl*. (Bennour A *et al.*, 2015)

2) Mécanismes moléculaires

La protéine de fusion BCR-ABL avec son activité tyrosine kinase constitutive va suractiver de nombreuses voies de signalisation (Figure 4) (Muz B. *et al.*, 2015 ; Lin Z. *et al.*, 2016).

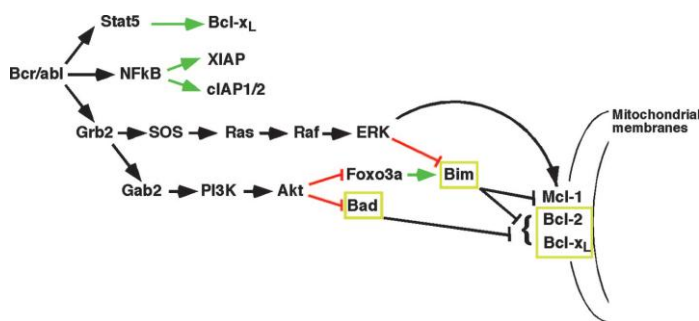


Figure 4 : Les voies de signalisation impactées par l'interaction entre la protéine de fusion BCR-ABL et l'Imatinib : L'interaction de l'Imatinib avec la protéine BCR-ABL entraîne l'inhibition des différentes voies de signalisation : STAT, NF- κ B, Ras/Raf, PI3K/AKT/mTOR provoquant l'activation des protéines proapoptotiques Bim, Bad (Kaufmann SH., 2006).

a) MAPK Kinases

La première est la voie des MAPK Kinases participant au contrôle de la prolifération, la différenciation, la migration, l'apoptose et favorisant l'angiogénèse. La voie des MAPK Kinases se divise en 4 autres voies de signalisation. (Cilloni D. et Saglio G., 2012)

La voie majoritaire est la voie Ras/Raf/MEK/ERK (Figure 5). Activé par la fixation de son ligand, le récepteur tyrosine kinase phosphoryle la protéine adaptative Grb2 sur ses résidus tyrosine de son domaine SH2 et la protéine adaptative SOS sur son domaine SH3. Cette dernière interagit avec la protéine PIP2 intégrée dans la membrane cytoplasmique. Cette fixation permet à la protéine SOS la formation du GTP à partir du GDP et l'activation de la protéine Ras alors associée au GTP. En conséquence, Ras active la protéine PLC gamma mais surtout Raf par phosphorylation. La protéine Raf phosphoryle alors la protéine MEK1 sur ses sérines 218 et 222 et la protéine MEK2 sur les sérines 222 et 226. Ces dernières vont alors activer les protéines ERK1 et ERK2 par phosphorylation respectivement sur les thréonines 185 et 202, les thréonines 187 et 204. Une fois phosphorylées, les protéines ERK1 et ERK2 migrent au noyau pour activer des facteurs de transcription induisant la transcription des gènes participant à la survie, à la croissance cellulaire et aussi à la production de cytokines. (Cilloni D. et Saglio G., 2012)

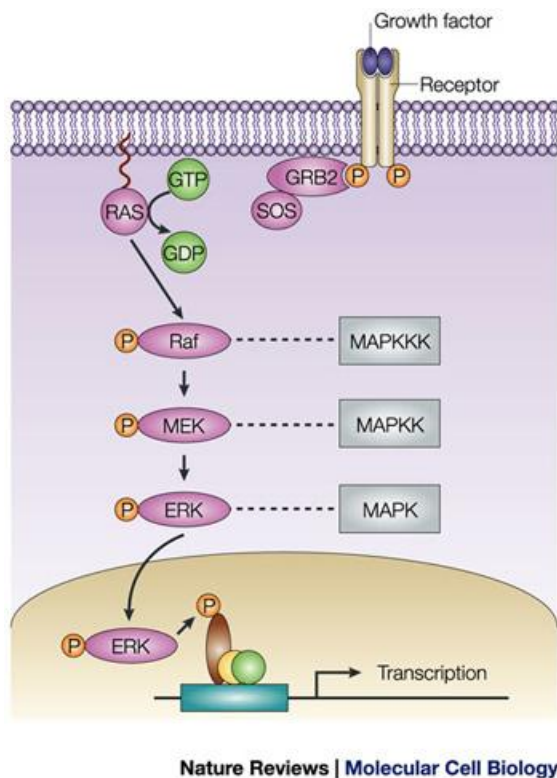


Figure 5 : La voie Ras/Raf/MEK/ERK : Un facteur de croissance se fixe sur le récepteur tyrosine kinase qui phosphoryle la protéine adaptative Grb2 liée à la protéine adaptative SOS. En se liant au GTP, Ras devient actif et phosphoryle Raf qui phosphoryle MEK qui phosphoryle alors ERK. Ce dernier actif phosphorylé pourra activer les facteurs de transcription.

La voie des MAPK Kinases active aussi la voie p38 $\alpha/\beta/\gamma/\Delta$ (Figure 6). Les MAP3K (telles que MKK3 ou MKK6) activent les MAP2K (dont TAK1) qui activent à leur tour p38. Ce dernier induit la transcription de gènes participant à la prolifération, l'angiogénèse, l'inflammation, la production de cytokines immunomodulatrices.

La troisième voie activée par les MAPK Kinases est la voie JNK (Figure 6). TAK1 ou MEKK1 ou MLL-MAP3K activent MAP2K4 ou MAP2K7 qui activent JNK 1 ou 2 ou 3 qui modulent le contrôle de l'apoptose et le développement du système immunitaire.

La dernière voie activée par les MAPK Kinases est la voie ERK5. WNK1 active MEKK2 ou 3 qui phosphorylent MEK5 conduisant à l'activation de ERK5. ERK5 part au noyau induire la transcription de gènes codant notamment pour la cycline D1 modulant ainsi le cycle cellulaire et la survie.

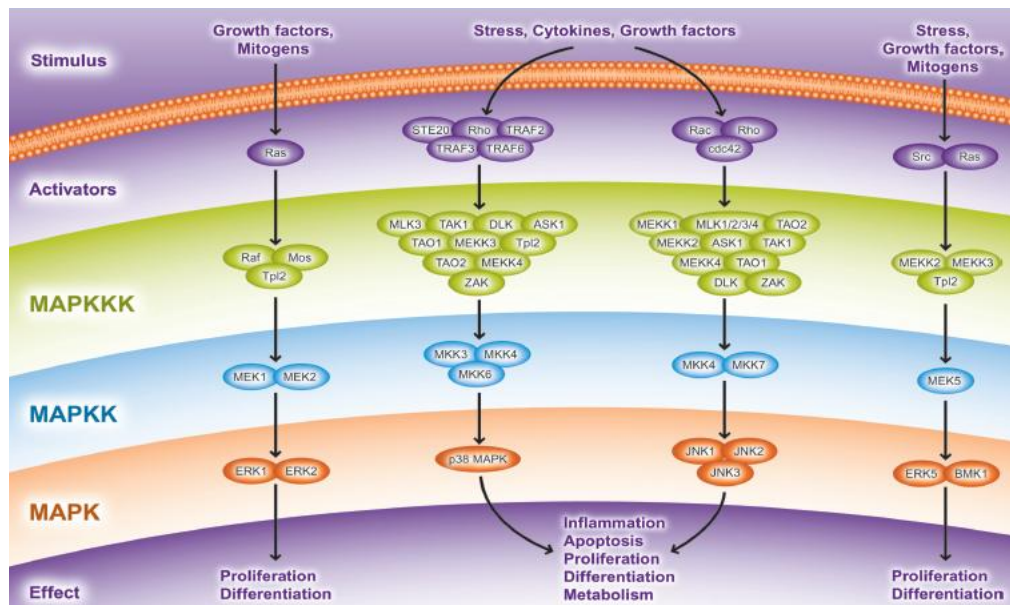


Figure 6 : Les différentes voies MAPK Kinase : Les facteurs de croissance et les mitogènes activent la voie Ras/Raf/MEK/ERK induisant la prolifération et la différenciation. Le stress, des cytokines, des facteurs de croissance stimulent la voie TRAF/MEKK/MKK/p38 MAPK et Rac/MEKK/MKK/JNK favorisant l'inflammation, l'apoptose, la prolifération, la différenciation, le métabolisme. Le stress, des facteurs de croissance et des mitogènes excitent la voie Src/MEKK/MEK/ERK engageant la prolifération et la différenciation (d'après Abcam).

b) PI3K/AKT/mTOR

La deuxième voie activée par la protéine de fusion BCR-ABL est la voie PI3K/AKT/mTORC2 (Figure 7). Cette voie régule la prolifération, l'équilibre de la balance entre la survie et l'apoptose. La protéine de fusion BCR-ABL active la protéine adaptative Grb2 sur ses résidus tyrosine de son domaine SH2 et la protéine adaptative SOS sur son domaine SH3. Cette dernière va alors interagir avec la protéine PIP2 intégrée dans la membrane cytoplasmique. PIP2 est phosphorylée par la protéine PI3K donnant la protéine PIP3. Cette dernière active PDK1 qui phosphoryle à son tour la protéine AKT, une sérine/thréonine kinase. AKT, une première fois phosphorylée sur le résidu thréonine 308

dans le domaine catalytique, et une seconde fois phosphorylée sur le résidu sérine 473 dans le domaine hydrophobe par la 3'Phosphoinositide Dependent Kinase 2 (PDK2) = mTORC2, le complexe insensible à la Rapamycine (Sarbassov DD. *et al.*, 2005). Le complexe mTORC2 est composé de mTOR, Rapamycin Insensitive Companion of mTOR (Rictor), GβL (mLST8), mSin1 et PROTein Observed with Raptor (Protor) (Guertin DA., et Sabatini DM., 2007). Activée, la protéine AKT active de nombreuses voies : la prolifération en induisant l'expression de cyclines et en inhibant les répresseurs du cycle cellulaire tels que p21 ou p27. AKT favorise aussi l'angiogénèse via l'induction de la transcription de gènes pro-angiogéniques tels que VEGF, HIF1α. De plus, AKT induit la survie en favorisant l'expression des facteurs anti-apoptiques tels que Bcl2 et en inhibant l'expression des facteurs pro-apoptiques Bad et p53. Enfin, AKT active mTORC1, le complexe sensible à la Rapamycine. Ce complexe est composé de mTOR, Regulatory Associated Protein of mTOR (Raptor), GβL, PRAS40. Une fois activé, mTORC1 phosphoryle les S6 kinases et les eIF4E Binding Proteins 1-3 (4E-BP). L'activation de la voie PI3K/mTOR par BCR-ABL entraîne une production accrue des espèces réactives de l'oxygène (ROS) contribuant aux dommages spontanés de l'ADN et à l'instabilité génomique (Kim JH., 2005).

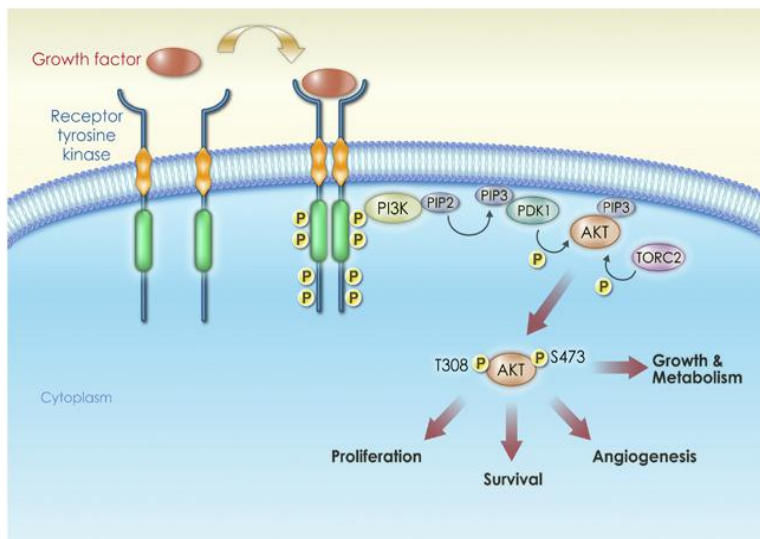


Figure 7 : La voie PI3K/AKT : Le récepteur tyrosine kinase active PI3K qui phosphoryle PIP2 donnant PIP3. Ce dernier stimule PDK1 qui phosphoryle AKT lui même phosphorylé par mTORC2. Doublement phosphorylé, AKT induit la croissance, l'angiogénèse, la survie, la prolifération (Garcia-Echeverria C. et Sellers WR., 2008)

c) JAK/STAT

La famille Janus Kinase (JAK) est composée de 4 membres (JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2) constitués de 7 domaines d'homologie appelés domaines JH (JAK Homology) équivalents aux domaines SH₂. Les protéines JAK sont constitutivement activées dans les

tumeurs hématopoïétiques. BCR-ABL active JAK2 par phosphorylation. JAK2 induit l'expression de *c-myc*. En coordination avec la voie MEK, JAK2 phosphoryle STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription) stimulant son activité anti apoptotique (Figure 8) (Chopra R. *et al.*, 1999 ; Coppo P. *et al.*, 2006). Les protéines STAT sont phosphorylées sur leurs tyrosines de manière constitutive chez les patients BCR-ABL⁺. Leur activité de liaison à l'ADN est maximale (Stirewalt DL. *et al.*, 2003). L'activation de STAT5 par BCR-ABL confère la résistance à l'apoptose en activant la transcription des gènes codant les protéines anti-apoptotiques BCL_{XL} et Mcl1. STAT5 induit aussi avec STAT3 l'expression de c-Myc et les gènes régulant le cycle cellulaire comme cycline D1/D2 (Horita M. *et al.*, 2000 ; Steelman L.S. *et al.*, 2004).

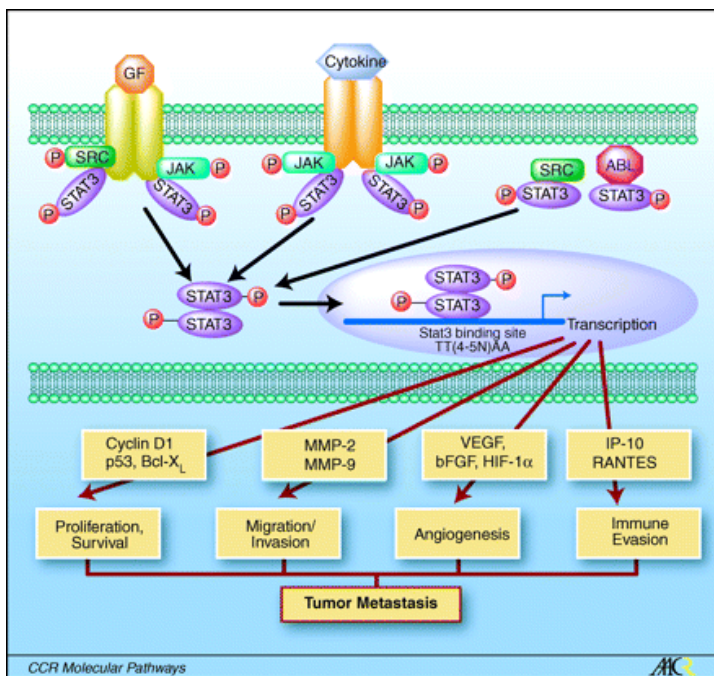


Figure 8 : La voie JAK/STAT : Après fixation de cytokines, le récepteur de tyrosine kinase phosphoryle JAK qui est alors activé. La protéine JAK phosphoryle STAT3, facteur de transcription qui active l'expression de différentes protéines participant à la prolifération, la migration, l'invasion, l'angiogenèse, l'évasion immunitaire, la survie (Huang S., 2007).

d) NF- κ B

La protéine BCR-ABL active la voie NF- κ B via la voie PI3K/AKT (Hamdame *et al.*, 1997 ; Chopra R., 1999). AKT phosphoryle la protéine I-Kappa-B Kinase α (IKK α) activée phosphoryle à son tour la protéine I κ B α ce qui libère le facteur de transcription NF- κ B dans le cytoplasme. NF- κ B est transloqué dans le noyau activant l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation, la réponse au stress, et l'inhibition de l'apoptose. En effet, NF- κ B bloque l'activation de la caspase 8 (supprimant la réponse induite notamment par TNF), de

Bcl2 mais aussi des inhibiteurs de caspases (c-IAP-1,2 et XIAP) et des facteurs TRAF1 et TRAF2 (TNFR-associated factor) (Chopra R., 1999).

3) Traitements

Le traitement de la leucémie myéloïde a évolué au cours des années avec la compréhension de la pathologie. Les thérapies non spécifiques ont laissé place à des thérapies ciblées développées à partir de la conception de l'Imatinib.

a) Chimiothérapie

Le Busulfan (1,4 dimethane-sulfonyl-oxybutane) est un agent alkylant utilisé contre les cellules souches primitives. Par la suite, il a été remplacé par l'Hydroxyurée (également appelée Hydréa) mais reste prescrit pour les personnes intolérantes à l'Hydroxyurée. (Goldman JM., 2010). L'Hydroxyurée est un inhibiteur de la ribonucléotide réductase empêchant l'incorporation des ribonucléotides dans l'ADN. Son effet thérapeutique est plus rapide mais moins durable que celui du Busulfan. Néanmoins, l'Hydroxyurée permet d'augmenter davantage la durée de vie du patient. Ce traitement permet d'obtenir une rémission hématologique de 70% avec peu d'effets secondaires (nausées, ulcères de la bouche).

Le traitement standard a évolué par l'utilisation de l'Interféron α avec une rémission hématologique de 80% et une rémission cytogénétique durable. L'Interféron α est capable de réduire la proportion voire d'éradiquer les cellules BCR-ABL⁺ sans entraîner une suppression importante des cellules myéloïdes. Il peut être associé à la Cytarabine, un inhibiteur de l'ADN polymérase, pour une synergie d'action permettant d'avoir une rémission cytogénétique complète. Cependant, il présente plus d'effets indésirables que les agents précédents (Goldman JM., 2010). Malgré tout, le traitement à l'Interféron α reste le traitement de référence pour les malades ne pouvant pas recevoir de greffe de moelle allogénique.

b) Greffes

Les allogreffes ont été développées offrant un traitement curatif aux patients. Après une chimiothérapie agressive, les cellules souches de la moelle osseuse d'un donneur compatible devraient être greffées à un patient de moins de 45 ans ce qui est rarement le cas, la leucémie étant plutôt détectée vers 50/60ans. Des autogreffes peuvent être également effectuées avec un

risque accru de faire une rechute par contamination du greffon par les cellules malignes (Joha S., 2009).

c) Thérapie ciblée

La vraie révolution dans les traitements donnés aux malades est arrivée grâce aux thérapies ciblées permettant une véritable amélioration pour les patients avec une diminution des effets secondaires. Ces thérapies ciblées ne ciblent que les cellules cancéreuses BCR-ABL⁺ et ne touchent pas les cellules saines limitant les effets secondaires. Le premier inhibiteur de tyrosine kinase : Imatinib, 2 phényl-aminopyrimidine, composé polycyclique de la famille des aminopyridines a été conçu par Brian Drucker. L'Imatinib est un inhibiteur compétitif vis-à-vis de l'ATP. (Santos FP. *et al.*, 2011). L'Imatinib occupe la poche hydrophobe laissée vacante par l'ATP dans la poche de fixation de l'ATP de la protéine de fusion BCR-ABL bloquant la boucle d'activation dans une conformation non phosphorylée et inactive (Figure 9).

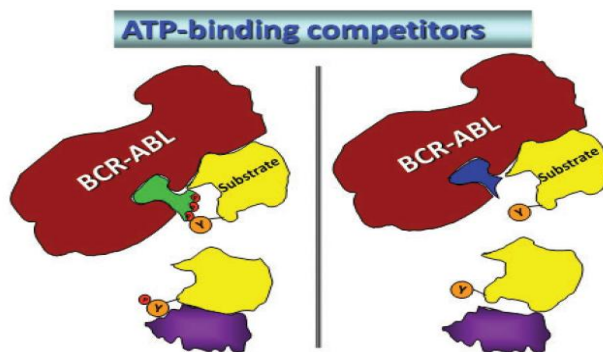


Figure 9 : Le mécanisme moléculaire de l'Imatinib : L'Imatinib, un inhibiteur compétitif, vient se fixer à la place de l'ATP dans le domaine kinase de la protéine de fusion BCR-ABL. La protéine reste sous forme inactive empêchant la phosphorylation du substrat.

La protéine BCR-ABL est donc inactivée incapable de phosphoryler ses substrats. Les différentes voies de signalisation sont bloquées inhibant les mécanismes de survie cellulaire et favorisant l'activation de l'apoptose (Figure 4).

Ce traitement apporte des taux de rémission importants : une réponse hématologique complète chez 98% des patients et une réponse cytogénétique majeure chez une partie des patients.

d) Résistances aux inhibiteurs de tyrosine kinase

Cependant, des cas de résistance au traitement apparaissent. Ils peuvent être dus soit à une résistance primaire (insensibilité à l'Imatinib), soit à une résistance secondaire (perte de

l'efficacité de l'Imatinib) provoquant la rechute. Ces différentes résistances sont dépendantes ou non de la protéine chimérique BCR-ABL (Figure 10).

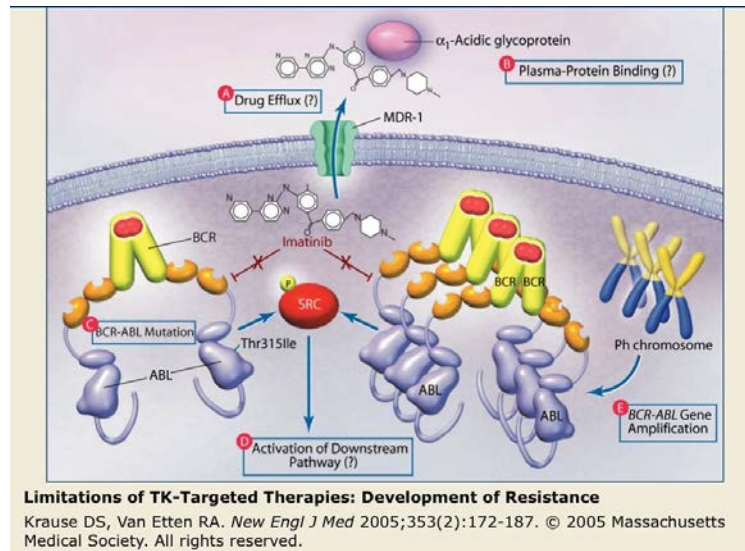


Figure 10 : Les principaux mécanismes de résistance à l'Imatinib : Les mécanismes de résistance sont soit indépendants de BCR-ABL (augmentation de l'efflux des drogues, séquestration extracellulaire des drogues, activation de tyrosine kinase secondaire, indépendance oncogénique des cellules souches...) soit dépendants de BCR-ABL (insensibilité des allèles BCR-ABL, surexpression de BCR-ABL...)

❖ Résistances indépendantes de la protéine de fusion BCR-ABL

Certaines résistances au traitement sont indépendantes à la protéine chimérique. Une augmentation du gène Multi Drug Resistance 1 (MDR1) codant pour la pompe à efflux glycoprotéine P entraîne l'expulsion de l'Imatinib dans le milieu extracellulaire. Au contraire, l'expression diminuée des gènes codant pour les pompes à influx dont la protéine Organic Cation Transporter (OCT-1) entraîne une baisse de la concentration d'Imatinib présente dans les cellules BCR-ABL (Hagop, 2007 ; Baker SJ. *et al.*, 2011).

L'inhibition de l'activité kinase de la protéine BCR-ABL peut être contournée par la cellule en augmentant l'activité des autres protéines kinases de la famille Src (Hck, Lyn, Fgr...) présentes dans les cellules myéloïdes. Ces dernières régulent les voies de transduction du signal dans la croissance cellulaire, la différenciation, la survie jouant donc un rôle important dans les cellules BCR-ABL⁺, dite Philadelphie⁺ (Hagop, 2007).

❖ Résistances dépendantes de la protéine de fusion BCR-ABL

Les résistances dépendantes de la protéine de fusion BCR-ABL sont liées à différents mécanismes. Ces résistances peuvent être dues à l'amplification du gène Bcr-Abl, à une

duplication du chromosome Philadelphie entraînant une augmentation de la production de la protéine de fusion BCR-ABL.

De nombreuses mutations ponctuelles (environ une cinquantaine décrite dans la littérature) modifient la conformation de la protéine de fusion entraînant une diminution voire une perte complète de l'interaction avec l'Imatinib (Baker SJ. *et al.*, 2011). La première mutation caractérisée est E255K. Mais, la mutation la plus importante et la plus fréquente est la mutation T315I entraînant une insensibilité complète à l'Imatinib et à de nombreux autres inhibiteurs de tyrosine kinase comme le Dasatinib (Turhan AG., 2005). Ces différentes mutations peuvent être déjà présentes au moment de l'introduction du traitement ou apparaître au cours du temps suite à l'instabilité génétique des cellules Philadelphie⁺.

Par ailleurs, la protéine de fusion BCR-ABL induit différentes voies de signalisation (JAK2, PI3K/AKT/mTOR, MAP Kinases). Or une surexpression de ces molécules comme de BCR-ABL peut être responsable de la résistance à l'Imatinib (Baker SJ. *et al.*, 2011 ; Hagop, 2007).

e) Surmonter les résistances

Pour surmonter ces nombreuses résistances à l'Imatinib, différentes alternatives ont été adoptées. Dans certains cas, en augmentant simplement les doses d'Imatinib, une réponse cytogénétique est retrouvée chez les patients. Néanmoins pour les résistances persistantes, dans un premier temps, de nouvelles générations d'inhibiteurs de tyrosine kinase ont été développées. Puis, dans un deuxième temps, de nouvelles stratégies thérapeutiques ont été étudiées ciblant les voies de signalisation suractivées dans les cellules BCR-ABL⁺.

❖ Nouvelles générations d'inhibiteurs de tyrosine kinase

Le Dasatinib et le Nilotinib, inhibiteurs de tyrosine kinase BCR-ABL, se lient au site de liaison à l'ATP de la protéine BCR-ABL. Ainsi, ils inhibent l'activité kinase mais aussi la prolifération cellulaire des cellules Philadelphie⁺. Ils sont utilisés dans les deux types de phases chronique ou accélérée des leucémies myéloïdes chroniques ou dans les cas de résistance ou d'intolérance à l'Imatinib offrant une meilleure réponse hématologique et cytogénétique. Le Nilotinib permet une réponse cytogénétique rapide et complète dans la phase chronique. Des cas de résistance au Dasatinib apparaissent notamment dus à des mutations dont V299L. Le Dasatinib et le Nilotinib sont inactifs pour les patients présentant la

mutation T315I ou sur la fraction des cellules souches leucémiques quiescentes (Baker SJ. *et al.*, 2011 ; Bitencourt R. *et al.*, 2011).

Le Bosutinib et le Bafetinib sont des inhibiteurs de la kinase ABL se liant au domaine kinase BCR-ABL. Ils bloquent alors la progression dans la maladie en entraînant une activité anti proliférative et pro apoptotique. Ils sont utilisés dans les cas de résistance ou d'intolérance à l'Imatinib (Bitencourt R. *et al.*, 2011). A forte concentration, le Bosutinib inhibe la protéine Multi Drug Resistance (MDR). Les molécules sont actives sur tous les mutants sauf sur celui portant la mutation T315I, et sur les cellules souches leucémiques quiescentes (Bitencourt R. *et al.*, 2011 ; Joha S., 2009).

Le Tozasertib cible la protéine BCR-ABL. Il provoque une activité anti proliférative et des effets pro apoptotiques. Il est actif contre toutes les mutations de la protéine BCR-ABL y compris T315I (Bitencourt R. *et al.*, 2011 ; Hagop 2007).

De nombreux nouveaux inhibiteurs de tyrosine kinase ont été synthétisés permettant de contrer les phénomènes de résistance vis-à-vis de l'Imatinib à court terme. Mais d'une part, les cellules BCR-ABL⁺ possèdent des capacités d'adaptation face à leur microenvironnement. D'autre part, l'instabilité génomique entraîne des mutations responsables de résistance aux thérapies. Les cellules leucémiques ont tendance toujours à échapper au traitement. Il faut en conséquence compléter la thérapie en ciblant également les voies de signalisation surexprimées dans les cellules BCR-ABL⁺. De plus, il a été montré que seule l'inhibition de l'activité kinase de la protéine de fusion n'était pas suffisante pour éradiquer toutes les cellules leucémiques. Les cellules souches leucémiques ont tendance à devenir indépendantes de l'activité BCR-ABL (Takahiro I., 2013). Ainsi, lors de l'introduction d'inhibiteurs de tyrosine kinase, ces cellules restent insensibles et deviennent alors responsables du seuil cellulaire basal leucémique résistant à l'origine des rechutes. Il faut développer d'autres stratégies ne ciblant pas uniquement BCR-ABL.

❖ Inhibiteurs des voies de signalisation induites par la protéine BCR-ABL

Par la suite, l'Imatinib a donc été associé à des inhibiteurs des voies de signalisation induites par la protéine de fusion BCR-ABL pour surmonter les résistances aux inhibiteurs de tyrosine kinase et éliminer davantage les cellules BCR-ABL⁺.

Les inhibiteurs de farnesyl transférase : Tipifarnib et Lanafarnib empêchent l'addition de groupement Farnesyl sur un résidu de cystéine dans le motif CAXX de la protéine Ras (Joha S., 2009). Or l'activité de la protéine Ras est dépendante de ce groupement. Donc en présence de ces inhibiteurs, la protéine Ras est inactive (Hagop, 2007). Des inhibiteurs de MEK1/2 dont PD184352 sont utilisés en synergie avec l'Imatinib ou le Dasatinib induisant l'apoptose (Joha S., 2009). Enfin, des inhibiteurs de la voie *PI3K/AKT/mTOR* peuvent être utilisés (Hagop, 2007 ; Vakana E. *et al.*, 2010). Le RAD001 (Everolimus), un dérivé de Rapamycine, inhibiteur de l'activité de mTORC2 (Mancini M. *et al.*, 2010) arrête le cycle cellulaire entraînant l'apoptose. Un inhibiteur de la protéine chaperonne HSP90 empêche la stabilisation de la protéine AKT par la protéine chaperonne conduisant à la dégradation de la protéine AKT.

Ces molécules en association avec les TKI permettent d'obtenir une synergie d'action offrant au patient une réponse plus ciblée et forte vis-à-vis de la pathologie. Le développement de nouvelles thérapies ciblant les voies de signalisation suractivées par BCR-ABL est très important.

III) Mélanome

A) Développement

Le mélanome est la forme la plus agressive du cancer de la peau (Katayoun I. *et al.*, 2005). Le rayonnement UV (Bauer J. et Garbe C., 2003 ; Bliss *et al.*, 1995) ainsi que le terrain génétique sont des facteurs prédisposants qui favorisent la transformation maligne des mélanocytes (Katayoun I. *et al.*, 2005 ; Ueda Y. *et al.*, 2006). Le risque est d'autant plus élevé chez les personnes à peau claire. (Bauer J. et Garbe C., 2003 ; Bliss JM. *et al.*, 1995 ; Ueda Y. *et al.*, 2006). Le mélanome débute dans les mélanocytes, spécialisés dans la production du pigment, présents dans la couche basale de l'épiderme ou dans l'œil (Hurst EA. *et al.*, 2003). La pigmentation de la peau protège contre les dommages créés par les irradiations UV (Gilchrest BA. *et al.*, 1999). Le mélanome progresse suite à des lésions pigmentées (Ueda Y. *et al.*, 2006). L'accumulation des mutations permet la progression du mélanome, son passage dans les différentes phases. (Katayoun I. *et al.*, 2005). L'évolution du mélanome se caractérise par plusieurs phases (Figure 11) (Ostyn P., 2016). Premièrement, l'apparition des nevus

bénins correspond à la mise en place de la formation du mélanome. Leur transformation en nevi dysplasiques est la deuxième étape montrant une augmentation de l'atypie structurale et architecturale (Clark WH., 1991 ; Clark WH. *et al.*, 1989 ; Koh HK., 1991 ; Mooi WJ., 1997 ; Parmiter AH. et Nowell PC., 1993). La troisième étape est le premier stade malin reconnaissable défini comme la progression de la tumeur du mélanome latéralement confinée dans l'épiderme correspondant à la phase de croissance radiale (RGP : Radial Growth Phase) du mélanome primaire (Clark WH., 1991). Dans cette phase, les cellules restent localement invasives et ne présentent pas de potentiel métastatique. La phase de croissance radiale évolue vers la phase de croissance verticale (VGP : Vertical Growth Phase) (Clark WH., 1991). Dans cette quatrième étape, les cellules de mélanomes infiltrent et envahissent le derme comme un large cluster de cellules, augmentant le potentiel métastatique. La dernière étape dans ce processus est l'invasion métastatique (Clark WH., 1991 ; Katayoun I. *et al.*, 2005 ; Ueda Y *et al.*, 2006). La progression du mélanome résulte donc en l'accumulation de défauts génétiques intrinsèques des mélanocytes. L'importance du microenvironnement tumoral dans le contrôle de la croissance, de la différenciation, de l'invasion et du métastase augmente la complexité du développement tumoral du mélanome et à sa compréhension. En raison de la complexité de la maladie, le mélanome est résistant aux chimiothérapies classiques telles que la Décabazine, Témazolomide à un stade métastatique (Sun W. et Schuschter LM., 2001 ; Balch CM. et Cascinelli N., 2001 ; Sondak *et al.*, 2001). Les patients à un stade métastatique ont une espérance de survie de 6 à 10 mois (Katayoun I. *et al.*, 2005, Ueda Y. *et al.*, 2006). Au contraire, les patients dans la phase radiale de croissance peuvent être traités par chirurgie avec ablation de la tumeur avec succès avec un faible risque d'échappement de la tumeur ou de métastases (Ueda Y. *et al.*, 2006).

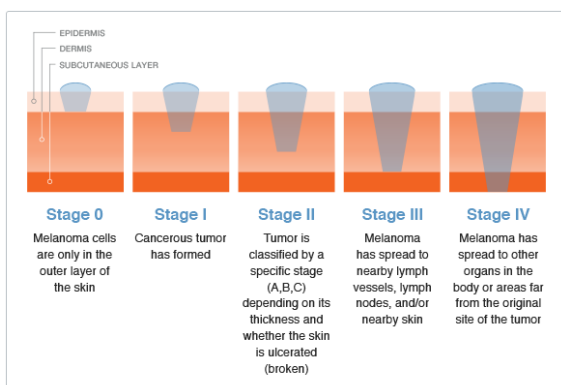


Figure 11 : *Différents stades du mélanome :* Stade 1 : Formation de nevi bénins correspond à la mise en place de la formation du mélanome. Stade 2 : Transformation des nevi bénins en nevi dysplasiques. Stade 3 : Premier stade malin correspondant à la phase de croissance radiale (RGP : Radial Growth Phase). Stade 4 : Evolution de la phase de croissance radiale vers la phase de croissance verticale (VGP : Vertical Growth Phase) (<https://www.yervoy.com/understanding-metastatic-melanoma>)

La classification de la tumeur est basée sur l'épaisseur de la tumeur, le degré d'envahissement ganglionnaire, la présence d'ulcération, la profondeur de pénétration et la localisation de métastases. L'évaluation des lésions cutanées se fait par une dermatoscopie. Si la lésion est suspecte, une biopsie peut être réalisée. Pour établir un diagnostic précoce, les dermatologues utilisent la règle dite de « l'ABCDE » (Shenenberger DW. *et al.*, 2012) pour identifier les signes d'une lésion : une asymétrie (A), des bords irréguliers (B), un changement de couleur (C), une augmentation du diamètre (D) et une évolution (E) (Figure 12) (Ostyn P. 2016).

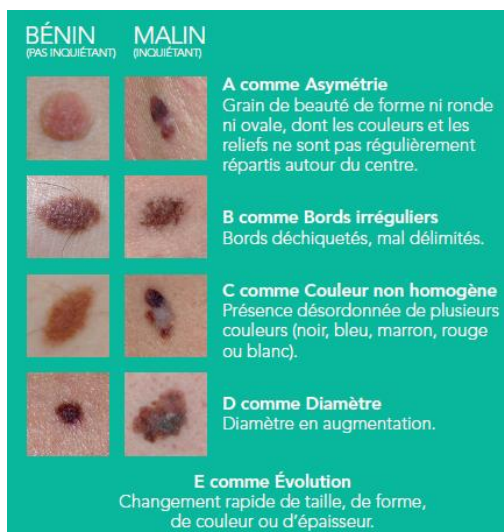


Figure 12 : La règle ABCDE : Asymétrie (A), des Bords irréguliers (B), un changement de Couleur (C), une augmentation du Diamètre (D) et une Evolution (E). (Institut National du Cancer)

Lors du développement du mélanome, les différentes voies de signalisation sont activées dont la voie majeure Ras/B-Raf/MERK/ERK. Suite à la fixation des facteurs de croissance sur les récepteurs tyrosine kinase, la voie de signalisation Ras/B-Raf/MERK/ERK est activée favorisant l'activation du cycle cellulaire : le passage de la phase G1 en phase S (Figure 13). Les cellules quiescentes entrent alors en prolifération. L'activation du cycle cellulaire est contrôlée par le degré d'activation de la protéine Ras de la voie de signalisation. (Chambard JC. *et al.*, 2007). Mais dans 50% des cas de mélanomes, la protéine B-Raf est mutée majoritairement sur son acide aminé 600 au niveau du domaine kinase entraînant son activation constitutive et par conséquent une prolifération incontrôlée des cellules de mélanome (Figure 13) (Foletto MC. et Haas SE., 2014 ; Lo JA. et Fisher DE., 2014 ; Regad T., 2013 ; Ilieva KM. *et al.*, 2014 ; Hu-Lieskovan S. *et al.*, 2014)

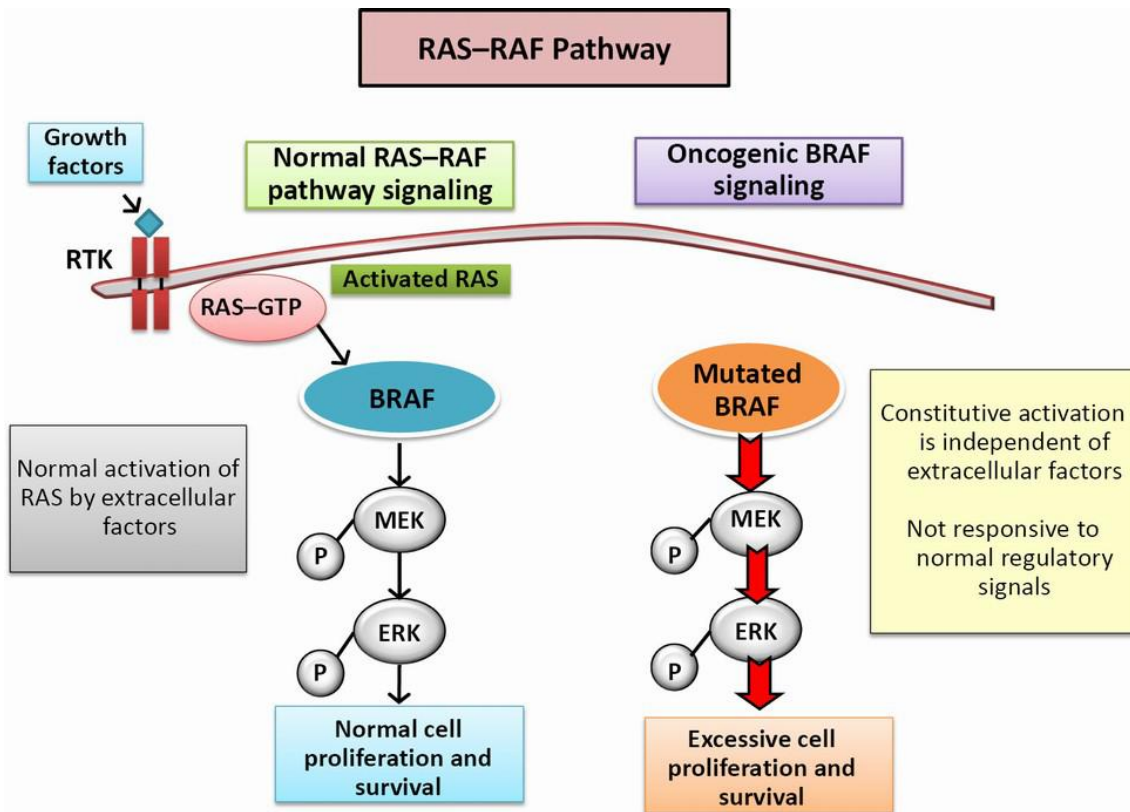


Figure 13 : La voie de signalisation Ras/B-Raf/MERK/ERK : Les facteurs de croissance se fixent sur un récepteur tyrosine kinase. Ce dernier active la protéine Ras alors couplée avec la molécule de GTP. A son tour, la protéine Ras active la protéine B-Raf qui phosphoryle MEK qui à son tour phosphoryle ERK favorisant ainsi la prolifération et la survie cellulaire (voie de signalisation de gauche). Mais, lorsque B-Raf est mutée, la protéine devient constitutivement active et indépendante des signaux extracellulaires. La protéine B-Raf mutée phosphoryle MEK qui phosphoryle à son tour ERK induisant une prolifération incontrôlée et la survie cellulaire (Munoz-Couselo *et al.*, 2015).

B) Traitements

Selon le stade d'évolution du mélanome, différentes stratégies thérapeutiques peuvent être choisies. Néanmoins, le stade métastatique reste difficile à traiter étant résistant aux chimiothérapies classiques telles que la Dacarbazine ou le Témzolomide, des agents alkylants. Un acte de chirurgie seul pour éliminer la tumeur ne peut être envisagé pour ces cas étant donné que la tumeur est dispersée dans l'ensemble du corps (Ostyn P., 2016).

1) Chirurgie

La chirurgie est un moyen efficace d'éliminer la tumeur à un stade de croissance radiale. Pour éliminer tout risque de rechute, l'excision de la tumeur peut être accompagnée de chimiothérapie (Ostyn P., 2016).

2) Chimiothérapie

L'agent alkylant la Dacarbazine, chef de file est la première chimiothérapie utilisée. Un dérivé de la Dacarbazine, le Témozolamide peut être également utilisé ainsi qu'un 3^{ème} composé : le Fotemustine. Cependant, leurs taux de réponse sont trop faibles et de plus en plus lorsque le mélanome évolue vers le stade métastatique. De plus, les effets secondaires sont nombreux. Ces différentes chimiothérapies ne peuvent donc pas être utilisées seules pour lutter efficacement contre le développement du mélanome (Ostyn P., 2016).

3) Thérapie ciblée

La compréhension des mécanismes permettant le développement du mélanome a permis de développer de nouvelles stratégies ciblant directement des acteurs majeurs du mélanome comme la protéine BRAF mutée ou la protéine MEK suractivée. Ainsi, un inhibiteur spécifique de la protéine BRAF mutée : le Vemurafenib est utilisé dans les cas de mélanome métastatique ou de rechute chez les patients présentant la mutation majoritaire V600E. Il permet une diminution de la tumeur totale ou partielle augmentant la survie des patients. A long terme, les patients traités acquièrent de nouvelles mutations sur la protéine BRAF (Munoz-Causelo E. *et al.*, 2015) les rendant résistant à l'effet de la drogue entraînant leur rechute. La résistance au traitement peut être aussi due à une suractivation des différentes voies de signalisation telles que la voie des MAPK, la voie PI3K/AKT (Munoz-Causelo E. *et al.*, 2015). Ainsi, différents inhibiteurs ciblant ces voies de signalisation peuvent être utilisés en synergie d'action avec les inhibiteurs de la protéine BRAF pour augmenter l'efficacité du traitement (Menzies AM. et Long. GV., 2014).

4) Immunothérapie

Etant donné, la présence d'un lien entre le système immunitaire et le développement du mélanome, le recours à l'immunothérapie peut être envisagé notamment via l'usage d'un anticorps anti CTLA4 (Cytotoxique T Lymphocyte Antigen 4) : l'Ipilimumab dans des cas de mélanome métastatique suite à un échec de chimiothérapie et la présence d'une rechute. L'Ipilimumab permet une augmentation de la survie de plusieurs années. Néanmoins, ce traitement présente aussi des effets secondaires touchant différents organes (la peau, le tube digestif, le foie ou l'axe hypothalamo-hypophysaire). Des inhibiteurs de la liaison PD1/PDL1 tels que le Pembrolizumab et le Nivolumab sont également utilisés pour rétablir la réponse

immunitaire anti-tumorale des lymphocytes T. Ces deux inhibiteurs permettent d'augmenter la durée de survie des patients (Routier E. *et al.*, 2014 ; Menzies AM. et Long GV., 2014 ; Ilieva KM. *et al.*, 2014 ; Spagnolo F. *et al.*, 2014 ; Davey RJ. *et al.*, 2016).

IV) CELLULES SOUCHES

A) Généralités

Les cellules souches se caractérisent par leurs capacités de différenciation et d'auto-renouvellement. Il existe différents types de cellules souches. Les cellules souches totipotentes peuvent former tous les types cellulaires de l'organisme (Figure 14). Les cellules souches pluripotentes donnent les différents tissus issus des trois feuilletts embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) après différenciation. Les cellules souches multipotentes conduisent à quatre types cellulaires différents après différenciation (Figure 14). Mais leurs capacités de différenciation sont moindres que celles des pluripotentes. Enfin, les cellules souches unipotentes ne peuvent donner qu'un seul type cellulaire (Mauzon M., 2011)

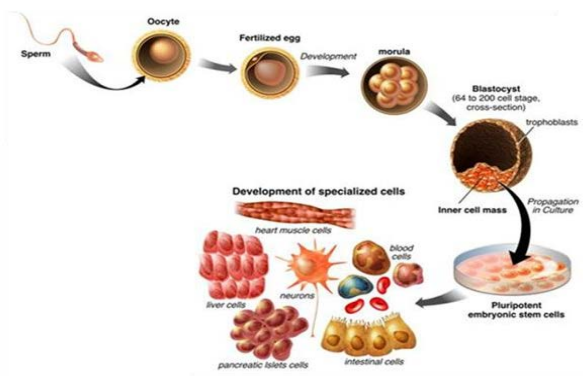


Figure 14 : Les différents types de cellules souches à partir du développement embryonnaire : Au cours du développement embryonnaire, les cellules souches embryonnaires en devenant pluripotentes sont capables de donner différents types cellulaires (cellules sanguines, intestinales, pancréatiques, hépatiques, musculaires, neurones) (<https://fr.pinterest.com/pin/385691155561975602/>) et modifié de Latreche-Carton C., 2017.

Nous nous concentrerons sur les cellules souches hématopoïétiques et de mélanome.

B) Cellules souches hématopoïétiques

1) Cellules souches saines

Les cellules souches hématopoïétiques, sont des cellules souches adultes donnant les trois types de cellules sanguines : les globules blancs, les globules rouges, les plaquettes (Figure 15). Elles représentent 0,01 à 0,05 % des cellules médullaires. Les cellules souches

hématopoïétiques possèdent deux caractéristiques majeures. D'une part, elles sont capables de s'auto-renouveler pour maintenir un stock constant dans la moelle osseuse. D'autre part, elles peuvent se différencier pour donner différents types cellulaires sanguins mais aussi non hématopoïétiques (adipocytes, cardiomyocytes, cellules endothéliales, cellules pancréatiques). Ainsi, les cellules souches hématopoïétiques peuvent soit s'auto-renouveler soit se différencier. Il existe donc une balance régulée par de nombreux facteurs tels que les facteurs de transcription, de croissance, de développement, des protéines de liaison ADN/ARN, des facteurs associés à la chromatine, des chimiokines, des cytokines (SCF, Thromboplastine, NOTCH, angiopoïétine, prostaglandines...) (Mosaad YM., 2014 ; Testa U., 2011).

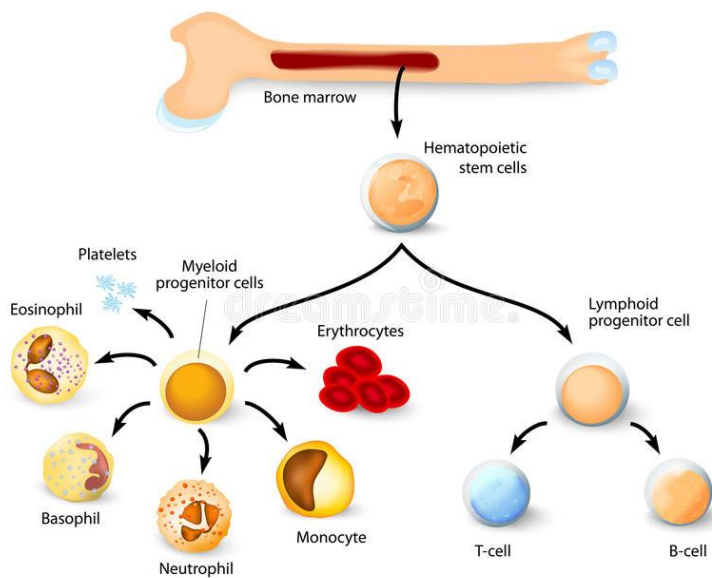


Figure 15 : Les différents types de cellules souches hématopoïétiques. Les cellules souches hématopoïétiques se différencient en 2 progéniteurs : les cellules progénitrices lymphoïdes et les cellules progénitrices myéloïdes. Les cellules progénitrices lymphoïdes se différencient en cellules-T et en cellules-B. Les cellules progénitrices myéloïdes se différencient en différents types cellulaires : les érythrocytes, les monocytes, les neutrophiles, les basophiles, les éosinophiles, les plaquettes (Dreamstime).

Les cellules souches hématopoïétiques sont localisées dans des microdomaines tissulaires appelés niches de la moelle osseuse. Les niches jouent un rôle protecteur des cellules souches hématopoïétiques face au stress cellulaire (métabolisme oxydatif, erreurs de réplication, mutations...). Ce microenvironnement composé d'ostéoblastes, d'ostéoclastes, de cellules souches mésenchymateuses, de cellules stromales périvasculaires et de cellules endothéliales sinusoidales et de cellules immunitaires permettant aux cellules souches de s'auto-renouveler ou de se maintenir dans un état de quiescence ou de se lancer dans le processus de différenciation ou encore de proliférer après stimulation pour réparer des tissus et/ou pour le renouvellement des tissus (Mosaad YM., 2014). Ainsi, les niches permettent la régulation de l'équilibre de la balance auto-renouvellement/différenciation. Il existe deux types de niches : la niche ostéoblastique située dans la moelle osseuse et la niche vasculaire

localisée à proximité du sang circulant. Chacune des niches a un rôle qui lui est propre et complémentaire (Mosaad YM., 2014).

La niche ostéoblastique se situe dans la partie spongieuse des os longs au niveau des travées osseuses à la jonction épiphyse métaphyse. Elle est composée d'ostéoblastes, d'ostéocastes, de cellules corticales et trabéculaires. Les ostéoblastes sont des éléments majeurs de la niche. Leur nombre est proportionnel au nombre de cellules souches hématopoïétiques présentes dans la niche. De plus, les ostéoblastes sont le producteur principal de CXCL-12 (nommé également SDF-1 Stroma cell Derived Factor-1), une chimiokine essentielle maintenant les cellules souches hématopoïétiques dans la niche. Il y a également des familles de molécules d'adhésion comme la N-cadhérine et l'intégrine VLA-4. Cette adhérence est renforcée par l'activation de la voie JAK/STAT, du récepteur Notch (Notch1 ou 2) présent à la surface des cellules souches hématopoïétiques. (Mosaad YM., 2014). De plus, les cellules souches hématopoïétiques sont dans un environnement hypoxique (avec un taux d'oxygène très bas et une expression du facteur hypoxique HIF1 α élevée) et hypercalcémique (avec un taux élevé de calcium). Ces deux paramètres favorisent l'état de quiescence et le maintien dans la niche ostéoblastique respectivement (Mosaad YM., 2014 ; Testa U., 2011).

La niche vasculaire forme des petits vaisseaux sanguins. Cette niche sert d'intermédiaire permettant aux cellules souches hématopoïétiques après maturation de migrer de la niche ostéoblastique vers le sang circulant. Cette niche est composée de cellules endothéliales, d'artérioles, de cellules réticulaires, stromales périvasculaires, de cellules souches mésenchymateuses, de neurones. Elle présente un taux d'oxygène élevé se traduisant par une diminution d'expression du facteur HIF1 α et un taux calcémique au contraire faible favorisant donc la différenciation des cellules souches hématopoïétiques qui entrent également en cycle (Mosaad YM., 2014).

Les cellules souches hématopoïétiques sont à l'origine des différentes cellules sanguines. Les différentes étapes permettant d'obtenir des cellules sanguines matures composent l'hématopoïèse. Il existe 2 modèles (Figure 16).

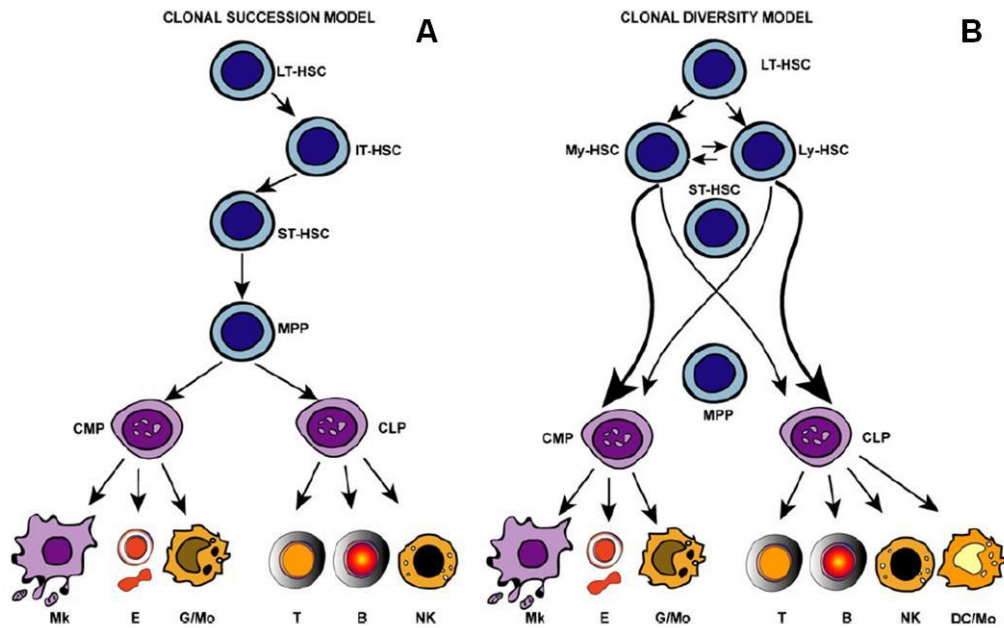


Figure 16 : Les différents modèles de l'hématopoïèse : (A) Le modèle de succession clonale : le modèle historique. Les cellules souches hématopoïétiques à long terme (LT-HSC) se différencient en cellules souches hématopoïétiques à terme intermédiaire (IT-HSC) qui se différencient elles-mêmes en cellules souches hématopoïétiques à court terme (ST-HSC). Ces dernières se différencient en progéniteurs multipotents (MPP) qui peuvent donner deux types cellulaires progéniteurs de cellules souches : les cellules progénitrices myéloïdes (CMP) et les cellules progénitrices lymphoïdes (CLP). Les premières se différencient en érythrocytes, monocytes, mégacaryocytes. Les deuxièmes se différencient en cellules NK, en cellules-T, en cellules-B. (B) Le modèle de diversité clonale : les cellules souches hématopoïétiques à long terme (LT-HSC) se différencient en cellules souches myéloïdes (My-HSC) et en cellules souches lymphoïdes (Ly-HSC). Ces cellules peuvent se transformer en cellules souches myéloïdes ou inversement les cellules souches myéloïdes peuvent se transformer en cellules souches lymphoïdes. Les cellules souches myéloïdes se transforment en cellules progénitrices myéloïdes (CMP) qui se différencient en érythrocytes, monocytes, mégacaryocytes. Les cellules souches lymphoïdes se transforment en cellules progénitrices lymphoïdes (CLP) qui se différencient en cellules-T, cellules-B, cellules NK. (Testa U. 2011)

Le modèle historique est composé de quatre phases (Figure 16A). Au départ des cellules souches deviennent des progéniteurs qui se différencient en précurseurs et qui à leur tour donnent des cellules matures. Lors de la première étape, la cellule souche hématopoïétique (HSC) reçoit un signal via un facteur de croissance de se différencier en un progéniteur soit lymphoïde (HSC-L) soit myéloïde (HSC-GEMM). Cette étape de différenciation entraîne la perte de la totipotence de ces progéniteurs qui deviennent pluripotents. Néanmoins, ils gardent la même morphologie que les cellules souches hématopoïétiques et une capacité de renouvellement réduite. Les cellules progénitrices acquièrent de nouveaux marqueurs (CD34, HLA-DR...). Pendant la deuxième étape, les cellules progénitrices se différencient pour donner des précurseurs. Ainsi, les cellules progénitrices lymphoïdes donnent des lymphoblastes tandis que les cellules progénitrices myéloïdes donnent des érythroblastes, des

monoblastes, des myéloblastes et des mégacaryoblastes. L'ensemble de ces précurseurs perd sa capacité d'auto-renouvellement mais acquiert une morphologie polymorphique reconnaissable sur un frottis médullaire. Au cours de la troisième étape, les précurseurs se multiplient et entament leur maturation pour donner des cellules matures. Au cours de cette maturation, les précurseurs acquièrent des modifications morphologiques successives. Une partie de ces modifications sont communes telles que la réduction de la taille cellulaire et du rapport nucléoplasmique, la condensation de la chromatine, la disparition des nucléoles. L'autre partie est spécifique de la lignée obtenue notamment via l'apparition de marqueurs membranaires spécifiques et caractéristiques. Par exemple, la lignée érythrocytaire perd son noyau et se met à produire de l'hémoglobine tandis que la lignée granulocytaire a une polylobulation du noyau et des granulations cytoplasmiques (Mosaad YM., 2001 ; Testa U., 2011).

Le deuxième modèle fait appel à plusieurs cellules souches hématopoïétiques capables de donner les différents types cellulaires du sang périphérique (Figure 16B). La programmation de la formation de ces cellules dépend des stimulations du microenvironnement. De plus en plus d'études confirment et valident le deuxième modèle en prouvant l'existence de cellules souches hématopoïétiques "à la base des cellules myéloïdes" et de cellules souches hématopoïétiques "à la base des cellules lymphoïdes". Ces deux types cellulaires répondent différemment à la stimulation de TGF- β 1. Ainsi une stimulation de TGF- β 1 induit la prolifération des cellules souches hématopoïétiques "à la base des cellules myéloïdes" et au contraire inhibe la prolifération des cellules souches hématopoïétiques "à la base des cellules lymphoïdes" (Testa U., 2011).

Au cours de la différenciation et de la maturation, les cellules expriment différents marqueurs membranaires. Le marqueur le plus important est le CD34 exprimé par 0,5 à 5% des cellules de la moelle osseuse. Il est présent chez les cellules progénitrices mais absent des cellules matures. Le marqueur CD38 est exprimé que chez les progéniteurs des monocytes, des érythrocytes, des NK. Au contraire, le CD90 est présent uniquement dans les cellules souches hématopoïétiques. Le CD10 est exprimé chez les progéniteurs lymphoïdes. Quant au CD45RA⁻, il est exprimé dans les progéniteurs communs myéloïdes (Mosaad YM., 2014).

L'hématopoïèse est régulée par des facteurs de croissance stimulateurs, des facteurs répresseurs, le système médullaire.

Les facteurs de croissance hématopoïétiques sont synthétisés par des cellules sanguines, endothéliales, des fibroblastes, des macrophages, des lymphocytes. L'ensemble de ces cellules se trouve dans le stroma médullaire et produit les facteurs de croissance hématopoïétiques dans la moelle osseuse. Ces facteurs de croissance hématopoïétiques sont des glycoprotéines de la famille des cytokines qui stimulent l'hématopoïèse en se fixant sur des récepteurs membranaires de grande affinité. Ces facteurs régulent la croissance et les fonctions des cellules sanguines (en mode paracrine ou autocrine).

Parmi, les facteurs de croissance sont composés de :

- facteurs de promotion (IL1, IL4, IL6, SCF : Stem Cell Factor) : ils augmentent le nombre de cellules souches en cycle cellulaire et sensibilisent les cellules souches totipotentes à l'action des autres facteurs de croissance

- facteurs multipotents (GM-CSF, IL3) : ils permettent la survie et la différenciation des cellules souches les plus immatures lorsque celles-ci ont déjà été sensibilisées par les facteurs de promotion présentes au stade précoce de l'hématopoïèse (cellules souches et jeunes progéniteurs).

- facteurs restreints (EPO, IL5, G-CSF, IL4, M-CSF, IL6, TPO, IL7) : ils agissent sur les cellules souches déjà engagées (précurseurs) en favorisant leur multiplication et la maturation lignée dépendant présentes à un stade final de l'hématopoïèse.

Les facteurs de régulation négative inhibent l'hématopoïèse de façon générale ou spécifique. Le TGF β (Transforming Growth Factor β) inhibe la croissance des progéniteurs précoces *in vitro*. Le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) est produit par les monocytes et les lymphocytes T. Les interférons sont produits par de nombreuses cellules dont les lymphocytes notamment lorsqu'elles sont attaquées par un virus. Ils sont anti-mitotiques (anti-virales) et activent les macrophages et la phagocytose.

Enfin, le stroma médullaire est un tissu de soutien et de nutrition pour toutes les cellules hématopoïétiques. Il est constitué de différents types cellulaires : les cellules de la matrice cellulaire osseuse, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les adipocytes, les lymphocytes T, les monocytes-macrophages, les cellules musculaires lisses baignants dans une matrice extracellulaire. Cette matrice extracellulaire est sécrétée par les cellules du stroma formant un réservoir de facteurs de régulation de l'hématopoïèse.

Ainsi, chaque phase (état de quiescence, auto-renouvellement, différenciation) est régulée par différents facteurs présents dans le microenvironnement.

2) Cellules souches leucémiques

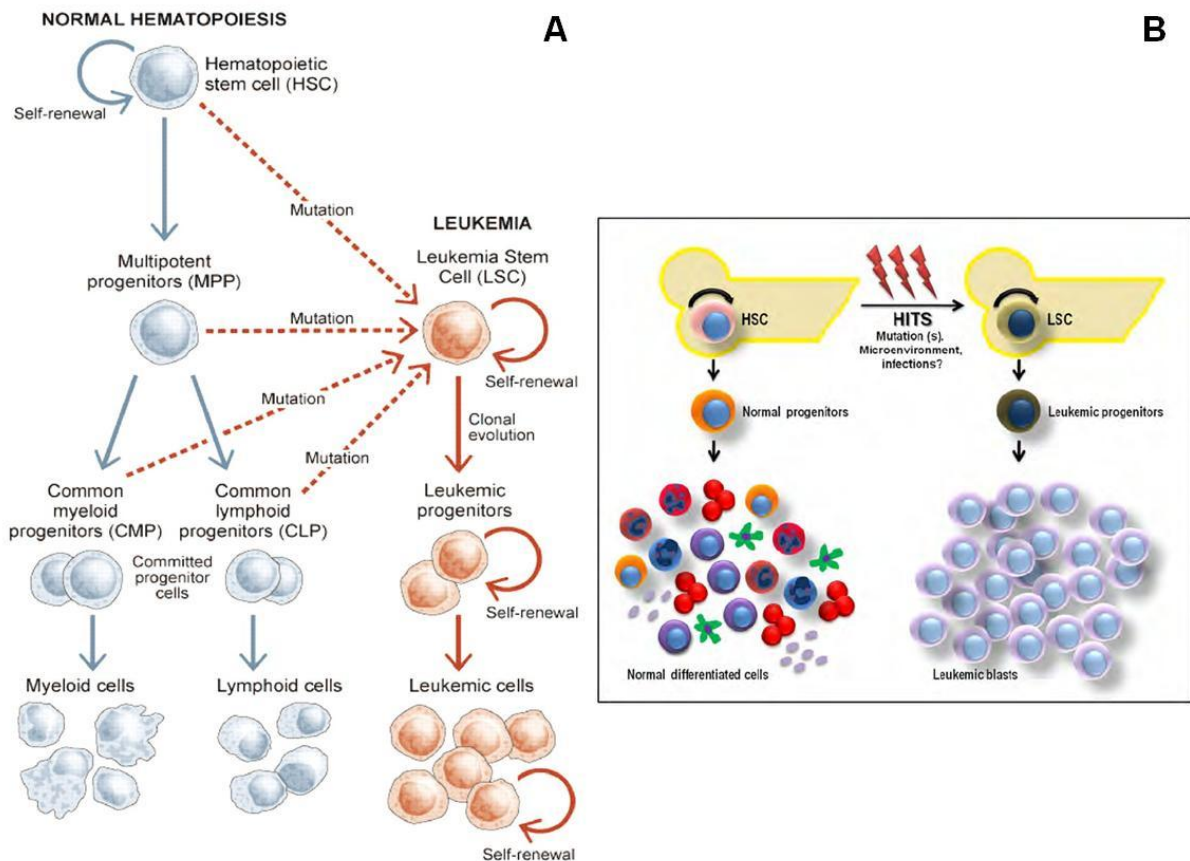


Figure 17 : *Le passage des cellules souches hématopoïétiques en cellules souches leucémiques :* (A) L'acquisition de mutations dans les cellules souches hématopoïétiques, les progéniteurs multipotents, les cellules progénitrices myéloïdes, les cellules progénitrices lymphoïdes transforment ces cellules en cellules souches leucémiques. Ces dernières comme les cellules progénitrices leucémiques, et les cellules leucémiques sont capables de s'auto renouveler. (Martinez-Climent JA, 2010). (B) Les cellules souches hématopoïétiques se transforment en cellules progénitrices qui se différencient en différentes cellules. Ces cellules souches hématopoïétiques subissent des mutations donnant les cellules souches leucémiques qui se transforment en progéniteurs leucémiques qui évoluent en blastes leucémiques. (Pelayo R. *et al.*, 2012)

Une suractivation des voies de signalisation, des événements épigénétiques anormaux et un microenvironnement altéré entraînent une augmentation de prolifération des cellules souches hématopoïétiques devenant les cellules souches leucémiques (Figure 17). Ces dernières acquièrent alors un nouveau phénotype $CD34^+ CD38^- CD45RA^- CD71^- HLA^-$ qui reste relativement proche de celui des cellules souches hématopoïétiques ($CD34^+ CD38^-$). L'ensemble de ces événements favorise donc à la fois un état de non différenciation des

cellules souches leucémiques, la survie, la prolifération des cellules souches leucémiques progénitrices mais aussi la différenciation de ces progéniteurs en différentes lignées. Ainsi, de nombreuses études ont montré que les cellules souches leucémiques pluripotentes sont responsables du développement de la leucémie myéloïde chronique chez les patients. En effet, ces progéniteurs leucémiques ont des capacités de prolifération plus fortes et élevées que les progéniteurs sains (Zhou H. et Xu R., 2015).

