



**HAL**  
open science

# Coopération entre les isoformes TAp73 et la signalisation TGF- $\beta$ dans la régulation de l'expression de la NO Synthase inductible

Aimeric Cabrié

► **To cite this version:**

Aimeric Cabrié. Coopération entre les isoformes TAp73 et la signalisation TGF- $\beta$  dans la régulation de l'expression de la NO Synthase inductible. Immunité innée. Université Paris-Saclay, 2017. Français. NNT : 2017SACLS397 . tel-01968024

**HAL Id: tel-01968024**

**<https://theses.hal.science/tel-01968024>**

Submitted on 2 Jan 2019

**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.

# Coopération entre les isoformes TAp73 et le TGF- $\beta$ dans la régulation de l'expression de la NO Synthase inductible

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Université Paris Sud

École doctorale n°568 BIOSIGNE  
Signalisations et réseaux intégratifs en biologie

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 18 Décembre 2017, par

**Aimeric Cabrié**

Composition du Jury :

Karim Benihoud Professeur, Université Paris Sud (UMR 8203)	Président
Catherine Paul Maître de conférences, Université de Dijon (UMR 866)	Rapporteuse
Richard Tomasini Directeur de recherche, Université d'Aix-Marseille (UMR 1068)	Rapporteur
Anny Slama-Schwok Directrice de recherche, Institut Gustave Roussy (UMR 8200)	Examinatrice
Franck Verrecchia Directeur de recherche, Université de Nantes (UMR 1238)	Examineur
Michel Lepoivre Directeur de recherche, Université Paris Sud (UMR 9198)	Directeur de thèse



*« Mystérieuse splendeur des choses vitales.  
Beauté inimitable, inintelligible, impoſſédable.  
Aimer, ce n'est pas pouvoir poſſéder. »*

*Jean Rostand – Carnet d'un biologiste (1959)*



# REMERCIEMENTS

Pour entamer cette série de remerciements, je tiens à exprimer ma reconnaissance envers tous les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ces travaux : le Pr. Karim Benihoud (Président), la Dr Catherine Paul (rapporteuse), le Dr Richard Tomasini (rapporteur), la Dr Anny Slama-Schwok (examinatrice) et le Dr Franck Verrecchia (examineur). Je salue tout particulièrement Karim Benihoud pour avoir suivi mes travaux tout au long de ma thèse et pour tous ses bons conseils.

Il y a tant d'autres personnes pour lesquelles je souhaite exprimer ma gratitude après ces quatre années de thèse ! Mais je vais commencer par Michel Lepoivre, qui a accepté de me faire confiance dans cette longue aventure commencée en stage de Master. Michel, je ne te remercierai jamais assez pour toutes les compétences scientifiques que tu as su m'apporter, et pour avoir été un directeur de thèse aussi impliqué auprès de moi. Un immense merci aussi à Olivier Guittet, avec qui j'ai partagé mon bureau durant tout ce temps. Merci pour ton incroyable gentillesse et pour ton soutien au jour le jour durant tout ce temps. Ensemble, nous avons traversé des moments excitants mais aussi des moments de doutes. Malgré cela, vous êtes toujours montrés disponibles et à l'écoute de mes propositions et de mes interrogations.

Parmi les autres personnes sans lesquelles ces travaux n'auraient pas pu exister, je tiens à remercier : Richard Tomasini pour son don très généreux des fibroblastes immortalisés sur lesquels reposent une grande partie de ces expériences, Fadel Tissir pour nous avoir permis de travailler sur des souris transgéniques conçues dans son laboratoire, et Philippe Vincendeau pour nous avoir fait profiter de son expertise des trypanosomes. Je souhaite également remercier Jean-Claude Drapier et Cécile Bouton, avec qui notre équipe a beaucoup interagit. Nos échanges ont toujours été très enrichissants. Merci à Corinne Dupuy pour son regard avisé sur nos travaux, j'espère très sincèrement que la collaboration pourra se poursuivre. Merci enfin à Boris Julien et Camille Le Guilcher, avec qui nous avons beaucoup échangé autour de nos thématiques finalement très voisines. Un grand merci à eux pour les nombreux efforts auxquels ils ont consenti pour développer notre sujet d'étude autour de modèles cellulaires hépatiques.

Si ces années m'ont paru si agréables, c'est aussi grâce à toutes les personnes que j'ai pu croiser dans les couloirs de notre laboratoire et avec lesquelles je me suis si bien entendu. Je tiens tout particulièrement à remercier Jean Kanellopoulos, une personne extraordinaire et un conteur intarissable, merci pour toutes ces histoires hilarantes et pour ce soutien infaillible. Merci beaucoup à Amel Rayah qui m'a aussi beaucoup soutenu lors du concours et de ma première année de thèse. Je regrette que nous n'ayons pas eu plus de temps à partager ! Un immense merci aussi à Pierre Bobé et Amine Mellouk, pour les nombreux déjeuners partagés ensemble et pour leur bonne humeur perpétuelle. Amine, tu es un ami en or !

Je salue également toute l'équipe du 3<sup>e</sup> étage, avec laquelle je me suis vraiment bien entendu, et aussi pour nos séances de football hebdomadaires : Guillaume Manat, Rodolphe Auger, Dimitri Cherier, Dominique Mangin-Lecreulx, Thierry Touze, Victorien Decoin, Hélène Barreteau et Xudong Tian. Guillaume, merci à toi d'avoir partagé avec moi tous ces bons moments, j'espère te retrouver très vite !

Au terme de ce parcours, je veux m'adresser à celles et ceux qui me sont chers. Je remercie en particulier mes parents, mes grands-parents ainsi que mon frère Alexis. Sans vos encouragements et votre soutien de chaque instant, jamais je ne serais parvenu où je suis aujourd'hui. Enfin, je souhaite remercier du fond du coeur ma compagne, pour tout l'amour qu'elle me porte et pour la patience et la compréhension dont elle a fait preuve pour me supporter au cours de ces derniers mois.

# LISTE DES ABBREVIATIONS

$\alpha$ -SMA = alpha-Smooth muscle actin  
ADMA = Asymmetrical dimethyl-L-arginine  
Akt = Protein kinase B  
ALK = Activin receptor-like kinase  
AP-1 = Activator protein-1  
APAF-1 = Apoptotic peptidase activating factor-1  
ARE = Antioxidant response element  
ASPP = Apoptosis-stimulating protein of p53  
ATM = Ataxia telangiectasia mutated  
ATP = Adenosine triphosphate  
ATR = Ataxia telangiectasia and Rad3-related

BAMBI = BMP and activin membrane-bound inhibitor  
Bcl-2 = B cell lymphoma-2  
BH<sub>4</sub> = Tetrahydrobiopterin  
BMDM = Bone marrow-derived macrophage  
BMP = Bone morphogenetic protein  
Bub1/R1 = Budding uninhibited by benzimidazoles 1/R1  
bZIP = basic region-leucine zipper

CaM = Calmodulin  
CBP = CREB binding protein  
CDK = Cyclin-dependent kinase  
Chk1/2 = Checkpoint kinases 1/2  
CO = Monoxyde de carbone  
CO<sub>2</sub> = Dioxyde de carbone  
COL1A = Collagen type 1 alpha  
COX2 = Cyclooxygenase 2  
cPLA2 = cytosolic Phospholipase A2  
CREB = cAMP response element-binding protein  
CTLA4 = Cytotoxic T lymphocyte antigen 4  
Cul3 = Cullin 3



DBD = DNA-binding domain  
DD1 $\alpha$  = Death domain 1 $\alpha$   
dNTP = Desoxynucleotide triphosphate

ECR = Evolutionary conserved region  
EDRF = Endothelium-derived relaxing factor  
EMT = Epithelial to mesenchymal transition  
eNOS = endothelial NO synthase  
ERK1/2 = Extracellular signal-regulated kinase 1/2

FAD = Flavin dinucleotide  
FASAY = Functional analysis of separated alleles in yeast  
FMN = Flavin mononucleotide  
FOXP3 = Forkhead box P3

G6PD = Glucose-6-phosphate dehydrogenase  
GAPDH = Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  
GAS =  $\gamma$ -interferon-activated site  
GM-CSF = Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor  
GMP = Guanosine monophosphate  
GPX = Glutathione peroxidase  
GSH = Glutathione  
GSNO = S-nitrosoglutathione  
GSSG = Glutathione disulfide  
GST = Glutathione S-transferase  
GTP = Guanosine triphosphate

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Peroxyde d'hydrogène  
HAT = Histone acetyltransferase  
HDAC = Histone deacetylase  
HIF-1 $\alpha$  = Hypoxia-inducible factor-1alpha  
HO = Hydroxyle  
HO-1 = Heme oxygenase-1

Hsp90 = Heat shock protein 90 kDa

IFN- $\gamma$  = Interferon-gamma

I $\kappa$ B = Inhibitor of kappa B

IKK = IkappaB kinase

IL-1 $\beta$  = Interleukin-1beta

iNOS = inducible NO synthase

IRAK = Interleukin-1 receptor-associated kinase

IRF1 = Interferon regulatory factor-1

ISG = Interferon-stimulated gene

ISGF3 = Interferon-stimulated gene factor 3

ISRE = Interferon-stimulated response element

JAK = Janus kinase

JNK = c-Jun N-terminal kinase

Keap1 = Kelch-like ECH-associated protein 1

LAP = Latency-associated peptide

L-Arg = L-arginine

LLC = Large latent complex

LPS = Lipopolysaccharide

LTBP = Latent TGF-beta-binding protein

Maf = Musculoaponeurotic fibrosarcoma

MAPK = Mitogen-activated protein kinase

MCP-1 = Monocyte chemoattractant protein-1

M-CSF = Macrophage-colony-stimulation factor

MDSC = Myeloid-derived suppressor cell

MEF = Mouse embryonic fibroblast

MH2 = Mad homology domain 2

MM1 = Myc modulator 1

MMP = Matrix metalloproteinase

MyD88 = Myeloid differentiation primary response gene 88

$N_2O_3$  = Trioxyde d'azote  
NADPH = Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  
NEDD = Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated  
NF-E2 = Nuclear factor-erythroid 2  
NGF = Nerve growth factor  
NF- $\kappa$ B = Nuclear factor- $\kappa$  light chain enhancer of activated B cells  
NK = Natural killer  
NLS = Nuclear localization signal  
nNOS = neuronal NO synthase  
NO = Monoxyde d'azote  
 $NO^+$  = Nitrosonium  
 $NO\cdot$  = Nitroxyle  
 $NO_2$  = Dioxyde d'azote  
 $NO_2^+$  = Nitronium  
 $NO_2^-$  = Nitrite  
 $NO_3^-$  = Nitrate  
NOS = NO synthase  
NOX4 = NADPH oxidase 4  
NQO1 = NAD(P)H quinone oxidoreductase 1  
Nrf2 = NF-E2-related nuclear factor 2

$O_2$  = Dioxygène  
 $O_2^-$  = Superoxyde  
OD = Oligomerization domain  
 $ONOO^-$  = Peroxynitrite  
Oct-1 = Octamer-1

PAI-1 = Plasminogen activator inhibitor-1  
PAMP = Pathogen-associated molecular pattern  
PARP = Poly (ADP-ribose) polymerase  
PCAF = p300/CBP-associated factor  
PD-L1 = Programmed death-ligand 1  
PI3K = Phosphoinositide 3-kinase

PIAS1 = Protein inhibitor of activated STAT1  
PIR2 = p73-induced ring finger protein 2  
PKC = Protein kinase C  
PKG = cGMP-dependent protein kinase  
PMA = Phorbol 12-myristate 13-acetate  
PPAR- $\gamma$  = Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma  
PRX = Peroxiredoxin  
PTEN = Phosphatase and TENsin homolog  
PTP = Mitochondrial permeability transition pore

RNS = Reactive nitrogen species  
RNR = Ribonucleotide reductase  
ROR $\gamma$ t = Retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t  
ROS = Reactive oxygen species  
RSNO = S-nitrosothiol  
RyR = Ryanodine receptor

SAM = Sterile alpha motif domain  
SARA = Smad anchor for receptor activation  
SBE = Smad binding elements  
SCAO2 = Short chain alcohol oxidase 2  
SERCA = Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase  
SESN2 = Sestrin 2  
sGC = soluble Guanylate cyclase  
SHH = Sonic hedgehog  
SLC = Small latent complex  
SMAD = Sma and MAD protein  
SNP = Single nucleotide polymorphism  
SOCS = Suppressor of cytokine signaling  
SOD = Superoxide dismutase  
SPSB = SPRY domain and SOCS-box-containing protein  
SPRY = SplA/ryanodine receptor  
SRX = Sulfiredoxin  
STAT1 $\alpha$  = Signal transducer and activator of transcription 1 alpha

TAD = Transactivation domain  
TAK1 = TGF- $\beta$ -activated kinase 1  
TAM = Tumor-associated macrophage  
t-BHQ = tert-Butylhydroquinone  
TCF11 = Transcription factor 11  
TCR = T cell receptor  
TGF- $\beta$  = Transforming growth factor-beta  
TIE = TGF- $\beta$  inhibitory element  
TIGAR = TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator  
TIMP1 = Tissue inhibitor of metalloproteinase 1  
TLR = Toll-like receptor  
TNF- $\alpha$  = Tumor necrosis factor-alpha  
TRAF6 = TNF receptor-associated factor 6  
Trx = Thioredoxin

UTR = Untranslated region

YAP1 = Yes-associated protein 1

YY1 = Yin Yang 1

ZEB = Zinc finger E-box-binding homeobox

# TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>7</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>17</b>
<b>1 Le monoxyde d'azote et les NO synthases</b>	<b>19</b>
1.1 La chimie de NO	19
1.1.1 Description chimique de NO	19
1.1.2 Propriétés physiques de NO	20
1.1.3 Réactivité de NO avec O <sub>2</sub> et des espèces radicalaires	21
1.1.4 Formation de S-nitrosothiols	23
1.1.5 Nitrosylation de complexes métalliques et de métalloprotéines	24
1.1.6 Formation de N-nitrosamines	25
1.1.7 Nitration par des dérivés de NO	25
1.2 Synthèse de NO par les NO synthases	27
1.2.1 Découverte de la synthèse de NO chez les mammifères	27
1.2.2 Les NO synthases	28
1.2.2.1 Généralités	28
1.2.2.2 Localisation tissulaire et subcellulaire des NO Synthases	29
1.2.2.3 Structure des NO Synthases	31
1.2.3 Mécanisme de synthèse de NO par les NO synthases	34
1.2.4 Disponibilité en substrats et activité NO Synthase	37
1.3 NO est une molécule de signalisation cellulaire	38
1.3.1 Sélectivité des cibles de NO : effets de seuils et diversité de réponses	38
1.3.2 Les S-nitrosylations : un nouveau paradigme en signalisation	40
1.3.2.1 La S-nitrosylation : un mécanisme sélectif et réversible ?	40
1.3.2.2 Rôles des S-nitrosylations en signalisation cellulaire	44
1.3.3 Quel est le destin des cellules exposées à de fortes concentrations en NO ?	45
1.3.4 Les défenses cellulaires en réponse aux dommages induits par NO	48
1.3.4.1 Aperçu général des mécanismes de défense antioxydante	48
1.3.4.2 L'activation de Nrf2 est une voie centrale de détoxification des xénobiotiques et des espèces oxydantes	49
1.4 Les fonctions physiologiques et les effets physio-pathologiques des NO synthases	52
1.4.1 NO dans le système cardiovasculaire	52
1.4.2 NO dans le système nerveux : un neurotransmetteur atypique	56
1.4.3 NO dans l'inflammation, l'immunité et le cancer	58
1.4.3.1 Les activités antimicrobienne, antivirale et antiparasitaire de la iNOS	58
1.4.3.2 NO comme médiateur de l'immunité adaptative	60
1.4.3.3 La iNOS dans les maladies inflammatoires chroniques et le cancer	62
1.5 Régulation de l'expression et de l'activité iNOS	65
1.5.1 Structures du gène et du promoteur <i>NOS2</i>	65
1.5.2 Les facteurs de transcription modulant l'expression de la iNOS	68
1.5.3 La régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle de la iNOS	73
1.6 Contrôle de la synthèse de NO par le TGF- $\beta$	75
1.6.1 Composants de la voie de signalisation canonique du TGF- $\beta$	75
1.6.2 Régulation de gènes cibles par les protéines SMADs et leurs partenaires	77

1.6.3	Les voies de signalisation indépendantes des protéines SMADs.	79
1.6.4	Régulation de la biodisponibilité du TGF- $\beta$	80
1.6.5	Régulation de l'expression de la iNOS par le TGF- $\beta$ 1	84
<b>2</b>	<b>Le suppresseur de tumeur p73 et ses homologues</b>	<b>88</b>
2.1	La famille p53 : Origine, structures et fonctions	88
2.1.1	Découverte d'un « Gardien du génome »	88
2.1.2	Origine évolutive et fonctions ancestrales de p53	90
2.1.3	Structure et complexité moléculaire de la famille p53	91
2.1.3.1	Diversité des isoformes au sein de la famille p53	91
2.1.3.2	Structure protéique de p73 et de ses homologues	93
2.1.3.3	La famille p53 forme un réseau d'interactions	95
2.1.4	Régulation génique par p53 et ses homologues	97
2.1.5	p73 est-il réellement un gène suppresseur de tumeur ?	100
2.2	Contrôle de l'activité et de l'expression de p73	103
2.2.1	Régulation des fonctions de p73	103
2.2.2	Expression différentielle des isoformes de p73	107
2.3	Fonctions exclusives de p63 et p73 dans le développement	107
2.3.1	p63 dans le développement des épithéliums et des tissus d'origine ectodermique	108
2.3.2	p73 dans le développement et la maintenance du système nerveux central	109
2.4	Rôles émergents de p53 et p73 dans l'immunité	111
2.4.1	p53 dans l'immunité antivirale et la réponse aux IFNs de type I	112
2.4.2	Contrôle des réponses inflammatoires par p53	113
2.4.3	p53 dans le contrôle de l'autoimmunité et de l'immunité antitumorale	116
2.4.4	Rôle émergent de p73 dans les fonctions immunes	120
2.5	Interactions entre NO et la famille p53	121
2.5.1	Activation de p53 et TAp73 par NO	121
2.5.2	Régulation de la synthèse de NO par p53	122

## **OBJECTIFS DES TRAVAUX** **125**

## **MATERIEL ET METHODES** **129**

<b>1</b>	<b>Culture cellulaire</b>	<b>131</b>
1.1	Conditions de culture	131
1.2	Lignées murines immortalisées de fibroblastes embryonnaires <i>TAp73<sup>-/-</sup></i> (3T3)	131
1.3	Isolement de cellules primaires $\Delta Np73^{-/-}$	132
1.3.1	Souris <i>knockout</i> pour les isoformes $\Delta Np73$	132
1.3.2	Macrophages dérivant de cellules de moelle osseuse	134
1.3.3	Fibroblastes pulmonaires	135
<b>2</b>	<b>Cytokines et inhibiteurs pharmacologiques</b>	<b>136</b>
<b>3</b>	<b>Mesure de la production de NO avec le réactif de Griess</b>	<b>137</b>
<b>4</b>	<b>Détermination des niveaux d'expression protéique par western-blot</b>	<b>138</b>
4.1	Extraction et dosage des protéines solubles	138
4.2	Electrophorèse SDS-PAGE et Western-Blot	139
4.3	Révélation des immunoblots et anticorps	139
<b>5</b>	<b>Mesure d'expression génique par RT-qPCR</b>	<b>141</b>
5.1	Extraction et purification des ARN totaux	141
5.2	Rétrotranscription	141
5.3	PCR quantitative	142
<b>6</b>	<b>Mesure de production de TGF-<math>\beta</math>1 par ELISA</b>	<b>145</b>

<b>7</b>	<b>Infection parasitaire avec <i>Trypanosoma muscili</i></b>	<b>146</b>
<b>8</b>	<b>Statistiques</b>	<b>146</b>

## **RESULTATS EXPERIMENTAUX** **147**

<b>1</b>	<b>Implication des isoformes TAp73 dans la régulation de l'expression de la iNOS</b>	<b>149</b>
1.1	Détermination des conditions d'induction de la iNOS dans des fibroblastes immortalisés de souris	149
1.2	Les isoformes TAp73 régulent négativement l'expression de la iNOS	150
1.2.1	Surexpression de la iNOS dans les 3T3 TAp73 <sup>-/-</sup>	150
1.2.2	Les isoformes TAp73 sont nécessaires à la dégradation de la iNOS par le protéasome	152
1.2.3	La régulation négative de la iNOS par les isoformes TAp73 dépend d'un facteur sécrété par les cellules	153
1.3	Réduction de l'effet suppresseur du TGF-β sur l'induction de la iNOS dans les 3T3 TAp73 <sup>-/-</sup>	154
1.4	Mécanismes de coopération entre les isoformes TAp73 et le TGF-β dans la répression de la iNOS	156
1.5	Conséquences fonctionnelles de la surproduction de NO induite par la déficience en isoformes TAp73	159
1.5.1	Renforcement de la réponse antioxydante dépendante de Nrf2 et de NO dans les 3T3 TAp73 <sup>-/-</sup>	159
1.5.2	Les isoformes TAp73 et le TGF-β1 affectent les effets antiparasitaires dépendants de NO lors d'une infection avec <i>T. muscili</i>	162
<b>2</b>	<b>Etude préliminaire des effets des isoformes ΔNp73 dans la régulation de la iNOS et la réponse au TGF-β</b>	<b>163</b>
2.1	Régulation de l'expression de la iNOS par les isoformes ΔNp73 dans les BMDM	163
2.2	Potentialisation de l'induction de gènes cibles du TGF-β par les isoformes ΔNp73 dans les fibroblastes pulmonaires	165

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES** **195**

<b>1</b>	<b>Régulation négative de l'expression de la iNOS par les isoformes TAp73</b>	<b>197</b>
1.1	Coopération entre les isoformes TAp73 et le TGF-β dans le processus de répression de la iNOS	198
1.1.1	Effet des isoformes TAp73 et du TGF-β sur l'induction transcriptionnelle du gène Nos2	198
1.1.2	Leçons tirées des autres exemples d'interactions entre la voie de signalisation du TGF-β et la protéine p53 ou ses homologues	201
1.1.3	Régulation de la signalisation TGF-β par les isoformes TAp73	204
1.1.4	Implication des isoformes TAp73 et du TGF-β dans la régulation de la stabilité de la protéine iNOS.	205
<b>2</b>	<b>Conséquences de la coopération entre le TGF et les isoformes TAp73 sur des fonctions cellulaires dépendantes de la production de NO</b>	<b>207</b>
2.1	Régulation de la réponse génique dépendante de Nrf2 et des effets anti-parasitaires dépendants de NO	207
2.2	Autres conséquences potentielles de la régulation par les isoformes TAp73 de l'expression de la iNOS	209
<b>3</b>	<b>Le cas des isoformes ΔNp73, vers un modèle global d'intégration de la famille p53 dans les fonctions du TGF-β ?</b>	<b>210</b>

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** **214**





CHAPITRE I :

INTRODUCTION  
BIBLIOGRAPHIQUE

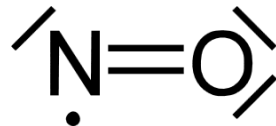


# 1 Le monoxyde d'azote et les NO synthases

## 1.1 La chimie de NO

### 1.1.1 Description chimique de NO

Le monoxyde d'azote (NO) est l'une des 10 plus petites molécules stables se trouvant dans la Nature. Cette molécule se caractérise principalement par quatre propriétés : elle est gazeuse, petite, non chargée, et elle comporte un électron non apparié (impossibilité pour l'atome d'azote de remplir sa couche de valence). NO est donc un radical libre doué de paramagnétisme. Cette propriété détermine en grande partie sa réactivité chimique.

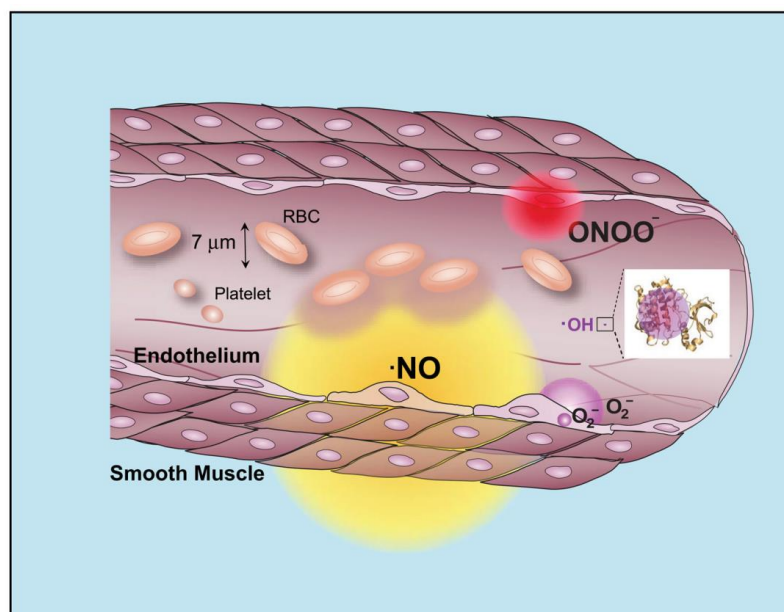


Cet électron non apparié présente une instabilité intrinsèque. Deux mécanismes permettent de remédier à cette instabilité et dominent la chimie de NO : l'appariement avec un autre électron non apparié, et la mise en résidence partielle dans l'orbitale *d* d'un métal de transition.

NO est considéré comme un radical libre relativement stable et faiblement réactif. Il ne se décompose pas spontanément et ne réagit pas non plus avec lui-même en conditions biologiques. L'oxydation/réduction mono-électronique de NO, donnant respectivement le cation nitrosonium  $\text{NO}^+$  et l'anion nitroxyle  $\text{NO}^-$  ou son acide conjugué HNO, est thermodynamiquement très défavorable, ce qui prévient leur formation directe<sup>1</sup>. NO réagit cependant rapidement avec de nombreuses cibles cellulaires, ce qui explique sa faible demi-vie biologique, la plupart du temps inférieure à  $2 \text{ s}^2$ . C'est un temps de vie extrêmement court en comparaison avec d'autres molécules de signalisation, mais c'est un temps relativement long si on le compare à celui des autres radicaux libres dont la durée de vie est plutôt de l'ordre de quelques millisecondes.

### 1.1.2 Propriétés physiques de NO

NO est une molécule non chargée, ce qui lui permet de traverser facilement les membranes biologiques par diffusion passive. Il est soluble à la fois en milieu hydrophobe et en milieu hydrophile (avec une solubilité 10 fois inférieure cependant). En raison de sa nature gazeuse, son coefficient de diffusion élevé ( $\approx 3800 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) lui permet de parcourir des distances considérables en une courte période temporelle ( $\approx$  longueur d'une cellule/25 ms) (cf. Figure I-1)<sup>3</sup>. Une fois synthétisé, le NO se déplace par diffusion aléatoire depuis son point d'origine, établissant un gradient spatial de concentration à partir de son site de production. Dans des cultures cellulaires, le NO libéré par des macrophages RAW 264.7 en réponse à l'interféron- $\gamma$  a été détecté à une distance de 100 à 500  $\mu\text{m}$  des cellules, soit un rayon de diffusion équivalent à 10-50 cellules<sup>4</sup>. Dans des systèmes biologiques, la diffusion de NO est toutefois limitée par de nombreux facteurs : son interaction avec des protéines (hémoglobine, guanylate cyclase, etc.), la composition lipidique de la membrane plasmique (présence de cholestérol, de liposomes, etc.) ou bien sa réactivité avec des radicaux libres.



**Figure I-1 : Comparaison des rayons de diffusion de NO, du peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), de l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et du radical hydroxyle (HO·)<sup>5</sup>. Ces distances de diffusion sont approximatives et se basent sur une estimation de la demi-vie moyenne de NO de 1 s, dans un contexte où celle-ci est limitée par la présence de globules rouges (RBC : red blood cells). La distance de diffusion du radical hydroxyle est 10<sup>4</sup> fois plus faible que celle du peroxynitrite, soit environ le rayon d'une petite protéine.**

### 1.1.3 Réactivité de NO avec O<sub>2</sub> et des espèces radicalaires

NO peut réagir très rapidement avec d'autres radicaux libres au moyen d'un appariement électronique favorable, formant des composés secondaires appelés espèces réactives de l'azote (RNS = *Reactive nitrogen species*)<sup>6</sup>. Parmi les molécules possédant un électron non apparié, le dioxygène (O<sub>2</sub>) est largement prédominant. Si O<sub>2</sub> possède un nombre pair d'électrons, deux de ses électrons se trouvent pourtant sur des orbitales séparées dans la forme la plus commune de la molécule (état fondamental).

La concentration en O<sub>2</sub>, qui varie dans de grandes proportions en fonction de l'organe, du tissu, du type cellulaire et même de la localisation intracellulaire, est un déterminant majeur de la concentration en NO à un temps donné. O<sub>2</sub> participe en effet à la fois à la synthèse de NO comme cosubstrat des NO Synthases, mais aussi au métabolisme de NO. Ainsi, la demie-vie et la distance de diffusion de NO sont d'autant plus réduites que la concentration en O<sub>2</sub> est élevée (cf. Figure I-2)<sup>7</sup>.

Le produit immédiat de la réaction de NO avec O<sub>2</sub> est généralement le dioxyde d'azote (<sup>•</sup>NO<sub>2</sub>), qui est aussi un radical, mais qui contrairement à NO est oxydant (**Réaction 1**). <sup>•</sup>NO<sub>2</sub> réagit rapidement avec NO ou des molécules riches en électrons (nucléophiles), générant d'autres dérivés ainsi que l'anion nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>).



NO réagit également avec la forme réduite de l'oxygène, l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), de façon extrêmement rapide, ce qui réduit son potentiel de diffusion. Le produit formé par cette réaction, le peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>), est un puissant agent oxydant et nitrant (**Réaction 2**). Cette réaction est limitée par l'activité superoxyde dismutase (SOD) des cellules et a lieu essentiellement lorsque les concentrations des deux substrats sont équivalentes.



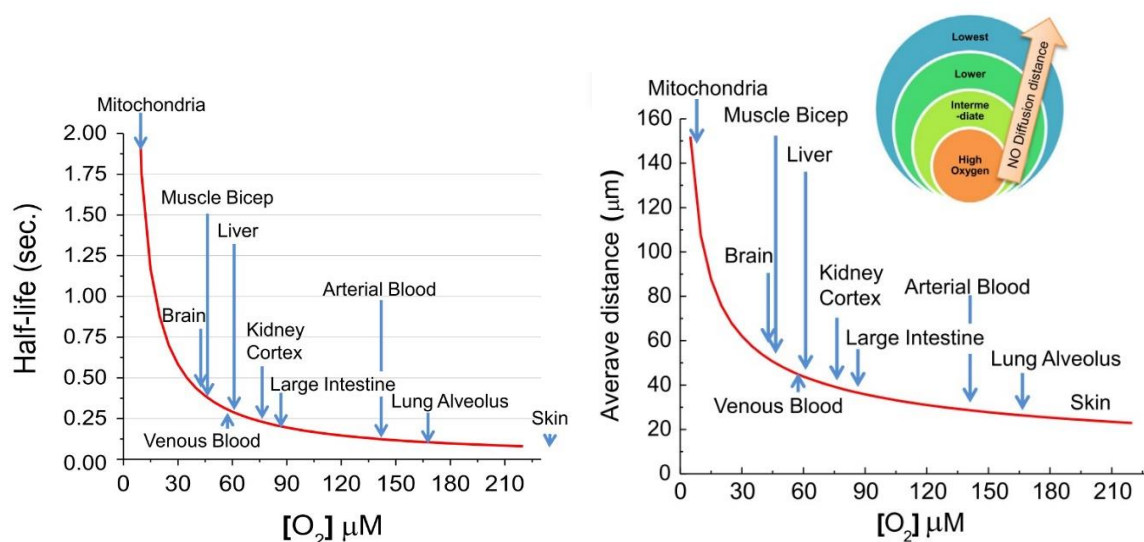
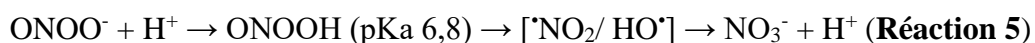
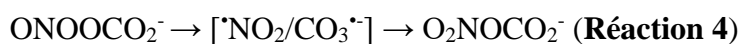


Figure I-2 : La distance de diffusion et la demi-vie de NO (en ordonnée) sont directement corrélées à la concentration en O<sub>2</sub> des différents tissus<sup>8</sup>.

En réagissant avec le CO<sub>2</sub> présent en grandes quantités en conditions biologiques, ONOO<sup>-</sup> se décompose et conduit à la formation d'une espèce anionique (ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>) puis d'un complexe radicalaire [<sup>•</sup>NO<sub>2</sub>/CO<sub>3</sub><sup>•-</sup>] (**Réactions 3 et 4**). ONOO<sup>-</sup> réagit aussi avec les groupements thiols (RSH), résultant en une oxydation formant des acides sulféniques instables et réactifs (RSOH). Enfin, au sein de certains microenvironnements, la forme protonée du peroxy-nitrite (ONOOH) subit un clivage homolytique produisant du <sup>•</sup>NO<sub>2</sub> et le radical hydroxyle (HO<sup>•</sup>) qui est une espèce oxydante très puissante (oxydation des centres fer/soufre, des doigts de zinc et des thiols) (**Réaction 5**)<sup>9</sup>.

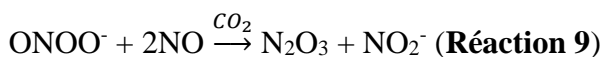
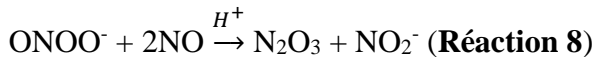


Ainsi, les réactions de NO avec des espèces non métalliques ont deux conséquences majeures : l'oxydation de molécules nucléophiles cellulaires, et la formation de deux produits stables de décomposition (les anions nitrite et nitrate). Les deux nucléophiles cibles de NO les plus étudiés sont le groupement thiol des cystéines (contenus dans les protéines et dans de petites molécules comme le glutathion) et le groupement phénolique de la tyrosine.

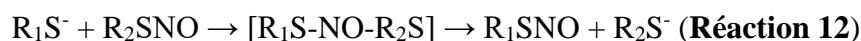
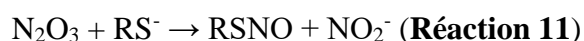
### 1.1.4 Formation de S-nitrosothiols

NO lui-même ne réagit pas avec les groupements thiol ou thiolate. La modification des thiols par NO nécessite une oxydation préalable, soit de NO (pour former un donneur  $\text{NO}^+$ ), soit du thiol (formation d'un radical thiyl  $\text{RS}^\bullet$ )<sup>10</sup>.

L'oxydation de NO pour former un cation nitrosonium ( $\text{NO}^+$ ) est une réaction hautement défavorable dans des conditions physiologiques. Toutefois, des espèces avec une réactivité proche de celle de  $\text{NO}^+$  peuvent se former. NO et  $\bullet\text{NO}_2$  peuvent par exemple se combiner pour former du trioxyde d'azote ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) (**Réaction 6**). Celui-ci s'obtient également lors de l'auto-oxydation de NO (**Réaction 7**). Lorsque  $\text{ONOO}^-$  se décompose en présence de  $\text{CO}_2$  (**Réactions 3 et 4**) ou en milieu acide (**Réaction 5**), de puissants agents oxydants sont produits. Cependant, la balance oxydative peut basculer vers la nitrosation lorsque ces intermédiaires oxydants sont convertis en  $\text{N}_2\text{O}_3$  en réagissant davantage avec NO (**Réactions 8 et 9**)<sup>11</sup>.

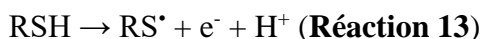


$\text{N}_2\text{O}_3$  se comporte comme un donneur de  $\text{NO}^+$  [ $^+\text{ON}\bullet\bullet\text{NO}_2^-$ ] et réagit avec les thiols en transférant un groupement nitroso dans une réaction de transnitrosation, formant ainsi un composé covalent S-nitrosothiol ( $\text{RSNO}$ ) (**Réaction 11**). La transnitrosation peut aussi se faire lors d'une attaque nucléophile d'un anion thiolate sur l'azote d'un nitrosothiol, ce qui permet le transfert du S-nitrosothiol d'une protéine à une autre par exemple (**Réaction 12**).



Il existe un second mode de génération de S-nitrosothiols : la nitrosylation oxydative. L'oxydation d'un groupement thiol par des dérivés de NO ou de l'oxygène tels que  $\text{HO}^\bullet$  et  $\bullet\text{NO}_2$  génère un radical thiyl (**Réaction 13**). Ce radical thiyl réagit ensuite directement avec NO pour former un S-nitrosothiol par recombinaison radicalaire (**Réaction 14**).





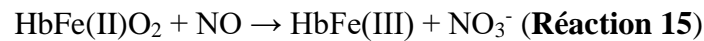
Enfin, les métaux de transition sont aussi des accepteurs d'électron de NO. Le NO lié au Fe(III) de l'hème présente un caractère  $\text{NO}^+$  et peut induire la nitrosation des thiols aussi bien que celle des amines secondaires et de groupements phénoliques (s'accompagne aussi d'une réduction de l'hème).

### 1.1.5 Nitrosylation de complexes métalliques et de métalloprotéines

Les métaux de transition sont appelés ainsi car dans le tableau périodique des éléments, ils représentent les éléments qui font la transition entre les orbitales *s* et *p*, avec des électrons occupant les orbitales *d*. Ces orbitales peuvent accueillir 10 électrons et sont généralement assez espacées en énergie en fonction de l'arrangement des ligands autour du métal. Les métaux de transition constituent ainsi de bons foyers pour les électrons non appariés. La plupart du temps cependant, l'électron non apparié n'est pas totalement transféré au métal mais est partagé avec le radical. NO et O<sub>2</sub> sont tous deux capables de former ce type de liaison avec un métal de transition, appelée liaison de coordination. En raison de la nature différente de la liaison qui n'est pas covalente, le groupement fonctionnel du ligand lié au métal est appelé nitrosyl.

La liaison de coordination entre NO et un métal de transition la plus étudiée est celle qui lie NO au fer, soit dans son état ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), soit dans son état ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Une large proportion du fer existe sous forme liée à la protoporphyrine au sein de l'hème, qui est utilisé comme cofacteur d'une grande variété d'enzymes et permet notamment le transport du dioxygène par l'hémoglobine. La coordination de NO à l'hème ferreux de la Guanylate Cyclase soluble (sGC) est sans doute la mieux connue et représente la quintessence d'un exemple de nitrosylation en biologie. La formation du complexe ferreux-nitrosyl ( $\text{FeII-NO}$ ) provoque des changements structuraux qui multiplient par un facteur 100 la conversion du GTP (*Guanosine triphosphate*) en GMPc (*cyclic Guanosine monophosphate*) par l'enzyme<sup>12</sup>. Dans de nombreux cas cependant, la nitrosylation des métalloenzymes a un effet négatif sur leur activité : c'est par exemple le cas pour le cytochrome P450, la NO Synthase et pour l'aconitase<sup>13</sup>. De cette façon, NO exerce un rétrocontrôle négatif sur sa propre synthèse.

Le fer des hémoprotéines peut participer à des réactions d'oxydoréduction avec NO. La réaction qui se produit le plus souvent en contexte biologique est la réaction avec l'oxyferrohémoglobine (FeII) des globules rouges pour former du nitrate et la méthémoglobine contenant un ferrihème (FeIII) (**Réaction 15**). C'est un phénomène majeur de consommation de NO qui régule largement ses concentrations locales<sup>14</sup>.



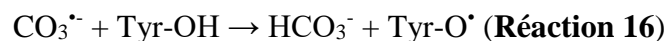
### 1.1.6 Formation de N-nitrosamines

La réaction de nitrosation, qui consiste en l'addition d'un ion nitrosonium  $\text{NO}^+$  sur un groupe nucléophile, ne se limite pas aux seuls thiols. Les amines primaires ( $\text{RNH}_2$ ) telles que celles retrouvées dans les bases nucléiques peuvent aussi subir une nitrosation par  $\text{N}_2\text{O}_3$  ou par des complexes ferri-nitrosyl (FeIII-NO). Les N-nitrosamines sont instables car elles peuvent tautomériser. Ce processus est notamment à l'origine de la conversion de la cytosine en uracile<sup>15</sup>.

La formation de N-nitrosamines a rapidement fait l'objet de suspicions dans la carcinogenèse associée à l'inflammation<sup>16</sup>.

### 1.1.7 Nitration par des dérivés de NO

La nitration consiste en l'addition d'un ion nitronium ( $\text{NO}_2^+$ ) sur un groupe nucléophile. La réaction aboutit à la formation d'un composé covalent comportant le groupement fonctionnel nitro ( $\text{R-NO}_2$ ). Il existe de nombreux mécanismes de nitration. L'un d'eux implique l'oxydation du groupement phénol de la tyrosine par l'anion carbonate  $\text{CO}_3^-$  (issu de l'interaction entre  $\text{ONOO}^-$  et  $\text{CO}_2$ ), ce qui génère un radical tyrosyl (**Réaction 16**). Ce radical réagit ensuite avec  $^*\text{NO}_2$  pour former une 3-nitrotyrosine (**Réaction 17**).



La formation des adduits de nitration est irréversible dans les conditions biologiques, et peut aussi cibler d'autres molécules comme le tryptophane, la guanine (8-nitroguanine) ou les acides gras. Elle peut permettre la modulation d'une activité enzymatique : notre laboratoire a

par exemple démontré qu'*in vitro*, la nitration de certains résidus tyrosine de la ribonucléotide réductase (enzyme catalysant l'étape limitante de la synthèse *de novo* des dNTPs) provoque son inhibition<sup>17,18</sup>.