Le programme d'auto-renouvellement dirigé par la protéine Sonic Hedgehog, un morphogène, responsable du développement embryonnaire (Gupta S., 2010) est suractivé de façon aberrante induisant le développement des cellules souches leucémiques dans un modèle murin de leucémie myéloïde chronique. (Zhou H et Xu R, 2015).

Par ailleurs, la voie de signalisation Wnt1 et le facteur de transcription Bmi1 sont impliqués dans la régulation et l'expansion des cellules souches leucémiques dans la phase blastique de la leucémie myéloïde chronique. (Chen JC. *et al.*, 1994 ; Reya T. *et al.*, 2001 ; Saady NS. *et al.*, 2014 ; Lowe SW. et Sherr CJ., 2003 ; Zhou H. et Xu R., 2015). CD34⁺, CD38⁻ jouent également un rôle majeur dans la prolifération mais aussi dans la survie des cellules souches leucémiques. (Zhou H. et Xu R., 2015).

Les cellules souches leucémiques sont aussi résistantes à l'apoptose grâce à une expression anormale de la famille Bcl2. De plus, la production autocrine de TNF α favorise la survie et la prolifération des cellules souches leucémiques et progénitrices (Zhou H. et Xu R., 2015).

Les cellules souches leucémiques présentent une diminution de la différenciation, de la voie de signalisation TGF β /BMP, une augmentation du métabolisme oxydatif, des systèmes de réparation de l'ADN, de l'activation des cytokines inflammatoires (Zhou H. et Xu R., 2015).

Ainsi, les cellules souches leucémiques représentent la "réserve", la niche, dans la moelle osseuse. Elles favorisent la progression de la leucémie vers la phase blastique. (Zhou H. et Xu R., 2015)

Les cellules souches leucémiques résistantes aux chimiothérapies et aux TKI en phase quiescence entraînent la progression de la leucémie vers la phase blastique. Ceci peut être dû à la protéine déacétylase SIRT1 qui régule l'acétylation de nombreux facteurs de transcription tel que p53, est surexprimée dans les cellules leucémiques CD34⁺ causant l'accumulation de

mutations génétiques entraînant la résistance des cellules leucémiques aux traitements tels qu'aux TKI voire une rechute. Il est donc nécessaire d'utiliser des inhibiteurs ciblant plus précisément ces cellules souches leucémiques en bloquant par exemple la survie à l'aide d'inhibiteurs de Bcl2, Sonic Hedgehog, Bmi1, Notch, Wnt ; en activant la différenciation via la voie JAK2/STAT5 et les gènes HoxA (Zhou H. et Xu R., 2015).

C) Cellules souches de la peau

1) Cellules souches saines

Les cellules souches saines peuvent s'autorenouveler, générer un tissu et présentent des marqueurs de surface. Elles correspondent à un mélange de cellules souches de différentes provenances : la crête neurale, les mélanocytes ou encore l'épiderme se situent dans le « bulge » au niveau de la gaine externe des follicules pileux sous la glande sébacée (Figure 18). Comme toutes cellules souches, elles sont capables de se différencier en follicules pileux, glandes sébacées, épiderme (Lander AD. *et al.*, 2012)

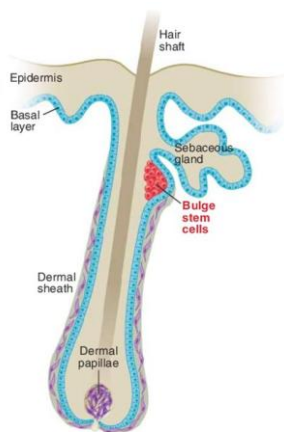


Figure 18 : La localisation des cellules souches de la peau : Le mélange des cellules souches provenant de la crête neurale, des mélanocytes, de l'épiderme est localisé au niveau du bulge (Moore KA. et Lemischka IR., 2009).

2) Cellules souches de mélanome

Comme dans les cas de leucémies, elles participent aussi aux différentes phases du développement du mélanome (initiation, progression, chimiorésistance, rechute). Ces cellules souches présentent différents marqueurs : CD133⁺, la pompe à efflux ABCB5, p75. La présence de sous-groupes ne permet pas d'exclure la présence d'autres marqueurs cellulaires ou l'absence de ces marqueurs précédemment cités (Quintana E. *et al.*, 2008, Boiko AD. *et al.*, 2010). La dynamique des cellules souches étant très importante, il est difficile de

déterminer des marqueurs de cellules caractéristiques de chaque phase ou de chaque sous population.

V) L'apoptose

L'apoptose est un mécanisme de mort programmée des cellules essentiel pour le maintien de l'équilibre entre le renouvellement avec l'arrivée de nouvelles cellules et l'élimination des cellules âgées, abîmées... conservant le nombre de cellules présentes dans l'organisme constant. Ainsi, l'homéostasie est maintenue. L'apoptose est aussi un mécanisme de protection et de défense contre les cellules endommagées, infectées par des virus, stimulées par des agents pathogènes en évitant l'accumulation des cellules non fonctionnelles dans les tissus. La voie de l'apoptose est activée lors de la détection d'anomalies telles que des modifications génétiques, des aberrations de l'ADN, d'un déséquilibre de l'homéostasie cellulaire, de l'hypoxie, d'un nombre insuffisant de facteurs de survie. Lorsque le mécanisme d'apoptose n'a pas lieu, les cellules mutées s'accumulent et continuent de proliférer de façon incontrôlée comme dans les cas de cancer, du SIDA, des maladies auto-immunes, neurodégénératives (Kiraz Y. *et al.*, 2016 ; Green DR. et Lambi F., 2015).

A) Processus biochimique et morphologique de l'apoptose

L'apoptose se compose de plusieurs étapes (Figure 19A). Elle est initiée lorsque la cellule reçoit des signaux de mort, ou qu'elle n'interagit plus avec son microenvironnement. Dans un premier temps, les phosphatidylsérines basculent de la phase interne à celle externe de la membrane cytoplasmique par un mouvement de flip-flop (Figure 19C). De plus, cette membrane se rompt. De même, les protéines participant à la formation des jonctions serrées telles que l'actine, la β -caténine, la spectrine et la Gas2 sont désactivées après clivage par les caspases (Figure 19D). Le contenu cytoplasmique est alors enfermé dans des corps apoptotiques éliminés par phagocytose. Les organites sont détruits. Dans un deuxième temps, la membrane nucléaire se rompt à son tour. La chromatine se condense : il s'agit de l'étape pyknosis (Figure 19B). Lors de l'étape karyorrhexis, l'ADN est morcellé en fragments de 180 à 200 bp par les caspases, et par des facteurs de fragmentation de l'ADN (DFF) et des endonucléases (Figure 19B). L'apoptose dure de 30 à 120 min. L'ensemble des débris est

englouti par les cellules environnantes. Au bout de 24 H, les cellules mortes ne sont plus détectables (Kiraz Y. *et al.*, 2016).

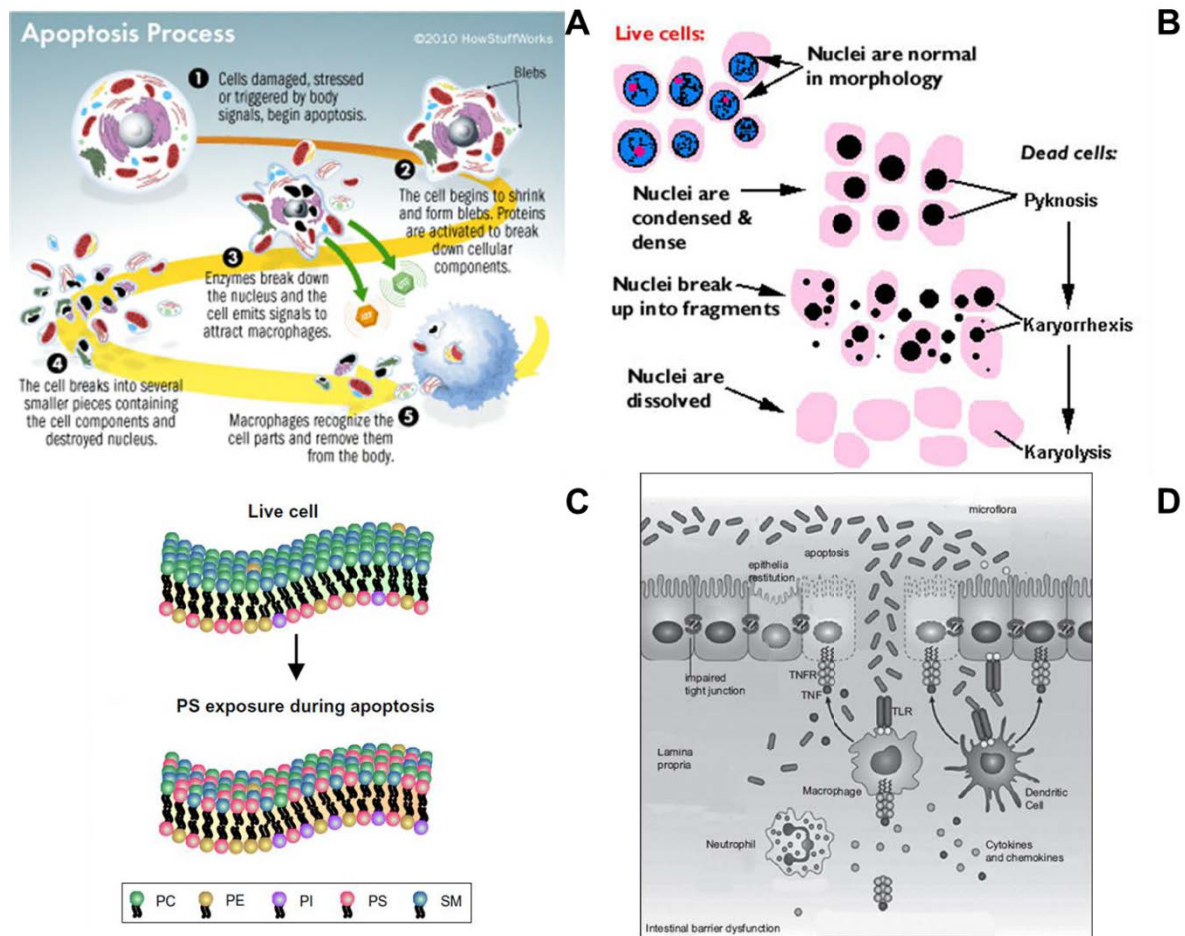


Figure 19 : *Les mécanismes de l'apoptose.* (A) Le processus apoptotique est composé de plusieurs étapes. (B) La dégradation de l'ADN au cours de l'apoptose en plusieurs étapes. La première étape, l'étape pyknosis : la chromatine se condense. Lors de la deuxième étape, l'étape karyorrhexis, l'ADN se morcelle en fragments. Lors de la dernière étape, l'étape karyolysis, l'ADN est lysé. (http://weallhaveuniquebrains.com/starting_material/necrosis/). (C) Le mouvement Flip-Flop des phosphatidylserines présentes au niveau de la phase interne de la membrane (Julian L. et Olson MF., 2015). (D) Rupture des jonctions serrées entraîne la perte du liquide cytoplasmique (Sertaridou E. *et al.*, 2015)

B) Acteurs de l'apoptose

La machinerie apoptotique est composée de deux types d'acteurs : les senseurs et les effecteurs. Les senseurs reçoivent les informations de l'environnement leur indiquant si la cellule doit vivre ou mourir en fonction des conditions environnementales favorables ou défavorables. Pour cela, les senseurs ont des récepteurs fixés sur la membrane. Selon les différents stimuli (tels que IGF-1, IGF-2 et leurs récepteurs, IL3 et son récepteur ; et le

ligand Fas et son récepteur Fas, le TNF α et son récepteur), les senseurs vont induire respectivement la prolifération ou l'apoptose activant ainsi les effecteurs de l'apoptose. Les signaux proapoptotiques (tels que les facteurs suppresseurs de tumeurs (ex: p53)) déséquilibrent la balance entre les membres de la famille Bcl-2 : les facteurs anti-apoptiques (Bcl-2, Bcl-XL...) et les facteurs pro-apoptotiques (Bim, Bid...). Ces derniers surexprimés sont des effecteurs de l'apoptose. Ils induisent la libération de cytochrome c en grande quantité des mitochondries qui répondent en déclenchant les premières étapes de l'apoptose libérant les signaux pro-apoptotiques. Ainsi, la surexpression des facteurs pro-apoptotiques est favorisée. Les caspases initiatrices 8 et 9 sont activées par les signaux de mort tels que Fas ou le cytochrome c respectivement. Ensuite, ces caspases vont activer les caspases effectrices pour réaliser les différentes étapes de l'apoptose : dégrader les différents organites, le génome. (Kiraz Y. *et al.*, 2016)

1) Protéines effectrices de l'apoptose : les caspases

La famille des caspases est composée de protéases cystéines conservées qui interagissent spécifiquement avec l'acide aspartique de leurs substrats. Les caspases sont essentielles dans le processus apoptotique. Il existe 14 caspases différentes classées en 3 sous catégories (Figure 20):

- les caspases initiatrices 2 ; 8 ; 9 ; 10
- les caspases effectrices 3 ; 6 ; 7 ; 14
- les caspases activatrices des cytokines 1 ; 4 ; 5 ; 11 ; 12 ; 13.

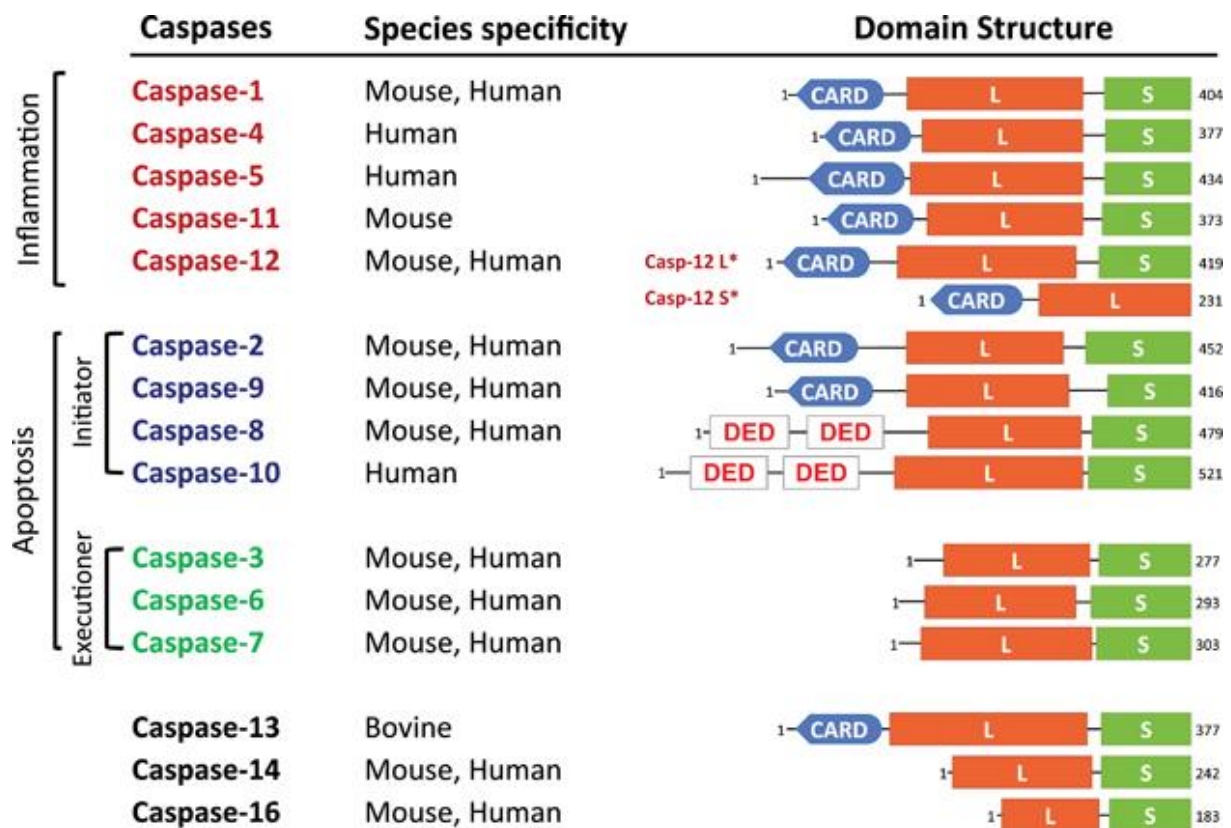


Figure 20 : La famille des caspases : Les caspases 1 ; 4 ; 5 ; 11 ; 12 participent aux mécanismes de l'inflammation. Elles sont composées des domaines : CARD (Caspase Recruitment Domain) (90 acides aminés), la grande sous unité catalytique et la petite sous unité catalytique à part la caspase 12 qui peut exister sous deux formes : caspase 12L ou caspase 12S (chez l'humain). Cette dernière ne possède pas la petite sous unité. Les caspases 2 ; 9 ; 8 ; 10 sont les caspases initiatrices de l'apoptose. Elles possèdent toutes la grande et la petite sous unités. Elles se distinguent en N-Terminal par un domaine CARD pour les deux premières et deux domaines DED (Death Effector Domain) (20 à 30 acides aminés) pour les deux dernières. Les caspases 3 ; 6 ; 7 sont des caspases effectrices de l'apoptose. Elles sont constituées de la grande et la petite sous unités catalytiques. Les caspases 14 ; 16 ; 13 sont formées de la grande et de la petite sous unités. Un domaine CARD est également présent uniquement dans la structure de la caspase 13 (Shalini S. *et al.*, 2015).

Dans un premier temps, les caspases sont présentes sous forme de proenzymes ou zymogènes avant d'être activées au cours du processus apoptotique. (Kiraz Y. *et al.*, 2016). Des molécules adaptatrices fixées aux récepteurs de mort interagissent grâce à leur domaine CARD avec les caspases initiatrices présentes jusqu'à ce moment-là sous forme de monomères inactifs induisant leur activation et un changement de conformation libérant les sites actifs. Elles s'autoclivent devenant matures et plus stables. (Green DR. et Lambi F., 2015). Une fois activées, les caspases initiatrices clivent les caspases effectrices (6 et 7) présentes sous forme de dimère inactif entre les petites et les grandes sous unités de l'enzyme mature. (Kiraz Y. *et al.*, 2016, Green DR. et Lambi F., 2015). Ce clivage induit un changement des conformations laissant apparaître le domaine d'interaction protéine-protéine

et créant deux sites actifs permettant l'interaction avec la protéine mature. Le clivage de la caspase 3 est modulé par les caspases 6 et 7 (Green DR. et Lambi F., 2015).

Les caspases sont essentielles dans le fonctionnement de l'apoptose. Mais elles peuvent aussi participer à différentes fonctions cellulaires telles que la prolifération, la survie ou encore l'inflammation (Kiraz Y. *et al.*, 2016).

a) Caspases 3 ; 6 ; 7

Les caspases effectrices 3 ; 6 ; 7 sont activées par les voies intrinsèque et extrinsèque. (Kiraz Y. *et al.*, 2016). Elles sont produites sous la forme de dimère protéique inactif avec un domaine d'interaction protéique masqué. L'activation des caspases est due à un clivage protéolytique interne entre les petites et les grandes sous unités induisant un changement de conformation donnant une enzyme mature. Le clivage induit un changement de conformation créant deux sites actifs permettant l'interaction avec la protéine mature (Green DR. et Lambi F., 2015).

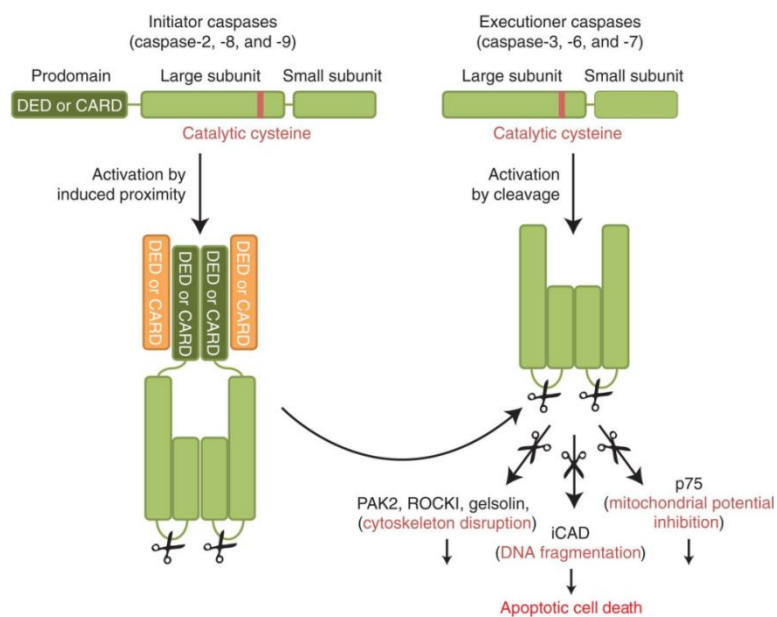


Figure 21 : L'activation des caspases effectrices : Les caspases effectrices : la caspase 3, la caspase 6 et la caspase 7 sont clivées entre la grande et la petite sous unités entraînant un changement de conformation. Sous leur forme active, les caspases vont réguler l'expression de nombreux gènes (PAK2, ROCK1, gelsolin, iCAD, p75) amenant à l'induction de l'apoptose (Green DR. et Lambi F., 2015).

Une fois activée, les caspases 3 et 7 modulent positivement ou négativement l'expression de plus de 1000 protéines. Par exemple, elles inactivent les protéines jouant un rôle physiologique telle que la sous-unité p75 du complexe I de la chaîne du transport d'électrons sur la membrane mitochondriale perturbant le potentiel membranaire mitochondrial, le transport d'électrons, la production d'ATP. Au contraire, la protéine CAD (Caspase Activated nuclease DNase) est activée pour couper la chromatine entre les

nucléosomes. Quant à son inhibiteur, le CADi, il est inactivé par la caspase 3. Les caspases peuvent également détourner les voies de signalisation pour activer de façon constitutive leurs protéines cibles. De même, l'activité kinase peut être induite de façon constitutive et indépendante de GTPase induisant un réarrangement aberrant du cytosquelette d'actine (Green DR. et Lambi F., 2015).

La caspase 3 est essentielle dans le processus d'apoptose contrairement aux caspases 6 et 7. En effet, la caspase 3 est indispensable pour réaliser le clivage de PARP et la fragmentation de l'ADN. En absence des caspase 3 ou 7, les cellules se tournent vers la nécrose au lieu de l'apoptose (Kiraz Y. *et al.*, 2016).

C) Voies d'induction de l'apoptose

Il existe deux voies pour induire l'apoptose : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (Figure 22).

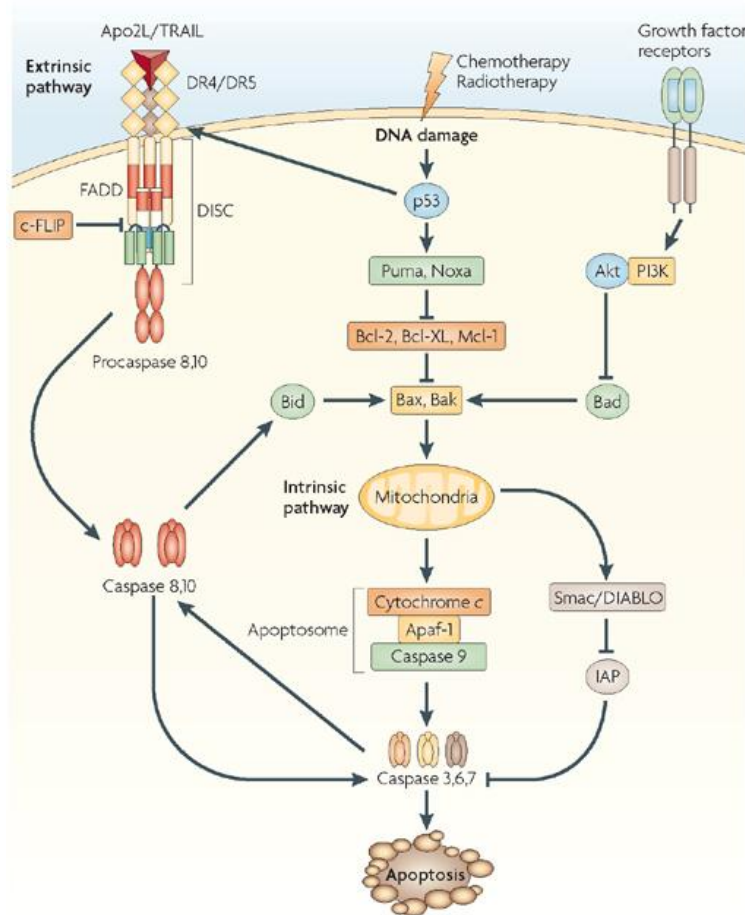


Figure 22 : Les voies d'induction de l'apoptose : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. Un dommage à l'ADN enclenche l'activation de la protéine p53 qui peut induire à la fois les voies extrinsèque et intrinsèque. La voie intrinsèque est mise en place suite à l'activation des protéines pro-apoptotiques Puma et Noxa. Ces dernières viennent inhiber les protéines anti-apoptotiques Bcl2, Bcl X_L, Mcl-1 qui jusque là inhibaient elles-mêmes l'action des protéines pro-apoptotiques Bax, Bak menant à l'activation de la voie mitochondriale intrinsèque. La voie mitochondriale active la protéine Smac/DIABLO qui inhibe alors les protéines inhibitrices de l'apoptose IAP (qui inhibaient les caspases 3 ; 6 ; 7). La mitochondrie induit aussi la libération de cytochrome c qui forme un apoptosome avec la protéine Apaf-1 et la caspase 9. L'apoptosome active les caspases 3 ; 6 ; 7 déclenchant le processus apoptotique. Les caspases 3 ; 6 ; 7 induisent aussi l'activité des caspases 8 et 10 qui activent la protéine pro-apoptotique Bid qui conforte à son tour l'activation des protéines pro-apoptotiques Bax, Bak renforçant l'activation de la voie intrinsèque. La protéine p53 active aussi la voie extrinsèque via les récepteurs Apo2L/TRAIL DR4/DR5 associés à la molécule adaptatrice FADD formant un complexe DISC (Death-Inducing Signalling Complex). La formation du complexe est inhibée par la protéine c-FLIP. Le complexe DISC va induire la maturation des procaspases 8 et 10 en caspases 8 et 10. Ces dernières vont activer à la fois la protéine Bid (qui active les protéines Bax et Bak induisant la voie intrinsèque) et les caspases 3 ; 6 ; 7 induisant l'apoptose. (Ashkenazi A., 2008)

1) Voie intrinsèque

La voie intrinsèque appelée aussi la voie mitochondriale est la voie la plus commune de l'apoptose. Elle est indépendante des signaux provenant du microenvironnement. La voie est activée en réponse à différents stress cellulaires (la présence de matières toxiques, d'une infection virale, de radiations, de dommages de l'ADN, d'un stress réticulaire, la privation des facteurs de croissance, de certaines cytokines, hormones...) entraînant l'activation des protéines Bax et Bak (Figure 23A). Ensemble, elles forment un oligomère qui perce la membrane externe mitochondriale permettant ainsi sa perméabilisation (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization : MOMP) (causant une variation du potentiel membranaire des mitochondries). Au cours de cette perméabilisation, des protéines pro-apoptotiques, solubles du cytosol, telles que le cytochrome c mais aussi les protéines Smac (nommée aussi Diabloc) et Omi (appelée également HtrA2), des endonucléases G et AIF sont libérées dans le cytoplasme (Figure 23A) (Kiraz Y. *et al.*, 2016 ; Green DR. et Lambi F., 2015).

Le cytochrome c induit la cascade d'activation des caspases. Le cytochrome c interagit avec la protéine Apaf-1 couplée à l'ATP formant un oligomère. L'association de 7 oligomères forme un complexe : un apoptosome actif (Figure 23B) qui recrute la caspase 9 (Green DR. et Lambi F., 2015). Une fois activée, la caspase 9 active la caspase 3. Cette dernière participera alors à la fragmentation de l'ADN grâce à la rupture des membranes nucléaires. La caspase 3 clive aussi différentes protéines telles que des kinases, des protéines contrôles de l'ADN, des protéines du cytosquelette, des inhibiteurs des endonucléases (Kiraz Y *et al.*, 2016).

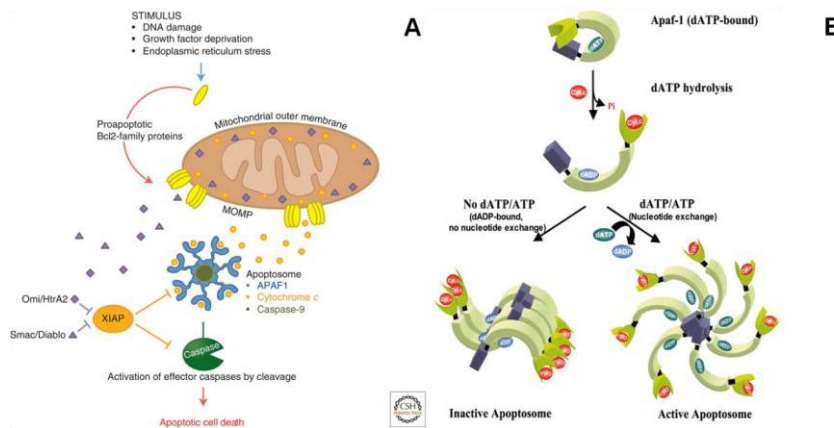


Figure 23 : *L'activation de la voie intrinsèque.* (A) Activation de la voie intrinsèque. (B) Activation de l'apoptosome : La protéine Apaf-1 est liée à une molécule d'ATP. Le cytochrome c se fixe sur la protéine Apaf-1 induisant l'hydrolyse de l'ATP en ADP. La molécule d'ADP est échangée avec une d'ATP formant un oligomère actif. Ce dernier va s'associer avec 6 autres oligomères identiques actifs pour créer l'apoptosome (Kim HE *et al.*, 2005).

Quant aux protéines Smac et Omi, elles "protègent" l'activité de l'apoptosome en inhibant l'activité des inhibiteurs de caspases XIAP (X linked Inhibitor of Apoptosis) (Green DR. et Lambi F., 2015).

2) La voie extrinsèque

La voie extrinsèque également appelée la voie des récepteurs de mort est dépendante des signaux libérés par le microenvironnement. Les ligands se fixent sur ces récepteurs de la mort : Fas ligand/Fas Receptors, TNF/TNF Receptors, Apo2L/DR4, TRAIL/TRAIL Receptors. Ainsi, lorsque le ligand Fas se lie à son récepteur, il induit l'interaction entre son récepteur et la molécule adaptatrice FADD (Fas Associated Death Domain) tandis que le récepteur TNF se lie à la protéine TRADD (TNF-R Associated Death Domain) via leurs domaines de mort DD (Death Domain) respectifs (Kiraz Y. *et al.*, 2016). Cette interaction entraîne un changement de conformation des molécules adaptatrices laissant apparaître leurs domaines effecteurs de mort (DED : Death Effectors Domain). Le complexe formé DISC (Death Inducing Signaling Complex) constitue une plateforme d'activation et de recrutement des caspases. Le domaine effecteur de mort de la molécule adaptatrice FADD se lie à celui de la caspase 8 dans le prodomaine. Les monomères de la caspase 8 déclenchent leur activité protéique autocatalytique par clivage entre la petite et la grande sous-unité et entre la grande sous-unité et le prodomaine. Le premier clivage permet de stabiliser le dimère actif tandis que le deuxième permet la séparation du complexe DISC de la caspase 8 (Green DR. et Lambi F., 2015). Une fois activée, la caspase 8 active la protéine pro-apoptotique cytoplasmique Bid par

clivage et myristoylation. Bid migre alors vers les mitochondries pour former un apoptosome induisant l'activation de Bax et Bak qui enclenche la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie permettant la libération du cytochrome c (Kiraz Y. *et al.*, 2016).

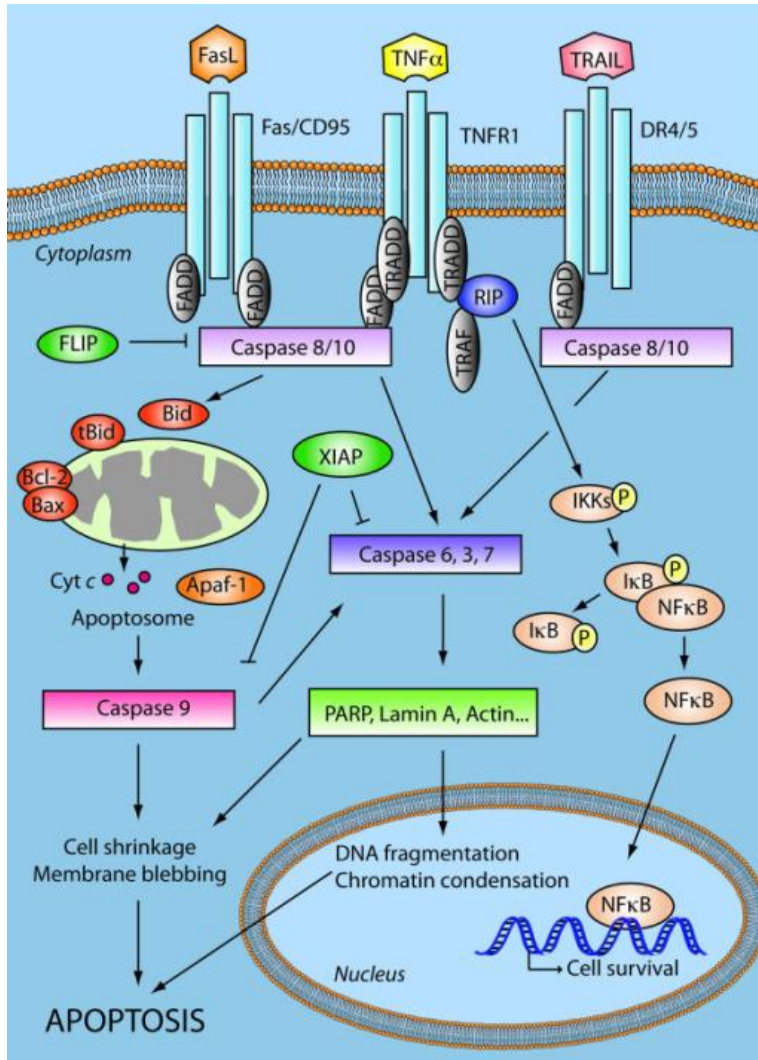


Figure 24 : La voie extrinsèque de l'apoptose : Les ligands Fas L, TNF α , TRAIL se fixent sur leurs récepteurs Fas/CD95, TNF-R1, DR4/5 respectivement. Les récepteurs s'associent à la molécule adaptatrice FADD qui recrute les caspases 8 et 10. Ces dernières activent les protéines pro-apoptotiques mitochondriales Bid, tBid, Bcl2, Bax libérant le cytochrome c qui s'associe à la protéine Apaf-1 formant l'apoptosome. L'apoptosome active la caspase 9 qui induit le rétrécissement cellulaire et la rupture membranaire enclenchant l'apoptose. Les caspases 8 et 10 activent les caspases 3 ; 6 ; 7 qui à leur tour activent différentes protéines dont PARP, Lamine A et Actine induisant la fragmentation de l'ADN, la condensation de la chromatine amenant à l'apoptose. Le récepteur TNF-R1 s'associe aux protéines adaptatrices FADD, TRADD, TRAF. Les protéines TRADD et TRAF interagissent avec la protéine RIP. Cette dernière active IKK qui phosphoryle I κ B libérant NF- κ B partant au noyau induire la survie cellulaire (Kraakstad C. et Chekenya M., 2010).

VI) La nécroptose

A) Caractéristiques de la nécroptose et de la nécrose

La nécrose se caractérise par le gonflement de la cellule, la rupture des membranes plasmiques, des organelles sans la condensation de la chromatine (Green DR. et Lambi F., 2015). L'ADN est fragmenté de façon irrégulière. En entrant en nécrose, les cellules présentent une morphologie du noyau différente de celle lorsque les cellules entrent en apoptose (Nugues A-L. *et al.*, 2014). La rupture des membranes laissent échapper les

protéines dans le milieu extracellulaire entraînant des réactions immunitaire et inflammatoire (Kroemer G. *et al.*, 1998).

La nécroptose, la nécrose programmée, présente des caractéristiques similaires de celles de la nécrose telles que le gonflement de la cellule et des organites, la rupture des membranes plasmiques, la fragmentation irrégulière de l'ADN. Au contraire, elle se distingue par la vacuolisation du cytoplasme, la rupture des membranes (Nugues A-L. *et al.*, 2014).

B) Induction de la nécroptose

La nécroptose est déclenchée par différentes voies de signalisation activant la protéine RIP3 (Receptors Interacting Protein kinase 3) suite à des dommages irréparables touchant les organelles. Les Death Receptors (DR), Toll-like Receptors (TLR), T-Cell Receptors (TCR) et TNF-R1 sont activés et induisent la formation du RIPoptosome, un complexe macromoléculaire : le via le recrutement de TRIF-1 RHIM (containing protein TIR domain containing adaptator inducing interferon β). TRIF recrute RIP1 qui est désubiquitinylé devenant actif. RIP1 peut alors interagir avec RIP3 via leurs domaines RHIM (RIP Homology Interaction Motifs) pour former le complexe RIPoptosome et déclencher la nécrose RIP-dépendant. TRIF peut recruter directement RIP3 car il possède aussi un domaine RHIM.

Par contre, si l'ADN est également endommagé, il induit directement l'activation de RIP3 sans passer par les différents récepteurs de mort présents à la surface membranaire. La voie dépendante RIP3 peut être aussi déclenchée lors d'une infection virale, la présence d'ADN double brin viral dans le cytosol est détectée par les senseurs cytosoliques de l'ADN RHIM containing, les facteurs régulateurs DAI (DNA Activator of Interferon regulatory factor) déclenchant la nécrose RIP3-dépendant. Activé par de l'ADN double brin viral, DAI recrute RIP3 via son domaine RHIM. Et enfin, un dommage à l'ADN induit la formation du RIPoptosome indépendamment de l'activation des récepteurs membranaires (Green DR. et Lambi F., 2015).

Le mécanisme utilisé par RIP3 est encore mal connu. L'un des premiers mécanismes proposés est la génération d'espèces réactives de l'oxygène (mitochondriales ou via NADPH oxydase). Une augmentation du métabolisme consomme tout l'ATP et/ou le NADH (Hitomi J. *et al.*, 2008). D'autres études plus récentes proposent l'implication de la pseudokinase MLKL (Mixed Lineage Kinase Like) pour son rôle majeur dans l'activation de la nécrose RIP dépendant (Sun L. *et al.*, 2012 ; Zhao J. *et al.*, 2012). La phosphorylation par RIP3 enclenche

l'oligomérisation de MLKL et sa translocation à la membrane cytoplasmique. Son rôle dans la perturbation de l'intégrité de la membrane est encore mal connu peut-être en déséquilibrant l'homéostasie ionique de la membrane.

C) Récepteurs de mort

Le récepteur le plus étudié dans la signalisation de la nécroptose est le récepteur du TNF- α qui est à la fois impliqué dans la signalisation de l'apoptose, de la survie via NF κ B et de la nécroptose. Il peut donc induire la mort comme la survie cellulaire. (Nugues A-L. *et al.*, 2013).

Il est issu de la superfamille TNF qui comprend des ligands tels que le TNF, Fas, TRAIL et leurs récepteurs. Ainsi, cette superfamille est composée de 19 ligands et de 29 récepteurs intervenant dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la prolifération, l'invasion, l'inflammation et bien sûr l'apoptose. Tous les récepteurs de cette superfamille sont des protéines transmembranaires trimériques et possèdent un domaine extracellulaire riche en cysteines spécifique à chaque récepteur par sa structure primaire lui permettant d'interagir de façon spécifique avec son ligand (Figure 25). Chaque récepteur possède un domaine de mort du côté cytoplasmique pour transmettre le message et activer les voies intracellulaires à l'aide des molécules adaptatrices telles que FADD, TRADD (Dempsey PW. *et al.*, 2003).

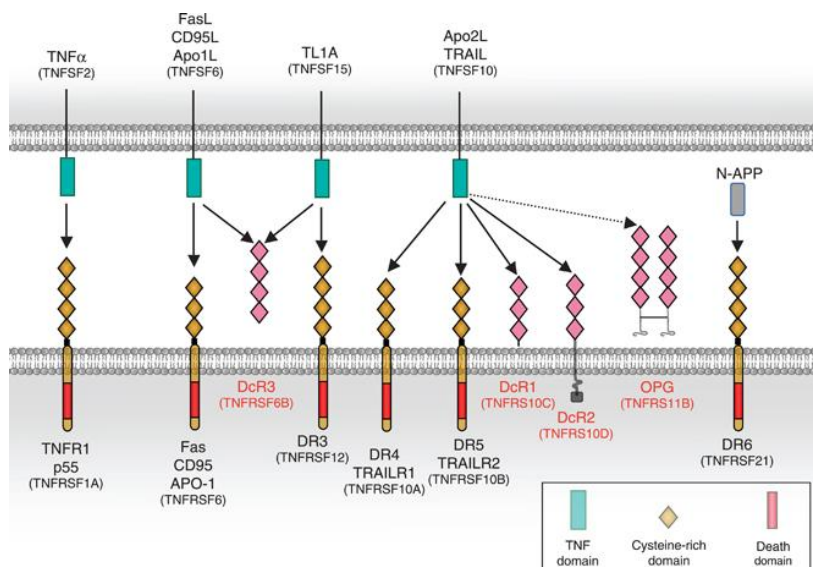


Figure 25 : La représentation des récepteurs de mort et leurs ligands : Les ligands possèdent tous un domaine TNF reconnu par les récepteurs de mort. Dans la partie extracellulaire des récepteurs, il y a un domaine riche en cystéines. La partie intracellulaire des récepteurs est composée du domaine de mort (Gonzalvez F. et Ashkenazi A., 2010).

TNF est une protéine transmembranaire de 26kDa. Après le clivage, la protéine ne fait plus que 17kDa se présentant sous sa forme trimérique soluble cytokine dans le cytoplasme. Le ligand TNF peut se lier à deux récepteurs différents TNF-R1 et TNF-R2 qui sont eux aussi

des protéines trimériques. Le TNF se lie à son récepteur TNF-R1 dévoilant le domaine de la mort DD. Ainsi, la protéine TRADD peut alors interagir avec FADD qui induit alors le passage sous forme de pro-caspases à caspases. Le récepteur TNF-R2 possède aussi une activité de prolifération non acquise par le récepteur TNF-R (Green DR. et Lambi F., 2015).

D) Protéines effectrices de la nécroptose

Parmi les protéines effectrices, on retrouve les protéines RIP1 et RIP3 appartenant à la famille des kinases RIP (Figure 26). Ces protéines possèdent un domaine sérine/thréonine kinase (KD) et un domaine RHIM. Elles peuvent être s'autophosphorylées sur leur domaine kinase afin de les activer. Leur domaine RHIM leur permet d'interagir entre elles (Vandenabeele P. *et al.*, 2010).

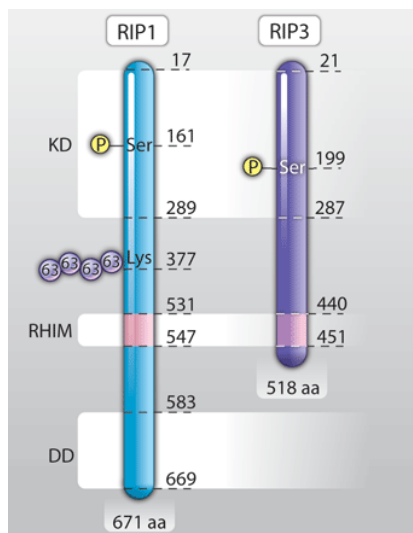


Figure 26 : La représentation de la structure protéique de RIP1 et RIP3 : RIP1 est constitué de 671 acides aminés. La protéine est composée d'un domaine kinase (KD), d'un domaine RHIM, d'un domaine de mort (DD). RIP3 est constitué de 518 acides aminés. La protéine est composée d'un domaine kinase (KD), d'un domaine RHIM. Elles peuvent être phosphorylées sur une sérine du domaine kinase. La protéine RIP1 peut être aussi acétylée (Vandenabeele P. *et al.*, 2010).

1) Protéine RIP1

RIP1 participe aux voies de signalisation de la mort en interagissant avec les récepteurs de mort TNF-R1, TRAIL-R1, TRAIL-R2 via les protéines adaptatrices FADD ou TRADD. (Meylan E. et Tschopp J., 2005 ; Hsu H. *et al.*, 1996). Le gène codant pour la protéine RIP1 est localisé sur le chromosome 6 en position p25.2. L'expression de la protéine RIP1 est ubiquitaire dans de nombreux tissus. Elle peut être augmentée après un traitement au TNF α ou une stimulation des cellules T. La protéine RIP1 possède un domaine sérine/thréonine kinase en N-Terminal sur lequel elle peut s'autophosphoryler sur sa sérine 161. RIP1 a aussi un domaine de mort (DD) en C-Terminal lui permettant de participer aux voies de signalisation de mort. RIP1 peut également être phosphoryler sur d'autres résidus de sérines

(14 ; 15 ; 20 ; 161 ; 166). Grâce à son domaine RHIM, la protéine RIP1 peut interagir avec son homologue : la protéine RIP3 (Vandenabeele P *et al.*, 2010). La protéine RIP1 est aussi impliquée dans la voie de signalisation de NF- κ B (Zhang D *et al.*, 2010).

2) Protéine RIP3

La protéine RIP3 participe aussi aux voies de signalisation de la mort en interagissant principalement avec le récepteur de mort TNF-R1. (Sun X. *et al.*, 1999 ; Yu PW. *et al.*, 1999 ; He S. *et al.*, 2009 ; Zhang D. *et al.*, 2009 ; Cho YS. *et al.*, 2009). Ainsi, la protéine RIP3 est capable d'induire l'apoptose ou la nécroptose selon le type cellulaire (Sun X. *et al.*, 1999 ; Nugues AL. *et al.*, 2014). Le gène codant pour la protéine RIP3 est localisé sur le chromosome 14 en position q11.2. Il est constitué de 10 exons. La protéine RIP3 est exprimée lors du développement embryonnaire. Elle est présente dans de nombreux tissus tels que le foie, les poumons, la rate, le cerveau, le cœur, les muscles squelettiques, le colon, les testicules (Pazdernik NJ. *et al.*, 1999). Comme la protéine RIP1, la protéine RIP3 est composée d'un domaine kinase sur lequel elle peut aussi s'autophosphoryler sur la sérine 199. La protéine RIP3 par son domaine kinase est capable de phosphoryler d'autres protéines dont RIP1. Elle possède aussi un domaine RHIM lui permettant d'interagir avec RIP1 (Sun X. *et al.*, 2002 ; Li M. *et al.*, 2008). La protéine RIP3 est capable d'aller au noyau grâce à ses deux domaines d'export nucléaire (NES : Nuclear Export Sequence) et son domaine de localisation nucléaire (NLS : Nuclear Localisation Signal) (Yang Y. *et al.*, 2004) sans que son rôle n'a pu être établi dans le noyau. Elle peut également être clivée par la caspase 8 sur son résidu d'acide aspartique D328. La protéine RIP3 est capable d'induire la nécroptose (Nugues AL. *et al.*, 2013). Or l'expression de la protéine RIP3 est éteinte chez les patients. De même, dans de nombreuses lignées leucémiques (notamment DA1-3b), RIP3 n'est pas exprimée. L'étude de Nugues AL *et al.* a montré lorsque l'activité kinase est abolie, RIP3 active la caspase 6 qui clive la protéine p65/RelA sur l'acide aspartique 361 (Nugues AL. *et al.*, 2013).

E) Régulation de la nécroptose

L'assemblage et l'activation de la plateforme de signalisation nécroptique sont contrôlés par une série de modifications post traductionnelles des constituants du complexe. La formation du RIPoptosome est régulée négativement par l'ubiquitylation de RIP1. Les traitements avec les inhibiteurs cIAP1/2 ou l'expression de la deubiquitylase CYLD induisent

une nécrose TNF-R1 dépendant. L'activation de RIP3 dépend de l'activité kinasique de RIP1 qui peut être inhibée par la nécrostatine. L'induction de la nécrose par le RIPoptosome est inhibée aussi par l'activité catalytique de l'hétérodimère caspase 8/FLIP. Si un stimulus de RIP1 et du RIPoptosome active la caspase 8 et FLIP, l'activité catalytique de l'hétérodimère caspase 8/FLIP inhibe l'activation de RIP3 et donc l'induction de la nécrose RIP dépendant. Les cellules ont tendance à survivre. Mais en l'absence de FLIP, la caspase 8 est incapable d'inhiber RIP3.

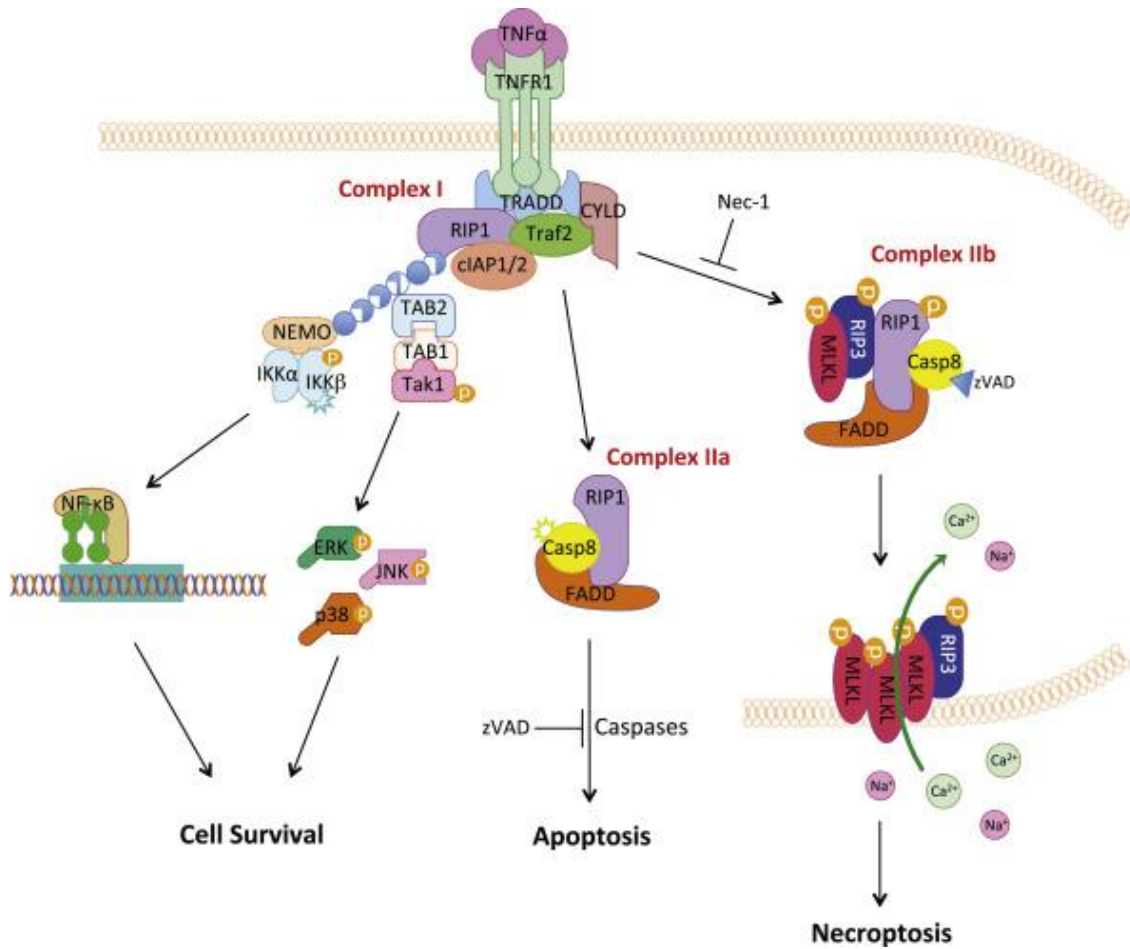


Figure 27 : Les voies de signalisation régulées par le TNF-R1 : Localisée dans la membrane, le complexe I est composé de TRADD, TRAF2, RIP1 et cIAP1. La polyubiquitination de RIP1 par cIAP1 permet le recrutement du complexe IKK et TAK1 en activant les voies de survie NF-κB et MAPK. Le complexe I peut activer le complexe IIa composé de RIP1, de FADD et de la caspase 8 induisant l'activation de la cascade des caspases et par conséquent l'apoptose. Le complexe I peut aussi activer le complexe IIb composé de RIP1, de FADD, de la caspase 8 mais aussi de MLKL, de RIP3 induisant la nécroptose (Zhou W. et Yuan J., 2014).

VII) La voie de signalisation de NF-κB

A) Famille NF-κB

Sen et Baltimore ont décrit un facteur de transcription rapidement induit dans les lymphocytes B qu'ils ont appelé « nuclear factor binding near the κ light-chain gene in B cells », plus communément connu sous le nom de NF-κB (Sen R. et Baltimore D., 1986). Nuclear Factor kappa B fait partie d'une famille de facteurs de transcription qui régule de nombreuses fonctions cellulaires telles que la survie, l'apoptose ou encore participe à la réponse immunitaire. Il joue aussi un rôle proinflammatoire (Zhou J. *et al.*, 2015).

La famille NF-κB est composée de 5 membres : RelA (nommé aussi p65), RelB, cRel, p50 et p52 (Figure 28). Ces membres sont classés en deux sous-familles. La première sous-famille correspond aux deux membres p50 et p52 existant préalablement sous la forme de précurseurs p105 (également appelé NFκB1) et p100 (aussi nommé NFκB2) respectivement. La deuxième sous-famille est composée de p65/RelA, RelB, cRel.

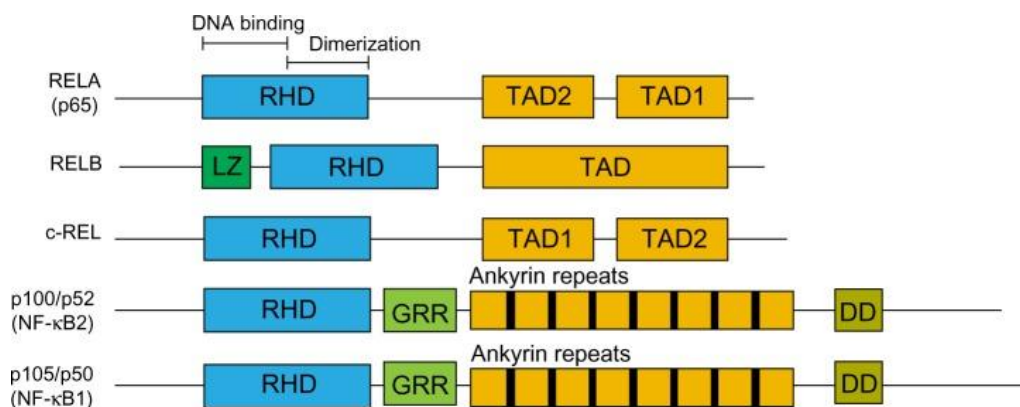


Figure 28 : La représentation des différents membres de la famille NF-κB : La protéine p65/RelA comme la protéine cRel est composée d'un domaine RHD (Region Homology Domain) et deux domaines de transactivation (TAD1 et TAD2). La protéine RelB présente également un domaine RHD mais un seul domaine TAD et un domaine Leucine Zipper. Les précurseurs p100/p52 et p105/p50 sont constitués d'un domaine RHD, une région riche en glycine (GRR), une région riche en motifs répétitifs ankyrin et un domaine de mort (DD). Le domaine RHD est lui-même composé des sous domaines de liaison à l'ADN et de dimérisation (Mowla SN. *et al.*, 2013).

1) Structure des monomères

Les 5 monomères présentent une homologie de séquence. En N-Terminal, la région RHR (Rel Homology Region) composée de 300 résidus, est responsable des activités

principales dont l'association des monomères pour former le dimère, la localisation nucléaire, la liaison à l'ADN et l'association aux inhibiteurs IκB. Ces différentes propriétés sont régulées par différents stimuli. La région RHR est divisée en trois sous régions : NTD (N Terminal Domain), DD (Dimerization Domain), NLS (Nuclear Localization Signal) (Figure 28).

Le domaine de dimérisation DD composé de 100 résidus sert uniquement à la formation d'un dimère à partir de la combinaison des monomères. L'homologie de séquence de cette région entre les différents membres de la famille NF-κB est entre 20 à 50%. Environ 12 à 14 résidus de chaque monomère sont impliqués dans la formation du dimère en symétrie (ou en pseudo symétrie pour les hétérodimères). Le changement de tout acide aminé en contact avec l'autre sous unité impacte la stabilité de la région DD et influence l'homo ou l'hétéro dimérisation (Ghosh G. *et al.*, 2012 ; Huang DB. *et al.*, 1997).

Ensemble, les domaines de NTD et DD permettent la liaison à l'ADN. Les dimères de NF-κB se lient à l'ADN sur une séquence consensus : 5'-GGGRNWYYCC-3' avec R = A ou G, N = A ou C ou G ou T, W = A ou T, Y = C ou T. Les séquences d'ADN au niveau des régions promotrices ou enhancer qui permet l'interaction avec NF-κB conduisant à l'expression du gène NF-κB dépendant sont nommées κB-DNA, κB-site. Les domaines de liaison à l'ADN : DBD (DNA Binding Domain) sont de petite taille mais doivent reconnaître de longues séquences consensus de plus de 10 paires de bases (Figure 29). L'ensemble des contacts avec l'ADN se fait par des boucles β-strands. Chaque monomère de l'hétérodimère se lie à sa moitié d'ADN via une boucle. Les boucles (L1 et L2) de la région NTD reconnaissent la région « flanking » d'un brin de l'ADN présente sur les bords du grand sillon. La boucle L1 peut être divisée en trois parties : le N-Terminal avant, le N-Terminal arrière et le C-Terminal flexible. Le C-Terminal peut interagir au niveau de la "colonne vertébrale" avec les nucléotides flanking (région d'ADN encadrant la partie C-Terminale d'une unité de transcription où on trouve de nombreuses séquences régulatrices) la séquence κB. Le N-Terminal avant et arrière forme une structure centrale rigide qui se lie ou non à l'ADN. La tyrosine de L1 joue un rôle essentiel dans la reconnaissance des séquences AAATT ou AATTT au centre du κB-site par les homodimères RelA et cRel. Le lien (L3) et les boucles forment le domaine de dimérisation qui interagit au centre du grand sillon. Au niveau des petits sillons, les boucles entourent l'ADN. Chaque paire de base qui varie peut entraîner un important changement de conformation. L'interface principale du dimère doit être maintenue avec κB-site pour réguler l'expression des gènes. Les sous unités p50 et p52 ont 6 acides

aminés conservés interagissant avec κ B-site. Deux arginines, une tyrosine et un glutamate sont présents dans toutes les sous unités de NF- κ B. His 64 et Lys 241 sont remplacés par Ala et Arg respectivement dans les sous unités RelA, RelB et cRel. Cette différence entraîne une modification de la longueur de paires de bases auxquelles interagissent NF- κ B. D'autres interactions viennent s'ajouter de façon non spécifique entre les domaines NTD et DD et des régions de l'ADN (Ghosh G. *et al.*, 2012).

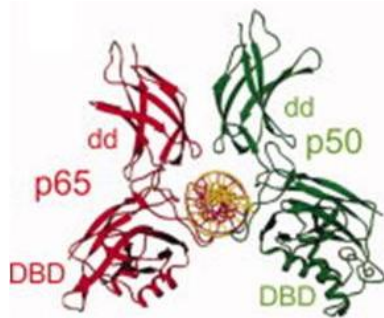


Figure 29 : La représentation de l'interaction du complexe NF- κ B avec l'ADN : Le complexe des sous unités p65/RelA et p50 via leur domaine de liaison à l'ADN (DBD) interagissent avec les sites κ B-sites de l'ADN. (Dyson HJ. et Komives EA., 2012)

Les interactions protéine-protéine et protéine-ADN sont interdépendantes. L'association de NF- κ B dans un complexe plus gros peut être impactée par un changement de conformation de l'ADN (Leung TH *et al.*, 2004, Ghosh G. *et al.*, 2012).

La région NLS est flexible avec une structure désordonnée lui permettant d'adopter différentes conformations selon le type de partenaires I κ B ou Importin α . Les régions NLS et DD sont les premières cibles sur lesquelles se fixent I κ B. La partie C-Terminale de la région RHR de RelA, RelB, cRel correspond au domaine de transactivation, région essentielle pour la transcription des gènes cibles de NF- κ B. (Ghosh G. *et al.*, 2012 ; Zhou J. *et al.*, 2015). Mais cette région TAD (Transcription Activation Domain) n'est pas conservée chez toutes les sous unités de NF- κ B (Figure 28). Ainsi, p50 et p52 ne possèdent pas ce domaine. A la place, ils possèdent une région riche en glycines : GRR (Glycin Rich Region) résultant du processus protéolytique incomplet (Ghosh G. *et al.*, 2012). De même que p105 et p100 contiennent des motifs répétitifs Ankyrin composés chacun de 33 résidus en C-Terminal (Zhou J. *et al.*, 2015). Par ailleurs, NF- κ B possède au moins une sous unité interagissant avec les activateurs de la transcription (Ghosh G. *et al.*, 2012).

2) Formation des dimères

Ces différents monomères ont à former des homodimères ou des hétérodimères. (Mitchell S. *et al.*, 2016). NF- κ B fonctionne sous forme de dimère (Ghosh G. *et al.*, 2012). La forme dimérique stabilise les membres de la famille NF- κ B. (Ghosh G. *et al.*, 2012). La génération des dimères est très dynamique et régulée homéostasiqement. Ainsi, 15 dimères sont possibles (Figure 30). Mais seulement 12 sont capables de se fixer à l'ADN. Néanmoins, parmi ces derniers, 9 peuvent induire la transcription grâce à la présence de p65/RelA, RelB ou cRel dans le dimère. Trois dimères : p50/p50, p52/p52, p50/p52 se présentent aussi comme activateurs de la transcription mais uniquement en présence de coactivateurs Bcl3 et I κ B ζ . (Mitchell S. *et al.*, 2016). Par contre, l'homodimère RelA peut se lier à l'ADN mais ne possède pas d'activité physiologique (Ghosh G. *et al.*, 2012).

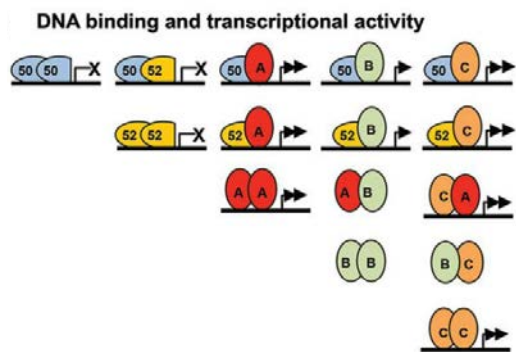


Figure 30 : Les différents dimères formant le complexe NF- κ B : Il existe 15 possibilités différentes pour former un dimère NF- κ B. Parmi ces différents monomères, 12 sont capables de se fixer à l'ADN. Mais seuls 9 peuvent induire la transcription (Mitchell S. *et al.*, 2016).