La détection de nitrations au niveau de protéines ou de nucléotides est souvent utilisée pour signaler une condition de stress nitrant associé à des pathologies. L'activité iNOS induit la nitration et l'oxydation de la guanine (8-nitroguanine et 8-oxodG) et une transversion G → T mutagénique. Ce type de mutation apparaît dans de nombreux cancers d'origine inflammatoire ou pathogène : cholangiocarcinome (douve du foie), cancer gastrique (*H. pylori*), cancer du col de l'utérus (papilloma virus humain), carcinome du nasopharynx (virus d'Epstein-Barr), hépatocarcinome (virus de l'hépatite C), carcinome pulmonaire (amiante), maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique)<sup>19</sup>.

Les différentes modifications post-traductionnelles induites par NO et ses dérivés réactifs sont résumées sur la Figure I-3.

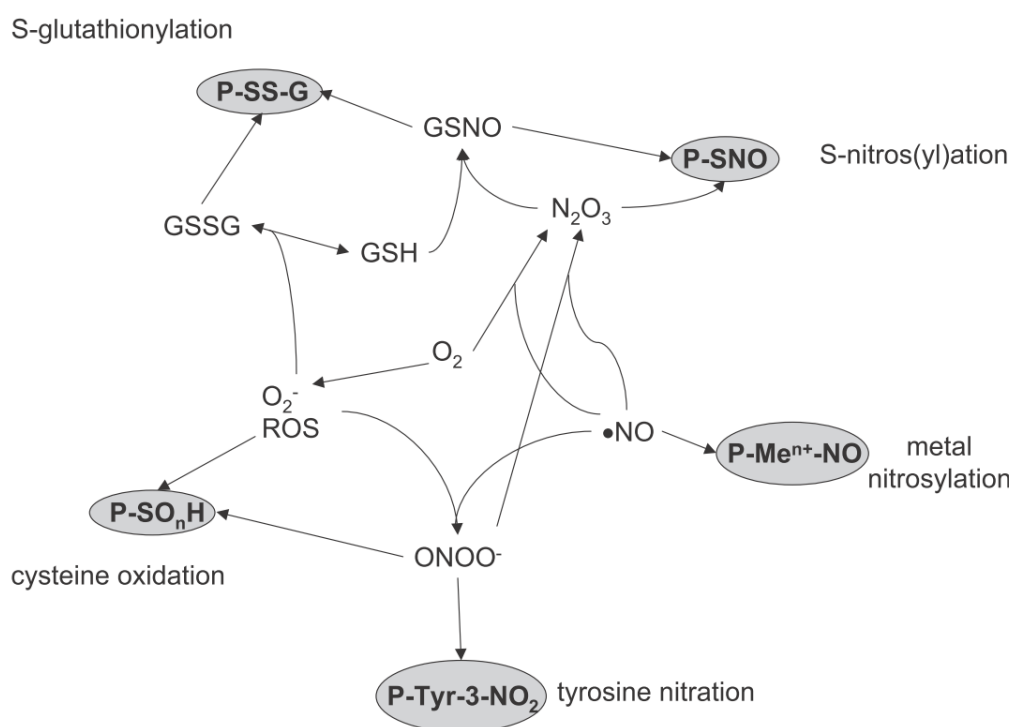
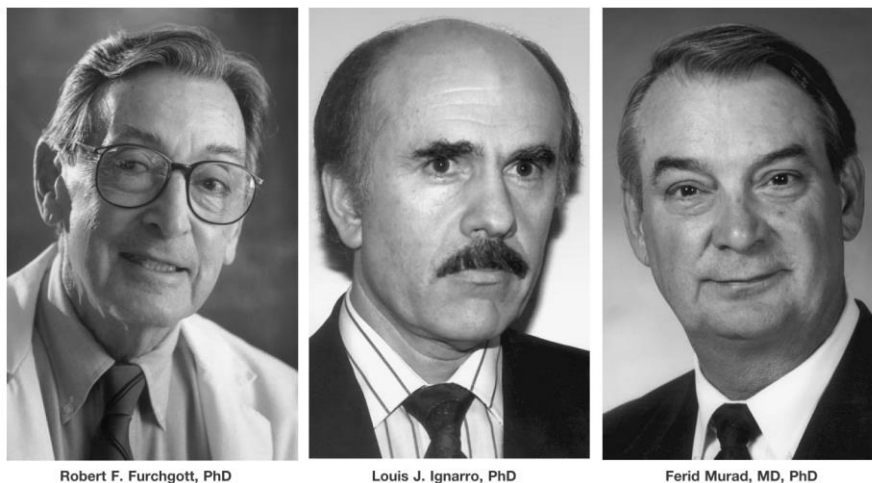


Figure I-3 : Résumé des relations chimiques entre des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des espèces réactives de l'azote (RNS), et leur impact sur différentes modifications post-traductionnelles des protéines<sup>20</sup>. GSH : glutathion, GSSG : disulfure de glutathion, GSNO : S-nitrosoglutathion.

## 1.2 Synthèse de NO par les NO synthases

### 1.2.1 Découverte de la synthèse de NO chez les mammifères

NO est identifié et décrit comme un gaz pour la première fois par Joseph Priestley en 1772. Pendant de longues années, cette molécule à l'apparence simple, constituée d'un atome d'azote et d'un atome d'oxygène, est seulement considérée comme un polluant atmosphérique et un poison, en raison de sa forte affinité pour l'hémoglobine. Dans les années 1980, certains chercheurs s'intéressent à la manière dont les vaisseaux sanguins peuvent se dilater. Le phénomène de vasodilatation est essentiel au contrôle de la pression artérielle. Des molécules telles que la nitroglycérine étaient couramment utilisées dans le traitement de maladies cardiaques comme l'angine de poitrine afin de favoriser la vasodilatation, sans que l'on connaisse mécanisme qui en était la cause.



Robert F. Furchgott, PhD

Louis J. Ignarro, PhD

Ferid Murad, MD, PhD

**Figure I-4 : Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro et Ferid Murad furent récompensés en recevant le prix Nobel (1998) pour leurs découvertes concernant NO comme molécule de signalisation dans le système cardiovasculaire<sup>21</sup>.**

En 1980, Robert Furchgott examine l'effet de l'acétylcholine sur la vasodilatation et s'aperçoit que le relâchement des vaisseaux sanguins ne se produit qu'en présence de cellules endothéliales<sup>22</sup>. Ces cellules tapissent l'intérieur des vaisseaux sanguins et sont au contact de cellules musculaires lisses responsables de la dilatation ou de la constriction des vaisseaux. Les résultats de R. Furchgott suggéraient que les cellules endothéliales produisent un facteur requis pour la vasodilatation. Ce facteur, encore non identifié, fut nommé EDRF (*Endothelium-Derived Relaxing Factor*).

Auparavant, Ferid Murad avait démontré que la nitroglycérine déclenche la libération de NO qui est alors capable d'induire un relâchement des cellules musculaires lisses<sup>23</sup>. C'est finalement Louis Ignarro qui, en 1986, fournit les derniers éléments décisifs pour résoudre cette question. Il identifie l'EDRF et montre qu'il possède des propriétés chimiques et pharmacologiques identiques au radical NO<sup>24,25</sup>. La découverte qu'un gaz puisse avoir une si grande implication dans des fonctions biologiques eut un retentissement gigantesque dans la communauté scientifique. Furchgott, Murad et Ignarro furent récompensés par un prix Nobel en 1998 (cf. Figure I-4)<sup>21</sup>.

## 1.2.2 Les NO synthases

### *1.2.2.1 Généralités*

La synthèse de NO est catalysée par une famille d'enzymes appelées NO synthases (NOS). Trois isoformes distinctes de NOS ont été décrites chez les mammifères à partir de 1989<sup>26</sup>. Elles sont les produits de gènes indépendants, localisés sur des chromosomes différents, et se distinguent par une localisation subcellulaire et tissulaire, une régulation et des propriétés catalytiques qui leur sont propres. Leur clonage et leur purification ont été réalisés entre 1991 et 1994. La nomenclature la plus couramment utilisée est la suivante : nNOS (aussi nommée Type I, NOS-I ou NOS-1) d'abord isolée du tissu neuronal où elle est prédominante, iNOS (Type II, NOS-II ou NOS-2) qui est inductible dans une grande variété de cellules et tissus, et eNOS (Type III, NOS-III ou NOS-3) pour l'isoforme découverte originellement dans les cellules endothéliales vasculaires.

Les NOS sont également parfois classées selon leur mécanisme d'expression et leur dépendance au calcium : les NOS constitutives (eNOS et nNOS), pour lesquelles une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca<sup>2+</sup> est nécessaire à la production de NO, et la NOS inductible (iNOS), dont l'activité est indépendante des flux calciques. Le potentiel de synthèse de NO par les NOS constitutives (concentrations nanomolaires) est très inférieur à celui de la NOS inductible (concentrations sub-micromolaires). L'idée selon laquelle la eNOS et la nNOS sont exprimées de façon constitutive tandis que la iNOS est induite durant la réponse immunitaire est vraie dans la majeure partie des situations. Cette classification est toutefois désuète du fait de l'existence de conditions entraînant une hausse de l'expression génique pour les enzymes constitutives : la eNOS voit par exemple son niveau d'expression augmenté dans

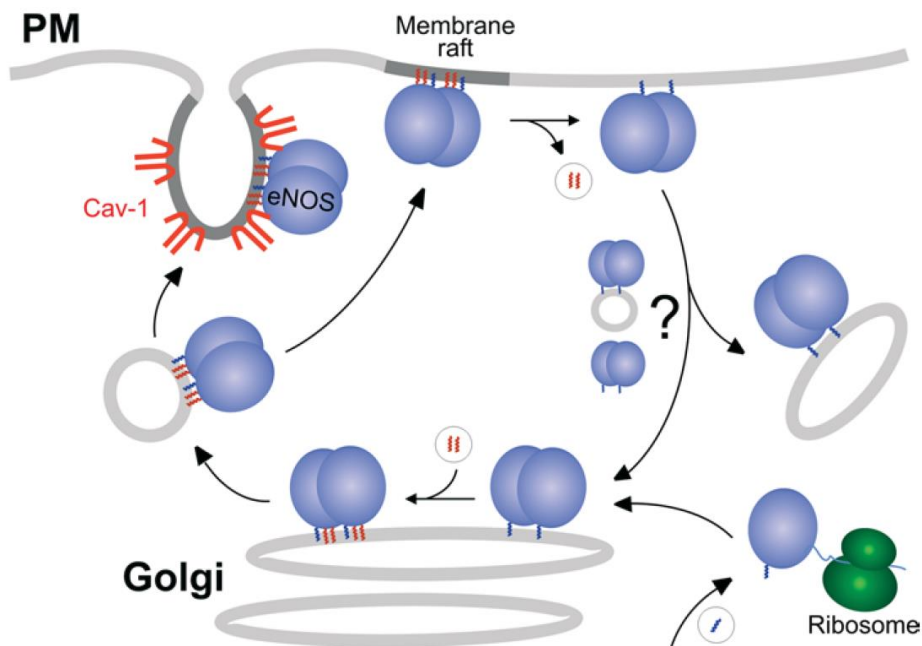
certaines situations comme la stimulation par des œstrogènes, l'hyperthermie, l'exercice physique et les forces de cisaillement hémodynamiques<sup>27-30</sup>. À l'inverse, il existe des conditions physiologiques faisant de la iNOS une enzyme exprimée « constitutivement », comme c'est par exemple le cas dans le colon, la trachée, les poumons et le foie<sup>31-33</sup>.

#### 1.2.2.2 Localisation tissulaire et subcellulaire des NO Synthases

Si la nNOS et la eNOS tiennent leur dénomination de l'origine tissulaire à partir de laquelle elles furent décrites pour la première fois, cette classification n'est pas absolue<sup>34</sup>. La nNOS est aussi présente de façon importante dans le muscle squelettique par exemple. La iNOS, initialement purifiée à partir de macrophages activés, est aussi induite dans de très nombreux types cellulaires comme les cardiomyocytes, les fibroblastes, les hépatocytes, les cellules gliales ou les cellules musculaires lisses vasculaires. La eNOS, enfin, fut d'abord purifiée et clonée à partir de l'endothélium vasculaire, mais elle est aussi exprimée dans les cardiomyocytes ou les plaquettes sanguines.

La compartimentalisation intracellulaire des isoformes de NOS est cruciale pour leurs activités de transduction du signal respectives. En plus de dépendre du type cellulaire, l'expression de chaque isoforme est en effet restreinte à des compartiments subcellulaires particuliers. Un exemple très marquant est le cas des cardiomyocytes, dans lesquels les trois isoformes sont exprimées (pour la iNOS seulement en réponse à des stimuli proinflammatoires). Les souris eNOS<sup>-/-</sup> et nNOS<sup>-/-</sup> développent une hypertrophie cardiaque liée à l'âge, mais seules les souris nNOS<sup>-/-</sup> sont hypertensives. Ces phénotypes ont pu être expliqués par une localisation subcellulaire différencielle de ces isoformes : la nNOS est proche du réticulum sarcoplasmique tandis que la eNOS se situe au niveau des cavéoles des cardiomyocytes (avec les récepteurs β-adrénergiques et les canaux calciques de type L)<sup>35</sup>. Ces isoformes sont également connues pour exercer une régulation différente des flux de calcium : la eNOS inhibe l'influx calcique en réponse à des agonistes des récepteurs β-adrénergiques (et *via* les canaux calciques de type L), alors que la nNOS facilite la sortie de calcium du réticulum sarcoplasmique. Ceci peut être facilement expliqué par les localisations subcellulaires de ces deux isoformes, qui favorisent respectivement leur interaction avec la cavéoline-3 et les récepteurs à la ryanodine.

De manière générale, la iNOS se trouve sous forme particulière (à l'état dimérique) dans le cytosol. Mais elle a aussi été observée sous forme monomérique dans les péroxysomes d'hépatocytes, ainsi qu'au pôle apical des cellules épithéliales où elle s'associe au cytosquelette d'actine corticale<sup>36,37</sup>. La eNOS est majoritairement exprimée au niveau membranaire dans le Golgi, les cavéoles et les radeaux lipidiques<sup>38</sup>. La nNOS enfin, a été décrite aussi bien sous forme soluble dans le cytosol, que sous forme particulière au niveau du réticulum endoplasmique et des zones de densité post-synaptique<sup>39</sup>.



**Figure I-5 : Trafic intracellulaire de la eNOS<sup>38</sup>.** La eNOS est ancrée à la membrane du Golgi après avoir été myristoylée à l'extrémité N-ter (Gly-2) au cours de sa traduction. Elle est ensuite adressée à la membrane plasmique grâce à sa palmitoylation (Cys-15 et Cys-26), au niveau de radeaux lipidiques ou des cavéoles. Le transport rétrograde de la eNOS de la membrane plasmique au Golgi est initié en cas de dépalmitoylation.

Les NOS peuvent également être transloquées au sein de différents compartiments cellulaires. La eNOS est l'isoforme la plus étudiée du point de vue de son trafic intracellulaire. Elle subit des translocations entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique induites par des modifications post-traductionnelles qui affectent son ancrage lipidique (palmitoylation et myristoylation) (cf. Figure I-5)<sup>38</sup>. L'association eNOS/cavéoline inhibe l'activité de la eNOS. Après stimulation par un agoniste, la concentration en  $Ca^{2+}$  intracellulaire augmente, induisant alors l'association de la CaM à la eNOS et provoquant dans le même temps sa dissociation de la cavéoline. La eNOS est dépalmitoylée et acheminée jusqu'au Golgi où elle est phosphorylée avant de revenir à la membrane où son activité est la plus élevée. La nNOS peut aussi avoir une

localisation membranaire : grâce à son domaine PDZ (*PSD/Disc-large/ZO-1*), elle s'associe à la protéine PSD-95 (*Post synaptic density-95*) qui est palmitoylée, et se localise dans la densité post-synaptique des neurones.

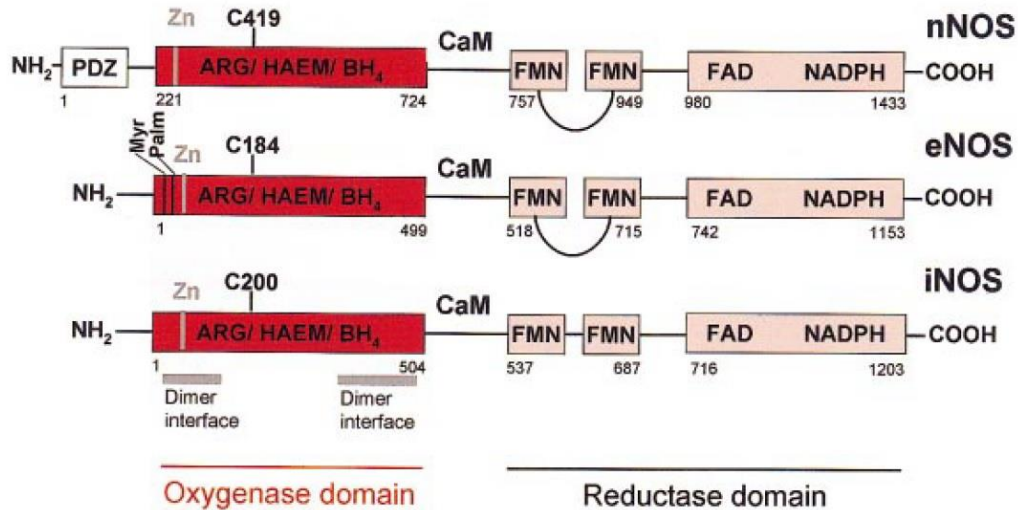
### 1.2.2.3 Structure des NO Synthases

Les NOS des mammifères sont composées d'un domaine oxygénase (N-terminal) et d'un domaine réductase (C-terminal) (cf. Figure I-6). Le domaine oxygénase des NOS lie l'arginine et deux cofacteurs, la (6R)-5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>) et l'hème (coordination avec le cation Fe<sup>2+</sup> et la protoporphyrine IX). Le domaine réductase de la NOS peut être subdivisé en deux domaines de liaison aux flavines FAD (*Flavin adenine dinucleotide*) et FMN (*Flavin mononucleotide*). Le domaine réductase lie également le NADPH (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) qui fournit les électrons nécessaires à la catalyse enzymatique. Il est apparenté à la cytochrome P450 réductase microsomiale qui permet le transfert d'électrons du NADPH aux cytochromes P450 (métabolisme des acides gras, des stéroïdes, des prostaglandines et de nombreux xénobiotiques). Le domaine de liaison à FMN est connecté au domaine oxygénase par l'intermédiaire d'un segment d'une trentaine d'acides aminés formant le domaine de liaison à la calmoduline (CaM). La forme catalytique des NOS est un homodimère.

Les NOS inductible et constitutives partagent de 51 à 57% d'homologie dans la séquence primaire. Il y a une forte conservation des domaines de liaison aux cofacteurs, mais des divergences au niveau des segments de connexion (ex : domaine de liaison à la CaM) et dans des inserts. La eNOS et la nNOS partagent certaines séquences modifiées (liaison à la CaM) et deux inserts importants : une boucle d'autoinhibition (AI) de 45 acides aminés au sein du domaine FMN, et une extension de 42 acides aminés à l'extrémité C-ter du domaine réductase (CT). L'isoforme nNOS comporte également un domaine PDZ de 220 aa à l'extrémité N-terminale, qui est impliqué dans des changements de localisation subcellulaire de cette isoforme. Pour la iNOS, la liaison à la CaM est de très haute affinité et quasi irréversible, à tel point que la calmoduline est parfois considérée comme une sous-unité de cette isoforme. En conséquence, la iNOS est active de façon permanente et capable de générer du NO sur des périodes longues (plusieurs jours). La structure du domaine de fixation à la CaM est modifiée dans les NOS constitutives, ce qui rend leur activité dépendante des flux calciques, et permet seulement une flambée transitoire de la production de NO<sup>40</sup>. Certaines modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation de la eNOS permettent toutefois de prolonger leur activité<sup>41</sup>. Pour

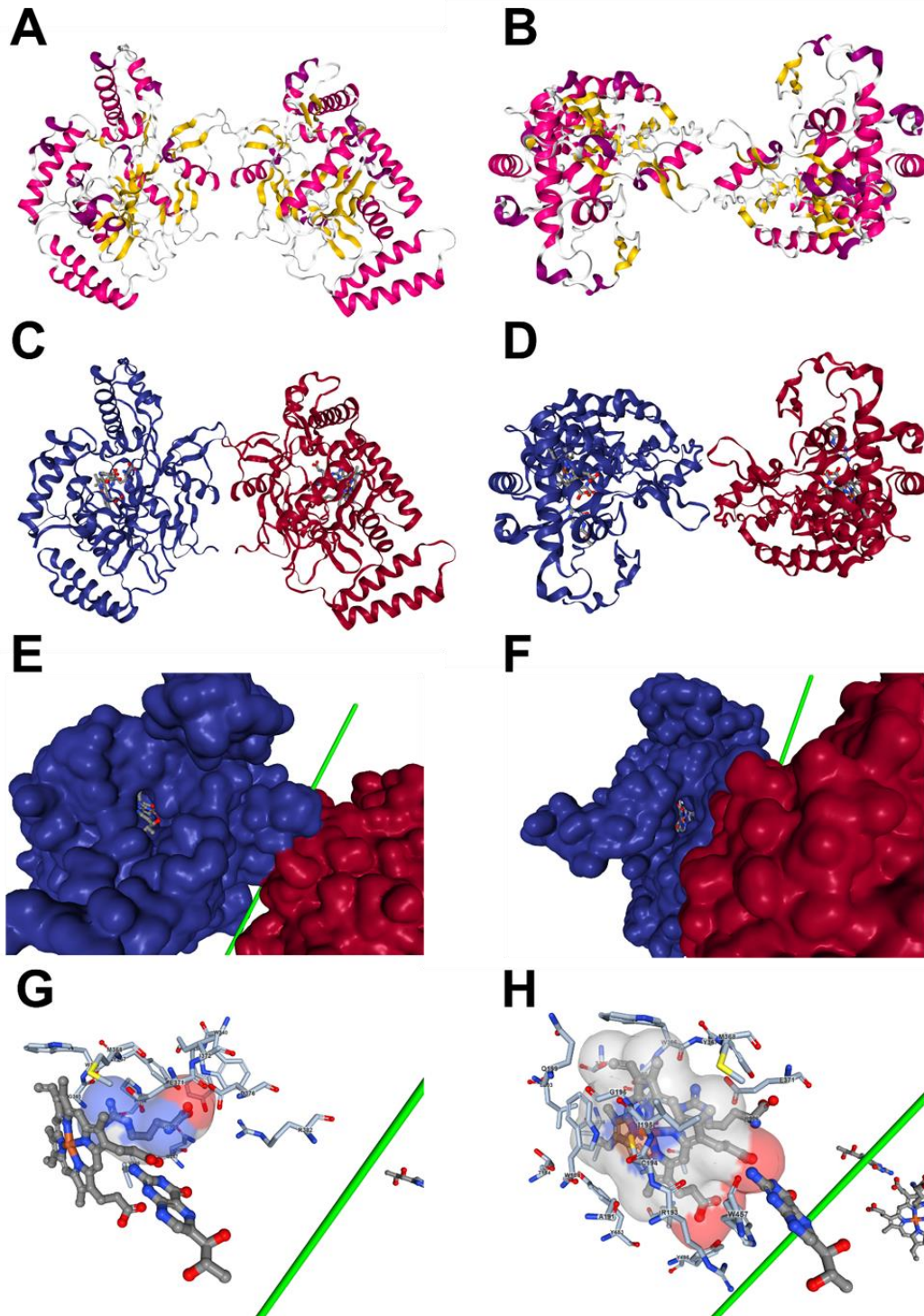


les NOS constitutives, il a aussi été montré que la délétion de la boucle d'auto-inhibition (AI) présente dans le domaine FMN et la délétion de l'extension CT résultaient en une liaison à la CaM pour de plus faibles concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$ , et en une hausse de l'activité du domaine réductase<sup>42,43</sup>.



**Figure I-6 : Organisation des domaines structuraux des isoformes de NOS humaines<sup>26</sup>.** La position des différents domaines de liaison au substrat et aux cofacteurs est indiquée, tout comme la localisation de l'atome de zinc, du résidu cystéine qui est coordonné à l'hème, du site de fixation de la CaM, de la boucle d'autoinhibition (eNOS et nNOS), des sites de myristoylation (Myr) et palmitoylation (Palm) (eNOS) et de l'interface du dimère.

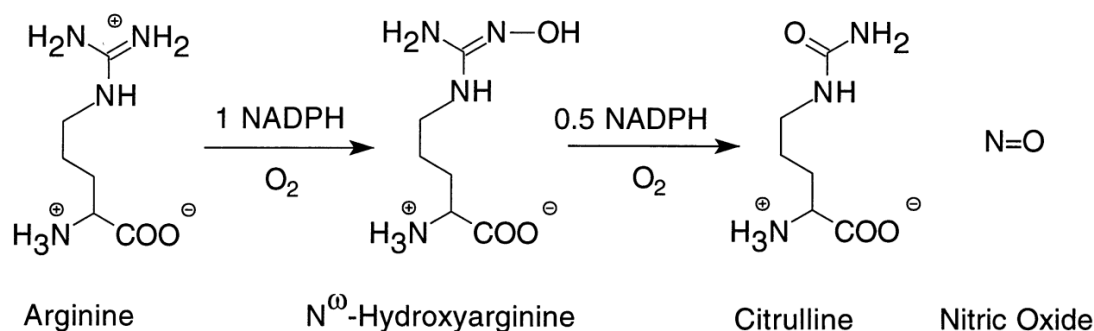
La technique de cristallisation aux rayons X a permis la détermination de structures à haute résolution des NO synthases, souvent par fragments et avec différents ligands (cf. Figure I-7)<sup>44</sup>. Les polypeptides AI et CT insérés augmentent la zone de contact entre les domaines FAD et FMN, et influencent la dépendance à la CaM de l'enzyme. La comparaison des structures des différentes isoformes de NOS révèle une organisation générale et une forme moléculaire très proches, avec une orientation relative des cofacteurs et une stéréochimie au sein du centre catalytique similaires<sup>45</sup>. L'association des NOS en dimères actifs fait intervenir une large interface dans le domaine oxygénase. La  $\text{BH}_4$  se lie au niveau de cette interface et aide à stabiliser la structure quaternaire de l'enzyme. En plus de la  $\text{BH}_4$ , l'hème et la L-Arginine favorisent la dimérisation et/ou stabilisent les trois isoformes de NOS à l'état de dimère actif<sup>46</sup>. Les NOS humaines contiennent aussi un cluster zinc-tétrathiolate formé par un cation  $\text{Zn}^{2+}$  qui établit une liaison de coordination avec deux motifs CysXXXXCys (un sur chaque monomère). Le zinc se situe à l'interface du dimère de NOS où il joue un rôle majeur dans sa stabilisation<sup>47,48</sup>.



**Figure I-7 :** Visualisation 3D d'un dimère de domaines oxygénase de iNOS murine à l'aide de l'application web NGL Viewer. La structure a été résolue par cristallographie aux rayons X avec une résolution de 2,6 Å (Identifiant Protein Data Bank = 1NOD)<sup>44</sup>. Représentation en rubans des structures secondaires (en rose les hélices  $\alpha$ , en jaune les feuillets  $\beta$ ) du dimère avec une vue de face (A) et du dessus (B). En (C) et (D) les mêmes représentations avec une couleur différente (rouge ou bleue) pour chaque monomère, et avec les différents ligands du site actif (L-arginine,  $BH_4$ , hème). La représentation de la surface occupée par les atomes révèle seulement deux poches exposées au solvant (pour chaque monomère), qui permettent d'apercevoir la  $BH_4$  (E) et l'hème (F). L'axe de symétrie C2 est représenté en vert. Les acides aminés du domaine oxygénase qui entrent en interaction avec l'arginine (G) et l'hème (H) au niveau du site actif sont également visualisables.

### 1.2.3 Mécanisme de synthèse de NO par les NO synthases

Les NO synthases convertissent la L-arginine en L-citrulline et en NO par l'intermédiaire de deux réactions de mono-oxydation successives (cf. Figure I-8). Elles utilisent le NADPH et O<sub>2</sub> comme cosubstrats. Le mécanisme catalytique est décomposé comme suit :

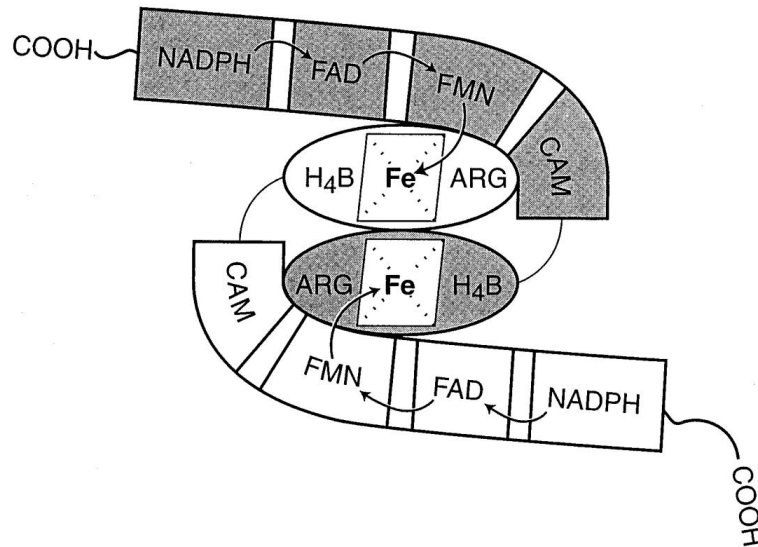


**Figure I-8 : Réaction catalysée par les NOS et aboutissant à la libération de NO<sup>49</sup>.**

- Transfert des électrons au sein du domaine réductase :

L'apport en électrons servant à la synthèse de NO débute avec le transfert d'un ion hydrure H<sup>-</sup> provenant du NADPH directement sur le N5 du FAD au niveau du domaine réductase. L'hydroquinone FAD nouvellement formée doit ensuite transférer un électron au FMN, qui se comporte comme une navette assurant le passage d'un électron à la fois vers l'hème du domaine oxygénase. Les cofacteurs FAD et FMN sont positionnés à une distance de seulement 5 Å l'un par rapport à l'autre, dans une configuration optimale facilitant le transfert électronique de FAD à FMN. Pour que le transfert se poursuive jusqu'à l'hème, il est nécessaire que le FMN se rapproche au moyen d'une transition de conformation de l'enzyme qui s'effectue autour de la charnière du domaine réductase.

Le rôle des flavines est par conséquent essentiel car il permet au NADPH, un donneur de deux électrons, de transférer des électrons sur l'hème, qui est un accepteur d'un électron, en formant des intermédiaires radicalaires semiquinones stables. A noter que le cheminement des électrons emprunte les deux domaines flaviniques d'une sous-unité avant de se poursuivre jusqu'au domaine héminique de la sous-unité adjacente (cf. Figure I-9)<sup>50</sup>. Ceci a pour conséquence directe que la forme monomérique des NOS est inactive.



**Figure I-9 : Cheminement des électrons au sein d'un dimère de NOS<sup>50</sup>.** Les électrons fournis par le NADPH sont transférés sur les flavines FAD et FMN du domaine réductase puis sur l'hème du domaine oxygénase de la sous-unité adjacente.

- Rôle de la liaison à la calmoduline (CaM) :

La liaison de CaM s'effectue via ses motifs EF hands sur la séquence de reconnaissance des NOS dans une orientation antiparallèle. Cette liaison est indispensable au transfert électronique entre le domaine réductase et le domaine oxygénase<sup>51</sup>. Elle est semblable à un commutateur électrique qui déclencherait le transfert en favorisant le changement conformationnel des NOS. Elle accélère également la réduction des flavines par le NADPH.

- Synthèse de NO au sein du domaine oxygénase :

Le substrat, la L-Arginine, est converti en NO et L-Citrulline en présence de O<sub>2</sub> au niveau du domaine oxygénase des NOS *via* deux réactions de mono-oxydation consécutives. Le cycle catalytique a été résolu en grande partie et ressemble à celui des cytochromes P450 (cf. Figure I-10).

La première étape requiert le transport de deux électrons du domaine réductase vers l'hème, où l'activation de l'oxygène a lieu<sup>26</sup>. C'est une réaction de mono-oxydation standard telle qu'elle se produit avec les cytochromes P450, qui conduit à la formation de N<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginine. Elle débute par la réduction du Fe<sup>3+</sup> de l'hème en Fe<sup>2+</sup> grâce à l'électron transféré par FMNH<sub>2</sub>. Puis l'oxygène se lie et forme un complexe oxy-ferreux [Fe<sup>2+</sup> = O<sub>2</sub>], qui est

équivalent à un complexe superoxyde-ferrique [ $\text{Fe}^{3+} = \text{O}_2^{\cdot-}$ ]. La  $\text{BH}_4$  cède ensuite un électron au complexe qui va subir une première protonation et devenir [ $\text{Fe}^{3+} = \text{OOH}^-$ ]. La protonation de l'hydroperoxyde induit la rupture de la liaison O-O, générant un radical cationique lié à la protéine [ $\text{Fe}^{4+} = \text{P}^{\cdot+}$ ]. Ce dernier oxyde rapidement la L-arginine en  $N^0$ -hydroxy-L-arginine (NOHA) et permet un retour de l'hème à l'état ferrique. Un second électron provenant de  $\text{FMNH}^-$  permet finalement de régénérer la  $\text{BH}_4$  réduite.

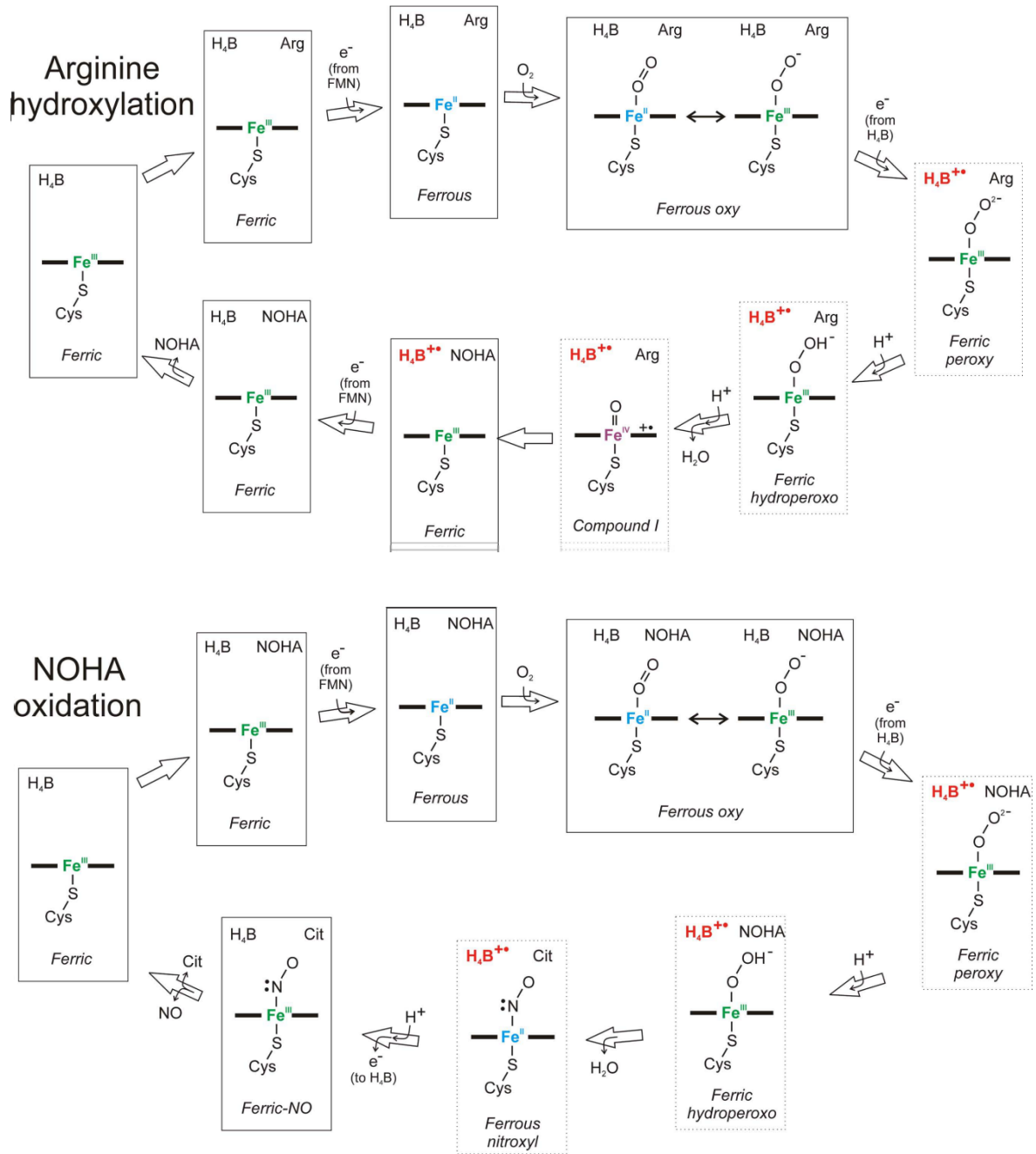


Figure I-10 : Mécanisme catalytique détaillé de la synthèse de NO (voir le texte pour explications)<sup>52</sup>.

La seconde étape d'oxydation ne consomme qu'un électron issu du domaine réductase et accomplit une réaction d'activation du dioxygène de façon similaire : un électron transféré par FMNH<sub>2</sub> permet d'abord la réduction de l'hème. La liaison d'O<sub>2</sub> provoque la formation du complexe [Fe<sup>2+</sup> = O<sub>2</sub>] ↔ [Fe<sup>3+</sup> = O<sub>2</sub><sup>•-</sup>]. Puis la BH<sub>4</sub> réduit le complexe qui ne subit alors qu'une seule protonation pour devenir un complexe hydroperoxyde [Fe<sup>3+</sup> = OOH<sup>-</sup>]. C'est ce complexe qui converti la NOHA en L-citrulline par oxydation, formant dans le même temps un complexe ferreux-nitrosyl [Fe<sup>2+</sup> = NO]. Enfin, la libération de NO du complexe ferreux est déclenchée par la réduction du radical BH<sub>4</sub> et la restauration d'un hème ferrique.

La BH<sub>4</sub> intervient donc activement dans le mécanisme catalytique, en changeant d'état redox. Elle joue tour à tour la fonction de donneur (activation de l'oxygène) puis d'accepteur d'électron (recapture de l'électron provenant du complexe ferreux-nitrosyl afin de déclencher la libération de NO)<sup>52</sup>. Lorsque la disponibilité en BH<sub>4</sub> est réduite, il y a un découplage de l'enzyme et une production d'anions superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

#### 1.2.4 Disponibilité en substrats et activité NO Synthase

L'activité enzymatique des NOS est finement régulée, en fonction notamment de la disponibilité en cofacteurs et en substrats. Lorsque les cofacteurs (NADPH, BH<sub>4</sub>, FAD, FMN) sont présents en quantité suffisante, l'activité NOS est dépendante de la disponibilité en arginine et en oxygène. Il existe un paradoxe appelé le paradoxe de l'arginine, selon lequel malgré la présence d'un pool d'arginine cellulaire suffisant pour la synthèse de NO, la disponibilité en arginine reste un facteur limitant pour l'activité NOS. L'arginase 1, enzyme exprimée de façon caractéristique par les macrophages et cellules dendritiques exposés à l'IL-4, l'IL-13 ou le TGF-β, clive l'arginine pour former de l'ornithine et de l'urée, menant à une déplétion du pool d'arginine.

Trois processus régulent principalement la disponibilité en arginine<sup>53,54</sup> : 1) L'activité arginase, qui catalyse la première étape de la synthèse des polyamines et entre en compétition avec les NOS en consommant une grande proportion du pool d'arginine 2) L'absorption de l'arginine par les cellules via le transporteur d'acides aminés cationiques et 3) La formation de diméthylarginine asymétrique (ADMA) qui se comporte comme un inhibiteur endogène des NOS. La réduction de la disponibilité en arginine crée un découplage de la NOS et la convertit en un générateur d'anions superoxyde<sup>55</sup>.

Les changements de concentration en O<sub>2</sub> ont aussi une profonde influence sur l'activité des NOS. La dépendance à l'oxygène est un des facteurs qui différencie le plus les isoformes de NOS. Ainsi, le K<sub>m</sub> pour O<sub>2</sub> (concentration en O<sub>2</sub> pour laquelle l'activité NOS atteint la moitié de sa valeur maximale) diffère considérablement d'une isoforme à l'autre : 23 μM pour la eNOS, 135 μM pour la iNOS, et 350 μM pour la nNOS<sup>56</sup>. Lorsque la concentration en O<sub>2</sub> est inférieure ou proche du K<sub>m</sub>, l'activité enzymatique devient très dépendante de cette concentration. Ainsi, la nNOS est l'isoforme la plus affectée par les fluctuations de concentration en O<sub>2</sub>. A l'opposé, la eNOS atteint son activité maximale pour de faibles concentrations en O<sub>2</sub>, ce qui lui permet d'exercer des fonctions critiques dans le système cardiovasculaire. La localisation subcellulaire des NOS joue également un rôle important, car la concentration en O<sub>2</sub> est 10 fois supérieure au niveau membranaire, du fait de la solubilité très supérieure des gaz en milieu hydrophobe (NO, O<sub>2</sub>, CO). L'activité eNOS est par exemple multipliée par 10 après sa translocation à la membrane<sup>57</sup>.

## 1.3 NO est une molécule de signalisation cellulaire

### 1.3.1 Sélectivité des cibles de NO : effets de seuils et diversité de réponses

A la complexité de la chimie de NO s'ajoute la diversité de réponses de ses cibles biologiques, qui dépend souvent de la concentration et de la durée d'exposition à NO. De nombreuses démonstrations ont été faites d'une activation spécifique de certaines protéines ou de cascades de transduction du signal en réponse à des seuils distincts de concentration en NO (cf. Figure I-11). La sGC, une des plus importantes cibles biologiques de NO, est activée par de très faibles concentrations en NO (0,5-5 nM). Les protéines de la famille des MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase*) et la sérine/thréonine kinase Akt (*Protein kinase B*) sont phosphorylées en réponse à des concentrations légèrement supérieures en NO (respectivement 10-30 nM et 30-60 nM). Le facteur de transcription HIF-1α (*Hypoxia-inducible factor-1α*) est stabilisé à des concentrations intermédiaires (100-300 nM). La protéine suppresseur de tumeur p53 est quant à elle activée par phosphorylation uniquement en cas de fortes concentrations en NO (>400 nM)<sup>58</sup>.