Les gènes codant pour l'expression des monomères sont exprimés différemment. RelA est exprimé de façon ubiquitaire à de fortes concentrations. RelB est fortement exprimé dans des types cellulaires spécifiques. cRel est exprimé dans les cellules lymphoïdes telles que les cellules dendritiques inflammatoires. Les gènes codant pour les monomères p50 et p52 obtenus via des précurseurs sont inductibles par les monomères RelA, RelB, cRel. L'expression du gène *nfkb1* est induite par les monomères RelB et cRel, tandis que celle du gène *nfkb2* par le monomère RelA (Mitchell S. *et al.*, 2016).

Les gènes *nfkb1* et *nfkb2* codent pour les précurseurs de p50 et p52 : p105 et p100 respectivement qui donnent par clivage endoprotéique les monomères p50 et p52 (Figure 31). La maturation de p105 en p50 est un processus constitutif. Tandis que le processus de maturation de p100 en p52 est augmenté en réponse à des signaux de développement. Ce mécanisme permet à la fois de générer p52 et de réduire le taux de p100 inhibant le complexe I κ B Δ . (Mitchell S. *et al.*, 2016)

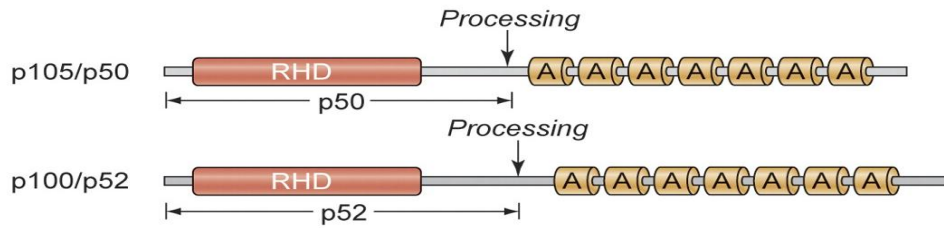


Figure 31 : La représentation des précurseurs p105 et p100 des protéines p50 et p52 : Représentation des précurseurs p105 et p100 composés de son domaine RHD contenant le signal de localisation nucléaire (NLS). Le domaine C-Terminal est composé d'une région riche en motifs répétitifs d'Ankyrin. Le site de clivage donne les protéines matures p50 et p52 respectivement (Jost PJ. et Ruland J., 2007).

3) Activation du complexe NF- κ B

En l'absence de stimuli, le facteur de transcription NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme par I κ B (Inhibitor kappa B) masquant sa séquence de localisation nucléaire (NLS : Nuclear Localization Signal). Mais lors de la présence d'un stimulus, le complexe IKK (Inhibitor of kappa B Kinase) est activé. Ce dernier phosphoryle I κ B dans une séquence consensus DSGXXS de la région N-Terminale sur ses sérines (Ser32 et 36 pour I κ B α , Ser19 et 23 pour I κ B β) induisant son ubiquitinylation par la β TrCP (β -Transducin Repeat Containing Protein) et par la suite sa dégradation par le protéasome 26S (Zhou J. *et al.*, 2015). Le complexe NF- κ B est alors libéré et peut migrer au noyau pour se fixer sur ses éléments de réponse induisant l'expression de gènes codant pour des protéines jouant un rôle clé dans la prolifération, la survie, la résistance aux thérapies. (Mitchell S. *et al.*, 2016)

B) Régulation de la voie NF- κ B

1) Famille des protéines I κ B

La famille I κ B est composée de 8 membres : I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ (NF- κ B1/p105), I κ B δ (NF- κ B2/p100), Bcl3 (B-cell lymphoma 3), I κ B ζ , I κ BNS. Tous ces membres possèdent un domaine avec 6 motifs répétitifs Ankyrin : ARD (Ankyrin Repeat Domain) composé chacun de 33 acides aminés (Figure 32) (Ghosh G. *et al.*, 2012).



Figure 32 : Représentation des différents membres de la famille I κ B : Chaque membre de la famille I κ B est composé de 6 motifs répétitifs d'Ankyrin (Jost PJ. et Ruland J., 2007).

I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ se lient au complexe NF- κ B afin de l'empêcher d'aller au noyau en le séquestrant dans le cytoplasme. Lors de l'activation de NF- κ B, ces protéines sont phosphorylées dans une séquence consensus DSGXXS de la région N-Terminale, ubiquitinylées et enfin dégradées libérant le complexe NF- κ B. Tandis que la région C-Terminale est composée des motifs répétitifs Ankyrin : ARD (Yaron A. *et al.*, 1998). Cette partie forme une région flexible riche en proline (P), en acide glutamique (E), sérine (S), thréonine (T) donnant la région PEST (Yaron A. *et al.*, 1998). I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ s'associent préférentiellement à NF- κ B quand celui-ci possède dans son dimère au moins une sous unité RelA ou cRel. Le taux de complexe I κ B/NF- κ B est plus élevé dans le cytoplasme que dans le noyau. L'ensemble des étapes de dégradation est rapide permettant une activation rapide de NF- κ B. Mais après une longue activation, I κ B α peut venir dans le noyau dissocier le complexe NF- κ B (contenant RelA) de l'ADN (Ghosh G. *et al.*, 2012).

Les précurseurs p105 et p100 (donnant p50 et p52 respectivement) sont aussi des inhibiteurs de la voie NF- κ B. Ils se lient sous forme de monomère à NF- κ B et avec deux autres inhibiteurs. Le précurseur p105 interagit de préférence avec RelA, cRel tandis que p100 se lie avec RelB, p52 et plus faiblement à RelA. Pour libérer le complexe NF- κ B, les précurseurs p100 ou p105 sont dégradés lentement mais par des mécanismes différents initiant l'activité de NF- κ B. p100 est dégradé par phosphorylation par les kinases NIK (Nuclear factor kappa B Inhibitor Kinase)/IKK1. p105 est éliminé de la même façon que I κ B α mais avec une vitesse plus réduite. Après une stimulation prolongée de NF- κ B, p100 néo synthétisé peut se lier au complexe NF- κ B pour arrêter son activité de stimulation (Mercurio F. *et al.*, 1992 ; Rice NR. *et al.*, 1992 ; Ghosh G. *et al.*, 2012).

Enfin, les polypeptides Bcl3, I κ B ζ , I κ BNS régulent aussi l'activité de NF- κ B. Ils peuvent interagir spécifiquement avec les homodimères p50 et p52. De même, lorsqu'ils sont surexprimés dans le cytoplasme, ils sont capables de migrer au noyau où ils jouent un rôle régulateur dans le réarrangement de la chromatine, les échanges de complexes NF- κ B, la coactivation de l'expression de gènes cibles. En effet, grâce à leur homologie de séquence, ces protéines peuvent se fixer à l'ADN et les complexes NF- κ B. Bcl3, I κ B ζ , I κ BNS sont alors des régulateurs de la transcription. Bcl3, I κ B ζ jouent le rôle de co-activateur ou co-répresseur. I κ BNS est uniquement un co-répresseur de la transcription (Ghosh G. *et al.*, 2012).

Lors d'une stimulation notamment inflammatoire et immunitaire, NF- κ B doit être activé rapidement. Ainsi, la dégradation des protéines I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ est rapide. Tandis que celle des précurseurs p100 et p105 est lente permettant de pouvoir prolonger l'état d'activation du complexe NF- κ B de même que pour les protéines Bcl3, I κ B ζ , I κ BNS (Ghosh G. *et al.*, 2012).

Les protéines I κ B influencent la formation des dimères de NF- κ B. I κ B α s'associe au dimère p50/RelA formant un complexe ternaire où I κ B α stabilise l'ensemble. p52 forme préférentiellement des hétérodimères avec RelB. Mais en présence de Bcl3, membre de la famille I κ B, p52 a tendance à former des homodimères. Tandis qu'I κ B β coactivateur de la transcription favorise la formation des hétérodimères cRel/RelA et des homodimères RelA/RelA et leurs recrutements sur des sites promoteurs cibles. Seuls cRel et RelA forment des hétérodimères avec p50 ou des homodimères (Ghosh G. *et al.*, 2012).

2) Famille IKK

La famille IKK (Inhibitor Kappa B Kinase) est une famille de protéines kinases avec quatre membres IKK1 (IKK α), IKK2 (IKK β), IKK3 (IKK ϵ), TBK1 (protéine sérine/thréonine kinase) (Figure 33).

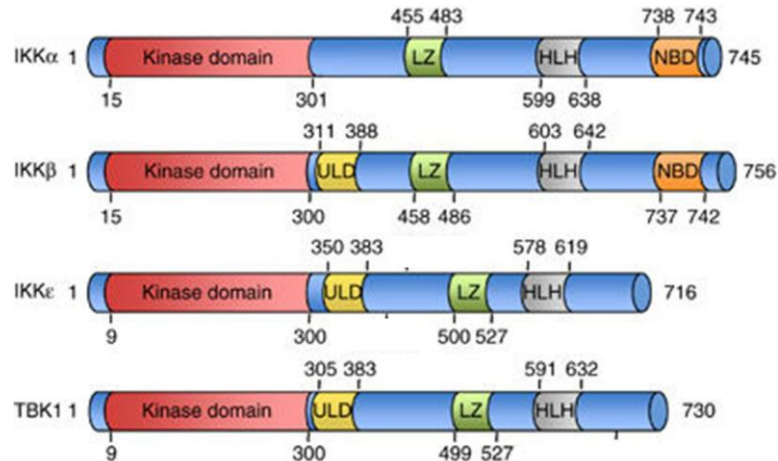


Figure 33 : La représentation de la famille IKK : La famille IKK est composée de 4 membres. Chaque membre de la famille IKK possède un domaine kinase, une leucine zipper (LZ), un motif hélice-boucle-hélice (HLH = Helix-Loop-Helix). Le domaine d'ubiquitylation (ULD = Ubiquityn-Like-Domain) est présent chez tous les membres sauf pour la protéine IKK α . Les protéines IKK α et IKK β possèdent un domaine de liaison pour NEMO (NBD= NEMO Binding Domain) (Shen RR. et Hahn WC., 2011).

L'ensemble des membres possèdent une structure homologue composée d'un domaine kinase (en N-Terminal), d'une séquence homologue de 300 résidus et d'une région flexible

(en C-Terminal) pour la fixation d'une molécule adaptatrice. Ils forment des homo ou des hétérodimères (Ghosh G. *et al.*, 2012).

La famille peut être divisée en deux sous-familles. La première composée d'IKK3 (IKK ϵ) et de TBK1 joue un rôle dans l'activation de la voie NF- κ B sans entraîner la dégradation par phosphorylation d'I κ B α . Au contraire, le rôle principal de la deuxième sous famille composée d'IKK1 (IKK α) et d'IKK2 (IKK β) est la dégradation par phosphorylation d'I κ B. Pour cela, un complexe trimérique se forme avec les constituants IKK α , IKK β et la molécule adaptatrice NEMO (IKK γ) (Hacker H. *et al.*, 2006 ; Krappmann D. *et al.*, 2005 ; Ghosh G. *et al.*, 2012).

Cependant, IKK α et IKK β peuvent également exister sous forme d'homodimères dans la cellule. Lors de la formation du complexe, la protéine NEMO se lie préférentiellement à IKK β .

C) Les voies d'activation canonique et non canonique de NF- κ B

Il existe deux voies d'activation du complexe NF- κ B : la voie canonique et la voie non canonique.

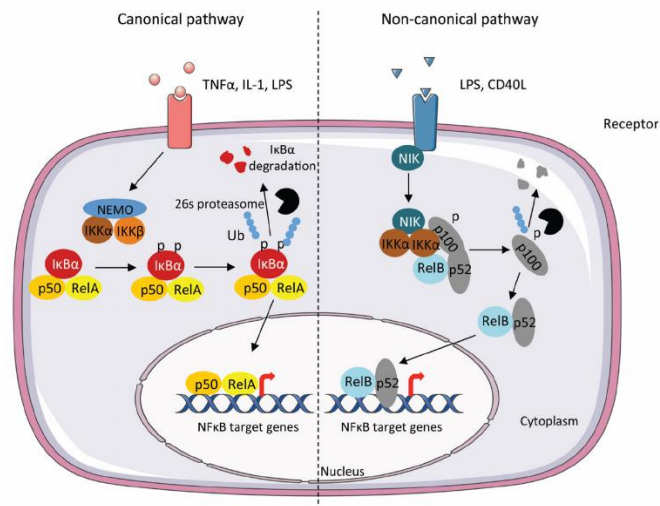


Figure 34 : Les deux voies d'activation de NF- κ B : La voie canonique est activée par la fixation du TNF α , IL1, LPS sur leurs récepteurs spécifiques induisant l'activation du complexe IKK composé de NEMO, IKK α , IKK β . Le complexe IKK phosphoryle I κ B α provoquant son ubiquitinylation puis sa dégradation protéosomale libérant ainsi le complexe NF- κ B qui migre au noyau. La voie non canonique est activée par la stimulation du LPS, CD40L activant la protéine NIK qui vient se fixer sur le complexe IKK α /IKK β associé à RelB et p100. p100 est alors dégradé et mûri en p52. Le complexe RelB/p52 migre alors au noyau induire l'expression de gènes cibles (Viennois E. *et al.*, 2013).

1) Voie canonique

La voie canonique est une voie NEMO dépendante. Elle est activée pour des réponses inflammatoires ou immunitaires rapides, réversibles et brèves. L'axe caractéristique de la voie canonique se compose de : NEMO/IKK β /RelA (Figure 34) (Shih VF. *et al.*, 2011). La voie canonique entraîne ainsi l'activation du complexe NF- κ B sous sa forme p65/RelA/p50 (Gasparini C. *et al.*, 2014) majoritairement, ou du complexe cRel/p50 (Zhou J. *et al.*, 2015). Mais en l'absence d'IKK β , IKK α peut le remplacer et participer à l'activation de la voie canonique. De même, des études ont montré que p65/RelA pouvait être activée dans la voie non canonique (Shih VF. *et al.*, 2011).

Différents stimuli comme le LPS, des cytokines, des facteurs de croissance, TNF α , IL1, TLR, PAMPs (Pathogens Associated Molecular Patterns), les DAMPS (Dangers Associated Molecular Patterns) des signaux activateurs immunitaires, des antigènes activent le complexe IKK. (Carrà G. *et al.*, 2016 ; Mitchell S. *et al.*, 2016 ; Shih VF. *et al.*, 2011). Le complexe kinase IKK est composé de deux protéines kinases I κ B Kinase : IKK α et IKK β et de la protéine adaptatrice d'échafaudage NEMO (également appelé IKK γ) (Mitchell S. *et al.*, 2016 ; Zhou J. *et al.*, 2015 ; Gasparini C. *et al.*, 2014). En fonction du signal et du récepteur activé en conséquence, le mécanisme amenant à l'activation IKK β au sein du complexe IKK peut être différent (Shih VF. *et al.*, 2011). Mais l'étape finale de ce mécanisme se solde toujours par la phosphorylation des sérines 177 et 181 de la boucle P d'activation (Shih VF. *et al.*, 2011 ; Mitchell S. *et al.*, 2016). Le complexe IKK phosphoryle I κ B α sur ses sérines 32 et 36 en N-Terminal (Gasparini C. *et al.*, 2014). La ligase ubiquitine E3 SCF/ β TRCP est alors recrutée pour réaliser l'ubiquitinylation d'I κ B α . (Shih VF. *et al.*, 2011 ; Mitchell S. *et al.*, 2016 ; Gasparini C. *et al.*, 2014). Par ce marquage, I κ B α est dégradé par le protéasome 26 S libérant le complexe NF- κ B séquestré jusqu'alors (Shih VF. *et al.*, 2011 ; Mitchell S. *et al.*, 2016 ; Gasparini C. *et al.*, 2014). NF- κ B migre dans le noyau pour se fixer sur ses éléments de réponse induisant l'expression de nombreux gènes (Shih VF. *et al.*, 2011 ; Mitchell S. *et al.*, 2016 ; Gasparini C. *et al.*, 2014) codant pour les cytokines (TNF α , IL1 β , IL6, GM-CSF), les chimiokines (IL8, RANTES, MIP1 α , MCP-1), les molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1, E-Selectin), les enzymes (iNOS, COX2, PLA2) (Zhou J. *et al.*, 2015). Cet ensemble de molécules participe à différentes fonctions (prolifération, pro-inflammatoire, anti-apoptotique via la production de nombreux inhibiteurs de l'apoptose, l'inflammation,

l'angiogenèse, le développement tumoral, les métastases ou encore la résistance aux drogues (Gasparini C. *et al.*, 2014). Parmi les premiers gènes à transcrire, le complexe NF- κ B induit aussi l'expression du gène *nfk1* codant pour p100, le précurseur de p52 et l'inhibiteur de la voie canonique sous le nom d'I κ B δ et du gène *nfkbia* codant pour la protéine I κ B α . Ainsi, ces deux protéines vont pouvoir exercer un rétrocontrôle négatif sur l'activation du complexe NF- κ B (Carrà G *et al.*, 2016).

I κ B α peut alors migrer vers le noyau pour décrocher l'hétérodimère p50/RelA de l'ADN pour arrêter son activité de stimulation. L'action inhibitrice d'I κ B α dans le noyau peut être complétée par celle d'I κ B β (Mitchell S. *et al.*, 2016). I κ B δ , étant insensible aux signaux d'activation de la voie canonique, va jouer un rôle de modérateur en régulant le taux d'activation de la voie canonique à long terme (Shih VF. *et al.*, 2011). Par ailleurs, I κ B δ est un intermédiaire clé entre la voie canonique qu'il régule et la voie non canonique à laquelle il participe au cours de son activation. Ainsi, les signaux de la voie non canonique tels que LT β R ou BAFF peuvent stimuler ou prolonger l'activation de la voie canonique (Mitchell S. *et al.*, 2016).

IKK peut également venir moduler directement l'activité du complexe NF- κ B lié à un élément de réponse dans la zone promotrice d'un gène cible. Pour cela, IKK phosphoryle RelA (et parfois cRel) induisant leur ubiquitinylation suivie de leur dégradation par le protéasome (Shih VF. *et al.*, 2011).

Les signaux induisent l'activation transitoire de NF- κ B. Au contraire si l'activation devient prolongée alors elle peut induire une expression aberrante de certains gènes due à une dérégulation de l'expression de NF- κ B causant des cancers ou des maladies inflammatoires chroniques (Shih VF. *et al.*, 2011).

En fonction du stimulus, la vitesse d'activation de la voie canonique est différente. Par exemple, le TNF induit une activation rapide d'IKK. Cette activité est effective à court terme. Au contraire, une stimulation via le LPS entraîne une activation lente d'IKK mais par conséquent une action plus longue dans le temps. L'induction avec le LPS peut se faire en parallèle de celle avec le TNF permettant de prolonger la durée d'activation d'IKK et par conséquent celle de NF- κ B (Werner SL. *et al.*, 2005 ; Covert MW. *et al.*, 2005 ; Shih VF. *et al.*, 2011)

2) Voie non canonique

La voie non canonique est indépendante de l'activation via NEMO mais dépendante de l'activation d'IKK α et de la protéine NIK (NF- κ B Inducing Kinase) (Figure 34) (Mitchell S. *et al.*, 2016 ; Shih VF. *et al.*, 2011). La voie non canonique active NF- κ B sous la forme du complexe RelB/p52 majoritairement ou du complexe RelB/p50 (Gasparini C. *et al.*, 2014).

La voie non canonique est stimulée par différents signaux dont le facteur d'activation des cellules B BAFF (B cells Activating Factor), le ligand CD40, le LT β R, le RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand), le TNF, le Fn14 (Zhou J. *et al.*, 2015 ; Mitchell S. *et al.*, 2016). Les stimuli empêchent la dégradation par ubiquitinylation de la protéine kinase NIK par le complexe TRAF-cIAP (Figure 35). En effet, la stimulation du récepteur TRAF2 induit le recrutement du complexe cIAP1/cIAP2. Ainsi, les protéines cIAPs activées (comme la protéine K63 linked ubiquitination) induisent alors l'ubiquitinylation de la molécule adaptatrice du complexe TRAF3 (par l'action de la protéine K48 linked ubiquitination). TRAF3 se détache alors des autres membres du complexe cIAPs (Shih VF. *et al.*, 2011). Une fois, le complexe dissocié, le niveau d'expression de la protéine kinase NIK passe de l'état basal à un taux d'expression élevé au sein de la cellule. NIK possède deux rôles. Le premier est de phosphoryler I κ B δ (=le précurseur p100) conduisant à sa dégradation pour libérer le complexe préexistant p50/RelB ou p52/RelB séquestré dans le cytoplasme (Gasparini C. *et al.*, 2014) qui peut alors migrer vers le noyau pour activer des fonctions immunologiques et/ou de développement (Mitchell S. *et al.*, 2016). Pour le deuxième, NIK phosphoryle le complexe IKK α sur ses résidus de sérines et thréonines 866 et 870 de la boucle d'activation (Mitchell S. *et al.*, 2016 ; Carrà G *et al.*, 2016). Ce dernier phosphoryle le précurseur p100 sur ces résidus de sérines 99 ; 108 ; 115 ; 123 ; 872 en C-Terminal (Zhou J. *et al.*, 2015 ; Mitchell S. *et al.*, 2016 ; Carrà G *et al.*, 2016 ; Shih VF. *et al.*, 2011). Ces sites phosphorylés sont reconnus par SCF/ β TRCP ubiquitin ligase. Le précurseur p100 est alors dégradé partiellement de la partie ARD par le protéasome 26S donnant le monomère p52 mature (Mitchell S. *et al.*, 2016 ; Carrà G *et al.*, 2016). p52 forme un hétérodimère avec RelB (Mitchell S. *et al.*, 2016 ; Carrà G *et al.*, 2016 ; Shih VF. *et al.*, 2011). Le complexe RelB/p52 part au noyau se fixer sur différents éléments de réponse pour induire l'expression des cytokines (BAFF, BlyS), des chimiokines (BLC, SLC, SDF-1, ELC), des gènes de l'organogénèse lymphoïde (PNAd, GlyCAM-1) (Zhou J. *et al.*, 2015). La voie non canonique joue un rôle important dans la régulation des fonctions biologiques des lymphoïdes : l'organogénèse lymphoïde,

développement lymphoïde, l'organisation des nœuds lymphoïdes, la formation des cellules B (maturation et survie), l'organisation de la réponse immunitaire adaptative, la survie, l'activation des cellules dendritiques, le métabolisme de la moelle osseuse (Zhou J. *et al.*, 2015 ; Mitchell S. *et al.*, 2016 ; Carrà G *et al.*, 2016 ; Shih VF. *et al.*, 2011 ; Gasparini C. *et al.*, 2014). La voie non canonique présente aussi une activité anti inflammatoire (Gasparini C. *et al.*, 2014).

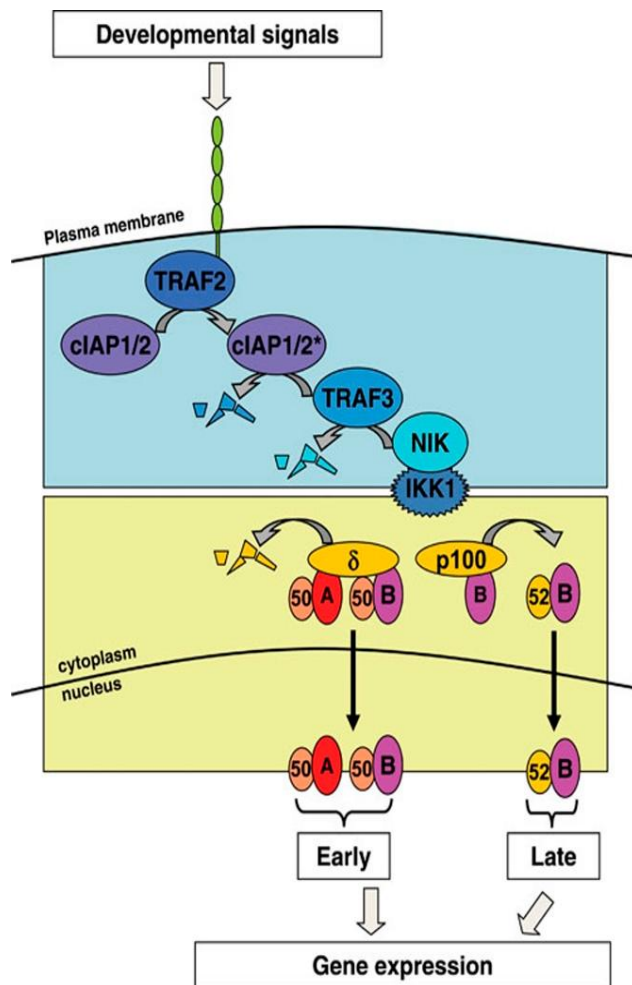


Figure 35 : L'activation de la voie non canonique : La stimulation par des facteurs du développement du récepteur TRAF2 permet le recrutement des protéines cIAP1/2 entraînant la dégradation de TRAF3. La protéine NIK stabilisée active IKK1 qui induit la dégradation IκB δ. Les complexes p50/p65/RelA et p50/RelB peuvent induire l'expression de gènes cibles. IKK1 peut aussi induire la maturation de p100 en p52. La sous unité p52 obtenue s'associe à RelB pour induire à son l'expression de gènes cibles. (Shih VF. *et al.*, 2011)

Durant la maturation des cellules B, BAFF active la voie non canonique dépendante du taux d'expression de p100. Avec un taux modéré de p100, BAFF induit la production de p52 et inhibe la formation d'IκBδ (Figure 35). Avec un fort taux de p100, BAFF dégrade IκBδ (Mitchell S. *et al.*, 2016).

Une fois NF-κB activé, le complexe induit l'expression de la protéine TRAF3. Par la suite cette dernière va exercer un rétrocontrôle négatif sur l'activation de la voie non canonique. Après une activation de la voie non canonique, la protéine NIK va être

phosphorylée sur les sérines 809, 812, 815 par IKK causant sa déstabilisation menant à l'activation de la voie canonique. Les microARN miR223, miR16, miR15a sont impliqués dans le ciblage d'IKK pendant la différenciation des macrophages participe à la régulation de la voie non canonique. Dans les thymocytes primaires, RelB est phosphorylé par TPA/Ionomysin causant sa dégradation. Il s'agit d'un mécanisme de contrôle du turn-over de la voie non canonique limitant le temps d'induction (Shih VF. *et al.*, 2011).

La voie non canonique est activée suite à la stimulation des récepteurs TNF qui sont aussi impliqués dans le développement. La cinétique d'activation de la voie est lente mais durable dans le temps contrairement aux stimulations inflammatoires (Shih VF. *et al.*, 2011).

3) Interactions entre les deux voies

NF- κ B est capable d'activer deux voies différentes : la voie canonique et la voie non canonique. Ces deux voies ont toujours été considérées comme deux voies bien distinctes et indépendantes l'une de l'autre. Mais des études récentes ont prouvé des liens qui existaient entre les deux voies permettant notamment la régulation d'une voie par l'autre voie (Shih VF. *et al.*, 2011).

Par exemple, lorsque p65/RelA est surexprimé, il peut se lier à p100 sur sa partie C-Terminale (Figure 36). La voie LT β R (normalement stimulateur de la voie non canonique) est capable de rompre le complexe inhibiteur I κ B δ libérant l'hétérodimère p50/ p65/RelA : les effecteurs de la voie canonique pour migrer vers le noyau. L'association p65/RelA et I κ B δ sous l'activation du TNF augmente l'expression du gène codant pour la protéine inflammatoire LT β R. I κ B δ donc à la fois inhibe l'activité de p65/RelA dans la voie canonique et active après stimulation la voie non canonique. Ainsi, I κ B δ est un médiateur à l'intersection des deux voies canonique et non canonique. La régulation d'I κ B δ module l'activité de RelA/p50 en balance entre la voie canonique et la voie non canonique dans des cellules saines physiologiquement en présence de multiples stimuli. (Pomerantz JL. et Baltimore D. *et al.*, 2002 ; Mercurio F. *et al.*, 1993 ; Tucker E. *et al.*, 2007 ; Novack DV. *et al.*, 2003 ; Ishimaru N. *et al.*, 2006 ; Courtois G. et Gilmore TD., 2006 ; Shih VF. *et al.*, 2011). Le microenvironnement régule aussi l'activation des deux voies. En contact avec des signaux inflammatoires, le microenvironnement favorise la dégradation d'I κ B δ libérant p50/RelA pour exercer leur activité anti-inflammatoire (Shih VF. *et al.*, 2011).

Une expression élevée de NIK et un taux important de p100 traduisent une activation de la voie non canonique. Cependant, les dimères contenant p65/RelA peuvent être activés par l'axe NIK/IKK β lorsque NIK est surexprimé s'accumulant dans la cellule. La voie canonique est alors aussi active (Shih VF. *et al.*, 2011).

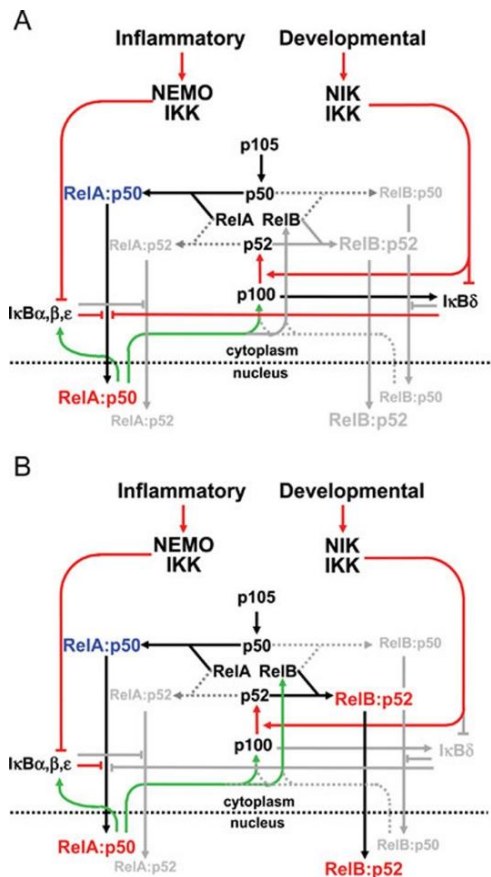


Figure 36 : Les interactions entre les voies canonique et non canonique (A) La voie non canonique contrôle l'activité du complexe p50/p65/RelA. Son activité est inhibée par I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B δ . au contraire quand le complexe p50/p65/RelA est situé au noyau, il stimule l'activité de I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B δ , p100. (B) La voie canonique contrôle l'activité du complexe RelB/p52. L'expression basale de p100 et de RelB dépend de l'activité du complexe p50/p65/RelA (Shih VF. *et al.*, 2011).

L'interdépendance des deux voies est mise en évidence lors du contrôle de la transcription. Les promoteurs des gènes *relb* et *nfkb2* contiennent des séquences κ B-DNA. La régulation de la transcription de ces gènes dépend de RelA. LT β R active la voie canonique via p65/RelA/p50 alors que LT β R est activé par la voie non canonique via RelB/p52. La transcription homéostatique de *relb* est induite par l'activité basale de p65/RelA alors que le processus de maturation de p100 a lieu après l'activation de p65/RelA. Ce sont des points majeurs de l'activation de la voie non canonique. Ainsi, l'activité de la voie canonique est importante pour induire celle de la voie non canonique dans la formation des nodes lymphoïdes. Il s'agit bien d'une interdépendance physiologique des deux voies (Shih VF. *et al.*, 2011). Par ailleurs, la famille TRAF (TNF Receptor Associated Factor) joue aussi le rôle clé d'intermédiaire entre les deux voies canonique et non canonique. Ces membres deviennent

actifs sous stimulation d'IKK (pour la voie canonique) et de NIK (pour la voie non canonique). TRAF2 et TRAF3 présentent des activités distinctes participant aux voies d'activation NF- κ B. TRAF2 et TRAF6 sont recrutés pour induire la voie canonique. Alors que TRAF3 est un inhibiteur de la voie canonique mais, activateur de la voie non canonique (Bren GD. *et al.*, 2001 ; Liptay S. *et al.*, 1994 ; Muller JR *et al.*, 2003 ; Alcamo E. *et al.*, 2002 ; Gasparini C. *et al.*, 2014).

Les séquences κ B-DNA reconnues par l'hétérodimère p52/RelB sont différentes de celles reconnues par l'hétérodimère p50/RelA. Néanmoins, ces deux complexes sont tous deux des mécanismes de cellules eucaryotes et peuvent donc se lier sur des séquences consensus communes (Shih VF. *et al.*, 2011).

D) Rôle de NF- κ B dans le développement tumoral

1) Maladies hématologiques

Dans les tumeurs, l'activité de NF- κ B est souvent constitutive induisant une surexpression des gènes cibles codant pour des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des facteurs de croissance, des régulateurs du cycle cellulaire, des molécules anti-apoptotiques, des molécules de l'adhésion et des protéases de la matrice (Gasparini C. *et al.*, 2014) entraînant l'échappement à l'apoptose, la prolifération, la résistance des cellules leucémiques aux chimiothérapies et aux radiations, favorisant l'évolution de la pathologie et le développement des métastases (Zhou J. *et al.*, 2015 ; Carrà G *et al.*, 2014).

La voie NF- κ B joue donc un rôle majeur dans le développement de la leucémie myéloïde aiguë. (Zhou J. *et al.*, 2015). NF- κ B est aussi un modulateur majeur des leucémies myéloïdes chroniques BCR-ABL et des leucémies lymphoblastiques aiguës Philadelphie⁺ (Carrà G *et al.*, 2014).

a) NF- κ B dans la leucémie myéloïde chronique

La protéine de fusion BCR-ABL entraîne une activation constitutive de la voie NF- κ B via la voie canonique avec une activation constitutive des sous unités p65/RelA dans les blastes du sang périphérique (Gasparini C. *et al.*, 2014).

BCR-ABL régule la voie NF- κ B. Ce dernier participe au développement de la tumeur BCR-ABL. La présence de Ras est nécessaire pour réguler NF- κ B. Dans des cellules BCR-ABL dépendantes, NF- κ B ne semble pas protéger les cellules de l'apoptose en présence de l'apport d'IL3 ou de traitement avec des agents endommageant l'ADN. Mais NF- κ B module la tumorigénèse de BCR-ABL. L'activation de NF- κ B est partiellement dépendant d'I κ B α mais indépendante d'IKK. L'activation de NF- κ B dépend aussi des cibles activées par BCR-ABL dont MEKK1. En effet, BCR-ABL augmente l'expression et l'activité de MEKK1 qui induit une augmentation de l'activité de NF- κ B. Par ailleurs, BCR-ABL induit aussi l'activation de NF- κ B via la phosphorylation de PKD2 (Protein Kinase D2) sur sa Tyrosine 438. L'ostéopontine produite par les cellules BCR-ABL⁺ peut se fixer sur des récepteurs de l'intégrine et réguler l'expression autocrine d'I κ B α (Carrà G *et al.*, 2016).

La voie NF- κ B est contrôlée par différentes cytokines produites par les cellules stromales ou par la tumeur directement. Par exemple, le TNF α , la plus importante des cytokines capable de moduler NF- κ B, est contrôlé par BCR-ABL directement. Les cellules souches leucémiques BCR-ABL indépendantes augmentent la production de TNF α favorisant l'activation de NF- κ B. La production autocrine de TNF α favorise la survie des cellules souches leucémiques et des cellules progénitrices. Le ciblage thérapeutique de la voie TNF α /NF- κ B induit une synergie d'action avec les thérapies inhibitrices de BCR-ABL. Ainsi, le microenvironnement joue un rôle clé dans la régulation de la voie NF- κ B dans la LMC. Le TGF β joue aussi un rôle important dans le développement de la LMC en gérant différentes voies de signalisation PI3K/AKT/NF- κ B/MMP9. Le microenvironnement des cellules leucémiques Philadelphie⁺ régule l'activité de NF- κ B. La sécrétion autocrine de TNF α et des cytokines produites par le microenvironnement soutient la voie NF- κ B dans la LMC (Carrà G *et al.*, 2016).

b) NF- κ B dans la leucémie myéloïde aiguë

40% des cas LAM présentent une activation constitutive de NF- κ B (Carrà G *et al.*, 2016). Cette activation constitutive peut être due à une altération des gènes qui codent pour NF- κ B ou les inhibiteurs de NF- κ B favorisant l'activation de NF- κ B. Par exemple, IKK peut être activé de façon constitutive et phosphoryle anormalement I κ B entraînant une activation permanente de NF- κ B. Par ailleurs, la présence constitutive de stimuli dans le

microenvironnement tumoral peut être aussi une cause de l'activation constitutive de la voie NF- κ B (Zhou J. *et al.*, 2015).

Différentes protéines ou voies de signalisation sont responsables ou participent à l'activation constitutive de NF- κ B. La protéine ATM, activée constitutivement, interagit avec la sous unité NEMO du complexe catalytique IKK et la protéine PIDD (p53 Induced Death Domain) qui ensemble activent NF- κ B. La protéine RUNX1 en se liant à IKK atténue son effet inhibiteur sur I κ B limitant ainsi l'activation de NF- κ B. Mais dans les cellules leucémiques, RUNX1 est souvent muté empêchant son action inhibitrice vis à vis d'IKK causant l'activation constitutive de NF- κ B. Le TNF α peut se lier à deux récepteurs TNF-R1 et TNF-R2 permettant une activation de la voie canonique. Dans les cas de LAM, les cellules souches leucémiques réalisent une production autocrine de TNF α ayant pour conséquence une activation constitutive de NF- κ B. La voie Ras peut aussi réguler une augmentation de l'activité de NF- κ B. Dans les blastes de LAM, un lien significatif a été démontré entre la présence de NF- κ B nucléaire pour son activité de liaison à l'ADN et l'activation persistante de la voie Ras (par Birkenkamps). Par ailleurs, la présence de FLT3 surexprimée ou mutée dans les blastes de LAM entraîne une activation constitutive de NF- κ B. FLT3 s'associe à ITD formant le complexe FLT3-ITD qui induit l'expression de RelB, des hétérodimères p52/RelB activant préférentiellement la voie non canonique (Zhou J. *et al.*, 2015).

2) Dans le mélanome

L'activation constitutive de NF- κ B est un marqueur du mélanome comme pour d'autres tumeurs (Wang W. *et al.*, 1999 ; Bours V. *et al.*, 1994 ; Sovak MA *et al.*, 1997 ; Dejardin E. *et al.*, 1995 ; Duffey DC *et al.*, 1999 ; Nakshatri H. *et al.*, 1997) Son expression et sa liaison à l'ADN sont constitutivement plus élevées dans les cellules de mélanome par rapport aux melanocytes (McNulty SE. *et al.*, 2001 ; Dhawan P. *et al.*, 2002). Les aberrations de NF- κ B (augmentation de la phosphorylation et de la translocation nucléaire de p65/RelA) sont retrouvées dès les premiers stades de développement du mélanome et tout au long de la progression de la tumeur (Dhawan P. *et al.*, 2002 ; McNulty SE. *et al.*, 2004, Amiri KI. et Richmond A., 2005). NF- κ B joue donc un rôle majeur dans le développement du mélanome (transformation, initiation, promotion, invasion, angiogénèse, métastase). L'augmentation de l'activation de NF- κ B est due à la dérégulation des voies de signalisation Ras/Raf, PI3K/AKT, NIK (Amiri KI et Richmond A., 2005).

Dans le mélanome, NF- κ B induit l'activation de l'expression des gènes codant pour des protéines anti apoptotiques (tels que TRAF1, TRAF2, cIAP1, cIAP2, ML-IAP (MeLanoma IAP), la Survivine, les protéines de la famille Bcl2) détectables dès la phase nevi et tout au long des différentes phases de développement du mélanome jusqu'aux phases d'invasion et de métastases (Deveraux QL. *et al.*, 1998 ; Wang CY. *et al.*, 1998 ; Baldwin AS., 1996 ; Micheau O. *et al.*, 2001 ; Ravi R. *et al.*, 2001 ; Catz SD. et Johnson JL., 2001 ; Grossman D. *et al.*, 1999 ; Vucic D. *et al.*, 2000 ; Alonso SR *et al.*, 2004). L'expression de TRAIL est inhibée par NF- κ B empêchant la mise en place de l'apoptose (Ravi R *et al.*, 2001). À l'inverse, la suppression de l'activité de NF- κ B induit l'apoptose via la fixation du ligand Fas (Ivanov VN. *et al.*, 2001). En plus de l'inhibition de l'apoptose, NF- κ B régule aussi la progression du cycle cellulaire par l'expression de nombreuses protéines régulatrices du cycle cellulaire telles que la cycline D1, CDK2 contribuant aussi au développement tumoral (Guttridge DC. *et al.*, 1999 ; Bash J. *et al.*, 1997). Les cellules de mélanome échappent aux mécanismes de contrôle cellulaire permettant l'initiation de la prolifération cellulaire. L'activation nucléaire constitutive de NF- κ B joue un rôle clé dans l'expression endogène des chimiokines, des interleukines IL1 et IL6, VEGF ainsi que d'autres facteurs participant à la croissance des cellules de mélanome. CXCL1 et CXCL8 induisent la sécrétion de chimiokines qui à leur tour active NF- κ B qui induit l'expression CXCL1 et CXCL8 (Yang J. et Richmond A., 2001). Il s'agit donc d'une boucle perpétuelle d'activation de NF- κ B. La présence additionnelle ou les altérations dans les voies de signalisation contribuent à la dérégulation de NF- κ B dans le mélanome. Le taux d'expression de CXCL8 qui est dépendant de NF- κ B est corrélé avec l'agressivité du mélanome. Les chimiokines avec le VEGF permettent le développement de l'angiogénèse des cellules du mélanome et travaillent de concert pour permettre la néovascularisation de la tumeur (Rofstad EK. et Halsør EF., 2000). NF- κ B sert de médiateur entre les cellules du mélanome et la vascularisation tumorale (Kashani-Sabet M. *et al.*, 2004). L'activation endogène de NF- κ B participe à la progression et augmente le potentiel métastatique des cellules de mélanome malin (Amiri KI. et Richmond A., 2005).

NF- κ B régule la production de prostaglandines via la cyclooxygénase COX2 surexprimée dans le mélanome (Denkert C. *et al.*, 2001 ; Goulet AC. *et al.*, 2003). NF- κ B facilite l'invasion et l'état métastatique via la production d'ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1), de VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), d'ELAM-1 (Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1), MMPs (Matrix MetalloProteinases) (Van de Stolpe A. *et*

al., 1994 ; Bond M. *et al.*, 1998). Ces différentes protéines sont des médiateurs permettant la migration, l'invasion cellulaire. Le pourcentage de cellules de mélanome exprimant la protéine ICAM-1 est proportionnel à la phase de développement du mélanome. Ainsi, les cellules en phase métastatique expriment beaucoup plus ICAM-1 par rapport aux cellules aux premiers stades de développement. ICAM-1 facilite les interactions entre les cellules de mélanome et les leucocytes permettant d'augmenter l'adhésion des cellules tumorales, la migration et l'invasion des leucocytes (Johnson JP. *et al.*, 1989 ; Hirai S. *et al.*, 1997). VCAM-1 contribue à l'état métastatique (Langley RR. *et al.*, 2001) L'expression d'ECAM-1 (E-Selectin) joue un rôle dans l'adhésion des leucocytes et la transmigration de l'endothélium. NF- κ B est un régulateur central des différents stades de développement des cellules du mélanome malin (Amiri KI et Richmond A., 2015).

NF- κ B joue aussi un rôle dans la résistance aux chimiothérapies classiques par l'induction des transporteurs ABC (Wang CY *et al.*, 1999 ; Deng L. *et al.*, 2001). NF- κ B induit la surexpression des gènes codant pour la résistance multiple aux drogues avec les glycoprotéines correspondantes entraînant une résistance aux différents traitements en empêchant l'entrée des drogues dans la cellule (Kuo MT. *et al.*, 2002 ; Zhou G. *et al.*, 1997). Lorsque les cellules ont une résistance multiple aux drogues, on observe une augmentation de l'expression de la sous unité p65 et d'activité de NF- κ B. L'inhibition de NF- κ B permet de réduire l'expression des transporteurs ABC et des glycoprotéines et de resensibiliser les cellules exprimant cette résistance aux chimiothérapies classiques (Um JH. *et al.*, 2001). NF- κ B protège le mélanome des différentes chimiothérapies (Amiri KI. et Richmond A., 2015).

L'altération de NF- κ B est accompagnée par une augmentation d'expression des cytokines et chimiokines anti apoptotiques, des facteurs de croissance, des oncogènes (Wang D. *et al.*, 2000 ; Brandt RL. et Richmond A., 1997 ; Shih IM. et Herlyn M., 1994), des protéines d'adhésion, des protéases (Gilmore TD. *et al.*, 1996), des inhibiteurs de l'apoptose (Karin M. et Lin A., 2002). Les cellules malignes de mélanome présentent une activation constitutive d'IKK entraînant une dégradation rapide d'I κ B permettant une localisation nucléaire de NF- κ B, une activation transcriptionnelle de NF- κ B. L'activation de NF- κ B induit l'expression des inhibiteurs de l'apoptose, des facteurs associés à l'angiogénèse, la croissance et au métastase (Amiri KI. et Richmond A., 2015).

Surexprimé, NIK augmente l'activation de NF- κ B via la phosphorylation d'IKK α , IKK β (Ling L. *et al.*, 1998 ; Nakano H. *et al.*, 1998). NIK est aussi impliqué dans le processus de p100 maturé en p52 (Xiao G. *et al.*, 2001). La dérégulation de NIK joue un rôle dans l'activation constitutive de NF- κ B dans le mélanome. L'activité d'IKK dépendante de NIK est augmentée dans les cellules du mélanome par rapport aux cellules du mélanocyte. NIK module l'activation d'ERK qui contribue à l'activité de NF- κ B (Dhawan P. et Richmond A., 2002 ; Amiri KI. et Richmond A., 2015).

E) Modifications post traductionnelles de p65/RelA

La régulation de la voie NF- κ B passe par des modifications post traductionnelles qui contrôlent l'ensemble des composants du complexe NF- κ B : le complexe IKK, les protéines I κ B, les sous unités p65/RelA, RelB, cRel, p50, p52. Les modifications régulatrices : la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitylation, la sumoylation, la nitrosylation présentes dépendent du contexte, des stimulations, du type cellulaire. Les modifications sont le plus fréquemment distinctes, parfois antagonistes dans leurs conséquences fonctionnelles. Une même modification peut avoir des effets différents en fonction du contexte (Perkins ND., 2006).

Les modifications post traductionnelles de p65/RelA induisent la translocation nucléaire du complexe NF- κ B (Figure 37). Ces modifications peuvent agir ensemble ou activer séparément des voies différentes. La phosphorylation de p65/RelA dans le cytoplasme active le processus d'activation du complexe NF- κ B en commençant par la translocation nucléaire (Perkins ND., 2006).

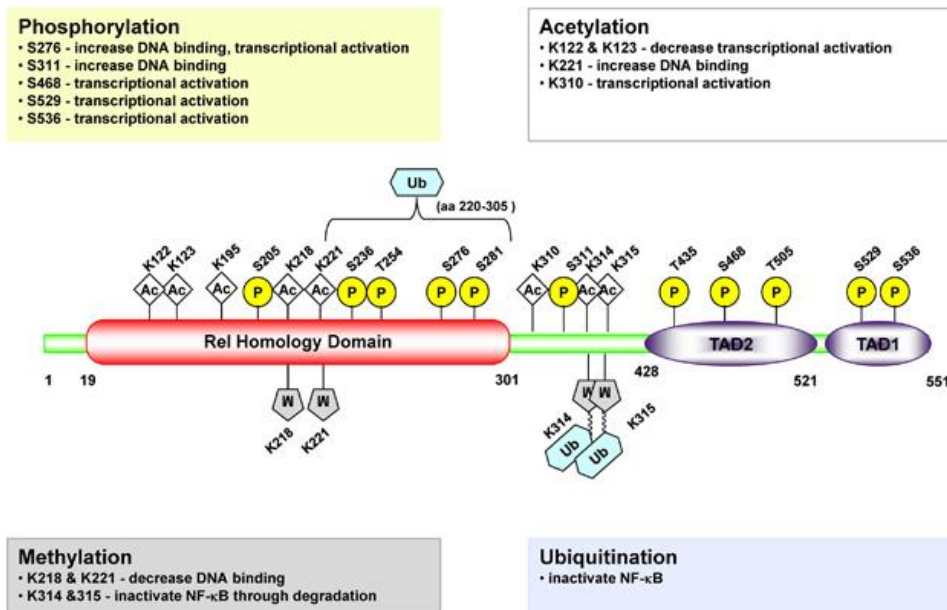


Figure 37 : Représentation des différentes modifications post traductionnelles au sein des domaines RHD et TAD de la sous unité p65/RelA : Ac, acétylation; K, résidu de lysine; M, méthylation; P, phosphorylation; S, résidu de sérine; Ub, ubiquitination (Chaturvedi MM. *et al.*, 2001).

La capacité à recruter des partenaires ou à induire l'expression de gènes est régulée par les modifications post traductionnelles présentes sur p65/RelA et aussi à l'environnement de la chromatine (Vermeulen L. *et al.*, 2002).

1) Phosphorylation

De nombreuses kinases peuvent phosphoryler p65/RelA dans ses différents domaines sur 7 résidus de sérines et 3 de thréonines selon les stimulations environnementales. La majorité des sites phosphorylables se situe dans le domaine RHD de la région N-Terminale et dans le domaine d'activation transcriptionnelle (TAD) de la région C-Terminale (avec les sous domaines TA1 et TA2, ce dernier régule la liaison aux coactivateurs et aux corépresseurs) (Huang B. *et al.*, 2010 ; Perkins ND., 2006). p65/RelA peut être phosphorylé à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Huang B. *et al.*, 2010). Ces phosphorylations évoluent dans le temps et selon les conditions environnementales modulant l'activité transcriptionnelle de NF-κB en fonction du site de phosphorylation et des stimuli responsables de la phosphorylation mais aussi du type cellulaire permettant de favoriser ou inhiber l'expression de gènes cibles (Huang B. *et al.*, 2010 ; Perkins ND., 2006).

Plusieurs stimuli dont le LPS, le TNFα et le TGFβ activent la protéine kinase A (PKA). Cette dernière via sa sous-unité catalytique va phosphoryler le résidu très conservé de sérine

276 dans le domaine RHD de p65/RelA (Huang B. *et al.*, 2010 ; Perkins ND., 2006 ; Vermeulen L. *et al.*, 2002 ; Quivy V. et Van Lint C., 2004). La phosphorylation de Ser276 suite à différentes stimulations entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (Huang B. *et al.*, 2010). Dans le noyau, en réponse au TNF α , à l'IL1 β , au RSV (Respiratory Syncytial Virus) et à l'infection *Helicobacter pylori*, la sérine 276 est aussi la cible de MSK1 (Mitogen and Stress activated protein Kinase 1) induisant une dissociation entre la partie N-terminale et la partie C-Terminale de p65/RelA qui formaient jusqu'alors une liaison intramoléculaire ainsi que la liaison à l'ADN et l'interaction avec le coactivateur p300/CBP (Huang B. *et al.*, 2010 ; Perkins ND., 2006 ; Vermeulen L. *et al.*, 2002 ; Quivy V. et Van Lint C., 2004). L'effet de cette phosphorylation peut varier selon le promoteur du gène cible (Perkins ND., 2006). La phosphorylation de la Ser276 augmente l'activité transcriptionnelle mais aussi l'expression dépendante des cytokines IL6 et IL8. L'augmentation de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B via la phosphorylation de la Ser276 est due à un changement de conformation induisant une augmentation de liaison de p65/RelA aux coactivateurs de NF- κ B qui jouent le rôle d'intermédiaires avec les éléments de la machinerie transcriptionnelle (Huang B. *et al.*, 2010 ; Campbell KJ. et Perkins ND., 2004). La forme non phosphorylée de RelA favorise la liaison avec les represseurs transcriptionnels diminuant l'activité transcriptionnelle de NF- κ B. Au delà du recrutement des coactivateurs ou du détachement des corépresseurs, la phosphorylation de la Ser276 régule l'activité de NF- κ B via d'autres mécanismes tels que la stabilisation de p65/RelA lorsque la Ser276 est phosphorylée par la kinase Pim 1 suite à la stimulation du TNF α (Huang B. *et al.*, 2010).

Suite à la présence de stimuli inflammatoires, p65/RelA peut être aussi phosphorylé sur sa sérine 536 dans la partie TA1 du domaine de transactivation TAD. Elle est la cible de phosphorylation dans de nombreuses conditions par différentes kinases dont des IKKs (IKK β ou IKK α ou IKK ϵ), RSK-1 (Ribosomal Subunit Kinase 1), TBK1 (TANK Binding Kinase), NAK régulant de nombreuses fonctions (Huang B. *et al.*, 2010 ; Perkins ND., 2006 ; Vermeulen L. *et al.*, 2002 ; Quivy V. et Van Lint C., 2004). IKK phosphoryle la Ser536 de p65/RelA suite à l'induction par le TNF α , LPS, *Helicobacter pylori*, HTLV1 (Human T Lymphotropic Virus 1), la protéine Tax du virus lymphotrope des cellules T humaines, la lymphotoxine β modulant la liaison à l'ADN (Huang B. *et al.*, 2010 ; Quivy V. et Van Lint C., 2004). L'augmentation de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B après la phosphorylation sur la Ser536 est due à un changement de conformation de p65/RelA modifiant ses interactions

avec ses partenaires. La phosphorylation de la Ser536 par IKK augmente l'affinité de p65/RelA pour la protéine p300 mais diminue l'interaction avec le corepresseur SMRT (Silencing Mediator for Retinoic acid receptor and Thyroid hormone receptor). La phosphorylation de la Ser536 modulée par RSK1 et TBK1 diminue l'affinité de p65/RelA pour I κ B α favorisant sa libération pour aller au noyau (Huang B. *et al.*, 2010). La Ser536 phosphorylée module aussi la liaison à l'ADN (Perkins ND., 2006). La phosphorylation de la Ser536 est un marqueur actif de l'activation de la voie canonique. La phosphorylation de la Ser536 peut aussi être impliquée dans l'activation de la voie non canonique qui est indépendante du taux de dégradation d'I κ B α . La régulation de l'expression des gènes par cette voie est différente de celle modulée par la dégradation d'I κ B α de la voie canonique (Huang B., *et al.* 2010).

La sérine 468 de p65/RelA de la partie TA2 dans le domaine TAD de p65/RelA peut être phosphorylée par différentes kinases GSK3 β , IKK β , IKK ϵ en présence ou non de stimulation. Ces deux dernières kinases agissent en réponse à la stimulation par le TNF α et IL-1 β (Huang B. *et al.*, 2010 ; Perkins ND., 2006). La phosphorylation de la Ser468 modulée par IKK ϵ a lieu dans le noyau alors que celle modulée par IKK β a lieu dans le cytoplasme. La phosphorylation de la Ser468 peut à la fois stimuler ou inhiber la transactivation de p65/RelA. (Perkins ND., 2006). La phosphorylation de la Ser468 par ces kinases peut donc diminuer l'activité de NF- κ B entraînant une baisse de l'expression des gènes cibles. Ou au contraire, la phosphorylation de la Ser468 induite par IKK ϵ dans les cellules T augmente l'activation transcriptionnelle de NF- κ B en réponse à une costimulation des cellules T (Huang B. *et al.*, 2010 ; Quivy V. et Van Lint C., 2004). La phosphorylation de la Ser468 régule l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (Huang B. *et al.*, 2010).

D'autres sites sont phosphorylés pour réguler l'activité de NF- κ B : les Ser205, Ser281, Ser311, Ser529, Thr254, Thr435, Thr505 (Huang B. *et al.*, 2010 ; Perkins ND., 2006). La phosphorylation de ces sérines régule l'activité transcriptionnelle de certains gènes cibles de NF- κ B (Huang B. *et al.*, 2010). Néanmoins, l'absence de la phosphorylation sur le résidu Ser205 n'inhibe que partiellement l'activité de p65/RelA (Perkins ND., 2006). La Ser311, présente dans le domaine de transactivation à la jonction du domaine d'homologie Rel (RHD), est phosphorylée par PKC ζ après stimulation au TNF α (Huang B. *et al.*, 2010 ; Perkins ND., 2006 ; Quivy V. et Van Lint C., 2004). Comme la phosphorylation des Ser276, Ser536, celle de la Ser311 augmente l'activité transcriptionnelle de NF- κ B par le recrutement de

coactivateurs dont CBP sur le promoteur d'IL6 (Campbell KJ. et Perkins ND., 2004). La phosphorylation de Ser536 présent dans la partie TA1 du domaine de transactivation en présence de stimuli inflammatoires (TNF α , IL1) par la kinase CK2 (Casein Kinase 2) induit la stimulation de la transactivation de p65/RelA augmentant modérément l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (Huang B. *et al.*, 2010 ; Perkins ND., 2006 ; Vermeulen L. *et al.*, 2002 ; Quivy V. et Van Lint C., 2004). Avec la phosphorylation de la Ser536, celle de la Ser529 augmente la présence de charges négatives dans le domaine de transactivation favorisant la liaison basale aux composants de la transcription (Campbell KJ. et Perkins ND., 2004). p65/RelA peut être aussi phosphorylée sur la Thr254 présente dans le domaine d'homologie de Rel (RHD) suite à une stimulation du TNF formant un motif pThr-Pro qui peut alors s'isomériser avec la protéine Pin-1 (Peptidyl Prolyl isomerase). Cette protéine permet la dissociation d'I κ B α induisant la translocation nucléaire de NF- κ B. À l'état phosphorylé, la Thr254 peut interagir avec la Pro255 augmentant la localisation nucléaire et la stabilité mais altérant les capacités de liaison à l'ADN et de l'activité transcriptionnelle de p65/RelA. La phosphorylation de la Thr254 protège aussi de l'action d'ubiquitynilation de SOCS1 entre les résidus 220 et 335 qui amènerait à la protéolyse de p65/RelA. (Perkins ND., 2006 ; Campbell KJ. et Perkins ND., 2004). La phosphorylation de la Thr435 diminue l'activité transcriptionnelle de p65/RelA (Huang B. *et al.*, 2010 ; Perkins ND., 2006 ; Campbell KJ. et Perkins ND., 2004). La phosphorylation de Thr505 dans le domaine TA2 par Chk1 (CHeckpoint kinase 1) en réponse à la stimulation du facteur suppresseur de tumeurs ARF inhibe la transactivation de p65/RelA qui interagit alors davantage avec HDAC1 et induit une inhibition de la transcription de certains gènes cibles dont Bcl-XL (Huang B. *et al.*, 2010 ; Perkins ND., 2006 ; Campbell KJ. et Perkins ND., 2004). La phosphorylation des 2 autres thréonines permet la formation d'un site de fixation pour HDAC1 inhibant l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (Huang B. *et al.*, 2010).

La déphosphorylation de p65/RelA est une étape importante pour rétablir une réponse normale de NF- κ B après stimulation ou expression de gènes cibles. La protéine phosphatase 2A (PP2A) interagit avec p65/RelA dans des conditions non stimulantes et déphosphoryle directement p65/RelA sur la Ser536 inhibant l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (Huang B. *et al.*, 2010 ; Vermeulen L. *et al.*, 2002). La déphosphorylation de la Ser536 diminue l'interaction de p65/RelA avec p300 et donc la transcription des gènes cibles de NF- κ B (Huang B. *et al.*, 2010). PP2A peut aussi agir sous stimulation d'IL1 (Vermeulen L. *et al.*,

2002). PP2A et WIP1 déphosphorylent la Ser536 mais en agissant distinctement (Huang B. *et al.*, 2010 ; Quivy V. et Van Lint C., 2004). La déphosphorylation de la Thr435 de p65/RelA par la phosphatase 4 (PP4) permettant une augmentation de l'activité de p65/RelA peut être induite par la cisplatine (Huang B. *et al.*, 2010 ; Perkins ND., 2006).

La phosphorylation de RelA est un processus hautement régulé par les kinases cellulaires et celles dépendantes des signaux extracellulaires. (Vermeulen L. *et al.*, 2002). L'effet de la phosphorylation ou de la déphosphorylation de p65/RelA par les kinases et les phosphatases régule les fonctions du complexe NF- κ B selon les conditions environnementales, le type de stimulations mais aussi des interactions entre les kinases et les phosphatases (Perkins ND., 2006 ; Huang B. *et al.*, 2010 ; Vermeulen L. *et al.*, 2002). L'effet de ces modifications modulent la spécificité des gènes cibles ou la durée d'action de p65/RelA ou s'opposent au passage d'un état inactif à actif du complexe. Les modifications peuvent être différentes ou différées dans les conséquences fonctionnelles selon le type de stimulation (dont par exemple les agents génotoxiques, les suppresseurs de tumeur, les oncogènes). (Perkins ND., 2006). Cependant dans la majorité des cas, la phosphorylation de p65/RelA augmente sa transactivation de façon optimale (Quivy V. et Van Lint C., 2004). La déphosphorylation de p65/RelA est aussi impliquée dans la répression de l'activité transcriptionnelle de p65/RelA. Ainsi la phosphorylation comme la déphosphorylation régule l'activité de RelA (Campbell KJ. et Perkins ND., 2004).

2) Acétylation

L'acétylation et la désacétylation sont des événements impliqués dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (Huang B. *et al.*, 2010). L'association de NF- κ B avec les HAT et les HDAC est un point important de contrôle de l'activation de la transcription. Les sous unités peuvent être acétylées permettant un contrôle direct de l'activité de transcription. Les différents niveaux de régulation via l'acétylation permettent de moduler l'activité de transcription de NF- κ B. Les protéines participant à l'acétylation influencent le processus cellulaire dont les différentes régulations de la transcription via le recrutement des acétyltransférases ou des désacétyltransférases (Quivy V. et Van Lint C., 2004 ; Chen LF. et Greene WC., 2003). L'acétylation réversible est la modification post traductionnelle la plus importante pour les facteurs de transcription, les protéines régulant la structure chromosomale, les histones acétyltransférases, la protéine Tat HIV1, les protéines non

nucléaires (tubuline α), les protéines d'export nucléaire (importine α). La régulation via l'acétylation se fait à plusieurs niveaux. L'acétylation des histones limite l'accès à l'ADN. L'acétylation peut moduler aussi l'activité d'IKK. L'acétylation des sous unités p65 et p50 sur des résidus de lysine régule l'activité transcriptionnelle, l'affinité à l'ADN, l'association au complexe I κ B. Ainsi, les acétyltransférases et désacétyltransférases interagissent avec différentes protéines participant à la voie NF- κ B : IKK α ou γ , I κ B α , p65 et p50 (Quivy V. et Van Lint C., 2004 ; Perkins ND., 2006 ; Huang B. *et al.*, 2010 ; Vermeulen L. *et al.*, 2002 ; Chen LF. et Greene WC., 2003). L'acétylation de p65/RelA est impliquée dans de nombreuses conditions physiologiques comme pathologiques dont la régulation de l'inflammation, le développement de cancer. Une activation de NF- κ B par des pathogènes est associée à une acétylation de NF- κ B. L'acétylation de NF- κ B est impliquée dans la régulation de la réponse immunitaire adaptative des cellules dendritiques en réponse à des pathogènes viraux, bactériens, fongiques. Des pathogènes tels que *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV1) induisent l'acétylation de p65/RelA. L'hyperacétylation de p65/RelA est associée à de nombreux cancers entraînant une activation constitutive de NF- κ B dans les cellules cancéreuses qui se traduit notamment par une liaison plus forte à l'ADN. L'acétylation de p65/RelA permet également la transformation de cellules non tumorales en cellules tumorales. Les acétylations se produisent majoritairement dans le noyau faisant appel à des histones acétyl transférases et des histones désacétylase qui modulent l'ajout ou le retrait de groupement acétyl sur des résidus de lysine (Huang B. *et al.*, 2010). De nombreux coactivateurs (hGCN5, CBP/p300, P/CAF, SRC1) possèdent une activité intrinsèque acétyltransférase. A l'inverse, le complexe corépresseur a une activité désacétylase (Quivy V. et Van Lint C., 2004). Selon le domaine fonctionnel touché, l'acétylation modifie différentes fonctions dont la reconnaissance de l'ADN, la stabilité protéique, les interactions protéine-protéine, la localisation cellulaire (Quivy V. et Van Lint C., 2004 ; Chen LF. et Greene WC., 2003). La transcription dépendante de NF- κ B nécessite de multiples coactivateurs possédant une activité d'histone acétyltransférase tels que CBP et son paralogue p300, P/CAF (p300/CBP Associated Factor), SRC-1/Nco1. La sous unité p65/RelA peut être directement acétylée par les acétyltransférases endogènes suite à une stimulation du TNF α ou PMA ou suite à une surexpression de CBP. (Quivy V. et Van Lint C., 2004). Les interactions entre NF- κ B et les HAT indiquent un lien entre l'acétylation et l'activation de NF- κ B. L'acétylation régule l'activité de NF- κ B à différents niveaux. NF- κ B est capable d'interagir

avec des acétyltransférases mais aussi avec des désacétylases. Il existe une compétition entre les acétyltransférases et les désacétylases (Quivy V. et Van Lint C., 2004).