Ainsi, à des concentrations faibles et modérées, NO favorise la croissance cellulaire et protège les cellules de l'apoptose. Lorsque cette concentration atteint une valeur élevée, ce sont

au contraire les effets proapoptiques et entraînant l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en sénescence qui sont privilégiés.

NO est un exemple typique de molécule à deux visages : pour une même fonction biologique, elle peut tout aussi bien présenter des effets bénéfiques et des effets délétères, en fonction du contexte cellulaire dans lequel elle est produite et des conditions de l'étude. Dans le développement des cancers par exemple (et nous y reviendrons dans cette synthèse bibliographique), de nombreuses études rapportent des effets apparemment opposés. NO présente dans certains cas des effets proapoptotiques, antioxydants et cytotoxiques qui entraînent une réduction du volume des tumeurs. Parfois, au contraire, il est un indicateur de mauvais pronostic en favorisant l'angiogenèse, en stimulant la migration et l'invasion, et en provoquant des lésions de l'ADN.

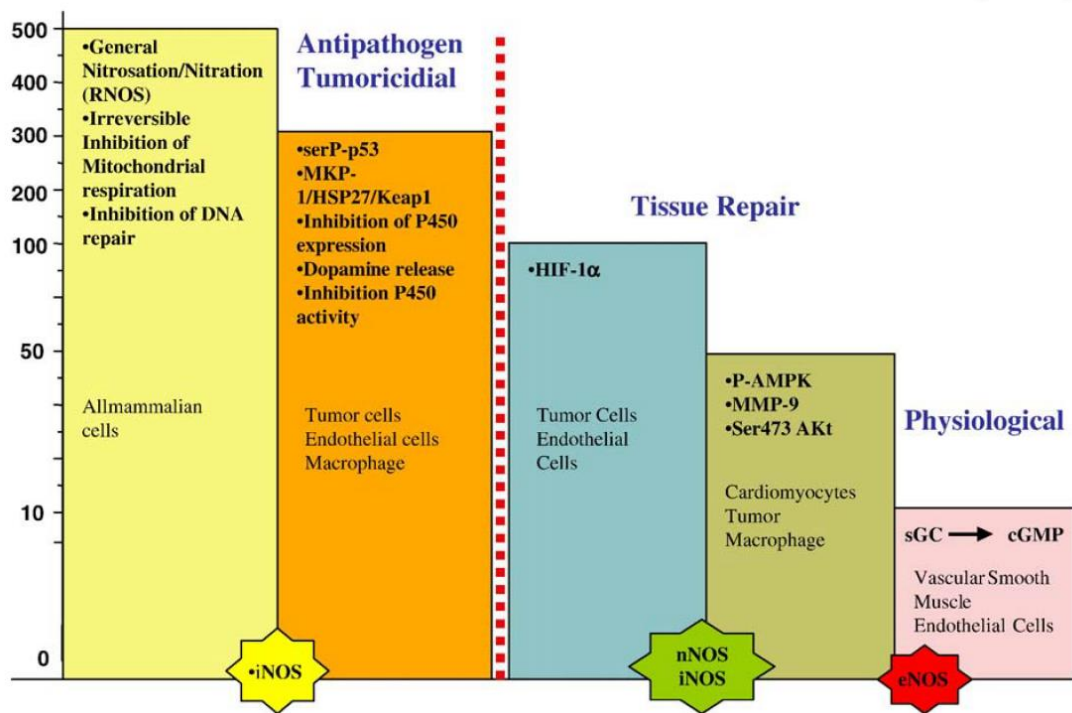


Figure I-11 : Représentation schématique de la sensibilité de plusieurs cibles de NO à des valeurs seuil de concentrations générées par les NOS<sup>58</sup>.

Pour expliquer une telle diversité de réponses, il faut comprendre qu'en plus de la quantité de NO qui est produite, l'aspect temporel de l'exposition des cibles est également un facteur déterminant. Les trois isoformes de NOS diffèrent dans leur capacité de production de NO, à la fois en termes de quantités mais aussi de durée. Alors que les NOS constitutives (eNOS et nNOS) produisent des quantités modérées de NO de façon très transitoire, la iNOS génère de



fortes concentrations sur des durées prolongées. Ces propriétés sont très importantes car certaines protéines sont activées (ou inhibées) immédiatement au contact de NO (sGC, HIF-1 $\alpha$  et ERK par exemple) tandis que d'autres nécessitent une exposition prolongée à NO (p53). La durée de la réponse peut également beaucoup varier d'une cible à l'autre : certaines protéines vont être activées (ou inhibées) de façon très transitoire par NO (sGC, et HIF-1 $\alpha$ ), et donc revenir rapidement à leur état d'origine lorsque la production de NO est interrompue. D'autres resteront activées (ou inhibées) sur une période plus longue (ERK et p53)<sup>59</sup>.

## 1.3.2 Les S-nitrosylations : un nouveau paradigme en signalisation

### 1.3.2.1 La S-nitrosylation : un mécanisme sélectif et réversible ?

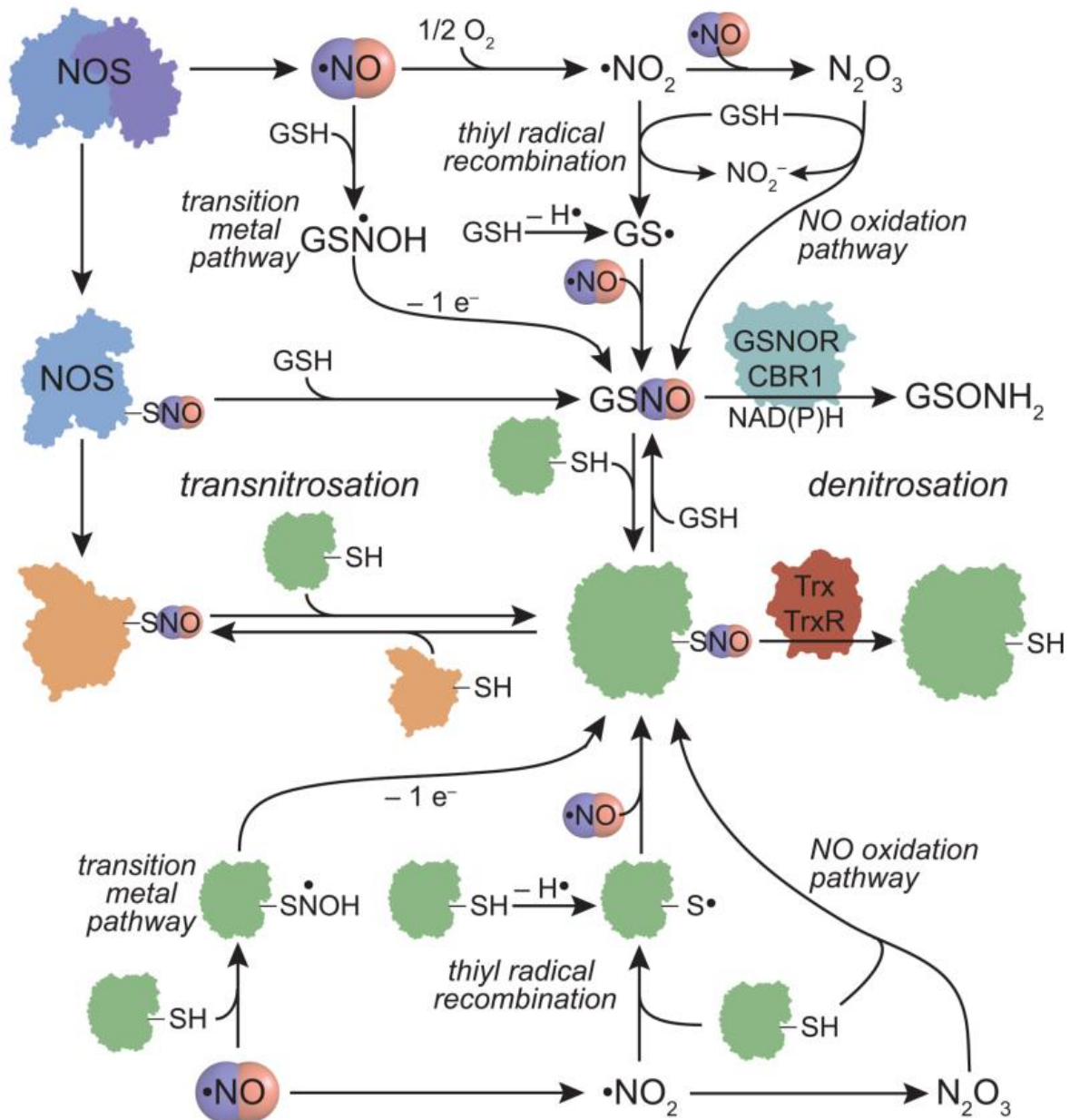
Au cours de ces dernières années, la S-nitrosylation des protéines est peu à peu apparue comme une modification post-traductionnelle jouant un rôle majeur en signalisation cellulaire<sup>20</sup>. Dans de nombreux cas, la nitrosylation des thiols se fait sur des cystéines oxydées et induit la formation de ponts disulfure<sup>60</sup>. Le terme « S-nitrosylation » est souvent employé dans la littérature pour faire une analogie avec la phosphorylation. D'un point de vue mécanistique, il peut tout aussi bien s'agir d'une transnitrosation (typiquement par N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ou par transfert de la S-nitrosylation d'un nitrosothiol vers un autre thiol) que d'une nitrosylation oxydative ou d'une nitrosation par un complexe métallique nitrosylé (cf. Figure I-12). Pour que l'analogie entre la S-nitrosylation et les systèmes de signalisation par phosphorylation soit valable, il faut s'interroger sur la spécificité de cette modification, ainsi que sur sa réversibilité. La spécificité des S-nitrosylations dépend de la réactivité chimique entre l'agent nitrosylant et la cible. Cette réactivité est modulée par plusieurs facteurs : la réactivité du résidu cible (état d'oxydation des cystéines, hydrophobicité), les concentrations relatives et la localisation subcellulaire de l'agent nitrosylant et de la protéine cible.

La concentration en agents de nitrosation (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) provenant des voies d'oxydation de NO décroît très rapidement en s'éloignant de la source de production de NO car ils sont décomposés en produits stables (l'hydrolyse de N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> forme par exemple du nitrite). L'interaction directe ou la colocalisation de protéines avec les NOS permettent d'apporter de la sélectivité à la S-nitrosylation. L'arginase 1 et la COX-2 (*cyclooxygenase-2*) sont ainsi S-nitrosylées après avoir formé un complexe avec la iNOS<sup>61</sup>. Ces complexes peuvent aussi servir d'échafaudage dans

une interaction indirecte avec une autre protéine : Le complexe iNOS/COX-2 permet par exemple la S-nitrosylation de la cPLA<sub>2</sub> (*cytosolic phospholipase A2*, qui catalyse le clivage de l'acide arachidonique des phospholipides membranaires, et permet la biosynthèse de la prostaglandine E2)<sup>62</sup>. La compartimentalisation des NOS peut également apporter de la spécificité à la S-nitrosylation. La eNOS est la seule isoforme qui peut être adressée à des sous-compartiments membranaires (les cavéoles et l'appareil de Golgi) par myristoylation et palmitoylation. Ceci a pu être associé à une hausse généralisée de la S-nitrosylation de protéines dans ces compartiments<sup>63</sup>. Les NOS peuvent aussi être S-nitrosylées au niveau de leur cluster Zn<sup>2+</sup>-tétrathiolate<sup>64</sup>. Une réaction de transnitrosation pourrait avoir lieu au voisinage proche de ces NOS, même si ce mécanisme est encore controversé.

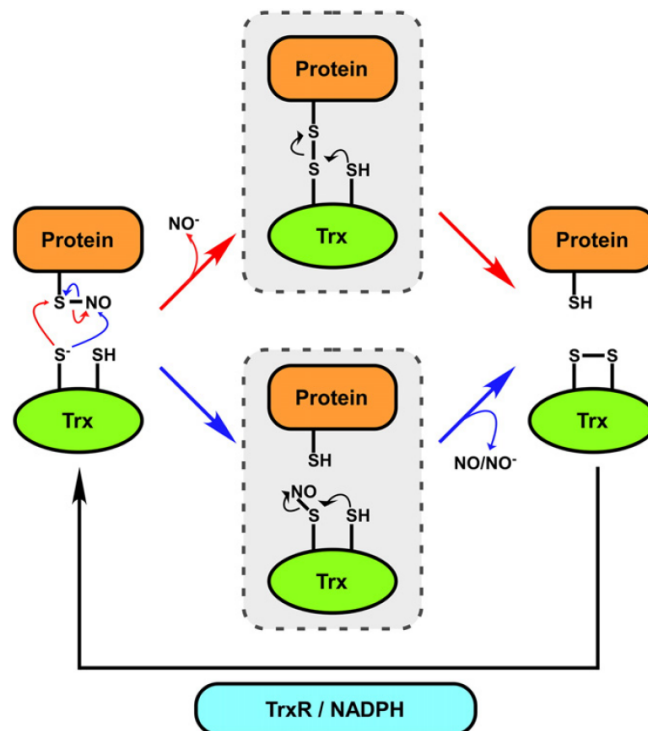
Le glutathion (GSH) est la molécule portant un thiol la plus présente dans le cytoplasme. La forme S-nitrosylée du glutathion (GSNO) peut elle aussi transférer son groupement nitrosothiol par transnitrosation. Certaines interactions protéine-protéine peuvent également guider les réactions de transnitrosation dans une direction, notamment lorsque la S-nitrosylation résulte en un changement de conformation rendant le nitrosothiol inaccessible ou en un changement de localisation subcellulaire. De cette façon, la S-nitrosylation en C152 de la GAPDH (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) induit sa liaison à Siah1 (une E3 ubiquitine ligase) qui comporte une séquence de localisation nucléaire conduisant à une translocation du complexe GAPDH/Siah1 dans le noyau, où la GAPDH transnitrosyle Sirt1 (*Silent information regulator 1*), HDAC2 (*Histone deacetylase 2*) et DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*)<sup>65</sup>.

Jusqu'à très récemment, toutes les études tendaient à montrer que, contrairement aux phosphorylations, la spécificité des S-nitrosylations ne reposait pas sur la reconnaissance d'une cible par une enzyme. Cette conception fut toutefois bouleversée par la découverte d'un complexe iNOS/S100A8/A9, formé en réponse à une stimulation par l'IFN- $\gamma$  et les LDL<sub>ox</sub>, qui possède une activité S-nitrosylase et dirige la S-nitrosylation de la GAPDH et d'autres protéines cibles au niveau d'un motif protéique consensus (I/LXCXXD/E) dans des cellules myéloïdes humaines<sup>66</sup>.



**Figure I-12 : Présentation des mécanismes de formation et de dégradation des nitrosothiols protéiques<sup>67</sup>.** L'activité NOS permet une synthèse de NO et une auto-S-nitrosylation. La S-nitrosylation du glutathion (nitrosoglutathion GSNO) ou de protéines peut être réalisée soit par des voies d'oxydation de NO (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), soit par la voie catalysée par un métal de transition, ou soit par une nitrosylation oxydative (recombinaison d'un radical thiyl). Une fois formés, le GSNO et les protéines portant un S-nitrosothiol peuvent transférer la S-nitrosylation à d'autres protéines grâce à une réaction de transnitrosation. La dégradation du nitrosothiol de GSNO est effectuée par des enzymes dépendantes du NAD(P)H, la GSNO réductase (GSNOR) ou la carbonyl réductase 1 (CBR1). La thioredoxine (Trx) peut dénitrer les protéines, un processus qui devient catalytique grâce à l'activité de la thioredoxine réductase (TrxR).

Si la S-nitrosylation est spécifique, elle est aussi réversible. Deux enzymes permettent la réduction du GSNO : la GSNOR (*GSNO reductase*) et la CBR1 (*Carbonyl reductase 1*), qui sont respectivement dépendantes du NADH et du NADPH<sup>67</sup>. Seule la Trx (*Thioredoxin*), elle aussi dépendante du NADPH, a jusqu'à présent été impliquée dans la dénitrosylation des protéines<sup>68</sup>. Le système Trx est mieux connu pour sa fonction de réduction des ponts disulfure qui joue un rôle clé dans l'homéostasie redox des cellules. La réduction par Trx des peroxyrédoxines (Prx) oxydées permet de maintenir leur activité de détoxification des peroxydes (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ONOO<sup>-</sup>).



**Figure I-13 : Mécanismes alternatifs de dénitrosylation des protéines par la thioredoxine<sup>69</sup>.** Deux mécanismes réactionnels de réduction d'un groupement SNO protéique sont proposés et impliquent soit : (1) la formation d'un intermédiaire disulfure intermoléculaire (flèches rouges) ou (2) la S-nitrosylation transitoire de Trx (flèches bleues).

La réduction des ponts S-S par la Trx fait intervenir un motif comportant une cystéine catalytique et une cystéine de résolution (Cys-X-X-Cys). Ces mêmes cystéines sont impliquées dans la réduction des S-nitrosothiols protéiques par la Trx. Deux mécanismes réactionnels sont actuellement envisagés selon que l'attaque nucléophile de Trx sur le groupement SNO est dirigée contre l'atome de soufre ou d'azote (cf. Figure I-13)<sup>69</sup>. Le mécanisme impliquant la formation d'un intermédiaire disulfure mixte est supporté par une étude très récente : dans cette

dernière, une Trx mutée au niveau de sa cystéine de résolution a été utilisée pour piéger un très grand nombre de protéines S-nitrosylées dans des monocytes, des macrophages et dans des cellules de carcinome pulmonaire humaines<sup>70,71</sup>. Il faut remarquer que la forme réduite de la Trx est régénérée par la TrxR (*Thioredoxin reductase*), ce qui provoque sa réactivation.

### 1.3.2.2 Rôles des S-nitrosylations en signalisation cellulaire

Il est clairement établi que les S-nitrosylations peuvent modifier la fonction de nombreuses protéines. A l'ère de la protéomique, différentes techniques ont permis d'établir un profil global des protéines S-nitrosylées, le SNO-protéome. L'avènement de la technique du biotin-switch et le développement de techniques dérivées ont largement facilité la détection et l'identification à haut débit de protéines individuelles portant cette modification<sup>72</sup>. Environ un millier de protéines nitrosylables ont été identifiées : elles interviennent dans la signalisation de récepteurs, la transduction du signal, la contraction musculaire, l'apoptose, l'homéostasie redox, la régulation génique et même dans la synthèse de NO (cf. Tableau I-1)<sup>73</sup>.

Protein name	Gene name	Pathway
Type-1 angiotensin II receptor	AGTR1	Receptor signaling
Dynamin-1/2	DYN1, DYN2	
Insulin receptor	INSR	
NMDA receptor	NMDAR2A, NMDAR1	
Beta-arrestin-2	ARRB2	Signal transduction
MAP kinase 8	MAPK8	
Protein-tyrosine phosphatases, PTP1B, SHP1	PTP1B, PTP1C	
Dexamethasone-induced Ras-related protein 1	DEXRAS1	
GTPase HRas, NRas	HRAS, NRAS	Muscle contraction
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> ATPase	ATP2A1	
Myosin-9	MYH9	
Ryanodine receptor 1/2	RYR1, RYR2	Apoptosis
Apoptosis regulator Bcl-2	BCL2	
Caspase-3, caspase-9	CASP3, CASP9	
E3 ubiquitin-protein ligase XIAP	XIAP	NO synthesis
Arginase-1	ARG1	
Argininosuccinate synthase	ASS1	Redox regulation
Nitric oxide synthase, endothelial	NOS3	
Glutaredoxin-1	GRX	
Thioredoxin-1	TRX1	Heat shock response
Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	
Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	Gene regulation
Elongation factor 1-alpha	EF1A	
Histone deacetylase 2	HDAC2	
Hypoxia-inducible factor 1-alpha	HIF1A	
Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase	IKKB	Circulation
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II	CAMK2A	
E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2	MDM2	
Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit	NFKB1	
Tumor necrosis factor receptor superfamily	TNFRSF10A	Membrane channels
Hemoglobin	HBA1; HBA2	
Tissue-type plasminogen activator	PLAT	Respiratory chain
Voltage-gated potassium channel	KCNA8, KCNA5	
Cytochrome c oxidase subunit 2	MT-CO2	Protein homeostasis
Protein disulfide isomerase	PDI	
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	UBE2L3	Others
Cytosolic phospholipase A2	PLA2G4A	
Glucokinase	GCK	
Iron-responsive element-binding protein 2	IREB2	
Matrix metalloproteinase-9	MMP9	
Microsomal glutathione S-transferase 1	MGST1	
Syntaxin-1A	STX1A	
Vesicle-fusing ATPase	NSF	

Tableau I-1 : Exemples de protéines S-nitrosylées et de fonctions cellulaires qui leurs sont associées<sup>73</sup>.

L'impact des S-nitrosylations sur la fonction des protéines ciblées a parfois été étudié de manière plus approfondie. La S-nitrosylation inhibe par exemple la liaison à l'ADN de la sous-unité p50 de NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor- $\kappa$  light chain enhancer of activated B cells*)<sup>74</sup>. La stabilisation et l'activation de HIF-1 $\alpha$  par NO ont lieu même en normoxie à la fois grâce à une inhibition des prolyl hydroxylases (l'hydroxylation de résidus proline et arginine de HIF-1 $\alpha$  entraîne son ubiquitination) mais aussi grâce à la S-nitrosylation de HIF-1 $\alpha$  qui favorise son interaction avec les coactivateurs transcriptionnels CBP (*CREB-binding protein*) et p300<sup>75,76</sup>. La S-nitrosylation d'un groupement thiolate intervenant dans la liaison des ions Zn<sup>2+</sup> perturbe aussi la structure des doigts de zinc, des motifs couramment impliqués dans la liaison à l'ADN pour certains facteurs de transcription tels que Sp1 (*Specificity protein 1*) et EGR-1 (*Early growth response protein-1*)<sup>77</sup>. Les métalloprotéases matricielles (MMP) sont sécrétées sous forme inactive avec un propeptide comportant un résidu cystéine conservé dans cette famille de protéases. Cette cystéine est impliquée dans une liaison de coordination avec un atome de zinc (Zn<sup>2+</sup>) et trois histidines du domaine catalytique, formant un complexe intramoléculaire appelé interrupteur cystéine qui maintient les MMP sous forme inactive (« *cysteine switch* »). L'activation est généralement accomplie après le clivage du propeptide. Toutefois, il a été découvert que l'activation de MMP9 peut se produire sans que ce clivage ait lieu, par l'intermédiaire d'une S-nitrosylation de l'interrupteur cystéine<sup>78</sup>. Au niveau du réticulum sarcoplasmique du muscle cardiaque et squelettique, la S-nitrosylation régule également l'activité des canaux calciques RyR (*Ryanodine receptor*) et donc la sortie d'ions Ca<sup>2+</sup> dans le sarcoplasme<sup>79</sup>. Les S-nitrosylations ont donc une influence sur la globalité des processus de signalisation cellulaire. Elles ont aussi un impact sur des protéines régulant la plupart des autres modifications post-traductionnelles : phosphorylation, acétylation, sumoylation, palmitoylation, ubiquitination (voir la revue de Douglas T. Hess et Jonathan S. Stamler pour plus de détails à ce sujet)<sup>80</sup>.

### 1.3.3 Quel est le destin des cellules exposées à de fortes concentrations en NO ?

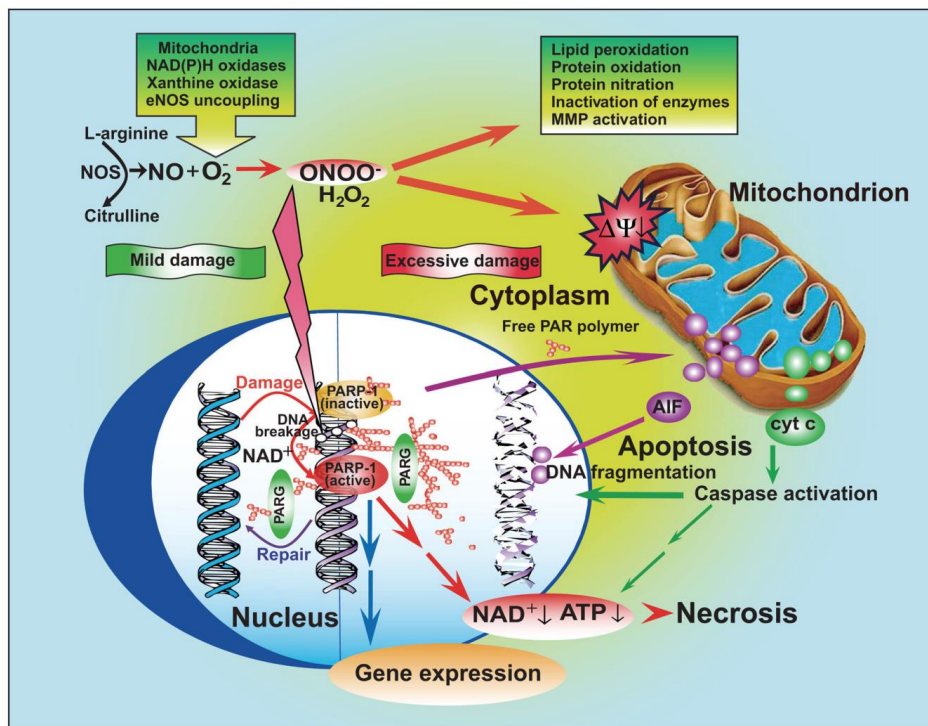
NO est une molécule aux multiples facettes : A de faibles concentrations, elle agit comme une molécule de signalisation régulant de très nombreux processus physiologiques. A de fortes concentrations essentiellement générées par une activité iNOS prolongée, elle favorise l'apparition de mutations et altère le fonctionnement de nombreuses protéines. Le destin des cellules confrontées à de fortes concentrations de NO va dépendre du contexte cellulaire et de

la sévérité des dommages, qui soit pourront être réparés, soit aboutiront à la mort cellulaire apoptotique voir nécrotique en cas de déplétion en ATP (*Adenosine triphosphate*).

La plupart des dommages macromoléculaires sont causés par des espèces réactives formées à partir de dérivés de NO ( $N_2O_3$ ,  $ONOO^-$ ,  $\cdot NO_2$ ). Au niveau de l'ADN, NO et le peroxy-nitrite provoquent respectivement des désaminations et des oxydations de bases mutagènes<sup>81</sup>. L'analyse des mutations induites par une exposition prolongée à NO révèle une fréquence élevée de substitutions de bases, mais aussi la présence de cassures double brin, de délétions et d'insertions. Les modifications post-traductionnelles (S-nitrosylation, nitration) de protéines induites par NO peuvent également inactiver des enzymes cruciales dans le métabolisme (ex : aconitase) ou la détoxification (ex : Mn-SOD), et inhiber la réparation de l'ADN (ex : Ribonucléotide réductase). L'inhibition de la respiration cellulaire par NO fut l'un des premiers mécanismes de cytotoxicité dépendante de NO à être mis en évidence<sup>82</sup>. NO module en effet le fonctionnement de la mitochondrie en interagissant avec différents composants de la chaîne respiratoire mitochondriale. En concentration subnanomolaire, NO induit une inhibition réversible de la respiration grâce à une S-nitrosylation du complexe IV (cytochrome *c* oxydase) au niveau du fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) hémunique ou du cuivre cuprique ( $Cu^{2+}$ ) de son centre bimétallique<sup>56</sup>. Des concentrations en NO plus fortes inhibent la chaîne respiratoire au niveau du complexe I (NADH déshydrogénase), cette fois de manière irréversible *via* l'oxydation ou la S-nitrosylation de groupements thiols spécifiques<sup>83</sup>.

De très nombreux travaux ont révélé une modulation par NO de la mort cellulaire par apoptose<sup>84</sup>. NO induit l'apoptose dans des types cellulaires variés dont les macrophages, les neurones, les cellules  $\beta$ -pancréatiques et les hépatocytes. La voie mitochondriale semble être la voie apoptotique induite le plus fréquemment par NO. Elle se caractérise par une accumulation de la protéine suppresseur de tumeur p53, des changements d'expression des membres pro- et antiapoptotiques de la famille Bcl-2 (*B cell lymphoma-2*) et la formation d'un pore de transition de perméabilité mitochondriale. La perméabilisation de la membrane mitochondriale et la chute subséquente du potentiel de membrane mitochondrial entraînent un relargage cytoplasmique de facteurs proapoptotiques (cf. Figure I-14). Le cytochrome *c* est l'un de ces facteurs qui, en s'associant avec la procaspase-9 et APAF-1 (*Apoptotic peptidase activating factor-1*), constitue l'apoptosome et active des caspases effectrices comme la caspase-3<sup>85</sup>. Dans certains types cellulaires comme les cellules de neuroblastome et les cellules leucémiques HL-60, il a toutefois été rapporté une activation précoce des caspases initiatrices -2 ou -8, suggérant que la voie

extrinsèque de l'apoptose peut également être déclenchée par NO. Cette seconde voie fait appel à une hausse de l'expression du récepteur à domaine de mort Fas/CD95 dépendante de p53<sup>86,87</sup>. Dans nombre de ces situations, la protéine p53 apparaît comme un médiateur critique de l'apoptose induite par NO. Ceci est très bien illustré par les découvertes réalisées sur les cellules WTK-1, qui sont transformées par infection avec le virus d'Epstein-Barr. Cette lignée porte une mutation de perte de fonction de la protéine p53 à l'origine d'une forte instabilité génomique. Le traitement de ces cellules avec de fortes doses de NO, bien qu'induisant des dommages très conséquents à l'ADN, résulte en une abrogation de la réponse apoptotique<sup>88</sup>.



**Figure I-14 : Mécanismes moléculaires de mort cellulaire induite par NO<sup>5</sup>.** La génération simultanée de flux de NO (par les NO synthases) et d'anions O<sub>2</sub><sup>-</sup> (ex : fuite d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale, NADPH oxydase, xanthine oxydase, découplage de NOS) favorise considérablement la formation de peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>). La cytotoxicité du peroxynitrite provient d'une panoplie d'effets variés tels que la peroxydation lipidique, l'oxydation et la nitration de protéines, les dommages oxydatifs de l'ADN, l'activation de métalloprotéases matricielles ou l'inactivation d'une série d'enzymes clé dans le fonctionnement de la cellule. Les enzymes mitochondriales sont particulièrement vulnérables aux attaques du peroxynitrite, ce qui conduit à une réduction de la formation d'ATP et à l'ouverture d'un pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTP) qui dissipe le potentiel de membrane mitochondrial. Ces événements aboutissent à une interruption de la chaîne de transport d'électrons, à l'arrêt de la synthèse d'ATP, au gonflement des mitochondries et à la perméabilisation de leur membrane externe, ce qui provoque un efflux de facteurs proapoptotiques comme le cytochrome c et AIF. Ces derniers activent en aval des effecteurs comme les caspases, qui conduisent à la fragmentation nucléaire. Le peroxynitrite inflige des dommages supplémentaires au niveau de l'ADN qui provoquent l'activation de la PARP. Les dommages modérés de l'ADN activent la machinerie de réparation de l'ADN. Les dommages excessifs provenant d'un stress nitrant et d'un stress oxydatif entraînent la mort de la cellule par apoptose ou par nécrose en cas d'ouverture étendue du PTP ou de suractivation de la PARP (consommation massive de NAD et effondrement du niveau d'ATP).



Il existe également des situations dans lesquelles NO exerce au contraire un effet protecteur contre l'apoptose. Parmi les mécanismes biochimiques sous-jacents, la voie NO/GMPc intervient dans l'inhibition de l'apoptose induite par des ligands comme le TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor-alpha*) et Fas-L, lors d'un stress oxydatif ou d'une privation en facteurs de croissance<sup>89-92</sup>. La S-nitrosylation de protéines comme les caspases effectrices -3 et initiatrices -8 et -9 ou celle des facteurs de transcription AP-1 (*Activator protein 1*) et NF- $\kappa$ B interfère aussi avec le programme d'exécution de l'apoptose. Enfin, NO agit dans certains cas comme un piègeur de ROS, limitant leurs effets cytotoxiques dans des cellules qui y sont particulièrement exposées comme par exemple les macrophages<sup>93</sup>.

Les niveaux toxiques de NO produits par les cellules inflammatoires peuvent infliger des dommages cellulaires et macromoléculaires aux cellules situées dans leur voisinage, dont le destin dépend de la gravité des dommages et de leur capacité de réparation de l'ADN. Les cellules présentant des dommages mineurs à l'ADN peuvent les réparer de façon complète sans autre conséquence, tandis que celles touchées par des dommages sévères meurent par apoptose ou par nécrose. Dans les situations où les lésions de l'ADN sont trop importantes pour être réparées mais où la mort cellulaire n'est pas déclenchée, ces cellules peuvent acquérir de nouvelles mutations qui vont initier et renforcer la carcinogenèse. Ainsi, l'apoptose peut être considérée comme une réponse cellulaire protectrice lorsque les dommages causés par NO sont trop conséquents.

### 1.3.4 Les défenses cellulaires en réponse aux dommages induits par NO

#### 1.3.4.1 Aperçu général des mécanismes de défense antioxydante

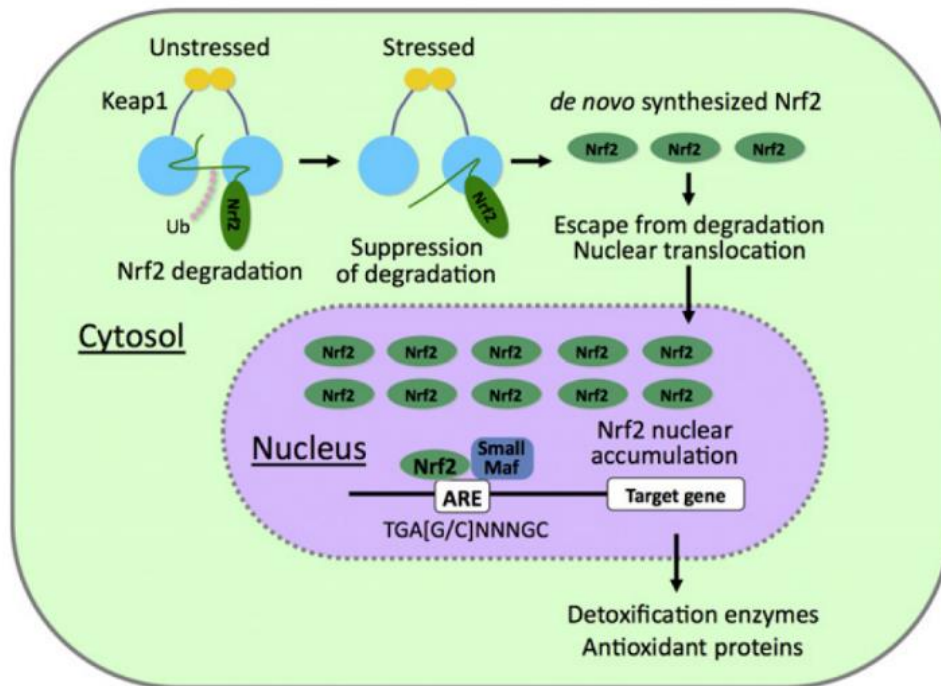
Les mécanismes de défense permettant aux cellules de se protéger des dommages induits par un stress oxydant et nitrant sont cruciaux pour la survie, la différenciation et la croissance cellulaire<sup>94</sup>. Au moins trois mécanismes de défense ont été communément adoptés par les cellules pour se protéger des effets cytotoxiques de NO. Le premier est la mise en place d'un environnement réducteur et protecteur composé de molécules de faible poids moléculaire et comportant des thiols avec un groupement sulfhydryle actif d'un point de vue redox (ex : GSH, TRX). A cela s'ajoute l'expression d'enzymes antioxydantes (ex : SOD, catalase, GPX). Les superoxyde dismutases (SOD) ont un rôle fondamental dans la limitation des effets toxiques de NO. Elles accélèrent en effet la réaction de dismutation des anions  $O_2^{\cdot-}$  en  $O_2$  et  $H_2O_2$ , dont la

détoxification est ensuite prise en charge par la GPX (*Glutathione peroxidase*) ou la catalase. A noter que deux des trois types de SOD exprimées par les cellules eucaryotes sont impliquées dans la défense contre la cytotoxicité de NO : une SOD constitutivement exprimée dans le cytosol (Cu,Zn-SOD) et une SOD mitochondriale dont l'expression est largement modulée par divers stimuli (Mn-SOD, qui est induite par NO). Enfin, la réponse antioxydante reposant sur le système Nrf2 (*NF-E2-related nuclear factor 2*) – Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) constitue un troisième mécanisme critique de défense contre la cytotoxicité de NO.

#### 1.3.4.2 *L'activation de Nrf2 est une voie centrale de détoxification des xénobiotiques et des espèces oxydantes*

Le système Keap1-Nrf2 est au centre d'une voie majeure de détoxification des xénobiotiques et de réponse aux stress oxydant et électrophile<sup>95</sup>. A l'état basal, la protéine Nrf2 réside principalement dans le cytoplasme où elle est liée à Keap1, elle-même ancrée au cytosquelette d'actine et qui réprime son activité<sup>96</sup>. L'exposition des cellules à des espèces oxydantes ou électrophiles libère Nrf2 de Keap1, conduisant à la translocation nucléaire de Nrf2 et à l'activation coordonnée de gènes régulés par des ARE (*Antioxidant response elements*). Nrf2 est apparenté au facteur de transcription NF-E2 (*Nuclear factor-erythroid 2*) et appartient à la famille *Cap'n'collar*. Il possède un domaine bZIP (*Basic region-leucine zipper*) lui conférant la capacité de se lier à ces éléments de réponse. Nrf2 déclenche l'expression d'enzymes de phase II qui détoxifient les intermédiaires électrophiles générés suite à la première étape de métabolisation des xénobiotiques (assurée par les cytochromes P450)<sup>97</sup>.

On compte parmi ces enzymes NQO1 (*NAD(P)H quinone oxidoreductase 1*) et la sous-unité Ya de la GST (*Glutathione S-transferase*). NQO1 est une flavoprotéine qui catalyse la réduction à deux électrons des quinones à chaîne courte (ex : ubiquinone, benzoquinone) en hydroquinones, ce qui évite la formation d'espèces radicalaires issues de leur réduction mono-électronique. La sous-unité Ya de la GST assure la conjugaison d'électrophiles hydrophobes ou de ROS avec le glutathion, qui sont ensuite excrétés. Nrf2 induit également une batterie de gènes antioxydants codant pour HO-1 (*Heme oxygenase 1*), GCL (*Glutamate cysteine ligase*), PRX (*Peroxyredoxine*) ou encore SRX (*Sulfiredoxin*). HO-1 catalyse l'étape limitante du catabolisme de l'hème ; GCL est responsable de la première réaction de la voie de biosynthèse du GSH ; SRX réduit le thiol du résidu cystéine catalytique des PRX lorsqu'elles sont suroxydées (les faisant passer de l'état d'acide sulfinique -SO(OH) à l'acide sulfénique -SOH, qui peut être réduit à nouveau par TRX afin de régénérer l'activité de la PRX).



**Figure I-15 : Activation de gènes cibles de Nrf2 en réponse à des stress cellulaires<sup>95</sup>.** En absence de stress cellulaire, Nrf2 est maintenue dans le cytoplasme par Keap1, qui dirige constamment sa dégradation par le protéasome. L'exposition à des molécules électrophiles ou oxydantes perturbe le complexe et le rend inactif. Les protéines Nrf2 synthétisées de novo échappent à la dégradation et subissent une translocation nucléaire. Elles s'associent ensuite aux petites Maf et se lient à des ARE pour induire l'expression d'enzymes de détoxification et de protéines antioxydantes.

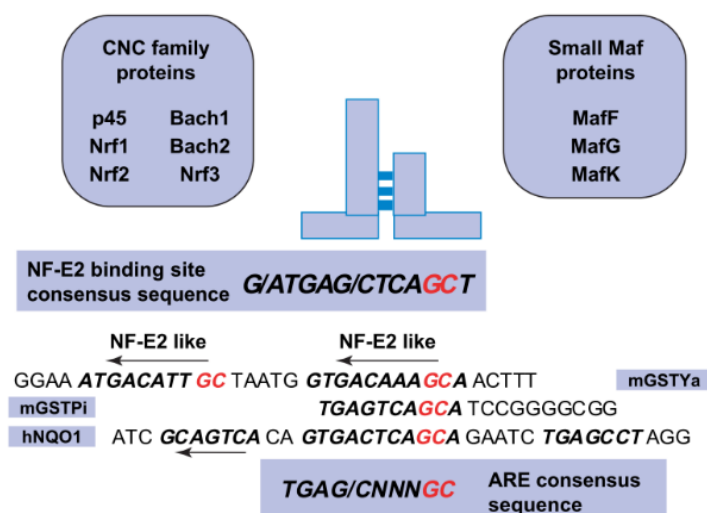
En plus des intermédiaires issus du métabolisme des xénobiotiques, Nrf2 est activée par beaucoup d'autres molécules au caractère électrophile telles que la *tert*-butylhydroquinone (*t*-BHQ), le sulforaphane (présent en quantité dans des légumes crucifères comme les brocolis) ou le curcumin<sup>98-100</sup>. Certains métaux lourds (ex : chlorure de cadmium), des ROS (ex : O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et des RNS (ex : ONOO<sup>-</sup>) peuvent aussi être à l'origine de son activation. Les ROS et RNS étant produites dans de multiples situations physiologiques comme par exemple l'activation des neutrophiles au cours d'une inflammation ou d'une infection, et la phosphorylation oxydative, la réponse Nrf2 fait partie des mécanismes vitaux mis en place par les cellules eucaryotes pour survivre face aux stress cellulaires induits par ces molécules.