Il y a sept sites d'acétylation : Lys122, Lys123, Lys218, Lys221, Lys310, Lys314 et Lys315 (Figure37). La majorité des lysines sont acétylées par p300/CBP mais les lysines comme Lys122 et Lys123 peuvent être aussi acétylées par PCAF (Huang B. *et al.*, 2010). L'acétylation de la Lys221 a pour conséquence un changement de conformation ce qui augmente l'affinité de liaison à l'ADN via une augmentation de son affinité pour les κ B enhancers et au contraire diminue celle pour I κ B α (Huang B. *et al.*, 2010 ; Perkins ND., 2006 ; Quivy V. et Van Lint C., 2004 ; Chen LF. et Greene WC., 2003). L'acétylation de la Lys218 empêche également l'interaction de p65/RelA avec I κ B α (Huang B. *et al.*, 2010). Ainsi, l'association des Lys218 et Lys221 acétylées permet d'inhiber la liaison avec I κ B α jouant donc un rôle clé dans la régulation de cette interaction (Perkins ND., 2006 ; Campbell KJ. et Perkins ND., 2004 ; Quivy V. et Van Lint C., 2004 ; Chen LF. et Greene WC., 2003 ; Huang B. *et al.*, 2010). Lys310 acétylé permet le recrutement de différentes protéines du complexe transcriptionnel en étant reconnu spécifiquement par la protéine Brd4 qui active CDK9 pour phosphoryler l'ARN polymérase III induisant la transcription des gènes cibles de NF- κ B (Huang B. *et al.*, 2010 ; Chen LF. et Greene WC., 2003). Par contre, l'acétylation de la Lys310 n'affecte pas l'association avec I κ B α ou la fixation à l'ADN (Huang B. *et al.*, 2010). Au contraire, l'acétylation de Lys122 et Lys123 par p300/CBP ou par P/CAF inhibe l'activité de transcription en réduisant l'affinité de p65/RelA pour les séquences enhancer κ B (Huang B. *et al.*, 2010 ; Quivy V. et Van Lint C., 2004 ; Perkins ND., 2006 ; Campbell KJ. et Perkins ND., 2004 ; Chen LF. et Greene WC., 2003). L'acétylation de p65/RelA sur Lys314 et Lys315 par p300 n'affecte pas la liaison à l'ADN ni l'induction des gènes anti apoptotique mais active l'expression de plusieurs gènes cibles de NF- κ B suite à une stimulation du TNF α . L'acétylation de ces deux lysines prévient de la méthylation qui induit la dégradation de p65/RelA ainsi responsable de la régulation négative des fonctions de NF- κ B (Huang B. *et al.*, 2010).

L'acétylation de NF- κ B est réversible modulée par les histones acetyl transférase et les histones désacétylase transférase. L'effet des histones acétyl transférase est opposé à celui des histones désacétylase transférase (Huang B. *et al.*, 2010). Le complexe corépresseur contient HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6. HDAC1 et HDAC2 surexprimées répriment l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (Quivy V. et Van Lint C., 2004). La surexpression de HDAC1 et

HDAC2 inhibe l'activité transcriptionnelle de NF- κ B induite par la stimulation du TNF α ou la surexpression de p65/RelA (Vermeulen L. *et al.*, 2002 ; Quivy V. et Van Lint C., 2004). Plusieurs histones désacétylase transférases dont HDAC1, HDAC3 et SIRT1 désacétylent p65/RelA et régulent les fonctions de NF- κ B. Les formes acétylées de p65/RelA sont soumises à la désacétylation par l'Histone Désacétylase 3 (HDAC3) (Quivy V. et Van Lint C., 2004 ; Chen LF. et Greene WC., 2003). En inhibant l'acétylation de p65/RelA, on prévient la transformation des cellules en cellules tumorales et induit une sensibilité à l'apoptose (Huang B. *et al.*, 2010).

3) Méthylation

La méthylation est un phénomène réversible. Les conséquences fonctionnelles de la méthylation dépendent du site de méthylation et le degré de méthylation (mono, di, tri méthylation). Plusieurs méthyltransférases sont capables de méthyler NF- κ B et de réguler son fonctionnement (Huang B. *et al.*, 2010).

La méthylation de la lysine est une modification importante dans la régulation de l'activité de NF- κ B. La méthylation de p65/RelA induite par le TNF α ou LPS par Set9 régule négativement les fonctions NF- κ B via son ubiquitylation et sa dégradation du promoteur lié à NF- κ B. Set9 est capable de méthyler différents résidus de lysine de p65/RelA régulant différemment les fonctions de NF- κ B. La méthylation et la régulation des fonctions de NF- κ B par Set9 dépendent des conditions environnementales, du microenvironnement et ciblent spécifiquement les promoteurs des gènes cibles de NF- κ B. Set9 méthyle séquentiellement différentes lysines en fonction de l'état d'avancement dans le processus d'activation de NF- κ B. NSD1 (Nuclear receptor binding SET Domain containing protein 1), une histone méthyltransférase H3K36, méthyle de façon réversible une fois Lys218 et deux fois Lys221 qui sont acétylés par p300/CBP. Ainsi NF- κ B peut être aussi déméthylé par des histones demethylases. Lys218 et Lys221 sont déméthylées par FBXL11 (F-BoX Leucine rich repeat protein 11), une H3K36 déméthylase connue pour déméthyler les lysines méthylées par NSD1. La déméthylation entraîne une diminution de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (et donc l'expression des gènes cibles). Par contre, l'enzyme responsable de la déméthylation de Lys37, Lys314 et Lys315 est encore inconnue à ce jour (Huang B. *et al.*, 2010).

p65/RelA peut être aussi méthylée sur ses arginines. Plusieurs arginines méthyltransférases telles que PRMT1, PRMT2, PRMT4 (CARM1) sont des cofacteurs importants de NF- κ B régulant l'activité transcriptionnelle de NF- κ B. Les enzymes peuvent cibler directement p65/RelA en méthylant les arginines et ainsi réguler les fonctions de NF- κ B (Huang B. *et al.*, 2010).

4) Ubiquitylation

L'ubiquitylation et la dégradation de p65/RelA ont une importance physiologique dans la régulation de la voie NF- κ B. La conjugaison covalente de l'ubiquityne à des protéines cellulaires régule de nombreuses fonctions cellulaires et assiste à la régulation de la dégradation protéasomale de protéines régulatrices majeures. La dégradation de NF- κ B permet de réguler sa force et sa durée d'action. Après son activation, p65/RelA est ubiquitynilé dans le noyau pour être dégradé. Si l'activité protéasomale est bloquée, la liaison au promoteur et l'action transcriptionnelle de NF- κ B sont prolongées. En plus de la synthèse d'I κ B α , la dégradation de p65/RelA permet d'arrêter le processus transcriptionnel (Huang B. *et al.*, 2010). L'ubiquitylation de p65/RelA par SOCS1 (Suppressor Of Cytokine Signaling 1) marque la fin de l'activation en réponse à une stimulation du TNF. La ligase SOCS1 entre en compétition avec Pin-1 pour ubiquityler dans la zone des résidus de 220 à 335 amenant à la protéolyse de p65/RelA par dégradation protéasomale (Campbell KJ. et Perkins ND., 2004). SOCS1 (Suppressor Of Cytokine Signaling 1) est une ligase E3 responsable de l'ubiquitylation de p65/RelA suite à une stimulation au LPS. SOCS1 est régulé par COMMD1 (nommé également MURR1) et GCN5. COMMD1 est exprimé ubiquitairement comme inhibiteur de p65/RelA. Il stabilise l'interaction p65/RelA/SOCS1 favorisant l'ubiquitylation et la dégradation protéasomale de p65/RelA. GCN5 inhibe l'activité de NF- κ B en augmentant l'ubiquitylation et la dégradation de p65/RelA indépendamment de l'activité des histones acétyl transférase. PDLIM2 est une protéine nucléaire possédant un domaine LIM avec une activité polyubiquitin ligase contribuant au turn-over de NF- κ B nucléaire. PDLIM2 favorise la translocation de NF- κ B dans un compartiment insoluble des corps nucléaires de la leucémie promyécytique où RelA est polyubiquitynilée par PDLIM2 induisant sa dégradation (Huang B. *et al.*, 2010).

D'autres ligases E3 peuvent cibler NF- κ B. IKK α limite l'activation de NF- κ B dans les macrophages en réponse à une stimulation du LPS favorisant un turn-over de la liaison

promoteur/NF- κ B. La phosphorylation de la sérine 536 induit la dégradation de NF- κ B dans le noyau par ubiquitinylation par une ligase E3 non identifiée. La lysine méthyltransférase Set9 méthyle p65/RelA induisant par conséquence la dégradation par ubiquitinylation de p65/RelA. En effet, p65/RelA méthylé va recruter une ligase E3 pour induire sa propre ubiquitinylation et sa dégradation. La liaison entre la ligase E3 et NF- κ B lié au promoteur est dépendant de la méthylation de RelA (Huang B. *et al.*, 2010).

L'acétylation de p65/RelA peut être liée à la phosphorylation de p65/RelA. Les inhibiteurs de la désacétylase prolongent la durée de phosphorylation de p65/RelA (Vermeulen L. *et al.*, 2002).

La phosphorylation de la Ser276 de p65/RelA augmente le recrutement de CBP (CREB-Binding Protein) et diminue l'affinité pour HDAC1. Suite à une stimulation, la dégradation d'I κ B α induit l'activation de PKA qui vient phosphoryler la Ser276. L'état de phosphorylation de p65/RelA peut influencer les interactions que peut établir p65/RelA avec les coactivateurs ou les corepresseurs (Quivy V. et Van Lint C., 2004).

L'acétylation de la K310 et la méthylation des sites K314 et K315 ont des effets opposés sur l'activité transcriptionnelle de NF- κ B. L'acétylation de la K310 inhibe la méthylation de K314 et K315 par Set9. L'acétylation inhibe la méthylation et ainsi l'induction de l'ubiquitylation (responsable de la dégradation de p65/RelA) augmentant la stabilité de la fixation de RelA à la chromatine et prolongeant ainsi l'activité transcriptionnelle de NF- κ B. L'acétylation de K310 interfère avec la liaison de Set9 à RelA neutralisant la charge positive de K310 qui est essentielle pour la reconnaissance de la charge négative avec le domaine SET de Set9 (Huang B. *et al.*, 2010).

5) Clivages de p65/RelA

Les premiers clivages décrits sont réalisés par des caspases. Cependant, pour plus de clarté dans mon propos, je commencerai par les clivages réalisés par des agents infectieux avant de revenir sur les clivages réalisés par les caspases.

La sous-unité p65/RelA peut être clivée par des protéines appartenant à différents agents infectieux comme *Chlamydia pneumonia* ou *Chlamydia trachomatis* par la protéase *Chlamydia* (*Chlamydia* Protease like Activity Factor (CPAF)) en réponse à l'IL-1 β externe. L'inhibition de l'activation de NF- κ B par *Chlamydia* permet à la bactérie d'inhiber la réponse

immunitaire pouvant être mise en place par NF- κ B. p65/RelA peut être clivée aussi par Tsp CT441 durant l'infection par le Chlamydia. L'expression de CT441 inhibe l'activation de NF- κ B induite par le TNF α (Christian J. *et al.*, 2010). Les virus tels que les picornavirus peuvent aussi induire le clivage de l'extrémité C-Terminale de p65/RelA par la protéase 3C virale. Le fragment N-Terminal résultant agit comme un dominant négatif inhibiteur de NF- κ B favorisant l'apoptose dans les cellules HUVEC (Levkau B. *et al.*, 1999 ; Coiras M. *et al.*, 2008).

La surexpression de p65/RelA actif protège contre l'apoptose. Ainsi NF- κ B protège contre les stimuli apoptotiques tels que le TNF α , les radiations ionisantes, les chimiothérapies. La dégradation de p65/RelA est un mécanisme important de survie dans de nombreuses cellules. La séquence de reconnaissance par les caspases 3 et 6 est présente dans celle de p65/RelA. La présence de ces signaux est responsable de la modulation de l'activité de NF- κ B par le clivage de p65/RelA par les caspases. Le site de clivage identifié au niveau de la séquence 94 DCDR 97 est un site majeur de clivage reporté dans de nombreuses études dans les cellules HeLa, les cellules hépatiques SK-Hep1 mais pas dans les PBLs humains. L'élimination de la partie C-Terminale donne un fragment N-Terminal possédant le domaine de liaison à l'ADN mais ne peut initier la transcription. La caspase 6 clive p65/RelA au niveau de l'Asp97 dans les cellules HeLa donnant un fragment N-Terminal responsable de l'induction de l'apoptose en réponse à la stimulation d'un dérivé analogue de la naphthoquinone (Coiras M. *et al.*, 2008 ; Kang KH. *et al.*, 2001 ; Kim HS. *et al.*, 2005). Selon le type cellulaire, la spécificité des stimuli, le clivage peut avoir lieu sur différents sites en N-Terminal ou en C-Terminal (Coiras M. *et al.*, 2008). Ce clivage est observé sur deux sites différents au niveau de la partie C-Terminale. Le clivage prédominant a lieu après l'Aspartate dans la séquence 462 VFTDL un site classique de clivage par la caspase 6. Le clivage minoritaire a lieu après l'une des trois aspartates de la séquence 443 LQFDDEDL par la caspase 6 générant des petits fragments. L'ensemble des caspases exécutrices (caspase 3, caspase 6, caspase 7) est capable de donner les deux fragments obtenus par le clivage majoritaire *in vitro*. Par contre, les 7 fragments minoritaires sont obtenus uniquement par la caspase 6. Les sites de clivage touchent le domaine de l'activité transcriptionnelle le séparant du domaine de liaison à l'ADN qui reste intact. L'inactivation de NF- κ B dans l'apoptose peut résulter de deux mécanismes différents. Le premier est l'incapacité de la transactivation de la protéine p65 native. Le deuxième est le clivage de p65/RelA générant un fragment p65/RelA capable de se lier à

l'ADN entrant en compétition avec p65/RelA WT inhibant l'activité transcriptionnelle. Le fragment agit alors comme un dominant négatif inhibiteur. Le fragment majoritaire obtenu ne possède pas réellement une activité de transcription. Mais il est suffisamment pour inhiber la survie cellulaire induite par NF- κ B et l'activité de NF- κ B. Le mutant non clivable protège contre l'apoptose favorisant la survie et permet le maintien de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (Levkau B. *et al.*, 1999).

La stimulation de TRAIL présente en forte concentration cellulaire active NF- κ B dans un premier temps. Puis dans un second temps, il induit le clivage de p65/RelA dans son domaine de liaison à l'ADN de la partie N-terminale de p65/RelA au niveau de son résidu Asp97 par les caspases activées entraînant l'arrêt de l'activité de NF- κ B et par conséquent l'induction de l'apoptose grâce à l'inhibition de la synthèse des protéines XIAPs. La partie N-Terminale contient les domaines de liaison à l'ADN, de dimérisation et de localisation nucléaire. Par ce clivage dans cette région, la liaison est rompue diminuant l'activité transcriptionnelle. L'abrogation de l'activité transcriptionnelle via le clivage de p65/RelA dans son domaine de transactivation par la caspase 3 diminue l'effet anti apoptotique induit par NF- κ B. Inversement, l'utilisation d'un mutant non clivable de p65/RelA par les caspases augmente l'activité de NF- κ B inhibant l'apoptose malgré une stimulation TRAIL. Le fragment issu du clivage a un effet dominant négatif inhibiteur de NF- κ B en agissant comme un mécanisme de rétrocontrôle pro-apoptotique avec l'inactivation de NF- κ B et l'activation des caspases favorisant ainsi l'apoptose (Kim HS. *et al.*, 2005 ; Levkau B. *et al.*, 1999). Le fragment C-Terminal obtenu à l'issue du clivage peut former des dimères avec les autres membres de la famille NF- κ B bloquant l'activation du complexe NF- κ B mais ne peut se lier à des séquences ADN jouant alors le rôle d'inhibiteur dominant négatif. Ce fragment C-Terminal peut être utilisé pour sensibiliser les cellules cancéreuses résistantes à la stimulation de TRAIL ou des autres membres de la famille TNF. Il y a une relation réciproque entre les caspases et NF- κ B. L'inhibition des caspases par z-VAD, l'inhibiteur pan-caspases augmente l'activité de NF- κ B. p65/RelA clivé durant la stimulation de TRAIL dans des cellules d'hépatocytes SK-Hep1 est responsable de l'inactivation de NF- κ B à fortes concentrations de TRAIL. Le clivage est aussi retrouvé en présence de Fas. Cependant, le clivage de p65/RelA ne semble pas observer dans d'autres types d'apoptose cellulaire auxquels participent TRAIL ou d'autres membres de la famille TNF. Les sous unités "actives" non liées à I κ B α de NF- κ B sont accessibles pour être clivées par les caspases contrairement aux sous unités "inactives"

associées à I κ B α . Dans d'autres cellules, le clivage de p65/RelA n'est pas retrouvé suite à un traitement de TRAIL. L'inactivation de NF- κ B est alors induite par d'autres systèmes tels que par le clivage de RIP (Kim HS. *et al.*, 2005). Ce site de clivage de p65/RelA est également la cible de la stimulation d'un dérivé analogue de la naphthoquinone qui active la caspase 3 afin d'inhiber l'activité transcriptionnelle de NF- κ B et de resensibiliser les cellules cancéreuses à l'apoptose. Au contraire, la protéine mutée non clivable protège de l'apoptose. De même, p65/RelA tronqué conduit à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (Kang KH. *et al.*, 2001). L'inhibition de l'activité des caspases empêche le clivage de p65/RelA et rétablit l'induction de NF- κ B maintenant la survie des cellules T activées. Le promoteur de CD95L contient un élément de réponse de NF- κ B. L'expression de CD95L est induite suite à l'activation des cellules T. La ligature du CD95 initie une cascade d'activation des protéases cystéines menant à l'activation des caspases. La séquence de reconnaissance des caspases est retrouvée dans la séquence de la protéine p65/RelA ou de la protéine p50 (Ravi R. *et al.*, 1998). Une deuxième autre étude indique que p65/RelA peut être clivé dans sa partie C-Terminale par la caspase 3 par la ligature de Fas. Le clivage dans la partie C-Terminale peut être induit par la privation de facteurs de croissance, de sérum supprimant l'activation de NF- κ B et par conséquent les programmes de survie (Kim HS. *et al.*, 2005 ; Neuzil J. *et al.*, 2001). Les caspases 6 et 7 sont également capables d'induire le clivage de p65/RelA dans sa partie C-Terminale comme la caspase 3. La partie N-Terminale contient les domaines de liaison à l'ADN, de dimérisation et de localisation nucléaire. Par ce clivage dans cette région, la liaison est rompue diminuant l'activité transcriptionnelle. L'abrogation de l'activité transcriptionnelle via le clivage de p65/RelA par la caspase 3 diminue l'effet anti apoptotique induit par NF- κ B (Kim HS. *et al.*, 2005 ; Wier EM. *et al.*, 2015). Au contraire, le fragment C-Terminal obtenu par clivage par la caspase 3 est détecté dans les lymphocytes du sang périphérique humain activés. Les cellules produisant ce fragment résistent à l'apoptose et voient leur survie augmentée malgré l'activation de la caspase 3. Le fragment C-Terminal ne possède plus le domaine de liaison à l'ADN mais le domaine de dimérisation, le domaine de localisation nucléaire et le domaine de transactivation. Ainsi, il peut aller au noyau, se lier à p50 et à I κ B α mais ne peut se lier à des sites d'ADN. Par ces caractéristiques, il entre en compétition avec p65/RelA WT pour la liaison à p50 ou à I κ B α . Ce dernier montre une plus grande affinité pour le fragment C-Terminal que pour p65/RelA WT. La formation du fragment peut avoir lieu dans le noyau empêchant I κ B α d'exercer son rétrocontrôle. Ainsi, l'activité de NF- κ B est

augmentée grâce à une présence sous forme libre du complexe plus importante et fréquente permettant une induction de l'expression des gènes cibles plus longue pouvant aller jusqu'à une transactivation permanente de l'activité de p65/RelA WT. Le fragment C-Terminal protège p65/RelA WT d'I κ B α lui permettant d'avoir son activité maximale dans les lymphocytes T humains. L'hétérodimère p65/RelA WT-fragment p65/RelA C-Terminal ne peut se lier à l'ADN. Le fragment C-Terminal peut interagir avec I κ B α (Coiras M. *et al.*, 2008). Le clivage de p65/RelA est augmenté après traitement de stimulation de PhytoHemAgglutinin (PHA), du 5-Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) ou du TNF α . Le fragment obtenu et exprimé dans les cellules T (PBL, Jurkat) ne mène pas à l'apoptose (Coiras M. *et al.*, 2008). Un clivage similaire a lieu dans les HNE (Human Neutrophil Elastase). La protéinase PR3 neutrophilique et monocytique élimine le domaine de liaison à l'ADN présent dans l'extrémité N-Terminale par clivage dans une séquence proche du site de clivage de la caspase 3 donnant un fragment C-Terminal avec deux domaines potentiels de transactivation et le signal de localisation nucléaire (Coiras M. *et al.*, 2008).

L'association du clivage de p65/RelA avec l'induction de l'apoptose ou la modulation de la transactivation de NF- κ B est encore mal comprise et semble être cellules dépendante. (Coiras M. *et al.*, 2008)

Au sein du laboratoire, le travail de thèse de Nugues AL. *et al.* a pu montrer un nouveau site de clivage de p65/RelA sur le résidu d'acide aspartique 361 par la caspase 6 alors activée par RIP3 dans lequel l'activité kinase est abolie. Lors d'une étude préliminaire *in vivo*, nous avons démontré que le mutant non clivable p65/RelA D361E induit une tumorigénèse accrue.

OBJECTIFS

Les travaux préalables de Nugues AL. *et al.* ont montré que l'ablation du site de clivage de la protéine p65/RelA par la caspase-6 dans des cellules tumorales RIPK négatives induit une tumorigénèse accrue *in vivo* dans un modèle leucémique murin syngénique. Notre but a été de compléter cette étude d'une part et de l'étendre, d'autre part. Le premier objectif est de déterminer les mécanismes mis en place par la présence du mutant non clivable p65/RelA D361E dans les cellules. Le deuxième est au contraire de déterminer les rôles fonctionnels de l'expression des fragments résultant du clivage par la caspase-6 : p65/RelA 1-361 et p65/RelA 362-549 ainsi que de la coexpression des deux fragments p65/RelA 1-361 et p65/RelA 362-549. Pour atteindre ces deux objectifs, nous effectuerons une étude *in vivo* dans un modèle murin syngénique puis dans un modèle de souris immunodéficiente de type "nude". L'étude du rôle fonctionnel de p65/RelA et de ses différents mutants (prolifération, cycle cellulaire, localisation nucléaire, fixation à un élément de réponse, activité promotrice, phosphorylations de p65/RelA) sera effectuée. Ceci sera poursuivi par l'étude du transcriptome qui pourrait nous permettre des développements intéressants. Enfin, le troisième objectif est de savoir si les résultats que nous avons obtenus dans le modèle leucémique peuvent être étendus à d'autres types de cancers comme les cancers solides comme celui du mélanome.

MATERIEL & METHODES

I) Modèles cellulaires

Le premier modèle utilisé est un modèle murin leucémique créé à partir de la lignée parentale myéloïde murine DA1 transfectée stablement avec le gène humain BCR-ABL donnant la lignée cellulaire DA1-3b, référée M0, qui possède toutes les caractéristiques de la leucémie myéloïde chronique (Verecque, 1999).

Le deuxième modèle utilisé est un modèle murin de mélanome : les B16/F1 acheté auprès de la banque ATCC (CRL-1619TM; CRL 6323TM).

II) Culture cellulaire

A) Modèle leucémique

La lignée DA1-3b a été transfectée par électroporation avec le plasmide contenant le gène codant pour l'expression de la protéine GFP par induction à l'IPTG référée DA1-3b/M0 IPTG GFP. Cette lignée M0 IPTG GFP est transfectée avec un plasmide contenant le gène codant pour la protéine DsRed, le gène codant pour l'expression soit de la protéine p65/RelA sauvage (WT) soit de la protéine p65/RelA mutée non clivable D361E (Mut) soit d'un des fragments : le fragment N Terminal : p65/RelA 1-361 (N Ter) ou le fragment C Terminal ; p65/RelA 362-549 (C Ter), obtenus après un clivage de la protéine p65/RelA par la caspase 6 soit la combinaison des 2 fragments séparés par un IRES p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 (N&C Ter). Ces protéines sont couplées à 2 tags : un à chaque extrémité : Myc Tag en N Terminal et His Tag en C Terminal donnant une lignée référée DA1-3b/M0 IPTG GFP DsRed Vide ou p65 WT ou Mut ou N ter ou C Ter ou N&C Ter. Ces 6 lignées cellulaires obtenues sont cultivées, de façon stérile, dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + GlutaMAX 1X (Gibco) auquel on ajoute 100 µM d'acides aminés non essentiels (MEM NEAA 100X, Gibco), 50 µg/ml de streptomycine, 50 UI/ml de pénicilline (Gibco), 10% de sérum de veau fœtal (SVF : Fœtal Bovine Serum) (Gibco) et 5% du pyruvate dans une étuve à 37°C sous atmosphère humide et enrichie en CO₂ (5%). On change le milieu toutes les 48 heures pour permettre aux cellules de continuer à proliférer. Pour connaître la concentration cellulaire présente dans le milieu de culture, les cellules sont diluées volume/volume avec du bleu Trypan (Gibco) à l'aide d'une cellule de comptage : cellule de kova.

B) Modèle de mélanome

La lignée B16/F1 est transfectée par lipofection avec un plasmide contenant le gène codant pour l'expression de la protéine DsRed et le gène codant pour l'expression soit de la protéine p65/RelA WT, soit de la protéine p65/RelA D361E, soit le fragment p65/RelA 1-361, soit le fragment p65/RelA 362-549, soit les deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. Un clone de chaque forme de la protéine p65/RelA. Les 6 clones obtenus sont cultivés, de façon stérile, dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + GlutaMAX 1X (Gibco) auquel on ajoute 50 µg/ml de streptomycine, 50 UI/ml de pénicilline (Gibco), et 10% de sérum de veau fœtal (SVF : Fœtal Bovine Serum) (Gibco) dans une étuve à 37°C sous atmosphère humide et enrichie en CO₂ (5%). On change le milieu toutes les 48 heures pour permettre aux cellules de continuer à proliférer. Pour connaître la concentration cellulaire présente dans le milieu de culture, les cellules sont diluées volume/volume avec du bleu Trypan (Gibco) à l'aide d'une cellule de comptage : cellule de kova.

III) Obtention des mutants

Dans un premier temps, l'ADNc codant pour la protéine fluorescente DsRed est isolé du plasmide vecteur pCMV DsRed-Express2 (Clontech) (Figure 38A). Dans un deuxième temps, l'ADNc est inséré dans le plasmide pVITRO1-blasti mcs (Commercial InvivoGen) (Figure 38B). Parallèlement, l'ADNc (ORF NM_009045.4) codant pour mRela (p65/RelA WT) (Origene) à l'aide du kit In-Fusion® PCR cloning system (Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA) est inséré dans le plasmide pcDNA6 Myc His (Commercial Invivogen) (Figure 38C). Puis la séquence codant pour le gène Myc-p65-His est isolée pour l'insérer dans le plasmide pVITRO1-blasti-mcs/DsRed.

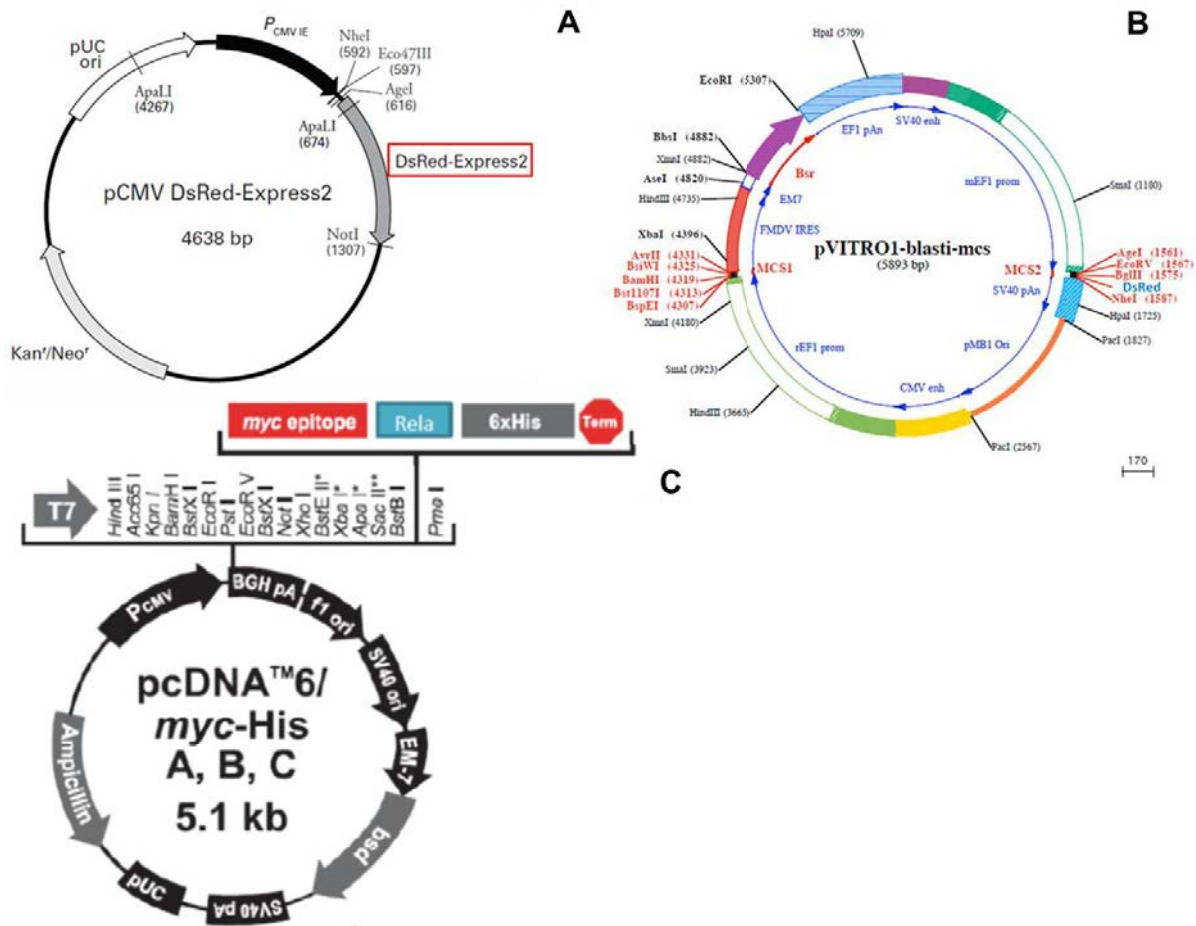


Figure 38 : Les cartes des plasmides : (A) La carte du plasmide pCMV DsRed Express codant pour l'expression de la protéine fluorescente DsRed. (B) La carte plasmidique pVITRO1-blasti-mes intégrant l'ADNc codant pour la DsRed au niveau des sites de restriction BgIII et NheI. (C) La carte plasmidique pcDNA™6/myc-His intégrant l'ADNc codant pour la protéine Rela au niveau des sites de restriction BstBI et PmeI.

Le mutant non clivable p65 est obtenu par mutagenèse dirigée remplaçant l'acide aminé 361 (l'acide aspartique en acide glutamique) puis inséré dans le plasmide pVITRO1-blasti-mcs/DsRed (Figure 39). Les mutants codant chacun pour l'un des deux fragments obtenus (le fragment N Ter codant pour l'extrémité 5' (1-361) et le fragment C Ter codant pour l'extrémité 3' (362-549)) après le clivage de p65/RelA sont obtenus par délétion de la séquence codant pour la protéine p65/RelA WT puis insérés dans un plasmide pVITRO1-blasti-mcs/DsRed. Les deux fragments sont co-intégrés dans le même plasmide pVITRO1-blasti-mcs/DsRed séparés par un IRES. Le plasmide pVITRO1-blasti-mcs/DsRed est utilisé comme contrôle.

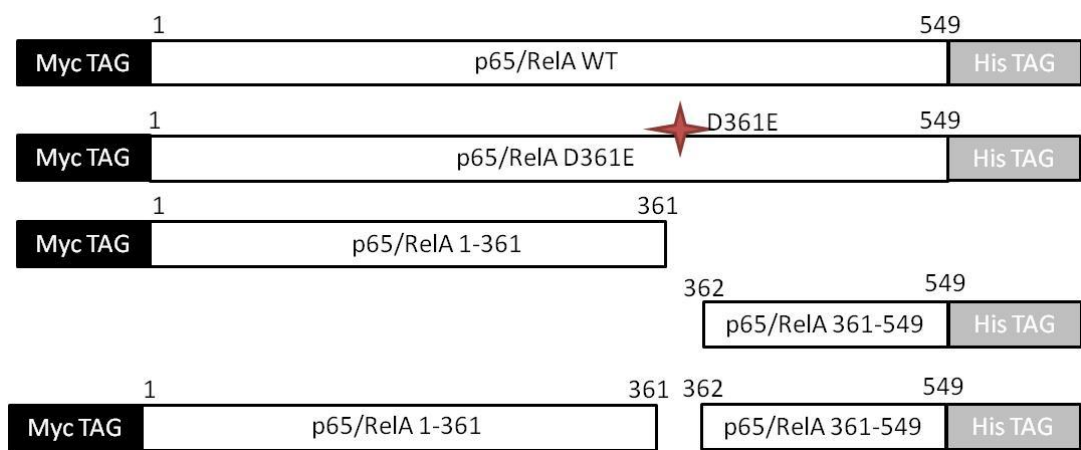


Figure 39 : Différents mutants de la protéine p65/RelA : A partir de la protéine p65/RelA, différents mutants ont été construits. Le p65/RelA muté sur son acide aminé 361 est non clivable. Le fragment p65/RelA N Ter ne possède que le domaine N-Terminal (1-361) obtenu par clivage de la protéine p65/RelA WT. Le fragment p65/RelA C Ter ne possède que le domaine C-Terminal (362-551) obtenu par clivage de la protéine p65/RelA WT. Le dernier mutant correspond à la coexpression des fragments N Ter (=p65/RelA 1-361) et C Ter (p65/RelA 362-549). Chaque mutant exprime en N Ter le Myc TAG (sauf le fragment C Ter) et en C Ter le His TAG (sauf le fragment N Ter).

IV) Transfection

La lignée M0 IPTG GFP a été transfectée par les différents plasmides à une concentration de 2 µg par million de cellules à l’aide du système d’électroporation d’Amaxa. 5 millions de cellules de la lignée M0 IPTG GFP sont prélevées. Puis, les cellules sont centrifugées à 150 g pendant 5 minutes. Les culots cellulaires sont resuspendus dans 100 µL de la solution de nucléofection V (Lonza AG) puis complétés par 10 µg de plasmide. Ensuite, la suspension cellulaire est transférée dans la cuve Amaxa pour être placée dans le Nucleofector Amaxa (Lonza AG). La nucléofection est réalisée avec le programme O-017. Les cellules transfectées sont remises dans le milieu de culture à une concentration finale 10⁶ cellules/mL. Puis, elles sont incubées dans l’étuve à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 48 heures. Les cellules sont ensuite traitées à l’antibiotique Blasticidine pendant 10 jours afin de sélectionner les cellules exprimant le plasmide. Les cellules exprimant la protéine DsRed sont sélectionnées avec le trieur cytométrique FACS Aria III (Becton Dickinson) pour obtenir un clone par puits. Ces derniers sont mis en culture dans un milieu composé à 50% de milieu DMEM conditionné (obtenu à partir de la culture de la lignée M0 IPTG GFP) et à 50% de milieu DMEM. Le taux d’expression de la protéine DsRed est mesuré par le cytomètre Cell Lab Quanta (Beckman Coulter). Puis les clones exprimant le plus fortement la protéine

DsRed sont sélectionnés et mélangés pour obtenir un mélange de clones plus représentatif des modèles *in vivo*.

V) Extraction de protéines totales

5 millions de cellules sont prélevées pour être centrifugées à 150 g pendant 7 minutes. Le culot cellulaire est remis en suspension avec 10 mL de PBS 1X (Gibco). Ensuite, une nouvelle centrifugation est effectuée à 150 g pendant 7 minutes. Le culot est à nouveau remis en suspension dans 1 mL de PBS 1X pour être centrifugé à 200 g pendant 5 minutes. Ainsi, un culot sec de cellules obtenu est conservé à -80°C.

Le culot sec est remis en suspension avec 100 µL du tampon de lyse 1X, une pastille de Roche, inhibiteur de protéase auquel on ajoute des inhibiteurs de phosphatases ((cocktail B et cocktail C) Roche). Puis le tube est mélangé toutes les 10 minutes 30 secondes pendant 30 minutes. Ensuite, une centrifugation des lysats cellulaires est réalisée à 4°C pendant 30 minutes à 14 000 g. Le surnageant contenant les protéines est récupéré.

VI) Extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques

30 millions de cellules sont prélevées pour être centrifugées à 150 g pendant 7 minutes. Le culot cellulaire est remis en suspension avec 10 mL de PBS 1X (Gibco). Ensuite, une nouvelle centrifugation est effectuée à 150 g pendant 7 minutes. Le culot est à nouveau remis en suspension dans 1 mL de PBS 1X pour être centrifugé à 200 g pendant 5 minutes. Ainsi, un culot sec de cellules obtenu est conservé à -80°C.

Les protéines nucléaires et cytoplasmiques sont extraites à l'aide du kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific). Le culot sec est remis en suspension avec 300 µL du tampon de lyse Cytoplasmic Extraction Reagent I (CER I) associé à un inhibiteur de protéase et à des inhibiteurs de phosphatases ((cocktail B et cocktail C) Roche). Le tube est mélangé pendant 15 secondes puis est incubé pendant 10 minutes sur la glace. Ensuite, 16,5 µL du tampon Cytoplasmic Extraction Reagent II (CER II) sont ajoutés. Le tube est à nouveau mélangé pendant 5 secondes puis incubé une minute sur la glace. Ensuite, une centrifugation des lysats cellulaires est réalisée à 4°C pendant 5 minutes à 16 000 g. Le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques est récupéré. L'extrait protéique cytoplasmique est stocké à -80°C. Le culot est lavé à l'aide du tampon CER I

associé à un inhibiteur de protéase et à des inhibiteurs de phosphatases par centrifugation pendant 30 secondes à 16 000 g. Cette étape est répétée 3 fois. Le culot est resuspendu avec 150 µL du tampon Nuclear Extraction Reagent (NER). Puis le tube est mélangé toutes les 10 minutes 15 secondes pendant 40 minutes. Ensuite, une centrifugation des lysats cellulaires est réalisée à 4°C pendant 10 minutes à 16 000 g. Le surnageant contenant les protéines nucléaires est récupéré. Les extraits sont ensuite stockés à -80°C.

VII) Dosage des protéines

La concentration protéique est déterminée en utilisant le kit Pierce ® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Une gamme de concentrations connues est réalisée puis déposée en duplicat dans une plaque de 96 puits tandis que les échantillons protéiques sont déposés en triplicat. Ensuite, le réactif est ajouté. La plaque est incubée sous agitation pendant 30 minutes à 37°C dans l'obscurité. L'absorbance est lue avec le lecteur de plaque et le logiciel Soft Max Pro à 562 nm. Ainsi, la concentration protéique est calculée et le volume nécessaire correspondant à 30 µg de protéines est déterminé pour réaliser le western blot avec la même quantité pour chaque échantillon.

VIII) Western blot

Les protéines des extraits totaux (30 µg) diluées dans le tampon de charge sont dénaturées à 95°C pendant 10 minutes. Puis, les extraits protéiques sont séparés sur un gel SDS PAGE 4-12% (NuPAGE 12% Bis Tris Gel 1 mm, 10%). Un marqueur de taille Magic Mark (Invitrogen) est également déposé sur le gel comme marqueur de poids moléculaire. La migration sur gel d'acrylamide Bis-Tris 12% est réalisée à 200 Volts en courant constant pendant 45 minutes à l'aide du tampon de migration NuPAGE® Novex® MES SDS Running Buffer à la concentration finale 1X permettant la séparation des protéines. Puis le transfert du gel sur la membrane de nitrocellulose (i-Blot Regular, Invitrogen) est réalisé grâce au système iBlot (Invitrogen) pendant 7 minutes à 23 Volts. La saturation de la membrane est réalisée dans du lait (Santa Cruz) à 5%, Tween 0,2% dissous dans du PBS 20X ou dans de la BSA (Bovine Serum Albumine) (Santa Cruz) à 5% Tween 0,2% dissous dans du PBS 20X pendant une heure. Ensuite, l'anticorps primaire est ajouté dilué au 1/1000^{ème} dirigé contre :

- Myc TAG ((71D10) #2278, Cell Signaling)
- His TAG (70796, Merck Millipore)
- NFκB p65 ((D14E12) XP® #8242, Cell Signaling)
- Phospho-NF-κB p65 ((Ser536) (93H1) #3033, Cell Signaling)
- Phospho-NF-κB p65 (Ser468) (#3039, Cell Signaling)
- GAPDH ((6C5): sc-32233, Santa Cruz)
- Lamin B1 ((D4Q4Z) #12586, Cell Signaling)
- Tubuline β (T8328, Sigma Aldrich)
- Cystatin A (Stefin A) [WR-23/2/3/3] (ab10442) (Abcam)
- SLC4A5 (NBC4) (Santa Cruz)

L'anticorps incube sur la membrane pendant une nuit à 4°C sous agitation. Ensuite, 3 lavages sont réalisés avec le tampon de lavage PBS 20X/Tween 0,2%. Puis, l'anticorps secondaire (couplé à la peroxydase) est ajouté dilué au 1/2000^{ème} dans du lait 5% dissous dans le tampon PBS 20X Tween 0,2% ou dans de la BSA à 5% Tween 0,2% dissous dans du PBS 20X pendant une heure à température ambiante sous agitation. 4 lavages sont effectués avec le tampon de lavage PBS 20X Tween 0,2%. Ensuite, le substrat de la peroxydase (ECL Prime, General Electric Health CARE) est ajouté sur la membrane pendant 5 minutes. Cette dernière est soit exposée sur un film radiographique (Hyperfilm MP, Amersham) qui est révélé avec le produit de développement (Developer Kodak) et le produit de fixation (Fixat Kodak) ou soit placée dans l'appareil de révélation LAS4000.

IX) Extraction d'ARN

4 millions de cellules sont prélevées pour être centrifugées à 150 g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est remis en suspension avec 10 mL de PBS 1X (Gibco). Ensuite, une nouvelle centrifugation est effectuée à 150 g pendant 7 minutes. Le culot est à nouveau remis en suspension dans 1 mL de PBS 1X pour être centrifugé à 200 g pendant 5 minutes. Ainsi, un culot sec de cellules obtenu est conservé à -80°C.

Le culot sec est lysé selon le protocole du kit Nucleospin RNA (Macherey Nagel). Dans un premier temps, le culot sec est remis en suspension en contact avec le tampon de lyse RA1 contenant du β Mercaptoéthanol. Le lysat est mélangé puis est déposé sur une colonne de silice pour être centrifugé pendant 1 minute à 11 000 g. L'éluat est mélangé à 350 µL d'éthanol 70%. Le mélange est déposé sur une colonne de silice, elle-même est centrifugée

pendant une minute à 11 000 g. La membrane de silice de la colonne est désalinisée à l'aide du tampon MDB. Ensuite, la colonne est centrifugée pendant une minute à 11 000 g. Tandis que l'éluat est éliminé, 75 µL d'ADNase sont déposés sur la colonne de silice pour digérer l'ADN pendant 15 minutes à température ambiante. La membrane de silice de la colonne est lavée 3 fois à l'aide des tampons RAW2 et RA3 avec des centrifugations de 11 000 g pendant 30 secondes et une dernière de 11 000 g pendant 2 minutes. Puis le contenu de la colonne est élué avec de l'eau dépourvue ARNase par centrifugation de 11 000 g pendant une minute. Cet éluat correspond à l'ARN.

X) Dosage de l'ARN

Le dosage de l'ARN s'effectue à l'aide de l'appareil NanoDrop (ThermoFischer). Après avoir réalisé le blanc, 2 µL de chaque échantillon sont déposés sur la sonde. Puis l'appareil mesure et calcule la concentration d'ARN présente pour chaque échantillon.

XI) Transcriptome

Le transcriptome est réalisé par la plateforme de Génomique de l'Université LILLE 2. Les échantillons d'ARN sont déposés sur des puces Agilent. Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel par la plateforme de Génomique (Université de Lille).

XII) Rétrotranscription

L'ARN est rétrotranscrit à l'aide du kit Super Script VILO CDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific). 1 µg d'ARN est mis en contact de l'enzyme 10X Super Script Enzyme Mix dans son tampon 5X VILO Reaction Mix. L'échantillon est chauffé d'abord à 25°C pendant 10 minutes puis à 42°C pendant 60 minutes et ensuite à 85°C pendant 5 minutes. Ainsi l'ADNc est obtenu.

XIII) PCR quantitative

La quantité de l'ADNc du gène étudié est mesurée à l'aide d'une sonde TaqMan® Gene Expression Assay (20X) (Thermo Fisher Scientific). 50 ng d'ADNc sont mis en contact de la

sonde TaqMan dans son tampon TaqMan® Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). L'ADNc d'intérêt est amplifié pendant 40 cycles. L'ADNc est dénaturé à 95°C pendant 15 secondes puis est terminé à 60°C pendant une minute sur l'appareil.

Les sondes TaqMan utilisées sont les :

- Taq Man Igf2r (4331182 Mm00439576_m1)
- Taq Man Flywch2 (4331182 Mm00513052_m1)
- Taq Man Irg1 (4331182 Mm01224532_m1)
- Taq Man BC100530 (4331182 Mm01617599_m1)
- Taq Man 2010005H15Rik (4331182 Mm00472575_m1)
- Taq Man Stfa2 (4331182Mm04204812_mH)
- Taq Man Stfa2l1 (4331182 Mm04212095_mH)
- Taq Man Gm10872 (4426961 Mm04335849_m1)
- Taq Man Gm5483 (4331182 Mm01973771_s1)
- Taq Man Slc4a5 (4331182 Mm01190997_m1)
- Taq Man Gapdh (1331182 Mm99999915-g1)
- Taq Man Il2ra (4331182 Mm01340213_m1)
- Taq Man Cd200r3 (4331182 Mm01343888_m1)
- Taq Man Il13 (4331182 Mm00434204_m1)
- Taq Man Slc17a8 (4331182 Mm00805413_m1)
- Taq Man Inha (4331182 Mm00439683_m1)
- Taq Man Serpinb6e (4351372 Mm03015820_m1)
- Taq Man Cxcl3 (4331182 Mm01701838_m1)

La sonde TaqMan Gapdh est utilisée pour normaliser.

XIV) Etude protéique cytométrique

Un million de cellules sont lavées avec le tampon autoMACS Running Buffer (Miltenyi Biotec) par centrifugation à 150 g pendant 5 minutes. Le culot est remis en suspension par le fixateur Formalin à 2% (Sigma Aldrich) pendant 20 minutes. Les cellules sont centrifugées à 150 g pendant 5 minutes. Puis, les cellules sont perméabilisées avec du Triton X100 à 0,1% pendant 45 minutes. De nouveau, les cellules sont centrifugées à 150 g pendant 5 minutes. Ensuite, les cellules sont incubées avec du Fc Block Murin (7,2µg/mL) pendant 15 minutes à 4°C puis est ajouté l'anticorps anti- anti-Cystatin A (Stéfin A) (CSTA) (Alexa Fluor 350) (Anticoprse ligné) dilué au 1/1000^{ème}, ou son isotype contrôle Rabbit IgG (Alexa Fluor 350) (Anticoprse ligné) dilué au 1/1000^{ème} pendant 45 minutes à 4°C. Le taux d'expression de la protéine est mesuré sur le cytomètre LSR X20 (Becton Dickinson). Les résultats sont ensuite analysés avec le logiciel Kaluza (Beckman Coulter).

0,250 millions de cellules sont lavées avec le tampon PBS 1X (Gibco) par centrifugation à 130 g pendant 5 minutes. Le culot est remis en suspension dans le PBS 1X contenant le Fc Block Murin (7,2µg/mL) dilué au 1/5000^{ème} pendant 5 minutes à température ambiante puis est ajouté l'anticorps anti-PDL1 (APC), ou son isotype contrôle (APC) dilué au 1/3000^{ème} pendant 30 minutes à 4°C. Le taux d'expression de la protéine est mesuré sur le cytomètre Cyan ADP (Beckman Coulter). Les résultats sont ensuite analysés avec le logiciel Kaluza (Beckman Coulter).

XV) Etude des cellules souches

A) Formation de sphères

4.10³ cellules B16/F1 sont déposées sur des plaques de 24 puits contenant une solution d'éthanol poly-2- hydroxyéthylmétacrylate (polyHEMA) à 0,5 mg/mL (Sigma-Aldrich, France) pour éviter la fixation cellulaire et cultivées dans du milieu DMEM/F12 (Gibco®, Life Technologies™, France) qui a été complété par EGF (Biotechnologies de cellules souches, Colombie-Britannique, Canada), 1:50 B27-supplement (Gibco®, Invitrogen™, France) et 20 ng/ml rHu bFGF (PromoKine-PromoCell GmbH, Allemagne), dans un incubateur à 5% CO₂ humidifié à 37°C pendant 7 jours. Les sphères (plus de ~ 50 cellules) ont été comptées sous un microscope inversé.

B) Test Aldefluor

0,6 millions de cellules DA1-3b/M0 sont centrifugées à 200 g pendant 5 minutes. Le culot est remis en suspension dans le tampon ALDH Fluor Buffer Assay (Stem Cell). La sonde ALDH est incorporée dans la suspension cellulaire. Cette dernière est répartie entre le tube contenant l'inhibiteur DEAB Reagent et le tube ALDH. Les tubes sont incubés pendant 45 minutes à 37°C. Les cellules sont centrifugées à 200 g pendant 5 minutes.

C) Etude des cellules souches par cytométrie en flux

0,5 millions de cellules DA1-3b/M0 sont lavées avec le tampon autoMACS Running Buffer (Miltenyi Biotec) par centrifugation à 150 g pendant 5 minutes. Le culot est remis en suspension dans le tampon autoMACS Running Buffer contenant le Fc Block Murin

(7,2µg/mL) pendant 15 minutes à 4°C puis est ajouté l'anticorps, ou son isotype contrôle pendant 45 minutes à 4°C.

La dilution optimale d'anticorps est déterminée à partir de cellules de moelle osseuse de souris. 0,5 millions de cellules sont lavées avec le tampon autoMACS Running Buffer (Miltenyi Biotec) par centrifugation à 150 g pendant 5 minutes. Le culot est remis en suspension dans le tampon autoMACS Running Buffer contenant le Fc Block Murin (7,2µg/mL) pendant 15 minutes à 4°C puis est ajouté l'anticorps, ou son isotype contrôle pendant 45 minutes à 4°C.

Les anticorps sont :

- Anti-Mouse Ly-6A/E (Sca-1) (V500) et son isotype contrôle Rat IgG2a, κ (V500) (BD Biosciences)
- Anti-Mouse CD117 (c-Kit) (BV786) et son isotype contrôle Rat IgG2b, κ (BV786) (BD Biosciences) utilisé à 5 µg/mL
- Anti-Mouse CD34 (gp 105-120) (Alexa Fluor® 700) et son isotype contrôle Rat IgG2a, κ (Alexa Fluor® 700) (BD Biosciences) utilisé à 10 µg/mL
- Anti-Mouse BD Optibuild™ Ms CD38 (BV650) et son isotype contrôle Rat IgG2a, κ (BV650) (BD Biosciences) utilisé à 7 µg/mL
- Anti-Mouse BD Optibuild™ Ms/Rat CD90.1 (BUV395) et son isotype contrôle Mouse IgG2a, κ (Specific for TNP) (BD Biosciences)
- Anti-Mouse CD90.2 (Thy-1.2) (APC-Cy™7) et son isotype contrôle Rat IgG2a, κ (APC-Cy™7) (BD Biosciences) utilisé à 7 µg/mL
- Anti-Mouse CD150 (Alexa Fluor® 647) et son isotype contrôle Rat IgG2a, κ (Alexa Fluor® 647) (BD Biosciences) utilisé à 2 µg/mL
- Anti-Mouse CD127 (IL-7 Receptor α chain) (BV711) et son isotype contrôle Rat IgG2b, κ (BV711) (BD Biosciences) utilisé à 10 µg/mL

Les cellules sont analysées sur le cytomètre en flux LSR X20 (Becton Dickinson). Les résultats sont ensuite analysés avec le logiciel Kaluza (Beckman Coulter).

XVI) Etude des cellules en différenciation en cytométrie en flux

0,5 millions de cellules sont lavées avec le tampon autoMACS Running Buffer (Miltenyi Biotec) par centrifugation à 150 g pendant 5 minutes. Le culot est remis en suspension dans le tampon autoMACS Running Buffer contenant le Fc Block Murin (7,2µg/mL) pendant 15 minutes à 4°C puis est ajouté l'anticorps, ou son isotype contrôle pendant 45 minutes à 4°C (utilisé aux concentrations recommandées par le fournisseur)

Les différents anticorps de différenciation :

- Anti-Mouse CD18 FITC et son isotype contrôle Rat IgG2a K FITC (eBiosciences)
- Anti-Mouse CD14 APC et son isotype contrôle Rat IgG2a K APC (eBiosciences)
- Anti-Mouse CD11b eFluor® 450 et son isotype contrôle Rat IgG2b K eFluor® 450 (eBiosciences)

XVII) Etude du pH intracellulaire en cytométrie en flux

0,2 millions de cellules sont lavées avec le tampon Live Cell Imaging Solution (Thermo Fischer Scientific). Le culot est remis en suspension dans le tampon Live Cell Imaging Solution contenant la sonde pHrodo® Green AM Intracellular pH Indicator (Thermo Fisher Scientific) pendant 30 minutes à 37°C. Puis, les cellules sont analysées sur le cytomètre LSR X20 (Becton Dickinson). Parallèlement, les cellules sont incubées dans un premier temps avec la sonde pHrodo® Green pendant 30 minutes à 37°C. Ensuite, les cellules sont centrifugées à 150 g pendant 5 minutes. Le culot est alors remis en suspension dans l'une des solutions tampon (pH5,5 ; pH6,5 ; pH7,5) du kit Intracellular pH Calibration Buffer Kit (Thermo Fisher Scientific) et incubé 5 minutes à 37°C avant d'être lu sur le cytomètre LSR X20 (Becton Dickinson) (Figure 40A). Les résultats sont ensuite analysés avec le logiciel Kaluza (Beckman Coulter). Les moyennes d'intensité obtenues pour chaque solution tampon permettent de tracer la droite Intensité de fluorescence en fonction du pH. A l'aide de l'équation de la droite, le pH intracellulaire des cellules peut être calculé (Figure 40B).

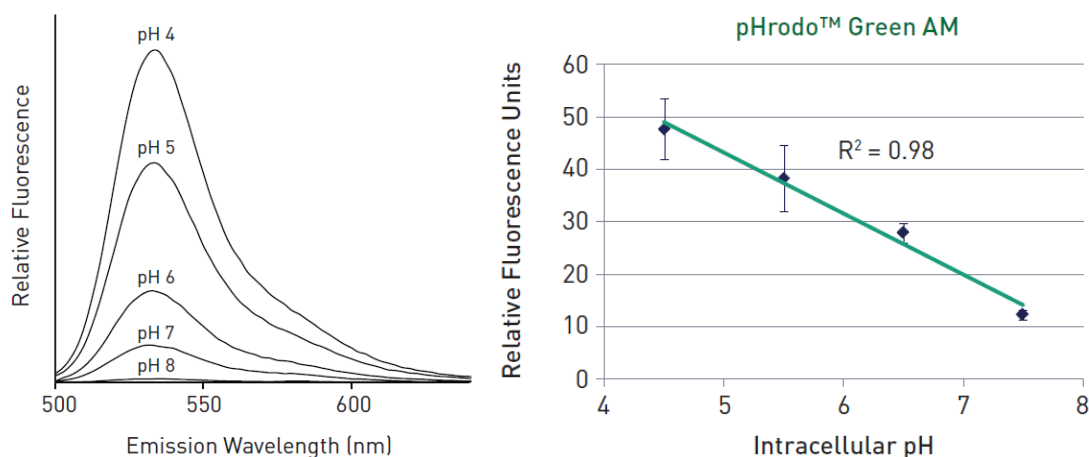


Figure 40 : *Mesure du pH intracellulaire* (A) Spectre d'émission de fluorescence de la sonde pHrodo® Green (B) : Courbe de standardisation obtenue avec les tampons pH de calibration. La courbe d'équation l'intensité de fluorescence en fonction du pH intracellulaire est tracée. A l'aide du coefficient directeur, le pH intracellulaire des cellules peut être déterminé.

XVIII) Mesure de l'activité de liaison à des éléments de réponse

L'activité de liaison est mesurée à l'aide du kit TransAM™ NFκB p65. Dans un premier temps, 30 µL du tampon Complete Binding dans chaque puits d'une plaque 96 puits. Ensuite, un témoin positif composé de 2,5 µg d'extrait nucléaire de Jurkat est déposé en triplicats comme le témoin blanc composé uniquement du tampon Complete Lysis. 20 µg de chaque échantillon dilué dans le tampon Complete Buffer est déposé en triplicat. La plaque est incubée pendant une heure sous agitation à température ambiante. La plaque est lavée 3 fois avec 200 µL de tampon de lavage 1X. Puis, 100 µL de l'anticorps primaire NF-κB p65, dilué au 1000^{ème} dans son tampon, sont déposés dans chaque puits. L'anticorps primaire incube pendant une heure sous agitation à température ambiante. La plaque est à nouveau lavée 3 fois avec 200 µL du tampon de lavage 1X. Ensuite, 100 µL d'anticorps secondaire HRP conjugué, dilué au 1000^{ème} dans son tampon. La réaction de reconnaissance d'anticorps primaire/secondaire a lieu pendant une heure sous agitation à température ambiante. Les puits sont ensuite lavés 4 fois avec 200 µL du tampon de lavage 1X. 100 µL de la solution de développement sont déposés dans chaque puits pendant 5 minutes à l'abri de la lumière. 100 µL de la solution Stop sont ajoutés dans chaque puits pendant 5 minutes. La plaque est enfin lue à la longueur d'onde 450 nm sur le Spectramax (Molecular Devices).

XIX) Mesure du taux de phosphorylation de NF-κB p65/RelA

Le taux de phosphorylation est mesuré à l'aide du kit FACE™ NFκB p65 Profiler. Avant de déposer les cellules, la plaque de 96 puits est traitée avec une solution de poly-L-Lysine (Sigma Aldrich) de 10 µg/ml pendant 30 minutes à 37°C. La plaque est ensuite lavée 2 fois avec du PBS 1X pendant 5 minutes. 20 000 cellules sont enfin déposées dans chaque puits. La plaque est déposée dans l'étuve pour laisser les cellules proliférer pendant 24 heures. Les cellules sont ensuite fixées à l'aide de 100 µL d'une solution de Formaldéhyde à 8% pendant 20 minutes à température ambiante. La plaque est lavée avec 200 µL de tampon de lavage pendant 5 minutes sous agitation. Cette étape de lavage est répétée 3 fois. Les cellules sont ensuite perméabilisées à l'aide de 100 µL de tampon Quenching pendant 20 minutes à température ambiante. La plaque est à nouveau lavée pendant 5 minutes 2 fois avec 200 µL de tampon de lavage. Les puits sont saturés avec 100 µL de tampon bloquant pendant une heure à température ambiante. Les puits sont ensuite lavés avec 200 µL de tampon de lavage 1X

pendant 5 minutes sous agitation. 40 μ L d'anticorps primaire (dilué au 1000^{ème} dans son tampon) dirigé contre soit la protéine p65 totale soit la protéine p65 phosphorylée sur sa Sérine 468 ou Sérine 536. Les puits contrôles négatifs contiennent quant eux uniquement du tampon de dilution d'anticorps. La plaque couverte d'un parafilm est incubée sur la nuit à 4°C sous agitation. Après cette nuit d'incubation, les puits sont lavés 3 fois pendant 5 minutes avec 200 μ L de tampon de lavage. 100 μ L d'anticorps secondaire (dilué dans son tampon) sont ajoutés dans chaque puits pour une incubation d'une heure. Les puits sont ensuite lavés 3 fois avec 200 μ L du tampon de lavage 1X puis 2 fois avec du PBS 1X. 100 μ L de la solution de développement sont déposés dans chaque puits pendant 5 minutes à l'abri de la lumière. 100 μ L de la solution Stop sont ajoutés dans chaque puits pendant 5 minutes. La plaque est enfin lue à la longueur d'onde 450 nm sur le Spectramax (Molecular Devices).

XX) Etude de la localisation nucléaire par microscopie confocale

Pour augmenter l'adhérence des cellules, une solution de poly L-Lysine (concentration) est déposée sur les lames LabTeck II Chamber Slide w/Cover CC2 Glass Slide Sterile (8 puits) pendant une heure à température ambiante sous PSM. Les lames sont lavées 3 fois à l'aide d'une solution d'eau MQ. Elles sont ensuite séchées sur la nuit sous le flux du PSM. Du lendemain, 1 million de cellules sont déposés dans chaque puits de la lame. Les cellules prolifèrent pendant 24 heures. Les cellules n'ayant pas adhérees sur la lame sont éliminées. La lame est nettoyée une fois avec du PBS 1X. Les cellules sont fixées avec une solution de formalin 8% (Sigma Aldrich) pendant 20 minutes. 3 lavages au PBS 1X sont réalisés. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec une solution BSA 3% Triton 0,5% pendant une heure en chambre humide. Les cellules sont lavées avec le PBS 1 X 3 fois. Puis, les cellules sont mises en contact dans un premier temps avec le tampon autoMACS Running Buffer contenant le Fc Block Murin (7,2 μ g/mL) pendant 15 minutes et dans un deuxième temps avec l'anticorps primaire dilué au 40^{ème} et au 100^{ème} pour les anticorps dirigés contre p65, Myc Tag et His Tag respectivement sur la nuit. 3 lavages au PBS 1X sont réalisés. Les anticorps secondaires couplés à l'Alexa Fluor488, à l'Alexa Fluor 647, à l'Alexa Fluor 514 respectivement (ThermoScientific) diluées au 500^{ème} sont déposés sur la lame et incubés une heure. L'excès d'anticorps secondaires est éliminé par un lavage au PBS 1X. La coloration DAPI couplée au milieu de montage est déposée sur la lame. Cette dernière est montée d'une lamelle et scellée avec du vernis.

XXI) Etude de la sensibilité aux drogues

La résistance aux drogues est étudiée par la mesure de la viabilité cellulaire à l'aide du kit CellTiter 96® AQueous Non Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega). Il s'agit d'une méthode colorimétrique basée sur la réduction d'un solvant le MTS ou [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tétrazolium], en un produit coloré, le formazan, par la NADPH ou NADH déshydrogénase des cellules viables (Figure 41). La quantité de formazan produite est mesurée par l'absorbance à une longueur d'onde de 490 nm, et elle est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

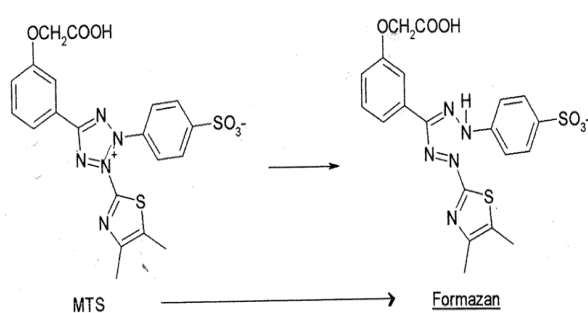


Figure 41 : Réaction de la réduction du MTS : Le MTS ou [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tétrazolium] est réduit par la NADPH ou NADH déshydrogénase en un produit coloré le formazan.

Après 24 heures de traitement à l'Imatinib, 1×10^5 cellules sont prélevées et déposées sur une plaque de 96 puits. 20 μ L de la solution de MTS sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est incubée pendant 4 heures à 37°C avec 5% de CO₂. L'absorbance de la réaction est lue à 490 nm avec le lecteur de plaque et le logiciel Soft Max Pro. Des puits témoins contenant le milieu DMEM seul avec la solution de MTS sont réalisés.