Deux mécanismes de dissociation de Nrf2 et Keap1 ont jusqu'à présent été identifiés. Il y a d'une part l'activation par un stress oxydant ou électrophile de la PKC (*Protein kinase C*) qui phosphoryle Nrf2 au niveau du résidu C40, et d'autre part la perturbation du complexe par des inducteurs ciblant des résidus cystéine de Keap1<sup>101,102</sup>. Keap1 est une protéine adaptatrice qui sert d'échafaudage à la formation d'un complexe avec Nrf2 et Cul3 (*Culline 3*), une E3

ubiquitine ligase responsable de la poly-ubiquitination de Nrf2 et de sa dégradation protéasomale. Keap1 est une protéine riche en cystéines, dont certaines présentent une forte réactivité avec les électrophiles et les ROS : elles sont localisées dans le domaine d'homodimérisation de Keap1 (C151), dans son domaine de liaison à la Culline 3 (C273/C288), ainsi que dans son domaine de liaison à Nrf2 (C434). Les modifications chimiques (oxydation, S-nitrosylation, etc.) de ces thiols induisent des changements conformationnels de l'homodimère Keap1 qui inactivent le complexe Keap1-Cul3 et perturbent la liaison avec Nrf2, empêchant la poly-ubiquitination de résidus lysine de cette dernière. Les dernières découvertes supportent plutôt un modèle selon lequel Nrf2 ne se dissocie pas complètement du complexe Cul3-Keap1, rendant ce dernier inactif<sup>103</sup>. Les protéines Nrf2 nouvellement synthétisées échappent ainsi à la dégradation protéasomale et peuvent s'accumuler dans le noyau où elles activent des gènes cibles (cf. Figure I-15).

Plusieurs mécanismes d'activation de Nrf2 par NO ont été rapportés. Le stress nitrosant induit par NO peut activer Nrf2 en passant par la voie PI3K-Akt, *via* une S-nitrosylation de la phosphatase PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*, régulateur négatif de la voie PI3K-Akt)<sup>104</sup>. De plus, le produit de nitration du GMPc (8-nitro-cGMP) possède des propriétés électrophiles lui permettant de cibler Keap1 (S-guanylation de C434)<sup>105</sup>. Enfin, la S-nitrosylation directe de Keap1 (C151) a également été observée lors d'une activation de la voie Nrf2 par NO dans les cellules PC12<sup>106</sup>.

Nrf2 ne comporte pas de domaine de liaison à l'ADN. Sa fixation à l'ADN et son activité transactivatrice de gènes cibles nécessitent la présence de partenaires hétérodimériques, les petites Maf (*Musculoaponeurotic fibrosarcoma* : MafG, MafK et MafF), dont la spécificité de reconnaissance est réservée aux seuls ARE (cf. Figure I-16). Les facteurs de transcription de la famille des petites Maf ne contiennent pas de domaine de transactivation et présentent la caractéristique de pouvoir former des homodimères qui se comportent comme des répresseurs transcriptionnels<sup>107</sup>.



**Figure I-16 : Séquences ADN consensus de reconnaissance des protéines de la famille CNC et des petites Maf**<sup>97</sup>. La séquence consensus des éléments de réponse antioxydants (ARE) est proche de celle du site de liaison du facteur de transcription NF-E2. Les hétérodimères composés d'un membre de la famille des Cap'n'collar à domaine bZIP et d'une petite Maf interagissent avec ces éléments. D'autres protéines à domaine bZIP comme c-Jun et c-Fos peuvent également se lier aux ARE, mais seules les petites Maf reconnaissent les séquences MARE (Maf recognition elements).

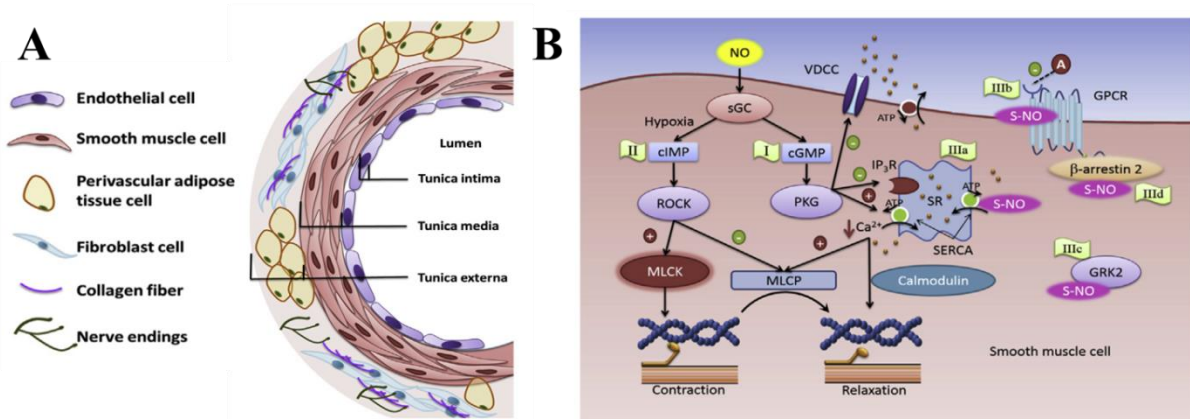
## 1.4 Les fonctions physiologiques et les effets physiopathologiques des NO synthases

En raison de l'extrême diversité des cibles de NO et des effets qui leur sont associés, les différentes isoformes de NO synthases, qui sont co-exprimées dans la plupart des tissus et organes, ont pu être impliquées dans un nombre très conséquent de processus physiologiques et pathologiques. Nous nous limiterons ici dans un premier temps aux rôles de NO dans les systèmes cardiovasculaire et nerveux, où les isoformes constitutives de NOS ont une importance majeure. Nous nous concentrerons ensuite sur les fonctions de NO dans le système immunitaire, l'inflammation et la carcinogenèse, où la NO synthase inducible joue un rôle prépondérant.

### 1.4.1 NO dans le système cardiovasculaire

La NOS endothéliale est l'isoforme de NOS exerçant les fonctions cardiovasculaires les plus critiques<sup>108</sup>. Elle est un médiateur essentiel de la vasodilatation de tous les types de vaisseaux sanguins. L'augmentation systémique de la pression artérielle suite à la délétion du gène codant la eNOS est d'ailleurs là pour en attester<sup>109</sup>. L'activité eNOS peut être stimulée soit par sa phosphorylation (kinases PKA ou Akt) en réponse à des facteurs de croissance, des

hormones ou des forces de cisaillement, soit par un influx calcique en réponse à des ligands comme l'acétylcholine ou la bradykinine<sup>110</sup>. Les différentes voies de régulation du tonus vasculaire par NO sont détaillées sur la Figure I-17.



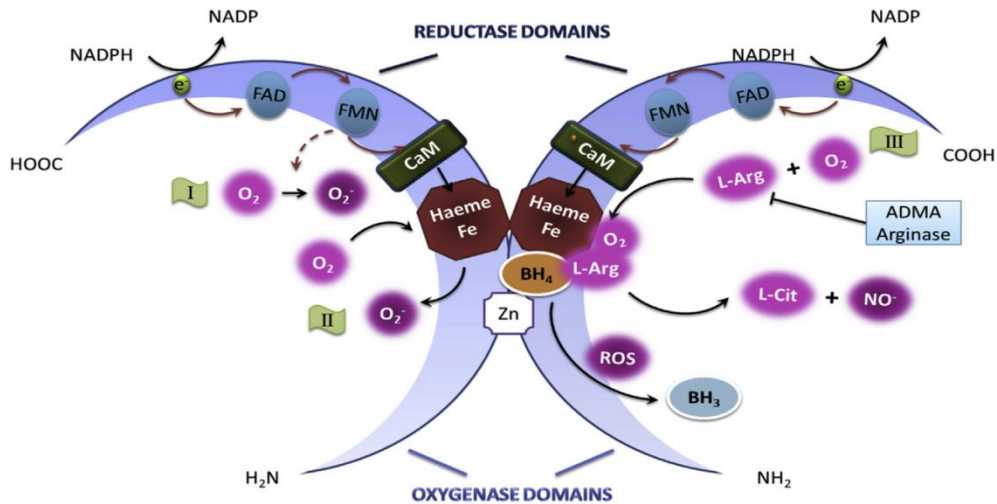
**Figure I-17 : Régulation du tonus vasculaire par NO<sup>110</sup>.** **A :** La paroi vasculaire est composée de trois couches : l'intima (tunique interne = monocouche de cellules endothéliales), la média (couche de cellules musculaires lisses) et l'adventice (tunique externe = terminaisons nerveuses, tissu adipeux périvasculaire, tissu conjonctif). **B :** **I.** NO stimule la sGC dans les cellules musculaires lisses pour induire la formation de GMPc. Celui-ci active la PKG qui prévient l'influx calcique provenant des canaux calciques voltage-dépendants (VDCC) et la libération de calcium par les récepteurs à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>R). La PKG favorise aussi la recapture de calcium par le réticulum sarcoplasmique via la pompe SERCA (Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase). La réduction de la concentration en Ca<sup>2+</sup> intracellulaire inactive la kinase MLCK et active la phosphatase MLCP, ce qui entraîne la déphosphorylation des chaînes légères de myosine (MLC). Les ponts actine-myosine sont alors rompus et la relaxation du muscle lisse se produit. **II.** En condition hypoxique, la sGC produit de l'IMPc (cyclic inosine 3',5'-monophosphate) qui active la protéine kinase ROCK et inactive la phosphatase MLCP, ce qui résulte en une contraction du muscle lisse. **IIIa.** La S-nitrosylation de la pompe SERCA augmente son activité et favorise la relaxation. **IIIb.** La S-nitrosylation de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) entrave la liaison de leurs ligands. **IIIc.** La S-nitrosylation de GRK2 (G protein-coupled receptor kinase 2) empêche la désensibilisation et l'internalisation des récepteurs β-adrénergiques. **IIId.** La S-nitrosylation de la β-arrestine 2 augmente l'internalisation du RCPG.

Comme évoqué précédemment, la liaison de NO à l'hème de la sGC augmente son activité de conversion du GTP en GMPc. Ceci entraîne la déphosphorylation des chaînes légères de myosine et la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires. Lorsqu'un vaisseau se dilate pour fournir plus de sang à un muscle ou un organe, cela crée une perturbation de l'écoulement sanguin qui devient turbulent. La libération de NO par l'endothélium permet de contrebalancer la contraction myogénique qui a lieu lorsque la perturbation du flux entraîne un stress lié aux forces de cisaillement exercées sur les vaisseaux sanguins. Le relâchement local des muscles lisses se propage et amortit la perturbation du flux, assurant une restauration de l'écoulement laminaire<sup>111</sup>.

Le développement de l'athérosclérose est une complication de la modulation du tonus vasculaire par NO qui tend à se développer dans les régions de faible turbulence. Des macrophages s'accumulent sous l'endothélium et absorbent des lipoprotéines oxydées, formant alors des lésions athérosclérotiques. Des travaux ont montré que le peroxy-nitrite pouvait être à l'origine de l'oxydation des lipoprotéines ensuite reconnues par des récepteurs « scavenger » du macrophage (MSR)<sup>112</sup>. La présence d'une activité iNOS et l'apparition de nitrotyrosines au niveau de ces lésions confortent l'hypothèse d'une implication du peroxy-nitrite<sup>113</sup>.

La eNOS exerce des effets antiathérosclérotiques majeurs. Son activité permet de réduire l'expression de la protéine chimio-attractante MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein-1*) et d'inhiber l'adhésion leucocytaire aux vaisseaux sanguins en interférant avec la molécule d'adhésion CD11/CD18 des leucocytes<sup>114,115</sup>. Le NO libéré dans la lumière de l'endothélium vasculaire est aussi un inhibiteur très efficace de l'adhésion et de l'agrégation des plaquettes au niveau de la paroi vasculaire<sup>116</sup>. Au-delà de la protection contre la thrombose, cela prévient la libération de facteurs de croissance dérivant des plaquettes qui stimulent la prolifération des cellules musculaires lisses et la production de molécules matricielles. De cette façon, la formation de plaques fibreuses, une étape plus tardive de l'athérogenèse, est également limitée par NO. La eNOS est aussi critique dans le remodelage vasculaire en réponse à des modifications chroniques de la circulation sanguine<sup>117</sup>. Les souris eNOS<sup>-/-</sup> sont en effet affectées par un défaut de mobilisation des cellules progénitrices endothéliales de la moelle osseuse et par un déficit de néovascularisation. C'est également le cas des patients atteints d'une cardiomyopathie ischémique, chez lesquels la biodisponibilité en NO se trouve réduite<sup>118</sup>.

Les patients ayant des facteurs de risque cardiovasculaire (ex : hypertension, hypercholestérolémie, diabète sucré, obésité, tabagisme, etc.) et ceux atteints d'une maladie cardiovasculaire présentent des dysfonctionnements de l'endothélium. Ces dysfonctionnements sont associés à une incapacité de l'endothélium à produire des quantités appropriées de NO ou à induire la vasodilatation. Les souris triples mutantes n/i/eNOS<sup>-/-</sup> ont une espérance de vie réduite avec une apparition précoce de pathologies cardiovasculaire incluant l'hypertension, l'hypertrophie cardiaque, l'insuffisance cardiaque, l'athérosclérose et l'infarctus du myocarde<sup>119</sup>. La surproduction de ROS par des enzymes comme la NADPH oxydase et la xanthine oxydase et par la chaîne respiratoire mitochondriale joue un rôle clé dans ces pathologies. Elle entraîne un découplage de la eNOS, qui est alors convertie en enzyme génératrice d'anions superoxyde et s'arrête de produire du NO (cf. Figure I-18).



**Figure I-18 : Mécanismes de découplage de la eNOS<sup>110</sup>.** **I.** La forme monomérique de la eNOS produit des anions  $O_2^-$  au lieu de NO. **II.** Même à l'état d'homodimère, la eNOS continue de produire des anions  $O_2^-$  lorsque la concentration en L-arginine chute sous le seuil de saturation de l'enzyme. **III.** La production de NO a lieu lorsque le transfert électronique entre le NADPH et les différents cofacteurs peut s'opérer. L'oxydation de la  $BH_4$  par des ROS ou des RNS peut toutefois conduire à un découplage. L'inhibiteur compétitif de l'arginine qu'est l'ADMA et l'activité arginase, qui réduisent la disponibilité en arginine, réduisent également le taux de production de NO.

Ce découplage se produit dans diverses situations. Il peut intervenir lors d'une oxydation de la  $BH_4$  ou de son site de liaison (cluster zinc-tétrathiolate) par des ROS ou par le peroxy-nitrite<sup>120,121</sup>. Il se produit également en cas d'apport insuffisant en L-arginine, apparemment plus en raison d'une suractivité de l'arginase plutôt que d'une synthèse insuffisante d'arginine<sup>122,123</sup>. Par ailleurs, les ROS augmentent l'activité de l'arginine N-méthyltransférase, enzyme qui génère l'ADMA (*Asymmetrical dimethyl-L-arginine*). L'ADMA entre en compétition avec l'arginine, ce qui inhibe la eNOS et peut induire son découplage<sup>124</sup>. Enfin, la S-glutathionylation de la eNOS est un dernier mécanisme dont il a été démontré récemment qu'il pouvait conduire à son découplage<sup>125</sup>.

Enfin, la production excessive de NO joue un rôle crucial au cours du choc septique. Celui-ci se définit par une vasodilatation artériolaire massive, une hypotension systémique, et des lésions microvasculaires. Les symptômes du choc septique sont habituellement initiés par des endotoxines bactériennes et font appel à de multiples médiateurs circulants comme le facteur d'activation des plaquettes et des cytokines comme le thromboxane  $A_2$ , l'IL- $1\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ . Cependant, la chute de la pression artérielle a pu être attribuée à l'excès de production de NO par la iNOS au niveau de la paroi vasculaire<sup>126</sup>.

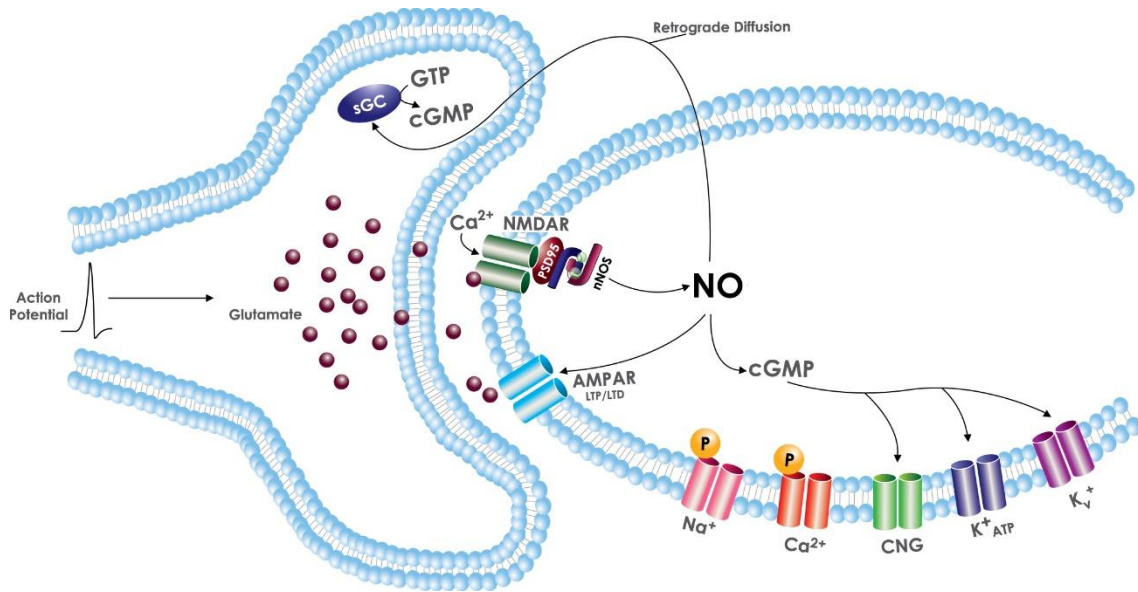


### 1.4.2 NO dans le système nerveux : un neurotransmetteur atypique

Si NO est considéré de longue date comme un neurotransmetteur, ses propriétés le différencient néanmoins très nettement de la plupart d'entre eux. En effet, tandis qu'un neurotransmetteur conventionnel tel que l'acétylcholine conserve son activité seulement quelques millisecondes après son relargage synaptique, celle de NO peut perdurer plusieurs secondes. Sa diffusion rapide lui permet de couvrir des régions comprenant plusieurs millions de synapses<sup>127</sup>. Ceci lui octroie la possibilité d'agir comme un messager rétrograde et d'exercer un contrôle simultané sur des cellules pré- et post-synaptiques.

La NOS neuronale est l'isoforme constitutive exprimée de façon prédominante dans le cerveau. La nNOS se localise dans les épines dendritiques et le bouton synaptique des neurones. Elle existe sous forme inactive particulière, dans des agrégats de nNOS monomérique. La chaperonne Hsp90 facilite sa transition vers une forme fonctionnelle soluble et dimérique, et son association avec d'autres protéines à domaine PDZ (ex : PSD95). De cette façon, l'activité nNOS est stimulée par l'influx calcique en réponse au glutamate grâce à son association avec les récepteurs NMDA dans la zone de densité post-synaptique. Le NO synthétisé module le potentiel de membrane, la force de la synapse et l'excitabilité du neurone en ciblant de nombreux canaux ioniques : Canaux Na<sup>+</sup>, canaux Ca<sup>2+</sup> dépendant du voltage, canaux K<sup>+</sup> activés par le calcium ou sensibles à l'ATP, canaux ioniques sensibles aux nucléotides cycliques (CNG) et récepteurs AMPA (cf. Figure I-19)<sup>128</sup>.

Grâce à ses capacités de diffusion, NO peut agir comme messager rétrograde et stimuler l'activité sGC pré-synaptique, ce qui lui permet de contrôler la libération de neurotransmetteurs (GABA, glutamate) dans la fente synaptique (phosphorylation de la synaptophysine)<sup>129</sup>.



**Figure I-19 : Signalisation par NO au niveau de la synapse neuronale<sup>128</sup>.** La libération de glutamate dans la fente synaptique active les récepteurs NMDA et AMPA, générant un influx calcique qui stimule l'activité nNOS. NO diffuse et stimule la production de GMPc, qui régule la libération pré-synaptique de neurotransmetteurs et module l'activité de différents canaux ioniques.

Les années passées ont démontré l'importance de la nNOS dans une multitude d'évènements de signalisation synaptique. La nNOS module des fonctions physiologiques comme l'apprentissage, la mémoire et la neurogenèse<sup>130</sup>. Dans le système nerveux central (SNC), la nNOS est un médiateur de la plasticité synaptique à long terme, qui module les phénomènes de potentialisation et de dépression à long terme<sup>131,132</sup>. Ces modifications durables de l'efficacité de la transmission synaptique sont impliquées dans les processus de mémorisation et d'apprentissage. L'inhibition de la nNOS provoque l'apparition d'amnésies et une détérioration de l'apprentissage dans différents modèles animaux<sup>133,134</sup>. Ces défauts de synthèse de NO sont également observés chez les patients souffrant de troubles de la mémoire, chez lesquels les mécanismes de potentialisation à long terme sont perturbés.

Au niveau périphérique, certains muscles lisses sont innervés par des nerfs nitrergiques. Ces nerfs expriment la nNOS et libèrent du NO, qui stimule l'activité sGC de cellules effectrices réduisant le tonus des muscles lisses, dont celui des vaisseaux sanguins<sup>135</sup>. La conception initiale selon laquelle la NOS endothéliale est la seule isoforme régulant le tonus vasculaire a donc largement été remise en question à la suite de ces découvertes. Le relâchement des muscles lisses des corps caverneux du pénis, responsable de l'érection, est ainsi déclenché par l'activité nNOS de nerfs nitrergiques<sup>136</sup>.

Les pathologies neurodégénératives se caractérisent souvent par la mise en place durable d'une excitotoxicité induite par le glutamate. Les perturbations de l'activité nNOS et les niveaux anormalement élevés de NO qui en résultent interviennent dans une série de pathologies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Huntington, la sclérose en plaque et la sclérose latérale amyotrophique<sup>137</sup>. L'installation d'une neurodégénérescence inflammatoire participe également au développement de ces pathologies. Une explication possible est l'expression simultanée de la NOX (*NADPH oxidase*) dans la microglie activée et de la iNOS dans les cellules gliales, qui aboutit à la formation de peroxynitrite. Les neurones exposés au peroxynitrite meurent et libèrent du glutamate qui génère de l'excitotoxicité<sup>138</sup>.

Lors d'un accident vasculaire cérébral (AVC), l'hyperactivité de la nNOS, stimulée par des influx massifs de  $Ca^{2+}$ , contribue à une mort neuronale conséquente. Certains dérèglements du tonus gastro-intestinal (ex : reflux gastro-oesophagien) pourraient aussi provenir d'une surproduction de NO par la nNOS au niveau des nerfs nitrergiques<sup>139</sup>.

### 1.4.3 NO dans l'inflammation, l'immunité et le cancer

Des travaux pionniers ont montré à la fin des années 1990 que les macrophages murins produisent de grandes quantités de NO en réponse au lipopolysaccharide (LPS) et à l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), et que l'activité antitumorale et cytotoxique des macrophages activés dépend de la production de NO<sup>140,141</sup>. Bien que la iNOS fût pendant longtemps considérée comme un effecteur de l'immunité innée aux fonctions antimicrobiennes et tumoricides non spécifiques, il s'est clairement avéré par la suite que NO affecte aussi fortement les réponses immunes adaptatives grâce à des fonctions de signalisation versatiles et pléiotropes.

#### *1.4.3.1 Les activités antimicrobienne, antivirale et antiparasitaire de la iNOS*

Les activités antivirale, antimicrobienne et antiparasitaire de la iNOS ont été principalement étudiées avec les macrophages, mais d'autres cellules d'origine myéloïde (ex : cellules dendritiques, neutrophiles, éosinophiles) ou non myéloïde (ex : hépatocytes) exercent également ce type de fonctions effectrices. Une catégorisation simplifiée et très largement usitée classe les macrophages en deux phénotypes distincts (M1/M2) en fonction de leur état d'activation et de leur orientation inflammatoire. Dans les années 2000, l'équipe de Mills releva

un paramètre métabolique qui discrimine de façon remarquable ces deux catégories de macrophages : le métabolisme de l'arginine<sup>142</sup>. Une fois différenciés, les macrophages M1 (classiquement activés) déclenchent une réponse immune Th1 et produisent de grandes quantités de NO pour éliminer les agents pathogènes ou exercer une action cytotoxique sur les cellules tumorales<sup>143</sup>. A l'opposé, les macrophages M2 (activés de façon alternative) expriment des niveaux élevés d'arginase 1, qui entrent en compétition avec la iNOS pour le pool d'arginine et préviennent la génération de NO<sup>144</sup>. La production de NO représente un véritable marqueur de l'état d'activation des macrophages en contexte pathologique. Le paradigme « M1/M2 » a été récemment réévalué et enrichi pour prendre en compte l'immense plasticité fonctionnelle de ces cellules qui adoptent en réalité un phénotype parmi un *continuum* de phénotypes possibles<sup>145,146</sup>.

NO exerce des effets directs sur les pathogènes infectieux (intra- et extracellulaires) en réagissant avec des éléments structuraux, des composants de la machinerie de réplication, les acides nucléiques, des enzymes métaboliques, ou bien encore avec des facteurs de virulence qui leur sont associés<sup>147</sup>. Ces effets directs ont été impliqués dans la défense contre des infections aiguës et latentes par des bactéries pathogènes variées dont *Clostridium difficile* (diarrhée infectieuse) et *Salmonella enterica* (salmonellose)<sup>148,149</sup>. Même s'il fut d'abord postulé que l'élimination efficace des pathogènes nécessitât une colocalisation de la iNOS avec les compartiments cellulaires infectés, il est désormais admis que les propriétés de diffusion de NO lui permettent d'exercer une activité antipathogénique même dans des cellules qui n'expriment pas la iNOS. De ce point de vue, une publication récente soutient l'idée que, lors d'une infection par un pathogène intracellulaire comme *Leishmania major*, c'est un mécanisme coopératif basé sur la production collective de NO par des phagocytes et l'instauration à l'échelle du tissu d'un micromilieu aux propriétés antipathogènes qui prévaut<sup>150</sup>. Le contrôle de la prolifération de pathogènes par la iNOS n'implique pas nécessairement leur mort ou leur élimination. Dans certaines situations, les effets cytostatiques médiés par NO (ex : réduction de l'activité métabolique) sont suffisants pour stopper la prolifération du pathogène et pour permettre une résolution clinique de l'infection par la réponse immunitaire. C'est par exemple ce qui se produit à la suite d'une infection par *Leishmania major*, un parasite protozoaire intracellulaire qui infecte les macrophages et les cellules dendritiques et est responsable de la leishmaniose cutanée<sup>151</sup>.

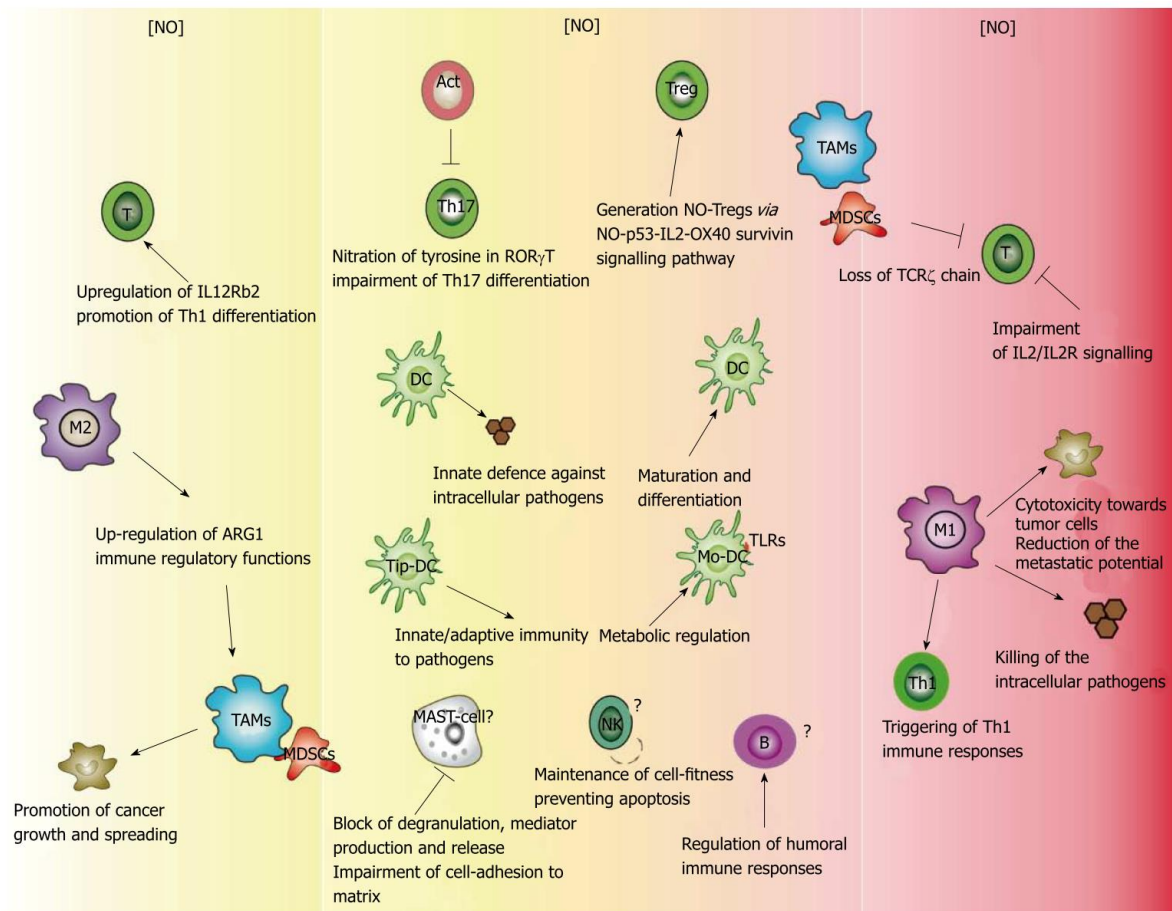
En plus de la toxicité directe associée à la formation de RNS qui est particulièrement efficace contre des pathogènes extracellulaires, l'activité iNOS comporte également des effets indirects contre les pathogènes intracellulaires. Elle induit par exemple l'apoptose des macrophages murins infectés par *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculose), et la nécrose des macrophages infectés par *Listeria monocytogenes* (listériose), privant ainsi ces bactéries de leur cellule hôte<sup>152,153</sup>. Dans les macrophages infectés par *Salmonella typhimurium* (gastroentérite, fièvre typhoïde), la production de NO induit une activation de Nrf2 et l'expression de la ferroportine 1 (Fpn1), un exporteur de fer qui prive la bactérie de fer intracellulaire, ce qui inhibe sa croissance<sup>154</sup>. Chez les Anophèles (moustique vecteur du paludisme), la nitration de protéines du parasite *Plasmodium falciparum* facilite sa reconnaissance par le système du complément dans l'hémolymphe<sup>155</sup>.

#### 1.4.3.2 NO comme médiateur de l'immunité adaptative

En plus d'exercer des effets antipathogéniques, l'activité iNOS des cellules myéloïdes peut aussi réguler la différenciation, la fonction et la survie des autres cellules du système immunitaire (cf. Figure I-20). Dans ce contexte, un des effets les plus spectaculaires de NO est sa capacité d'inhibition de la prolifération voire d'induction de la mort des lymphocytes T. Ce fut l'une des premières fonctions immunomodulatrices attribuées à NO, qui est portée par des cellules spécialisées appelées macrophages suppresseurs, cellules suppressives myéloïdes (MDSCs = *Myeloid-derived suppressor cells*) ou encore macrophages régulateurs<sup>156</sup>. Les fortes concentrations de NO inhibent aussi les fonctions des lymphocytes T en bloquant la cascade de signalisation en aval de la liaison de l'IL-2 à son récepteur<sup>157</sup>. A l'opposé, des quantités plus modérées de NO supportent la survie et la différenciation de sous-populations de lymphocytes T. Elles promeuvent par exemple la différenciation des lymphocytes Th1 en augmentant de façon sélective l'expression du récepteur IL-12R $\beta$ 2<sup>158</sup>.

NO régule également les lymphocytes Th9 et Th17. *In vitro*, la présence d'un donneur de NO (50  $\mu$ M) stimule la différenciation des lymphocytes T CD4+ (murins et humains) en Th9 induite par un traitement avec les anticorps anti-CD3 et anti-CD28 et les cytokines IL-4 et TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor- $\beta$* )<sup>159</sup>. Les preuves d'une expression de la iNOS dans les Th9 n'ont cependant pas été obtenues. Deux groupes ont en revanche démontré l'expression de la iNOS dans les Th17 humains et murins, avec toutefois des conséquences fonctionnelles différentes. Les donneurs de NO (10-200  $\mu$ M) et l'activité iNOS inhibent la différenciation des

lymphocytes T CD4<sup>+</sup> murins en Th17 après une stimulation avec les anti-CD3 et anti-CD28 et avec l'IL-6 et le TGF-β<sup>160</sup>. L'inhibition par NO de la différenciation des Th17 intervient suite à la nitration de résidus tyrosine du facteur de transcription RORγt (*Retinoic acid receptor-related orphan receptor γt*), qui régule l'expression de l'IL-17 au niveau transcriptionnel. A l'inverse, les faibles doses de NO exogène (10-25 μM) délivrées par des donneurs de NO ou des MDSC favorisent très fortement le développement de lymphocytes Th17 (RORγt<sup>+</sup> IL-23R<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>) à partir de lymphocytes Th0 humains stimulés avec les anti-CD3 et anti-CD28 en combinaison avec l'IL-1β, l'IL-6, l'IL-23 et le TGF-β<sup>161</sup>. L'expression de la iNOS dans ces Th17 humains s'est révélée nécessaire au maintien de leur phénotype *via* la signalisation dépendante du GMPc. L'activité iNOS des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> peut aussi inhiber leur différenciation en T régulateurs (T<sub>reg</sub>) en bloquant la libération de TGF-β<sup>162</sup>.



**Figure I-20 : Effets distinctifs de NO dans différentes sous-classes de cellules immunitaires<sup>163</sup>.** NO est un acteur clé dans l'immunité et l'inflammation. Les niveaux réduits de NO (sur la gauche) favorisent la réponse Th1 et la mise en place d'un environnement immuno-régulateur, tandis que des fortes concentrations (sur la droite) de NO sont nécessaires aux fonctions effectrices des macrophages M1 et bloquent l'activation des lymphocytes T. NO exerce également des effets plus controversés sur d'autres cellules du système immunitaire comme les mastocytes, les cellules NK, les lymphocytes B et les cellules dendritiques.

L'impact de NO sur la maturation et les fonctions d'autres cellules du système immunitaire telles que les lymphocytes B, les mastocytes et les cellules dendritiques reste encore aujourd'hui controversé. Certains travaux récents indiquent une implication de NO dans la régulation de la réponse humorale, comme le suggère la plus forte réponse humorale TI-2 et la hausse de production du facteur BAFF (*B cell activating factor*) par les cellules dendritiques de souris *Nos2*<sup>-/-</sup> <sup>164</sup>. Les cellules dendritiques sont les cellules présentatrices d'antigène par excellence. Elles représentent le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Lorsque leur activation survient, classiquement en réponse à des produits microbiens, elles se mettent à produire de grandes quantités de cytokines (ex : IL-12 et IFN- $\alpha$ ) qui dirigent la différenciation des lymphocytes T naïfs en cellules effectrices. De plus, les cellules dendritiques exposées à des cytokines proinflammatoires activent rapidement d'autres cellules de l'immunité innée, comme les cellules NK (*Natural killer*). L'expression de la iNOS et la production de TNF- $\alpha$  par une sous-catégorie de cellules dendritiques (Tip-DC) intervient clairement dans la défense innée contre les pathogènes intracellulaires<sup>165-167</sup>.

#### 1.4.3.3 *La iNOS dans les maladies inflammatoires chroniques et le cancer*

Bien qu'il permette une réponse immunitaire efficace dans le contrôle des maladies infectieuses, le NO produit par la iNOS peut aussi être impliqué dans des dérèglements immunitaires à l'origine de maladies inflammatoires chroniques. Les maladies auto-immunes se caractérisent par la mise en place d'un état inflammatoire chronique suite à une rupture de tolérance immunitaire. Cet événement survient lorsque des protéines de l'hôte sont reconnues comme des antigènes du « non-soi », ce qui initie une réponse immunitaire adaptative inappropriée. Les stress oxydant et nitrant qui accompagnent beaucoup de maladies inflammatoires induisent des modifications post-traductionnelles des protéines, formant potentiellement de nouveaux épitopes antigéniques<sup>168-170</sup>. Ces néo-épitopes peuvent déclencher une réponse adaptative directement ou indirectement *via* plusieurs mécanismes (mimétisme moléculaire, exposition d'antigènes cryptiques, propagation d'épitopes, etc.)<sup>171,172</sup>. L'accumulation de RNS et d'anticorps anti-nitrotyrosine a ainsi été observée et mise en cause chez des patients atteints de lupus érythémateux systémique, de polyarthrite rhumatoïde et d'arthrose<sup>173,174</sup>. La surproduction de NO intervient aussi dans le développement et le maintien de maladies inflammatoires chroniques intestinales (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique), où l'activité iNOS affecte l'intégrité de la muqueuse et entraîne l'activation de neutrophiles<sup>175</sup>.

Les liens établis entre inflammation et cancer remontent au XIXe siècle, sur la base des observations que des tumeurs émergent fréquemment de sites d'inflammation chronique, et que des cellules inflammatoires sont présentes dans les biopsies de tumeurs<sup>176</sup>. Des études épidémiologiques ont montré que l'inflammation augmente le risque de développement de nombreux cancers dont ceux de la rate, du col de l'utérus, de l'estomac, de l'intestin, de l'œsophage, des ovaires, de la prostate et de la thyroïde<sup>177</sup>. L'inflammation représente ainsi un marqueur additionnel des cancers. Le microenvironnement tumoral abrite différentes cellules résidentes reprogrammées et des cellules recrutées par la tumeur elle-même, qui établissent un environnement cytokinique particulier<sup>178</sup>. Parmi elles, les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) et les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) surexpriment la iNOS et libèrent des RNS qui provoquent la nitrosylation et la nitration de composants du TCR (*T cell receptor*), ce qui empêche l'activation des lymphocytes T et facilite la progression tumorale<sup>179</sup>. De plus, la nitration de la chimiokine CCL2 prévient l'infiltration des tumeurs par les lymphocytes T, qui restent ainsi confinés à la périphérie des tumeurs<sup>180</sup>. Comme cela a été mentionné précédemment, les RNS suppriment également l'immunité antitumorale dépendante des lymphocytes T en perturbant la phosphorylation de JAK3/STAT5 dans la voie de signalisation de l'IL-2<sup>181</sup>.

Les macrophages et NO accomplissent tous deux des fonctions divergentes qui impactent la biologie des cancers. D'un point de vue mécanistique, il a été proposé qu'au cours des étapes précoces du développement tumoral les macrophages exploitent de fortes concentrations de NO et RNS pour tuer les clones de cellules tumorales. Aux stades plus avancés de la progression tumorale, les macrophages sont reprogrammés par la tumeur pour produire des quantités plus modérées de NO, qui favorisent au contraire sa croissance et son expansion (en agissant par exemple sur le remodelage vasculaire). La nature dichotomique des fonctions du NO produit par les macrophages est ainsi le reflet de la plasticité fonctionnelle de ces cellules en réponse à des signaux environnementaux.



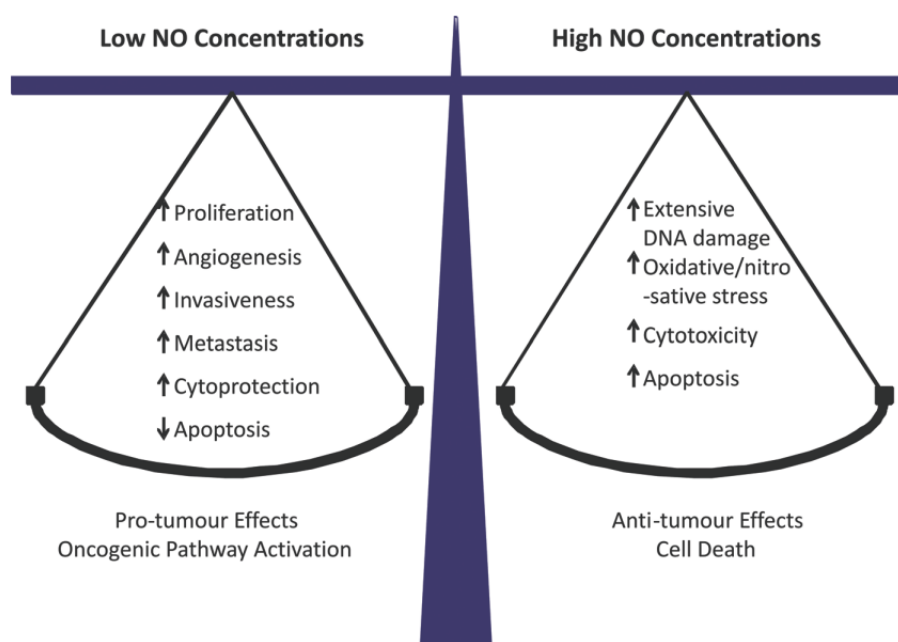


Figure I-21 : Le Yin et le Yang de NO dans la progression tumorale<sup>182</sup>.