- Ruxolitinib (INCB018424) (réf : S1378, Selleckchem) : inhibiteur de JAK1/2
- AG490 (réf : # tlr1-ag4, Invivogen) : inhibiteur de JAK2
- Décitabine (5-Aza-2'-deoxycytidine) (réf : A3656, Sigma Aldrich) : agent déméthylant
- Cytarabine Arabinose (Ara C) (réf : Vidaza, 25mg/mL, Laboratoire Celgene) : agent déméthylant
- Imatinib Mesylate (Glivec) (STI571) (réf : S1026, Selleckchem) : inhibiteur des tyrosines kinases BCR-ABL
- Wortamanin (réf : # tlr1-wtm, Invivogen) : inhibiteur de PI3K
- Crizotinib (PF-02341066) (réf : S1068, Selleckchem) : inhibiteurs de c-met, de ALK
- Palbociclib (PD-0332991) HCl (réf : S1116, Selleckchem) : inhibiteurs de CDK4/6
- 5'Azacytidine (Vidaza) (CELGENE) : agent déméthylant
- SH-4-54 (réf : S7337, Selleckchem) : inhibiteur de STAT

- OSI-906 (Linsitinib) (réf : S1091, Selleckchem) : inhibiteur de IGF-1R
- CHIR-99021 (CT99021) HCl (réf : S2924, Selleckchem) : inhibiteur de GSK-3 α/β
- Staurosporine (réf : S1421, Selleckchem) : inhibiteur de PKC
- Everolimus (ref : S1120, Selleckchem) inhibiteur de mTor C1
- BAY 87-2243 (réf : .S7309, Selleckchem) : inhibiteur de HIF-1 α
- SC75741 (réf : S7273, Selleckchem) : inhibiteur de NF- κ B

XXII) Etude de l'activité promotrice

L'activité promotrice est mesurée à l'aide du kit Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega). Il s'agit d'une méthode luminescente utilisant deux luciférases différentes Firefly (61 kDa) et Renilla (36 kDa).

5 millions de cellules sont transfectées avec différents plasmides : un plasmide contenant soit un promoteur faible servant de contrôle négatif, soit un promoteur fort CMV servant de contrôle positif soit le promoteur κ B-luc reporter. Les cellules sont prélevées pour être centrifugées à 150 g pendant 5 minutes. Les culots cellulaires sont resuspendus dans 100 μ L de la solution de nucléofection V (Lonza AG) puis complétés par 5 μ g de plasmide. Ensuite, la suspension cellulaire est transférée dans la cuve Amaxa pour être placée dans le Nucleofector Amaxa (Lonza AG). La nucléofection est réalisée avec le programme O-017. Les cellules transfectées sont remises dans le milieu de culture à une concentration finale 10⁶ cellules/mL. Puis, elles sont incubées dans l'étuve à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 24 heures.

Après 24 heures d'incubation, 75 μ L de la suspension cellulaire est prélevés pour être mélangé avec 75 μ L de Dual-Glo® Reagent pendant 10 minutes à température ambiante. Puis la luminescence émise par la protéine Luciférase Firefly est mesurée à l'aide du Spectramax (Molecular Devices). Ensuite 75 μ L de Dual-Glo® Stop & Glo® Reagent est ajouté au mélange pendant 10 minutes. La luminescence émise par la protéine Luciférase Renilla est mesurée à l'aide du Spectramax (Molecular Devices). Le rapport de luminescence est calculé à l'aide de la formule suivante : Luminescence Firefly/Luminescence Renilla. Pour normaliser le ratio de luminescence obtenu, la concentration protéique est déterminée. Pour cela, un culot sec de chaque condition est réalisé. Puis, les protéines sont extraites selon le protocole habituel (voir au-dessus), et dosées. Ainsi, le rapport de luminescence est normalisé :

$$R = \frac{\text{Luminescence Firefly}}{\frac{\text{Luminescence Renilla}}{[\text{protéines}]}}$$

Puis, le ratio de luminescence est calculé selon la formule suivante :

$$\frac{R(\text{Luminescence } kB - Luc) - R(\text{Luminescence contrôle négatif})}{R(\text{Luminescence contrôle positif}) - R(\text{Luminescence contrôle négatif})}$$

XXIII) Etude *in vivo*

A) Souris syngéniques

1) Souris C3H

Les cellules sont centrifugées à 130 g pendant 5 minutes. Les culots sont remis en suspension avec du PBS 1X pour laver 2 fois la suspension cellulaire. 5 millions de cellules/100 µL sont injectées chez les souris en intra péritonéale. 96 heures après, les souris sont séparées en 2 groupes. Soient elles sont traitées avec de la 5'Azacytidine (Vidaza, 25mg/mL, Laboratoire Celgene) à une dose injectée en sous cutanée pendant 2 séries de 5 jours de traitement. Soient elles représentent le groupe contrôle et reçoivent à la place de la drogue le PBS 1X. Ensuite, la survie des souris est suivie. Les souris ayant atteint le point limite sont sacrifiées.

2) Souris C57Black6

Des souris femelles immunocompétentes C57BL6JRj de huit semaines (Janvier Labs, France) ont été injectées par voie intrapéritonéale avec B16/Void, B16/p65/RelA WT, B16/p65/ RelA D361E, B16/p65/RelA 1-361, B16/p65/RelA 362-549, B16/p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. La croissance tumorale a été évaluée aux points de temps indiqués en effectuant des mesures bidimensionnelles avec un étrier. Les volumes de tumeurs en mm³ ont été calculés selon la formule suivante: largeur² x longueur x 0,5.

B) Souris "nude"

Les cellules sont centrifugées à 130 g pendant 5 minutes. Les culots sont remis en suspension avec du PBS 1X pour laver 2 fois la suspension cellulaire. 0,1 millions de cellules/100 µL sont injectées chez les souris en intra péritonéale. A J7, les souris, séparées en 2 groupes, reçoivent en sous cutanée soit une dose de 5'Azacytidine (Vidaza, 25mg/mL, Laboratoire Celgene) soit une dose de PBS 1X pendant 5 jours. La survie des souris est suivie. Les souris ayant atteint le point limite sont sacrifiées.

RESULTATS

I) Création des lignées

L'expression de RIP3KD induit un clivage par la caspase-6 de la sous-unité p65/RelA de NF- κ B à l'acide aspartique D361. Afin d'obtenir des lignées exprimant la protéine p65/RelA ou ses mutants, les lignées DA1-3b et B16 ont été transfectées avec les différents plasmides codant pour l'expression de p65/RelA WT ou de ses mutants associée à une expression de la protéine fluorescente DsRed (Schéma 1).

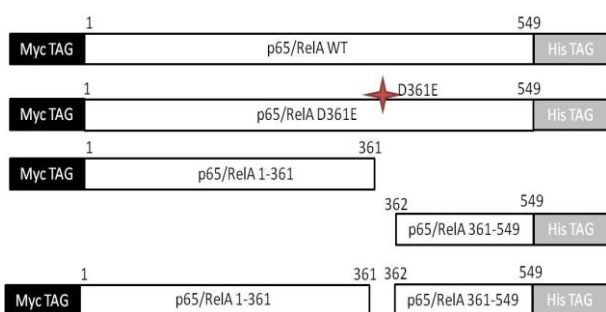


Schéma 1 : Les différents mutants de la protéine p65/RelA : A partir de la protéine p65/RelA, différents mutants ont été construits. Le p65/RelA muté sur son acide aminé 361 est non clivable. Le fragment N Ter ne possède que le domaine N-Terminal (1-361) obtenu par clivage de la protéine p65/RelA WT. Le fragment C Ter ne possède que le domaine C-Terminal (362-551) obtenu par clivage de la protéine p65/RelA WT. Le dernier mutant correspond à la coexpression des fragments N Ter et C Ter. Chaque mutant exprime en N Ter le Myc TAG (sauf le fragment C Ter) et en C Ter le His TAG (sauf le fragment N Ter).

A) Modèle leucémique

Après transfection, les lignées DA1-3b sont sélectionnées par la Blasticidine. Une dilution limite par tri cellulaire est réalisée. A partir du taux d'expression de la DsRed, les clones exprimant le plus fortement possible la protéine fluorescente DsRed ont été retenus (Figure 41).

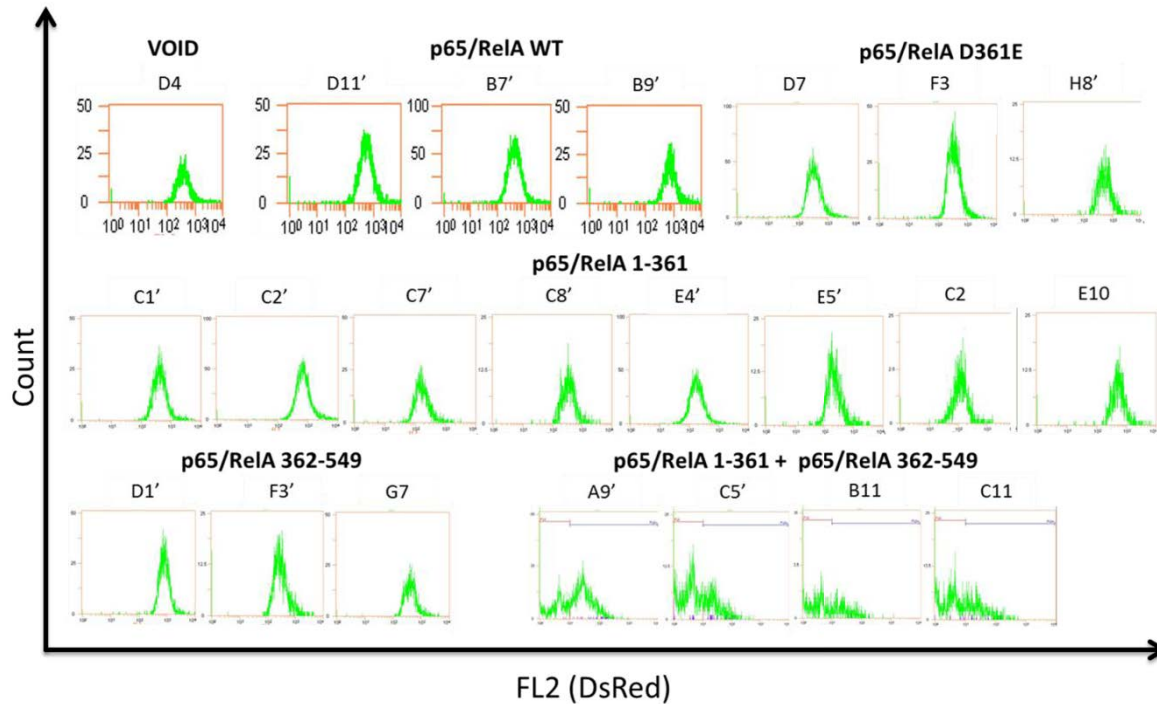


Figure 41 : Mesure du taux d'expression de la protéine DsRed dans les différents clones obtenus : Après transfection des différents plasmides codant pour la protéine p65/RelA WT ou ses mutants : p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361, p65/RelA 362-549, p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549, différents clones sont obtenus par tri cytométrique. Le taux d'expression de la DsRed au sein de ces clones est déterminé par la mesure de sa fluorescence par cytométrie de flux.

L'expression de la DsRed est forte pour l'ensemble des clones excepté ceux exprimant les deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. Malgré plusieurs tentatives, l'intensité de fluorescence de la DsRed n'augmente pas davantage lorsque les deux fragments sont exprimés. La présence d'une séquence IRES dans le plasmide est peut-être responsable de cette faible fluorescence de la protéine DsRed.

Pour les clones sélectionnés qui ont une intensité de fluorescence forte, l'expression de la protéine p65/RelA WT ou de ses mutants p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361, p65/RelA 362-549, p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 est vérifiée par Western blot. Les anticorps ciblant uniquement les tags présents soit en N-Terminal soit en C-Terminal de la protéine p65/RelA sont utilisés afin de bien distinguer l'expression basale de la protéine p65/RelA présente dans tous les clones avec la surexpression induite par la présence des plasmides (Figure 42).

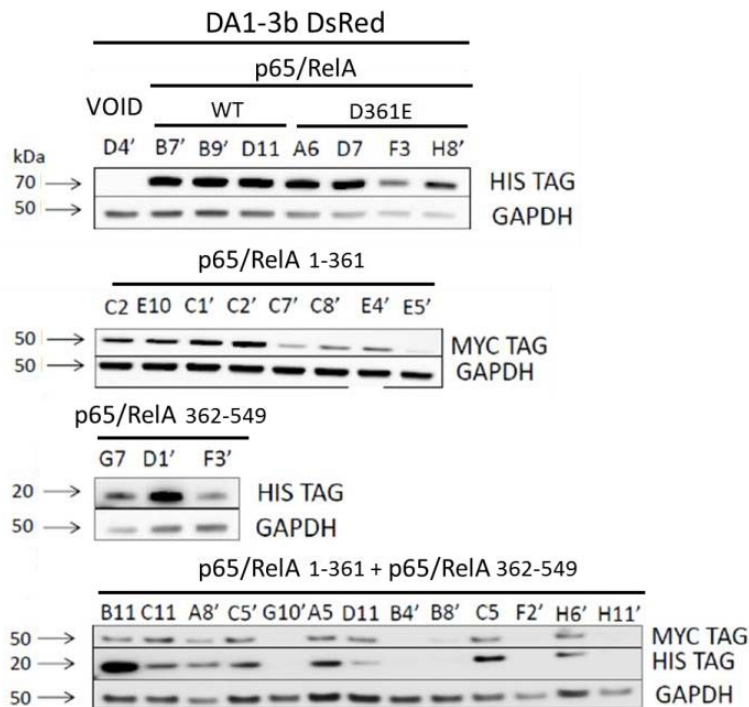


Figure 42 : Validation de l'expression de p65/RelA WT ou de ses mutants p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361, p65/RelA 362-549 et p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 dans les différents clones issus de la lignée leucémique mère DA1-3b par Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre Myc-Tag (présent en N-Terminal de nos constructions) ; contre His-Tag (situé en C-Terminal de nos constructions). L'anticorps dirigé contre la protéine GAPDH sert de contrôle. Issu du clivage, le fragment p65/RelA 1-361 fait 50kDa tandis que le fragment p65/RelA 362-549 fait 20kDa.

Les clones ici présents représentent un exemple de l'ensemble des clones testés. Seules les bandes d'intérêt correspondantes au fragment exprimé sont montrées ici. La protéine p65/RelA WT ou celle mutée p65/RelA D361E sont présentes dans la cellule sous leur forme totale. Donc, elles possèdent à chaque extrémité un tag : le Myc Tag en N-Terminal et le His Tag en C-Terminal. Dans le western blot ci-dessus (Figure 42), on observe bien que l'ensemble des clones exprimant l'une des deux protéines : la forme sauvage ou la forme mutée présentent une belle bande d'expression correspondante à celle du His Tag. La bande correspondante à l'expression du tag His du clone F3 transfecté avec le plasmide codant pour la protéine p65/RelA D361E est relativement plus faible que celles des trois autres clones ayant reçu le même plasmide. Le fragment p65/RelA 1-361 est associé uniquement à l'expression du tag Myc étant dépourvu d'extrémité C-Terminale. Le western blot confirme l'expression de ce fragment dans les clones transfectés avec le plasmide correspondant. Néanmoins, cette expression est très faible chez le clone E5'. Inversement, le fragment p65/RelA 362-549 est lié uniquement avec le tag His (Schéma 1). Cette expression est retrouvée pour chaque clone testé. Le clone D1' est celui qui l'exprime le plus fortement. Par contre, la coexpression des deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 nécessite la

présence des deux tags à des tailles différentes. Le fragment p65/RelA 1-361 est le plus long avec un poids moléculaire de 50kDa. Tandis que le fragment p65/RelA 362-549 est le plus court avec un poids moléculaire de 20kDa. L'ensemble des clones testés ne présente pas de bandes correspondantes aux deux tags. Ces clones correspondants (G10' ; B4' ; B8' ; F2' ; H11') sont donc éliminés. Le degré d'expression varie selon le clone testé. De façon générale, l'expression du tag His est plus marquée que celle du tag Myc. Seul le clone D11 semble exprimer davantage le tag Myc que le tag His au vue de l'intensité des bandes correspondantes.

Parmi l'ensemble des clones testés, seuls ceux exprimant fortement les deux tags ou l'un des deux pour les fragments sont sélectionnés. Pour chaque lignée correspondante, les clones sélectionnés sont mélangés pour former un bulk de clones. Ainsi, nous essayons de nous rapprocher de la diversité clonogénique qu'il peut exister chez le patient. Un nouveau western blot est réalisé pour valider le modèle (Figure 43).

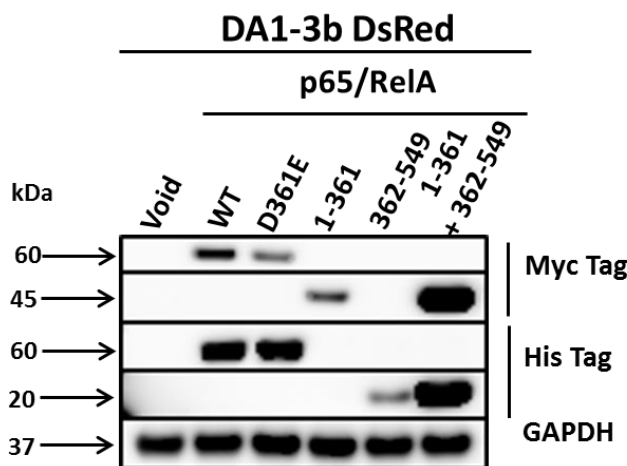


Figure 43 : Validation de l'expression de p65/RelA WT ou de ses mutants p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361, p65/RelA 362-549 et p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 dans le bulk de clones par Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre Myc-Tag (présent en N-Terminal de nos constructions) ; contre His-Tag (situé en C-Terminal de nos constructions). L'anticorps dirigé contre la protéine GAPDH sert de contrôle. Issu du clivage, le fragment p65/RelA 1-361 fait 50kDa tandis que le fragment p65/RelA 362-549 fait 20 kDa

Le résultat confirme l'absence d'expression des deux tags Myc et His dans la lignée Void. L'expression des deux tags Myc et His est bien sûr retrouvée dans les deux lignées exprimant soit p65/RelA WT soit p65/RelA D361E. Cependant, l'expression du tag Myc paraît plus faible que celle du tag His pour la lignée exprimant p65/RelA D361E. Pourtant leur expression est simultanée et fusionnée à la protéine p65/RelA. Les deux bandes exprimant chacune des deux tags sont à la taille. Il pourrait donc plutôt s'agir d'un souci technique d'anticorps qui s'est moins accroché sur la membrane ou au moment de la révélation. La lignée exprimant uniquement le fragment p65/RelA 1-361 a une bande d'expression uniquement pour le tag Myc présent en N-Terminal. Inversement, la lignée

exprimant le fragment p65/RelA 362-549 n'exprime que le tag His situé en C-terminal de la protéine. Enfin, la lignée exprimant les deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 présente deux bandes correspondantes aux tags Myc et His. Chaque bande est observée à la taille attendue. On note néanmoins une différence inexplicée entre l'expression faible de la DsRed et celle de certains mutants (p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 avec DsRed forte, p65/RelA 1-361 ou p65/RelA 362-549 avec DsRed faible).

Enfin pour terminer la validation du modèle, les différents clones sont séquencés afin de confirmer l'absence de mutations dans la séquence des différentes protéines. (Résultats non montrés).

B) Modèle de mélanome

Nous avons utilisé un deuxième modèle ; le mélanome afin de valider ceux obtenus dans le modèle leucémique dans ce modèle. Pour cela, les cellules de mélanome B16 sont transfectées par lipofection avec les différents plasmides exprimant la protéine p65/RelA WT ou ses mutants p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361, p65/RelA 362-549, p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 ainsi que le plasmide contrôle vide (VOID). Après sélection aux antibiotiques, les clones exprimant les différentes protéines sont choisis selon leur taux d'expression de la DsRed. Afin d'éviter l'effet immunogène de la protéine DsRed ainsi que son éventuelle influence sur le comportement des cellules, l'ensemble des clones sélectionnés présente un niveau d'expression similaire à part les clones exprimant les 2 fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 qui expriment toujours, comme le précédent modèle, faiblement la DsRed. Pour chaque lignée, un seul clone est choisi à l'exception de celle exprimant les 2 fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 où 2 clones ont été étudiés séparément. Les clones sont ensuite vérifiés par western blot et par séquençage.

II) Etude de la survie *in vivo*

Le projet prolonge le travail effectué par Nugues AL. *et al.* Dans un premier temps, nous voulons valider les résultats obtenus lors de l'étude *in vivo*.

A) Etude de l'évolution naturelle de la maladie

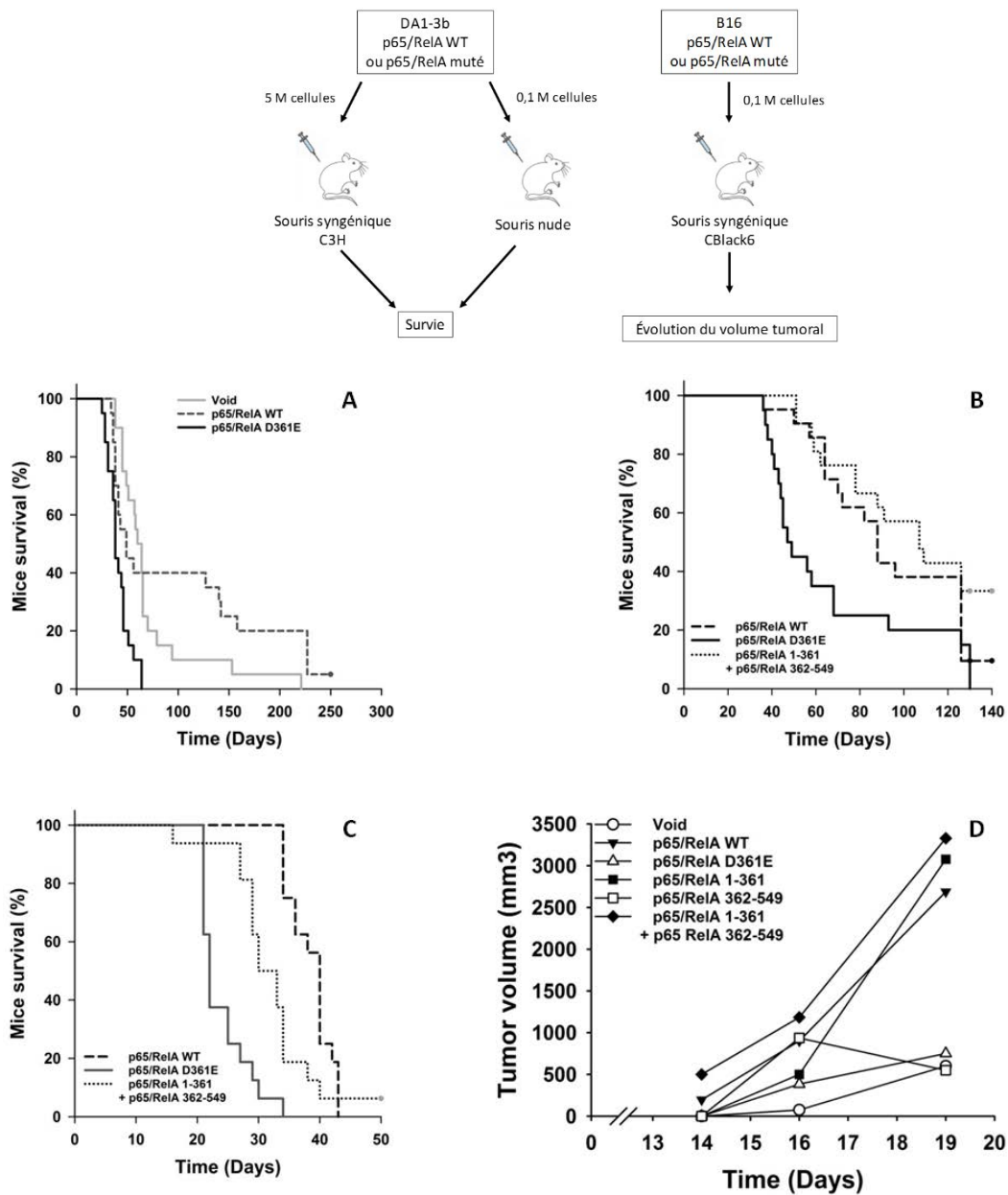


Figure 44 : Etude *in vivo* de l'expression de la protéine p53/RelA WT ou de ses mutants p53/RelA D361E, p53/RelA 1-361, p53/RelA 362-549 et p53/RelA 1-361 + p53/RelA 362-549 dans les cellules DA1-3b ou B16 dans des modèles syngéniques (C3H et CBlack6) et nude. (A) Etude de la survie des souris syngéniques C3H lors de l'expression de la protéine p53/RelA WT vs la protéine mutée p53/RelA D361E dans des cellules leucémiques DA1-3b. L'expression du plasmide Void sert de contrôle (10 souris/groupe). (B) Etude de la survie des souris syngéniques C3H lors de l'expression de la protéine p53/RelA WT, la protéine mutée p53/RelA D361E, des deux fragments p53/RelA 1-361 + p53/RelA 362-549 simultanément dans des cellules leucémiques DA1-3b (20 souris/groupe). (C) Etude de la survie des souris nude lors de de l'expression de la protéine p53/RelA WT, la protéine mutée p53/RelA D361E, des deux fragments p53/RelA 1-361 + p53/RelA 362-549 simultanément dans des cellules leucémiques DA1-3b (16 souris/groupe). (D) Etude de l'évolution du volume tumoral en présence de la protéine p53/RelA WT ou de ses mutants p53/RelA D361E, p53/RelA 1-361, p53/RelA 362-549 et p53/RelA 1-361 + p53/RelA 362-549 exprimés dans les cellules de mélanome B16 injectées dans des souris syngéniques C57Black6 (5 souris/groupe).

1) Souris syngéniques dans le modèle leucémique

Nous confirmons les résultats antérieurs obtenus par Nugues AL. *et al.* En effet, le mutant p65/RelA D361E non clivable qui a induit une létalité rapide de la souris par rapport aux souris injectées avec le plasmide vide ($p < 0,01$) ou le plasmide p65/RelA WT ($p < 0,001$) (Figure 44A). Nos résultats sont équivalents avec l'injection de cellules DA1-3b Bcr-Abl⁺ DsRed. Les cellules p65/RelA D361E transfecté dans les cellules DA1-3b Bcr-Abl⁺ DsRed⁺ entraînent une tumorigénèse plus importante et rapide par rapport à p65/RelA WT ($p < 0,001$) ou aux peptides résultant du clivage D361 (p65 / RelA 1-361 + p65 / RelA 362- 549; $p < 0,001$). Donc dans ce modèle, les peptides résultant du clivage se comportent comme les cellules WT (Figure 44B). Mais le fait de remplacer la protéine GFP par le traceur DsRed induit un décalage de la mort globale des souris (60 jours contre 130 jours). Cette différence de cinétique peut s'expliquer par la sélection des clones cellulaires exprimant plus fortement la protéine fluorescente DsRed qui est plus immunogène que la GFP. Cependant, cette deuxième étude réalisée chez des souris syngéniques confirme le premier résultat c'est-à-dire un potentiel tumorigène du mutant de p65/RelA. De même, le fait que l'expression de la protéine p65/RelA WT prolonge la survie des souris par rapport à celles ayant reçu les cellules leucémiques avec le plasmide Void (Figure 44A) pose la question du rôle du système immunitaire dans la résistance à la mort des souris.

2) Souris "nude"

Pour exclure l'impact du système immunitaire, des souris "nude" ont été utilisées. Le mutant D361E non clivable était une nouvelle fois le plus tumorigène par rapport aux cellules p65 WT ($p < 0,001$) et aux cellules exprimant les peptides résultant du clivage ($p < 0,01$) (Figure 44C). Par rapport au modèle syngénique, la tumorigénicité était plus rapide, suggérant un lien avec le système immunitaire. Les cellules exprimant à la fois les deux fragments N-Terminal et C-Terminal de p65/RelA étaient plus tumorigènes que les cellules WT dans ce modèle, ce qui suggère que le manque de système immunitaire peut impacter son activité. Par contre, la protéine mutée p65/RelA D361E induit une progression rapide de la leucémie entraînant une mort des souris précoces indépendamment de la présence du système immunitaire. p65/RelA D361E présente-t-il toujours cette agressivité dans d'autres modèles ?

3) Modèle de mélanome murin syngénique

Après l'injection, nous observons deux cinétiques contraires de croissance tumorale : les souris injectées avec des cellules B16 surexprimant p65/RelA WT, ou le fragment N-Terminal p65/RelA 1-361 ou la combinaison des N-Terminal et C-Terminal, respectivement, ont développé des tumeurs de plus en plus élevées par rapport aux souris injectées avec des cellules B16 transfectées avec le vecteur vide, le mutant p65/RelA D361E non clivable ou le fragment C-Terminal p65/RelA 362-549. Pour confirmer ce résultat, deux clones différents transfectés avec les fragments p65/RelA ont été utilisés et affichés de manière similaire à un développement tumoral. Dans ce modèle syngénique supplémentaire, l'expression du mutant p65/RelA D361E non clivable ou du mutant C-Terminal diminue de manière significative les activités tumorigènes des cellules de mélanome tandis que les peptides résultant du clivage par caspase-6, p65/RelA WT et le fragment p65/RelA 1-361 (N-terminal) seul augmentent le comportement d'agressivité *in vivo* des cellules de mélanome. Ensemble, nos résultats ne soutiennent pas le fait que la surexpression de p65/RelA réduit la tumorigénicité (Ricca A. *et al.* 2001).

4) Bilan de l'évolution tumorale

Nous confirmons les résultats déjà obtenus au laboratoire concernant le WT et le mutant non clivable dans le modèle leucémique (Nugues AL. *et al.* 2014). Nous observons des activités opposées entre les deux modèles du mélanome et de leucémie concernant l'impact de p65/RelA et de ses mutants sur le potentiel tumorigène des cellules (Tableau 1). Ainsi, les résultats obtenus diffèrent selon le modèle d'étude utilisé pouvant s'expliquer par le rôle fonctionnel joué par p65/RelA différent dans ces deux modèles. Néanmoins, dans les modèles de mélanome et de leucémie, nous avons pu observer le comportement similaire des cellules p65/RelA WT avec les cellules exprimant les deux peptides N-Terminal + C-Terminal et en opposition avec l'activité du mutant non clivable. Le potentiel tumoral mesuré ici correspond à l'évolution naturelle de la maladie.

croissance tumorale	Leucémie	Mélanome
p65/RelA WT	+	+++
p65/RelA D361E	+++	+
p65/RelA N&C Ter	+	+++

Tableau 1 : Bilan du développement tumoral dans les 2 modèles d'étude.

Au sein du laboratoire, nous avons montré la réexpression de RIP3 *in vitro* après un traitement 5AZA, un agent de déméthylation dans notre modèle leucémique (Nugues AL. *et al.* 2014). Nous avons ensuite vérifié l'activité de 5AZA dans notre modèle leucémique chez des souris syngéniques et nudes. En présence de ce traitement, p65/RelA WT ou de ses mutants conservent-ils le même pouvoir tumorigène ?

B) Effets du traitement de la 5'AZA sur la tumorigénèse des souris leucémiques

Seul le modèle leucémique est utilisé pour étudier l'évolution de la leucémie en présence d'un traitement à la 5'Azacytidine. Le choix du traitement des souris a été effectué après avoir testé différentes drogues *in vitro*. Seule la molécule 5'Azacytidine a montré une efficacité et une différence de comportement entre les différentes lignées. (Voir partie IV-A)

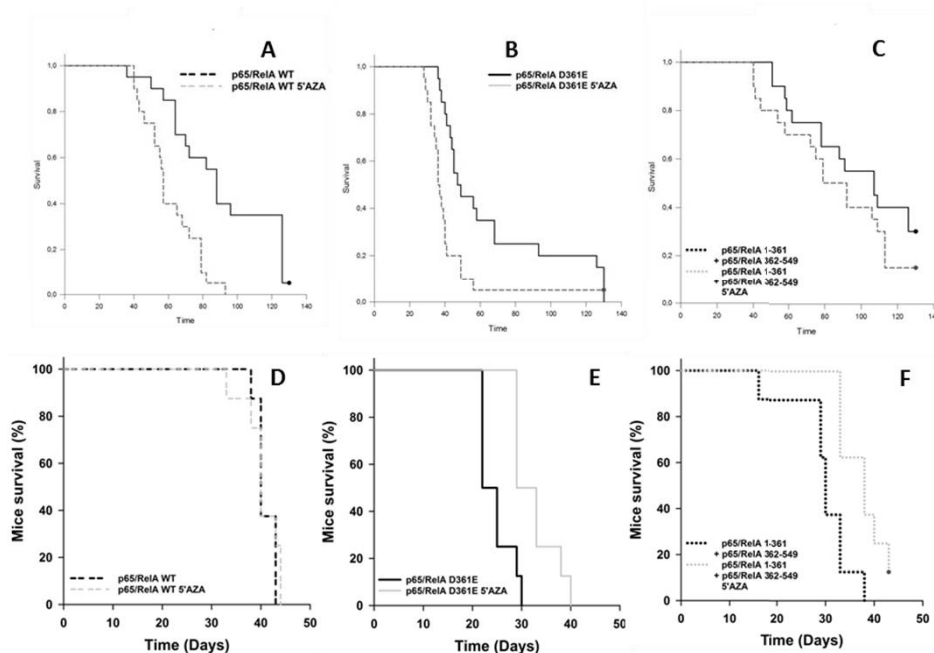
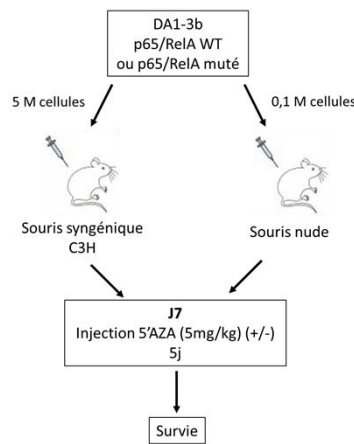


Figure 45 : Etude de la survie des souris syngéniques C3H et nudes traitées à la 5'Azacytidine vs un contrôle au PBS injectée avec des cellules exprimant la protéine p65/RelA WT, la protéine mutée p65/RelA D361E, les fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. (A) Etude de la survie des souris syngéniques traitées à la 5'Azacytidine vs souris contrôle en présence de l'expression de p65/RelA WT (10 souris/groupe). (B) Etude de la survie des souris syngéniques traitées à la 5'Azacytidine vs souris contrôle en présence de l'expression de p65/RelA D361E (10 souris/groupe). (C) Etude de la survie des souris syngéniques traitées à la 5'Azacytidine vs souris contrôle en présence de l'expression des deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 (10 souris/groupe). (D) Etude de la survie des souris nudes traitées à la 5'Azacytidine vs souris contrôle en présence de l'expression de p65/RelA WT (8 souris/groupe). (E) Etude de la survie des souris nudes traitées à la 5'Azacytidine vs souris contrôle en présence de l'expression de p65/RelA D361E (8 souris/groupe). (F) Etude de la survie des souris nudes traitées à la 5'Azacytidine vs souris contrôle en présence de l'expression des deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 (8 souris/groupe).

1) Souris syngéniques

Les souris sont traitées à l'agent déméthylant 5'Azacytidine à J7. Pour chacun des groupes p65/RelA WT, p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549, le traitement provoque une mortalité des souris plus rapide qu'en absence de traitement (Figure 45 A, B, C). Pour les groupes p65/RelA WT traité ou non, la survie est plus longue, en absence de traitement, prolongée d'une quarantaine de jours (Figure 45A). L'évolution clinique est aussi plus rapide chez les souris p65/RelA D361E non traitées vs celles traitées (Figure 45B). Mais cette différence de survie est moins marquée que chez les souris injectées avec les cellules leucémiques p65/RelA WT. Quant aux groupes de souris p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 traité ou non, ils présentent une évolution de la survie dans le temps similaire (Figure 45C). Néanmoins, les souris non traitées survivent plus longtemps. Donc le fait de traiter les souris à l'agent déméthylant 5'Azacytidine ne permet pas de prolonger la durée de vie des souris en ralentissant la progression de la leucémie. Au contraire, en tant qu'agent déméthylant, la 5'Azacytidine doit déméthylter des régions d'ADN enclenchant une expression plus importante de gènes oncogènes accélérant le développement de la maladie. De plus, la 5'Azacytidine peut également suractiver le système immunitaire ou comme dans le cas de la cytarabine, induire une action protectrice du transfert de mitochondries des cellules stromales vers les cellules leucémiques (Moschoi R. *et al.* 2016) entraînant une mort plus rapide des souris.

2) Souris "nude"

Les souris "nudes" sont également traitées à l'agent déméthylant 5'Azacytidine à J7. Chez les souris "nudes" injectées avec des cellules exprimant p65/RelA WT, le traitement n'apporte aucun bénéfice en terme de survie puisque celle-ci est identique pour les traitées

comme les non traitées (Figure 45D). Par contre, les souris nude du groupe p65/RelA D361E ont une durée de survie prolongée d'une dizaine de jours (Figure 45E). De même, le groupe p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 survivent plus longtemps en présence du traitement (Figure 45F). Ainsi, les souris de ces deux groupes traitées à la 5'Azacytidine présentent une survie prolongée de plusieurs jours par rapport à celles non traitées. Donc, dans ce modèle murin dépourvu de cellules T, on observe bien de façon générale une efficacité de traitement permettant une prolongation de la vie de la souris et une inhibition de l'évolution de la maladie.

3) Bilan du développement tumoral sous traitement

croissance tumorale	syngénique		nude	
	CTRL	5'AZA	CTRL	5'AZA
p65/RelA WT	+	+++	+++	+
p65/RelA D361E	+	+++	+++	+
p65/RelA N&C Ter	+	+++	+++	+

Tableau 2 : *Bilan du développement tumoral en présence d'un agent déméthylant 5'AZA dans les modèles syngénique et nude.*

Lorsque les souris syngéniques sont traitées avec l'agent déméthylant 5'AZA, le développement tumoral est plus précoce qu'en absence de traitement. Au contraire, les souris nudes traitées avec la 5'AZA survivent plus longtemps qu'en absence de traitement (Tableau 2).

Le traitement à la 5'Azacytidine doit donc enclencher une réponse immunitaire anormalement élevée causant une mort plus rapide des souris. Il existe donc une incidence du système immunitaire sur la capacité de la 5'Azacytidine à diminuer la tumorigénèse dans ce modèle murin (Tableau 2). Il peut également s'agir comme lors du traitement avec la cytarabine une action protectrice du transfert de mitochondries des cellules stromales vers les cellules leucémiques lors du traitement avec la 5'Azacytidine (Moschoi R. *et al.*, 2016).

III) Etude du rôle fonctionnel de p65/RelA et des différents mutants

Pour comprendre les effets *in vivo*, nous avons mené différentes études comme la prolifération et le cycle cellulaire *in vitro*

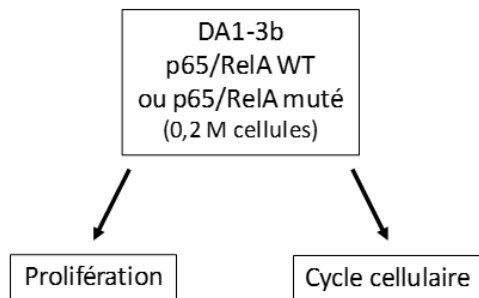


Figure 46 : Design de l'étude du rôle fonctionnel de p65/RelA et des différents mutants dans les différentes lignées leucémiques exprimant soit le plasmide Vide soit p65/RelA WT soit p65/RelA D361E soit p65/RelA 1-361 soit p65/RelA 362-549 soit p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549.

A) Prolifération

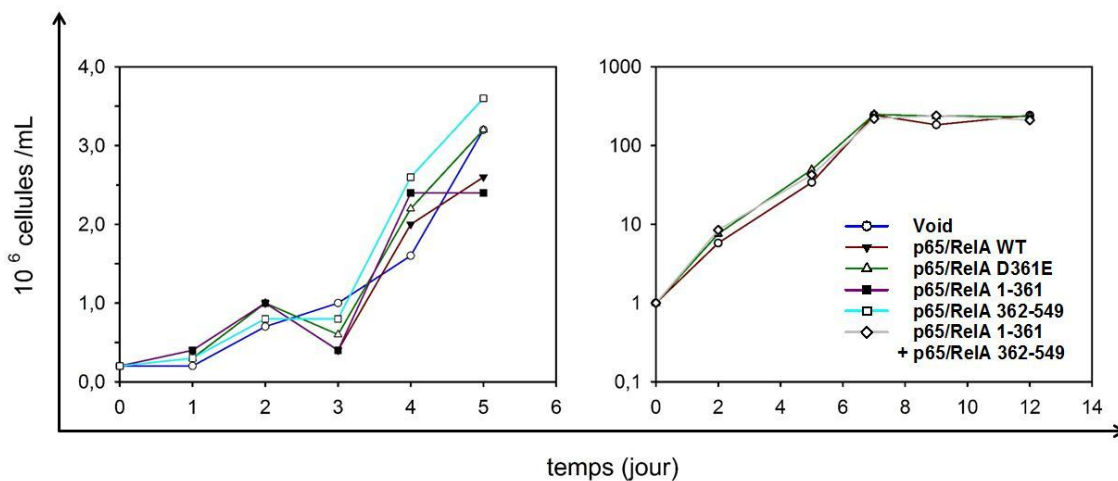


Figure 47 : Etude la prolifération des différentes lignées leucémiques exprimant soit le plasmide Vide soit p65/RelA WT soit p65/RelA D361E soit p65/RelA 1-361 soit p65/RelA 362-549 soit p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 (n=1).

p65/RelA joue un rôle dans la prolifération des cellules leucémiques. Nous avons voulu déterminer l'influence de nos constructions sur la prolifération. Avec un changement régulier de milieu, les cellules prolifèrent de la même façon. Nous n'observons pas de modifications de prolifération quelle que soit la construction utilisée (Figure 47). La tumorigénèse plus élevée de p65/RelA D361E ne s'explique pas par une prolifération plus rapide.

B) Cycle cellulaire

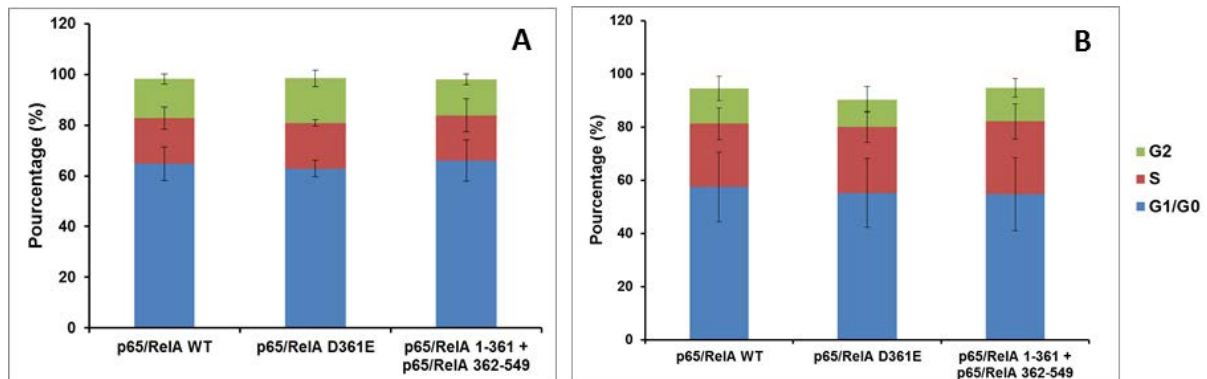


Figure 48 : Etude du cycle cellulaire des lignées leucémiques *DAI-3b* exprimant *p65/RelA WT*, *p65/RelA D361E*, *p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549*. (A) Mesure du cycle cellulaire à J0 des différentes lignées. (B) Mesure du cycle cellulaire à J2 (48H) des différentes lignées. La phase G1/G0 correspond à la phase de préparation à la duplication du matériel génétique (une copie de l'ADN = n). La phase S correspond à la phase de réplication de l'ADN menant au passage d'une copie à deux copies de l'ADN = n à 2n). La phase G2 correspond à la phase de préparation à la division cellulaire : la mitose (deux copies de l'ADN = 2n). Les barres d'erreurs correspondent aux SEM.

Le cycle cellulaire est étudié chez les 3 lignées majeures caractéristiques des phénomènes pouvant être observés chez les patients à J0 et au bout de 48h de prolifération. A J0 comme au bout de 48H, la majorité des cellules sont en phase G1. Les cellules se répartissent en proportion relativement égale entre les phases S et G2 à J0. Mais, au bout de 48H, les proportions changent : davantage des cellules se trouvent en phase S.

A J0, les 3 lignées présentent une phase G1 quasiment identique (65% vs 63% vs 66% pour les lignées *p65/RelA WT*, *p65/RelA D361E*, *p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549* respectivement). On n'observe pas de différence significative entre les 3 lignées (Figure 48A). De même, la proportion de cellules en phase S est équivalente pour l'ensemble des trois lignées (18%). Le taux de cellules en phase G2 est similaire pour les trois lignées (15% vs 18% vs 14% pour les lignées *p65/RelA WT*, *p65/RelA D361E*, *p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549* respectivement). Ces très faibles différences sont non significatives (Figure 48A).

Ces proportions dans les différentes phases changent pour chacune des lignées au bout de 48H (Figure 48B). Au bout de 48H, le nombre de cellules en phase G1 est plus faible qu'à J0 (de l'ordre de 50% vs 60%). Néanmoins, la lignée *p65/RelA WT* garde la plus forte proportion de cellules (57%) en phase G1. A l'inverse, les lignées *p65/RelA D361E* et *p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549* sont présentes en plus faible proportion (55%). En phase S, davantage de cellules (27%) de la lignée *p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549* sont en phase S. Au contraire, la lignée *p65/RelA WT* a la plus faible proportion de cellules (24%)

en phase S. La lignée p65/RelA D361E conserve une position intermédiaire avec une proportion de moyenne 25 % de cellules en phase S. En phase G2, p65/RelA D361E présente la plus faible proportion de cellules (10%), tandis que p65/RelA WT et p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 sont présents en plus grande proportion (13%). Cependant l'ensemble de ces résultats n'est pas significatif.

Ces différences entre les lignées pour chacune des phases du cycle cellulaire sont minimales, légères et non significatif que ce soit à J0 ou au bout de 48H. Aucun profil caractéristique d'un des mutants de p65/RelA ne peut être déterminé. Ainsi, ces différents mutants n'influencent pas le déroulement du cycle cellulaire. La différence de profil tumorigène ne peut s'expliquer par une modification de l'évolution du cycle cellulaire.

Ainsi, l'étude *in vitro* de la prolifération et du cycle cellulaire n'a pas permis d'expliquer une différence de tumorigénèse lorsque l'un des mutants de p65/RelA est exprimé. Cette différence peut être due à d'autres mécanismes.

C) Localisation nucléaire

Afin de déterminer l'impact de l'expression des différents mutants de p65/RelA sur le développement tumoral, la localisation cytoplasmique et nucléaire des différentes constructions de p65/RelA est étudiée par microscopie confocale et par western blot via l'utilisation d'extraits nucléaires.

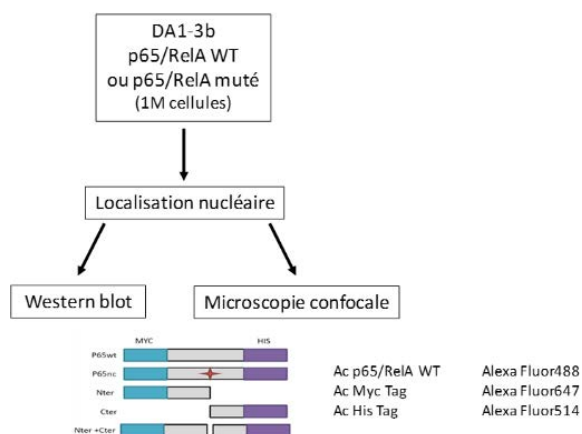


Figure 49 : Design de l'étude de la localisation nucléaire de p65/RelA WT ou de ses mutants p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361, p65/RelA 362-549 et p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 dans les lignées leucémiques DA1-3b

1) Western blot

La lignée DA1-3b exprimant le plasmide contrôle Void exprime uniquement p65/RelA dans le cytoplasme (Figure 50). La lignée surexprimant p65/RelA WT présente une expression plus importante de p65/RelA WT dans le cytoplasme mais aussi plus faiblement

dans le noyau. L'expression des tags est également retrouvée dans le cytoplasme uniquement (Figure 50). Ce résultat semble donc indiquer que la protéine p65/RelA couplée aux deux tags reste localisée dans le cytoplasme contrairement à la protéine p65/RelA synthétisée naturellement qui est également présente dans le noyau. En comparaison avec les autres lignées, la présence de p65/RelA WT dans le noyau est la plus forte. En présence de p65/RelA D361E, p65/RelA est fortement exprimé dans le cytoplasme et présent dans le noyau sous forme de trace. De même, les tags sont exprimés uniquement dans le cytoplasme (Figure 50).

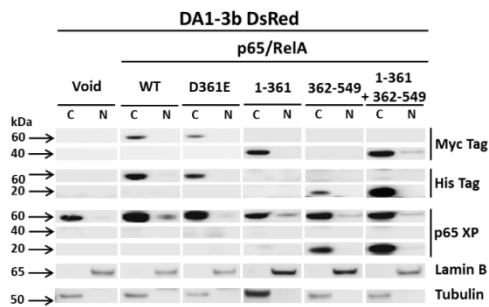


Figure 50 : Etude de la localisation nucléaire de p65/RelA WT ou de ses mutants p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361, p65/RelA 362-549 et p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 dans les lignées leucémiques DA1-3b par Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre Myc-Tag (présent en N-Terminal de nos constructions) ; contre His-Tag (situé en C-Terminal de nos constructions) ; contre p65/RelA, contre la lamine B, protéine nucléaire ; contre la tubuline, protéine cytoplasmique (C = Cytoplasme, N = Noyau).

Dans les cellules exprimant uniquement le fragment p65/RelA N-Terminal 51-361°, la protéine p65/RelA WT est présente à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Figure 50). Seul le tag Myc lié à la partie N-Terminale est exprimé uniquement dans le cytoplasme des cellules exprimant p65/RelA 1-361. Aucune expression du deuxième tag n'est pas retrouvée dans ces cellules. Le résultat inverse est retrouvé dans les cellules exprimant p65/RelA 362-549. Ainsi, seul le tag His est exprimé dans le cytoplasme de ces cellules (Figure 50). On retrouve également l'expression de p65/RelA WT dans le cytoplasme et faiblement dans le noyau. L'anticorps dirigé contre p65/RelA WT reconnaît la partie C-Terminale expliquant la présence de deux bandes à deux tailles différentes 65kDa et 20kDa correspondant respectivement à la protéine sauvage et au fragment C-Terminal. Dans les cellules exprimant les deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549, l'expression de la protéine p65/RelA WT est retrouvée à la fois dans le cytoplasme et sous forme de trace dans le noyau (Figure 50). Cette expression nucléaire correspond à celle du Myc-tag. En effet, on observe la présence du tag Myc dans le cytoplasme comme dans le noyau en plus faible quantité contrairement au tag His exprimé uniquement dans le cytoplasme. Les contrôles cytoplasmique et nucléaire sont conformes pour chaque lignée. Néanmoins, on observe que l'expression de la lamine B est beaucoup plus élevée dans les cellules exprimant l'un des deux fragments p65/RelA 1-361 ou p65/RelA 362-549 ce qui indique que l'expression de p65/RelA observée dans le noyau est donc plus faible que ce que la bande indique. De même,

l'expression de la tubuline est plus forte dans la lignée exprimant le fragment p65/RelA 1-361 donc l'expression de p65/RelA est plus faible qu'indiquée.

2) Microscopie confocale

Dans la lignée exprimant le plasmide contrôle Void, on retrouve une expression de p65/RelA WT à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Figure 51). Cette expression est relativement plus marquée cependant dans le cytoplasme. On observe un léger marquage du tag His dans cette lignée contrôle. Par contre, le marquage correspondant au Myc-Tag est complètement absent. Dans la lignée surexprimant p65/RelA WT, la fluorescence de p65/RelA est plus forte que celle de la lignée Void traduisant bien une augmentation de l'expression de p65/RelA WT (Figure 51). La protéine p65/RelA WT surexprimé est surtout présent dans le cytoplasme et plus faiblement dans le noyau. Le marquage dirigé contre le Myc-Tag indique surtout une localisation cytoplasmique et très légèrement dans le noyau. Au contraire le marquage dirigé contre le His-Tag est à la fois présent dans le cytoplasme et dans le noyau. Or, ici, il s'agit de la protéine totale non clivée, donc les deux tags sont présents sur la même protéine. On devrait donc retrouver une expression du Myc-Tag dans le noyau. Or ce n'est pas le cas, on peut donc supposer qu'il existe un autre clivage qui a lieu avant la séquence NLS permettant à la partie C-Terminale d'aller au noyau. En présence du mutant p65/RelA D361E, p65/RelA est localisé principalement dans le cytoplasme et légèrement dans le noyau (Figure 51). Le marquage dirigé contre Myc-Tag est localisé uniquement dans la partie cytoplasmique. Au contraire, le marquage dirigé His-Tag est équivalement réparti entre les parties cytoplasmique et nucléaire. On se retrouve dans la même situation qu'avec les cellules surexprimant p65/RelA WT. Donc nous pouvons poser les mêmes hypothèses. Les cellules exprimant le fragment p65/RelA 1-361 présente une localisation de p65/RelA uniquement dans le cytoplasme confirmée par le marquage dirigé contre le Myc-Tag (Figure 51).

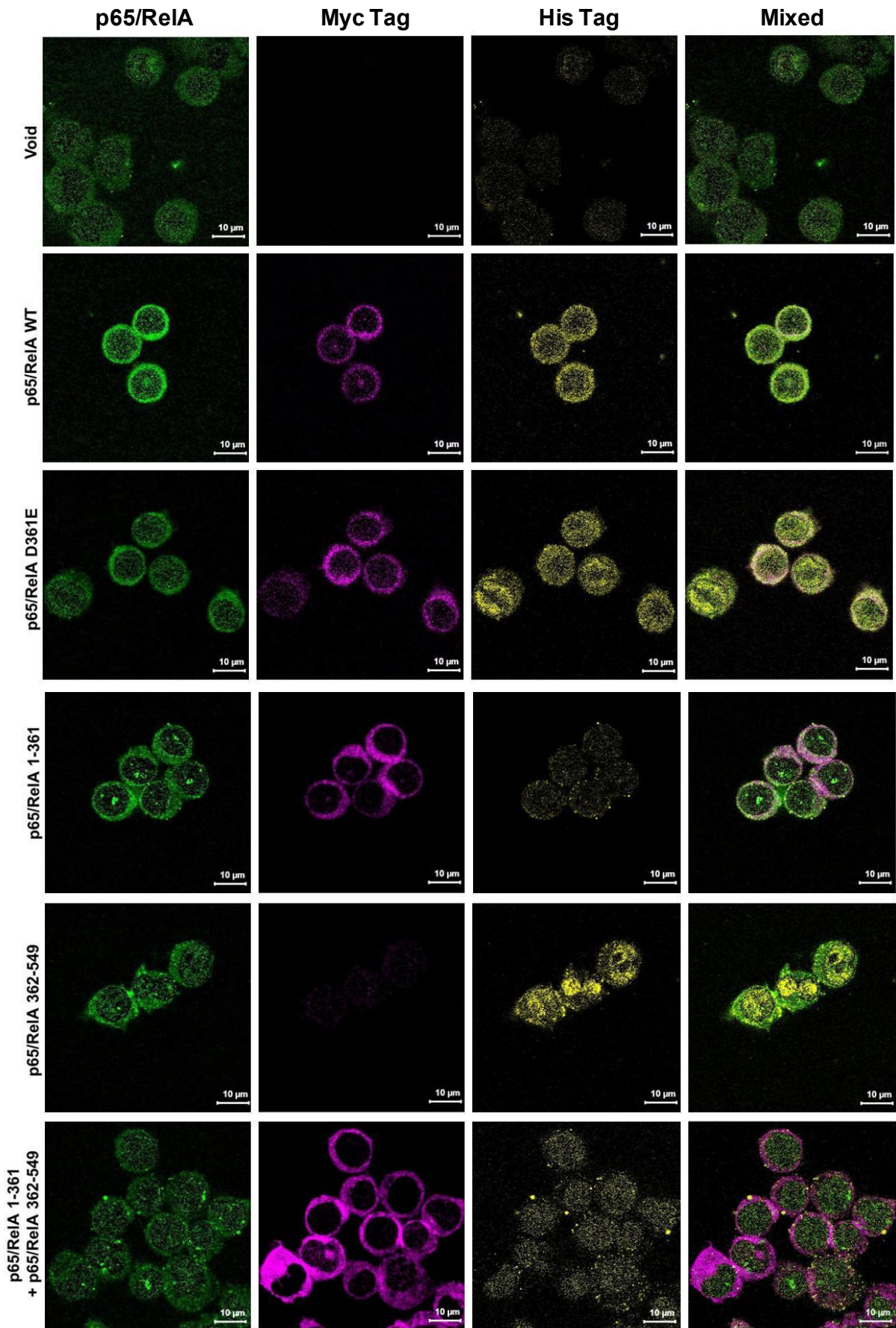


Figure 51 : Etude de la localisation nucléaire de p65/RelA WT ou de ses mutants p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361, p65/RelA 362-549 et p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 en microscopie confocale . Le marquage a été réalisé avec un anticorps dirigé contre p65/RelA couplé à l’Alexa Fluor488, un anticorps dirigé contre Myc-Tag (présent en N-Terminal de nos constructions) couplé à l’Alexa Fluor647, un anticorps dirigé contre His-Tag (situé en C-Terminal de nos constructions) couplé à l’Alexa Fluor514.

Le fragment p65/RelA 1-361 est fusionné qu’avec le Myc-Tag et non avec le His-Tag. Or, on observe un léger marquage dirigé contre His-Tag. Il s’agit donc du bruit de fond lié à l’anticorps. En présence du fragment p65/RelA 362-549, p65/RelA est positionné à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Figure 51). Cette différence de localisation est davantage mise en évidence en présence du marquage dirigé contre le His-Tag. Par contre, les cellules exprimant le deuxième fragment p65/RelA 362-549 ne possèdent pas le Myc-Tag expliquant l’absence de marquage fluorescent en Alexa Fluor647. Enfin, lors de la coexpression des deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549, p65/RelA est exprimé à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme comme l’indique également le marquage dirigé contre le His-Tag (Figure 51). Au contraire, le marquage dirigé contre Myc-Tag est retrouvé uniquement dans le cytoplasme. Ainsi, seul le fragment p65/RelA 362-549 est capable d’aller au noyau contrairement au fragment p65/RelA 1-361. Or la séquence NLS est présente dans le fragment p65/RelA 1-361. Donc le fragment p65/RelA 362-549 doit interagir avec le complexe NF- κ B ou l’un de ces membres afin de pouvoir aller au noyau.

3) Bilan de la localisation nucléaire

Comme le montre le diagramme récapitulatif du Tableau 3, les résultats de western blot (Figure 50) ne concordent pas à ceux de la microscopie (Figure 51). En effet, les résultats obtenus par ces deux techniques s’opposent. Le western blot indique que le fragment p65/RelA 1-361 est responsable de la translocation au noyau alors que les images de microscopie indiquent qu’il s’agit du fragment p65/RelA 362-549 qui est responsable de cette translocation. Il est donc nécessaire de vérifier l’activité de p65 NF- κ B par d’autres méthodes.

localisation	WB	Microscopie
Void	C	C
p65/RelA WT	C/N	C/N
p65/RelA D361E	C	C/N
p65/RelA 1-361	C/N	C
p65/RelA 362-536	C	C/N
p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549	C/N	C/N

Tableau 3 : Bilan de l’étude de localisation cellulaire selon 2 techniques différentes.
(WB = western blot, C = cytoplasme et N = Noyau)

D) Fixation à un élément de réponse

La protéine p65/RelA possède dans son domaine N-Terminal sa séquence de localisation nucléaire (NLS) tandis que dans son domaine C-Terminal le domaine d'activation à la transcription (TAD). Il est à noter que le kit utilisé nécessite un anticorps reconnaissant la protéine p65/RelA sur sa partie N-Terminale (Figure 52). Nous avons également recherché les activités nucléaires de p50, p52 et RelB.

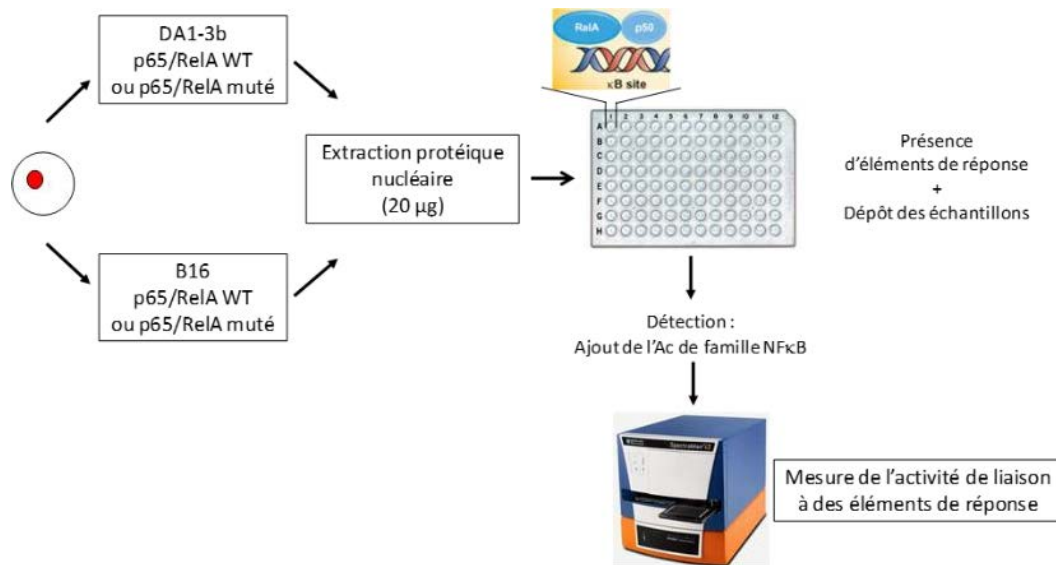


Figure 52 : Design de l'étude de la fixation de p65/RelA à un élément de réponse de p65/RelA WT ou de ses mutants p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361, p65/RelA 362-549 et p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 dans les lignées leucémiques DA1-3b ou dans les lignées de mélanome B16.

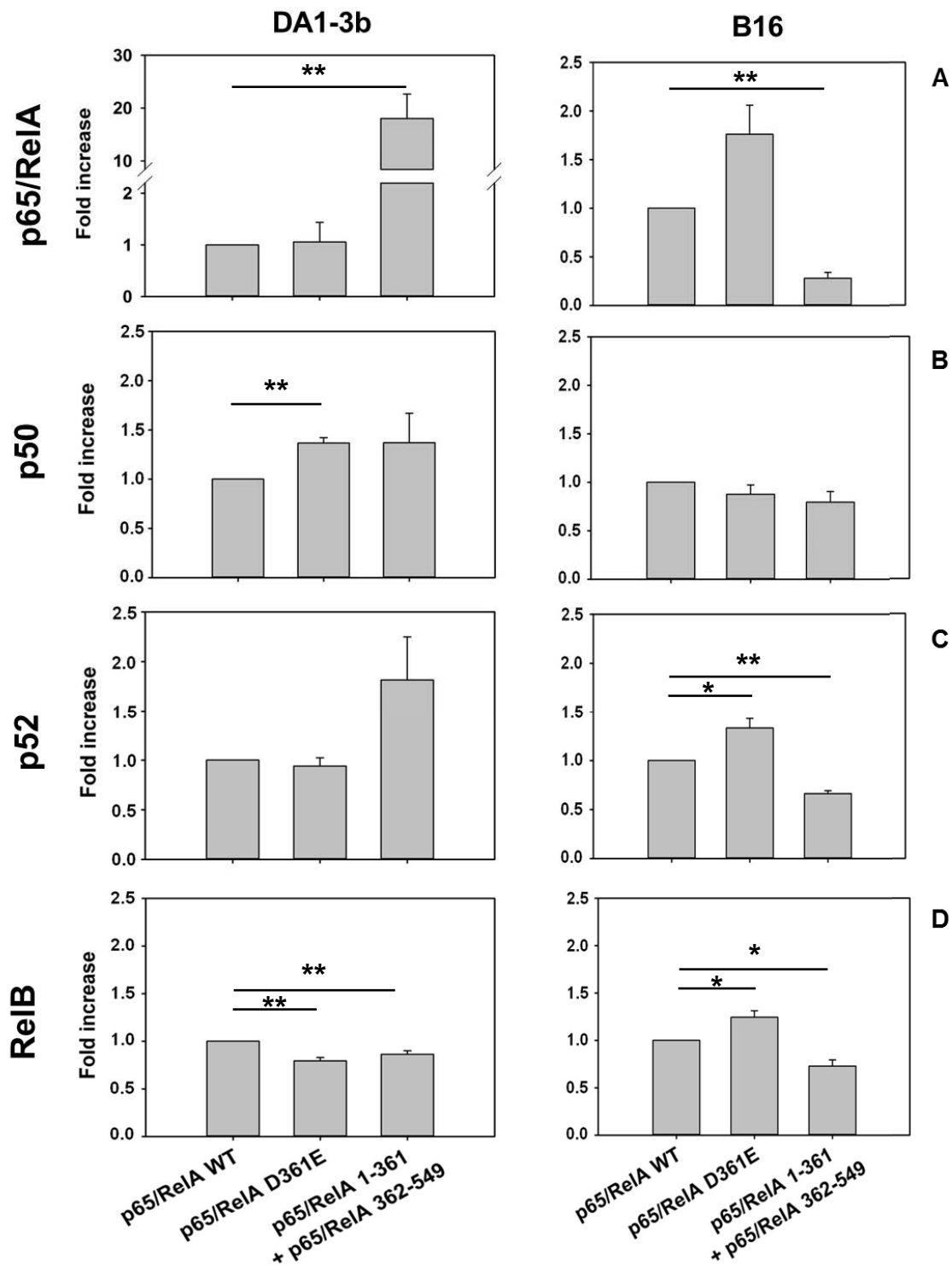


Figure 53 : Etude de la fixation de p65/RelA WT ou de son mutant p65/RelA D361E non clivable, ou des deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 à un élément de réponse des différents membres de la famille NF- κ B : (A) p65/RelA (B) p50 (C) p52 (D) RelB sur les régions promotrices de l'ADN dans le modèle leucémique DA1-3b (panel de gauche) et le modèle de mélanome B16 (panel de droite). L'ensemble des résultats est normalisé par rapport à ceux obtenus lors de la surexpression de p65/RelA WT. Les barres d'erreurs correspondent aux valeurs SEM.