Le niveau d'expression de la iNOS est corrélé aux différents stades de la progression tumorale dans de nombreux cancers comme les cancers du sein, du poumon, du cerveau, de l'estomac, du pancréas, le cancer colorectal et le mélanome<sup>183</sup>. Il est désormais bien établi que NO opère de façon bimodale, sur la progression tumorale comme dans beaucoup de processus biologiques<sup>182</sup>. NO peut agir sur la croissance et la survie de la tumeur, la migration, l'invasion, l'angiogenèse et le caractère métastatique, en fonction de l'importance et de la durée d'exposition aux flux de NO, de l'environnement redox et du microenvironnement tumoral (cf. Figure I-21). Les faibles concentrations de NO (<100 nM) favorisent la prolifération et l'angiogenèse. Les niveaux modérés de NO (100-500 nM) accroissent le caractère invasif et métastatique des tumeurs, en même temps qu'ils exercent des effets cytoprotecteurs et antiapoptotiques. A l'inverse, les fortes concentrations de NO (>500 nM) provoquent des dommages à l'ADN, un stress nitrant et oxydant, et ont des effets cytotoxiques et proapoptotiques. Tout dernièrement, il a par exemple été démontré que la S-nitrosylation de STAT3 et NF- $\kappa$ B inhibe la prolifération et sensibilise les cellules humaines de myélome multiple à un traitement chimiothérapeutique<sup>184</sup>. En conséquence, NO peut à la fois exercer des effets pro- et antitumoraux, ce qui fournit plusieurs options d'un point de vue thérapeutique. Ainsi, sur les tumeurs dont la croissance repose sur une production de NO, des inhibiteurs de NOS peuvent être utilisés pour en empêcher la progression, ou bien des donneurs de NO peuvent permettre de hisser les niveaux de NO jusqu'à ce qu'il devienne cytotoxique<sup>185-187</sup>.

Dans les tumeurs qui ne dépendent pas de NO pour se développer, il est probable que des donneurs de NO soient cytotoxiques puisque ces cellules ne sont à priori pas adaptées à un environnement riche en NO<sup>188</sup>.

## 1.5 Régulation de l'expression et de l'activité iNOS

Considérant les multiples effets physiologiques et pathologiques liés à l'activité iNOS, il est d'une importance capitale de comprendre au mieux les mécanismes par lesquels les cellules régulent son expression. Si l'activité iNOS est régulée (comme les autres NOS) par la disponibilité en substrat et en cofacteurs, la régulation de son expression intervient en tout premier lieu et constitue le déterminant majeur de la synthèse de NO par cette enzyme. En effet, et contrairement aux NOS constitutives, la iNOS synthétise habituellement du NO en continu jusqu'à ce que l'enzyme soit dégradée. Ainsi, chez les mammifères, un nombre considérable de mécanismes contrôlant l'expression de la iNOS ont été mis en place.

### 1.5.1 Structures du gène et du promoteur *NOS2*

Le gène codant la iNOS est nommé *NOS2*, il se localise chez l'Homme sur le bras long du chromosome 17 (position 17q11.2-q12) et présente une longueur de 43764 bp. Un seul transcrit semble être exprimé, il comporte 27 exons pour une longueur totale de 4176 nucléotides et code pour une protéine de 1153 acides aminés. Un pseudogène (*LGALS9C*) chevauche partiellement la région 3'UTR (*Untranslated region*) du gène *NOS2* sur le brin opposé. L'analyse de la séquence humaine du gène *NOS2* montre une très forte homologie avec celles des autres primates (macaque et chimpanzé). En revanche, les structures du gène et du promoteur *NOS2* des rongeurs (rat et souris) se différencient sensiblement de celles des primates (cf. Figure I-22)<sup>189</sup>. Il existe cependant plusieurs régions de forte homologie (*ECR = Evolutionary conserved regions*) dans les séquences génomiques flanquantes en 5' et en 3', qui sont susceptibles de participer à des mécanismes communs de régulation transcriptionnelle.

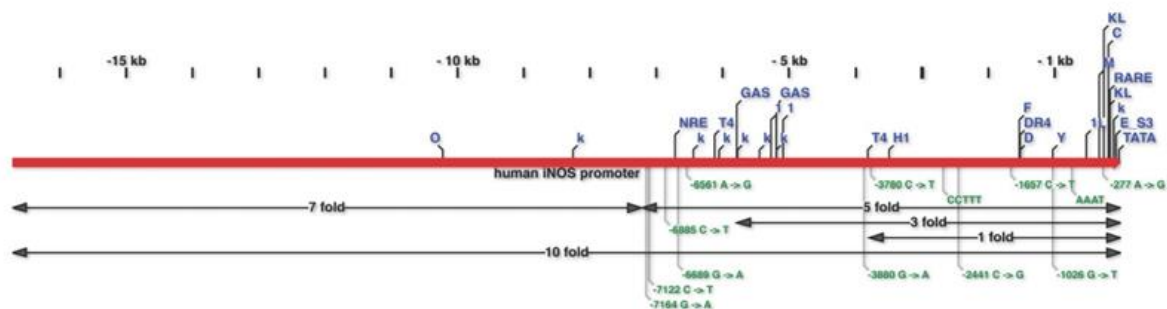
Les recherches concernant la régulation de l'expression de la iNOS sont dominées par les études chez la souris. Toutefois, il existe un grand nombre de types cellulaires humains ayant la capacité d'exprimer la protéine iNOS *in vitro* et *in vivo* : c'est par exemple le cas pour les macrophages résidents et dérivant de monocytes, les cellules dendritiques ou les hépatocytes. La caractérisation de l'expression de la iNOS dans les cellules humaines a confirmé le rôle



Le fragment de 1000 bp du promoteur *NOS2* humain présente une faible activité basale, mais pas d'induction par des cytokines après transfection transitoire dans différentes lignées humaines<sup>193,194</sup>. Ceci marque une très nette différence avec le promoteur murin de 1000 bp, dont la capacité d'induction est 50 fois supérieure après un traitement avec du LPS et de l'IFN- $\gamma$  dans des macrophages murins RAW 264.7<sup>195</sup>. Une induction par 9 a tout de même pu être observée avec le fragment humain de 1 kb dans une lignée de phagocytes humains (THP-1), en réponse à un activateur de la PKC (PMA = *phorbol 12-myristate 13-acetate*)<sup>196</sup>. De façon intéressante, lorsque le même fragment humain de 1 kb est transfecté dans un système hétérologue (lignée RAW 264.7), l'activité du promoteur est cette fois induite de façon remarquable en réponse au LPS, à l'IFN- $\gamma$  et à l'IL-1 $\beta$ <sup>197</sup>.

Chez l'Homme ou la souris, la majorité des régions régulatrices importantes se concentre dans la région proximale de 1 à 2 kb (cf. Figure I-23). Cependant, les promoteurs eucaryotes comportent fréquemment des éléments *enhancers* très distants qui s'avèrent parfois nécessaires lors de la transcription génique, et c'est le cas du promoteur *NOS2* humain<sup>198</sup>. Dans les lignées humaines AKN, DLD-1 et A549, seuls des fragments d'une taille supérieure à 3,8 kb permettent une induction significative de l'activité du promoteur *NOS2* humain en réponse à des cytokines<sup>193</sup>. Un fragment de 16 kb est apparemment nécessaire pour permettre une induction maximale de l'activité du promoteur humain (environ x10) dans des lignées humaines transfectées de façon stable (A549 et AKN)<sup>199</sup>. L'utilisation d'autres constructions a permis d'estimer la contribution des différentes régions promotrices dans l'induction.

Par ailleurs, plusieurs polymorphismes affectent l'inductibilité du promoteur *NOS2*. La répétition du pentanucléotide CCTTT localisé en position -2.5kb a été particulièrement étudiée. Certaines études ont pu corrélérer le nombre de répétitions de ce pentanucléotide avec l'activité du promoteur *NOS2* et la sévérité de plusieurs maladies dont le diabète de type I, la malaria, l'asthme, l'hypertension artérielle pulmonaire, la polyarthrite rhumatoïde et l'inflammation chronique intestinale<sup>200,201</sup>. Plusieurs autres polymorphismes ont été découverts, dont une insertion/délétion du tétranucléotide AAAT en position -0.7kb, et des polymorphismes nucléotidiques (SNP = *single nucleotide polymorphisms*), mais leurs effets, notamment chez des patients atteints de malaria, restent un sujet de controverse.



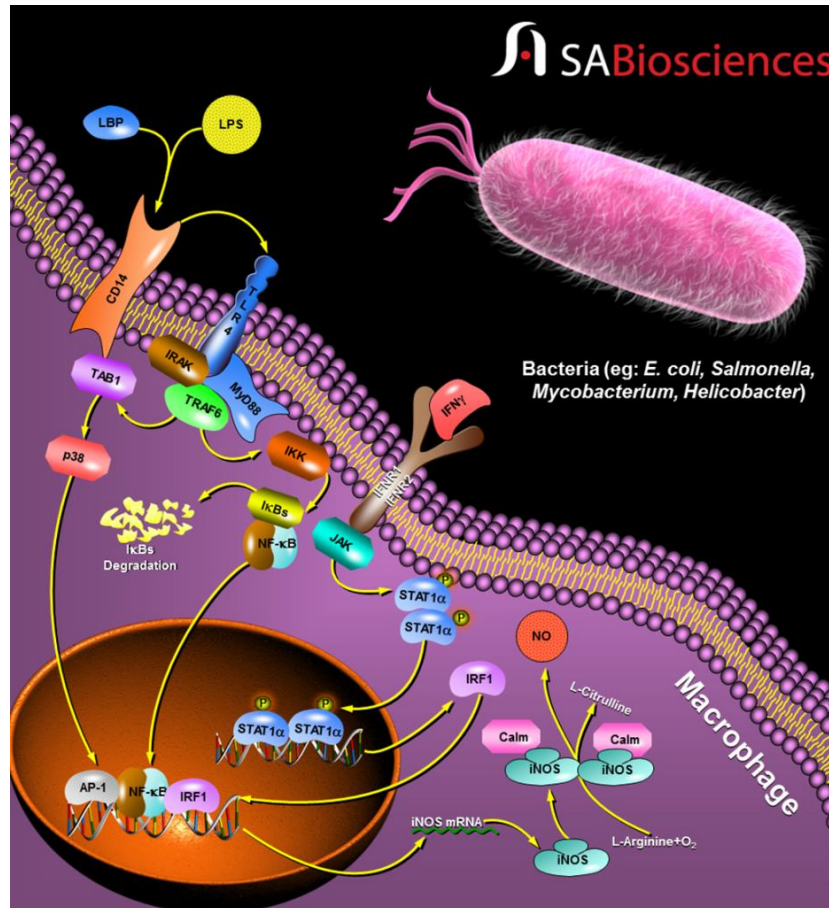
**Figure I-23 : Structure du promoteur 16 kb du gène NOS2 humain et contribution des différentes régions régulatrices à l'inductibilité du promoteur**<sup>189</sup>. La figure montre la position de la boîte TATA et les sites de liaison à des facteurs de transcription dont il a été démontré qu'ils avaient un effet sur la régulation de l'activité du promoteur : AP-1 (1), CAR (DR4), C/EBP (C), EGFR-STAT3 (E\_S3), FKHRL1 (F), HMGA1 (H1), KLF6 (KL), NF- $\kappa$ B ( $\kappa$ ), NRF (NRE), Oct-1 (O), RAR/RXR (RARE), PXR (DR4), STAT1 $\alpha$  (GAS), TCF4 (T4), TCF11/MafG (M) et YY1 (Y). La localisation des polymorphismes nucléotidiques les plus fréquents est renseignée, ainsi que celle de la répétition du pentanucléotide CCTTT et de l'insertion/délétion du tétranucléotide AAAT. La capacité d'induction des différents fragments de promoteur est signalée par les flèches (expériences de transfection transitoire dans les lignées humaines A549 ou AKN).

### 1.5.2 Les facteurs de transcription modulant l'expression de la iNOS

Les séquences promotrices du gène *NOS2* de tous les mammifères présentent de fortes homologies au niveau de sites de liaison à de très nombreux facteurs de transcription. L'identification des éléments de réponse à ces facteurs de transcription a mis en évidence leur fréquente localisation au sein des ECR du promoteur. Seuls certains de ces sites putatifs (qui sont au nombre de 2700 environ d'après une analyse avec le logiciel MatInspector de la région de 20 kb flanquant en 5' du gène humain) ont effectivement pu être impliqués dans la régulation de l'activité du promoteur (cf. Figure I-23). Leur répartition se concentre essentiellement à proximité de la boîte TATA (elle-même située à environ 30bp du site d'initiation de la transcription) ainsi que dans la région avoisinant -900 bp pour les promoteurs murins et humain.

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B constitue la cible centrale d'un grand nombre d'activateurs et d'inhibiteurs de l'expression de la iNOS, chez tous les mammifères<sup>202-204</sup>. La stimulation des récepteurs au LPS (TLR4), à l'IL-1 $\beta$  (IL1R1) et au TNF- $\alpha$  (TNFR2) engagent des voies de signalisation distinctes qui conduisent pourtant toutes à l'activation puis à la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B. L'activation de la sérine/thréonine kinase IKK, qui contrôle la dégradation de l'inhibiteur spécifique de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), est une étape critique dans ces voies d'activation. La liaison de NF- $\kappa$ B à des éléments de réponse spécifiques dans le promoteur

*NOS2* entraîne l'induction de l'expression de la *iNOS*. Plusieurs molécules comme les glucocorticoïdes et le TGF- $\beta$ 1 peuvent inhiber l'expression de la *iNOS* en bloquant l'activité de NF- $\kappa$ B (capture par des interactions protéine-protéine ; blocage de la translocation nucléaire ; inhibition de l'activité transactivatrice ; hausse de l'expression de I $\kappa$ B).



**Figure I-24 : Induction de l'expression de la *iNOS* par la stimulation synergique d'un macrophage avec le LPS et l'IFN- $\gamma$ .** Le LPS est un composant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Le LPS se lie à la LBP (LPS binding protein), qui le délivre à CD14, un récepteur de haute affinité au LPS. Le récepteur TLR4 (Toll like receptor 4) interagit avec le complexe CD14-LPS et active une cascade de signalisation intracellulaire via les protéines adaptatrices IRAK (Interleukin-1 receptor-associated kinase) et MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88). Ces adaptateurs activent à leur tour des molécules comme TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6), TAB1 (TAK1-binding protein 1) et p38. L'activation de TLR4 conduit aussi à la phosphorylation de IKK (Inhibitor of kappaB kinase), qui phosphoryle à son tour I $\kappa$ B et libère NF- $\kappa$ B. Ce dernier est alors transloqué dans le noyau où il se lie à des éléments de réponse spécifiques pour activer la transcription du gène *NOS2*. Les cytokines proinflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  activent également NF- $\kappa$ B. L'IFN- $\gamma$  se lie au complexe récepteur IFNRI/IFNR2, qui active des kinases JAK (Janus kinases), conduisant à la synthèse STAT1 $\alpha$ -dépendante d'IRF1. L'activation de STAT1 $\alpha$  et d'IRF1 en réponse à l'IFN- $\gamma$  fournit un boost synergique à l'induction par le LPS de la transcription de *NOS2*.

Il faut remarquer que la combinaison de différents stimuli, qui agissent en synergie, est souvent nécessaire pour assurer une induction transcriptionnelle vraiment significative du gène *NOS2*. Typiquement, sur des macrophages, le traitement avec du LPS en combinaison avec de l'IFN- $\gamma$  permet une induction bien supérieure à celle obtenue isolément avec chacun des stimuli (cf. Figure I-24). Chez la souris, les interférons (de type I - $\alpha/\beta$ - et de type II - $\gamma$ -) et les produits d'origine microbienne (ex : LPS) sont les inducteurs prototypiques de la transcription de la iNOS, qui stimulent efficacement la libération de NO par les macrophages. Les IFNs provoquent la dimérisation de STAT1 $\alpha$  (*Signal transducer and activator of transcription 1alpha*), l'expression d'IRF1 (*Interferon-regulatory factor-1*) puis la formation du complexe ISGF3 (*Interferon-stimulated gene factor 3*), tandis que le LPS déclenche l'activation de NF- $\kappa$ B. Ces facteurs de transcription interagissent avec des sites de liaison spécifiques dans le promoteur du gène *NOS2*.

L'équipe de Farlik et ses collaborateurs a révélé les bases moléculaires sous-jacentes à l'induction synergique de la iNOS par les IFNs de type I et des composés microbiens, en utilisant des macrophages dérivant de cellules de moelle osseuse infectées avec *Listeria monocytogenes*<sup>205</sup>. Dans un premier temps, les composés bactériens interagissent avec des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP = *Pathogen-associated molecular patterns*) membranaires et cytosoliques qui déclenchent respectivement l'activation de NF- $\kappa$ B et la production d'IFN- $\alpha/\beta$ . La liaison de NF- $\kappa$ B au promoteur de *NOS2* conduit au recrutement de TFIID (*Transcription factor II human*) et de sa sous-unité CDK7 (*Cyclin-dependent kinase 7*). La seconde étape est la formation et la liaison au promoteur *NOS2* du complexe ISGF3, permettant le recrutement de l'ARN polymérase II et sa phosphorylation par CDK7. NF- $\kappa$ B et ISGF3 agissent ainsi de façon séquentielle et coopérative pour induire transcriptionnellement la iNOS.

La liaison de l'IFN- $\gamma$  au récepteur aux IFN de type II provoque l'activation de JAK2, une tyrosine kinase cytosolique de la famille Janus. La phosphorylation de STAT1 $\alpha$ , par JAK2 directement ou par la PKC activée *via* la PI3K en réponse à JAK2, entraîne son homodimérisation et sa translocation nucléaire. L'activité du promoteur *NOS2* est stimulée après fixation de STAT1 $\alpha$  à des séquences GAS ( *$\gamma$ -interferon activated site*)<sup>206,207</sup>. L'activation parallèle des kinases ERK1/ERK2 induite par l'IFN- $\gamma$  assure une activation complète de STAT1 $\alpha$  (phosphorylation du résidu Ser727). De plus, STAT1 $\alpha$  induit transcriptionnellement IRF1, dont le rôle est essentiel dans l'induction de la iNOS par l'IFN- $\gamma$  dans les macrophages

murins. La liaison directe d'IRF1 au promoteur de *NOS2* n'a été décrite jusqu'aujourd'hui que chez la souris.

De multiples autres facteurs de transcription proinflammatoires ont pu être impliqués dans l'induction transcriptionnelle de *NOS2*, bien que leur influence varie considérablement en fonction de l'espèce et du type cellulaire concerné. Parmi ces facteurs de transcription figurent AP-1, HIF-1 (*Hypoxia-inducible factor-1*) et Oct-1 (*Octamer-1*). Le complexe AP-1 est issu de l'hétérodimérisation de c-Fos et c-Jun induite par les voies des MAPK ERK, tandis que HIF-1 est un facteur de transcription stabilisé en conditions d'hypoxie. La faible saturation en oxygène est une caractéristique des sites inflammatoires et des tissus tumoraux. Elle induit une stabilisation de la sous-unité  $\alpha$  du facteur de transcription HIF-1, qui stimule l'expression de gènes améliorant l'oxygénation des tissus et favorisant la résolution de l'inflammation. L'hypoxie seule est un faible inducteur de l'expression de la iNOS, mais une forte synergie opère entre HIF-1 $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  ou les agonistes des TLR (*Toll-like receptors*)-3/4/9 pour activer le promoteur de *NOS2*, au travers d'une coopération avec NF- $\kappa$ B<sup>208</sup>.

L'activité du promoteur *NOS2* peut aussi être réprimée : des récepteurs nucléaires comme les récepteurs aux glucocorticoïdes forment des complexes avec STAT1 $\alpha$ , AP-1 et NF- $\kappa$ B, ce qui inhibe leur activité transactivatrice<sup>209</sup>. De plus, ils entrent en compétition avec eux pour la liaison à des coactivateurs transcriptionnels (ex : CBP et p300). Il existe aussi des situations où AP-1 inhibe l'activité du promoteur *NOS2* humain en se fixant sur une séquence *Silencer* dite AP-1-like<sup>210</sup>. Le suppresseur de tumeur p53 et le TGF- $\beta$  (pour ce dernier *via* le complexe TCF11/MafG chez l'Homme) répriment également l'expression de la iNOS. Les mécanismes mis en cause dans cette régulation seront abordés en détail au cours des prochains chapitres.

Le tableau ci-après (Tableau I-2) récapitule l'effet des principaux facteurs de transcription régulant l'expression de la iNOS, et les types cellulaires dans lesquels leur implication a été décrite pour la première fois<sup>189</sup>.

**Tableau I-2 : Principaux facteurs de transcription régulant l'expression de la iNOS.** L'effet positif ou négatif des différents facteurs sur le niveau d'induction de la iNOS est indiqué par les flèches, ainsi que les lignées cellulaires dans lesquelles ces effets ont été décrits pour la première fois.



Chapitre I : Introduction bibliographique

Facteur de transcription	Activité du promoteur	Cellules (Espèce)
Activating protein-1 ( <b>AP-1</b> )	↑	A549 (Homme)
	↓	DLD-1, A549, HUVEC (Homme)
CCAAT-enhancer box binding protein ( <b>C/EBP</b> )	↑	Astrocytes primaires (Homme)
Forkhead box O3A ( <b>FOXO3A</b> )	↑	A549 (Homme)
Glucocorticoid receptor- $\alpha$ , $-\beta$ ( <b>GR-<math>\alpha</math>,<math>-\beta</math></b> )	↓	A549 (Homme)
Hypoxia-induced factor-1 ( <b>HIF-1</b> )	↑	Macrophages (Souris)
		Cardiomyocytes (Rat)
Hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$ ( <b>HNF-4<math>\alpha</math></b> )	↑	Hépatocytes (Rat)
Heat shock factor 1 ( <b>HSF1</b> )	↑	RAW 264.7 (Souris)
Interferon regulatory factor 1 ( <b>IRF1</b> )	↑	A549 (Homme)
		RAW 264.7 (Souris)
Krüppel-like factor 6 ( <b>KLF6</b> )	↑	Jurkat, Lymphocytes T (Homme)
		COS-7 (Vervet vert)
Nuclear factor of activated T cells ( <b>NF-AT</b> )	↑	Myocytes primaires (Rat)
Nuclear factor-IL6 ( <b>NF-IL6</b> )	↑	NIH-3T3, J774.A1 (Souris)
Nuclear factor- $\kappa$ B ( <b>NF-<math>\kappa</math>B</b> )	↑	AKN-1, A549 (Homme)
		RAW 264.7 (Souris)
Octamer factor 1 ( <b>Oct-1</b> )	↑	Hépatocytes primaires (Homme)
		RAW 264.7 (Souris)
Tumor suppressor p53 ( <b>p53</b> )	↓	AKN-1, DLD-1, Calu 6 (Homme)
		Fibroblastes de derme (Souris)
Peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$ ( <b>PPAR-<math>\gamma</math></b> )	↓	Chondrocytes (Homme)
		RAW 264.7 (Souris)
Retinoic acid receptor- $\alpha$ / Retinoic X receptor- $\alpha$ ( <b>RAR-<math>\alpha</math>/RXR-<math>\alpha</math></b> )	↑	HeLa, HepG2, A549 (Homme)
	↓	Gliobl. T98G / U87MG (Homme)
		Cellules de Küpffer, VSMCs (Rat)
Sma and MAD protein 2/3 ( <b>SMAD2/3</b> )	↓	RAW 264.7, Macrophages (Souris)
Signal transducer and activator of transcription 1 $\alpha$ ( <b>STAT1<math>\alpha</math></b> )	↑	A549, DLD-1 (Homme)
		Macrophages (Souris)
Signal transducer and activator of transcription 3 ( <b>STAT3</b> )	↑	A431, DLD-1 (Homme)
		Macrophages (Souris)
Transcription factor 11 ( <b>TCF11</b> )	↓	HASMC, HUVEC (Homme)

### 1.5.3 La régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle de la iNOS

Si l'activité du promoteur est un paramètre crucial lors de l'induction de la iNOS, la stabilité de l'ARN messager est également un facteur important. De façon générale, la régulation de la stabilité des ARNm dépend de séquences localisées dans la région 3'UTR des transcrits matures. L'ARNm de la iNOS contient dans cette région 3'UTR des éléments riches en AU, dont il a été démontré qu'ils déstabilisent l'ARNm en favorisant le recrutement de l'exosome. L'activité nucléasique de l'exosome provoque la dégradation rapide des transcrits. La reconnaissance des ARNm par l'exosome nécessite leur interaction avec des protéines de liaison aux éléments riches en AU. Ces protéines possèdent aussi bien des propriétés stabilisatrices (ex : HuR, TTP) que déstabilisatrices (ex : KSRP, AUF1) de l'ARNm *NOS2*<sup>211,212</sup>.

Un nombre croissant d'études souligne également le rôle des ARN non codants (ncRNA) dans la régulation de l'expression de la iNOS. Dans des modèles murins, de multiples séquences putatives d'interaction avec des micro-ARN (miARN) ont pu être identifiées dans l'ARNm *iNOS*<sup>189</sup>. Cependant, la plupart des miARNs identifiés (comme miR-125a-5p, miR-146a, miR-149, miR-155 et miR-301a) agissent de façon indirecte en bloquant l'expression de facteurs de transcription ou de protéines intervenant dans la régulation (positive ou négative) de l'expression du gène *NOS2* (ex : SOCS-1, IRAK-1, Krüppel-like factor 13, Rheb). Il existe cependant plusieurs cas bien étudiés pour lesquels l'interaction de miARNs avec la région 3'-UTR (*Untranslated region*) de l'ARNm *NOS2* conduit à sa déstabilisation et à la réduction des niveaux de transcrits et de protéine iNOS (ex : miR-939 dans les hépatocytes humains et miR-26a dans les cellules de lymphome T humaines)<sup>213,214</sup>.

La stabilité de la protéine iNOS est également sujette à une régulation. Certains travaux suggèrent par exemple que la cavéoline-1, en interagissant avec la iNOS, stimule sa dégradation protéasomale dans des lignées humaines de carcinome intestinal<sup>215,216</sup>. La phosphorylation de la iNOS par la tyrosine kinase Src augmente au contraire sa stabilité, mais réduit son activité enzymatique<sup>217</sup>. Il est désormais bien établi que le protéasome constitue la voie de dégradation majeure de la iNOS suite à sa polyubiquitination<sup>218,219</sup>. Les E3 ubiquitine ligases sont les enzymes responsables de la spécificité de transfert de l'ubiquitine sur des protéines cibles qui sont ensuite adressées au protéasome. Les complexes E3 ubiquitine ligase qui ciblent la iNOS sont des complexes de type ECS, qui sont constitués de l'élongine C, de la culline 5 et d'une

protéine SOCS-box (*Suppressor of cytokine signaling-box*). Dans ces complexes ECS, la protéine SOCS-box joue le rôle de sous-unité de reconnaissance du substrat. Dans le cas de la iNOS, de multiples travaux ont montré que les complexes ECS(SPSB) (*SPRY domain and SOCS-box containing proteins*) sont les principaux régulateurs de sa durée de vie<sup>220-222</sup>. Une équipe a par ailleurs découvert que l'expression de SPSB1 est induite lors de l'activation du TLR3 (reconnaissance des ARN double brin viraux) ou du TLR4 (récepteur au LPS), établissant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif sur l'expression de la iNOS<sup>223</sup>.

La modulation de l'activité enzymatique constitue le dernier niveau de régulation de la iNOS. Tout comme pour les autres NO synthases, elle est régulée en premier lieu par la disponibilité en cofacteurs et en substrats. Mais plusieurs protéines sont capables d'interagir avec la iNOS pour moduler son activité, comme la protéine kinase II  $Ca^{2+}$ /calmoduline-dépendante (CaMKII) ou la protéine de choc thermique Hsp90 (activateur allostérique de la iNOS)<sup>224,225</sup>. Quant à la kalirine et à la protéine NAP110, elles se fixent à la forme monomérique de la iNOS et préviennent sa dimérisation<sup>226,227</sup>. L'ensemble des niveaux de régulation de l'expression et de l'activité iNOS sont résumés sur la Figure I-25.

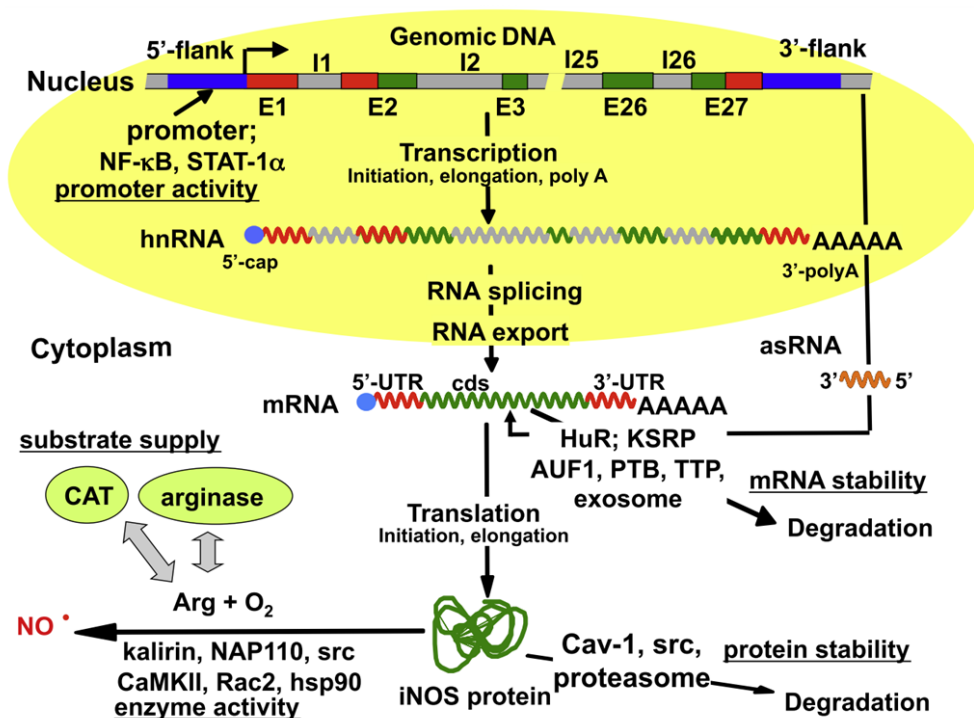


Figure I-25 : Résumé des principaux mécanismes de régulation de l'expression et de l'activité iNOS (détaillés dans le texte)<sup>189</sup>.

## 1.6 Contrôle de la synthèse de NO par le TGF- $\beta$

Le TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor- $\beta$* ) est une cytokine sécrétée par un très grand nombre de types cellulaires et impliquée dans des fonctions cellulaires variées telles que la prolifération, la différenciation, l'apoptose, l'adhésion, l'angiogenèse et la migration cellulaire<sup>228</sup>. Au niveau physiopathologique, le TGF- $\beta$  est très étudié en raison de son activité profibrogénique très puissante, dont les dérèglements sont associés à la plupart des fibroses (hépatique, pulmonaire, rénale, etc.)<sup>229</sup>. Il exerce cependant de nombreuses autres fonctions, dans le système immunitaire notamment, au sein duquel il module la prolifération et les fonctions des lymphocytes B et T, des cellules NK, des neutrophiles et des macrophages<sup>230-232</sup>. Le TGF- $\beta$  a aussi été identifié comme l'un des régulateurs physiologiques négatifs de la iNOS les plus puissants<sup>233</sup>.

### 1.6.1 Composants de la voie de signalisation canonique du TGF- $\beta$

Le TGF- $\beta$  est le membre prototypique d'une famille de facteurs de croissance et de différenciation comportant plus de 30 protéines structurellement apparentées incluant les BMPs (*Bone morphogenetic proteins*), les GDFs (*Growth and differentiation factors*) et les activines. Cette superfamille exerce un ensemble divers de fonctions allant de rôles morphogéniques au cours de l'embryogenèse jusqu'au maintien de l'homéostasie physiologique chez l'adulte. Au sein de cette famille, les fonctions des différents membres varient et peuvent même s'opposer selon le type cellulaire et le stade du développement. L'exemple de rôle contextuel du TGF- $\beta$  le plus fréquemment rapporté est son implication dans la tumorigenèse : le TGF- $\beta$  est un suppresseur de tumeur et un puissant inhibiteur de croissance cellulaire dans les cellules d'origine épithéliale et les tumeurs de stade précoce, tandis que dans les stades tumoraux avancés il promeut la croissance et la progression tumorale en induisant la transition épithélio-mésenchymateuse, et en renforçant le caractère invasif des tumeurs et la formation de métastases qui en résultent<sup>234</sup>.

Tous les ligands de la famille du TGF- $\beta$  sont des facteurs sécrétés qui se lient et activent des complexes hétéromériques de récepteurs à la surface des cellules, classés en deux catégories (type I et II, cf. Tableau I-3). Les deux types de récepteurs comportent un domaine kinase cytoplasmique qui possède une double spécificité d'activité (sérine/thréonine kinase et tyrosine

kinase)<sup>235</sup>. Suite à leur liaison à un ligand dimérique de la famille du TGF- $\beta$ , deux récepteurs de type II s'associent à deux récepteurs de type I au sein d'un complexe hétéromérique. Ceci permet aux récepteurs de type II, dont l'activité kinase est constitutive, de phosphoryler des régions juxta-membranaires cytoplasmiques des récepteurs de type I, ce qui active leur fonction kinase<sup>236</sup>. Il faut remarquer que le  $\beta$ -glycane, s'il n'intervient pas dans la transduction du signal, lie plusieurs ligands de la famille du TGF- $\beta$  et sert de réservoir de ligands (récepteur de type III)<sup>237</sup>. Par la suite, les récepteurs de type I phosphorylent deux résidus sérine situés dans un motif SSXS carboxy-terminal de protéines transductrices du signal : les SMADs régulées par le récepteur (R-SMADs)<sup>238</sup>. Cet évènement active les R-SMADs et permet la formation de complexes hétérotrimériques entre deux R-SMADs et une SMAD commune (SMAD4), qui subissent ensuite une translocation nucléaire (cf. Figure I-26)<sup>239,240</sup>. Il existe de surcroît des SMADs inhibitrices (I-SMADs : SMAD6 et SMAD7) qui antagonisent la signalisation médiée par les ligands de la famille du TGF- $\beta$ <sup>241</sup>. Les I-SMADs agissent de multiples manières, en interférant avec le recrutement des R-SMADs, en induisant une déphosphorylation des récepteurs et en recrutant des E3 ubiquitine ligases (Smurf1/2) qui les dégradent, ou en formant des complexes hétéromériques inactifs avec les R-SMADs ou SMAD4<sup>242</sup>.

Receptors	Alternative names	Ligands
Type I receptors		
<i>Alk1 group</i>		
Alk1 (Activin receptor-like kinase 1)	TSR1/SKR3/ACVRL1	TGF- $\beta$ , Activin A
Alk2	TSK7L/ActRIA/SKR1	TGF- $\beta$ , Activin A, MIS, BMP6/7
<i>Alk 3 group</i>		
Alk3	BMPRI/BMPRIA/BRK1/Tfr11/ACVRLK3	BMP2/4, BMP6/7
Alk6	BMPRII/BRK2	BMP2/4, GDF5/6, GDF9b, MIS, BMP6/7
<i>Alk 5 group</i>		
Alk4	ActRIB/ACVR1BSKR2	Activin A, GDF1 and Nodal (with EGF-CFC), GDF11
Alk5	TGF- $\beta$ RI/SKR4	TGF- $\beta$
Alk7		Nodal
Type II receptors		
TGF- $\beta$ RII		TGF- $\beta$
BMP RII	BRK3/T-AIk	Inhibin A (with TGFRIII), BMP2/4, BMP6/7, GDF5/6, GDF9b
Act RII (Activin type II receptor)	ACVR2	Activin A, Inhibin A/B, GDF1 and Nodal (with EGF-CFC), BMP2, BMP6/7, GDF5, GDF9b, GDF8/11
Act RIIB	ACVR2B	Activin A, Inhibin A/B, Nodal, BMP2, BMP6/7, GDF5, GDF8/11
MIS RII (Mullerian inhibitory substance type II receptor)	AMHR2	MIS

**Tableau I-3 : Nomenclature des différents récepteurs de type I et de type II aux ligands de la famille du TGF- $\beta$** <sup>235</sup>.

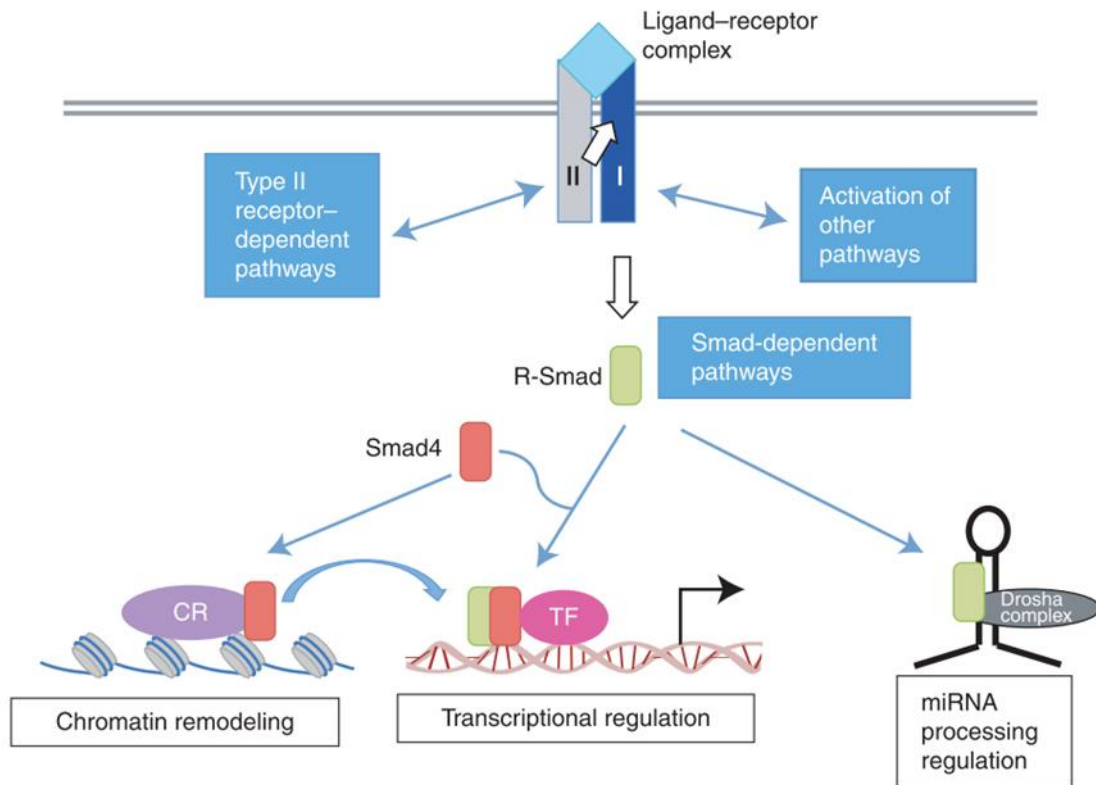
Les TGF- $\beta$ s se lient avec une très haute affinité au récepteur de type II (T $\beta$ RII), qui recrute ensuite un récepteur de type I (T $\beta$ RI), tandis que les BMPs se lient aux deux types de récepteurs avec la même affinité<sup>243,244</sup>. La durée et l'intensité des signaux transmis aux protéines SMADs dépendent de l'abondance et de la disponibilité des ligands, mais aussi du niveau d'expression et de la localisation à la surface des cellules des récepteurs de type I et de type II. De très nombreuses modifications post-traductionnelles de ces récepteurs, qui ne seront pas détaillées ici, régulent en effet leur activité kinase, leur niveau d'expression, leur localisation subcellulaire et leur reconnaissance du substrat.

Il existe une forte spécificité d'activation des R-SMADs par les récepteurs de type I nommés ALK (*Activine receptor-like kinase*) (cf. Tableau I-3). En réponse au TGF- $\beta$  (1,2 ou 3) ainsi qu'aux activines, SMAD2 et SMAD3 sont spécifiquement phosphorylées par les récepteurs ALK-4, ALK-5 et ALK-7. En réponse aux BMPs ou aux protéines apparentées, SMAD1, SMAD5 et SMAD8 sont activées par les récepteurs ALK-1, ALK-2, ALK-3 et ALK-6<sup>245</sup>. C'est la structure du domaine MH2 (*Mad homology 2*) des R-SMADs qui spécifie leur interaction avec les récepteurs de type I<sup>246</sup>. L'activation de SMAD2 et SMAD3 est facilitée par leur présentation au récepteur par la protéine SARA (*Smad anchor for receptor activation*).

### 1.6.2 Régulation de gènes cibles par les protéines SMADs et leurs partenaires

Les SMADs font constamment la navette entre le cytoplasme et le noyau, où elles sont transloquées *via* la séquence NLS (*Nuclear localization signal*) située dans leur domaine MH1 par des importines ou par des nucléoporines<sup>247-250</sup>. La phosphorylation des R-SMADs par les récepteurs ALK et leur association à SMAD4 entraînent leur rétention dans le noyau, où les SMADs jouent le rôle de facteurs de transcription et de régulateurs des miARN. Les complexes hétérotrimériques composés de deux R-SMADs et de SMAD4 se lient à l'ADN grâce aux structures  *$\beta$ -hairpin* situées dans leur domaine MH1. Le domaine MH2 des Smads interagit avec divers facteurs nucléaires afin de moduler la transcription de gènes ou le profil épigénétique. Les I-SMADs sont dépourvues de domaine MH1 mais elles conservent un domaine MH2 ce qui explique qu'elles puissent former des complexes inactifs avec les autres SMADs. SMAD7 se comporte comme un inhibiteur général de tous les TGF- $\beta$ s, tandis que SMAD6 bloque préférentiellement la signalisation des BMPs<sup>242</sup>.

Les complexes de SMADs se lient avec une faible affinité à des éléments de réponse appelés SBE (*SMAD binding elements*). Lorsqu'un trimère de SMADs agit de façon isolée, seuls certains gènes cibles vont pouvoir être activés à un niveau restreint. Cependant, son interaction avec des facteurs de transcription partenaires est la plupart du temps nécessaire pour améliorer l'affinité et la spécificité de liaison à l'ADN, et permettre une activation plus efficace de la transcription<sup>251</sup>. Une grande variété de partenaires de liaison à l'ADN des SMADs a été décrite, dont des protéines modifiant la structure de la chromatine comme des histone acétyltransférases (HATs, dont p300/CBP) et des histone désacétylases (HDACs). Nombre de ces partenaires de liaison sont tissu-spécifiques, ce qui est essentiel à l'établissement d'une régulation génique contextuelle par le TGF- $\beta$ .



**Figure I-26 : Voies classiques de transduction du signal activées par la famille du TGF- $\beta$ <sup>235</sup>.** Les ligands de la famille du TGF- $\beta$  transmettent des signaux en induisant l'assemblage hétérotétramérique de deux récepteurs de type I avec deux récepteurs de type II. Suite à la liaison du ligand, le signal est transmis par le domaine kinase cytoplasmique des récepteurs de type I qui phosphorylent des protéines SMADs régulées par le récepteur (R-SMADs). A côté de cette voie canonique SMAD-dépendante, plusieurs voies SMAD-indépendantes sont également activables par ces récepteurs (ex : MAPK, PI3K...). Les protéines R-SMADs activées forment des complexes avec une protéine SMAD4 qui sont ensuite transloqués dans le noyau, où ils régulent la transcription de gènes cibles en se liant à des éléments de réponse spécifiques avec d'autres cofacteurs. Les R-SMADs forment aussi des complexes avec des protéines de remodelage de la chromatine qui reconnaissent des modifications des histones et favorisent la formation de chromatine active. En supplément, les R-SMADs participent aussi à la biogenèse des miARN en interagissant avec le complexe Drosha.

La régulation de gènes par des miARN est aussi une voie majeure de contrôle de l'expression génique utilisée par les ligands de la famille du TGF- $\beta$ , qui sont capables de réguler leur biogenèse et leur expression<sup>252</sup>. Les miARN sont de petits ARN non codants qui s'associent à une séquence partiellement complémentaire souvent située dans la région 3'-UTR d'ARNm cibles, et répriment leur expression en promouvant leur dégradation ou en inhibant leur traduction. Un simple miARN est capable de cibler plusieurs dizaines d'ARNm simultanément, c'est pourquoi la régulation de quelques-uns peut affecter l'expression de centaines de gènes et contribuer au contrôle spatial et temporel des fonctions biologiques des ligands de la famille du TGF- $\beta$ .

### 1.6.3 Les voies de signalisation indépendantes des protéines SMADs.

En marge des voies de signalisation canoniques dépendantes des protéines SMADs, les récepteurs au TGF- $\beta$  (et aux ligands de la même famille) relaient également des signaux au travers de voies de signalisation additionnelles dites SMAD-indépendantes<sup>253</sup>. Ces voies de signalisation établissent des croisements (*crossstalks*) avec la signalisation des récepteurs au TGF- $\beta$ , et forment un réseau complexe et intriqué d'interactions moléculaires. Les récepteurs activés par les TGF- $\beta$ s et les BMPs induisent par exemple l'activation des MAPK ERK1/2 dans une variété de types cellulaires (cellules endothéliales, myoblastes, cellules souches, ostéoblastes, cellules cancéreuses...) <sup>254,255</sup>. Pour expliquer ce phénomène, la démonstration a été faite que l'activité tyrosine kinase spécifique des récepteurs T $\beta$ RII provoque une activation des GTPases Ras/Raf et une activation subséquente des MAPK MEKs puis ERK1/2<sup>256</sup>. Les MAPK JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) et p38 peuvent aussi être activées en réponse au TGF- $\beta$ . Après que le récepteur T $\beta$ RI/ALK5 se soit associé à la E3 ligase TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*), la polyubiquitination intramoléculaire de cette dernière sert d'échafaudage à un assemblage avec la kinase TAK1 (*TGF- $\beta$ -activated kinase 1*), qui agit en amont de JNK et p38<sup>257,258</sup>. Enfin, diverses autres voies de signalisation comme la voie PI3K-Akt et les GTPases de la famille Rho sont induites par les ligands de la famille du TGF- $\beta$ .

L'exemple de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est particulièrement bien adapté pour mettre en lumière l'importance de ces voies de signalisation SMAD-indépendantes. Les cellules épithéliales sont des cellules différenciées caractérisées par leur forme uniforme, une polarité apico-basale, de fortes jonctions adhérentes cellule-cellule, des hémidesmosomes



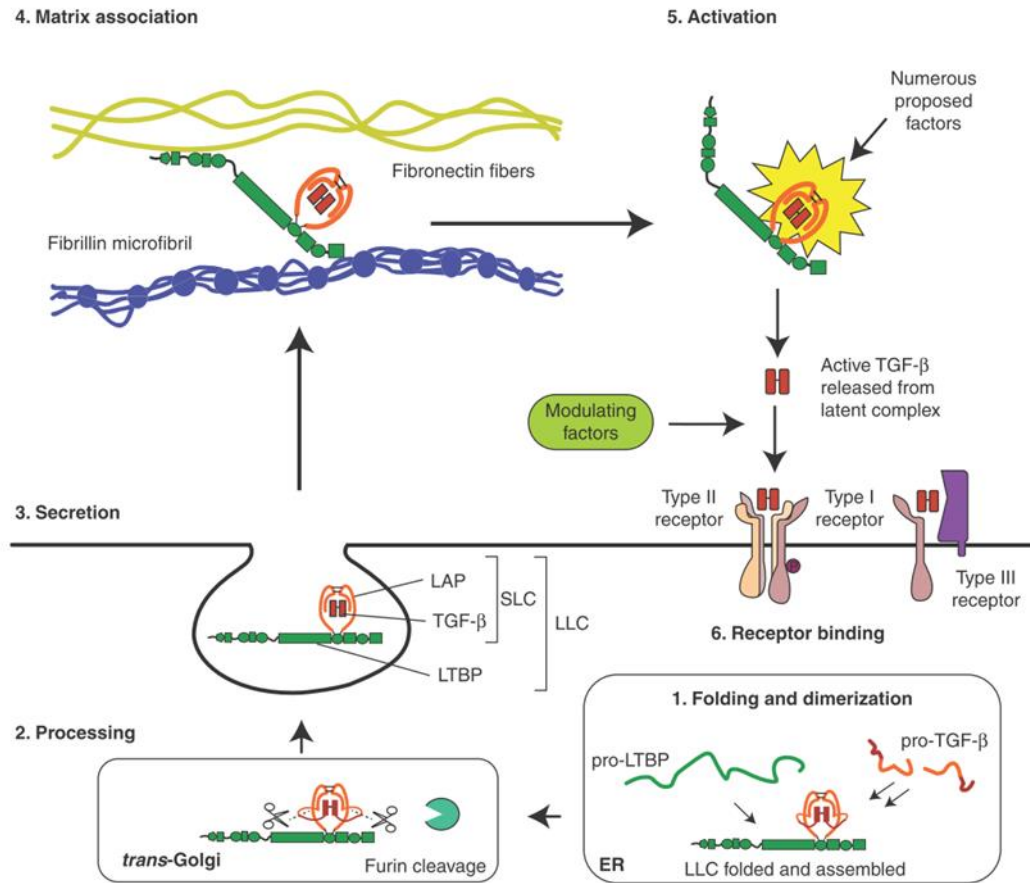
cellule-matrice extracellulaire, et une mobilité limitée. Ces cellules forment normalement des tubes ou des feuilletts composés d'une monocouche cellulaire. A l'opposé, les cellules mésenchymateuses ont une polarité avant-arrière et perdent leur faculté d'attachement aux autres cellules. Elles ont habituellement une mobilité très supérieure, étroitement reliée à leur fonction de régénération. Les cellules mésenchymateuses résident dans des tissus lymphatiques et circulatoires, ainsi que dans certains tissus conjonctifs où elles donnent naissance à d'autres types cellulaires. Nombreux sont les processus physiologiques nécessitant la conversion de cellules d'un phénotype épithélial vers un phénotype mésenchymateux (et la conversion inverse également). Au cours du développement embryonnaire, l'EMT est ainsi nécessaire lors de stades précoces comme la gastrulation et la formation de la crête neurale, mais aussi de stades plus tardifs comme la formation d'organes complexes comme les poumons et le cœur<sup>259</sup>. L'EMT joue aussi un rôle déterminant dans les processus de cicatrisation<sup>260</sup>.

Le TGF- $\beta$  est capable d'induire l'EMT au même titre que certains ligands de la famille de SHH (*Sonic hedgehog*) et de WNT, avec lesquels il existe des *crossstalks*<sup>261</sup>. Au niveau pathophysiologique, et sous certains aspects, le cancer est parfois comparé à un état de cicatrisation excessive ou à un processus développemental anormal<sup>262,263</sup>. L'invasivité et la formation de métastases sont des caractéristiques associées à l'EMT. Elles sont des étapes décisives dans le développement des cancers, car elles permettent à la tumeur de former des foyers secondaires. Dans ces contextes, l'activation des voies ERK1/2, PI3K-AKT et RHO GTPases sont essentielles au désassemblage des jonctions adhérentes, à la réorganisation du cytosquelette d'actine et à la motilité cellulaire<sup>255,264-267</sup>. Dans les stades tumoraux avancés, les voies de signalisation SMAD-indépendantes exercent ainsi des effets protumoraux qui s'opposent à ceux des voies SMAD-dépendantes à l'origine des fonctions suppresseur de tumeurs du TGF- $\beta$  dans les stades pré-oncogéniques.

#### 1.6.4 Régulation de la biodisponibilité du TGF- $\beta$

Le TGF- $\beta$  est synthétisé sous une forme dimérique inactive dans un complexe latent où il est associé au propeptide dimérique LAP (*Latency-associated peptide*) et à une protéine LTBP (*Latent TGF- $\beta$ -binding protein*). Ce complexe tripartite (TGF- $\beta$ , LAT et LTBP) appelé complexe LLC (*Large latent complex*) joue un rôle critique dans la modulation de l'action du TGF- $\beta$  et dans le contrôle de sa biodisponibilité. Au sein de ce complexe, le propeptide LAP confère sa latence au TGF- $\beta$ , et la protéine LTBP dirige et séquestre le facteur de croissance

dans la matrice extracellulaire, et aide à son activation par conversion de la forme latente du TGF- $\beta$  en sa forme active (cf. Figure I-27)<sup>268</sup>.



**Figure I-27 : Mécanismes de maturation, sécrétion et régulation extracellulaire du TGF- $\beta$** <sup>268</sup>. (1) Le TGF- $\beta$  latent et sa protéine de liaison (LTBP) sont traduites dans le réticulum endoplasmique (ER) où le pro-TGF- $\beta$  se dimérise et est lié à LTBP grâce à une paire de ponts disulfure. (2) Le dimère de TGF- $\beta$  est clivé de son propeptide LAP dans le réseau *trans*-Golgi, mais le TGF- $\beta$  reste fortement associé à ce propeptide via des interactions non covalentes (complexe LLC). (3), (4) et (5) Une fois sécrétée, la protéine LTBP se lie à différentes fibres matricielles qui séquestrent le TGF- $\beta$  latent, jusqu'à ce qu'il soit libéré en réponse à un signal d'activation. (6) Le TGF- $\beta$  mature et actif peut dès lors se fixer à ses récepteurs de surface cellulaire.

Le TGF- $\beta$  est initialement traduit sous la forme d'une protéine d'environ 50 kDa contenant à la fois le facteur de croissance et le peptide LAP. Elle se dimérise et elle adopte son repliement tridimensionnel dans le réticulum endoplasmique, où les propeptides LAP du pro-TGF- $\beta$  dimérique sont liés à une protéine LTBP par une paire de ponts disulfure<sup>269,270</sup>. Le propeptide LAP est ensuite clivé de la cytokine mature au niveau du réseau *trans*-Golgi par la furine ou par des enzymes apparentées<sup>271</sup>. Le TGF- $\beta$  et le propeptide LAP demeurent toutefois associés *via* des interactions non covalentes et forment un complexe appelé SLC (*Small latent*

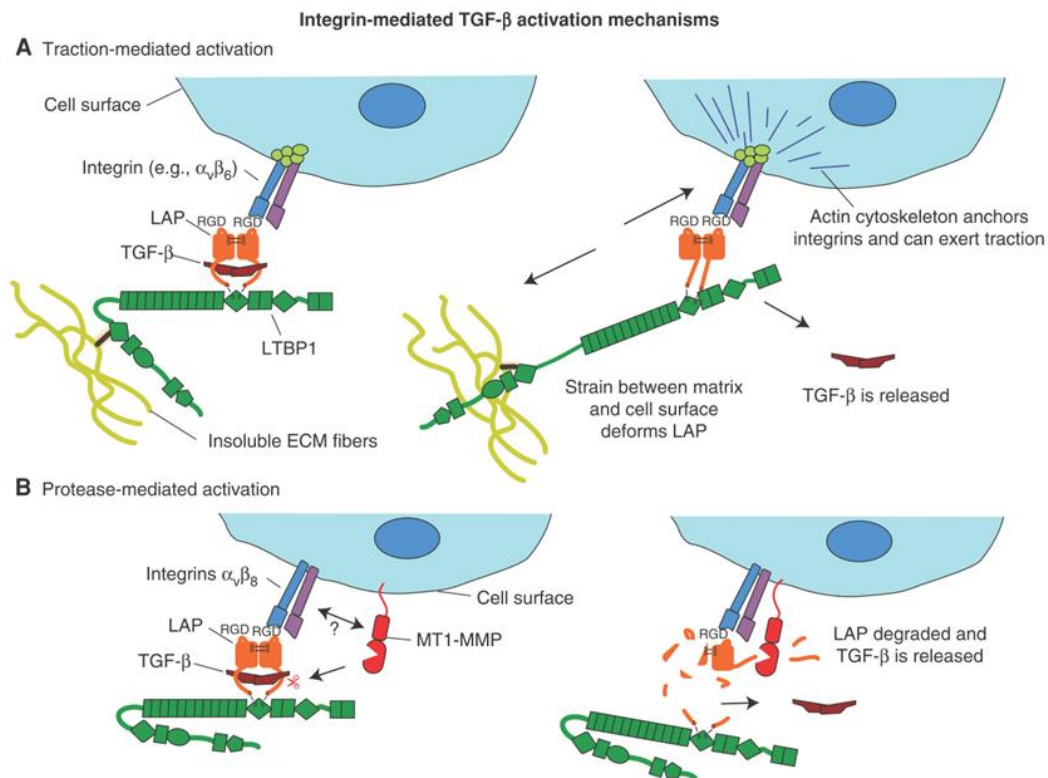
*complex*). L'interaction entre le propeptide LAP et le TGF- $\beta$  est d'une affinité telle que toutes les isoformes de TGF- $\beta$  sont sécrétées sous forme de complexe latent LLC ou SLC. Les protéines LTBP (famille de 4 protéines) servent de chaperonnes en améliorant le repliement et la sécrétion du pro-TGF- $\beta$ . Elles sont aussi responsables de la localisation du TGF- $\beta$  latent (complexes LLC) au niveau de la matrice extracellulaire, grâce à des interactions spécifiques avec les fibres de fibronectine et de fibrilline<sup>272-274</sup>.

L'ancrage du TGF- $\beta$  à la matrice extracellulaire permet son maintien sous forme latente et régule donc son état d'activation. C'est la raison pour laquelle les patients atteints du syndrome de Marfan, causé par des mutations du gène codant pour la fibrilline-1, affichent des niveaux plus élevés de TGF- $\beta$  actif<sup>275</sup>. Ceci peut s'expliquer par la réduction du nombre de sites d'ancrage du TGF- $\beta$  à la matrice qui entraîne un excès de complexes LLC solubles disponibles pour leur activation. Une seconde hypothèse est une hausse d'activation du TGF- $\beta$  latent par les intégrines qui serait favorisée par la destructuration de la matrice. En effet, le TGF- $\beta$  latent doit encore subir une étape d'activation pour devenir actif. Celle-ci peut être accomplie par certaines protéines ou lorsque des conditions physicochimiques particulières sont mises en place.

Les intégrines situées à la surface des cellules (ex :  $\alpha_v\beta_6$  et  $\alpha_v\beta_8$ ) sont des activateurs bien connus du TGF- $\beta$  latent (cf. Figure I-28)<sup>276,277</sup>. Le mécanisme d'activation du TGF- $\beta$  faisant intervenir des intégrines le plus étudié repose sur les forces de traction exercées entre les cellules et la matrice extracellulaire. Les intégrines sont associées au cytosquelette d'actine de la cellule et peuvent se lier au propeptide LAP. Ce dernier est attaché à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de la protéine LTBP, et la force de traction engagée permet de libérer le TGF- $\beta$  du complexe LLC. La nature critique de ce mode d'activation du TGF- $\beta$  est illustrée par un modèle murin dans lequel le motif RGD de liaison aux intégrines de TGF- $\beta$ 1-LAP a été remplacé par une séquence RGE<sup>278</sup>. Ces souris présentent un phénotype identique à celui des souris *TGF- $\beta$ 1*<sup>-/-</sup>, avec une inflammation généralisée dans de multiples organes, et ce malgré une sécrétion normale de TGF- $\beta$ . De cette façon, les intégrines jouent également un rôle important dans des pathologies pour lesquelles le TGF- $\beta$  est un médiateur majeur : la délétion du gène codant les intégrines  $\alpha_v$  protège par exemple les souris du développement de fibroses hépatiques, pulmonaires et rénales<sup>279</sup>. D'autre part, la délétion conditionnelle du gène codant les intégrines  $\beta_8$  dans les cellules dendritiques provoque de sévères maladies inflammatoires intestinales et auto-immunes, tandis que leur expression dans les lymphocytes T<sub>reg</sub> est

importante pour éviter une inflammation aberrante médiée par les lymphocytes T, ce qui souligne l'importance du TGF- $\beta$  dans le maintien de la tolérance immunitaire<sup>280,281</sup>.

Un grand nombre de protéases de différentes classes sont aussi capables d'accomplir l'activation du TGF- $\beta$  latent *in vitro*, dont des protéases à cystéine comme la calpaïne, des protéases aspartiques comme la cathépsine D, et des métalloprotéases matricielles comme MMP2, MMP3, MMP9, MMP13 et MMP14<sup>282,283</sup>. La pertinence de leurs fonctions *in vivo* dans le cadre de l'activation du TGF- $\beta$  reste toutefois incertaine car le phénotype des souris *knockout* pour ces différentes protéases ne correspond jamais à celui de souris TGF- $\beta^{-/-}$ . Cela pourrait indiquer un rôle mineur de cette voie dans l'activation du TGF- $\beta$  aussi bien qu'une forte redondance fonctionnelle à l'origine d'un phénomène de compensation.



**Figure I-28 : Mécanismes hypothétiques d'activation du TGF- $\beta$  latent par les intégrines<sup>268</sup>.** (A) Le premier mécanisme fait intervenir la soumission du peptide LAP à des forces de traction imposées par l'attachement de la cellule aux fibres de la matrice extracellulaire (MEC) via son cytosquelette d'actine. (B) Le second propose que la liaison du peptide LAP aux intégrines à la surface de la cellule puisse le rendre plus accessible et donc plus sensible au clivage par des métalloprotéases matricielles (MMP).

Enfin, l'activation du TGF- $\beta$  latent peut avoir lieu suite à son exposition à des conditions physiques ou chimiques particulières, telles que les détergents, les rayonnements ionisants et UV, les ROS, la chaleur, les forces de cisaillement et les pH extrêmes<sup>284-288</sup>. Certaines de ces conditions ont une signification biologique. Par exemple, les ROS produites par des lymphocytes T infectés par le VIH peuvent activer le TGF- $\beta$  latent et conduire à une immunosuppression<sup>289</sup>. Les ROS libérées lors de l'exposition à des rayonnements ionisants et UV sont probablement à l'origine d'une activation du TGF- $\beta$ <sup>290</sup>. Il existe de surcroît des circonstances pour lesquelles un faible pH conduirait à l'activation de TGF- $\beta$  latent. Au cours d'une résorption osseuse, les ostéoclastes réduisent ainsi le pH extracellulaire à environ 4,5, ce qui suffit à activer le TGF- $\beta$ <sup>291</sup>. Les cellules tumorales abaissent aussi significativement le pH de leur microenvironnement, ce qui pourrait contribuer à l'activation du TGF- $\beta$  observée en contexte tumorigénique<sup>292</sup>. Quant aux forces de cisaillement, elles permettent d'activer une part importante du TGF- $\beta$  latent libéré par les plaquettes sanguines<sup>288</sup>.

### 1.6.5 Régulation de l'expression de la iNOS par le TGF- $\beta$ 1

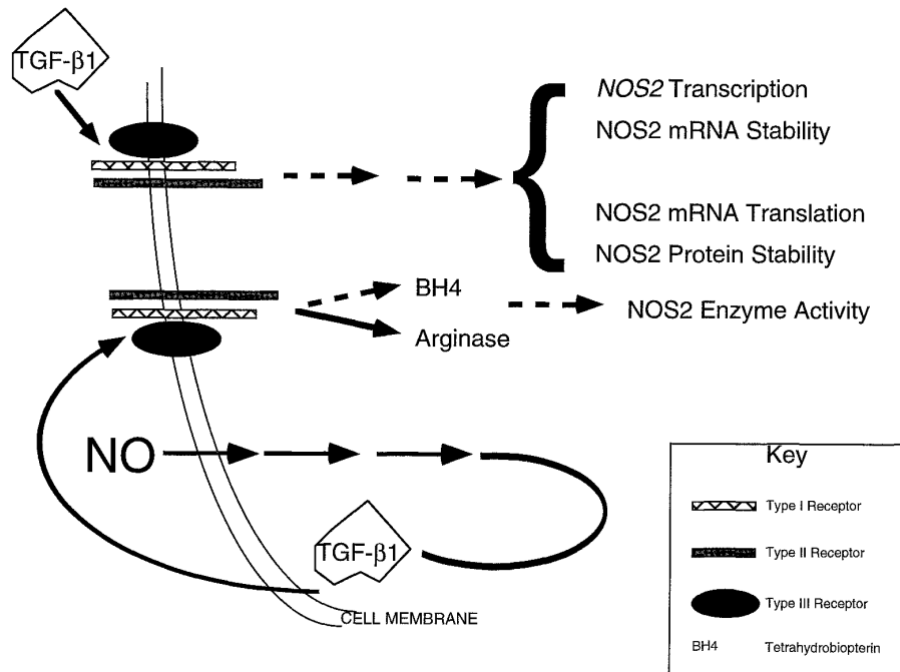
Au début des années 1990, une étude originale démontra que les trois isoformes de TGF- $\beta$  sont capables de réduire la capacité de production de NO par des macrophages murins en réponse à l'IFN- $\gamma$ <sup>293</sup>. Par la suite, nombre d'études réalisées *in vitro* (Y. Vodovotz et coll. ; D.J. Stuehr et coll.) ont rapporté un effet suppresseur prédominant du TGF- $\beta$ 1 sur la production de NO dans des types cellulaires variés, chez la souris, le rat ou chez l'Homme : macrophages, cellules musculaires lisses, cellules gliales, cardiomyocytes, cellules épithéliales pigmentaires de la rétine, cellules endothéliales, hépatocytes, cellules de Küpffer, chondrocytes, fibroblastes, kératinocytes<sup>294-307</sup> ... La large diversité de types cellulaires exprimant la iNOS pour lesquels le TGF- $\beta$ 1 exerce un effet modulateur reflète la distribution généralisée de récepteurs à cette cytokine dans tous les tissus de l'organisme.

La première étude ayant adressé la question de l'effet répresseur du TGF- $\beta$ 1 en contexte *in vivo* a mis en évidence une expression mutuellement exclusive de la iNOS dans les macrophages de souris résistantes à une infection par *Leishmania* et du TGF- $\beta$ 1 dans ceux des souris sensibles à cette même infection<sup>308</sup>. Les souris *TGF- $\beta$ 1*<sup>-/-</sup>, en plus d'exhiber une inflammation dans de multiples organes et des niveaux élevés d'auto-anticorps circulants, présentent spontanément de forts niveaux sériques de dérivés de NO (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> et NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) et un niveau aberrant d'expression de la iNOS dans le cœur, les reins, le foie et les poumons<sup>309-311</sup>. En outre,

le traitement de rats avec du TGF- $\beta$ 1 avant un choc endotoxinique induit par le LPS réduit considérablement le niveau d'expression de la iNOS et la production systémique de NO, tout en augmentant significativement la survie de ces animaux<sup>312</sup>.

Chez l'Homme, différentes études suggèrent que l'effet répresseur exercé sur la iNOS par le TGF- $\beta$ 1 pourrait être impliqué dans une série de pathologies pour lesquelles sont associés des niveaux aberrants d'expression de la iNOS. Le TGF- $\beta$ 1 est fortement exprimé chez les patients atteints de leishmaniose et il limite la capacité des macrophages humains à tuer les parasites *in vitro*<sup>313</sup>. Les mégacaryocytes de patients affectés par de l'athérosclérose expriment des niveaux aberrants de iNOS qui pourrait être mis en relation avec la réduction drastique du taux de TGF- $\beta$ 1 actif circulant chez ces mêmes patients<sup>314,315</sup>. Dans le côlon des personnes atteintes de la maladie de Crohn, une production excessive de NO aussi bien que de TGF- $\beta$ 1 a été relevée<sup>316,317</sup>. Cependant, la voie de signalisation du TGF- $\beta$  pourrait être défailante dans cette pathologie, comme le laisse supposer la localisation anormale des récepteurs au TGF- $\beta$  de type I et de type II chez les patients atteints de maladie inflammatoire intestinale<sup>318</sup>. En ce qui concerne les maladies neurodégénératives, l'apparition et la progression de la sclérose en plaques ont été associées à la fois à une réduction de l'expression du TGF- $\beta$ 1 dans les lymphocytes T et à une surexpression de la iNOS dans les cellules gliales<sup>319,320</sup>. Dans le cerveau des patients atteints par la maladie d'Alzheimer, la iNOS est exprimée dans les micro-vaisseaux sanguins et dans les neurones en dégénérescence, tandis que l'expression neuronale du TGF- $\beta$ 1 est diminuée dans les mêmes régions du cerveau<sup>321-323</sup>.

D'un point de vue mécanistique, le TGF- $\beta$ 1 agit à de multiples niveaux de régulation de l'expression et de l'activité de la iNOS avec, malgré tout, des disparités en fonction du type cellulaire étudié (cf. Figure I-29). Aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel, le TGF- $\beta$ 1 peut réduire l'activité du promoteur *NOS2* ainsi que la stabilité des transcrits *NOS2*. De cette façon, en absence de stimuli inducteurs, le TGF- $\beta$ 1 permet de réprimer l'expression de la iNOS malgré une activité basale du promoteur *NOS2*. Aux niveaux traductionnel et post-traductionnel, le TGF- $\beta$ 1 peut diminuer le taux de traduction des ARNm *NOS2* et la stabilité de la protéine iNOS. Le champ d'action du TGF- $\beta$ 1 a aussi été étendu à la régulation de l'activité enzymatique de la iNOS, après que la démonstration eût été faite qu'il induit l'activité arginase des macrophages (qui prive la iNOS de son substrat) et réprime la production de tétrahydrobioptérine dans les cellules<sup>324,302</sup>.



**Figure I-29 : Mécanismes de régulation de l'expression et de l'activité iNOS par le TGF-β1<sup>233</sup>.** Le TGF-β1 interagit avec son complexe récepteur à la surface de la membrane plasmique et déclenche une série d'évènements aboutissant à une réduction de la transcription du gène NOS2, de la stabilité des transcrits NOS2, de la traduction des ARNm NOS2 ainsi que de la stabilité de la protéine. Le TGF-β1 affecte également l'activité enzymatique de la iNOS en réduisant la synthèse de BH4 et en stimulant l'expression et l'activité de l'arginase. Dans certaines situations, les fortes concentrations en NO peuvent aussi stimuler la synthèse et la sécrétion de TGF-β1, ce qui résulte en une boucle de rétrocontrôle négatif.

Pour expliquer ces effets, les premières pistes mécanistiques envisagèrent que le TGF-β puisse altérer la liaison et/ou l'activité de facteurs de transcription impliqués dans l'induction transcriptionnelle de NOS2. Il a par exemple été démontré que le TGF-β1 est capable d'induire l'apoptose des lymphocytes B en inhibant l'activité de NF-κB, *via* l'induction transcriptionnelle de l'inhibiteur IκB (qui masque la séquence NLS de NF-κB)<sup>325</sup>. Dans les cellules macrophagiques RAW 264.7, le TGF-β1 inhibe l'activation par phosphorylation de STAT1 en réponse à l'IFN-γ<sup>326</sup>. De plus, il a été découvert dans cette même étude que le récepteur de l'IFN-γ (IFNGR1) se trouve associé au récepteur au TGF-β de type I (TβRI), et sa phosphorylation par ce dernier le rend inactif. Une autre étude effectuée dans les mêmes cellules RAW 264.7 a également permis de démontrer que le TGF-β1 provoque une hausse de la dégradation de la iNOS dépendante du protéasome, en améliorant l'activité Trypsine-like de ce dernier<sup>327</sup>.

Plus récemment, des travaux utilisant des macrophages BMDM (*Bone marrow-derived macrophages*) *knockout* pour SMAD2 et/ou SMAD3 ont montré le rôle essentiel de ces deux protéines dans l'effet répresseur exercé par le TGF- $\beta$ 1 sur la iNOS<sup>328</sup>. Dans les macrophages *Smad2*<sup>-/-</sup> ; *Smad3*<sup>-/-</sup>, l'effet répresseur du TGF- $\beta$ 1 sur l'activité du promoteur *NOS2* est perdu dans sa quasi intégralité. La phosphorylation de STAT1 est aussi plus forte et prolongée dans ces cellules, en raison d'une hausse secondaire de production d'IFN- $\beta$  et de phosphorylation d'IRF3 en réponse à l'activation de TLR3 ou TLR4 (respectivement par du poly(I:C) et par du LPS). Les auteurs rapportent également une induction de l'expression du complexe SPSB1 et de l'arginase par le TGF- $\beta$ 1 très amoindries dans les BMDM *Smad2*<sup>-/-</sup> ; *Smad3*<sup>-/-</sup>. Enfin, les voies de signalisation SMAD-indépendantes testées lors de cette étude (ERK, p38 et JNK) ne sont pas apparues significativement altérées par le double *knockout* de SMAD2/3.

Chez l'Homme, seule une étude de 2007 explore le mécanisme répresseur du TGF- $\beta$ 1 dans des cellules musculaires lisses de l'aorte, et rapporte une induction de l'expression du facteur de transcription TCF11 (famille de NF-E2) par le TGF- $\beta$ 1<sup>329</sup>. Le facteur nucléaire TCF11 forme un hétérodimère avec la protéine MafG, avec laquelle elle interagit au niveau d'un site de liaison spécifique dans le promoteur *NOS2* pour réprimer son activité (équivalent d'un site NF-E2-*like*, soit une combinaison de deux demi-sites T-mare et AP-1). La liaison de TCF11 au promoteur *NOS2* est apparue dépendante d'une activité PKC (induite avec le phorbol myristate acétate ou bloquée par la calphostine C).



## 2 Le suppresseur de tumeur p73 et ses homologues

La découverte, en 1979, de la protéine suppresseur de tumeurs p53, apporta un éclairage nouveau sur la biologie des cancers et constitua rapidement un axe majeur des recherches contre le cancer. La protéine p53 est un facteur de transcription principalement impliqué dans le maintien de l'intégrité génomique, capable d'induire l'apoptose cellulaire en réponse à divers stress cellulaires. Ses homologues p63 et p73, découverts à la fin des années 1990, exercent des fonctions supplémentaires dans le développement embryonnaire. L'existence de nombreuses isoformes des membres de la famille p53, qui forment un réseau complexe d'interactions aux fonctions variées, apporte une difficulté supplémentaire à la compréhension du puzzle que compose cette famille de protéines, dont l'histoire évolutive remonte aux organismes unicellulaires les plus primitifs.

### 2.1 La famille p53 : Origine, structures et fonctions

#### 2.1.1 Découverte d'un « Gardien du génome »

En 1979, plusieurs groupes publient des résultats décrivant la formation de complexes entre l'antigène T de SV40 et une protéine de 54 kDa, qui sera par la suite nommée p53<sup>330,331</sup>. L'antigène T ayant été identifié comme une oncoprotéine clé du virus SV40 dans les processus d'initiation et de maintien de la transformation cellulaire, cette interaction directe avec une protéine de l'hôte suscita beaucoup d'intérêt. En outre, la protéine p53 a été détectée comme un antigène tumoral qui élicite une réponse humorale lorsque des tumeurs sont produites chez la souris à partir de cellules transformées<sup>332</sup>. Durant les années 1980, des interactions entre p53 et d'autres oncoprotéines virales ont été rapportées (E1B de l'adénovirus et E6 du papillomavirus humain)<sup>333,334</sup>. Avec ces découvertes, il devint clair que les fonctions de p53 sont ciblées de façon stratégique par ces virus oncogéniques, et qu'elles sont intimement liées à la réplication virale et à la tumorigenèse.

Différents groupes se sont ensuite aperçus que des formes mutantes de p53 ont une activité transformante<sup>335,336</sup>. Suite à la description de mutations de *p53* dans des tumeurs murines et dans des cancers du côlon chez l'Homme, la classification de *p53* dans la catégorie des gènes suppresseurs de tumeurs s'est confirmée au cours des années suivantes grâce à aux

observations successives que (1) les patients héritant d'un allèle mutant de *TP53* sont atteints du syndrome de Li-Fraumeni, un syndrome de prédisposition génétique au développement de cancers multiples tout au long de leur vie<sup>337</sup>, (2) les souris porteuses de mutations perte de fonction de *Trp53* développent des tumeurs à un âge très précoce<sup>338</sup>, (3) jusqu'à 50% des cancers humains sont associés à des mutations des deux allèles du gène *TP53*<sup>339</sup>, et (4) des niveaux aberrants de la protéine p53 sont mesurés dans de nombreux types de tumeurs<sup>340</sup>.

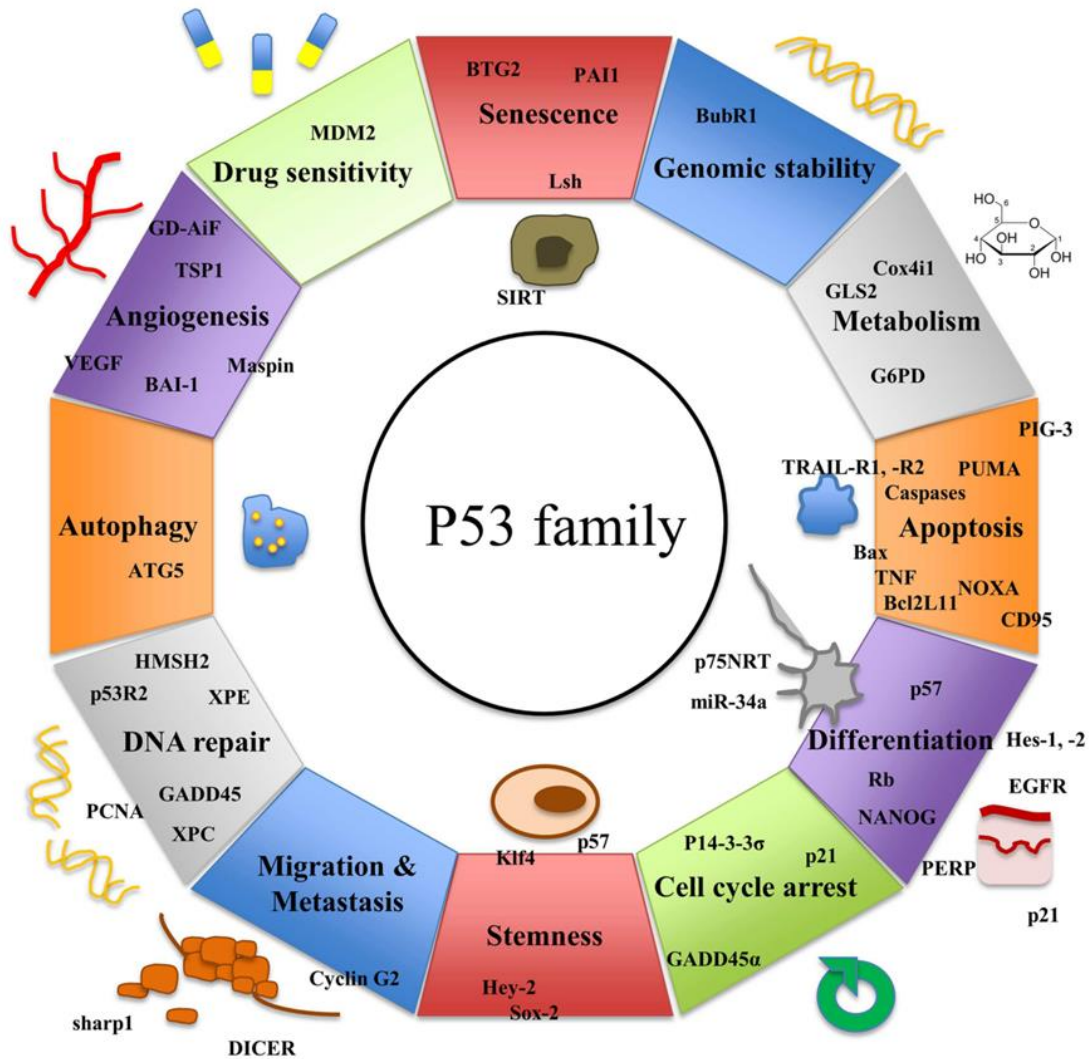


Figure I-30 : Aperçu de la variété de cibles induites par p53 ou par ses homologues p63 et p73 dans des processus tels que le maintien de l'intégrité génomique, le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire, l'angiogénèse et le métabolisme<sup>341</sup>.

Au fil des années et des découvertes, le facteur de transcription p53 s'est donc imposé comme un suppresseur de tumeur majeur lui ayant valu l'appellation de « gardien du génome » (cf. Figure I-30)<sup>342,343</sup>. En réponse à une grande variété de stress cellulaires, p53 assure le maintien de l'intégrité génomique en induisant un arrêt du cycle cellulaire et la réparation de

l'ADN, ou en dirigeant les cellules vers une mort par apoptose lorsqu'elles sont endommagées de manière irréversible. Il n'est ainsi guère surprenant de constater que des mutations responsables de l'inactivation de p53 représentent l'altération génétique la plus communément observée dans les tumeurs humaines<sup>344,345</sup>. La protéine p53 fut pendant longtemps considérée comme l'unique représentante de son genre jusqu'à l'identification, à la fin des années 1990, des protéines p63 et p73, qui présentent des structures modulaires comparables et un fort degré d'homologie<sup>346,347</sup>. Les protéines p63 et p73 partagent toutes deux des gènes cibles en commun avec p53 qui, bien que cela ne soit pas leur fonction première, font d'elles de puissants gènes suppresseurs de tumeur. Les gènes *p53*, *p63* et *p73* (*TP53/63/73* chez l'Homme ; *Trp53/63/73* chez la souris) codent pour une large diversité d'isoformes dont les fonctions cellulaires sont finement orchestrées par leur localisation tissu-spécifique, leur niveau d'expression et la régulation de leur activité.

### 2.1.2 Origine évolutive et fonctions ancestrales de *p53*

Les origines d'un gène *p53* ancestral sont clairement observables chez des descendants actuels des organismes les plus primitifs comme les choanoflagellés (des eucaryotes opisthocontes unicellulaires) et l'anémone de mer<sup>348,349</sup>. Dans ces organismes, le gène ancestral de *p53* est un gène hybride qui s'apparente en grande partie à une combinaison des gènes *p63* et *p73*. La fonction de ce gène ancestral chez l'anémone de mer est de protéger les cellules germinales de stress environnementaux, qui endommagent l'ADN et mettent en péril la transmission fidèle de l'information génétique aux gamètes et à la descendance. Cette fonction persiste chez les insectes, les vers, les mollusques et les vertébrés, y compris les humains.

L'histoire évolutionnaire de *p53* s'étale donc sur plus d'un milliard d'années. Chez les premiers vertébrés (poissons cartilagineux), ce gène ancestral subit une première duplication à la suite de laquelle un gène plus proche de *p53* fut produit<sup>350</sup>. Le gène *p53* acquit des fonctions somatiques : il jouait désormais le rôle de suppresseur de tumeurs dans des cellules souches et progénitrices, répondant ainsi aux besoins de régénération tissulaire des vertébrés. Plus tard au cours du développement des vertébrés (à l'apparition des poissons osseux), le gène ancestral subit une nouvelle étape de duplication, à l'issue de laquelle les gènes *p63* et *p73* apparurent. Leurs fonctions se sont par la suite élargies à des rôles de régulateurs transcriptionnels impliqués dans la formation d'organes d'origine ectodermique (*p63*) et dans la formation du système nerveux et du système immunitaire (*p73*). Depuis les premiers poissons osseux

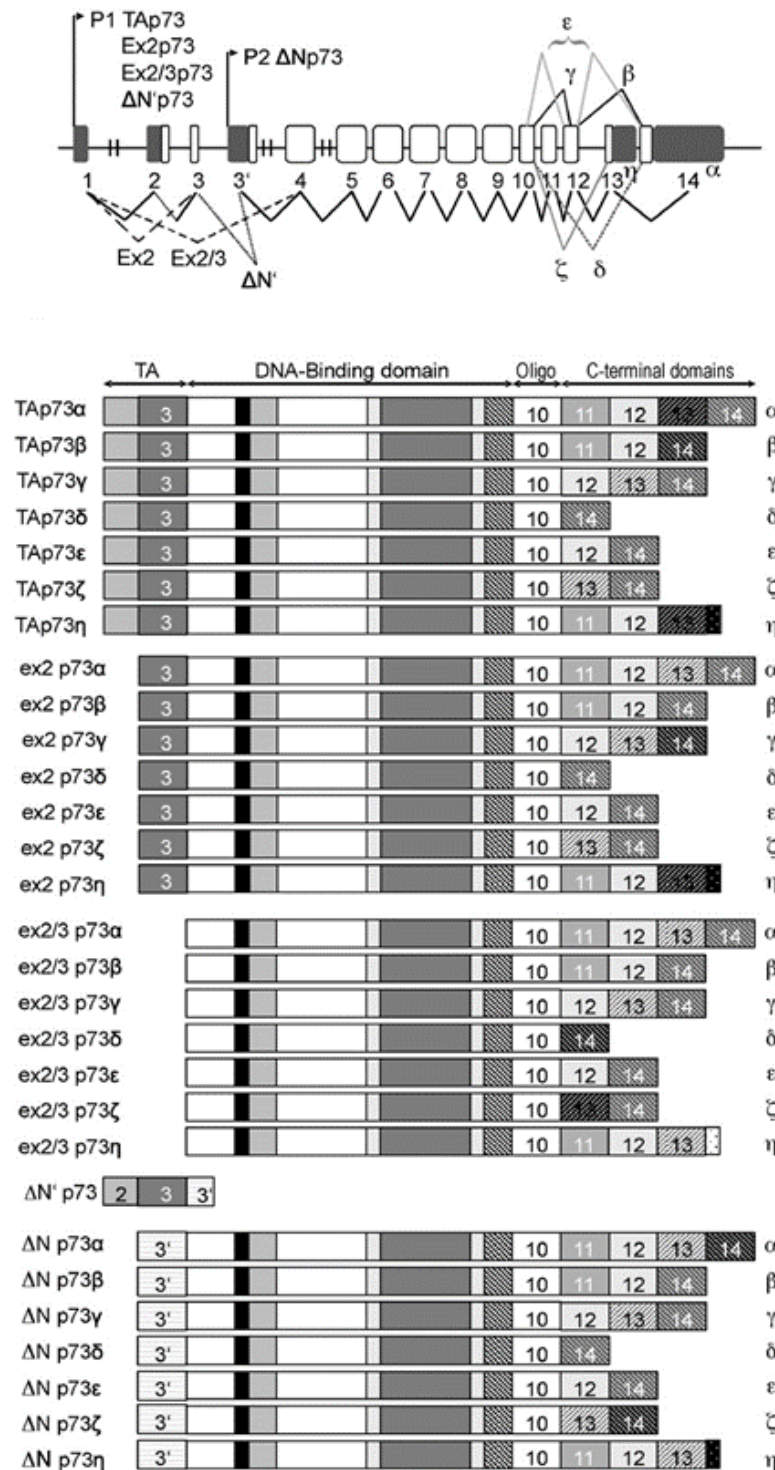
jusqu'aux mammifères, en passant par les amphibiens et les reptiles, la longueur des séquences introniques des gènes *p63* et *p73* a connu une augmentation spectaculaire, tandis que celle de *p53* a été conservée (comme en attestent les tailles respectives des gènes : *p53* = 19,2 kb ; *p63* = 265,8 kb ; *p73* = 80,7 kb). La forte pression de sélection exercée sur les gènes *p63* et *p73* explique qu'ils aient conservé leurs fonctions ancestrales de surveillance de l'intégrité génomique dans les lignées germinales et somatiques.