1) p65/RelA

La surexpression de p65/RelA WT dans le modèle leucémique induit une augmentation de la fixation de p65/RelA (à la fois endogène et exogène) sur son élément de réponse par rapport à la lignée Void (résultat non montré). Le mutant p65/RelA D361E se fixe de façon similaire à son élément de réponse que p65/RelA WT ($p=ns$) (Figure 53A, panel de gauche). La coexpression des fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 se traduit par une forte activité de liaison à un élément de réponse (X 15/20) en comparaison à la lignée p65/RelA WT ($p=0,00166$) (Figure 53A, panel de gauche). Ainsi, l'association des 2 fragments semble bénéfique pour les cellules augmentant fortement la fixation de p65/RelA sur son élément de réponse. Les fragments semblent interagir entre eux pour booster l'activité de p65/RelA endogène. Au contraire, dans le modèle de mélanome, l'expression de p65/RelA D361E induit une augmentation plus importante de l'activité de liaison à un élément de réponse (X 1,5) ($p=ns$) (Figure 53A, panel de droite). L'activité de liaison des 2 fragments combinés p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 est aussi faible que dans la lignée p65/RelA WT ($p=0,0003$) (Figure 53A, panel de droite). Contrairement au modèle leucémique dans lequel p65/RelA est suractivé par BCR-ABL, le modèle de mélanome ne présente pas de base une suractivation de p65/RelA pouvant expliquer cette différence d'intensité d'activité de liaison à un élément de réponse entre les deux modèles.

2) p50

Dans le modèle leucémique, en comparaison avec la lignée surexprimant p65/RelA WT, le taux de fixation de p50 à un élément de réponse des régions promotrices est augmenté légèrement (X 0,5) dans les lignées exprimant soit p65/RelA D361E ($p=0,00229$) soit p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 ($p=ns$) (Figure 53B panel de gauche). Dans le modèle du mélanome, en comparaison avec la surexpression de p65/RelA WT, l'expression de p65/RelA D361E ou de p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 entraîne une très légère diminution du taux de fixation de p50 sur un élément de réponse des régions promotrices avec des p-value non significatives (Figure 53B panel de droite). Ainsi, la différence d'expression de p65/RelA ne modifie pas le taux de liaison de p50 sur son élément de réponse de façon significative.

3) p52

Dans le modèle leucémique, la fixation sur son élément de réponse de p52 sur son élément de réponse est très légèrement diminuée lorsque p65/RelA D361E est exprimé vs une surexpression de p65/RelA WT ($p= ns$) (Figure 53C panel de gauche). Au contraire, celle en présence de p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 est fortement augmentée (X2) (Figure 53C panel de gauche). Cependant, l'écart type étant important ($p= ns$), il faudrait confirmer ce résultat pour conclure sur une influence positive de l'expression de p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. Dans le modèle du mélanome, le taux de fixation de p52 à un élément de réponse en présence d'une expression de p65/RelA D361E au sein de la lignée est augmenté de 0,5 par rapport à la lignée surexprimant p65/RelA WT ($p= 0,0279$) (Figure 53C panel de droite). Contrairement à la lignée exprimant p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 où le taux de fixation est diminué de 0,5 vs la lignée surexprimant p65/RelA WT ($p= 0,000357$) (Figure 53C panel de droite). L'expression de p65/RelA WT ou p65/RelA D361E ou p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 n'interfèrent pas dans la fixation de p52 sur son élément de réponse dans les régions promotrices.

4) RelB

En normalisant les résultats par rapport p65/RelA WT, on observe une diminution d'un quart du taux de fixation de RelB sur son élément de réponse en présence de p65/RelA D361E ($p= 0,00445$) ou de p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 ($p= 0,0212$) dans le modèle leucémique (Figure 53D panel de gauche). Dans le modèle de mélanome, le taux de fixation de p52 à un élément de réponse en présence d'une expression de p65/RelA D361E au sein de la lignée est augmenté de 0,5 par rapport à la lignée surexprimant p65/RelA WT ($p= 0,0253$) (Figure 53D panel de droite). Contrairement à la lignée exprimant p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 où le taux de fixation est diminué de 0,5 vs la lignée surexprimant p65/RelA WT ($p=0,0149$) (Figure 53D panel de droite). Dans les deux modèles, l'expression de p65/RelA WT ou p65/RelA D361E ou p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 induit une diminution de la fixation de RelB sur son élément de réponse dans les régions promotrices.

5) Bilan de la fixation des membres de la famille NFκB à un élément de réponse

L'étude de la fixation à un élément de réponse *in vitro* a mis en évidence dans le modèle leucémique une forte augmentation de la fixation à un élément de réponse de p65/RelA et de

p52 lorsque sont coexprimés les fragments N&C Ter. A l'inverse, RelB se fixe moins à son élément de réponse que ce soit en présence des 2 fragments p65/RelA N&C Ter ou en présence du mutant non clivable. Dans le modèle de mélanome, on observe un résultat inverse : la fixation de p65/RelA à son élément de réponse est fortement diminuée en présence des 2 fragments. Au contraire, cette fixation est fortement augmentée en présence du mutant non clivable. Par contre, on retrouve la même diminution de la fixation de RelB à son élément de réponse dans ce modèle de mélanome. Enfin, seule la fixation de p50 n'est pas modulée par l'expression de p65/RelA D361E ou de p65/RelA N&C Ter.

Ainsi, la coexpression des fragments p65/RelA induit un comportement de p65/RelA opposé selon le modèle. L'activité de liaison des mutants dépend du modèle cellulaire et de l'élément de réponse auquel on s'adresse (Tableau 4).

Leucémie	p65/RelA D361E	p65/RelA N&C Ter
p65/RelA	ns	↗↗↗
p50	ns	ns
p52	ns	↗↗
RelB	↘	↘
Mélanome	p65/RelA D361E	p65/RelA N&C Ter
p65/RelA	↗↗↗	↘↘↘
p50	ns	ns
p52	ns	ns
RelB	↘	↘

Tableau 4 : Bilan de la fixation à un élément de réponse dans les 2 modèles d'étude

E) Mesure de l'activité promotrice

Nous avons mesuré cette activité par un système rapporteur luciférase couplé à la luciférine. Dans le modèle leucémique, (Figure 54 panel de gauche), la surexpression de p65/RelA WT entraîne naturellement une augmentation de l'activité promotrice par rapport à la lignée contrôle ($p= 0,00271$). En présence du mutant p65/RelA D361E, l'activité promotrice diminue légèrement mais de façon non significative ($p=ns$) par rapport à celle de la lignée surexprimant p65/RelA WT. Par contre, l'activité promotrice est le plus fortement augmentée en présence du fragment p65/RelA 1-361 (x 2,5) de façon significative ($p=0$) en comparaison avec la présence de p65/RelA WT.

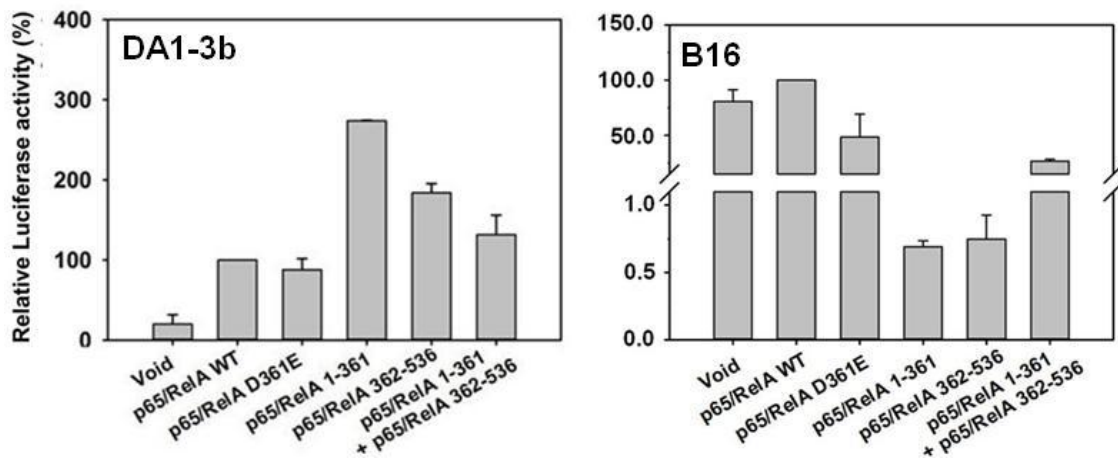


Figure 54 : Mesure de l'activité promotrice de p65/RelA WT ou de l'un de ses mutants p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361, p65/RelA 362-549, p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 dans le modèle leucémique DA1-3b (panel de gauche), et dans le modèle du mélanome B16 (panel de droite). L'ensemble des résultats est normalisé par rapport à celui obtenu lors de la surexpression de p65/RelA WT puis mis en pourcentage. Les barres d'erreurs correspondent aux valeurs SEM.

L'activité promotrice est également augmentée (x 2) en présence du fragment p65/RelA 362-549 mais moindre qu'en présence du premier fragment p65/RelA 1-361 mais restant significatif ($p=0,00223$). Néanmoins, la coexpression des deux fragments augmente bien l'activité promotrice (x 1,5) par rapport à la surexpression de p65/RelA WT mais pas autant que lorsque les fragments sont exprimés séparément. De plus, ce résultat n'est pas significatif ($p=ns$). L'association des fragments semble avoir un effet négatif sur l'activité promotrice. La surexpression de p65/RelA WT dans le modèle de mélanome (Figure 54 panel de droite) entraîne bien une augmentation de l'activité promotrice mais modérée par rapport à la lignée contrôle Void ($p=ns$). Par contre, pour l'ensemble des mutants, l'activité promotrice est diminuée contrairement à ce qu'on observe avec le modèle leucémique (Figure 54). Lorsque le mutant p65/RelA D361E est exprimé, l'activité promotrice est divisée par 2 ($p=ns$). De même pour les deux fragments p65/RelA 1-361 et p65/RelA 362-549 exprimés séparément, l'activité promotrice diminue de façon non significative ($p=0,060$ et ns respectivement). Enfin la coexpression des fragments induit une diminution encore moins forte que lorsque les fragments sont exprimés séparément (inférieur à 50% d'activité relative) ($p= ns$). Ainsi, l'association des deux fragments exerce un effet négatif combiné comme celui observé dans le modèle leucémique. Mais cet effet est plus faible que si chaque fragment est exprimé séparément dans la cellule contrairement à celui observé dans les cellules DA1-3b où l'association des fragments permet une action synergique sur l'activité promotrice.

❖ Bilan de l'activité promotrice

L'activité promotrice est augmentée en présence des fragments de p65/RelA individuellement ou coexprimés en comparaison avec celle en présence de p65/RelA WT dans le modèle leucémique. Au contraire, l'activité promotrice est diminuée en présence des différents mutants de p65/RelA (dont les fragments de p65/RelA exprimés individuellement ou coexprimés) par rapport à celle en présence de p65/RelA WT. Ainsi, l'activité promotrice est modulée différemment selon le modèle cellulaire (Tableau 5).

activité promotrice	leucémie	mélanome
Void	↗↗↗	↘
p65/RelA WT	référence	
p65/RelA D361E	ns	↘
p65/RelA 1-361	↗↗↗	↘↘↘
p65/RelA 362-536	↗↗	↘↘
p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549	↗	↘

Tableau 5 : Bilan de l'activité promotrice de p65/RelA dans les 2 modèles cellulaires.

F) Etude des phosphorylations de p65

La phosphorylation de p65/RelA permet de stabiliser le complexe NFκB et ainsi d'augmenter son activité transcriptomique.



Figure 55 : Différentes phosphorylations de p65/RelA.

Parmi l'ensemble des phosphorylations de p65/RelA possible (Figure 55), nous avons étudié les phosphorylations Ser468 et Ser536 à l'aide du kit d'étude des phosphorylations FACE. La phosphorylation de la Ser536 de p65/RelA chez l'humain correspond à la phosphorylation sur la Ser534 de p65/RelA murin.

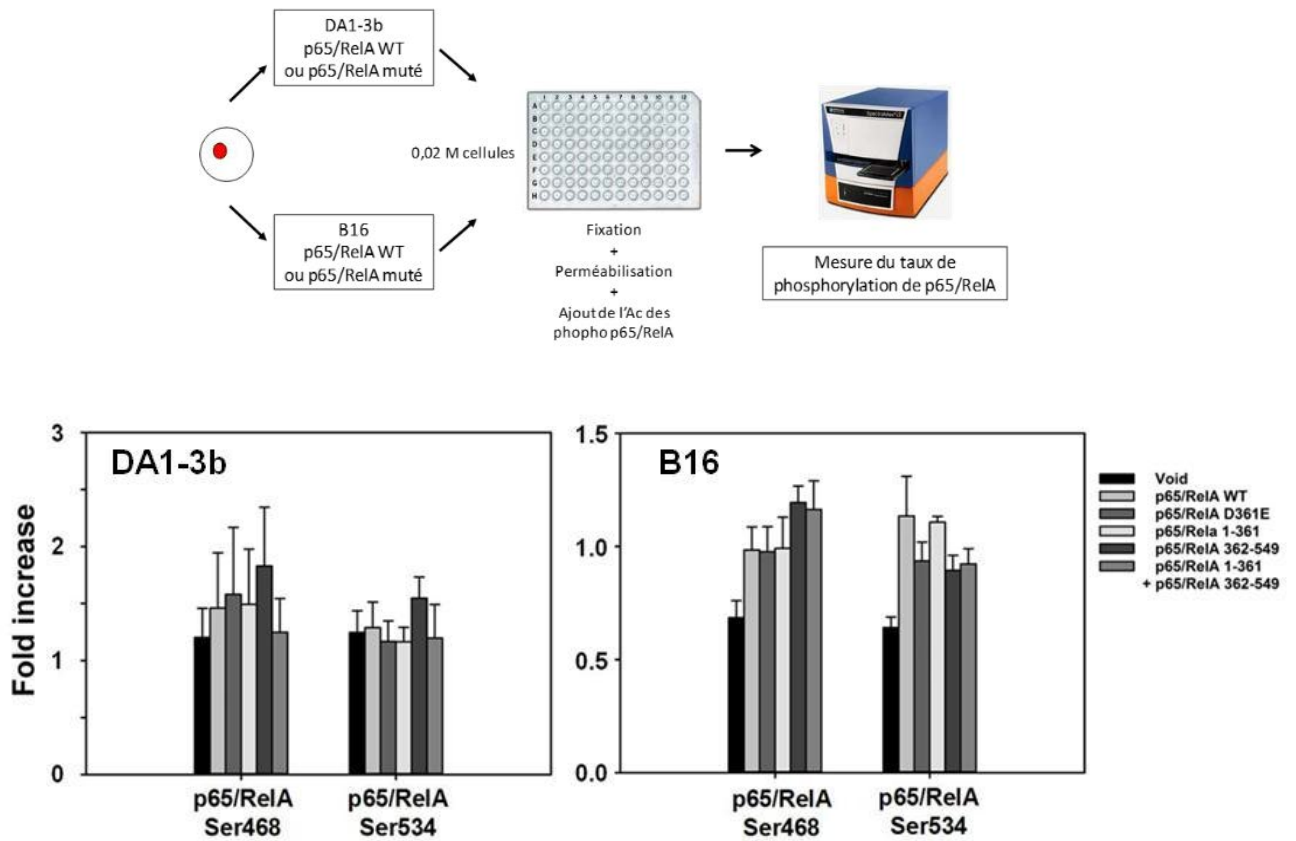


Figure 56 : Etude des phosphorylations de la Ser468 et de la Ser534 de p65/RelA lors de l'expression de p65/RelA WT ou p65/RelA D361E ou p65/RelA 1-361 ou p65/RelA 362-549 ou p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 dans le modèle leucémique DA1-3b (panel de gauche) et dans le modèle de mélanome B16 (panel de droite). Les résultats du taux d'expression des deux phosphorylations de p65/RelA sont normalisés par rapport à celui de la protéine p65/RelA totale non phosphorylée de chaque lignée. Les barres d'erreurs correspondent aux valeurs SEM.

Dans le modèle leucémique, la surexpression de p65/RelA WT augmente légèrement le taux de phosphorylation de la Ser468 par rapport à une expression basale de p65/RelA ($p=ns$) (Figure 56, panel de gauche). Ce taux de phosphorylation est similaire à celui retrouvé lorsque p65/RelA 1-361 est exprimé ($p=0,0170$). Quand p65/RelA D361E est présent, le taux de phosphorylation de la Ser468 augmente un peu par rapport à une surexpression de p65/RelA WT ($p=0,0381$). Le plus fort taux de phosphorylation de la Ser468 est retrouvé en présence du fragment p65/RelA 362-536 ($p=ns$). Par contre, la coexpression des deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 entraîne un taux de phosphorylation de la Ser468 équivalent à celui présent dans la lignée contrôle ($p=ns$).

De même dans le modèle de mélanome, la surexpression de p65/RelA WT entraîne aussi une augmentation du taux de phosphorylation de la sérine 468 par rapport à une expression basale de p65/RelA ($p=ns$) (Figure 56, panel de droite). Cette augmentation est retrouvée dans les lignées exprimant p65/RelA D361E ($p=ns$) et p65/RelA 1-361 ($p=ns$). Le

taux de phosphorylation de la sérine 468 est légèrement encore plus élevé dans les lignées exprimant p65/RelA 362-549 (p=ns) ou p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 (p=ns). L'expression des 2 fragments induit ici une augmentation du taux de phosphorylation de la Ser468 par rapport à l'expression de p65/RelA WT dans le modèle de mélanome contrairement au modèle leucémique où on observe une diminution du taux de phosphorylation de p65/RelA sur sa Ser468. Cependant les différences de phosphorylation ne sont pas suffisamment marquées et significatives.

Dans le modèle leucémique, la surexpression de p65/RelA WT induit une légère augmentation du taux de phosphorylation de la Ser534 par rapport à une expression basale (p=0,000850) (Figure 56, panel de gauche). Par contre, l'expression de p65/RelA D361E (p=ns) et de p65/RelA 1-361 (p=ns) entraîne une diminution du taux de phosphorylation de la Ser534. Au contraire, comme avec la phosphorylation sur la Ser468, le fragment p65/RelA 362-549 présente le plus grand taux de phosphorylation de la Ser534 (p=ns). Quant à la coexpression des deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549, elle induit un taux de phosphorylation intermédiaire : plus élevé qu'en présence de p65/RelA 1-361 mais plus faible qu'en présence de p65/RelA 362-549 ou tout simplement p65/RelA WT (p=ns).

Quant au modèle du mélanome, la surexpression de p65/RelA WT augmente fortement le taux de phosphorylation sur la sérine 534 par rapport au taux obtenu lors de l'expression basale de p65/RelA (p=0,0536) (Figure 56 panel de droite). On retrouve ce niveau d'augmentation avec la lignée exprimant p65/RelA 1-361 (p=ns) contrairement à ce que l'on observe dans le modèle leucémique où le taux de phosphorylation de la Ser534 est plus faible qu'en présence de p65/RelA WT. Le taux de phosphorylation de la Ser534 est légèrement diminué dans la lignée p65 D361E (p=ns) comme dans les lignées exprimant p65/RelA 362-549 (p=ns) ou p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 (p=ns) par rapport à celui en présence de l'expression de p65/RelA WT. Ainsi, dans le modèle de mélanome, la présence du fragment p65/RelA 362-549 induit une diminution du taux de phosphorylation de la Ser534 à l'inverse de l'augmentation du taux de phosphorylation de la Ser534 constatée dans le modèle leucémique. Cette augmentation de phosphorylation est significative entre la lignée ne surexprimant pas p65/RelA vs toutes lignées surexprimant p65/RelA WT ou ses mutants. Par contre, il n'y a pas de différence significative entre les lignées surexprimant p65/RelA ou l'un de ces mutants.

Ces résultats sont non significatifs et indiquent plutôt une absence de différence du taux des phosphorylations Ser468 et 536 entre les différentes lignées. Néanmoins, le taux de

phosphorylation sur la Sérine 468 semble plus élevé dans le modèle leucémique que dans le modèle de mélanome et peuvent être dû à l'activité endogène faible de NF-κB. Par contre, le taux de phosphorylation de la Sérine 534 est équivalent dans les deux modèles.

IV) Etude des effets de l'activité de p65/RelA

Afin de déterminer l'origine de cette tumorigénèse accrue en présence de p65/RelA D361E dans le modèle leucémique ou des 2 fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549, nous avons étudié les effets de l'activité de p65/RelA (résistance aux drogues, modulation de l'expression de gènes...)

A) Etude de la résistance aux drogues

Afin de déterminer un profil de résistance vis à vis de différentes drogues, nous avons utilisé différentes drogues ciblant différentes voies de signalisation (Tableau 6) :

Drogue	Cible
Cytarabine arabinose	Intercalant de l'ADN
5'Azacytidine	Déméthylant
Décitabine	Intercalant de l'ADN/Déméthylant
Imatinib	Inhibiteur de BCR-ABL
Staurosporine	Inhibiteur de Kinase
Ly294002	Inhibiteur de PI3K
Wortmanin	Inhibiteur de la voie PI3K/AKT/mTOR
KU-0063794	Inhibiteur de mTOR
Everolimus	
AG490	Inhibiteur de la voie JAK/STAT
Ruxolitinib	Inhibiteur de JAK
SH-4-54	Inhibiteur de la voie JAK/STAT
Lapatinib	Inhibiteur de EGFR/ErbB2
SC75741	Inhibiteur de NFκB
CHIR-99021	Inhibiteur de GSK3β
Crizotinib	Inhibiteur de c-MET
Palbociclib	Inhibiteur de CDK
Trichostatin A	Inhibiteur de la famille HDAC

Tableau 6 : Liste des drogues utilisées et leur cible

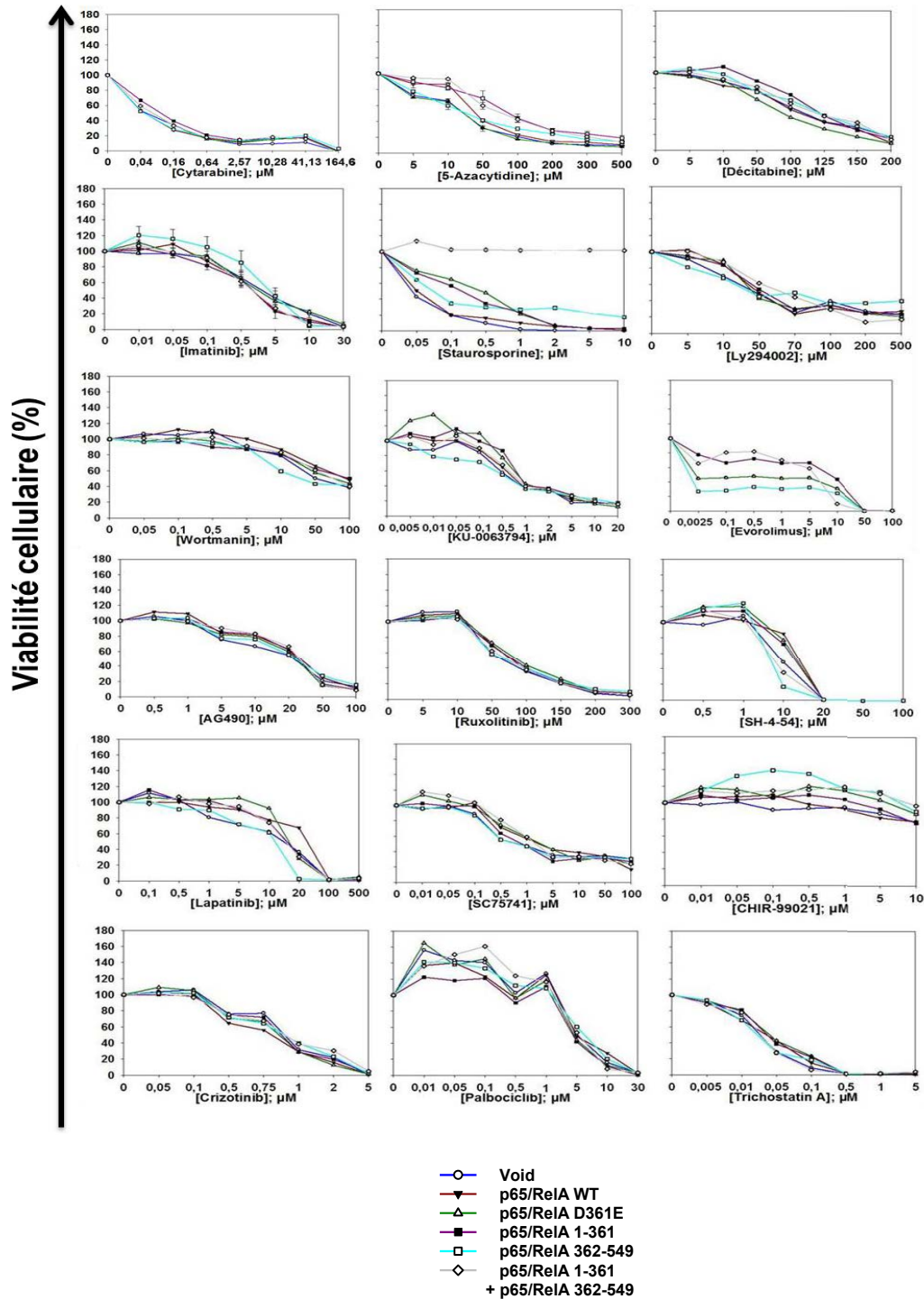
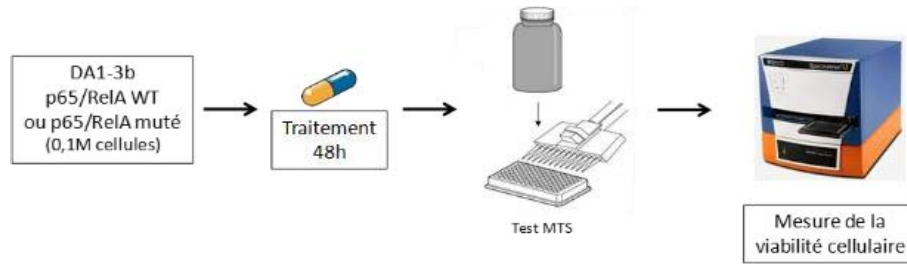


Figure 57 : Etude de la résistance aux drogues : Mesure de la viabilité cellulaire en fonction de différentes concentrations de drogues.

Pour plus de clarté, les graphiques de la viabilité cellulaire en fonction de différentes concentrations de drogues sont représentés sans les barres d'erreurs SEM.

On n'observe aucune différence significative dans les différents profils de résistance en fonction des différentes formes de p65/RelA (WT ou ses mutants) pour l'ensemble des drogues testées sauf lors du traitement à la 5'Azacytidine (Figure 57). En effet, les lignées exprimant p65/RelA WT ou p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 résistent davantage aux différentes concentrations de drogues de la 5'Azacytidine que la lignée exprimant p65/RelA D361E. par contre, lorsqu'on traite avec un autre agent déméthylant : la Décitabine, cette différence de viabilité n'est pas retrouvée. Ainsi, cette sensibilité à la 5'Azacytidine doit être liée à son mécanisme d'action. Suite à ces résultats, nous sommes passés au modèle animal leucémique afin de mesurer la survie de souris traitées vs les non traitées (voir la partie II)B)

B) Modulation de l'expression de gènes

Les résultats précédents n'ont pas permis de mettre en évidence une voie, un mécanisme pouvant expliquer le développement tumoral. Nous avons recherché une différence de modulation de l'expression des gènes en étudiant le transcriptome pour déterminer le rôle des mutants de p65/RelA dans la tumorigénèse.

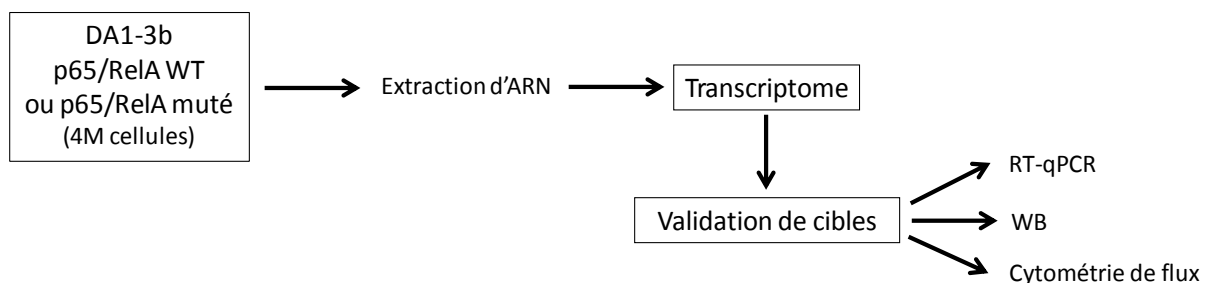


Figure 58 : Design de l'étude de la modulation de l'expression de gènes en présence de la protéine p65/RelA WT, de ses mutants p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361, p65/RelA 362-549, p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549.

1) Transcriptome

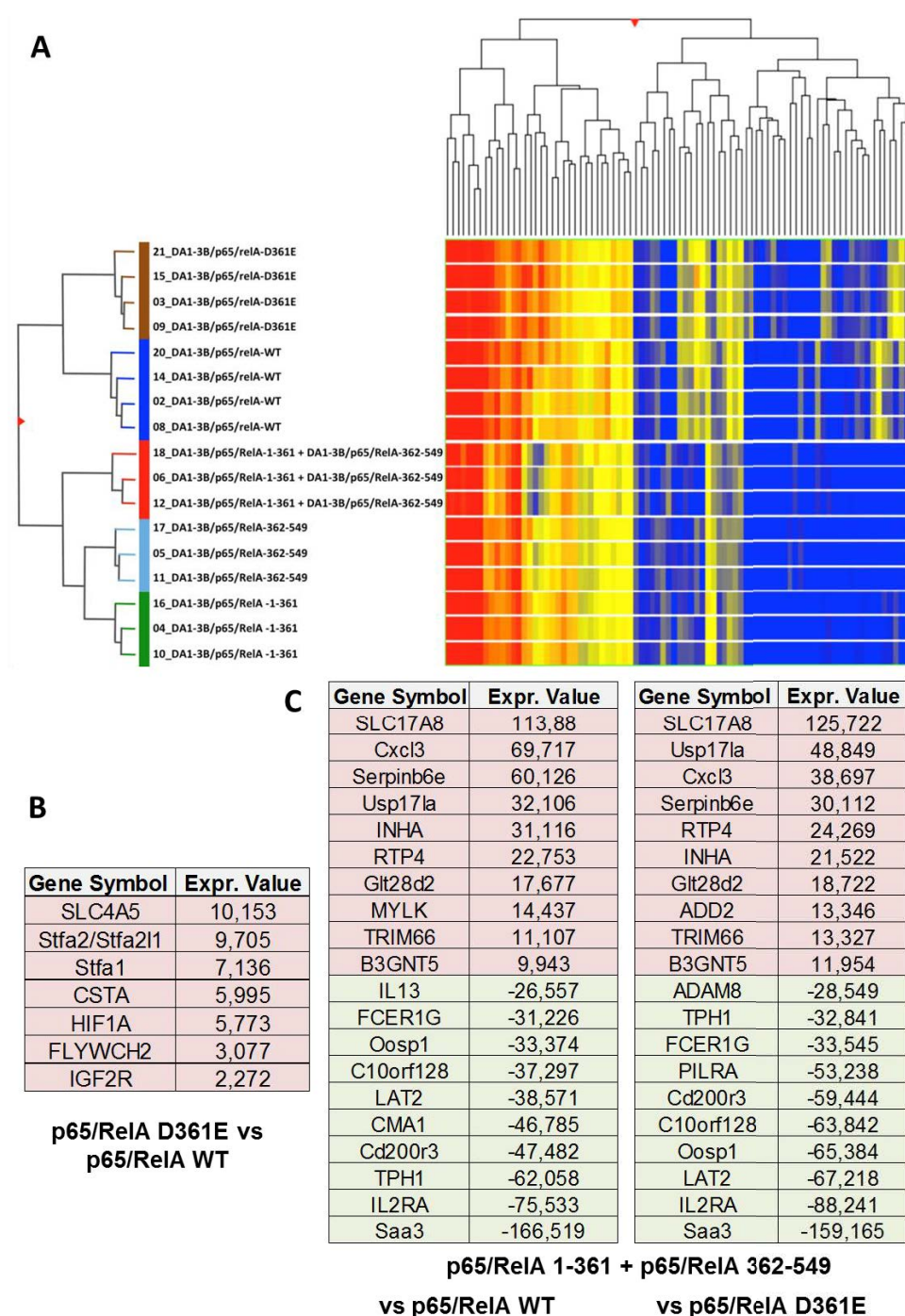


Figure 59 : Etude du transcriptome de l'expression de la protéine p65/RelA WT, de ses mutants p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361, p65/RelA 362-549, p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. (A) Représentation des gènes modulés en présence de p65/RelA WT, ou de p65/RelA D361E ou p65/RelA 1-361 ou p65/RelA 362-549 ou p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. (B) Tableau des 7 gènes les plus surexprimés lors de l'expression de p65/RelA D361E vs p65/RelA WT. (C) (Panel de gauche) Tableau des 10 gènes les plus surexprimés et des 10 gènes les moins surexprimés lors de l'expression de p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 vs p65/RelA WT. (C) (Panel de droite) Tableau des 10 gènes les plus surexprimés et des 10 gènes les moins surexprimés lors de l'expression de p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 vs p65/RelA WT.

Comme la surexpression de p65/RelA WT et de ses mutants p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361, p65/RelA 362-549, p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 ne semblent pas servir de médiateur à la tumorigénicité par l'activité conventionnelle de NF- κ B, nous avons étudié pour d'éventuelles nouvelles fonctions grâce à des analyses de profils transcriptomiques des cellules DA1-3b (Figure 59A). Les données Microarray sont disponibles via le dépôt GEO de NCBI (numéro d'accès GSE98437). Les cellules DA1-3b exprimant le mutant non clivable de p65/RelA D361E surexpriment spécifiquement 7 gènes vs celles exprimant p65/RelA WT (Figure 59B) ou p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 (résultats non montrés). L'expression de p65/RelA D361E induit uniquement la surexpression de 7 gènes surexprimés qui sont un transporteur d'ions bicarbonate/sodium : SLC4A5, et la famille des Stefines Stfa2 / Stfa2L1 et Stfa1 et entraîne aucune sous expression des gènes. L'analyse de l'IPA a révélé l'implication de plusieurs maladies et fonctions biologiques, y compris le cancer ($p=0,000234$), la signalisation du facteur induisant l'hypoxie ($p=0,0163$) et le développement et la fonction du système hématologique ($p=0,0163$). L'analyse transcriptomique des 10 gènes les plus sur ou sous-exprimés dans p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 vs p65/RelA WT (Figure 59C, panel de gauche) et p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 vs p65/RelA D361E (Figure 59C, panel de droite) ont révélé une grande similitude avec 9 gènes surexprimés (SLC17A8, Cxcl3, Serpinb6e, Usp17la, INHA, RTP4, Glt28d2, TRIM66 et B3GNT5) et 8 gènes sous exprimés (Saa3, IL2RA, TPH1, Cd200r3, LAT2, C10orf128, Oosp1 et FCER1G). L'analyse de l'IPA a permis de consolider ces résultats avec des fonctions moléculaires et cellulaires similaires (fonctions et maintenances cellulaires, signalisation, interaction cellule-cellule, mouvement cellulaire, croissance cellulaire, prolifération, développement avec des valeurs p ajustées allant de $1,78 \text{ E-}24$ à $4,67\text{E-}15$ dans les cellules p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 vs p65/RelA WT). Le développement du système physiologique implique le développement et la fonction du système hématologique ($p=9,97\text{E-}21$), le trafic de cellules immunitaires ($p=1,52\text{E-}19$) et l'hématopoïèse ($p=3,08\text{E-}14$). L'analyse de la maladie a révélé une réponse inflammatoire et une maladie immunologique avec une valeur p ajustée autour de $2\text{E-}19$.

2) Validation des cibles

Ainsi, le transcriptome a mis en évidence la modulation de l'expression de différents gènes par p65/RelA D361E ou par p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. Afin de valider les résultats du transcriptome, une RT-qPCR et un western blot sont réalisés. L'ensemble des

gènes modulés par p65/RelA D361E et les gènes les plus fortement modulés par p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 sont étudiés.

a) RT-qPCR

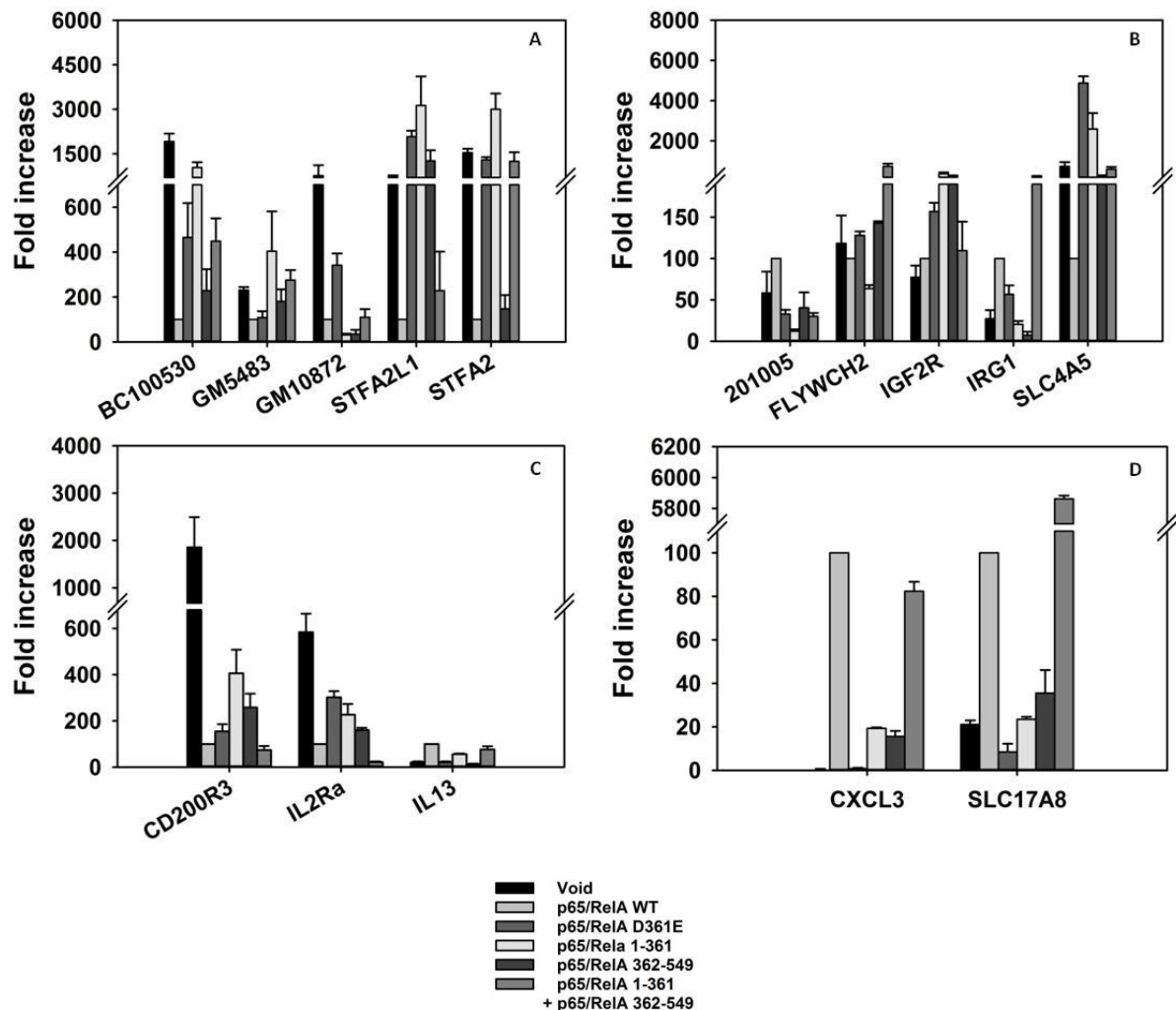


Figure 60 : Validation des cibles du transcriptome par RT-qPCR. (A) Validation de la modulation des gènes de la famille des Stefins surexprimés en présence de p65/RelA D361E (B) Validation des gènes modulés en présence de p65/RelA D361E. (C) Validation des gènes sousexprimés en présence de p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. (D) Validation des gènes surexprimés en présence de p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. L'ensemble des résultats est normalisé par rapport à celui obtenu lors de la surexpression de p65/RelA WT puis mis en pourcentage. Les barres d'erreurs correspondent aux valeurs SEM.

Suite aux résultats du transcriptome, l'expression de l'ensemble des membres de la famille des Stefins est vérifiée. L'expression basale de p65/RelA induit une forte expression de base des différents gènes de la famille des Stefins (à part pour le gène GM5483) alors que la surexpression de p65/RelA WT induit une diminution de l'expression de ces gènes (Figure 60A). L'expression de la protéine mutée p65/RelA D361E augmente fortement l'expression

des différents gènes (à part pour le gène GM5483 où l'augmentation est très faible par rapport à celle induite par p65/RelA WT). L'expression du fragment p65/RelA 1-361 ou du fragment p65/RelA 362-549 induit également une augmentation de l'expression des différents gènes de la famille (sauf pour le gène GM10872 pour lequel l'expression est diminuée) par rapport à la surexpression de p65/RelA WT. L'expression simultanée des fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 augmente l'expression de l'ensemble des gènes en comparaison avec la surexpression de p65/RelA WT. Le taux d'expression des gènes BC100530 et STFA2 est similaire lorsque p65/RelA D361E ou p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 sont exprimés. Par contre, le taux d'expression du gène GM5483 est plus fort en présence des fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 par rapport à la présence de p65/RelA D361E. Ainsi pour ces différents gènes, le résultat de transcriptome ne se confirme pas vu que ces gènes sont surexprimés en présence de p65/RelA D361E par rapport à celle de p65/RelA WT et de p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 d'après le transcriptome contrairement aux résultats de RT-qPCR. Cependant, les résultats de transcriptome sont confirmés pour les gènes GM10872 et STFA2L1. En effet, pour ces deux gènes, l'expression est réduite en présence des 2 fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 ou de la protéine sauvage p65/RelA WT par rapport à la présence de p65/RelA D361E.

Pour le gène 201005, son expression est la plus forte en présence de p65/RelA WT qu'en présence de ses mutants (Figure 60B). L'expression du fragment p65/RelA 362-549 augmente l'expression du gène 201005 contrairement à l'expression du fragment p65/RelA 1-361 qui la diminue. L'expression du gène 201005 est similaire en présence de p65/RelA D361E et des fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. Pour le gène FLYWCH2, son taux d'expression est plus faible lors de la surexpression de p65/RelA WT de même qu'en présence du fragment p65/RelA 1-361 par rapport à l'expression basale de p65/RelA (Figure 60A). Inversement, le taux d'expression du gène est similaire en présence de p65/RelA D361E par rapport à l'expression basale de p65/RelA WT mais légèrement augmenté par rapport à la surexpression de p65/RelA WT. Cette expression est déjà augmentée aussi en présence du fragment p65/RelA 362-549 et davantage avec la coexpression de p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. Le résultat du transcriptome de ce gène n'est donc pas validé. Puisque l'expression du gène est plus forte en présence des 2 fragments que du mutant non clivable contrairement au résultat du transcriptome où l'expression du gène FLYWCH2 est la plus forte en présence de p65/RelA D361E. Le taux d'expression du gène IGF2R est le plus faible lorsque l'expression de p65/RelA est basale (Figure 60B). La surexpression de

p65/RelA WT entraîne une augmentation de l'expression d'IGF2R. Cette augmentation est légèrement plus élevée lorsque les fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 sont coexprimés mais moindre que lorsqu'il s'agit de l'expression d'un seul des deux fragments p65/RelA 1-361 ou p65/RelA 362-549. L'expression de p65/RelA D361E induit également une augmentation de l'expression du gène d'IGF2R plus importante que celle induite par la surexpression de p65/RelA WT ou l'expression simultanée des fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. Ainsi, cette RT-qPCR confirme le résultat du transcriptome pour le gène IGF2R. La surexpression de p65/RelA WT induit une surexpression du gène IRG1 par rapport à celle induite par l'expression basale de p65/RelA WT. Cependant, cette augmentation n'est pas retrouvée lorsque p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361, p65/RelA 362-549 sont exprimés. Au contraire, ils induisent une diminution de plus en plus importante respectivement. Seule l'expression des deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 augmente fortement l'expression (x10) par rapport à la surexpression de p65/RelA WT. Donc ces résultats de RT-qPCR ne permettent pas de valider le résultat du transcriptome.

Enfin, le dernier gène SLC4A5 le plus fortement surexprimé en présence de p65/RelA D361E est vérifié (Figure 62B). La surexpression de p65/RelA WT diminue l'expression du gène SLC4A5 par rapport à l'expression basale de p65/RelA WT. Au contraire, ses mutants ont tendance à augmenter fortement l'expression de SLC4A5. La plus faible augmentation (x10) a lieu en présence du fragment p65/RelA 362-549. Cette augmentation est légèrement plus importante en présence de la coexpression des fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. Cette augmentation est intermédiaire entre les surexpressions induites par chacun des fragments p65/RelA 1-361 ou p65/RelA pris séparément. En effet, le fragment p65/RelA 1-361 induit une surexpression plus importante (x30) par rapport à p65/RelA WT ou au fragment p65/RelA 362-549. Le mutant non clivable p65/RelA D361E est responsable de la plus forte surexpression du gène du transporteur SLC4A5 confirmant le résultat obtenu par le transcriptome.

Par la suite, parmi l'ensemble des gènes modulés par l'expression simultanée des deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549, 5 gènes sont vérifiés par RT-qPCR (Figure 60C et 60D). Parmi eux, 3 gènes (CD200R3, IL2Ra, IL13) sont sousexprimés en présence des deux fragments issus du clivage de p65/RelA et 2 gènes (CXCL3, SLC17A8) sont surexprimés d'après le résultat du transcriptome. Ces gènes font donc l'objet d'une vérification par RT-qPCR.

La surexpression de p65/RelA WT diminue fortement l'expression du gène CD200R3 vs l'expression basale de p65/RelA WT (Figure 60C). Cette diminution est également observée chez l'ensemble des mutants de p65/RelA mais généralement de façon moins marquée. Seule la coexpression des fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 diminue aussi fortement cette expression du gène CD200R3. L'association des fragments semble combiner leurs effets en agissant en synergie permettant une baisse plus importante de l'expression du gène CD200R3 par rapport à celle observée lorsque les fragments sont exprimés séparément. Ainsi, l'expression individuelle des fragments p65/RelA 1-361 ou p65/RelA 362-549 augmente au contraire l'expression de CD200R3 par rapport à celle en présence de p65/RelA WT ou des fragments simultanément. L'expression du mutant non clivable p65/RelA D361E entraîne une diminution moins importante de l'expression du gène CD200R3 par rapport à celle observée en présence de p65/RelA WT ou des fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. De même, on observe une légère augmentation de l'expression du gène CD200R3 par rapport à celle observée en présence de p65/RelA WT ou des deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. Ainsi, ce résultat confirme le résultat obtenu avec le transcriptome où la coexpression des fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 induit la plus forte sous-expression de CD200R3. De même, l'expression du gène IL2Ra est fortement diminuée lors de la surexpression de p65/RelA WT par rapport à la lignée contrôle (Figure 60C). Cette diminution est autant plus importante en présence de la coexpression des deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. Par ailleurs, on retrouve cette même synergie d'action de la coexpression des deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 que si les fragments sont exprimés séparément de façon individuelle pour lesquels la diminution est beaucoup moins importante. En effet, par rapport au taux d'expression en présence de p65/RelA WT ou des deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549, on observe une augmentation d'expression du gène IL2Ra. Cette augmentation est légèrement plus importante en présence du mutant non clivable p65/RelA D361E. Pour ce 2^e gène étudié, le résultat de transcriptome est confirmé. La coexpression des fragments induit bien la plus forte sous-expression du gène IL2Ra. Enfin, le dernier gène sous-exprimé vérifié est celui codant pour IL13 (Figure 60C). Contrairement aux 2 gènes précédents dont le taux d'expression a été vérifié, le taux d'expression pour le gène IL13 est plus fort lorsque p65/RelA WT est surexprimé que lors d'une expression basale. Cette augmentation d'expression est moindre lorsque le fragment p65/RelA 1-361 est exprimé seul ou associé au fragment p65/RelA 362-549. Ainsi, l'ensemble des mutants de p65/RelA diminue l'expression du gène codant pour IL13. La plus forte diminution est retrouvée en

présence de p65/RelA D361E ou lorsque le fragment p65/RelA 362-549 est exprimé seul permettant de retrouver un niveau d'expression équivalent à celui observé en présence de l'expression basale de p65/RelA dans la lignée contrôle. Pour ce gène, le résultat de transcriptome n'est donc pas confirmé. Puisqu'il s'agit ici de p65/RelA D361E qui induit la plus forte sous-expression.

Enfin, deux gènes surexprimés en présence simultanée des deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 d'après le résultat de transcriptome sont vérifiés par RT-qPCR (Figure 60D). Concernant le gène codant pour la protéine CXCL3, la surexpression de p65/RelA WT induit une très forte augmentation d'expression (x100) par rapport au taux d'expression retrouvé dans la lignée basale. Cette augmentation est beaucoup moins importante lorsque les fragments p65/RelA 1-361 ou p65/RelA 362-549 sont exprimés séparément. En effet, l'expression individuelle des fragments induit une diminution d'expression du gène CXCL3 par rapport à celle observée en présence de la surexpression de p65/RelA WT. Cette diminution est beaucoup moins importante lorsque les fragments sont coexprimés et agissent en synergie. L'expression du mutant non clivable p65/RelA D361E entraîne une sous-expression très importante du gène CXCL3 se retrouvant à un niveau d'expression équivalent à celui observé lorsque p65/RelA WT est exprimé de façon basale. Ainsi, le résultat de transcriptome n'est pas confirmé vu que le résultat de RT-qPCR indique une surexpression du gène codant pour CXCL3 plus importante en présence de p65/RelA WT qu'en présence des fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. De même, pour le gène SCL17A8, la surexpression de p65/RelA WT entraîne une forte augmentation (x50) de l'expression du gène (Figure 60D). Cette augmentation est encore plus importante lorsque les deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 sont exprimés. Par contre, les fragments p65/RelA 1-361 ou p65/RelA 362-549 exprimés séparément diminuent l'expression de SCL17A8. Ainsi, la coexpression des fragments semble agir en synergie pour induire une très forte augmentation (x58) du gène SCL17A8 par rapport à celle induite par la surexpression de p65/RelA WT. L'expression de p65/RelA D361E induit la plus forte diminution de l'expression de SCL17A8. Ces résultats de RT-qPCR confirment le résultat de transcriptome obtenu.

L'ensemble de ces résultats de RT-qPCR semble démontrer que la coexpression des fragments permet une synergie d'action importante quand les fragments sont exprimés séparément.

Le mutant non clivable de p65/RelA ou la coexpression des fragments de p65/RelA induisent la tumorigénèse dans le modèle leucémique et le modèle de mélanome respectivement. Nous voulons déterminer le mécanisme induit par p65/RelA D361E ou par la coexpression de p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 favorisant le développement tumoral. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux gènes modulés par le mutant non clivable p65/RelA D361E responsable de la tumorigénèse accrue dans le modèle leucémique. Pour cela, nous avons étudié le niveau d'expression protéique par Western blot et par cytométrie en flux. Dans un deuxième temps, les gènes modulés par la coexpression des deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 responsable du développement tumoral dans le modèle de mélanome pourront être étudiés dans un projet ultérieur.

b) *Western Blot*

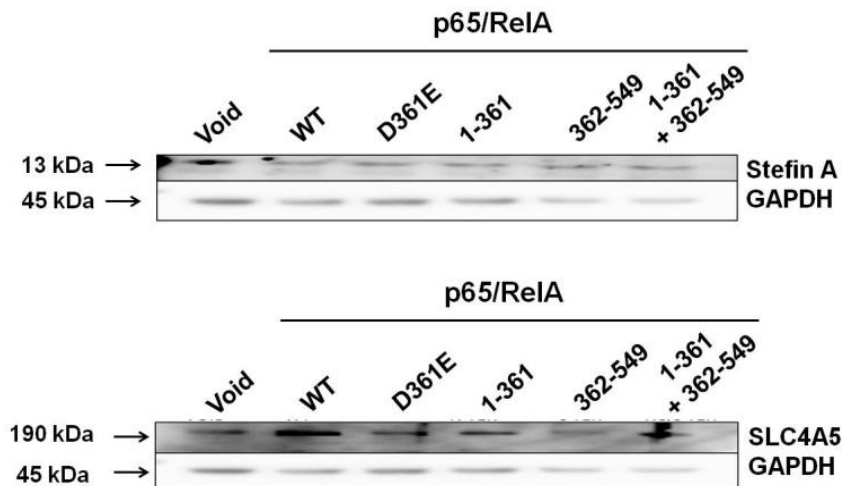


Figure 61 : Etude l'expression protéique de la Stefin A et du transporteur SLC4A5 en présence de p65/RelA WT ou de ses mutants p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361, p65/RelA 362-549, p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 dans le modèle leucémique DA1-3b par Western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre Stefin A ; contre SLC4A5 ; contre GAPDH.

L'expression de la Stefin A, membres de la famille des Cystatines, responsable de l'inhibition de protéases cystéines est étudiée par Western blot (Figure 61, panel du haut). L'expression de la Stefin A semble similaire que ce soit lorsque p65/RelA WT ou que ses mutants p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361, p65/RelA 362-549, p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 sont exprimés. Ainsi, le western blot ne confirme pas que l'expression de p65/RelA D361E augmente plus fortement l'expression de Stefin A. Dans un deuxième temps, l'expression du transporteur SLC4A5 est étudiée (Figure 61, panel du bas). Cette expression est plus importante lorsque p65/RelA WT est surexprimée qu'avec p65/RelA D361E

contredisant les résultats de transcriptome et de RT-qPCR. L'expression de SLC4A5 semble identique lorsque p65/RelA D361E, ou p65/RelA 1-361 ou p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 sont exprimés. L'expression du fragment p65/RelA 362-549 induit une faible expression protéique de SLC4A5.

c) Cytométrie en flux

En cytométrie de flux, seule l'expression de la Stefin A a été étudiée.

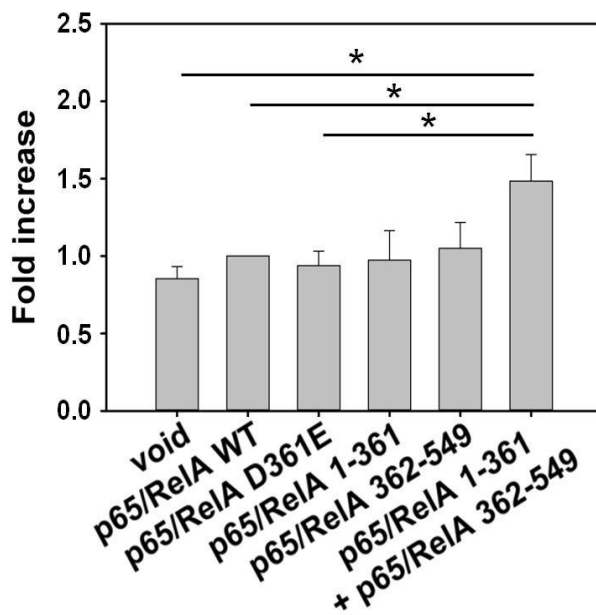


Figure 62 : Etude de l'expression protéique de la Stefin A lors de l'expression de p65/RelA WT, de p65/RelA D361E, de p65/RelA 1-361, p65/RelA 362-549, de p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 dans le modèle leucémique DA1-3b par cytométrie de flux. L'ensemble des résultats est normalisé par rapport à p65/RelA WT. Les barres d'erreurs correspondent aux valeurs SEM.

La surexpression de p65/RelA WT augmente légèrement l'expression de la Stefin A par rapport à celle induite par l'expression basale de p65/RelA WT ($p = ns$) (Figure 62). Au contraire, p65/RelAD361E diminue légèrement l'expression de la protéine Stefin A ramenant le taux d'expression à celui présent dans la lignée contrôle exprimant de façon basale p65/RelA WT ($p = ns$). Lorsque le fragment p65/RelA1-361 ($p = ns$) ou le fragment p65/RelA 362-549 ($p = ns$) sont exprimés, le taux d'expression de la Stefin A est similaire à celui de la surexpression de p65/RelA WT. La coexpression des fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 ($p = 0,018$) augmente davantage l'expression de la Stefin A que lorsque p65/RelA WT est exprimé ou lorsque les fragments p65/RelA 1-361 ou p65/RelA 362-549 sont exprimés séparément indiquant une synergie d'action lors de la coexpression des fragments.

C) Etude du rôle du bicarbonate de sodium

Le transporteur SLC4A5 est surexprimé en présence du mutant non clivable p65/RelA D361E à la fois au niveau du transcriptome et du protéome (voir Figures 60 et 61). Ce transporteur permet l'export du bicarbonate de sodium. Nous avons donc cherché à déterminer le rôle de ce transporteur de bicarbonate de sodium dans le développement tumoral. Nous avons choisi une stratégie dans laquelle on rajoute du bicarbonate de sodium à différentes concentrations dans le milieu cette culture pour déterminer la prolifération et la viabilité.

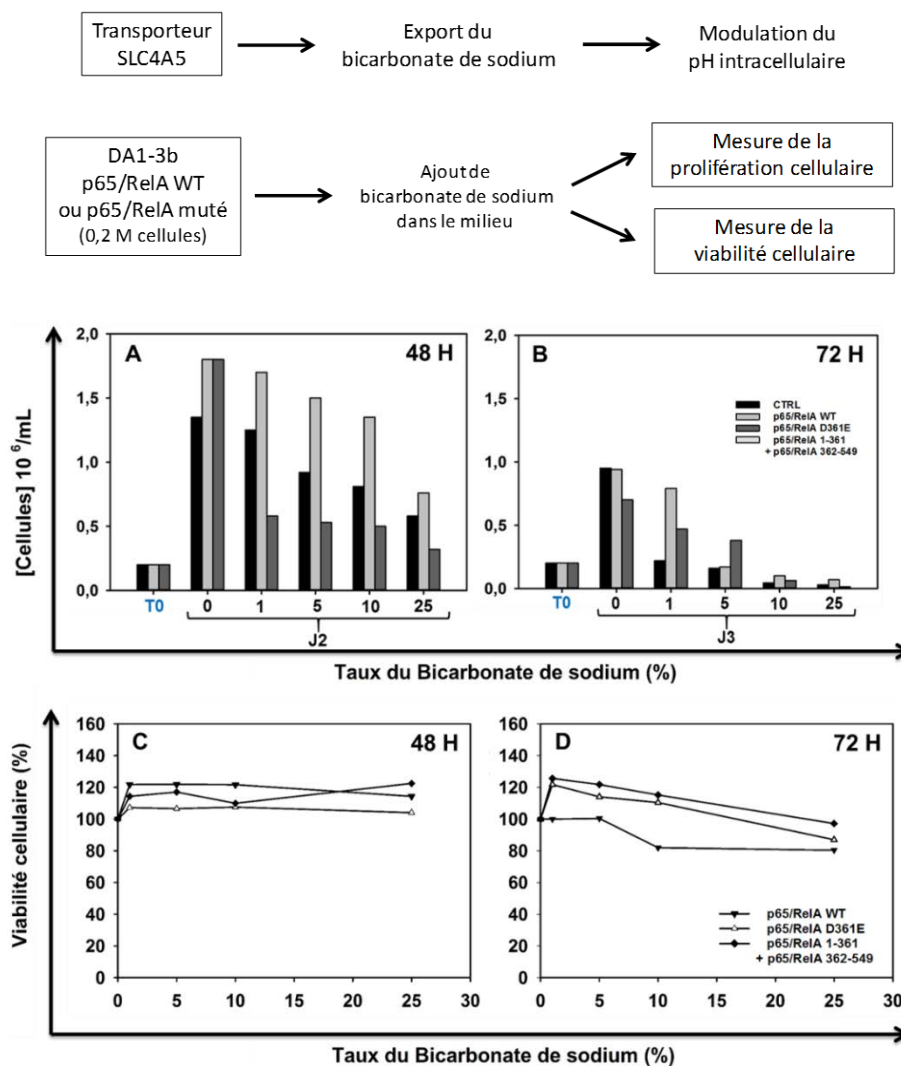


Figure 63 : Etude de l'influence du bicarbonate de sodium sur la prolifération et la viabilité dans les lignées leucémiques exprimant p65/RelA WT, p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 au cours du temps. (A et B) Mesure de la prolifération en fonction du taux de bicarbonate des lignées leucémiques exprimant p65/RelA WT, p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 à 48H (A), à 72H (B) le contrôle indique la concentration de départ d'ensemencement de chaque lignée (C et D) Mesure de la viabilité en fonction du taux de bicarbonate des lignées leucémiques exprimant p65/RelA WT, p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 à 48H (C), à 72H. (D)

A J0, les lignées exprimant les différentes formes de la protéine p65/RelA WT, p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 sont mises à 0,2M/mL.

A 48H, les lignées exprimant p65/RelA D361E ou les fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 prolifèrent davantage que celles exprimant p65/RelA WT en l'absence du taux de bicarbonate de sodium (Figure 63A). On observe une diminution de la croissance des lignées en fonction de la concentration en bicarbonate. La prolifération de la lignée exprimant p65/RelA WT diminue progressivement en fonction de l'augmentation du taux de bicarbonate de sodium dans le milieu (passant d'une concentration cellulaire de 1,35M/mL en l'absence de bicarbonate de sodium ajouté dans le milieu à une concentration cellulaire de 0,580M/mL dans un milieu contenant 25% de bicarbonate de sodium). Inversement, la présence du bicarbonate de sodium de plus en plus importante dans le milieu induit une chute de la prolifération de la lignée exprimant les fragments de p65/RelA.1-361 + p65/RelA 362-549 (passant d'une concentration cellulaire de 1,8M/mL en l'absence de bicarbonate de sodium ajouté dans le milieu à une concentration cellulaire de 0,320M/mL dans un milieu contenant 25% de bicarbonate de sodium). La prolifération de la lignée exprimant p65/RelA D361E est celle qui diminue le moins malgré l'augmentation du taux de bicarbonate de sodium dans le milieu (passant d'une concentration cellulaire de 1,8M/mL en l'absence de bicarbonate de sodium ajouté dans le milieu à une concentration cellulaire de 0,750M/mL dans un milieu contenant 25% de bicarbonate de sodium). La prolifération de la lignée exprimant p65/RelA D361E est la plus importante quelque soit l'augmentation du taux de bicarbonate de sodium. Ainsi, l'augmentation du taux d'expression du transporteur de bicarbonate de sodium en présence de p65/RelA D361E semble protéger les cellules d'une augmentation du taux de bicarbonate dans le milieu permettant aux cellules de continuer à proliférer.

Après 72H d'incubation, la lignée exprimant les deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 prolifère moins rapidement que la lignée surexprimant p65/RelA WT ou celle exprimant p65/RelA D361E en l'absence d'ajout de bicarbonate de sodium dans le milieu (Figure 63B). Lorsque le taux de bicarbonate de sodium est de 1% dans le milieu, les cellules exprimant le mutant non clivable p65/RelA D361E continue de proliférer. Par contre, cette prolifération chute lorsque le taux de bicarbonate de sodium ajouté augmente. La lignée surexprimant p65/RelA WT cesse de proliférer dès l'ajout de bicarbonate de sodium dans le milieu au bout de 72H.

En parallèle, nous avons mesuré la viabilité cellulaire à toutes les concentrations en utilisant de l'iodure de propidium comme marqueur de viabilité en fonction du taux de

bicarbonate de sodium présent dans le milieu. La viabilité ne diminue pas lorsque l'on ajoute du bicarbonate de sodium dans le milieu au bout de 48H (Figure 63C). Ainsi, les cellules exprimant les différentes formes de p65/RelA semblent diminuer leur vitesse de prolifération en entrant en phase G0 au lieu de partir en apoptose. Par contre, au bout de 72H, la viabilité commence à diminuer (Figure 63D). La viabilité de la lignée leucémique exprimant les deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 est celle qui diminue le plus fortement par rapport aux 2 autres lignées. Les 2 autres lignées exprimant p65/RelA WT ou p65/RelA D361E présente une baisse de la viabilité similaire.