### 2.1.3 Structure et complexité moléculaire de la famille p53

Suite à leur découverte à la fin des années 1990, les rôles de *p63* et *p73* dans le développement sont rapidement élucidés grâce à une série de travaux sur des souris *knockout* pour ces gènes<sup>351-353</sup>. Au même moment, la complexité de leur expression génique se révèle et rend la compréhension des fonctions des membres de la famille p53 beaucoup plus difficile. Elle repose sur l'utilisation de promoteurs alternatifs et des mécanismes d'épissage qui génèrent un grand nombre d'isoformes fonctionnelles différentes<sup>354</sup>.

#### 2.1.3.1 Diversité des isoformes au sein de la famille p53

Une caractéristique commune à tous les membres de la famille p53 est qu'ils peuvent être exprimés sous la forme de multiples isoformes (cf. Figure I-31). Les isoformes TAp63/73 possèdent un domaine de transactivation N-terminal (TAD) et sont générées à partir du promoteur P1. Dans les gènes *p63* et *p73*, l'usage d'un promoteur interne (P2) situé dans l'intron 3 permet l'initiation de la transcription au niveau d'un second site produisant l'exon 3'. Ce promoteur est responsable de la génération d'une catégorie d'isoformes tronquées au niveau N-terminal, identifiées collectivement comme étant les isoformes  $\Delta Np63/73$ . Il est à noter que le promoteur P1 est également à l'origine d'isoformes tronquées  $\Delta Ex2$  et  $\Delta Ex2/3$  provenant de l'épissage des exons 2 et 3 du transcrite. Ces isoformes possèdent seulement une partie ( $\Delta Ex2$ ) ou pas de domaine TAD ( $\Delta Ex2/3$ ). En outre, le second exon du transcrite *p73* contient un motif reconnu par la protéine PTBP (*Polypyrimidine tract-binding protein*). Cette protéine est capable de se lier à des ARN et d'agir à la fois comme un inhibiteur de l'épissage et comme un activateur de la traduction. Dans le cas du transcrite de *p73*, PTBP active la traduction à partir d'une séquence IRES (*Internal ribosome entry site*), un élément structural ribonucléique qui permet l'initiation de la traduction de manière indépendante de la coiffe 5' des ARNm. De cette façon, sont également générées des isoformes  $\Delta Np73-like$  dépourvues du domaine transactivateur N-terminal<sup>355</sup>.



**Figure I-31 : Structure du gène et diversité des isoformes de p73<sup>356</sup>.** En haut de la figure est représentée la structure du gène p73, avec la localisation des promoteurs alternatifs (P1 et P2) et l'épissage alternatif qui génère des isoformes variant au niveau de leur extrémité C-terminale (α,β,γ,δ,ε,ζ,η). Les différentes catégories d'isoformes de p73 représentées en dessous (les chiffres indiquent les exons contenus dans les différentes isoformes) comprennent les isoformes TAp73 (codées à partir du promoteur P1) qui comportent le domaine de transactivation N-terminal, les isoformes ΔEx2 et ΔEx2/3 qui sont tronquées au niveau de ce même domaine, et les isoformes ΔNp73 codées à partir du promoteur P2 et qui en sont totalement dépourvues.

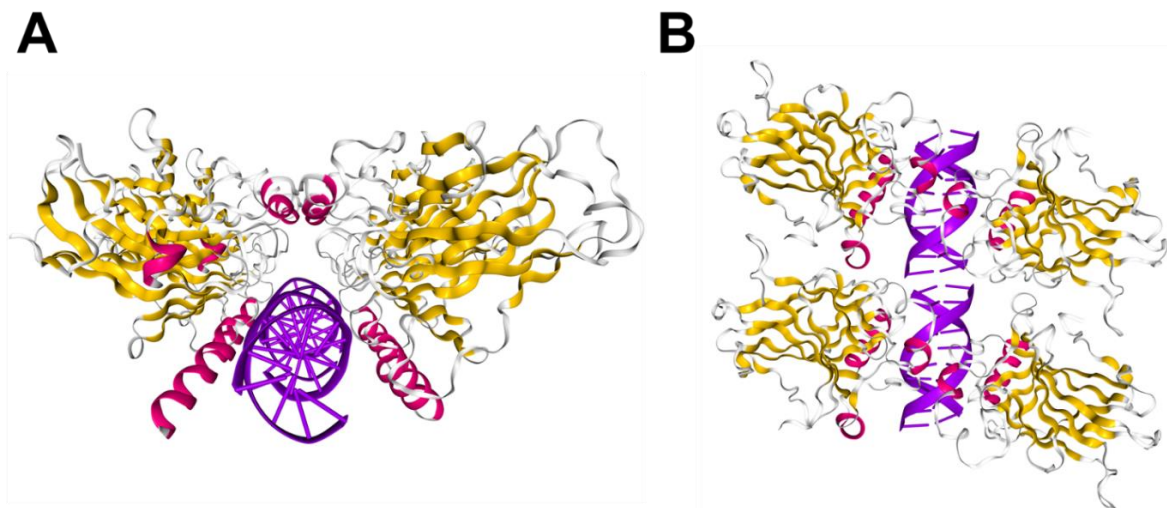
Une hétérogénéité supplémentaire est apportée par l'existence de variants d'épissage des exons codant l'extrémité C-terminale de p63 ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) et de p73 ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, \zeta, \eta, \varphi, \theta$ ). Elles diffèrent notamment dans leur potentiel d'activation transcriptionnelle. Par exemple, l'isoforme TAp73 $\alpha$ , qui correspond à la forme la plus longue de p73, induit moins fortement certains gènes cibles proapoptotiques que le variant  $\beta$ , ce qui suggère que cette extrémité peut jouer un rôle régulateur négatif. Les fonctions spécifiques de ces variants d'épissage sont peu étudiées et demeurent encore aujourd'hui très mal caractérisées.

### 2.1.3.2 Structure protéique de p73 et de ses homologues

La structure protéique des membres de la famille p53 peut être décomposée en plusieurs domaines fonctionnels : un domaine de transactivation N-terminal (TAD) suivi d'une séquence riche en prolines (PR), un domaine central de liaison à l'ADN (DBD) et un domaine d'oligomérisation C-terminal (OD) impliqué dans la formation de tétramères actifs. Les régions de haute homologie de séquence se trouvent dans le domaine de liaison à l'ADN : 60% d'identité de séquence entre p53 et p63 ; 63% entre p53 et p73 (homologie supérieure à 80% pour tous les membres). Les résidus qui interagissent directement avec l'ADN sont parfaitement conservés. En conséquence, p63 et p73 peuvent se lier à des éléments de réponse à p53 canoniques, et activer la transcription à partir de promoteurs répondant à p53, induisant ainsi un arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou la sénescence. En comparaison, les domaines d'oligomérisation sont beaucoup moins bien conservés. L'extrémité C-terminale des isoformes de type  $\alpha$  contient en supplément un motif *sterile alpha* (SAM) et un domaine terminal inhibiteur de transcription (TID) qui ne sont pas conservés dans la protéine p53<sup>357</sup>.

La protéine p73 conserve une organisation quaternaire très semblable à celle de p53 et p63 : c'est un dimère de dimères. Le domaine TAD de p73 est composé de deux sous-domaines distincts (TAD1 entre les résidus 1-31 et TAD2 entre les résidus 46-67) connectés par un *linker*. C'est le domaine le moins conservé de la famille (seulement 22% d'identité de séquence entre p53 et p63 ; 30% entre p53 et p73). Il est intrinsèquement désordonné, et sert de site de liaison à une variété de partenaires comme le coactivateur transcriptionnel p300. Lorsqu'il se lie à certaines protéines telles que MDM2 et Bcl-X<sub>L</sub>, le domaine TAD1 adopte une conformation en hélice  $\alpha$ . Le domaine TID des isoformes  $\alpha$  réduit leur activité transcriptionnelle en imposant une conformation fermée au travers de son interaction avec le TAD.

Les structures du domaine DBD de p73 à l'état libre ou lié à un élément de réponse à p53 complet (20 bp) ont été résolues en 2012 par cristallographie aux rayons X (cf. Figure I-32). Les DBD de p73 (et de ses homologues) forment des dimères puis des tétramères en présence d'ADN, mais restent sous forme monomérique en son absence. Le domaine DBD monomérique de p73 présente, comme pour p53 et p63, une structure de type immunoglobuline composée de deux feuillets  $\beta$  enchevêtrés. Deux larges boucles contenant les hélices H1 et  $3_{10}$  forment l'interface de dimérisation, et permettent un enlacement de l'ADN. Un motif composé de deux boucles (L1 et L3), d'un brin  $\beta$  (S10) et d'une hélice (H2) positionne cette interface pour permettre la reconnaissance d'un quartier de site de l'élément de réponse. Enfin, deux ions  $Zn^{2+}$  sont coordonnés, l'un au niveau de résidus de l'hélice H1 et de la boucle L3, et l'autre à l'interface du dimère formée par l'hélice H2 et l'extrémité C-terminale du domaine DBD.



**Figure I-32 :** Visualisation 3D d'un tétramère de domaines de liaison à l'ADN de p73 lié à un élément de réponse complet à p53, à l'aide de l'application web NGL Viewer. La structure a été résolue par cristallographie aux rayons X avec une résolution de 3,1 Å (Identifiant Protein Data Bank = 4G82)<sup>358</sup>. Représentation en rubans des structures secondaires (en rose les hélices  $\alpha$ , en jaune les feuillets  $\beta$ ) du tétramère avec une vue de face (A) et du dessus (B), en complexe avec un élément de réponse de 20 bp (en violet) dont la séquence des quartiers de sites est 5'-GAACA-3'.

La longueur de la séquence *spacer* entre les deux demi-sites de l'élément de réponse influence remarquablement la structure quaternaire de p73. Tandis que les structures du DBD de p73 lié à l'ADN avec une séquence *spacer* de 0 ou 1 nucléotide sont très compactes et présentent une large interface de tétramérisation, celles obtenues avec un *spacer* de 2 nucléotides ou plus ont une interface plus réduite et sont accompagnées d'un relâchement de l'ADN. Ces observations expliquent pourquoi l'activité transcriptionnelle de p73 est très largement affectée par une insertion de bases entre les deux demi-sites de l'élément de réponse

(elle s'effondre au-delà d'un nucléotide inséré), tandis que celle de p53 tolère jusqu'à 4 paires de bases de distance<sup>359</sup>.

### 2.1.3.3 La famille p53 forme un réseau d'interactions

L'importante homologie de séquence observée entre p53, p63 et p73 souleva initialement la possibilité que ces protéines pourraient s'oligomériser pour former des hétérotétramères dans un réseau complexe d'interactions. Cependant, p63 et p73 partagent seulement 38% d'identité de séquence avec le domaine d'oligomérisation de p53. Il en résulte que si p63 et p73 forment des hétérotétramères stables (elles partagent dans leur domaine d'oligomérisation une hélice  $\alpha$  supplémentaire) avec toutes les stœchiométries possibles, leur interaction avec p53 est encore l'objet d'incertitudes<sup>360</sup>. Bien que les formes WT et mutantes de p53 soient capables d'interagir avec p73 dans des systèmes de double hybride chez la levure, des expériences de cotransfection dans des lignées tumorales suggèrent que seule les formes mutantes de p53 acquièrent la possibilité d'interagir avec p63 et p73 pour inhiber leur activité transcriptionnelle<sup>361</sup>.

En contraste avec la majorité des gènes suppresseurs de tumeur dont l'expression est perdue au cours de la tumorigenèse, p53 demeure exprimée bien que fréquemment affectée par des mutations faux sens. Sept « hotspots » mutationnels (30% des mutations rapportées) ont été identifiés pour *TP53* et sont fortement corrélés à un mauvais pronostic pour les patients porteurs de ces mutations<sup>362-364</sup>. Certaines mutations de p53 exercent un effet dominant négatif de telle sorte qu'elles conduisent à une perte de la fonction suppresseur de tumeur de l'allèle p53-WT restant. De plus, certains mutants de p53 acquièrent un effet dominant négatif sur les membres apparentés que sont les protéines p63 et p73, ce qui conduit à une suppression complète de l'activité des protéines de la famille p53<sup>361,365</sup>. Plusieurs hypothèses ont été formulées pour essayer d'expliquer la capacité de ces formes mutantes à perturber le fonctionnement de p53. A ce jour, les travaux et les discussions se poursuivent afin de déterminer si cet effet passe (1) par une compétition de ces mutants ou isoformes qui privent la protéine WT de ses sites de liaison ou cofacteurs, (2) par la formation d'hétérotétramères inactifs constitués à la fois de protéines p53-WT et mutantes, ou (3) par un mécanisme de type prion par lequel une forme mutante de p53 serait capable de diriger la conversion de la forme WT de p53 vers une conformation alternative inactive<sup>366,367</sup>.



Les isoformes  $\Delta Np63/73$  sont dépourvues du domaine de transactivation N-terminal et perdent une grande partie de leur activité transcriptionnelle. Elles exercent un effet dominant négatif à la fois sur les isoformes TAp63/73 ainsi que sur p53. L'inhibition de p53 et de TAp63/73 par les isoformes  $\Delta N$  se fait par compétition pour la fixation aux mêmes sites de liaison à l'ADN (domaine DBD intact). Celle des isoformes TAp63/73 peut également se faire *via* la formation d'hétérotétramères inactifs<sup>368,369</sup>. Le résultat de toutes ces interactions dépend très largement des ratios d'expression entre les différentes catégories isoformes, et une altération dans leur équilibre peut fortement influencer le devenir de la cellule.

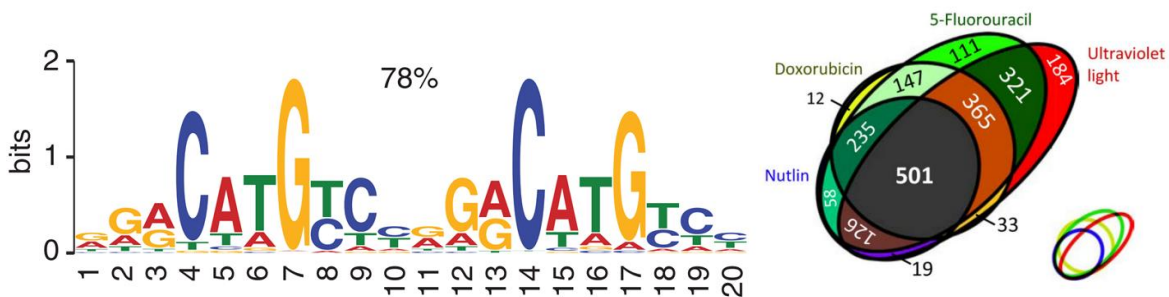
Dernièrement, une analyse FASAY (*Functional analysis of separated alleles in yeast*) a été employée pour évaluer et investiguer les mécanismes de dominance négative des 7 mutants « hotspots » de p53 et des 24 isoformes principales de p53, p63 et p73<sup>370</sup>. Elle montre que seuls les protéines p53 mutantes et les isoformes qui sont inactives mais toujours capables de former des tétramères peuvent affecter l'activité transcriptionnelle de p53-WT. La perte d'activité transcriptionnelle (ex : isoformes p53 $\beta$  et p53 $\gamma$ ) ne permet pas nécessairement à ces isoformes d'exercer un effet dominant négatif. La présence d'un domaine de tétramérisation intact, comme c'est le cas pour  $\Delta 133$ -p53 $\alpha$  et  $\Delta 160$ -p53 $\alpha$ , semble en effet obligatoire. Cette étude privilégie donc l'hypothèse d'un effet dominant négatif de ces isoformes qui repose sur la formation de tétramères inactifs d'un point de vue transcriptionnel. L'effet dominant négatif ne se limite pas à p53 et affecte également des isoformes de p63 et p73. L'extrémité C-terminale des isoformes  $\Delta N$  joue un rôle modulateur important dans leur capacité transactivatrice. Les isoformes  $\Delta Np73\gamma$  sont par exemple actives sur un plus grand nombre d'éléments de réponse que les isoformes  $\Delta Np73\alpha$  et  $\Delta Np73\beta$ . Dans ce système, seules les isoformes  $\Delta Np73\alpha$  et  $\Delta Np73\beta$  exercent un effet dominant négatif sur p53, p63 et p73.

Les isoformes  $\Delta Np63$  et  $\Delta Np73$  sont la plupart du temps désignées comme des régulateurs dominants négatifs équivalents à des mutants perte de fonction. Dans de multiples types cellulaires et sur de nombreux promoteurs de gènes cibles de p53, les isoformes  $\Delta N$  exercent un effet répresseur qui suggère une perte d'activité transactivatrice et un effet dominant négatif. Toutefois, plusieurs études rapportent une activité transactivatrice exclusive aux isoformes  $\Delta N$ <sup>371-374</sup>. L'isoforme  $\Delta Np73\beta$  possède par exemple une activité de transactivation dépendante de la présence des 13 résidus codés par l'exon 3' et du motif riche en prolines PXXP localisé au niveau N-terminal<sup>372</sup>. Cette isoforme est capable d'induire un arrêt de prolifération cellulaire et l'apoptose dans des cellules tumorales H1299. De leur côté,

Tanaka et ses collaborateurs ont mis en évidence la capacité pour les isoformes  $\Delta Np73\alpha$  d'induire l'expression de gènes cibles de NF- $\kappa B$  dans un contexte déficient pour  $p53^{375}$ . Cette fonction dépend de la présence du motif PXXP mais nécessite également l'extrémité C-terminale de  $\Delta Np73$  (les variants  $\Delta Np73\beta$  sont incapables d'exercer cette fonction).

### 2.1.4 Régulation génique par p53 et ses homologues

La liste des signaux de stress qui provoquent une accumulation de p53 est longue, et compte par exemple les stress génotoxiques (dommages à l'ADN, déplétion en dNTPs, érosion des télomères, etc.), l'hypoxie, la privation en nutriments ou facteurs de croissance, le stress lié à la biogenèse mitochondriale, la biogenèse ribosomale, les poisons du fuseau mitotique, les chocs thermiques, les stress du réticulum endoplasmique (anomalies de repliement tridimensionnel des protéines) et l'activation d'oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs.



**Figure I-33 : Élément de réponse à p53 et détermination d'un programme transcriptionnel<sup>376,377</sup>.** Un site consensus de liaison à p53 a pu être identifié en analysant par ChIP-sequencing les séquences de 500 sites communs à plusieurs traitements activant p53. L'élément de réponse à p53 complet est constitué de deux demi-sites du type 5'-PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy-3'. Le diagramme de Venn à droite indique la distribution des sites de liaison de p53 en réponse à différents traitements génotoxiques (la doxorubicine est un agent intercalant de l'ADN ; le 5-fluorouracile est un analogue de la pyrimidine ; les rayonnements ultraviolets) ou induisant directement l'accumulation de p53 (la nutline-3a est un inhibiteur de MDM2). Si un grand nombre de sites de liaison de p53 sont occupés en réponse à tous les traitements (environ 500), beaucoup d'autres le sont exclusivement en réponse à un ou plusieurs traitements seulement. Ceci suggère que p53 est capable de mettre en place un programme transcriptionnel adapté à des stress cellulaires particuliers.

Les premières expériences visant à définir le site de liaison de p53 démontrèrent que les gènes activés par p53 contiennent deux séquences consensus consécutives de 10 bp du type 5'-PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy-3' (Pu = Purine ; Py = Pyrimidine)<sup>378,379</sup>. Chaque demi-site est formé de répétitions inversées de 5 bp appelées quartiers de sites. Plus récemment, des études

génomiques utilisant principalement le *ChIP-sequencing* ont permis de cartographier des milliers de sites de liaison à p53 qui ne sont d'ailleurs pas nécessairement suffisant pour permettre une transactivation<sup>376,377,380-383</sup>.

L'activation de la transcription par des tétramères de p53, p63 ou p73 requiert la liaison de deux dimères de domaines DBD à un élément de réponse comportant le site complet de 20 bp. Chaque dimère de p73 se fixe sur un demi-site, et chaque monomère se lie à un quartier de site. Les études structurales sur les complexes entre les tétramères de domaines DBD de la famille p53 et leur élément de réponse ont établi que l'arrangement spatial de ces complexes suit la symétrie déterminée par la séquence ADN<sup>358</sup>. Comme le site complet de l'élément de réponse est une répétition de deux demi-sites, les deux dimères du tétramère sont positionnés à une distance de 34 Å l'un de l'autre, c'est-à-dire l'équivalent d'une séquence de 10 nucléotides. Et puisque chaque quartier de site est la répétition inversée du second quartier de site du même demi-site, les deux monomères de chaque dimère sont orientés avec une rotation à 180° de l'un par rapport à l'autre. Une étude publiée en 2015 a adressé la question de l'influence de chaque nucléotide du quartier de site sur l'affinité du domaine DBD de p73 à l'élément de réponse<sup>384</sup>. Elle permet de démontrer que la conservation d'une séquence 5'-CNNG-3' au centre de chaque demi-site est la caractéristique la plus déterminante pour permettre leur reconnaissance par les membres de la famille p53. Les études ayant localisé les éléments de réponse à p63 et p73 ont montré que leurs sites de liaison correspondent aux mêmes séquences consensus que pour p53. Il est toutefois apparu que les trois premières positions de chaque quartier de site tolèrent une certaine variabilité dans le ratio purine/pyrimidine, dont la fréquence préférentielle varie selon l'homologue de p53 et pourrait jouer un rôle régulateur dans la transactivation. A ce jour, les diverses études structurales n'ont pas encore permis d'expliquer l'existence de profils transcriptionnels spécifiques de chaque homologue au sein de la famille p53.

La modification des histones est nécessaire pour ouvrir la chromatine et permettre la liaison de la machinerie transcriptionnelle. L'histone acétyltransférase p300/CBP, recrutée par p53, acétyle les histones et p53 elle-même au voisinage de ses éléments de réponse<sup>385,386</sup>. Une fois la chromatine remodelée, les composants du complexe d'initiation de la transcription peuvent être recrutés, et les gènes cibles de p53 sont transcrits. Une des questions les plus intrigantes au sujet de la famille p53 est de savoir comment ces protéines parviennent à sélectionner un programme transcriptionnel en réponse à des stress cellulaires si variés, en discriminant parmi une myriade de promoteurs ceux qui vont être régulés (cf. Figure I-33). Au

moins trois types de mécanismes permettent à la protéine p53 et à ses homologues de façonner un programme transcriptionnel adapté à une situation de stress cellulaire particulière : (1) l'existence d'un nombre considérable de modifications post-traductionnelles de p53 qui modulent son activité, (2) la variabilité des éléments de réponse à p53, et (3) les interactions de p53 avec différents partenaires en fonction du contexte cellulaire.

La protéine p53 tolère une certaine variabilité dans la séquence des éléments de réponse reconnus, mais cette variabilité a un impact prononcé sur l'affinité de p53. Dans une étude réalisée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les différences de transactivation entre les sites les plus faibles et les sites les plus forts atteignent un facteur 1000<sup>387</sup>. Dans l'ensemble, les gènes cibles de p53 intervenant dans le cycle cellulaire comportent des sites plus robustes que ceux des gènes intervenant dans la mort cellulaire programmée<sup>388</sup>. Cette affinité différentielle permet à la concentration nucléaire de p53 de devenir un facteur déterminant dans la sélectivité des gènes activés et le destin de la cellule, en fonction du type de stress génotoxique auquel elle est soumise. Enfin, de multiples partenaires de liaison de p53 ou de ses homologues influencent leur capacité de liaison à l'ADN ou de recrutement de coactivateurs transcriptionnels. L'interaction sélective de p53 avec un partenaire plutôt qu'un autre dépend de son statut en termes de modifications post-traductionnelles. L'exemple le plus connu de cofacteurs de p53 lui conférant une sélectivité de promoteurs est la famille de protéines ASPP (*Apoptosis-stimulating protein of p53*), qui prédisposent la cellule à un phénotype apoptotique, en induisant la transactivation de *bax* mais pas celle de *p21*<sup>389</sup>.

Le haut degré d'homologie partagé entre les domaines de liaison à l'ADN des membres de la famille p53 explique la capacité commune de p63 et p73 à réguler de nombreux gènes cibles de p53 (ex : *p21*, *Puma*, *Noxa*, *Bax* et *Mdm2*). Le répertoire complet des gènes régulés de façon commune ou exclusive reste encore à déterminer<sup>390</sup>. Au début des années 2000, le travail de plusieurs groupes de recherche conduit à définir le rôle des isoformes TAp63 et TAp73 dans la réponse à l'endommagement de l'ADN et la chimio-sensibilité des cellules cancéreuses. Leur contribution à la suppression des tumeurs ne sera établie que plus tard, après la génération de souris sélectivement déficientes pour les isoformes TAp63 ou TAp73<sup>391,392</sup>. Le répertoire des fonctions, des voies de signalisation et des gènes régulés par p53, p63 et p73 s'est progressivement élargi bien au-delà de la suppression tumorale et du développement. Les membres de la famille p53 ont pu être impliqués dans les processus de réparation, de recombinaison et de fidélité génomique mais aussi dans le métabolisme, la reproduction et la

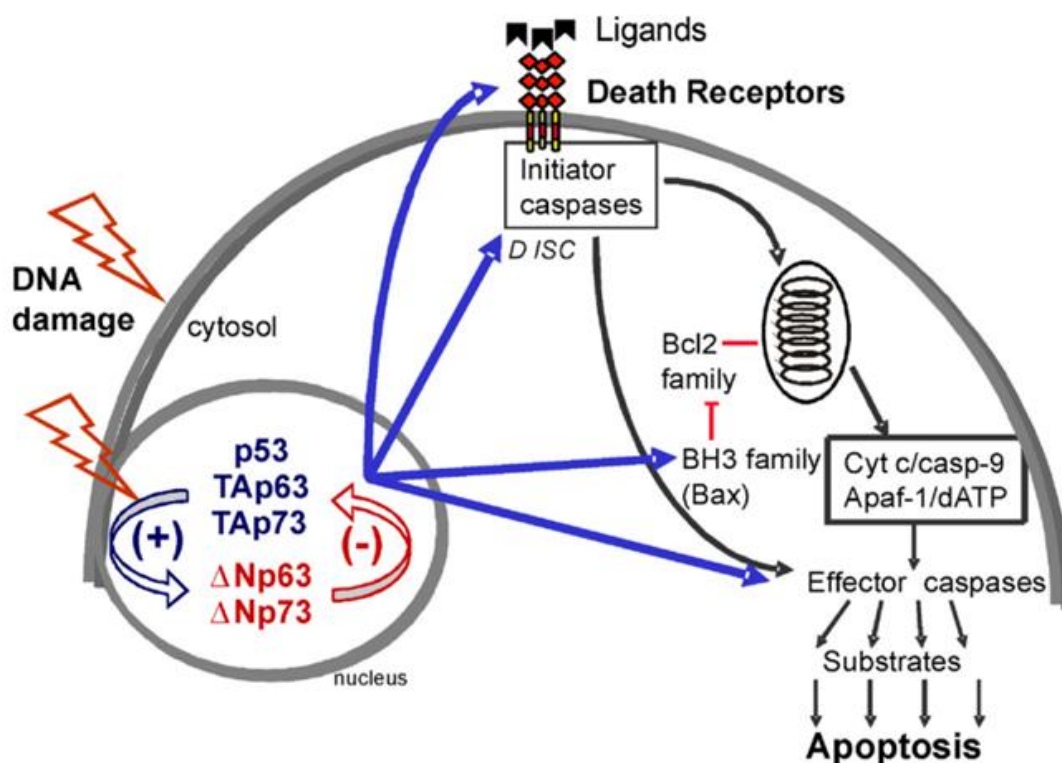
biologie des cellules souches. La compréhension incomplète des fonctions de cet ensemble de protéines, que ce soit au niveau de leur redondance fonctionnelle ou de leur hiérarchisation opérationnelle, limite actuellement le transfert rapide des connaissances acquises vers la gestion clinique des patients atteints de cancer.

### 2.1.5 *p73* est-il réellement un gène suppresseur de tumeur ?

Le rôle suppresseur de tumeur de *p73* fut initialement contesté par deux observations. Premièrement, seul un très faible pourcentage de tumeurs humaines (inférieur à 1%) porte des mutations du gène *TP73*<sup>393</sup>. Ensuite, le phénotype des souris *Trp73*<sup>-/-</sup> (mutation du domaine DBD qui affecte toutes les isoformes de *p73*) ne suggère pas une implication de *p73* dans le cancer. Les souris *Trp73*<sup>-/-</sup> meurent fréquemment *in utero* ou dès la naissance. Celles qui survivent meurent pour la plupart à l'âge de 4 à 6 semaines, et présentent de lourds défauts neurologiques (hydrocéphalie, dysgénésie de l'hippocampe), comportementaux, de reproduction (perte de détection des phéromones), ainsi que des affections inflammatoires. Ces observations ont prévalu sur les résultats d'études *in vitro* qui soutenaient par exemple une transformation oncogénique potentialisée des MEFs (*Mouse embryonic fibroblasts*) *Trp53*<sup>-/-</sup>; *TAp73*<sup>-/-</sup> ou démontraient la capacité pour les isoformes TAp73 de déclencher l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence ou l'apoptose en réponse à un endommagement de l'ADN, en promouvant la transcription de nombreux gènes cibles de *p53* (cf. Figure I-34)<sup>394,395</sup>.

Les premiers travaux ayant établi le rôle des isoformes TAp73 comme des protéines faisant partie, avec *p53* et les isoformes TAp63, d'un réseau intégré de suppresseurs de tumeurs, ont concerné des souris porteuses d'une mutation hétérozygote pour *p53* et *p73*, et des souris sélectivement déficientes pour les isoformes TAp73. En comparaison avec les souris (*Trp73*<sup>+/+</sup>; *Trp53*<sup>+/+</sup>), les souris (*Trp73*<sup>+/+</sup>; *Trp53*<sup>+/+</sup>) développent des tumeurs dont le phénotype est significativement plus agressif<sup>396</sup>. En 2008, la caractérisation du phénotype des souris *TAp73*<sup>-/-</sup> fut décisive dans la démonstration de la fonction suppresseur de tumeurs de ces isoformes<sup>392</sup>. Ces souris présentent des prédispositions à la tumorigenèse spontanée (avec une forte incidence d'adénocarcinomes pulmonaires) et à la tumorigenèse induite par un oncogène. Ces animaux sont infertiles mais, à la différence des souris *Trp73*<sup>-/-</sup>, ce ne sont pas des défauts sensoriels et hormonaux contribuant à un comportement reproducteur défaillant qui en sont la cause, car ces animaux s'accouplent normalement. L'année suivante, une étude présentée par la même équipe montra que les isoformes TAp73 participent à l'assemblage correct des fuseaux mitotique et

méiotique requis pour assurer un alignement chromosomique approprié dans les cellules en division. Les isoformes TAp73 peuvent se lier et réguler l'activité des sérine/thréonine kinases Bub1 et BubR1 (*Budding uninhibited by benzimidazoles 1/R1*), des composants essentiels du point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique qui assurent la fidélité du processus de ségrégation des chromosomes<sup>397</sup>. Ces résultats, auxquels s'ajoutent des observations précédentes impliquant les isoformes TAp73 dans le contrôle du cycle cellulaire et la prévention des aneuploïdies, attribuent clairement un rôle de ces protéines dans le maintien de l'intégrité génomique dans de multiples tissus<sup>398,399</sup>.



**Figure I-34 : Modèle de régulation de l'apoptose par les membres de la famille p53<sup>356</sup>.** Suite à un endommagement de l'ADN, p53 et les isoformes TAp63/73 peuvent activer à la fois la voie des récepteurs à domaine de mort et la voie mitochondriale de l'apoptose. Les isoformes ΔNp63/73 exercent un effet dominant négatif sur les isoformes transcriptionnellement actives de la famille et se comportent donc comme des inhibiteurs de ces deux voies de déclenchement de l'apoptose.

Les femelles *TAp73*<sup>-/-</sup> présentent un déficit d'ovulation, et des anomalies dans l'organisation du fuseau des ovocytes apparaissent très fréquemment, ce qui aboutit à un échec de l'implantation de l'embryon. De façon intéressante, le vieillissement naturel abolit l'expression des isoformes TAp73 dans les ovocytes, suggérant que la perte d'expression de

ces isoformes pourrait être impliquée dans l'échec du développement normal à partir des ovocytes âgés<sup>392</sup>. S'agissant de l'infertilité des souris mâles *TAp73<sup>-/-</sup>*, elle est la conséquence de la perte massive et prématurée de cellules germinales, elle-même causée par une rupture des contacts cellule-cellule entre les cellules germinales en développement et leurs cellules nourricières, les cellules de Sertoli, ce qui entraîne un arrêt de la spermiogenèse<sup>400,401</sup>.

Ces travaux démontrent la fonction suppresseur de tumeurs des isoformes TAp73. Ils suggèrent également une implication des isoformes  $\Delta$ Np73 dans l'oncogenèse et l'importance d'un équilibre approprié entre les isoformes TAp73 et  $\Delta$ Np73 pour permettre le maintien de l'intégrité génomique des cellules en cours de prolifération. Tandis que les isoformes TA sont généralement considérées comme des suppresseurs de tumeur, leurs *alter egos*  $\Delta$ N se comportent comme des facteurs oncogéniques dans de nombreuses situations<sup>402,403</sup>. Le modèle qui est aujourd'hui le plus accrédité repose sur un déséquilibre entre les isoformes TA et  $\Delta$ N qui mènerait à la tumorigenèse en empêchant les isoformes transcriptionnellement actives d'exercer leurs fonctions de suppresseurs de tumeurs. Le rôle oncogénique des isoformes  $\Delta$ Np73 est supporté par un grand nombre d'études faites *in vitro* et *in vivo*. Par exemple, la surexpression de  $\Delta$ Np73 dans des fibroblastes augmente leur capacité proliférative<sup>404</sup>. Elle facilite aussi leur transformation grâce à une coopération avec les oncogènes Ras, c-Myc et E1A, et elle augmente leur tumorigénicité<sup>395,405</sup>. A l'opposé, les MEFs et thymocytes  *$\Delta$ Np73<sup>-/-</sup>* présentent une sensibilité accrue à divers agents génotoxiques (rayonnements  $\gamma$ , étoposide, doxorubicine ou cisplatine), suggérant que ces cellules entrent plus facilement en apoptose suite à un endommagement de l'ADN<sup>406</sup>. Enfin, les souris transgéniques exprimant  $\Delta$ Np73 au niveau hépatique développent spontanément des adénomes et carcinomes hépatocellulaires<sup>407</sup>. Différents mécanismes contribuent au potentiel oncogénique de  $\Delta$ Np73. Les isoformes  $\Delta$ Np73 forment des homotétramères ou des hétérotétramères avec les autres membres de la famille p53, et exercent un effet dominant négatif sur p53, TAp63 et TAp73, en entrant en compétition avec eux pour la liaison aux mêmes éléments de réponse dans le promoteur de gènes cibles<sup>408,409</sup>. De plus, les isoformes  $\Delta$ Np73 promeuvent l'hyperphosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb) par les complexes Cycline E-CDK2 et Cycline D-CDK4/6. De cette façon, le facteur de transcription E2F échappe à sa séquestration par Rb, ce qui aboutit à la progression du cycle cellulaire<sup>410</sup>.

Le ratio d'expression TAp73/ $\Delta$ Np73 est, de façon remarquable, profondément altéré dans de nombreuses tumeurs<sup>411,412</sup>. La surexpression des isoformes  $\Delta$ Np73 ou  $\Delta$ Ex2p73 et

$\Delta Ex2/3p73$  a pu être observée dans des tumeurs du sein et des ovaires, dans des cancers de la prostate et des mélanomes, des neuroblastomes et des carcinomes hépatocellulaires<sup>409,413-418</sup>. Elle confère un avantage prolifératif et augmente le potentiel tumorigénique des cellules cancéreuses, en plus d'être associée à un mauvais pronostic et à une réduction de l'efficacité des chimiothérapies<sup>414,417,419,420</sup>. Dans la plupart des cas, cette surexpression est associée à un mauvais pronostic avec un échec des thérapies, une chimiorésistance, la formation de métastases et une invasion vasculaire<sup>403</sup>. Les niveaux d'expression des isoformes TAp73 et  $\Delta Np73$  semblent ainsi pouvoir prédire l'efficacité des chimiothérapies.

La récente découverte de fonctions métaboliques des membres de la famille p53 a aussi des implications en cancérologie<sup>421,422</sup>. Les cellules cancéreuses reprogramment le métabolisme cellulaire afin de satisfaire leurs besoins croissants en énergie et en macromolécules, et pour assurer le maintien de leur homéostasie redox. Le programme métabolique de ces cellules est marqué par une augmentation de l'absorption de glucose et de glutamine pour soutenir la croissance cellulaire. La plupart du glucose importé par les cellules est métabolisé lors de la glycolyse ou sert à alimenter la voie d'oxydation des pentoses phosphates, tandis que la glutamine sert à la fois de source d'azote pour la biosynthèse de nucléotides et de divers acides aminés non essentiels et de source importante de carbone pour le réapprovisionnement en intermédiaires du cycle de Krebs. TAp73, mais pas p53 ni p63, induit spécifiquement la transcription de la G6PD (*Glucose-6-phosphate dehydrogenase*), l'enzyme limitante dans la voie des pentoses phosphates. Cette voie métabolique permet la production de NADPH (biosynthèse des acides gras et du cholestérol et réduction du glutathion), de ribose-5-phosphate (synthèse des nucléotides) et d'érythrose-4-phosphate (précurseur des acides aminés aromatiques). De façon intéressante, les isoformes  $\Delta Np73$  et les formes mutées de p53 n'inhibent pas l'activation de la G6PD par TAp73, ce qui suggère que ce mécanisme pourrait rester opérant dans les cellules tumorales<sup>423</sup>.

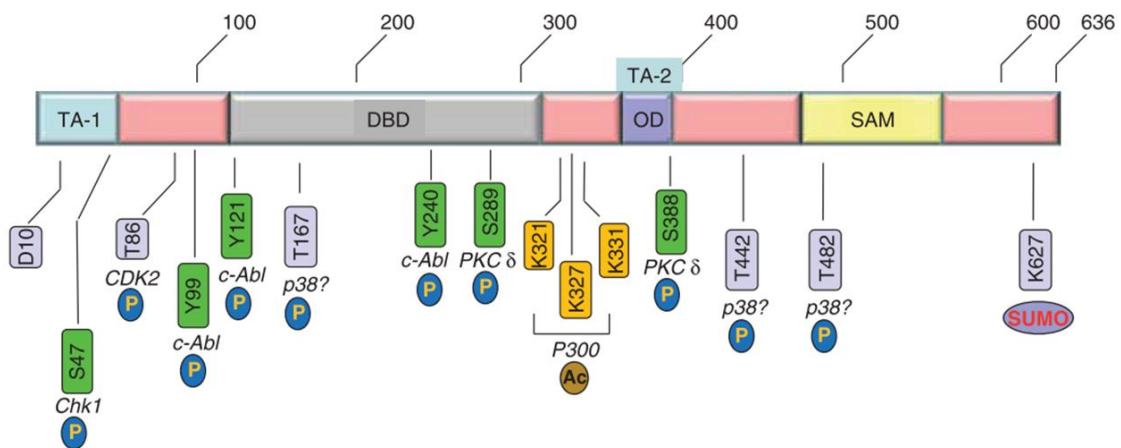
## 2.2 Contrôle de l'activité et de l'expression de p73

### 2.2.1 Régulation des fonctions de p73

Les protéines de la famille p53 sont régulées spatialement et temporellement par un très grand nombre de modifications post-traductionnelles et d'interactions protéine-protéine qui régulent leur niveau d'expression et leur activité.