❖ *Bilan du rôle du bicarbonate de sodium :*

	↗NaHCO ₃			↗NaHCO ₃	
prolifération	J2	J3	viabilité	J2	J3
p65/RelA WT	↘↘	↘↘↘	p65/RelA WT	stable	↘
p65/RelA D361E	↘	↘↘↘	p65/RelA D361E	stable	↘
p65/RelA N&C Ter	↘↘↘	↘↘	p65/RelA N&C Ter	stable	↘

Tableau 7 : Bilan de l'étude du rôle du bicarbonate de sodium

A 48H, les résultats de viabilité montrent que le bicarbonate entraîne une diminution de la prolifération sans affecter la mortalité. A 72H, la forte diminution du nombre de cellules vivantes et le faible taux de cellules mortes pouvant être expliquer par une cinétique rapide de l'apoptose.

D) Mesure du pH intracellulaire

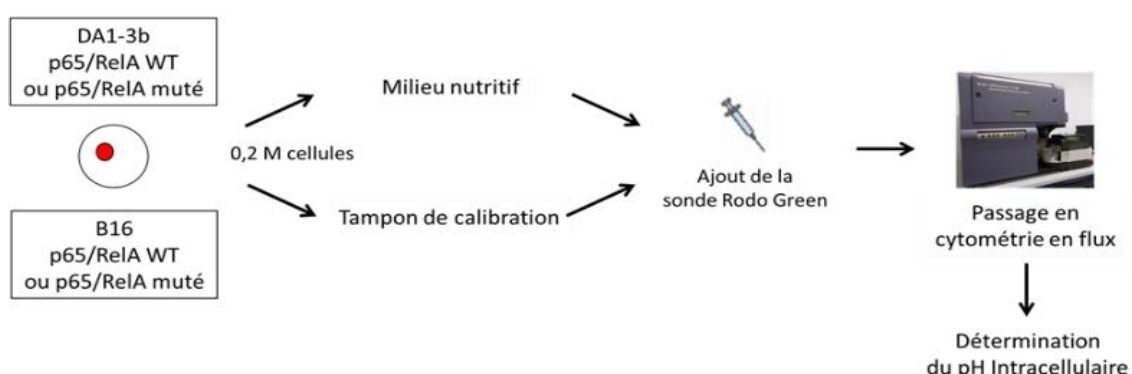


Figure 64 : Design de l'étude du pH intracellulaire en présence de la protéine p65/RelA WT, de ses mutants p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361, p65/RelA 362-549, p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549.

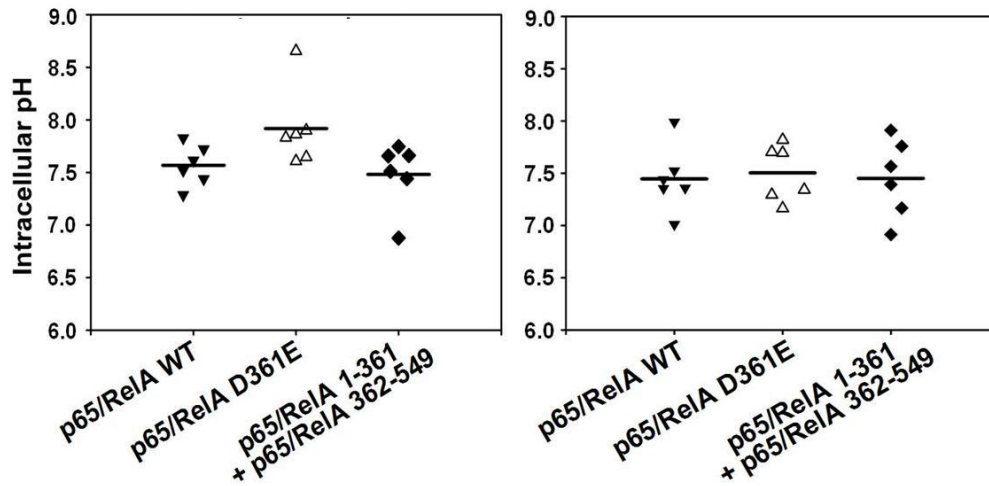


Figure 65 : Etude du pH intracellulaire lors de l'expression de p65/RelA WT ou p65/RelA D361E ou p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 dans le modèle leucémique DAI-3b (panel de gauche) ou dans le modèle du mélanome B16 (panel de droite).

Le transporteur SLC4A5 est surexprimé en présence du mutant non clivable p65/RelA D361E. Ce transporteur permet l'export du bicarbonate de sodium de la cellule participant ainsi à la régulation du pH intracellulaire. Or plusieurs études ont montré le rôle majeur du pH intracellulaire dans le développement tumoral. Nous avons donc mesuré le pH intracellulaire en présence des différentes formes construites de p65/RelA.

Le pH intracellulaire de la lignée leucémique surexprimant p65/RelA WT est de 7,5 (Figure 65 panel de gauche). Il est quasiment équivalent à celui de la lignée leucémique exprimant p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 ($p = ns$). Par contre, le pH de la lignée leucémique exprimant p65/RelA D361E ($p = ns$) est plus basique avec un pH autour de 8.

Contrairement au modèle leucémique, on n'observe pas de différence significative entre les différentes lignées de mélanome exprimant respectivement p65/RelA WT, p65/RelA D361E ($p = ns$), p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 ($p = ns$) (Figure 65 panel de droite). Toutes ces lignées ont un pH autour de 7,5.

E) Caractérisation du caractère "souche" dans différentes lignées construites

Par la suite, on a cherché à étudier les caractéristiques des cellules souches induites par l'expression de p65/RelA WT ou de ses mutants en mesurant soit l'activité Aldéhyde Déshydrogénase dans le modèle leucémique soit la capacité à former des sphères dans le modèle du mélanome.

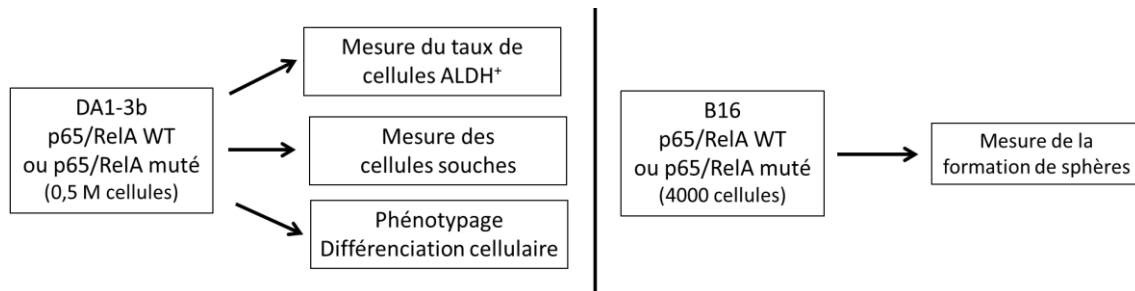


Figure 66 : Design de l'étude des caractéristiques de cellules souches lors de l'expression de p65/RelA WT ou p65/RelA D361E ou p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 dans le modèle leucémique DA1-3b ou le modèle de mélanome.

1) Mesure de l'activité aldéhyde déshydrogénase

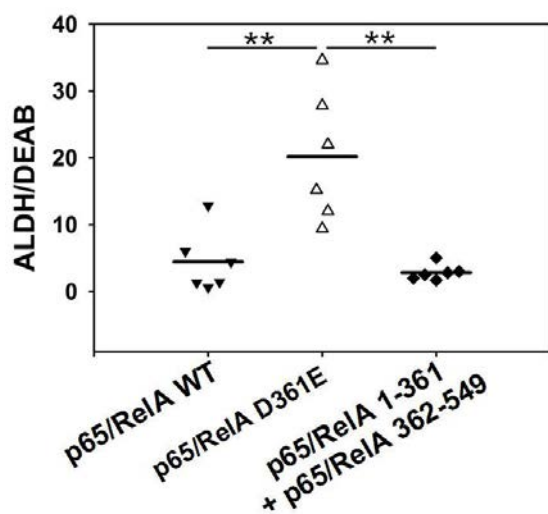


Figure 67 : Etude de la mesure des cellules $ALDH^+$ lors de l'expression de p65/RelA WT ou p65/RelA D361E ou p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 dans le modèle leucémique DA1-3b. Les barres d'erreurs correspondent aux valeurs SEM.

Il est maintenant admis que l'activité $ALDH^+$ des cellules reflète leurs caractéristiques de cellules souches. Le rapport des cellules $ALDH^+$ / des cellules en présence de l'inhibiteur DEAB de l'ALDH est de 5 dans la lignée surexprimant p65/RelA WT (Figure 67). Ce rapport est 4 fois moins important que celui de la lignée exprimant p65/RelA D361E ($p=0,005$). Par contre, le rapport ALDH/DEAB de la lignée exprimant les deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 est quasiment équivalent à celui de la lignée p65/RelA WT ($p=ns$). La lignée p65/RelA D361E présente le plus grand taux de cellules $ALDH^+$. Cette différence de taux avec les deux autres lignées est significative.

❖ Bilan de l'activité $ALDH^+$:

L'activité $ALDH^+$ mesurée pour les différentes lignées est comparée à l'évolution du pH intracellulaire et à la croissance tumorale (Tableau 8). On observe une corrélation entre un taux important de cellules $ALDH^+$ et l'augmentation du pH intracellulaire en présence du mutant non clivable p65/RelA D361E induisant une tumorigénèse accrue.

	croissance tumorale	pH intracellulaire	cellules ALDH ⁺
p65/RelA WT	+	+	+
p65/RelA D361E	+++	+++	+++
p65/RelA N&C Ter	+	+	+

Tableau 8 : Comparaison des résultats obtenus pour la croissance tumorale, du pH intracellulaire, du taux de cellules ALDH⁺

2) Phénotypage des cellules :

D'après la littérature, les cellules ALDH⁺ présentent généralement un caractère de cellules souches. Ainsi, différents marqueurs de cellules souches ou de différenciation ont été étudiés pour confirmer ou non le caractère d'une population de cellules souches au sein de la lignée DA1-3b en présence de p65/RelA WT ou de ses mutants p65/RelA D361E et p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549.

a) Marqueurs des caractéristiques des cellules souches

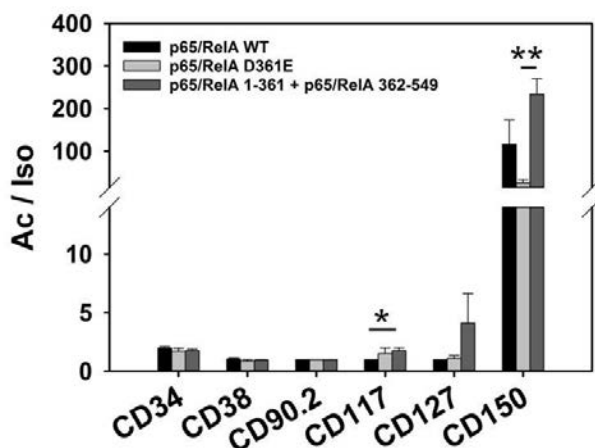


Figure 68 : Mesure des cellules souches lors de l'expression de p65/RelA WT ou p65/RelA D361E ou p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 dans le modèle leucémique. Les barres d'erreurs correspondent aux valeurs SEM.

Sachant que l'ALDH est un marqueur de cellules souches, le taux de cellules souches est mesuré. Différents marqueurs de cellules souches sont utilisés : CD34, CD38, CD90.2, CD117, CD127, CD150 (Figure 68). Pour les marqueurs CD34, CD38, CD90.2, le taux est identique entre les lignées. Le taux de cellules CD117⁺ est augmenté dans les lignées p65/RelA D361E et p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 par rapport à la lignée p65/RelA WT. Ce taux est légèrement plus élevé dans la lignée exprimant les deux fragments par rapport à la lignée exprimant la protéine p65/RelA mutée. Ce taux de cellules CD127⁺ est 4 fois supérieur dans la lignée p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 par rapport aux deux autres lignées p65/RelA WT et p65/RelA D361E. Par contre on n'observe pas de différence significative entre les lignées p65/RelA WT et p65/RelA D361E. Le taux de cellules CD150⁺

est beaucoup plus élevé que les autres taux des marqueurs de cellules souches (de 25 à 200 fois plus important selon la lignée). Le taux de CD150⁺ est de 110 dans la lignée p65/RelA WT. Ce taux est beaucoup plus faible dans la lignée p65/RelA D361E (4 et 9 fois moins important que celui de la lignée p65/RelA WT, et celui de la lignée p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 respectivement). Ces résultats ne permettent pas de conclure en la présence de cellules souches puisque seul le marqueur CD150 semble fortement exprimé par les 3 lignées.

b) Marqueurs de différenciation

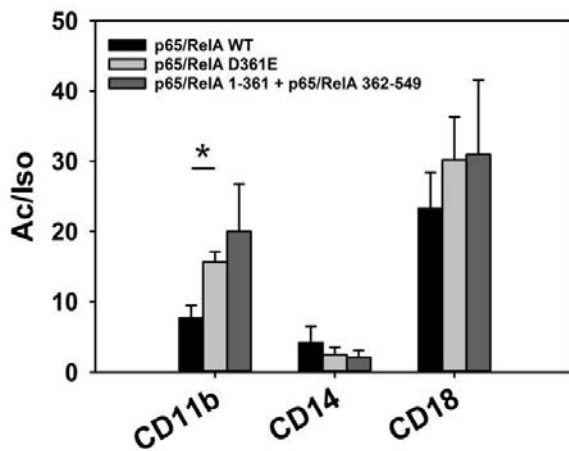


Figure 69 : Mesure des cellules différenciées lors de l'expression de p65/RelA WT ou p65/RelA D361E ou p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 dans le modèle leucémique DA1-3b. Les barres d'erreurs correspondent aux valeurs SEM.

En comparaison avec la lignée surexprimant p65/RelA WT, le rapport de l'expression du marqueur CD11b est deux fois plus élevé en présence de p65/RelA D361E (Figure 69). Ce rapport de l'expression du CD11b est 3 fois plus important dans la lignée exprimant p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 par rapport à la lignée contrôle p65/RelA WT. Pour le marqueur CD14, par rapport à la lignée p65/RelA WT, le rapport (Anticorps/Isotype) est divisé par 2 dans les lignées p65/RelA D361E et p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. Au contraire, le rapport est 1,3 fois plus élevé dans les lignées p65/RelA D361E et la lignée p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 en comparaison avec la lignée p65/RelA WT pour le marqueur CD18. Les cellules ne se différencient pas différemment en fonction de l'expression de p65/RelA WT ou de son mutant p65/RelA D361E ou des deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549.

3) Capacité à former des sphères

La formation de sphères est une caractéristique des cellules de mélanome, un marqueur de la capacité de développement du mélanome. Ainsi, la capacité de la lignée B16 a formé des sphères est étudiée en présence de p65/RelA WT ou p65/RelA D361E ou p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 (Figure 70).

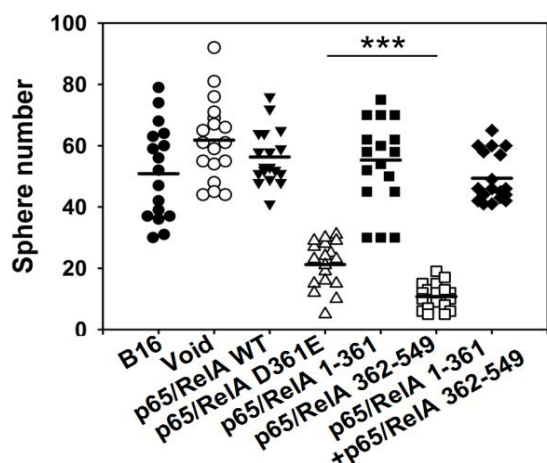


Figure 70 : Mesure de la formation de sphères lors de l'expression de p65/RelA WT ou p65/RelA D361E ou p65/RelA 1-361 ou p65/RelA 362-549 ou p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 dans le modèle de mélanome B16

La surexpression de p65/RelA WT diminue légèrement la capacité des cellules de mélanomes à former des sphères par rapport à une expression basale de p65/RelA dans la lignée contrôle. Les cellules B16 exprimant le fragment p65/RelA 1-361 présentent une capacité à former des sphères similaire à celle retrouvée dans la lignée surexprimant p65/RelA WT. De même, la coexpression des fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 diminue de façon plus marquée la capacité des cellules à former des sphères. La perte de cette capacité à former des sphères est la plus importante en présence de p65/RelA D361E ou du fragment p65/RelA 362-549 formant significativement moins de sphères que les cellules B16 exprimant ou surexprimant p65/RelA WT ou exprimant le fragment p65/RelA 1-361 seul ou co-exprimé avec le fragment p65/RelA 362-549.

❖ Bilan de la capacité à former des sphères par les cellules de mélanome :

La capacité à former des sphères mesurée pour les différentes lignées est comparée à l'évolution du pH intracellulaire et à la croissance tumorale (Figure 73). On observe qu'il n'existe pas de corrélation entre une capacité plus importante à former des sphères taux important de cellules ALDH⁺ et pH intracellulaire stable en présence des 2 fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 361-536 responsable d'une tumorigénèse accrue.

	croissance tumorale	pH intracellulaire	sphères
Void	+		+++
p65/RelA WT	+++	+	+++
p65/RelA D361E	-	+	-
p65/RelA N Ter	+++		+++
p65/RelA C Ter	-		-
p65/RelA N&C Ter	+++	+	+++

Tableau 9 : Comparaison des résultats obtenus pour la croissance tumorale, du pH intracellulaire, de la capacité à former des sphères.

F) Immunoévasion : Etude de l'expression de PDL1

Une récente étude a montré que NF- κ B est capable de moduler l'expression de PDL1 (Lim SO. *et al.*, 2016). Nous nous sommes donc intéressés à cette interaction possible entre ces 2 protéines. Pour cela dans un premier temps, nous avons mesuré l'expression basale de PDL1 puis soumis à différents traitements déméthylant 5'Azacytidine ou inhibiteur du complexe NF- κ B BAY11-7082.

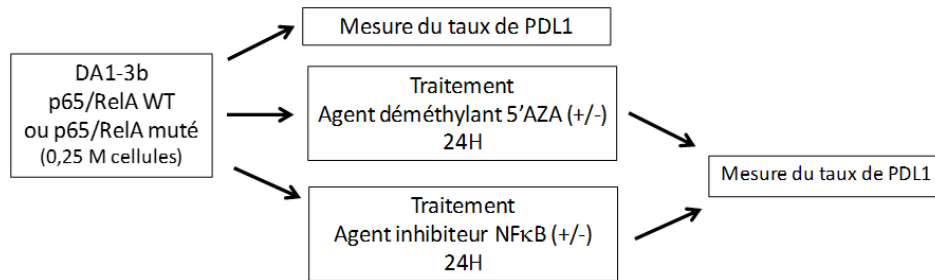


Figure 71 : Design de l'étude de l'expression de PDL1 lors de l'expression de p65/RelA WT ou p65/RelA D361E ou p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 dans le modèle leucémique DA1-3b.

1) Expression basale de PDL1

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'expression basale de PDL1 lors de l'expression de p65/RelA WT ou de p65/RelA D361E ou de p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549.

La surexpression de p65/RelA WT entraîne une augmentation de l'expression basale de PDL1 par rapport à une expression basale de p65/RelA WT (Figure 72). Au contraire, l'expression du mutant non clivable p65/RelA D361E comme celle du fragment p65/RelA 362-549 induit une diminution de l'expression de PDL1 amenant à un taux d'expression similaire qu'en présence d'une expression basale de p65/RelA. A l'inverse, le fragment p65/RelA 1-361 augmente l'expression de PDL1. Cette expression basale est d'autant plus importante lorsque les fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 sont coexprimés.

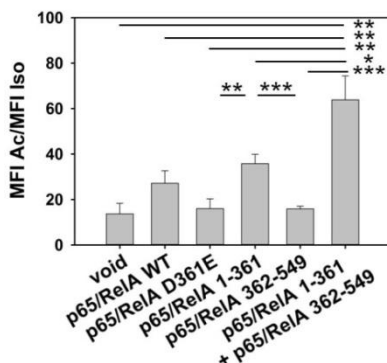


Figure 72 : Etude de l'expression basale de PDL1 dans les cellules leucémiques DA1-3b exprimant p65/RelA WT, p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361, p65/RelA 362-549, p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. Les barres d'erreurs correspondent aux valeurs SEM.

2) Expression de PDL1 en présence de 5'Azacytidine

En raison d'une mortalité plus importante des souris C3H traitées avec l'agent déméthylant 5'Azacytidine vs les souris syngéniques non traitées, nous avons voulu déterminer un éventuel rôle du système immunitaire dans cette tumorigénèse accrue qui n'est pas retrouvée chez les souris "nude". Au contraire, chez les souris "nude", la 5'Azacytidine protège contre le développement tumoral. Pour cela, nous avons traité *in vitro* les cellules avec un agent déméthylant de la 5'Azacytidine similaire à celui reçu par les souris. Puis, nous avons mesuré les variations du taux d'expression de PDL1, une protéine participant à la réponse immunitaire.

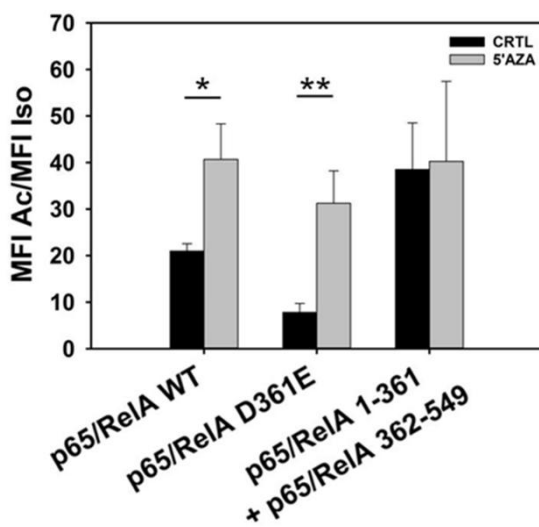


Figure 73 : Etude de l'expression induite de PDL1 suite à un traitement déméthylant de 5'Azacytidine dans les cellules leucémiques DA1-3b exprimant p65/RelA WT, p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361, p65/RelA 362-549, p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. Les barres d'erreurs correspondent aux valeurs SEM.

La coexpression des fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 augmente bien le taux d'expression basale de PDL1 par rapport aux 2 autres lignées (Figure 73). De même, la lignée exprimant le mutant non clivable p65/RelA présente le plus faible taux d'expression basale de PDL1. Lorsque les cellules sont traitées avec l'agent déméthylant 5'Azacytidine, on observe que l'expression de PDL1 est augmentée dans chaque lignée. Cette augmentation est très faible pour les cellules exprimant les 2 fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 étant donné que le niveau d'expression basale est déjà très élevé. Inversement, dans la lignée exprimant le mutant non clivable p65/RelA D361E, l'augmentation de l'expression de PDL1 est la plus importante (x3). Quant à la lignée surexprimant p65RelA, on observe également une augmentation de l'expression de PDL1 mais moins marquée (x2). Ainsi, le système immunitaire via l'action de la protéine PDL1 semble jouer un rôle dans la tumorigénèse accrue.

3) Expression de PDL1 en présence d'un agent inhibiteur de NF-κB

Cette récente étude a montré que NF-κB régule l'expression de PDL1 en utilisant un inhibiteur de NF-κB : BAY11-7082. Nous avons donc testé cet inhibiteur sur nos lignées afin d'étudier l'impact sur l'expression de PDL1 modulée par NF-κB (Figure 74).

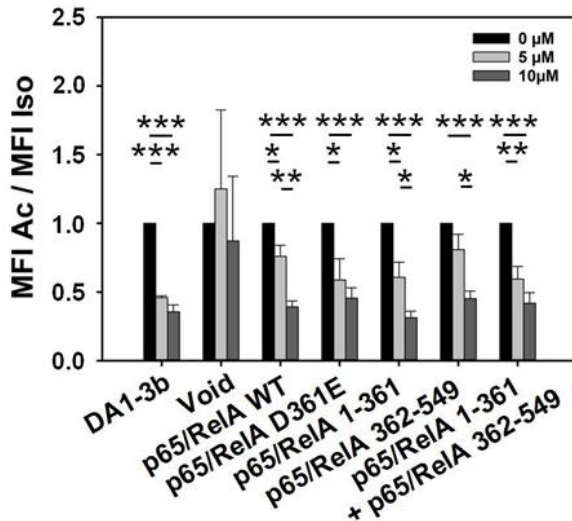


Figure 74 : Etude de l'expression induite de PDL1 suite à un traitement d'un agent inhibiteur de NF-κB : BAY11-7082 dans les cellules leucémiques DA1-3b exprimant p65/RelA WT, p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361, p65/RelA 362-549, p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. L'ensemble des résultats est normalisé par rapport à celui obtenu en l'absence de traitement BAY11-7082. Les barres d'erreurs correspondent aux valeurs SEM.

Le fait de transfecter les cellules leucémiques avec le plasmide induit un changement important dans l'expression de PDL1. En fait, la lignée contrôle exprimant le plasmide exprime davantage PDL1 malgré l'utilisation d'un inhibiteur de NF-κB que les autres lignées exprimant les différentes formes de PDL1. Cependant vu la taille des écarts-types, ce résultat est non significatif (p=ns) et ne permet pas de conclure sur l'impact de l'incorporation du plasmide dans les cellules sur l'expression de PDL1.

Le traitement des cellules avec différentes concentrations de BAY induit une diminution de l'expression de PDL1 plus ou moins importante selon la présence des différentes formes de p65/RelA (Figure 74).

Les cellules sont traitées avec 5 μM de BAY. La surexpression de p65/RelA WT induit la plus faible diminution de l'expression de PDL1 comme lorsque le fragment p65/RelA 362-549 (p=ns) est exprimé. Inversement, en présence de p65/RelA D361E (p=ns) ou du fragment p65/RelA 1-361 (p=ns) seul ou associé au 2^e fragment : p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 (p=ns), l'expression de PDL1 est plus fortement diminuée.

Lorsque les cellules sont traitées avec 10 μM de BAY, cette baisse d'expression de PDL1 est plus importante. Cette diminution d'expression est moins importante lorsque p65/RelA D361E (p=ns) est exprimé qu'avec p65/RelA WT. De même, la présence du

fragment p65/RelA 362-549 (p=ns) dans les cellules leucémiques induit aussi une diminution moins importante de l'expression de PDL1, équivalente à celle lorsque le mutant non clivable est exprimé. Ainsi, l'expression de p65/RelA 362-549 permet une baisse limitée de l'expression de PDL1 malgré l'ajout d'un inhibiteur de NF-κB. La coexpression des fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 (p=ns) limite aussi la baisse de l'expression de PDL1 malgré le traitement. La baisse de l'expression de PDL1 est la plus forte lorsque le fragment p65/RelA 1-361 (p= ns) est présent.

❖ *Bilan de l'expression de PDL1*

PDL1	Basale	5'AZA	BAY11-7082
Void	↘		
p65/RelA WT	↗	↗↗	↘
p65/RelA D361E	↘	↗↗↗	↘↘
p65/RelA N Ter	↗↗		↘↘
p65/RelA C Ter	↘		↘
p65/RelA N&C Ter	↗↗↗	↗	↘↘

Tableau 10 : Comparaison des résultats obtenus pour l'expression de PDL1 dans différentes conditions.

L'expression basale de PDL1 est la plus forte en présence des deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 (Tableau10). Mais l'utilisation d'un agent déméthylant induit la plus forte augmentation de l'expression de PDL1 en présence de p65/RelA D361E. Au contraire l'utilisation d'un inhibiteur du complexe NFκB BAY11-7082 induit une diminution de l'expression de PDL1 en présence de p65/RelA WT ou p65/RelA D361E ou p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. Ainsi, le complexe NFκB composé de p65/RelA semble moduler l'expression de PDL1.

A noter que l'ensemble de ces résultats sont soumis à publication.

“p65/RelA Nf-kB fragments generated by RIPK3 activity regulate tumorigenicity, PD-L1 expression, and stemness characteristics”

Céline Latreche-Carton^{1,2}, PhD, Yasmine Touil^{1,2}, PhD, Hassiba El Bouazzati², Xavier Thuru^{1,2}, PhD, Julie Berthe^{1,2}, Pascaline Segard, Bernadette Masselot, Nathalie Jouy^{1,2}, Frederic Lepretre³, PhD, Martin Figeac³, PhD, Thierry Idziorek^{1,2*}, PhD. and Bruno Quesnel^{1,2,4*}, MD PhD

DISCUSSION

Il y a 30 ans, en 1986, Sen et Baltimore ont décrit un facteur de transcription rapidement induit dans les lymphocytes B qu'ils ont appelé « Nuclear Factor binding near the κ light-chain gene in B cells », plus communément connu sous le nom de NF- κ B (Sen et Baltimore, 1986). Dans ces cellules, NF- κ B est normalement au repos et est activé par des stimuli spécifiques et/ou la différenciation. Depuis, les nombreuses études effectuées ont montré qu'il avait un rôle beaucoup plus large et que les mutations des molécules des voies de signalisation impliquées dans son activité avaient des effets profonds sur plusieurs pathologies génétiques humaines (Zhang Q. *et al.*, 2017).

Bcr-Abl, la protéine de fusion issue de la translocation t(9:22) a été séquencée en 1980 par le groupe de Richard Van Etten. Dix ans après la découverte de NF- κ B, une équipe de notre bâtiment (Hamdane *et al.*, 1997) a montré que p65/RelA, un des composants du complexe, était activé par Bcr-Abl, une étude confirmée peu de temps après par d'autres équipes (Reuther *et al.*, 1998 ; Guzman *et al.*, 2001). On sait aujourd'hui que Bcr-Abl active également d'autres voies de signalisation comme AKT/mTOR et Ras/Raf/Erk (Kaufmann SH., 2006).

En traitant par un agent déméthylant les cellules du modèle murin transfecté de façon stable par Bcr-Abl humain, on s'est aperçu que le gène de la protéine receptor-interacting protein kinase 3 (RIP3) était méthylé. Les études ultérieures effectuées sur les blastes des patients souffrant de leucémie myéloïde montrent également que RIP3 est significativement sous-exprimée (Nugues AL. *et al.*, 2014). RIP3 est identifié comme intervenant dans la régulation de la mort cellulaire apoptotique ou nécroptotique mais également dans la survie cellulaire. RIP3 possède un domaine RHIM et un domaine kinase (Li J. *et al.*, 2012). Lorsque RIP3 est délété du domaine kinase (RIP3-KD), elle induit la mort apoptotique (Nugues AL. *et al.*, 2014). RIP3 est également impliqué dans la régulation amont de la voie NF- κ B. Nous avons récemment montré que l'expression de RIP3-KD induit un clivage spécifique au niveau de l'acide aspartique D361 de la protéine NF- κ B p65 effectué en partie par la caspase-6 aboutissant à la formation de deux fragments 1-361 et 362-545 d'environ 25kDa et 40kDa respectivement (Nugues AL. *et al.*, 2014).

Pour comprendre le rôle de ces fragments et du mutant non clivable, nous avons utilisé le modèle murin décrit par Nugues *et al.* (2014) dans lequel nous avons fait toutes nos transfections de plasmides coexprimant les gènes d'intérêt et la protéine fluorescente DsRed. Ce choix a été pris car la lignée contient la cassette d'expression conditionnelle de RIP3 et la

GFP en réponse à l'adjonction d'IPTG. Nous savons que l'expression de la GFP entraîne un retard dans la tumorigénèse comparée à l'injection de la lignée parentale d'environ une semaine, vraisemblablement due à l'immunogénicité de la GFP. La protéine DsRed est également immunogène (Matsuoka H. *et al.*, 2012). Elle peut donc activer davantage le système immunitaire influençant le comportement cellulaire dans le développement tumoral. Mais son effet sur la tumorigénèse dans notre modèle n'a pas été encore apprécié. Cependant, entre chaque lignée, le taux d'expression de la DsRed est donc similaire sauf pour la lignée exprimant les deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 simultanément qui exprime faiblement la protéine DsRed. L'utilisation d'une séquence IRES dans le plasmide peut être responsable du faible taux d'expression de la protéine DsRed. La solution idéale serait de transfecter toutes nos constructions dans la lignée parentale DA1-3B hBcr-Abl⁺ RIP^{met}. Il pourrait toutefois être judicieux d'utiliser cette lignée et d'exprimer RIP3 pour déterminer les effets de la surexpression des fragments sur la mort cellulaire.

Nous avons utilisé la 5'AZA pour traiter les souris. Chez les patients, la molécule est efficace et plutôt bien tolérée, bien que d'un emploi contraignant à cause de sa demi-vie courte à température ambiante (elle est de 8 heures sur glace). En dehors de leurs effets sur les cellules ciblées, elles ont également des effets plutôt favorables sur le système immunitaire, induisant de potentiels antigènes tumoraux et une réponse cytotoxique CD8⁺ (Craddock C. *et al.*, 2016 ; Li H. *et al.*, 2014 ; Gang AO. *et al.*, 2014), améliorant le répertoire des cellules T dans les syndromes myélodysplasiques, et les LAM (Fozza C. *et al.*, 2015). Elle peut néanmoins diminuer la population NK dans une faible proportion (Gang *et al.*, 2014). Dans le modèle murin, le 5'AZA entraîne une thymopoièse anormale avec une réduction forte des thymocytes immatures (doubles négatifs) et des doubles positifs qui peut être annulée par des antagonistes du récepteur de l'interleukine-1 (Yu H. *et al.*, 2016). L'activité de la 5'AZA n'est pas connue dans notre modèle murin C3H/He OUI femelle et son rôle sur l'accélération de la tumorigénicité pour certains transfectants pourrait être relié à un effet néfaste sur des populations immunitaires qu'il reste à caractériser. En effet, les souris "nude" immunodéficientes traitées à la 5'AZA pendant 5 jours voient leur survie prolongée par rapport aux souris contrôles. Il serait donc intéressant de déterminer l'impact de la 5'AZA sur le système immunitaire pour déterminer les gènes modulés par la 5'AZA. Ces gènes codant pour des protéines qui peuvent être des nouveaux partenaires de p65/RelA, la sous unité du complexe NF- κ B. Par ailleurs, Moschoi R. *et al.* A montré que les cellules leucémiques bénéficiaient d'une action protectrice du transfert de mitochondries des cellules stromales

situées dans son microenvironnement lors d'une chimiothérapie avec la Cytarabine. Nous pouvons donc se demander si la présence de la 5'AZA peut induire le même mécanisme la coopération entre le microenvironnement et les cellules leucémiques induisant une survie plus faible des souris leucémiques traitées avec la 5'AZA.

Un des mécanismes pouvant protéger les cellules tumorales du système immunitaire (Saudemont A. *et al.*, 2004 ; Saudemont A. *et al.*, 2005) est l'expression de PDL1, qui est également connu pour être une cible de l'activité de transcription de NF- κ B selon le contexte (Chen J. *et al.*, 2016 ; Gowrishankar K. *et al.*, 2015 ; Peng J. *et al.*, 2015 ; Verecque R. *et al.*, 2004). Les résultats du transcriptome ne mettent pas en évidence de différence d'expression entre les différentes constructions. Nous avons néanmoins regardé l'expression de la protéine par cytométrie en flux et montré que les fragments de p65/RelA augmentent l'expression de PDL1, vraisemblablement par un mécanisme post-traductionnel, comme l'ont montré Lim SO. *et al.* pour la protéine CSN5 induite par NF- κ B (Lim SO. *et al.*, 2016). Nous n'avons pas retrouvé d'expression différentielle de ce gène dans l'analyse des transcriptomes, indiquant vraisemblablement que d'autres mécanismes entrent en jeu. L'expression de PDL1 résulte d'une cascade d'activations du système immunitaire via les voies canoniques et non canoniques. Dans notre modèle d'étude, une des conséquences de l'expression accrue de PDL1 est que le clivage de p65/RelA pourrait jouer un rôle dans l'immunoéchappement des cellules tumorales. Cependant, les résultats des expériences animales ne vont pas dans ce sens car l'expression de PDL1 n'est pas corrélée à la survie des souris, d'une part, et que nous n'observons pas de différence non plus entre les souris "nude" et les souris immunocompétentes, d'autre part. Par ailleurs, les cellules exprimant p65/RelA D361E sont celles qui sont les plus tumorigènes et qui expriment le moins PDL1. En définitive, si le clivage de p65/RelA joue un rôle dans l'immunoéchappement via PDL1, l'expression de PDL1 n'explique pas la tumorigénicité dans nos modèles.

Kirchner D. *et al.* a montré une activation de NF- κ B dans des prélèvements de blastes de patients de leucémie myéloïde chronique (Kirchner D. *et al.*, 2003). En utilisant le modèle murin de cellules BaF3 dépendant de l'interleukine-3, ces auteurs ont montré que cette activation ne dépendait pas d'IKK, mais plutôt de l'activation de Ras. Notre modèle cellulaire est différent puisque la transfection stable de Bcr-Abl humain dans la lignée murine supprime la dépendance à l'interleukine-3. Nous n'avons cependant pas étudié les effets des différentes constructions sur la voie Ras, ni d'ailleurs sur les voies AKT/mTOR. Il serait toutefois

possible d'effectuer des expériences similaires avec nos constructions en employant la lignée murine parentale DA1 qui dépend de l'interleukine-3 et qui utilise la voie Ras/Raf (Joha S. *et al.*, 2012).

La voie NF- κ B est activée chez les patients souffrant d'une leucémie myéloïde aigue (LAM). Elle résulte d'une augmentation de l'activité IKK et est observée à la fois dans les blastes de la moelle comme ceux du sang périphérique (Baumgartner B. *et al.*, 2002). Cette activation serait plus prononcée dans les sous-types M4/M5 (blastes myélomonocytiques/monocytiques) que dans les sous-types M1/M2.

Les altérations génétiques de NF- κ B sont très peu rencontrées dans les LAM, ce qui suggère un mécanisme d'activation de NF- κ B différent des autres maladies lymphoïdes (Imbert V. et Peyron JF., 2017). L'activation de NF- κ B est donc la conséquence directe de translocations/mutations observées dans les différents sous-types de LAM. On peut citer en dehors de Bcr-Abl, la mutation de FLT3 qui active IKK, C/EBP α qui active le promoteur du gène p50 de NF- κ B, la translocation t(8 ;21) qui produit la protéine AML1-ETO, incapable d'inhiber le complexe IKK/NF- κ B, contrairement à la protéine AML1 sauvage.

Les progrès de la génétique ont montré ces dernières années que certaines pathologies affectaient de nombreux éléments de la voie de signalisation NF- κ B. Les principales observations ont trait à l'immunodéficience, l'inflammation, la létalité embryonnaire et la cancérisation notamment dans le système immunitaire ou la peau. Les mutations de certains éléments n'ont pas encore de fonctions connues (Zhang Q. *et al.*, 2017). Parmi ces différents composants, les mutations ou inhibitions de fonction de certains ont des effets différents selon l'espèce, humaine ou murine. Par exemple, les mutations gain de fonction de I κ B α ont des effets dominant négatif chez l'homme. Chez la souris, mimer la pathologie induit une perte des ganglions, des plaques de Peyer, de la zone marginale de la rate, des centres germinatifs. La résultante est une diminution significative de la réponse immune au TLR, TNF, LT β R et BAFF, suggérant que les voies classiques et alternatives de NF- κ B sont touchées. Deux autres exemples concernant l'invalidation de la caspase-8 et de RelB chez la souris montrent que pour la première, elle est létale chez l'embryon car elle n'est pas compensée par la caspase-10 qui n'existe que chez l'homme (Su HC. et Lenardo MJ., 2008). En ce qui concerne la seconde, l'absence de RelB entraîne de graves manques dans l'homéostasie des cellules T et B, mais qu'une inflammation et quelques anomalies dans l'hématopoïèse chez la souris

(Gerondakis S. *et al.*, 2006 ; Sun L. *et al.*, 2012). En raison de ces différences, on peut raisonnablement penser que les protéines qui interviennent dans l'activation de NF- κ B ont évolué en fonction de la biologie propre à chaque espèce dans leur niche écologique respective. En clair, il y a encore des zones d'ombres à découvrir dans les mécanismes d'activation de NF- κ B.

Un bon exemple est RIP3. Le gène est méthylé dans le modèle phare du laboratoire et l'expression fortement réprimée dans les blastes CD34⁺ des patients leucémiques. Si nous avons testé l'effet des mutants de RIP3 sur la mort cellulaire d'autres lignées ou cellules murines comme les WEHI-3b et le MEF (Nugues AL. *et al.*, 2014), nous n'avons pas vérifié dans ces modèles l'expression de RIP3, ni d'ailleurs dans le modèle parental DA1 dans lequel Bcr-Abl n'a pas encore été transfecté, laissant le rôle de Bcr-Abl sur la méthylation de RIP3 en suspens, à la fois chez la souris et l'homme. L'absence de RIP3 offre un avantage sur la viabilité cellulaire et l'activation de NF- κ B. Des expériences avec des fibroblastes et des macrophages RIP^{-/-} ont montré que l'activité NF- κ B n'est pas affectée dans des conditions physiologiques (Newton K. *et al.*, 2004). Il est donc nécessaire d'explorer ses effets dans des modèles dans lequel l'activité de NF- κ B est augmentée. Par ailleurs, la caspase-8 augmente l'activité transcriptionnelle de NF- κ B dans les cellules 293T en clivant RIP3 et inhibant son activité kinase (Feng S. *et al.*, 2007). On se retrouve donc dans une situation similaire à celle que nous avons provoquée en inactivant la kinase de RIP3 (Nugues AL. *et al.*, 2014). Cette augmentation d'activité de liaison de NF- κ B est restreinte au complexe p65/RelA et ne touche pas p50, p52, RelB et cRel (Feng S. *et al.*, 2007). Un des mécanismes possible est le clivage de p65/RelA par des caspases (Neuzil J. *et al.*, 2001 ; Neznanov N. *et al.*, 2001 ; Kang KH. *et al.*, 2001 ; Coiras M. *et al.*, 2008 ; Levkau B. *et al.*, 1999). Selon le site de clivage, l'impact sur le rôle fonctionnel de p65/RelA est différent. L'activité peut être renforcée ou au contraire inhibée. Par exemple, l'abrogation de l'activité transcriptionnelle via le clivage de p65/RelA dans son domaine de transactivation par la caspase 3 diminue l'effet anti apoptotique induit par NF- κ B. Inversement, l'utilisation d'un mutant non clivable de p65/RelA par les caspases augmente l'activité de NF- κ B inhibant l'apoptose malgré une stimulation TRAIL. Le fragment issu du clivage a un effet dominant négatif inhibiteur de NF- κ B en agissant comme un mécanisme de rétrocontrôle pro-apoptotique avec l'inactivation de NF- κ B et l'activation des caspases favorisant ainsi l'apoptose (Kim HS. *et al.*, 2005 ; Levkau B. *et al.*, 1999). Ainsi, le clivage de p65/RelA par les caspases permet de réguler l'activité du complexe NF- κ B. Le

laboratoire a découvert un nouveau site de clivage par la caspase 6 en position D361 dans le site de coupure INFD (Nugues AL. *et al.*, 2014). Le mutant p65/D361E est résistant au clivage et protège les cellules RIP3 KD de l'apoptose, ce qui suggère un rôle important dans ce processus. Il est connu que le clivage de p65/RelA peut aboutir à des fragments ayant une activité dominant-négative (Coiras M, *et al.*, 2008 ; Levkau B, *et al.*, 1999). Dans l'étude effectuée par Nugues et collaborateurs, le fragment p65/RelA 1-361 n'a pas d'effet significatif alors que le fragment p65/RelA 362-549 n'entraîne une augmentation d'activité transcriptionnelle que dans les cellules RIP3KD. Ceci suggère que les activités de RIP3 indépendantes de sa fonction kinase sont très complexes. En effet, il est connu que RIP1 et RIP3 forment un hétérodimère via leur domaine RHIM, mais des hétérotrimères avec Trif et DAI/ZBP1 ont également été caractérisés par le groupe de J Tschopp (Meylan E. *et al.*, 2004 ; Rebsamen M. *et al.*, 2009). Par ailleurs, lorsque RIP4, un membre de la famille RIP est surexprimé, il active NF- κ B. Ce dernier possède un effet dominant-négatif lorsqu'il est clivé par des caspases dans des conditions d'induction de mort via Fas (Meylan E. *et al.*, 2002). Il serait intéressant d'étudier le partenariat entre le complexe NF- κ B et RIP4.

Nous montrons ici que les fragments de p65/RelA modulent la tumorigénicité d'une manière différente dans les modèles murins de leucémie et de mélanome (Tableau 11). Dans le modèle de leucémie, le mutant non-clivable p65/RelA D361E abrège la survie des souris, un résultat qui confirme celui déjà obtenu par le laboratoire (Nugues AL. *et al.*, 2014). Ceci indique qu'abolir le clivage de p65/RelA par RIP3 augmente la tumorigénicité. Dans le modèle du mélanome, RIP3 est toujours exprimé d'après les résultats du transcriptome et on observe des résultats inverses. La coexpression des fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 est hautement tumorigénique alors que le mutant non-clivable n'a pratiquement aucun effet. A notre connaissance, c'est la première observation de la tumorigénicité comme conséquence de l'activité de fragments de p65/RelA. Cependant, la différence d'activité des fragments selon les modèles est intrigante et indique que le rôle du clivage sur l'activité de p65/RelA est complexe. Les 11 lignées cellulaires de mélanome humain utilisées par le groupe de Geserick (Geserick P. *et al.*, 2015) montrent toutes une absence d'expression de RIP3, à l'opposé de notre modèle murin, qui est soit particulier parce que murin, soit ne représente qu'une partie des mélanomes humains. Par ailleurs, dans ces lignées humaines, seule la réexpression de RIP3, et non celle de RIP3KD, est capable d'induire la nécroptose, ce qui différencie encore plus les résultats obtenus avec ce modèle de ceux obtenus avec notre modèle murin de leucémie.

Pour comprendre le rôle de ces fragments sur la tumorigénicité, nous avons étudié leur activité fonctionnelle (translocation, fixation sur un élément de réponse et activité transcriptionnelle). La coexpression des fragments Nter et Cter aboutit à une translocation nucléaire similaire à celle de p65/RelA WT et une augmentation importante de la liaison à des sites de liaison de NF- κ B dans les extraits des cellules de leucémie mais pas de mélanome. Cependant, cette augmentation de liaison n'est pas corrélée à une augmentation d'activité transcriptionnelle (voir Tableau 11).

	Leucémie	Mélanome
Tumorigénicité	p65/RelA D361E	p65/RelA N&C Ter
"Souchitude"	p65/RelA D361E	p65/RelA N&C Ter
Fixation sur le RE	p65/RelA N&C Ter (\nearrow)	p65/RelA N&C Ter (\searrow)
Activité transcriptionnelle	p65/RelA N Ter (\nearrow)	p65/RelA N Ter (\searrow)
pH intracellulaire	p65/RelA D361E	

Tableau 11 : Implication des différents mutants de p65/RelA dans les 2 modèles cellulaires

Il est à noter que le test d'activité transcriptionnelle est effectué sur un site de liaison de NF- κ B consensus qui représente peut-être mal la diversité des sites de liaison dans chaque modèle. Par ailleurs, il existe à ce jour 12 hétérodimères de NF- κ B caractérisés pour leur liaison à l'ADN (Figure 75). Leur présence dans la cellule étant fonction de son degré de différenciation reste à être caractérisée dans chaque modèle. Enfin, ceci pourrait suggérer que la modulation de la tumorigénicité par les fragments n'est pas le résultat de l'activité de la voie NF- κ B mais peut-être d'autres fonctions à découvrir (Mitchell S. *et al.*, 2016).

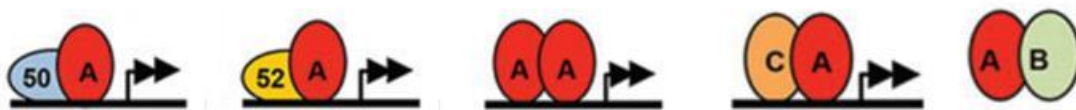


Figure 75 : Différentes formes du complexe NF κ B : p65/RelA (A) peut s'associer avec p50 ou p52 ou RelB (B) ou cRel (C) ou encore avec lui-même pour former un homodimère (Mitchell S. *et al.*, 2016).

Les études du transcriptome pourraient peut-être répondre à cette question. Les résultats montrent que les fragments ainsi que le mutant non clivable ont des profils d'expression clairement distincts, ce qui indique qu'ils sont actifs et non pas seulement des sous-produits du clivage par RIP3. Les fragments ainsi que le mutant non clivable modulent chacun plusieurs gènes qui n'étaient pas connus pour être des cibles de NF- κ B, mais plutôt comme

jouant un rôle dans le cancer. Parmi les gènes modulés par le mutant non clivable, on retrouve la famille des stéfinines, inhibiteurs de protéases à cystéine, qui sont surexprimés dans plusieurs types de cancers (Magister S. & Kos J., 2013). Le mutant non-clivable induit également l'expression de SLC4A5, un membre de la famille des SLC4, transporteur de bicarbonate de sodium, qui maintient le pH intracellulaire constant (Gorbatenko A. *et al.*, 2014) en exportant du bicarbonate de sodium. Par ailleurs, nombreuses études ont montré le rôle important que joue le pH dans le développement tumoral. Pour l'instant l'ensemble des publications ont étudié le rôle du pH intracellulaire dans des modèles de tumeurs solides. Notre étude est donc la première à être réalisée dans un modèle de tumeur liquide. En présence du mutant non clivable de p65/RelA, le pH intracellulaire est le plus basique par rapport à celui des deux autres lignées. Or les différentes études préalablement citées indiquent que lors du développement tumoral le pH intracellulaire devient de plus en plus basique (Damaghi M. *et al.*, 2013 ; Reshkin SJ. *et al.*, 2014 ; Harguindey S. *et al.*, 2005). Dans le même temps, le pH extracellulaire a tendance à devenir de plus en plus acide conformément à notre étude. Ainsi la surexpression du transporteur de bicarbonate de sodium régulateur du pH permettrait un développement tumoral plus important en présence du mutant non clivable de p65/RelA D361E dans notre modèle leucémique. Contrairement au modèle de mélanome dans lequel aucune différence de pH intracellulaire n'a été trouvée. Le développement tumorigène passe donc par un autre mécanisme. En conséquence, le pH des cellules surexprimant le mutant non clivable sont plus basiques ce qui est corrélé à la survie moindre des souris. Par contre, cet effet n'est pas rencontré dans le modèle murin de mélanome, ce qui conforte le rôle différent des fragments selon l'organe testé. L'effet du pH intracellulaire sur la tumorigénèse reste néanmoins une question en suspens.

Le rôle de NF- κ B dans le développement du caractère "souche" des cellules cancéreuses reste encore controversé (Shigdar S. *et al.*, 2014, Wang T. *et al.*, 2015). NF- κ B joue probablement un rôle majeur dans l'inflammation et le développement du caractère de cellule souche. L'activation de NF- κ B par des cytokines pro-inflammatoires ou des ligands du Toll-like récepteur (TLR) augmente le pourcentage de cellules souches. D'autre part, les cellules souches cancéreuses montrent une activité exacerbée de NF- κ B (Yeh DW. *et al.*, 2016). Par ailleurs, une forte activité de NF- κ B est décrite dans la sous-population CD34⁺ des blastes de LAM (Guzman ML. *et al.*, 2001). Selon les modèles étudiés, ce n'est pas toujours le cas. Par exemple, c'est l'inhibition de NF- κ B qui entraîne l'expansion cellulaire des cellules souches de tumeurs mammaires (Liu M. *et al.*, 2010). Nos résultats montrent que les

marqueurs de cellules souches sont modulés par les fragments et mutants de p65/RelA dans les deux modèles étudiés. Le mutant non clivable augmente l'activité aldéhyde deshydrogénase dans les cellules leucémiques et réduit la formation de sphères dans le modèle de mélanome. Or il est connu que les cellules ALDH⁺ présentent un potentiel de cellules souches. Ces cellules souches peuvent jouer un rôle très important dans le développement tumoral. Nous avons donc mesuré le taux de cellules souches à l'aide de différents anticorps dirigés contre des marqueurs de surface caractéristiques des cellules souches. Mais nous n'avons pas noté de différences significatives entre les différentes lignées. Il n'existerait donc pas un caractère de cellules souches dû à l'expression d'une des formes de p65/RelA WT, p65/RelA D361E, p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. Inversement, la coexpression des fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 réduit l'activité ALDH dans les cellules leucémiques et augmente la formation de sphères dans le modèle de mélanome. Or la capacité à former des sphères est une caractéristique des cellules souches. La tumorigénèse accrue de la lignée peut être due à une présence plus importante de cellules souches. Ces résultats sont compatibles avec la tumorigénicité observée *in vivo* dans les deux modèles murins (Tableau 12). Cependant, on remarque que la forme sauvage de p65/RelA ainsi que le plasmide vide possèdent la même capacité de formation de sphères dans le modèle de mélanome alors qu'ils montrent une tumorigénicité totalement divergente. En conclusion, ces résultats indiquent que les fragments issus du clivage de p65/RelA possèdent un rôle différent de celui de la forme sauvage sur le caractère de cellules souches des cellules cancéreuses, et qu'elle dépend du modèle étudié.

	croissance tumorale	pH intracellulaire	cellules ALDH ⁺
p65/RelA WT	+	+	+
p65/RelA D361E	+++	+++	+++
p65/RelA N&C Ter	+	+	+

	croissance tumorale	pH intracellulaire	sphères
Void	+		+++
p65/RelA WT	+++	+	+++
p65/RelA D361E	-	+	-
p65/RelA N Ter	+++		+++
p65/RelA C Ter	-		-
p65/RelA N&C Ter	+++	+	+++

Tableau 12 : Comparaison des résultats obtenus pour la croissance tumorale, du pH intracellulaire, de la caractérisation de cellules souches : Tableau du haut : modèle leucémique, Tableau du bas : modèle de mélanome

Nos résultats montrent que l'activité des fragments issus du clivage de p65/RelA par RIP3 indépendamment de la phosphorylation est réelle et n'est pas neutre. Elle comprend l'immunoéchappement les marqueurs de cellules souches ainsi que la tumorigénicité qui varient selon le type cellulaire. Le mutant non clivable module le pH intracellulaire et l'expression des Stefin qui peuvent affecter de nombreuses fonctions cellulaires. Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec circonspection. Les études que nous avons entreprises l'ont été avec des lignées stablement transfectées. Les résultats déjà obtenus par le laboratoire ont montré un clivage de p65/RelA dans un système dans lequel l'expression de RIP3 avec un domaine kinase non fonctionnel est inductible et entraîne une mort cellulaire rapide et massive (Nugues AL. *et al.*, 2014). Nous n'avons à l'heure actuelle aucune idée du rôle de ces fragments lorsqu'ils sont exprimés de façon transitoire ni s'ils existent dans des cellules vivantes. Il est possible, comme dans le cas de RIP4, qu'ils aient un rôle physiologique dont le mécanisme d'induction doit être caractérisé. Dans les leucémies aiguës myéloïdes et les leucémies lymphoïdes chroniques, RIP3 est absent et n'a au minimum aucun effet sur l'activation de NF- κ B ou alors favorise cette activation. Nos résultats confirment que le mutant non clivable possède la plus forte activité tumorigénique. Ils laissent également supposer que les fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 puissent avoir une activité dans des cellules tumorales possédant une protéine RIP3 fonctionnelle et active, probablement par des mécanismes inflammatoires ou autres qui doivent être caractérisés. Notre meilleur exemple tient aujourd'hui aux résultats obtenus dans le modèle du mélanome.

Dans le modèle leucémique, l'expression du mutant p65/RelA D361E induit une expression plus importante du transporteur de bicarbonate de sodium SLC4A5 responsable de l'augmentation du pH intracellulaire qui pourrait participer au développement tumoral. A l'opposé, l'augmentation de l'expression de PDL1 lorsque les fragments sont coexprimés pourrait être corrélé à l'activation de la voie non canonique via RelB. Comme la lignée exprimant les deux fragments est "peu" tumorigène, l'expression de PDL1 pourrait donner une lignée s'apparentant à de la "dormance tumorale" (Saudemont *et al.*, 2004). L'étude transcriptomique a montré que l'expression des deux fragments p65/RelA 1-361 et p65/RelA 362-549 régulaient de nombreux gènes positivement ou négativement. Il serait donc intéressant de vérifier l'expression de gènes régulant le système immunitaire ou la réponse immunitaire et d'approfondir leur fonction dans le développement tumoral s'ils existent. Tandis que dans le modèle du mélanome, en présence des 2 fragments, la présence plus importante des cellules

souches peut être responsable de la tumorigenèse accrue. Nous n'avons pas observé de variation du pH intracellulaire pour ce modèle.

Le rôle du système immunitaire n'a pas encore pu être établi clairement dans le modèle de mélanome en présence des 2 fragments. Le taux d'expression de la protéine PDL1 est très élevé dans les différentes lignées de mélanome ne mettant pas en évidence une différence de comportement d'immunoéchappement. Par ailleurs, une étude *in vivo* dans un modèle "nude" sera réalisée prochainement pour compléter l'étude du rôle des 2 fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 coexprimés dans le fonctionnement du système immunitaire.

En définitive, de grandes différences de comportement de p65/RelA non clivable ou des fragments p65/RelA dans le développement tumoral sont observées selon le modèle utilisé. Il serait donc intéressant de poursuivre cette étude afin d'établir l'impact du mutant de p65/RelA ou de la coexpression des fragments issus du clivage de p65/RelA.

CONCLUSION

Nugues AL. et *al.* ont montré au laboratoire, la présence d'un nouveau site de clivage de p65/RelA dans le modèle particulier de leucémie murine dans lequel RIP3 est réexprimé avec le domaine kinase inactivé. Le site de clivage par la caspase 6 se situe sur le résidu d'acide aspartique 361 et le mutant non clivable p65/RelA D361E induit une tumorigénèse accrue *in vivo*. Nous nous sommes alors intéressés au rôle de ce clivage ainsi qu'aux mécanismes mis en jeu par le mutant non clivable p65/RelA D361E. Pour cela, nous avons utilisé deux modèles. Le premier est la leucémie BCR-ABL⁺ dans lequel RIP3 est méthylé. Le second est un cancer solide, le mélanome dans lequel l'expression de l'ARN de RIP3 a été mis en évidence.

Dans cette étude, nous avons montré que l'expression de p65/RelA muté D361E non clivable ou des fragments obtenus : p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 après clivage de p65/RelA par la protéine RIP3KD présente un rôle et une activité dans le développement tumoral dans les modèles leucémique et du mélanome (Figure 76).

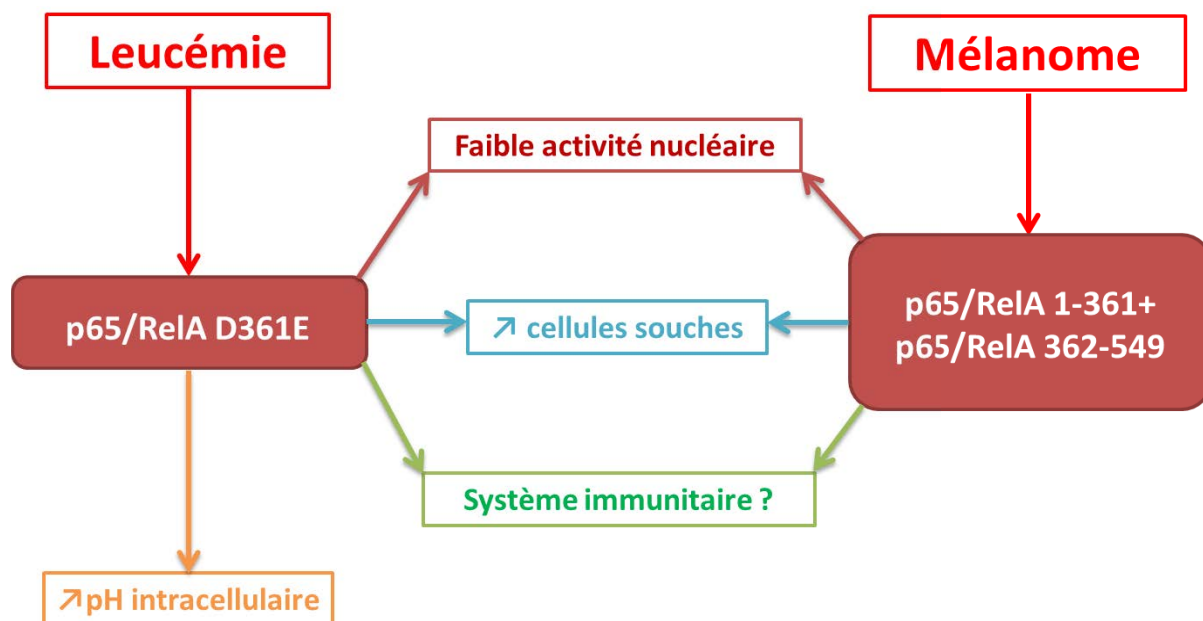


Figure 76 : Représentation bilan du rôle de p65/RelA D361E ou des fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 dans les modèles leucémique et de mélanome respectivement. Le mutant non clivable p65/RelA D361E, le responsable de la tumorigénèse accrue dans le modèle leucémique, induit une faible activité nucléaire, une augmentation du nombre de cellules souches comme du pH intracellulaire. La protéine p65/RelA D361E semble aussi réguler le système immunitaire. La coexpression des fragments de p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549, responsable de la tumorigénèse accrue dans le modèle du mélanome, présente une faible activité nucléaire. Les fragments induisent une augmentation des cellules souches et semblent réguler le système immunitaire

En effet, le mutant non clivable p65/RelA D361E est responsable du développement tumoral dans le modèle leucémique en induisant une faible activité nucléaire, une

augmentation du nombre de cellules souches. Nous observons que la coexpression des fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 induit le même comportement entraînant une tumorigénèse accrue dans le modèle de mélanome. Par contre, seul le mutant non clivable p65/RelA D361E induit une augmentation du pH intracellulaire des cellules leucémiques corrélé à un développement tumoral accru. Néanmoins, p65/RelA D361E comme les fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 semblent moduler l'activité du système immunitaire. Mais ce rôle reste à être confirmé par des études complémentaires.

En conclusion, nos résultats montrent que dans les deux modèles cellulaires non physiologiques, le mutant non clivable dans le modèle leucémique et la présence des deux fragments résultant du clivage dans le modèle du mélanome sont des acteurs déclenchant la tumorigénèse avec des modulations similaires de l'activité nucléaire, des cellules souches et probablement du système immunitaire.

PERSPECTIVES

L'étude que nous avons menée n'est évidemment pas complète. Elle peut être envisagée selon deux voies. La première est la compréhension des différences observées entre les deux modèles de leucémie et de mélanome, notamment par la comparaison des transcriptomes entre les 2 modèles. Ainsi que nous l'avons montré, notre étude est plutôt descriptive et certaines voies n'ont pas été approfondies, en ce sens que les choix qui avaient été faits n'avaient pas donné les résultats escomptés. Enfin, le modèle d'étude est particulier car il a été observé dans une situation pour laquelle la phosphorylation de RIP3 est abolie. Pour compléter cette étude nous proposons les expériences suivantes :

❖ Modifications post-traductionnelles

L'activité de p65/RelA peut être modulée par des modifications post-traductionnelles comme le clivage mais aussi par des phosphorylations, des acétylations, méthylations... Sur l'ensemble des différents sites possibles de phosphorylation, nous en avons étudié 2 pour lesquels nous n'observons pas de différences significatives du taux de phosphorylation (Figure 77). Cependant il reste de nombreux sites de phosphorylation à étudier. De même, la protéine p65/RelA peut être acétylée. Il serait donc intéressant de déterminer l'impact de l'acétylation sur la stabilité et l'activité de p65/RelA (Figure 77). En effet, les différentes modifications post-traductionnelles peuvent avoir un impact sur la stabilité protéique de p65/RelA mais aussi sur son activité.

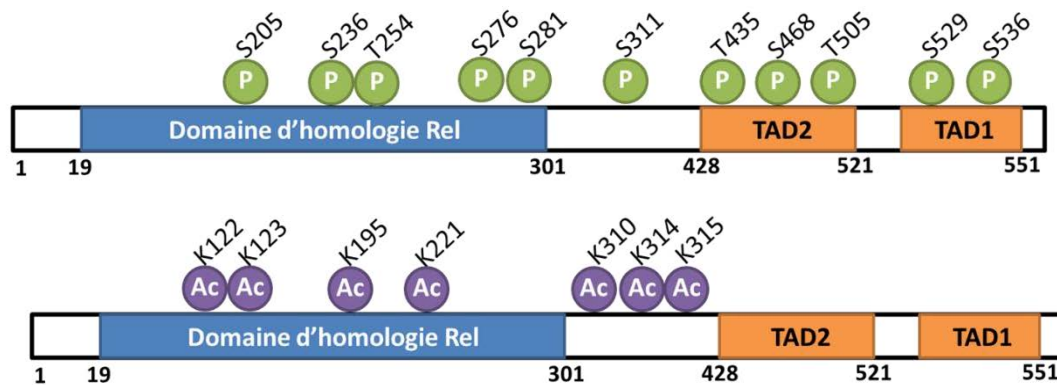


Figure 77 : Différents sites de phosphorylation et d'acétylation de la protéine p65/RelA. La phosphorylation des différents sites va augmenter la stabilité de la protéine p65/RelA et ainsi l'activité transcriptionnelle de p65/RelA. L'acétylation induit une augmentation de l'activité transcriptionnelle de p65/RelA.

Pour cela, l'étude pourra être réalisée en utilisant des anticorps dirigés contre ces phosphorylations ou acétylations par western blot ou cytométrie en flux. Par ailleurs, il serait intéressant de réaliser l'étude des kinases dans les 2 modèles pour déterminer l'impact de l'expression de p65/RelA WT ou de ses mutants sur les différentes protéines kinases.

❖ Localisation nucléaire

Par la suite, afin de lever les doutes de la localisation nucléaire éventuelle de la protéine p65/RelA WT ou de ses mutants dans le modèle leucémie, nous pourrions réaliser des immunoprécipitations dans les fractions cytoplasmique et nucléaire. De même, pour poursuivre l'étude de comparaison des modèles, il faudrait réaliser l'étude de la localisation nucléaire de p65/RelA WT ou de ses mutants dans le modèle du mélanome via les techniques de western blot et de microscopie confocale.

❖ Recherche de partenaires

De même, nous avons vu que la différence de régulation de l'expression des gènes par les différents mutants de p65/RelA dans le modèle leucémique ne suffit pas pour expliquer la différence du comportement du développement tumoral en présence de l'un des mutants de p65/RelA. Il est donc important de rechercher des partenaires (en utilisant des techniques de co-immunoprécipitation, western blot, cytométrie en flux) dans le modèle leucémique mais aussi dans le modèle de mélanome. La détermination de ces partenaires pourra expliquer une différence d'activité transcriptionnelle de p65/RelA.

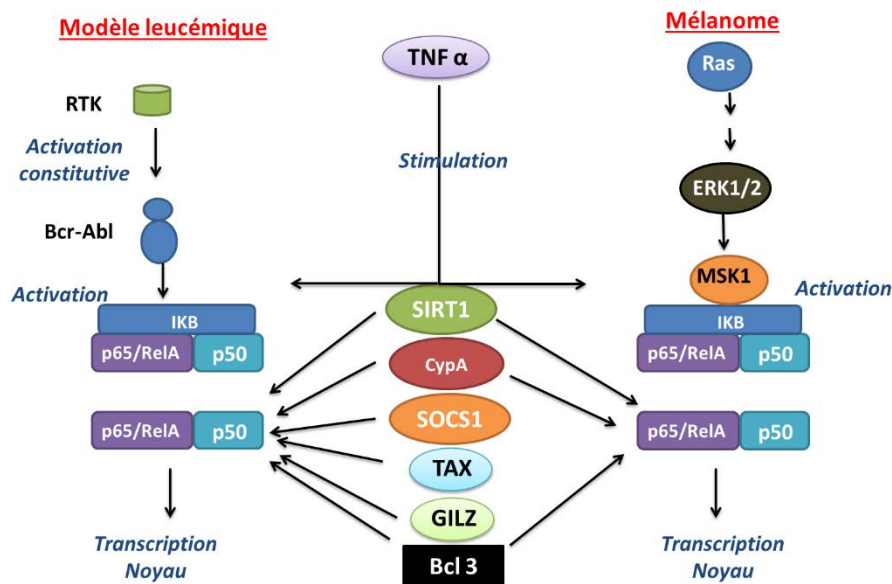


Figure 78 : Différents partenaires protéiques interagissant avec p65/RelA dans les deux modèles leucémique et de mélanome : Le complexe NF- κ B est activé par la protéine de fusion BCR-ABL dans le modèle leucémique et par la voie Ras/Raf/ERK dans le modèle du mélanome. Le TNF α peut stimuler directement le complexe NF- κ B ou indirectement via les différents partenaires de p65/RelA (SIRT1, CypA, SOCS1, TAX, GILZ, Bcl3) régulant son activité transcriptionnelle.

Pour répondre à cette question, nous pourrions rechercher dans le cytoplasme des partenaires protéiques (Figure 78) tels que SIRT1, CypA, TAX, GILZ, Bcl3. SIRT1 et CypA

sont des gènes suppresseurs de tumeur. SIRT1 induit la prolifération et inhibe l'apoptose. CypA participe au développement tumoral induisant l'activation de NF- κ B. Cette activation de NF- κ B peut être aussi induite par la protéine TAX permettant d'augmenter la stabilité et la translocation nucléaire du complexe NF- κ B. Au contraire, l'expression de la protéine GILZ inhibe l'activité de NF- κ B. Par ailleurs, fortement exprimé, Bcl3 régule l'activité du complexe NF- κ B. De même, le complexe NF- κ B est actif uniquement sous forme de dimère. La protéine p65/RelA peut s'associer avec différentes sous unités p50, p52, cRel, RelB ou s'autodimériser (Figure 75). Or, selon les sous unités composant le dimère, le complexe NF- κ B ne présente pas la même activité. En effet, le complexe NF- κ B sous sa forme p65/RelA-RelB ne possède pas d'activité de fixation à l'ADN.

De plus, on observe des effets synergiques ou intermédiaires des 2 fragments issus du clivage de p65/RelA sont coexprimés selon le tissu cellulaire étudié. Il serait donc intéressant de comprendre s'il existe une interaction entre les deux fragments, d'identifier les partenaires éventuels de fragments pouvant être responsable de l'absence de tumorigénèse dans le modèle leucémique ou au contraire responsable de cette tumorigénèse dans le modèle de mélanome.

❖ Rôle physiologique du clivage

Cependant, il est important de prendre en compte la réalité physiologique de ce clivage. En effet, notre système d'étude est particulier. Le clivage de p65/RelA est obtenu en présence de RIP3KD. Il serait donc judicieux de déterminer le taux d'expression de RIP3 dans notre modèle de mélanome, et la présence ou non de RIP3KD chez les patients leucémiques ou atteints de mélanome. Dans le cadre de la révision du papier, on a essayé de voir l'effet d'une drogue pouvait mimer le comportement de RIP3KD et induire un clivage de p65/RelA. Nous avons donc utilisé la staurosporine dans le modèle leucémique. La première expérience a mis en évidence l'obtention de fragments de p65/RelA à 40kDa. La taille de ce fragment pourrait correspondre à celle du fragment p65/RelA 1-361. Néanmoins, l'étude ayant été réalisée qu'une fois. Il est nécessaire de reproduire l'expérience pour confirmer ce résultat.

RESUME

L'utilisation d'un agent déméthylant induit la réexpression de la protéine RIP3, une sérine-thréonine kinase, dans un modèle leucémique murin exprimant BCR-ABL humain. La réexpression de RIP3 conduit rapidement les cellules vers la nécroptose. Le mutant délété du domaine kinase est de façon surprenante plus "apoptogène" et induit le clivage de p65/RelA sur le résidu d'acide aspartique D361 par la caspase 6. Pour déterminer l'impact de ce clivage, nous avons construit un mutant non clivable p65/RelA D361E, ainsi que des plasmides exprimant chacun des fragments p65/RelA 1-361 ou p65/RelA 362-549, ou un plasmide exprimant simultanément p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549. Ces différents plasmides codant pour les différentes formes de la protéine p65/RelA sont incorporés par transfection dans les cellules leucémiques ou de mélanome pour lesquels le gène RIP3 est respectivement méthylé ou exprimé. *In vivo*, nous mettons en évidence une différence de tumorigénicité entre les deux modèles. Elle est accrue par la présence de p65/RelA D361E par rapport à celle de p65/RelA WT et de p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 dans le modèle leucémique. Elle est au contraire faible dans le modèle du mélanome pour lequel la surexpression des fragments p65/RelA 1-361 +362-549 induit la tumorigénèse la plus forte.

L'agressivité du mutant non clivable *in vivo* n'est pas corrélée à l'activité de NF- κ B mesurée *in vitro*. Les fragments comme le mutant p65/RelA D361E induisent des profils d'expression différents dans le modèle murin de leucémie avec la modulation notable d'expression génique de la famille d'inhibiteurs de protéases à cystéine Stefins, ainsi que le transporteur de bicarbonate de sodium SLC4A5 qui joue un rôle majeur dans la régulation du pH intracellulaire. Le mutant p65/RelA D361E induit une expression importante du transporteur de bicarbonate de sodium SLC4A5 dans le modèle leucémique responsable de l'augmentation du pH intracellulaire qui participe au développement tumoral. Par contre, ce sont les deux fragments p65/RelA 1-361 + p65/RelA 362-549 qui induisent simultanément une expression plus forte de la molécule d'immunoéchappement PDL1, vraisemblablement par un mécanisme post-traductionnel.

L'étude de la "souchitude" des modèles montre une différence d'activité du mutant p65/RelA D361E selon le modèle. On observe une augmentation de l'activité ALDH dans le modèle leucémique et une diminution de la formation de sphères dans le modèle de mélanome.

En conclusion, ces résultats indiquent que les fragments issus du clivage de p65/RelA par l'activité de RIP3 indépendante de la kinase possèdent un rôle différent de celui de la forme sauvage sur la souchitude des cellules cancéreuses, et qu'elle dépend du modèle étudié.

Ils confirment que le mutant non clivable possède la plus forte activité tumorigénique. Ils laissent également supposer que les fragments Nter et Cter puissent avoir une activité dans des cellules tumorales possédant une protéine RIP3 fonctionnelle et active, probablement par des mécanismes inflammatoires ou autres qui doivent être caractérisés.

The receptor-interacting protein kinase 3 (RIPK3) can induce necroptosis, apoptosis, or cell proliferation, and is silenced in several hematological malignancies. We previously reported that RIPK3 activity independent of its kinase domain induces p65/RelA caspase-mediated cleavage resulting in N-terminal 1-362 and C-terminal 362-549 fragments. We show here that a non-cleavable p65/RelA D361E mutant expressed in DA1-3b leukemia cells decrease mouse survival and that coexpressed p65/RelA fragments increase tumorigenicity of B16/F1 melanoma cells that did not correlated with in vitro measured Nf-kB activity. Fragments and p65/RelA fragments display different expression profiles in DA1-3b leukemic cells, with the notable modulation of gene expression of the Stefin cysteine protease inhibitor family and of SLC4A5, a Na⁺-coupled HCO₃⁻ transporter. DA1-3b cells expressing p65/RelA D361E mutant showed more basic intracellular pH. p65/RelA fragments induced overexpression of PD-L1 immunoevasion molecule in DA1-3b cells. Markers of stemness were also affected: p65/RelA D361E induced increased ALDH activity in DA1-3b cells and fragments expression resulted in increased melanoma sphere formation in B16/F1 cells. Thus, far from being neutral, p65/RelA cleavage initiated by kinase independent activity of RIPK3 induced a pleiotropic range of effects in vitro and in vivo in cancer cells, that may vary across tumor types.

BIBLIOGRAPHIE

- Alcamo, E., Hacohen, N., Schulte, LC., Rennert, PD., Hynes, RO., Baltimore, D. *Requirement for the NF-kappaB family member RelA in the development of secondary lymphoid organs.* J Exp Med 195(2), 233-44 (2002).
- Alonso, SR., Ortiz, P., Pollan, M., Prez-Gomez, B., Sanchez, L., Acuna, MJ., Pajares, R., Martinez-Tello, FJ., Hortelano, CM., Piris, MA., Rodriguez-Peralto, JL. *Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study.* American J Pathology 164(1), 193-203 (2004).
- Amiri, KI., Richmond, A. *Role of nuclear factor-kappa B in melanoma.* Cancer Metastasis Rev 24(2), 301-13 (2005).
- Ashkenazi, A. *Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists.* Nat Rev Drug Discov 7(12), 1001-12 (2008).
- Baker, S.J., Reddy, E.P., *Targeted inhibition of kinases in cancer therapy.* Mt Sinai J Med. 77 (6), 573-586 (2010).
- Balch, CM., Cascinelli, N. *The new melanoma staging system.* Tumori 87(4), S64-8 (2001).
- Baldwin AS. Jr. *The NF-kappa B and Ikappa B proteins: new discoveries and insights.* Annual Review Immunology 14, 649-83 (1996).
- Bash, J., Zong, WX., Gélinas, C. *c-Rel arrests the proliferation of HeLa cells and affects critical regulators of the G1/S-phase transition.* Mol Cell Biol 17(11), 6526-36 (1997).
- Bauer, J., Garbe, C., *Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data.* Pigment Cell Res. 16(3), 297-306 (2003).
- Baumgartner, B., Weber, M., Quirling, M., Fischer, C., Page, S., Adam, M., von Schilling, C., Waterhouse, C., Schmid, C., Neumeier, D., et al. *Increased IκB kinase activity is associated with activated NF-κB in acute myeloid blasts.* Leukemia 16, 2062-2071 (2002).
- Bennour, A., Saad, A., Sennana, H. *Chronic myeloid leukemia: Relevance of cytogenetic and molecular assays.* Crit Rev Oncol Hematol 97, 263-74 (2016).
- Bitencourt, R., Zalberg, I., Drumond Louro, I., *Imatinib resistance: a review of alternative inhibitors in chronic myeloid leukemia.* Rev.Bras. Hematol Hemoter. 33 (6), 470-475 (2011).
- Bliss, JM., Ford, D., Swerdlow, AJ., Armstrong, BK., Cristofolini, M., Elwood, JM., Green, A., Holly, EA., Mack, T., MacKie, RM. et al. *Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies.* The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). Int. J. Cancer 62(4), 367-76 (1995).
- Blonska, M., Shambharkar, PB., Kobayashi, M., Zhang, D., Sakurai, H., Su, B., Lin, X. *TAK1 is recruited to the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptor 1 complex in a receptor-interacting protein (RIP)-dependent manner and cooperates with MEKK3 leading to NF-kappaB activation.* J Biol Chem 280(52), 43056-63 (2005).
- Boiko, AD., Razorenova, OV., van de Rijn, M., Swetter, SM., Johnson, DL., Ly, DP., Butler, PD., Yang, GP., Joshua, B., Kaplan, MJ., Longaker, MT., Weissman, IL. *Human melanoma initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271.* Nature 466(7302), 133-7 (2010).
- Bond, M., Fabunmi, RP., Baker, AH., Newby, AC. *Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B.* FEBS Lett 435(1), 29-34 (1998).

- Bours, V., Dejardin, E., Goujon-Letawe f., Merville, MP., Castronovo, V. *The NF-kappa B transcription factor and cancer: high expression of NF-kappa B and I kappa B-related proteins in tumor cell lines.* Biochemistry Pharmacology 47(1), 145-9 (1994).
- Bren, GD., Solan, NJ., Miyoshi, H., Pennington, KN., Pobst, LJ., Paya, CV. *Transcription of the RelB gene is regulated by NF-kappaB.* Oncogene 20(53), 7722-33 (2001).
- Bruttel, VS., Wischhusen, J. *Cancer stem cell immunology: key to understanding tumorigenesis and tumor immune escape?* Front Immunol 5, 360 (2014).
- Campbell, KJ., Perkins, ND. *Post-translational modification of RelA(p65) NF-kappaB.* Biochem Soc Trans 32(Pt 6), 1087-9 (2004).
- Carrà, G., Torti, D., Crivellaro, S., Panuzzo, C., Taulli, R., Cilloni, D., Guerrasio, A., Saglio, G., Morotti, A. *The BCR-ABL/NF-κB signal transduction network: a long lasting relationship in Philadelphia positive Leukemias.* Oncotarget 7(40), 66287-66298 (2016).
- Catz, SD., Johnson, JL. *Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in protaste cancer.* Oncogene 20(50), 7342-51 (2001).
- Chambard, JC., Lefloch, R., Pouysségur, J., Lenormand, P. *ERK implication in cell cycle regulation.* Biochim Biophys Acta 1773(8), 1299-310 (2007).
- Chaturvedi, MM., Sung, B., Yadav, VR., Kannappan, R., Aggarwal, BB. *NF-κB addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'.* Oncogene 30(14), 1615-30 (2011).
- Chen, J., Jiang, CC., Jin, L., Zhang, XD. *Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer.* Ann Oncol 27(3), 409-16 (2016).
- Chen, JC., Liu, SM., Fei, HB, Gong, WL. *Preliminary research on the p53 gene rearrangements in the evolution of chronic myelogenous leukemia to blast crisis.* J Tongji Med Univ 14(4), 204-8 (1994).
- Chen, LF., Greene, WC. *Regulation of distinct biological activities of the NF-kappaB transcription factor complex by acetylation.* J Mol Med (Berl) 81(9), 549-57 (2003).
- Chen, LF., Mu, Y., Greene, WC. *Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB.* EMBO J 21(23), 6539-48 (2002).
- Cho, YS., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, TD., Guildford, M., Chan, FK. *Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation.* Cell 137(6), 1112-23 (2009).
- Chopra, R., Pu, QQ., Elefanty, AG., *Biology of BCR-ABL.* Blod 13(4), 211-29 (1999)
- Christian, J., Vier, J., Paschen, SA., Häcker, G. *Cleavage of the NF-κB family protein p65/RelA by the chlamydial protease-like activity factor (CPAF) impairs proinflammatory signaling in cells infected with Chlamydiae.* J Biol Chem 285(53), 41320-7 (2010).
- Cilloni, D., Saglio, G. *Molecular pathways: BCR-ABL.* Clin Cancer Res 18(4), 930-7 (2012).
- Clark, AG., Vignjevic, DM. *Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment.* Current Opinion in Cell Biology 36 (13-22) (2015).
- Clark, WH., Jr., Elder, DE., Guerry, D., Braitman, LE., Trock, BJ., Schultz, D., Synnestvedt, M., Halpern, AC. *Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression.* J. Nati Cancer Inst 81(24), 1893-904 (1989).
- Clark, WH. *Tumor progression and the nature of cancer.* Br. J. Cancer 64(4), 631-44 (1991).

- Coiras, M., Lopez-Huertas, MR., Mateos, E., Alcami, J. *Caspase-3-mediated cleavage of p65/RelA results in a carboxy-terminal fragment that inhibits I κ B α and enhances HIV-1 replication in human T lymphocytes*. *Retrovirology* 5, 109 (2008).
- Coppo, P., Flamant, S., De Mas, V., Jarrier, P., Guiller, M., Bonnet, ML., Lacout, C., Guilhot, F., Vainchenker, W., Turhan, AG; *Br J Haematol*, 134(2), 171-9 (2006).
- Courtois, G., Gilmore, TD. *Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease*. *Oncogene* 25(51), 6831-43 (2006).
- Covert, MW., Leung, TH., Gaston, JE., Baltimore, D. *Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation*. *Science* 309(5742), 1854-7 (2005).
- Craddock, C., Jilani, N., Siddique, S., Yap, C., Khan, J., Nagra, S., Ward, J., Ferguson, P., Hazlewood, P., Buka, R., Vyas, P., Goodyear, O., Tholouli, E., Crawley, C., Russel, N., Byrne, J., Malladi, R., Snowden, J., Dennis, M. *Tolerability and clinical activity of post-transplantation azacitidine in patients allografted for acute myeloid leukemia treated on the RICAZA trial*. *Biologic Blood Marrow Transplantation* 22(2) 385-390 (2016).
- Damaghi, M., Wojtkowiak, JW., Gillies, RJ. *pH sensing and regulation in cancer*. *Frontiers in physiology* 4(370) (2013)
- Davey, RJ., van der Westhuizen, A., Bowden, NA. *Metastatic melanoma treatment: Combining old and new therapies*. *Crit Rev Oncology Hematology* 98, 242-53 (2016).
- Declercq, W., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P. *RIP kinases at the crossroads of cell death and survival*. *Cell* 138(2), 229-32 (2009).
- Dejardin, E., Bonizzi, G., Bellahcène, A., Castronovo, V., Merville, MP., Bours, V. *Highly-expressed p100/p52 (NFkB2) sequesters other NF-kappa B-related proteins in the cytoplasm of human breast cancer cells*. *Oncogene* 11(9), 1835-41 (1995).
- Dempsey, PW., Doyle, SE., He, JQ., Cheng, G. *The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily*. *Cytokine Growth Factor Rev* 14(3-4), 193-209 (2003).
- Deng, L., Lin-Lee, YC., Claret, FX., Kuo, MT. *2-acetylaminofluorene up-regulates rat mdrlb expression through generating reactive oxygen species that activate NF-kappa B pathway*. *J Biol Chem* 276(1), 413-20 (2001).
- Denkert, C., Köbel, M., Berger, S., Siegert, A., Leclere, A., Trefzer, U., Hauptmann, S. *Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma*. *Cancer Res* 61(1), 303-8 (2001).
- Deveraux, QL., Roy, N., Stennicke, HR., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, SM., Alnemri, ES., Salvesen, GS., Reed, JC. *IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases*. *EMBO* 17(8), 2215-23 (1998).
- Dhawan, P., Richmond, A. *A novel NF-kappa B-inducing kinase-MAPK signaling pathway up-regulates NF-kappa B activity in melanoma cells*. *J Biol Chem* 277(10), 7920-8 (2002).
- Dingli, D., Traulsen, A., Lenaerts, T., Pacheco, JM. *Evolutionary dynamics of chronic myeloid leukemia*. *Genes Cancer* 1(4), 309-15 (2010).
- Dondelinger, Y., Jouan-Lanhouet, S., Divert, T., Theatre, E., Bertin, J., Gough, PJ., Giansanti, P., Heck, AJ., Dejardin, E., Vandenabeele, P., Bertrand, MJ. *NF- κ B-Independent Role of IKK α /IKK β in Preventing RIPK1 Kinase-Dependent Apoptotic and Necroptotic Cell Death during TNF Signaling*. *Mol Cell* 60(1), 63-76 (2015).

- Duffey, DC., Chen, Z., Dong, G., Ondrey, FG., Wolf, JS., Brown, K., Siebenlist, U., Van Waes, C. *Expression of a dominant-negative mutant inhibitor-kappaB α of nuclear factor-kappaB in human head and neck squamous cell carcinoma inhibits survival, proinflammatory cytokine expression, and tumor growth in vivo.* Cancer Research 59(14), 3468-74 (1999).
- Dyson, HJ., Komives, EA. *Role of disorder in I κ B-NF κ B interaction.* IUBMB Life 64(6), 499-505 (2012).
- Elza C. de Bruin, Medema JP. *Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response.* Cancer Treatment Reviews 34, 737-749 (2008).
- Feng, S., Yang, Y., Mei, Y., Ma, L., Zhu, DE., Hoti, N., Castanares, M., Wu, M. *Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain.* Cell Signal 19(10), 2056-67 (2007).
- Foletto, MC., Haas, SE. *Cutaneous melanoma: new advances in treatment.* An Bras Dermatol 89(2), 301-10 (2014).
- Fozza, C., Corda, G., Barraqueddu, F., Viridis, P., Contini, S., Galleu, A., Isoni, A., Dore, F., Angelucci, E., Longinotti, M. *Azacitidine improves the T-cell repertoire in patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with multilineage dysplasia.* Leukemia Research 39(9) 957-63 (2015).
- Gang, AO., Frosig, TM., Brimnes, MK., Lyngaa, R., Treppendahl, MB., Gronbaek, K., Dufva, IH., Straten, PT., Hadrup, SR. *5-Azacitidine treatment sensitizes tumor cells to T-cell mediated cytotoxicity and modulates NK cells in patients with myeloid malignancies.* Blood Cancer J. 28(4) 197 (2014).
- Garcia-Echeverria, C., Sellers, WR. *Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer.* Oncogene 27(41), 5511-26 (2008).
- Gasparini, C., Celeghini, C., Monasta, L., Zauli, G. *NF- κ B pathways in hematological malignancies.* Cell Mol Life Sci 71(11), 2083-102 (2014).
- Gerondakis, S., Grumont, R., Gugasyan, R., Wong, L., Isomura, I., Ho, W., Banerjee, A. *Unravelling the complexities of the NF-kappaB signaling pathway using mouse knockout and transgenic models.* Oncogene 25(51) 6781-99 (2006).
- Geserick, P., Wang, J., Schilling, R., Horn, S., Harris, PA., Bertin, J., Gough, PJ., Feoktistova, M., Leverkus, M. *Absence of RIPK3 predicts necroptosis resistance in malignant melanoma.* Cell Death Dis 6, e1884 (2015).
- Ghosh, G., Wang, VY., Huang, DB., Fusco, A. *NF- κ B regulation: lessons from structures.* Immunol Rev 246(1), 36-58 (2012).
- Ghosh, S., Dass, JF. *Study of pathway cross-talk interactions with NF- κ B leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: A brief review.* Gene 584(1), 97-109 (2016).
- Gilchrest, BA., Eller, MS., Geller, AC., Yaar, M. *The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation.* N. Engl. J. Med. 340(17), 1341-8 (1999).
- Gilmore, TD., Koedood, M., Piffat, KA., White, DW. *Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer.* Oncogene 13(7), 1367-78 (1996).
- Goldman, JM., *Chronic myeloid leukemia: a historical perspective.* Semin Hematol 47(4), 302-11 (2010).

- Gonon-Demoulian. R., Goldman, JM., Nicolini FE. *History of chronic myeloid leukemia: A paradigm in the treatment of cancer*. Bulletin du cancer 101(1), 56-67 (2014).
- Gonzalvez, F., Ashkenazi, A. *New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL*. Oncogene 29(34), 4752-65 (2010).
- Gorbatenko, A., Olesen, CW., Boedtkjer, E., Pedersen, SF. *Regulation and roles of bicarbonate transporters in cancer*. Front Physiol 5, 130 (2014).
- Goulet, AC., Einsphar, JG., Alberts, DS., Beas, A., Burk, C., Bhattacharyya, A., Bangert, J., Harmon, JM., Fujiwara, H., Koki, A., Nelson, MA. *Analysis of cyclooxygenase 2 (COX-2) expression during malignant melanoma progression*. Cancer Biol Ther 2(6), 713-8 (2003).
- Gowrishankar, K., Gunatilake, D., Gallagher, SJ., Tiffen, J., Rizos, H., Hersey, P. *Inducible but not constitutive expression of PD-L1 in human melanoma cells is dependent on activation of NF- κ B*. PLoS One 10(4), e0123410 (2015).
- Green, DR., Lambi, F. *Cell Death Signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol 7(12), (2015).
- Grossman, D., McNiff, JM., Li, F., Altieri, DC. *Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, surviving, in human melanoma*. J. Invest. Dermatol. 113(6), 1076-81 (1999).
- Gu, Y., Chen, T., Meng, Z., Gan, Y., Xu, X., Lou, G., Li, H., Gan, X., Zhou, H., Tang, J., Xu, G., Huang, L., Zhang, X., Fang, Y., Wang, K., Zheng, S., Huang, W., Xu, R. *CaMKII γ , a critical regulator of CML stem/progenitor cells, is a target of the natural product berbamine*. Blood 120(24), 4829-39 (2012).
- Guertin, DA., Sabatini, DM., *Defining the role of mTOR in cancer*. Cancer Cell 12(1), 9-22 (2007)
- Gupta, S., Takebe, N., Lorusso, P. *Targeting the Hedgehog pathway in cancer*. Ther Adv Med Oncol 2(4), 237-50 (2010).
- Guttridge, DC., Albanese, C., Reuther, JY., Pestell, RG., Baldwin, AS Jr. *NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1*. Mol Cell Biol 19(8), 5785-99 (1999).
- Guzman, ML., Neering, SJ., Upchurch, D., Grimes, B., Howard, DS., Rizzieri, DA., Luger, SM., Jordan, CT. *Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells*. Blood 98(8), 2301-7 (2001).
- Häcker, H., Karin, M. *Regulation and function of IKK and IKK-related kinases*. Sci STKE 2006(357), re13 (2006).
- Hamdane, M., David-Cordonnier, MH., D'Halluin, JC. *Activation of p65 NF-kappaB protein by p210BCR-ABL in a myeloid cell line (P210BCR-ABL activates p65 NF-kappaB)*. Oncogene 15(19), 2267-75 (1997).
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., *The hallmarks of cancer*. Cell 100(1), 57-70 (2000).
- Harguindey, S., Orive, G., Pedraz, JL., Paradiso, A., Reshkin, SJ. *The role of pH dynamics and the Na⁺/H⁺ antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin-on single nature*. Biochimica et Biophysica Acta 1756, 1-24 (2005).
- He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., Wang, X. *Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha*. Cell 137(6), 1100-11 (2009).

- Heerema-McKenney, A., Arber, DA. *Acute myeloid leukemia*. Hematol Oncol Clin North Am 23(4), 633-54 (2009).
- Hirai, S., Kageshita, T., Kimura, T., Tsujisaki, M., Imai, K., Wakamatsu, K., Ito, S., Ono, T. *Serum levels of sICAM-1 and 5-S-cysteinyldopa as markers of melanoma progression*. Melanoma Res 7(1), 58-62 (1997).
- Hitomi, J., Christofferson, DE., Ng, A., Yao, J., Degtarev, A., Xavier, RJ., Yuan, J. *Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway*. Cell 135(7), 1311-23 (2008).
- Horita, M., Andreu, EJ., Benito, A., Arbona, C., Sanz, C., Benet, I., Prosper, F., Fernandez-Luna, JL. *Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL*. J Exp Med. 191(6), 977-84 (2000).
- Hsu, H., Huang, J., Shu, HB., Baichwal, V., Goeddel, DV. *TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex*. Immunity 4(4), 387-96 (1996).
- Huang, B., Yang, XD., Lamb, A., Chen, LF. *Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway*. Cell Signal 22(9), 1282-90 (2010).
- Huang, DB., Huxford, T., Chen, YQ., Ghosh, G. *The role of DNA in the mechanism of NFkappaB dimer formation: crystal structures of the dimerization domains of the p50 and p65 subunits*. Structure 5(11), 1427-36 (1997).
- Huang, DB., Vu, D., Ghosh, G. *NF-kappaB RelB forms an intertwined homodimer*. Structure 13(9), 1365-73 (2005).
- Huang, S. *Regulation of metastases by signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway: clinical implications*. Clin Cancer Res 13(5), 1362-6 (2007).
- Hu-Lieskovan, S., Robert, L., Homet Moreno, B., Ribas, A. *Combining targeted therapy with immunotherapy in BRAF-mutant melanoma: promise and challenges*. J Clin Oncol 32(21), 2248-54 (2014).
- Hurst, EA., Harbour, JW., Cornelius, LA. *Ocular melanoma: a review and relationship to cutaneous melanoma*. Arch. Dermatology 139(8), 1067-73 (2003).
- Ilieva, KM., Correa, I., Josephs, DH., Karagiannis, P., Egbuniwe, IU., Cafferkey, MJ., Spicer, JF., Harries, M., Nestle, FO., Lacy, KE., Karagiannis, SN. *Effects of BRAF mutations and BRAF inhibition on immune responses to melanoma*. Mol Cancer Ther 13(12), 2769-83 (2014).
- Imbert, V., Peyton, JF. *NF-kB in hematological malignancies*. Biomedicines 5, 27 (2017).
- Ishimaru, N., Kishimoto, H., Hayashi, Y., Sprent, J. *Regulation of naive T cell function by the NF-kappaB2 pathway*. Nat Immunol 7(7), 763-72 (2006).
- Ishinaga, H., Jono, H., Lim, JH., Kweon, SM., Xu, H., Ha, UH., Xu, H., Koga, T., Yan, C., Feng, XH., Chen, LF., Li, JD. *TGF-beta induces p65 acetylation to enhance bacteria-induced NF-kappaB activation*. EMBO J 26(4), 1150-62 (2007).
- Ivanov, VN., Fodstad, O., Ronai, Z. *Expression of ring finger-deleted TRAF2 sensitizes metastatic melanoma cells to apoptosis via up-regulation of p38, TNFalpha and suppression of NF-kappaB activities*. Oncogene 20(18), 2243-53 (2001).

- Jafri, MA., Ansari, SA., Alqahtani, MH., Shay, JW. *Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies*. *Genome Medicine* 8(69) (2016).
- Jamaluddin, M., Wang, S., Boldogh, I., Tian, B., Brasier, AR. *TNF-alpha-induced NF-kappaB/RelA Ser(276) phosphorylation and enhanceosome formation is mediated by an ROS-dependent PKAc pathway*. *Cell Signal* 19(7), 1419-33 (2007).
- Jiménez Fernández, D., Lamkanfi, M. *Inflammatory caspases: key regulators of inflammation and cell death*. *Biol Chem* 396(3), 193-203 (2015).
- Joha, S., *Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase sur le modèle de leucémie myéloïde chronique*. (2009)
- Johnson, JP., Stade, BG., Holzmann, B., Schwäble, W., Riethmüller, G. *De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(2), 641-4 (1989).
- Jost, PJ., Ruland, J. *Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications*. *Blood* 109(7), 2700-7 (2007).
- Julian, L., Olson, MF. *Apoptotic membrane dynamics in health and disease*. *Cell Health and Cytoskeleton* 2015:7, 133-142 (2015).
- Kang, KH., Lee, KH., Kim, MY., Choi, KH. *Caspase-3-mediated cleavage of the NF-kappa B subunit p65 at the NH2 terminus potentiates naphthoquinone analog-induced apoptosis*. *J Biol Chem* 276(27), 24638-44 (2001).
- Kanwal, R., Gupta, S. *Epigenetic modifications in cancer*. *Clin Genet* 81(4), 303-11 (2012 Apr).
- Karin, M., Lin, A. *NF-kappaB at the crossroads of life and death*. *Nat Immunol* 3(3), 221-7 (2002).
- Kashani-Sabet, M., Shaikh, L., Miller, JR 3rd., Nosrati, M., Ferreira, CM., Debs, RJ., Sagebiel, RW. *NF-kappa B in the vascular progression of melanoma*. *J Clin Oncol* 22(4), 617-23 (2004).
- Karin, M. Lin, A. *NF-kappaB at the crossroads of life and death*. *Nature Immunology* 3(3), 221-7 (2002).
- Kasof, GM., Prosser, JC., Liu, D., Lorenzi, MV., Gomes, BC. *The RIP-like kinase, RIP3, induces apoptosis and NF-kappaB nuclear translocation and localizes to mitochondria*. *FEBS Lett* 473(3), 285-91 (2000).
- Katayoun, I., Richmond, A., et Richmond, A. *Role of nuclear factor-kB in melanoma*. *Cancer and Metastasis* 24(2), 301-313 (2005).
- Kater, AP., van Oers, MH., Kipps, TJ., *Cellular immune therapy for chronic lymphocytic leukemia*. *Blood* 110(8), 2811-8 (2007).
- Kaufmann, SH. *Imatinib spells BAD news for Bcr/abl-positive leukemias*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(40), 14651-2 (2006).
- Kim, HE., Du, F., Fang, M., Wang, X. *Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(49), 17545-50 (2005).
- Kim, HS., Chang, I., Kim, JY., Choi, KH., Lee, MS. *Caspase-mediated p65 cleavage promotes TRAIL-induced apoptosis*. *Cancer Res* 65(14), 6111-9 (2005).

- Kim, JH., Chu, SC., Gramlich, JL., Pride, YB., Babendreier, E., Chauhan, D., Salgia, R., Podar, K., Griffin, JD., Sattler, M. Activation of the PI3K/mTOR pathway by BCR-ABL contributes to increased production of reactive oxygen species. *Blood* 105(4), 1717-23 (2005).
- Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., Baran, Y. *Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis*. *Tumour Biol* 37(7), 8471-86 (2016).
- Kirchner, D., Duyster, J., Ottmann, O., Schmid, RM., Bergmann, L., Munzert, G. *Mechanisms of Bcr-Abl-mediated NF- κ B/Rel activation*. *Exp Hematol* 31, 504-511 (2003).
- Kleinberg, L., Dong, HP., Holth, A., Risberg, B., Trope', CG., Nesland, JM., Flørenes, VA., Davidson, B. *Cleaved caspase-3 and nuclear factor-kappaB p65 are prognostic factors in metastatic serous ovarian carcinoma*. *Hum Pathol* 40(6), 795-806 (2009).
- Koh, HK. *Cutaneous melanoma*. *N. Engl. J. Med.* 325(3), 171-82 (1991).
- Krakstad, C., Chekenya, M. *Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics*. *Mol Cancer* 9, 135 (2010).
- Krappmann, D., Scheidereit, C. *A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of IkappaB kinase pathways*. *EMBO Rep* 6(4), 321-6 (2005).
- Kroemer, G., Dallaporta, B., Resche-Rigon, M. *The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis*. *Annual Review Physio.* 60, 619-42 (1998).
- Kuo, MT., Liu, Z., Wei, Y., Lin-Lee, YC., Tatebe, S., Mills, GB., Unate, H. *Induction of human MDRI gene expression by 2-acetylaminofluorene is mediated by effectors of the phosphoinositide 3-kinase pathway that activate NF-kappaB signaling*. *Oncogene* 21(13), 1945-54 (2002).
- Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P. *Caspases in cell survival, proliferation and differentiation*. *Cell Death Differ* 14(1), 44-55 (2007).
- Lander, AD., Kimble, J., Clevers, H., Fuchs, E., Montarras, D., Buckingham, M., Calof, AF., Trumpp, A., Oskarsson, T. *What does the concept of the stem cell niche really mean today?* *BMC Biology* 9, 10-19 (2012).
- Langley, RR., Carlisle, R., Ma, L., Specian, RD., Gerritsen, ME., Granger, DN. *Endothelial expression of vascular cell adhesion molecule-1 correlates with metastatic pattern in spontaneous melanoma*. *Microcirculation* 8(5), 335-45 (2001).
- Leung, TH., Hoffmann, A., Baltimore, D. *One nucleotide in a kappaB site can determine cofactor specificity for NF-kappaB dimers*. *Cell* 118(4):453-64 (2004).
- Levkau, B., Scatena, M., Giachelli, CM., Ross, R., Raines, EW. *Apoptosis overrides survival signals through a caspase-mediated dominant-negative NF-kappa B loop*. *Nat Cell Biol* 1(4), 227-33 (1999).
- Li, H., Chiappinelli, KB., Guzzetta, AA., Easwaran, H., Yen, RW., Vatapalli, R., Topper, MJ., Luo, J., Connolly, RM., Azad, NS., Stearns, V., Pardoll, DM., Davidson, N., Jones, PA., Slamon, DJ., Baylin, SB., Zhanow, CA., Ahuja, N. *Immune regulation by low doses of the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacitidine in common human epithelial cancers*. *Oncotarget* 5(3) 587-98 (2014).
- Li, J., McQuade, T., Siemer, AB., Napetschnig, J., Moriwaki, K., Hsiao, YS., Damko, E., Moquin, D., Walz, T., McDermott, A., Chan, FK., Wu, H. *The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis*. *Cell* 150(2), 339-50 (2012).
- Li, M., Feng, S., Wu, M. *Multiple roles for nuclear localization signal (NLS, aa 442-472) of receptor interacting protein 3 (RIP3)*. *Biochem Biophys Res Commun* 372(4), 850-5 (2008).

- Lim, SO., Li, CW., Xia, W., Cha, JH., Chan, LC., Wu, Y., Chang, SS., Lin, WC., Hsu, JM., Hsu, YH., Kim, T., Chang, WC., Hsu, JL., Yamaguchi, H., Ding, Q., Wang, Y., Yang, Y., Chen, CH., Sahin, AA., Yu, D., Hortobagyi, GN., Hung, MC. *Deubiquitination and Stabilization of PD-L1 by CSN5*. *Cancer Cell* 30(6), 925-939 (2016).
- Lin, Z., Zhang, Q., Luo, W. *Angiogenesis inhibitors as therapeutic agents in cancer: Challenges and future directions*. *Eur J Pharmacol* 793, 76-81 (2016).
- Ling, L., Cao, Z., Goeddel, DV. *NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7), 3792-7 (1998).
- Liptay, S., Schmid, RM., Nabel, EG., Nabel, GJ. *Transcriptional regulation of NF-kappa B2: evidence for kappa B-mediated positive and negative autoregulation*. *Mol Cell Biol* 14(12), 7695-703 (1994).
- Liu, M., Sakamaki, T., Casimiro, MC., Willmarth, NE., Quong, AA., Ju, X., Ojeifo, J., Jiao, X., Yeow, WS., Katiyar, S., Shirley, LA., Joyce, D., Lisanti, MP., Albanese, C., Pestell, RG. *The canonical NF-kappaB pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion*. *Cancer Res* 70(24), 10464-73 (2010).
- Lo, JA., Fisher, DE. *The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics*. *Science* 346(6212), 945-9 (2014).
- Lowe, SW., Sherr, CJ. *Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles*. *Current Opinion Genetic Development* 13(1), 77-83 (2003).
- Magister, S., Kos, J. *Cystatins in immune system*. *J Cancer* 4(1), 45-56 (2013).
- Martinez-Climent, JA., Fontan, L., Gascoyne, RD., Siebert, R., Prosper, F. *Lymphoma stem cells: enough evidence to support their existence?* *Haematologica* 95(2), 293-302 (2010).
- Mancini, M., Petta, S., Martinelli, G., Barbieri, E., Santucci, M.A., *RAD 001 (Everolimus) Prevents mTOR and Akt Late Re-Activation in Response to Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia*. *Journal of Cellular Biochemistry* 109, 320-328 (2010).
- Martinon, F., Holler, N., Richard, C., Tschopp, J. *Activation of a pro-apoptotic amplification loop through inhibition of NF-kappaB-dependent survival signals by caspase-mediated inactivation of RIP*. *FEBS Lett* 468(2-3), 134-6 (2000).
- Matsuoka, H., Sano, GI., Hattori, R., Tomita, H., Yamamoto, DS., Hirai, M. *One injection of DsRed followed by bites from transgenic mosquitoes producing DsRed in the saliva elicits a high titer of antibody in mice*. *Tropical Med Health* 40(2), 47-53 (2012).
- Mauzon, M. *Les cellules souches hématopoïétiques : définition, origines et principales utilisations thérapeutiques* Thèse de sciences biologie cellulaire (2011).
- McNulty, SE., Tohidian, NB., Meyskens, FL. Jr. *RelA, p50 and inhibitor of kappa B alpha are elevated in human metastatic melanoma cells and respond aberrantly to ultraviolet light B*. *Pigment Cell Research* 14(6), 456-65 (2001).
- Menzies, AM., Long, GV. *Systemic treatment for BRAF-mutant melanoma: where do we go next?* *Lancet Oncology* 15(9), e371-81 (2014).
- Menzies, AM., Long, GV. *Dabrafenib and trametinib, alone and in combination for BRAF-mutant metastatic melanoma*. *Clinic Cancer Res.* 20(8), 2035-43 (2014).
- Mercurio, F., Didonato, J., Rosette, C., Karin, M. *Molecular cloning and characterization of a novel Rel/NF-kappa B family member displaying structural and functional homology to NF-kappa B p50/p105*. *DNA Cell Biol* 11(7), 523-37 (1992).

- Mercurio, F., DiDonato, JA., Rosette, C., Karin, M. *p105 and p98 precursor proteins play an active role in NF-kappa B-mediated signal transduction*. *Genes Dev* 7(4), 705-18 (1993).
- Meylan, E., Martinon, F., Thome, M., Gschwendt, M., Tschopp, J. *RIP4 (DIK/PKK), a novel member of the RIP kinase family, activates NF-kappa B and is processed during apoptosis*. *EMBO Rep* 3(12), 1201-8 (2002).
- Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M., Tschopp, J. *RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation*. *Nat Immunol* 5(5), 503-7 (2004).
- Meylan, E., Tschopp, J. *The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress*. *Trends Biochem Sci* 30(3), 151-9 (2005).
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., Tschopp, J. *NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP*. *Molecular Cell Biology* 21(16), 5299-305 (2001).
- Mitchell, S., Vargas, J., Hoffmann, A. *Signaling via the NFkB system*. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 8(3), 227-41 (2016).
- Momoi, T. *Caspases involved in ER stress-mediated cell death*. *J Chem Neuroanat* 28(1-2), 101-5 (2004).
- Mooi, WJ., *Diagnosis of thin melanoma*. *J. Clinic Pathology* 50(3), 179-80 (1997).
- Moore, KA., Lemischka, IR. *Stem cells and their niches*. *Science* 311(5769), 1880-5 (2006).
- Moriwaki, K., Chan, FK. *Necrosis-dependent and independent signaling of the RIP kinases in inflammation*. *Cytokine Growth Factor Rev* 25(2), 167-74(2014).
- Moriwaki, K., Chan, FK. *RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation*. *Genes Dev* 27(15), 1640-9 (2013).
- Mosaad, YM. *Hematopoietic stem cells: an overview*. *Transfus Apher Sci* 51(3), 68-82 (2014).
- Moschoi, R., Imbert, V., Nebout, M., Chiche, J., Mary, D., Prebet, T., Saland, E., Castellano, R., Pouyet, L., Collette, Y., Vey, N., Chabannon, C., Recher, C., Sarry, JE., Alcor, D., Peyron, JF., Griessinger, E. *Protective mitochondrial transfert from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy*. *Blood* 128(2), 253-64 (2016).
- Mowla, SN., Perkins, ND., Jat, PS. *Friend or foe: emerging role of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells in cell senescence*. *Onco Targets Ther* 6, 1221-9 (2013).
- Müller, JR., Siebenlist, U. *Lymphotoxin beta receptor induces sequential activation of distinct NF-kappa B factors via separate signaling pathways*. *J Biol Chem* 278(14), 12006-12 (2003).
- Muñoz-Couselo, E., García, JS., Pérez-García, JM., Cebrián, VO., Castán, JC. *Recent advances in the treatment of melanoma with BRAF and MEK inhibitors*. *Ann Transl Med* 3(15), 207 (2015).
- Muz, B., de la Puente, P., Azab, F., Azab, AK. *The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy*. *Hypoxia (Auckl)* 3, 83-92 (2015).
- Nakano, H., Shindo, M., Sakon, S., Nishinaka, S., Mihara, M., Yagita, H., Okumura, K. *Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7), 3537-42 (1998).

- Nakshatri, H., Bhat-Nakshatri, P., Martin, DA., Goulet, RJ. Jr., Sledge, GW. Jr. *Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth.* *Molecular Cells Biology* 17(7), 3629-39 (1997).
- Naumann, M. and Scheidereit, C. *Activation of NF-kappa B in vivo is regulated by multiple phosphorylations.* *EMBO J* 13(19), 4597-607 (1994).
- Neuzil, J., Schroder, A., von Hundelshausen, P., Zerneck, A., Weber, T., Gellert, N., et al. *Inhibition of inflammatory endothelial responses by a pathway involving caspase activation and p65 cleavage.* *Biochemistry* 40, 4686–4692 (2001).
- Newton, K., Sun, X., Dixit, VM. *Kinase RIP3 is dispensable for normal NF-kappa Bs, signaling by the B-cell and T-cell receptors, tumor necrosis factor receptor 1, and Toll-like receptors 2 and 4.* *Mol Cell Biol* 24(4), 1464-9 (2004).
- Neznanov, N., Chumakov, KM., Neznanova, L., Almasan, A., Banerjee, AK., Gudkov, AV. *Proteolytic cleavage of the p65-RelA subunit of NF-kappaB during poliovirus infection.* *J Biol Chem* 280(25), 24153-8 (2005).
- Novack, DV., Yin, L., Hagen-Stapleton, A., Schreiber, RD., Goeddel, DV., Ross, FP., Teitelbaum, SL. *The IkappaB function of NF-kappaB2 p100 controls stimulated osteoclastogenesis.* *J Exp Med* 198(5), 771-81 (2003).
- Nugues, AL., El Bouazzati, H., Héтуin, D., Berthon, C., Loyens, A., Bertrand, E., Jouy, N., Idziorek, T., Quesnel, B. *RIP3 is downregulated in human myeloid leukemia cells and modulates apoptosis and caspase-mediated p65/RelA cleavage.* *Cell Death Dis* 5, e1384 (2014).
- Ofengeim, D., Yuan, J. *Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death.* *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(11), 727-36 (2013).
- Ostyn, P., *Facteurs inflammatoires et contrôle de la quiescence/activation des cellules souches tumorales de mélanome.* Thèse de Sciences (2016).
- Parker, H., Strefford, JC. *The mutational signature of chronic lymphocytic leukemia.* *Biochem J* 473(21), 3725-3740 (2016).
- Parmiter, AH., Nowell, PC. *Cytogenetics of melanocytic tumors.* *J. Invest. Dermatology* 100(3) 254S-258S (1993).
- Pazdernik, NJ., Donner, DB., Goebel, MG., Harrington, MA. *Mouse receptor interacting protein 3 does not contain a caspase-recruiting or a death domain but induces apoptosis and activates NF-kappaB.* *Mol Cell Biol* 19(10), 6500-8 (1999).
- Pelayo, R., Dorantes-Acosta, E., Vadillo, E., Fuentes-Panana, E. “*From HSC to B-Lymphoid Cells in Normal and Malignant Hematopoiesis*”, *Advances in Hematopoietic Stem Cell Research*, Dr. Rosana Pelayo (Ed.), InTech (2012), Chapter 13. DOI: 10.5772/32213.
- Peng, J., Hamanishi, J., Matsumura, N., Abiko, K., Murat, K., Baba, T., Yamaguchi, K., Horikawa, N., Hosoe, Y., Murphy, SK., Konishi, I., Mandai, M. *Chemotherapy Induces Programmed Cell Death-Ligand 1 Overexpression via the Nuclear Factor- κ B to Foster an Immunosuppressive Tumor Microenvironment in Ovarian Cancer.* *Cancer Res* 75(23), 5034-45 (2015).
- Perkins, ND. *Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway.* *Oncogene* 25(51), 6717-30 (2006).
- Pettijohn, EM., Ma, S. *Targeted Therapy in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL).* *Curr Hematol Malig Rep* 12(1), 20-28 (2017).

- Pomerantz, JL., Baltimore, D. *Two pathways to NF-kappaB*. Mol Cell 10(4), 693-5 (2002).
- Prada-Arismendy, J., Arroyave, JC., Röthlisberger, S. *Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia*. Blood Rev 31(1), 63-76 (2017).
- Pradère, JP., Hernandez, C., Koppe, C., Friedman, RA., Luedde, T., Schwabe, RF. *Negative regulation of NF- κ B p65 activity by serine 536 phosphorylation*. Sci Signal 9(442): ra85 (2016).
- Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, MS., Fullen, DR., Johnson, TM., Morrison, SJ. *Efficient tumor formation by single human melanoma cells*. Nature 456(7222), 593-8 (2008).
- Quivy, V., Van Lint, C. *Regulation at multiple levels of NF-kappaB-mediated transactivation by protein acetylation*. Biochem Pharmacol 68(6), 1221-9 (2004).
- Ravi, R., Bedi, A., Fuchs, EJ., Bedi, A. *CD95 (Fas)-induced caspase-mediated proteolysis of NF-kappaB*. Cancer Res 58(5), 882-6 (1998).
- Ravi, R., Bedi, GC., Engstrom, LW., Zeng, Q., Mookerjee, B., Gélinas, C., Fuchs, EJ., Bedi, A. *Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB*. Nature Cell Biology 3(4), 409-16 (2001).
- Rebsamen, M., Heinz, LX., Meylan, E., Michallet, MC., Schroder, K., Hofmann, K., Vazquez, J., Benedict, CA., Tschopp, J. *DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF-kappaB*. EMBO Rep 10(8), 916-22 (2009).
- Regad, T. *Molecular and cellular pathogenesis of melanoma initiation and progression*. Cell Mol Life Sci 70(21), 4055-65 (2013).
- Reshkin, SJ., Greco, MR., Cardone, RA. *Role of pHi, and proton transporters in oncogene-driven neoplastic transformation*. Philosophical Transaction Royal Society B 369 (2016).
- Reuther, JY., Reuther, GW., Cortez, D., Pendergast, AM., Baldwin, AS. Jr. *A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl mediated transformation*. Genes Development 12(7) 968-81 (1998).
- Reya, T., Morrison, SJ., Clarke, MF., Weissman, IL. *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature 414(6859), 105-11 (2001).
- Ricca, A., Biroccio, A., Trisciuglio, D., Cippitelli, M., Zupi, G., Del Bufalo, D. *relA over-expression reduces tumorigenicity and activates apoptosis in human cancer cells*. Br J Cancer 85(12), 1914-21 (2001).
- Rice, NR., MacKichan, ML., Israël, A. *The precursor of NF-kappa B p50 has I kappa B-like functions*. Cell 71(2), 243-53 (1992).
- Rofstad, EK., Halsør, EF. *Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts*. Cancer Res 60(17), 4932-8 (2000).
- Routier, E., Robert, C., Mateus, C. *Immunotherapies and melanoma*. Bulletin Cancer 101, S13-24 (2014).
- Santos, FP., Kantarjian, H., Quintas-Cardama, A., Cortes, J. *Evolution of therapies for chronic myelogenous leukemia*. Cancer J. 17(6), 465-76 (2011).
- Sarbassov, DD., Ali, SM., Sabatini, DM. *Growing roles for the mTOR pathway*. Current. Opinion Cell Biology. 17(6), 596-603 (2005)

- Saudemont, A., Quesnel, B. *In a model of tumor dormancy, long-term persistent leukemic cells have increased B7-H1 and B7.1 expression and resist CTL-mediated lysis.* Blood 104(7), 2124-33 (2004).
- Saudemont, A., Jouy, N., Hetuin, D., Quesnel, B. *NK cells that are activated by CXCL10 can kill dormant tumor cells that resist CTL-mediated lysis and can express B7-H1 that stimulates T cells.* Blood 105(6), 2428-35 (2005).
- Saudy, NS., Fawzy, IM., Azmy, E., Goda, EF., Eneen, A., Abdul Salam, EM. *BMI1 gene expression in myeloid leukemias and its impact on prognosis.* Blood Cells Molecular Disease 53(4), 194-8 (2014).
- Sen, R., Baltimore, D. *Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism.* Cell 47(6) 921-8 (1986).
- Sertaridou, E., Papaioannou, V., Kolios, G., Pneumatikos, I. *Gut failure in critical care: old school versus new school.* Ann Gastroenterol 28(3), 309-322 (2015).
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., Kumar, S. *Old, new and emerging functions of caspases.* Cell Death Differ 22(4), 526-39 (2015).
- Shattuck-Brandt, RL., Richmond, A. *Enhanced degradation of I-kappaB alpha contributes to endogenous activation of NF-kappaB in Hs294T melanoma cells.* Cancer Res 57(14), 3032-9 (1997).
- Shay, JW., Wright WE. *Role of telomeres and telomerase in cancer.* Semin Cancer Biology 21(6), 349-353 (2011).
- Shen, RR., Hahn, WC. *Emerging roles for the non-canonical IKKs in cancer.* Oncogene 30(6), 631-41 (2011).
- Shenenberger, DW. *Cutaneous malignant melanoma: a primary care perspective.* Am. Fam. Physician 85(2), 161-8 (2012).
- Shigdar, S., Li, Y., Bhattacharya, S., O'Connor, M., Pu, C., Lin, J., Wang, T., Xiang, D., Kong, L., Wei, MQ., Zhu, Y., Zhou, S., Duan, W. *Inflammation and cancer stem cells.* Cancer Lett 345(2), 271-8 (2014).
- Shih, IM., Herlyn, M. *Autocrine and paracrine roles for growth factors in melanoma.* In Vivo 8(1), 113-23 (1994).
- Shih, VF., Tsui, R., Caldwell, A., Hoffmann, A. *A single NFkB system for both canonical and non-canonical signaling.* Cell Res 21(1), 86-102 (2011).
- Short, NJ., Ravandi, F., *Acute myeloid leukemia: Past, present, and prospects for the future.* Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia. 16(S1), 25-29 (2016).
- Sondak, VK., Ross, MI., Schuchter LM. *Early stage (I, II, III) melanoma.* Current Treatment Options Oncology 2(3), 183-91 (2001).
- Sosa, MS., Bragado, P., Aguirre-Ghiso, JA. *Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field.* Nat Rev Cancer 14(9), 611-22 (2014).
- Sovak, MA., Bellas, RE., Kim, DW., Zanieski, GJ., Rogers, AE., Traish, AM., Sonenshein, GE. *Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer.* J Clin Invest. 100(12), 2952-60 (1997).
- Spagnolo, F., Ghiorzo, P., Queirolo, P. *Overcoming resistance to BRAF inhibition in BRAF-mutated metastatic melanoma.* Oncotarget 5(21), 10206-21 (2014).

- Steelman, LS., Pohnert, SC., Shelton, JG., Franklin, RA., Bertrand, FE., McCubrey, JA. *JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR/ABL in cell cycle progression and leukemogenesis*. *Leukemia* 18(2), 189-218, (2004)
- Stirewalt, DL., Meshinchi, S., Radich, JP. *Molecular targets in acute myelogenous leukemia*. *Blood Rev* 17(1), 15-23 (2003).
- Su, HC., Lenardo, MJ. *Genetic defects of apoptosis and primary immunodeficiency*. *Immunology Allergy Clinic North American* 28(2) 329-51 (2008).
- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., Wang, L., Yan, J., Liu, W., Lei, X., Wang, X. *Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase*. *Cell* 148(1-2), 213-27 (2012).
- Sun, W., Schuchter, LM. *Metastatic melanoma*. *Current Treatment Options Oncology* 2(3), 193-202 (2001).
- Sun, X., Lee, J., Navas, T., Baldwin, DT., Stewart, TA., Dixit, VM. *RIP3, a novel apoptosis-inducing kinase*. *J Biol Chem* 274(24), 16871-5 (1999).
- Sun, X., Yin, J., Starovasnik, MA., Fairbrother, WJ., Dixit, VM. *Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptor-interacting protein (RIP) by RIP3*. *J Biol Chem* 277(11), 9505-11 (2002).
- Testa, U. *Leukemia stem cells*. *Ann Hematol* 90(3), 245-71 (2011).
- Tucker, E., O'Donnell, K., Fuchsberger, M., Hilton, AA., Metcalf, D., Greig, K., Sims, NA., Quinn, JM., Alexander, WS., Hilton, DJ., Kile, BT., Tarlinton, DM., Starr, R. *A novel mutation in the *Nfkb2* gene generates an NF-kappa B2 "super repressor"*. *J Immunol* 179(11), 7514-22 (2007).
- Turhan, A.G. *Leucémie myéloïde chronique : actualités biologiques et thérapeutiques*. *Bull Cancer* 92 (1), 75-82 (2004).
- Ueda, Y., Richmond, A. *NF-kappaB activation in melanoma*. *Pigment Cell Res* 19(2), 112-24 (2006).
- Um, JH., Kang, CD., Lee, BG., Kim, DW., Chung, BS., Kim, SH. *Increased and correlated nuclear factor-kappa B and Ku autoantigen activities are associated with development of multidrug resistance*. *Oncogene* 20(42), 6048-56 (2001).
- van de Stolpe, A., Caldenhoven, E., Stade, BG., Koenderman, L., Raaijmakers, JA., Johnson, JP., van der Saag, PT. *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and tumor necrosis factor alpha-mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone. Functional analysis of the human intercellular adhesion molecular-1 promoter*. *J Biol Chem* 269(8), 6185-92 (1994).
- Vandenabeele, P., Declercq, W., Van Herreweghe, F., Vanden Berghe, T. *The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis*. *Sci Signal* 3(115), re4 (2010).
- Vakana, E., Sassano, A., Plataniias, L.C., *Induction of autophagy by dual mTORC1-mTORC2 inhibition in BCR-ABL expressing leukemic cells*. *Autophagy* 6 (7), 966-967 (2010).
- Vereecque, R., Buffenoir, G., Gonzalez, R., Preudhomme, C., Fenaux, P., Quesnel, B. *A new murine aggressive leukemic model*. *Leukemia Research* 23(4), 415-6 (1999)
- Vereecque, R., Saudemont, A., Quesnel, B. *Cytosine arabinoside induces costimulatory molecule expression in acute myeloid leukemia cells*. *Leukemia* 18(7), 1223-30 (2004).

- Vermeulen, L., De Wilde, G., Notebaert, S., Vanden Berghe, W., Haegeman, G. *Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor-kappaB p65 subunit*. *Biochem Pharmacol* 64(5-6), 963-70 (2002).
- Viatour, P., Merville, MP., Bours, V., Chariot, A. *Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation*. *Trends Biochem Sci* 30(1), 43-52 (2005).
- Viennois, E., Chen, F., Merlin, D. *NF-kB pathway in colitis-associated cancers*. *Transl Gastrointest Cancer* 2(1), 21-29 (2013).
- Vucic, D., Stennicke, HR., Pisabarro, MT., Salvesen, GS., Dixit, VM. *ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas*. *Current Biology* 10(21), 1359-66 (2000).
- Wang, CY., Mayo, MW., Korneluk, RG., Goeddel, DV., Baldwin AS. Jr. *NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 AND traf2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation*. *Science* 281(5383), 1680-3 (1998).
- Wang, CY., Cusack, JC Jr., Liu, R., Baldwin, AS Jr. *Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB*. *Nat Med* 5(4), 412-7 (1999).
- Wang, D., Yang, W., Du, J., Devalaraja, MN., Liang, P., Matsumoto, K., Tsubakimoto, K., Endo, T., Richmond, A. *MGSA/GRO-mediated melanocyte transformation involves induction of Ras expression*. *Oncogene* 19(40), 4647-59 (2000).
- Wang, T., Shigdar, S., Gantier, MP., Hou, Y., Wang, L., Li, Y., Shamaileh, HA., Yin, W., Zhou, SF., Zhao, X., Duan, W. *Cancer stem cell targeted therapy: progress amid controversies*. *Oncotarget* 6(42), 44191-206 (2015).
- Wang, W., Abbruzzese, JL., Evans, DB., Larry, L., Cleary, KR., Chiao, PJ. *The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells*. *Clinic Cancer Research* 5(1), 119-27 (1999).
- Werner, SL., Barken, D., Hoffmann, A. *Stimulus specificity of gene expression programs determined by temporal control of IKK activity*. *Science* 309(5742), 1857-61 (2005).
- Wier, EM., Fu, K., Hodgson, A., Sun, X., Wan, F. *Caspase-3 cleaved p65 fragment dampens NF-kB-mediated anti-apoptotic transcription by interfering with the p65/RPS3 interaction*. *FEBS Lett* 589(23), 3581-7 (2015).
- Xiao, G., Harhaj, EW., Sun, SC. *NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100*. *Mol Cell* 7(2), 401-9 (2001).
- Yang, J., Richmond, A. *Constitutive IkappaB kinase activity correlates with nuclear factor-kappaB activation in human melanoma cells*. *Cancer Res* 61(12), 4901-9 (2001).
- Yang, Y., Ma, J., Chen, Y., Wu, M. *Nucleocytoplasmic shuttling of receptor-interacting protein 3 (RIP3): identification of novel nuclear export and import signals in RIP3*. *J Biol Chem* 279(37), 38820-9 (2004).
- Yaron, A., Hatzubai, A., Davis, M., Lavon, I., Amit, S., Manning, AM., Andersen, JS., Mann, M., Mercurio, F., Ben-Neriah, Y. *Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase*. *Nature* 396(6711), 590-4 (1998).

- Yeh, DW., Huang, LR., Chen, YW., Huang, CF., Chuang, TH. *Interplay between Inflammation and Stemness in Cancer Cells: The Role of Toll-Like Receptor Signaling*. J Immunol Res 2016, 4368101 (2016).
- Yu, H., Wu, M., Wen, B., Sun, N., Xiang, D., Zhang, J., Zhu, S., Weng, S., Yu, Y., Han, W. *Antagonist effect of interleukin 1 receptor on normal thymopoiesis and thymus toxicity of 5-azacytidine in mouse*. American J Transl Res 8(2) 1237-45 (2016).
- Yu, PW., Huang, BC., Shen, M., Quast, J., Chan, E., Xu, X., Nolan, GP., Payan, DG., Luo, Y. *Identification of RIP3, a RIP-like kinase that activates apoptosis and NFkappaB*. Curr Biol 9(10), 539-42 (1999).
- Zhang, D., Lin, J., Han, J. *Receptor-interacting protein (RIP) kinase family*. Cell Mol Immunol 7(4), 243-9 (2010).
- Zhang, DW., Shao, J., Lin, J., Zhang, N., Lu, BJ., Lin, SC., Dong, MQ., Han, J. *RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis*. Science 325(5938), 332-6 (2009).
- Zhang, Q., Lenardo, MJ., Baltimore, D. *30 Years of NF-kB: A blossoming of relevance to human pathobiology*. Cell 168(1-2) 37-57 (2017).
- Zhao, J., Jitkaew, S., Cai, Z., Choksi, S., Li, Q., Luo, J., Liu, ZG. *Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis*. Proc Natl Acad Sci USA 109(14), 5322-7 (2012).
- Zhou H, Xu R. *Leukemia stem cells: the root of chronic myeloid leukemia*. Protein Cell 6(6), 403-12 (2015).
- Zhou, G., Kuo, MT. *NF-kappaB-mediated induction of mdr1b expression by insulin in rat hepatoma cells*. J Biol Chem 272(24), 15174-83 (1997).
- Zhou, J., Ching, YQ., Chng, WJ. *Aberrant nuclear factor-kappa B activity in acute myeloid leukemia: from molecular pathogenesis to therapeutic target*. Oncotarget 6(8), 5490-500 (2015).
- Zhou, W., Yuan, J. *Necroptosis in health and diseases*. Semin Cell Dev Biol 35, 14-23 (2014).