L'activité de p53 dépend surtout de mécanismes post-traductionnels qui stabilisent la protéine et augmentent son activité transcriptionnelle. Le principal mécanisme contrôlant l'abondance et l'activité de p53 implique l'E3 ubiquitine ligase à domaine RING finger appelée MDM2 (*Mouse double minute 2*). Elle exerce son effet inhibiteur en se liant directement à p53, ce qui inhibe à la fois son activité transcriptionnelle et provoque sa dégradation par le protéasome<sup>424,425</sup>. MDM2 fait partie des cibles induites par p53, et cette boucle régulatrice constitue un oscillateur cellulaire qui régule les niveaux de p53 et de MDM2 en réponse à une série de stress cellulaires. L'accumulation de p53 en réponse à un endommagement de l'ADN a lieu suite à sa phosphorylation, qui la rend résistante à sa dégradation induite par MDM2 et permet son interaction avec des coactivateurs transcriptionnels. D'autre part, p53 fut la première protéine n'appartenant pas à la famille des histones à avoir été identifiée comme substrat des histone acétyltransférases (HATs)<sup>386</sup>.



**Figure I-35 : Principales modifications post-traductionnelles de p73<sup>426</sup>.** Représentation schématique de la localisation des modifications post-traductionnelles jouant un rôle clé dans le contrôle de l'activité de p73 (P = phosphorylation ; Ac = acétylation ; SUMO = sumoylation). Sont également indiqués le résidu ciblé par la modification et la protéine qui en est responsable.

La phosphorylation de p73 par des kinases et son acétylation par des HATs est également essentielle dans la régulation de son activité et de sa stabilité. Ces modifications post-traductionnelles ont des conséquences importantes sur le répertoire d'interactions protéine-protéine de p73, et certaines altèrent sa localisation subcellulaire. Mais contrairement à p53, l'activation de p73 a d'abord lieu au niveau transcriptionnel. Dans la voie de réponse aux dommages à l'ADN, le facteur de transcription E2F1 est acétylé par PCAF (*p300/CBP-associated factor*), et phosphorylé par les kinases des points de contrôle du cycle cellulaire Chk1/2 (*Checkpoint kinases 1/2*). Ces événements contribuent à sa stabilisation, et E2F1 se fixe

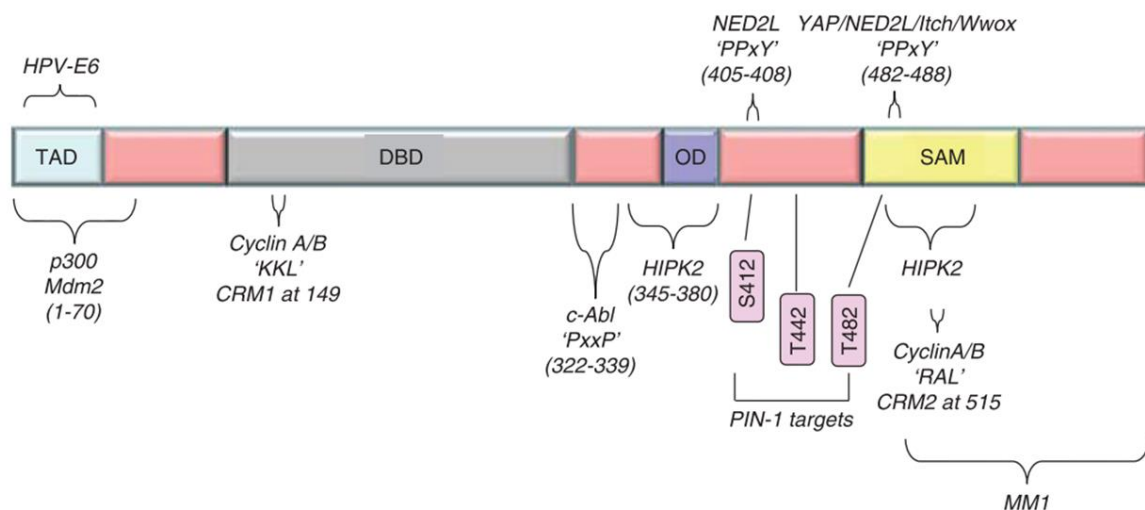
alors au promoteur P1 de *p73* pour induire l'expression des isoformes TAp73<sup>427-429</sup>. Par ailleurs, de multiples kinases de la voie de réponse aux dommages à l'ADN interviennent lors de la stabilisation et de l'accumulation des isoformes TAp73 suite à un traitement chimiothérapeutique, comme les sérine/thréonine kinases ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) et ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3-related*) qui sont recrutées au niveau des sites endommagés et interviennent en amont de Chk1/2, ainsi que de la MAPK JNK<sup>427,430</sup>.

A la différence de p53, un évènement initial de phosphorylation de p73 médié par la tyrosine kinase c-Abl est nécessaire pour permettre son accumulation<sup>431-434</sup>. Cette première phosphorylation fait office de prérequis à une série d'autres modifications régulant l'état d'activation de p73 (cf. Figure I-35). La MAPK p38 est aussi activée par c-Abl lors d'un endommagement de l'ADN, elle contribue à stabiliser la protéine p73 par phosphorylation<sup>435</sup>. La prolyl isomérase PIN1 reconnaît des résidus sérine et thréonine phosphorylés par p38 et joue le rôle d'adaptateur dans l'interaction de p73 avec p300. L'acétylation de résidus lysine de p73 par p300 ne se produit qu'en réponse à un endommagement de l'ADN (ex : traitement avec de la doxorubicine)<sup>436</sup>. La phosphorylation de p73 se produit par ailleurs également au cours du cycle cellulaire. Les kinases dépendantes des cyclines CDK2/CDK1 phosphorylent p73 durant les phases G2 et M en interagissant avec les cyclines A et B, ce qui entrave l'activité transcriptionnelle de p73 et garantit la progression du cycle cellulaire<sup>437</sup>. Par contraste, la PKC $\delta$  phosphoryle et augmente l'activité du second domaine transactivateur de p73 (acides aminés 381-399), qui est uniquement impliqué dans la progression du cycle cellulaire<sup>438</sup>. De façon remarquable, la PKC $\delta$  est clivée par la caspase-3 au cours de l'apoptose, et le fragment généré acquiert la capacité de phosphoryler p73 spécifiquement sur son résidu Ser289, ce qui augmente son activité proapoptotique<sup>439</sup>.

Par l'intermédiaire de son extrémité N-terminale, les isoformes TAp73 interagissent avec le domaine CH1 de deux coactivateurs transcriptionnels, p300 et CBP, qui augmentent leur activité transcriptionnelle. La protéine MDM2, qui est la principale E3 ubiquitine ligase contrôlant la stabilité de p53, entre en compétition avec p300/CBP pour la fixation à p73 au niveau de la même région protéique (cf. Figure I-36)<sup>440</sup>. De façon intéressante, l'interaction de MDM2 avec l'extrémité N-terminale de p73 n'affecte pas sa stabilité, mais elle est un prérequis à sa neddylation (conjugaison de polypeptides NEDD8 selon un mécanisme proche de l'ubiquitination), qui retient les isoformes TAp73 dans le cytosol et les rend inactives<sup>441-444</sup>. Il faut aussi remarquer que tout comme p53, p73 peut induire l'expression de MDM2 et ainsi

exercer un rétrocontrôle négatif sur sa propre activité.

La première E3 ubiquitine ligase ciblant p73 à avoir été identifiée est Itch. Elle possède un domaine HECT et appartient à la famille de NEDD4 (*Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4*). En se liant à p73 au niveau de son motif riche en prolines (PPPY), elle déclenche sa polyubiquitination et son adressage au protéasome<sup>445</sup>. Le coactivateur transcriptionnel YAP1 (*Yes-associated protein 1*), qui est un intervenant clé dans la voie de signalisation Hippo, entre en compétition avec Itch pour la fixation au même motif riche en prolines de p73, ce qui stabilise cette dernière<sup>446</sup>. Des travaux plus récents indiquent également que l'activité MDM2 est requise pour permettre la dégradation de p73 dépendante de Itch dans des MEFs<sup>447</sup>. De manière intéressante, l'enzyme NQO1, qui est induite suite à l'activation de Nrf2, se lie à p73 et empêche sa dégradation par le protéasome 20S<sup>448</sup>. Un autre exemple de contrôle compétitif de l'activité de p73 implique son interaction avec c-Myc, qui est un puissant inhibiteur de son activité transactivatrice et un compétiteur de MM1 (*Myc modulator 1*) pour la fixation à p73<sup>449</sup>. La protéine YAP1 est aussi un coactivateur transcriptionnel de p73 bien caractérisé, qui est dépourvu de domaine de liaison à l'ADN mais comporte un domaine WW transactivateur<sup>450</sup>. La kinase Akt contrôle strictement l'activité de YAP1 en la phosphorylant, ce qui la relocalise dans le cytosol où elle est inactive<sup>451</sup>.



**Figure I-36 : Sites d'interaction des protéines modulant la stabilité et/ou l'activité de p73<sup>426</sup>.** Les résidus essentiels dans ces interactions sont indiqués dans les apostrophes, et la localisation des domaines est indiquée entre parenthèses.

## 2.2.2 Expression différentielle des isoformes de p73

Il y a relativement peu de connaissances concernant les mécanismes responsables du différentiel d'expression entre les isoformes TA et  $\Delta N$  dans les différents tissus et les différentes conditions physiopathologiques. La transcription des isoformes TAp73 à partir du promoteur P1 est principalement contrôlée par le facteur de transcription E2F1, mais aussi par certains autres facteurs comme ZEB (*Zinc finger E-box-binding homeobox*) et YY1 (*Yin Yang 1*)<sup>452-455</sup>. La régulation du promoteur interne P2 est loin d'être clarifiée, mais plusieurs travaux indiquent de façon très intéressante que p53 et TAp73 peuvent induire spécifiquement l'expression de leurs propres antagonistes que sont les isoformes  $\Delta Np73$  en se liant à un élément de réponse à p53 situé dans ce promoteur<sup>368,456-458</sup>. La protéine p53 et les isoformes TAp73 peuvent ainsi activer directement la transcription des isoformes  $\Delta Np73$ <sup>459,460</sup>.

L'éventail d'interactions fonctionnelles entre ces régulateurs et les différentes isoformes de la famille p53 n'est pas entièrement caractérisé. Cependant, il est établi que certains facteurs régulent de façon différentielle les niveaux protéiques des isoformes TAp73 et  $\Delta Np73$ , notamment lors d'un stress génotoxique. Ainsi, l'E3 ubiquitine ligase à domaine RING-H2 nommée PIR2 (*p73-induced ring finger protein 2*), qui est induite par p53, entraînent la dégradation préférentielle des isoformes  $\Delta Np73$ , ce qui permet aux isoformes TAp73 d'accomplir le programme apoptotique en réponse à des dommages à l'ADN<sup>461</sup>. La kinase JNK stabilise quant à elle spécifiquement les isoformes TAp73 par une phosphorylation directe et par l'activation du facteur de transcription c-Jun, qui induit l'expression de YAP1<sup>462,430,463</sup>.

## 2.3 Fonctions exclusives de p63 et p73 dans le développement

De façon très frappante, et bien que les protéines de la famille p53 partagent de nombreuses similarités de séquences, de structures et de fonctions, les conséquences de leur invalidation génétique *in vivo* sont très différentes. En effet, p63 et p73 exercent toutes deux des fonctions qui leur sont exclusives et qui se manifestent dans le phénotype des souris *knockout*. Par exemple, si l'importance capitale de la protéine p73 a dernièrement été illustrée dans la régulation du processus d'angiogenèse<sup>464-467</sup>, ses fonctions exclusives dans le développement furent, comme pour p63, les premières à avoir été mises en évidence.

### 2.3.1 p63 dans le développement des épithéliums et des tissus d'origine ectodermique

Le rôle essentiel de p63 dans le développement de la peau et des épithéliums est désormais bien caractérisé. Les souris *Trp63<sup>-/-</sup>* sont atteintes de sévères malformations des membres et d'anomalies dans le développement des épithéliums (en particulier l'épithélium cutané), elles ne survivent pas plus de quelques heures après la naissance<sup>351,352</sup>. Les principales fonctions de p63 concernent le maintien du potentiel prolifératif des cellules progénitrices de l'épiderme<sup>468</sup>. En effet, le réservoir de cellules prolifératives de la peau des souris *Trp63<sup>-/-</sup>* subit une déplétion progressive, ce qui se traduit par une hypoplasie sévère du tissu dermique néonatal. Ces souris activent également un programme de sénescence cellulaire qui provoque un vieillissement accéléré<sup>469</sup>. Plus précisément, ce sont les isoformes TAp63 qui préviennent le vieillissement prématuré des tissus, en maintenant le *pool* de précurseurs dermiques et épidermiques<sup>470</sup>. Elles permettent aussi la mise en place d'une stratification de l'épiderme<sup>471</sup>. Quant aux isoformes  $\Delta$ Np63, elles sont requises pour engager les progéniteurs kératinocytes en voie de différenciation et assurer les stades terminaux de la morphogenèse<sup>472</sup>. Plusieurs études ayant fait appel à des souris sélectivement déficientes pour les isoformes TAp63 ou  $\Delta$ Np63 suggèrent que les isoformes  $\Delta$ Np63 sont importantes pour le maintien du potentiel prolifératif des cellules de la couche basale, tandis que les isoformes TAp63 contribuent à des stades plus tardifs de la différenciation dans les kératinocytes matures<sup>473,474</sup>. Dans la liste des gènes cibles de p63 déjà validés expérimentalement, se trouvent des gènes impliqués dans l'apoptose (ex : *Fas*, *Noxa*, *Bax*), le cycle cellulaire (ex : *p21*, *p57*, *14-3-3 $\sigma$* ), l'adhésion (ex : *Bpag1*, *Evl*, *Perp*, *Ita3-6*, *Laminin*), le développement (ex : *Notch*, *Bmp7*,  *$\beta$ -catenin*) et la différenciation (*Ikka*, *Gata-3*, *Ets-1*).

Des mutations germinales de *TP63* existent chez les humains et causent le développement de maladies rares autosomiques dominantes, comme le syndrome EEC (ectrodactylie, dysplasie ectodermique, fente labio-palatine), le syndrome de Hay-Wells ou encore le syndrome de Rapp-Hodgkin<sup>475</sup>. Ces syndromes affectent le développement des différents organes d'origine ectodermique ou dérivant de l'interaction entre l'ectoderme en cours de développement et le mésoderme. Ils se caractérisent cliniquement par des dysplasies ectodermiques touchant la peau, la chevelure, les ongles, et les dents, et s'accompagnent fréquemment de malformations des mains ou des pieds, et de la présence d'une fente labio-palatine. Les patients atteints du syndrome EEC sont en outre affectés par un dimorphisme facial, des anomalies des canaux

lacrymaux, des problèmes urogénitaux et un retard de développement<sup>476</sup>. Collectivement, la prévalence de ces dysplasies ectodermiques est estimée à 7 cas pour 10000 naissances. Dans la plupart de ces cas, les mutations de *TP63* donnent lieu à des substitutions d'acides aminés dans le domaine DBD de p63 qui abolissent sa capacité de liaison à l'ADN, ou bien conduisent à des décalages de la phase ouverte de lecture qui tronquent les isoformes de type  $\alpha$ . Enfin, des mutations faux sens affectent spécifiquement le domaine SAM de p63 (domaine compact d'interaction protéine-protéine à structure globulaire) chez les patients atteints du syndrome de Hay-Wells.

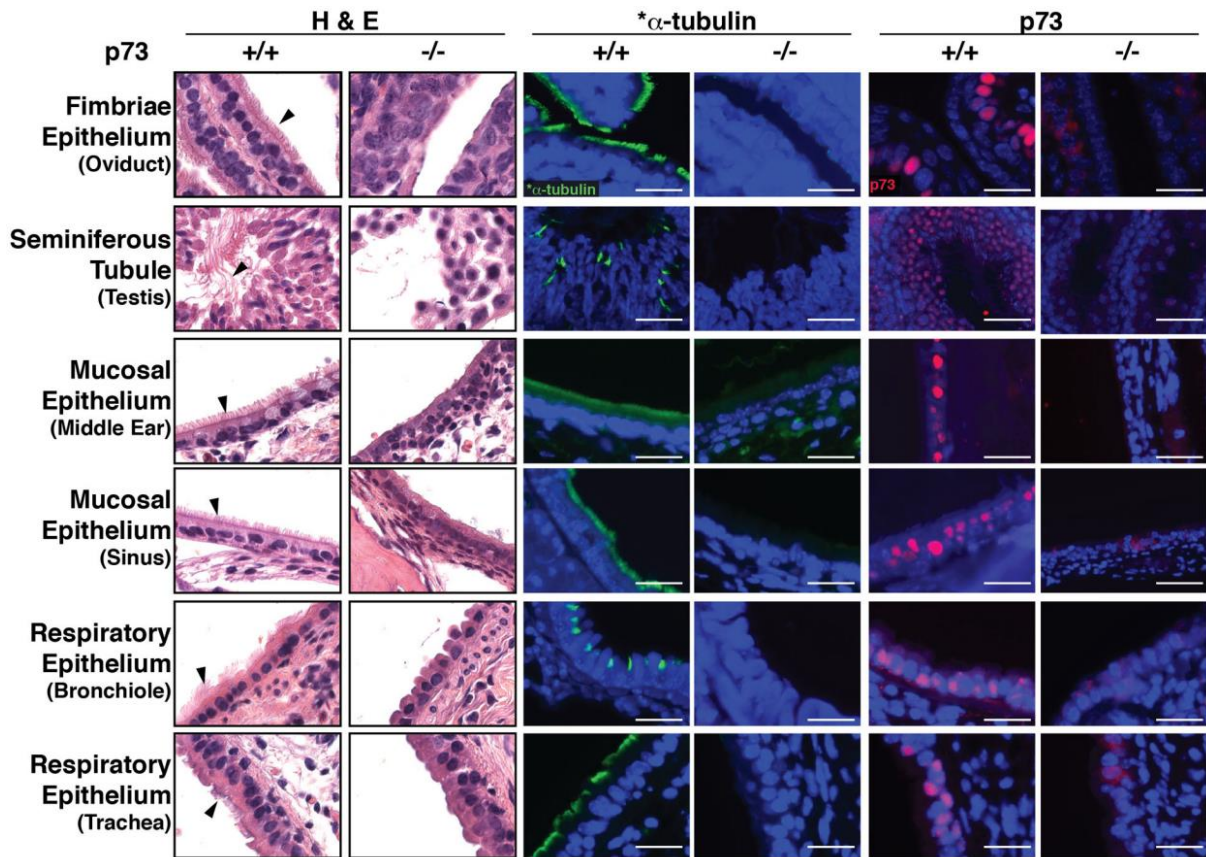
### 2.3.2 *p73* dans le développement et la maintenance du système nerveux central

De leur côté, les souris knockout pour *p73* présentent de sévères anomalies du développement cérébral. A la naissance, les souris *Trp73<sup>-/-</sup>* présentent une dysgénésie de l'hippocampe causée par une perte massive des neurones sympathiques situés dans le ganglion cervical supérieur (environ 40% par apoptose)<sup>477</sup>. Cette dysgénésie se caractérise par une organisation anormale de la couche de cellules pyramidales et du gyrus denté. Bien qu'affichant un retard de croissance important, ces souris sont viables mais meurent pour la plupart à l'âge de 4 semaines environ, et seul le quart d'entre elles atteignent l'âge adulte. Elles développent alors une hydrocéphalie congénitale, liée à une surproduction ou à un défaut de réabsorption du liquide cérébro-spinal, qui peut progresser de façon marquée et provoquer une expansion importante des ventricules latéraux, une compression du cortex et des saignements intraventriculaires. Des défauts de perception des phéromones provoquent aussi chez elles des anomalies du comportement social et reproducteur<sup>353</sup>. Les défauts neuronaux se manifestant chez les souris *Trp73<sup>-/-</sup>* révèlent le rôle déterminant de p73 dans les cellules neuronales en développement ainsi que dans le système nerveux mature pour le maintien à long terme des neurones adultes.

L'effet pro-survie de p73 au cours du développement du système nerveux a pu être attribué à l'expression prédominante des isoformes  $\Delta Np73$  antiapoptotiques dans le cerveau en développement et les ganglions sympathiques, où ils font office de facteurs de survie<sup>477</sup>. Ainsi, en réponse à une privation en NGF (*Nerve growth factor*) des cellules du ganglion cervical sympathique, les niveaux d'expression des isoformes  $\Delta Np73$  déclinent de façon spectaculaire, ce qui permet aux neurones d'entrer en apoptose<sup>478</sup>. L'implication de p73 dans la survie

neuronale a aussi été décrite chez des souris adultes, dont les neurones acquièrent des mécanismes de survie se basant sur une augmentation du ratio d'expression entre les isoformes  $\Delta Np73$  et  $p53$ <sup>479</sup>. Ceci explique la perte massive de neurones corticaux du système nerveux sympathique observée chez les souris  $Trp73^{-/-}$  adultes, qui se traduit par un amaigrissement des hémisphères corticaux et un élargissement des ventricules<sup>480</sup>. Par analogie, la densité neuronale dans le cortex moteur des souris  $\Delta Np73^{-/-}$  est significativement réduite environ 10 mois après leur naissance, et progresse avec des signes de neurodégénérescence<sup>481</sup>. La forte réduction du nombre de neurones voméro-nasaux explique également l'incapacité de ces souris à détecter les phéromones. Bien que les souris  $TAp73^{-/-}$  présentent des défauts neurologiques moins sévères (épaisseur du cortex normale), elles sont aussi atteintes d'anomalies du développement cérébral. Un déficit de neurogenèse dans la zone subgranulaire du gyrus denté, une structure majeure de l'hippocampe, est à l'origine de la dysgénésie de l'hippocampe observée chez ces souris. Ce phénotype suggère que les isoformes TAp73 sont critiques dans le maintien du potentiel prolifératif des cellules souches neurales et la persistance mémorielle<sup>482,483</sup>. Enfin, la protéine p73 ne régule pas simplement la mort cellulaire mais elle participe aussi activement à la différenciation neuronale *via* les isoformes TAp73, vraisemblablement en antagonisant la signalisation juxtacrine du récepteur Notch<sup>484,485</sup>.

Dernièrement, après avoir remarqué les ressemblances frappantes entre le phénotype des souris  $Foxj1^{-/-}$  (le principal gène régulateur de la ciliogenèse) et celui des souris  $Trp73^{-/-}$ , deux groupes de recherche ont examiné l'implication éventuelle de p73 dans la multiciliogenèse<sup>486</sup>. En effet, les cils cellulaires sont des organelles spécialisées présentes à la surface de nombreux épithéliums, et des anomalies de ces structures conduisent au développement de ciliopathies se caractérisant notamment par une hydrocéphalie sévère, des affections respiratoires, des otites et une infertilité<sup>487</sup>. Leurs travaux désignent p73, et plus particulièrement les isoformes TAp73, comme un facteur de transcription central dans la multiciliogenèse. Ils fournissent une explication unificatrice à la variété de défauts observés chez les souris  $Trp73^{-/-}$ . Chez les souris  $Trp73^{-/-}$  et  $TAp73^{-/-}$ , sont ainsi observées une raréfaction très significative du nombre de cils et une réduction importante de leur taille dans de nombreux tissus : épithéliums mucociliaires (oreille moyenne et sinus), épithéliums respiratoires (trachée et bronchioles), tubes séminifères (testicules), épithélium de l'oviducte (trompes de Fallope) (cf. Figure I-37)<sup>488</sup>. Grâce à l'utilisation d'une technique de séquençage à haut débit (*RNA-Sequencing*), un ensemble de 50 gènes requis dans la formation et la motilité des cils se sont révélés être affectés par l'absence d'expression de p73 (dont le facteur de transcription Foxj1)<sup>489</sup>.



**Figure I-37 : p73 est un régulateur central de la multiciliogenèse<sup>488</sup>.** L'analyse histologique de différents épithéliums des souris *Trp73<sup>-/-</sup>*, effectuée après un marquage avec l'hématoxyline et l'éosine (H & E, les flèches indiquent la présence de cils), et des marquages immunofluorescents de l' $\alpha$ -tubuline (en vert) et de p73 (en rouge), révèle une disparition complète des cellules multiciliées et fournit par la même occasion une explication unificatrice au phénotype de ces souris (inflammation des muqueuses, infections respiratoires chroniques, hydrocéphalie, stérilité, etc.).

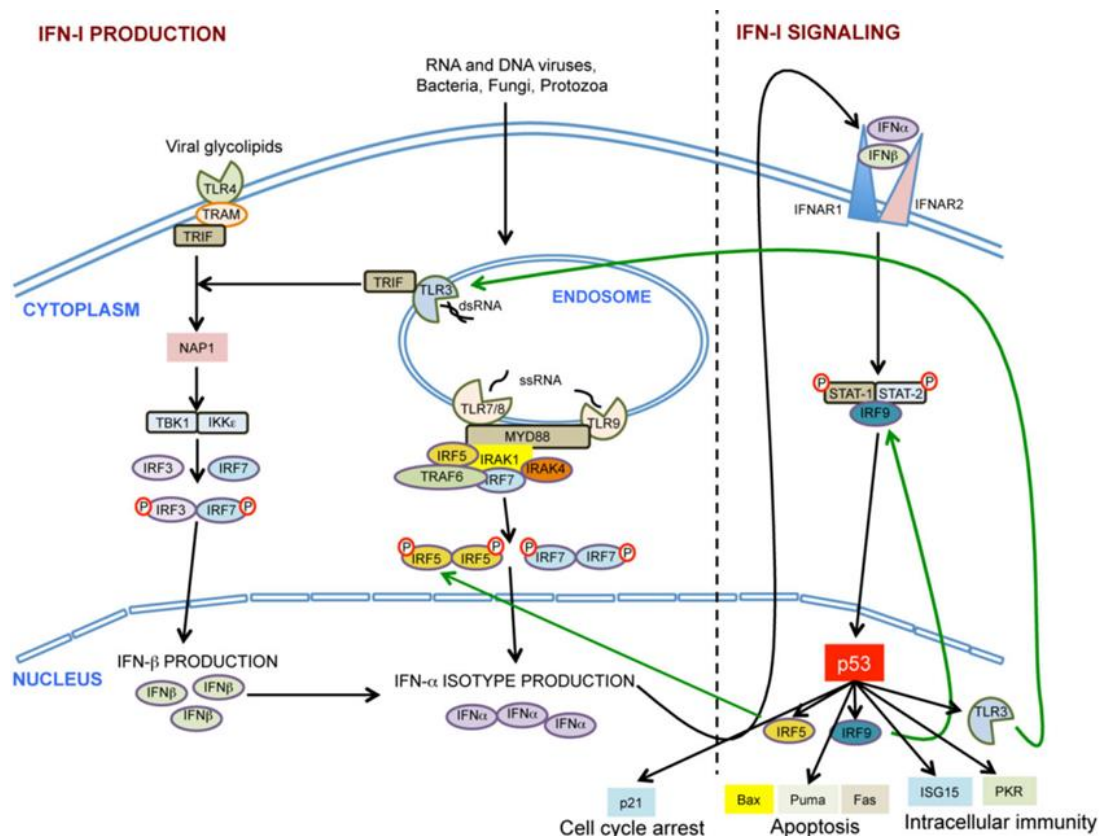
## 2.4 Rôles émergents de p53 et p73 dans l'immunité

L'importance capitale de *p53* comme gène suppresseur de tumeur a conduit des chercheurs du monde entier à investiguer ses fonctions et modes d'action aux niveaux moléculaire, cellulaire et de l'organisme, en se focalisant essentiellement sur les voies de contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose et de réponse aux dommages à l'ADN. Depuis quelques années cependant, il apparait un nombre grandissant de preuves d'une implication de *p53* dans les fonctions immunes. La protéine *p53* prévient notamment les réactions inflammatoires incontrôlées et est nécessaire au maintien des mécanismes de tolérance immunitaire au soi, de telle sorte que sous bien des aspects elle pourrait aussi bientôt être considérée comme un « gardien de l'intégrité immune »<sup>490</sup>.



### 2.4.1 p53 dans l'immunité antivirale et la réponse aux IFNs de type I

La libération locale d'interférons (IFNs), une classe de cytokines servant de signaux intercellulaires, est l'une des principales stratégies de défense mise en place par le système immunitaire de l'hôte lors d'une infection virale. Les IFNs induits par les virus sont produits de façon prédominante par des cellules de la lignée monocyttaire, et sont détectés par les cellules épithéliales qui expriment à la membrane des récepteurs aux IFN- $\alpha/\beta$ . L'engagement de ces récepteurs active la voie de signalisation JAK-STAT qui aboutit à l'induction de nombreux gènes comportant des éléments de réponse ISRE (*IFN-stimulated response element*). Les gènes stimulés par les IFNs (ISGs) servent de médiateurs dans la réponse immune, et sont par exemple capables d'élaborer une réponse antivirale en bloquant l'infection virale, en inhibant la réplication et en dégradant le génome viral.



**Figure I-38 : Rôles de p53 dans l'immunité antivirale**<sup>490</sup>. La protéine p53 est activée en réponse aux IFNs de type I en raison de la présence d'éléments de réponse ISRE localisés dans la séquence promotrice du gène p53. En plus de promouvoir l'expression de gènes responsables de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose, plusieurs gènes dirigeant la production d'IFNs ou contrôlant leur voie de signalisation sont aussi directement activés par p53 (ex : IRF5, IRF9, TLR3, ISG15). Une boucle de rétrocontrôle positif est donc mise en place entre p53 et la voie de signalisation des IFNs de type I, avec de fortes implications dans les réponses immunes (en particulier contre les infections virales).

L'intégration de la signalisation par les IFN $\alpha/\beta$  dans les réponses antitumorales et antivirales médiées par p53 fut démontrée pour la première fois en 2003 avec la mise en évidence d'un *cross-talk* entre ces deux voies de signalisation : p53 est transcriptionnellement induite par les IFNs de type I en cas de stress oncogénique et lors d'une infection virale<sup>491</sup>. Le promoteur du gène *TP53* contient un élément ISRE fonctionnel, et *TP53* peut par conséquent être considéré comme un ISG<sup>491,492</sup>. De plus, la découverte que p53 puisse induire l'expression d'autres ISGs et ainsi amplifier la réponse intracellulaire aux IFNs fournit une perspective nouvelle à ses fonctions dans le système immunitaire : initialement considérée comme un effecteur situé en aval et permettant d'initier une réponse antiproliférative lors d'une infection virale, p53 se révélait être un médiateur central dans la réponse immune innée globale (cf. Figure I-38).

Les ISGs ne contenant pas de site consensus de liaison à p53, leur induction se fait nécessairement de façon indirecte. Le groupe de Munoz-Fontela a identifié IRF9 (*IFN regulatory factor 9*) comme étant une des cibles directes de p53<sup>493</sup>. IRF9 fait partie du complexe ISGF3, qui induit l'expression de gènes comportant des éléments ISRE. Il pourrait s'agir du lien mécanistique reliant p53 à l'induction d'ISGs. De même, plusieurs autres inducteurs de l'expression d'ISGs stimulés par les IFNs ont pu être identifiés comme des gènes cibles de p53, dont IRF5 (*Interferon regulatory factor 5*) et TLR3 (*Toll-like receptor 3*)<sup>494,495</sup>. Ces derniers induisent la production de plusieurs cytokines et chimiokines comme les IFN $\alpha/\beta$ , CCL2/MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein-1*), CSF1 (*Colony stimulating factor 1*) et l'IL-15, qui assurent la migration et le recrutement de cellules dendritiques et de monocytes activés<sup>496</sup>. Pour échapper à l'immunité antivirale de l'hôte et rendre ses cellules plus permissives à l'infection, de nombreux virus ont acquis au cours de l'évolution des mécanismes d'abrogation de l'activité de p53 (ex : SV40, papillomavirus, herpèsvirus du sarcome de Kaposi, adenovirus, poliovirus, etc....)<sup>497,498</sup>.

## 2.4.2 Contrôle des réponses inflammatoires par p53

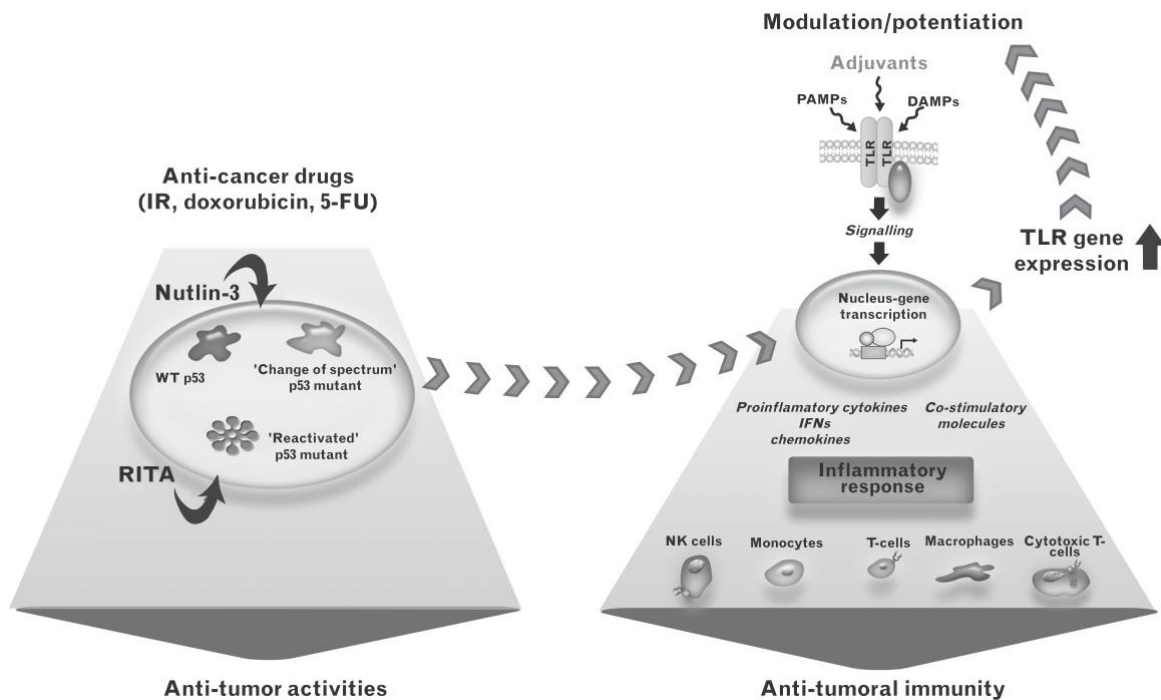
Différentes cibles de p53 ont été identifiées au sein des voies impliquées dans la détection de pathogènes, la production de cytokines et l'inflammation<sup>499</sup>. Si p53 est une molécule centrale dans la réponse aux signaux de stress intrinsèques, NF- $\kappa$ B est un composant central dans la réponse aux signaux de stress extrinsèques (infections, cytokines, etc.), qui active des gènes des

réponses immunes innée et adaptative. Un certain nombre d'études faites *in vitro* indiquent une compétition entre ces deux protéines : p53 se révèle être un suppresseur du potentiel transactivateur de NF- $\kappa$ B<sup>500</sup>. Dans des cellules LNCaP (carcinome de la prostate humain), l'utilisation d'un dominant négatif de p53 pour réprimer la protéine p53 permet d'augmenter l'induction d'une grande proportion de gènes (environ 50%) induits en réponse au TNF- $\alpha$ . NF- $\kappa$ B étant l'un des principaux effecteurs de la signalisation dépendante du TNF- $\alpha$ , ces résultats suggèrent en effet que p53 pourrait inhiber l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B de façon généralisée. Cette hypothèse est confortée par des expériences démontrant que p53 WT, mais pas la forme mutante inactive de p53 (R175H), réprime l'activité de promoteurs comportant des sites de liaison à NF- $\kappa$ B.

En 2005, une étude chercha à déterminer si ce phénomène se produit également *in vivo*, ce qui devrait se répercuter au niveau de l'induction de la réponse inflammatoire<sup>501</sup>. En comparant la réponse de souris WT et *Trp53*<sup>-/-</sup> à un traitement avec du LPS, elle permit de mettre en évidence une plus forte induction de nombreuses cytokines proinflammatoires, chimiokines et récepteurs de chimiokines dans le thymus des souris *Trp53*<sup>-/-</sup> (dont l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-12, le TNF- $\alpha$ , CCR2 et CCR5). L'exacerbation de la réponse inflammatoire chez les souris déficientes en p53 est à l'origine d'une hypersensibilité au choc septique induit par le LPS, qui se traduit par un endommagement accéléré des tissus et une plus forte mortalité. Enfin, l'injection intrapéritonéale de LPS ou de thioglycolate entraîne un recrutement plus important de macrophages et une clairance retardée des neutrophiles chez les souris *Trp53*<sup>-/-</sup>.

L'antagonisme entre p53 et NF- $\kappa$ B se manifeste aussi dans le contrôle du métabolisme. L'amplification des réponses immunes est un processus qui repose sur une sélection et une expansion clonale de certains types cellulaires produisant de grandes quantités de cytokines. Comme NF- $\kappa$ B conduit ces processus cellulaires qui impliquent la réplication, il peut se comporter comme un oncogène en cas de surexpression. En effet, la division des lymphocytes B et T et la réponse inflammatoire utilisent, tout comme les cellules cancéreuses ou le processus de cicatrisation, des voies métaboliques conduisant à l'effet Warburg. Ce phénomène se caractérise par une forte intensification du processus de glycolyse, qui devient utilisée préférentiellement pour générer de grandes quantités d'énergie et fournir assez de substrats pour permettre une fréquence de division élevée. Dans ces cellules pourtant non privées d'oxygène, une réorientation du métabolisme glucidique est opérée, le pyruvate étant utilisé comme substrat pour la fermentation lactique plutôt que dans le cycle de Krebs. De très hauts niveaux

de NADH sont générés pour tempérer ce système hautement aérobie qui produit beaucoup de ROS. Les réponses immunes emploient donc NF- $\kappa$ B pour modifier les voies métaboliques et diriger la division cellulaire, dans le but de mettre en place la sélection clonale. De façon intéressante, p53 agit de façon opposée. La protéine p53 induit l'expression de TIGAR (*TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator*), aussi connue sous le nom de fructose-2,6-bisphosphatase, qui ralentit le rythme de la glycolyse. p53 induit aussi l'expression de SCO2 (*Short chain alcohol oxidase*), qui permet l'assemblage des sous-unités de la cytochrome c oxydase et augmente le fonctionnement de la phosphorylation oxydative (consommation des substrats, baisse de la consommation de glucose, et hausse de l'efficacité de la production d'énergie)<sup>421</sup>. Il existe ainsi une relation antagoniste et réciproque entre p53 et NF- $\kappa$ B en ce qui concerne le contrôle de la prolifération cellulaire et du métabolisme.



**Figure I-39 : Potentialisation de la réponse des récepteurs TLR par p53<sup>499</sup>.** Les agents anticancéreux qui induisent un stress chromosomique (ex : rayonnements ionisants, doxorubicine, 5-fluorouracile) provoquent une accumulation de p53, qui potentialise l'expression de la plupart des récepteurs TLR et la réponse inflammatoire, ce qui participe aussi à l'immunité antitumorale. Les mutants perte de fonction de p53, à la différence des mutants de changement de son spectre d'activités, perdent cette capacité à induire l'expression des TLR. Certains agents chimiques (ex : nutline-3, RITA) peuvent toutefois rétablir la fonctionnalité de p53 et ainsi restaurer cette boucle amplificatrice.

Une autre interaction entre p53 et le système immunitaire inné a récemment été mise à jour, avec la découverte que les changements d'expression ou d'activité de p53 dans des lignées primaires et tumorales humaines affectent l'expression de la plupart des TLR (cf. Figure I-

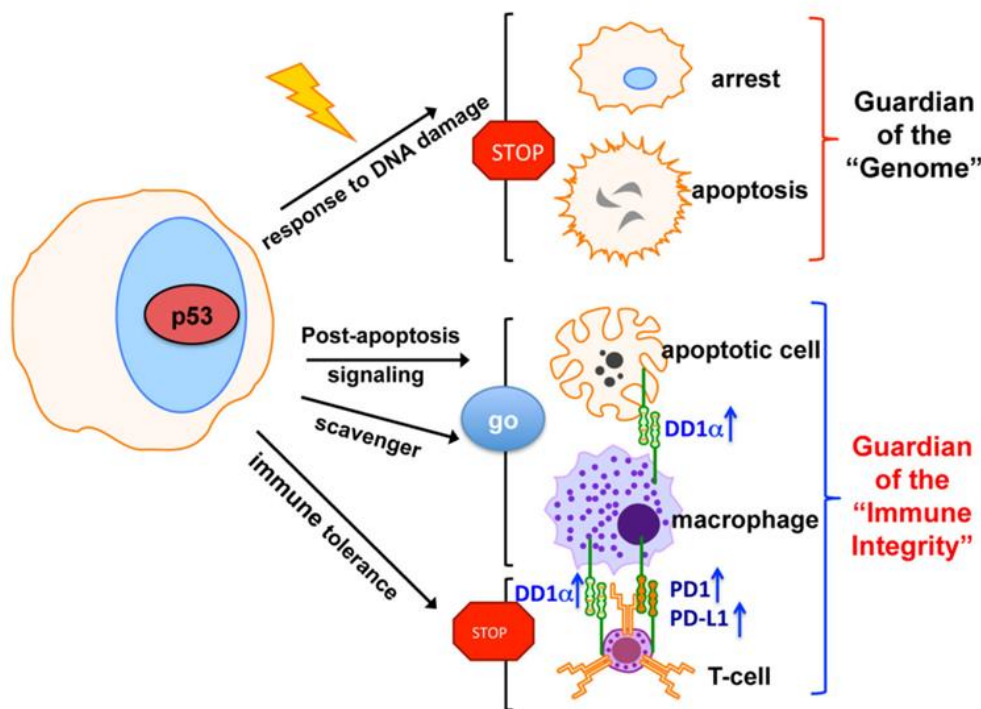
39)<sup>494,502-504</sup>. Les TLRs sont exprimés dans plusieurs types cellulaires du système immunitaire incluant les splénocytes, les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques et les macrophages. Ces récepteurs sont des glycoprotéines membranaires qui reconnaissent une variété de motifs moléculaires associés à des agents pathogènes. Des dérégulations de l'expression et de l'activité des TLRs sont associées au développement de maladies auto-immunes et de maladies inflammatoires chroniques, telles que le lupus érythémateux systémique, les maladies inflammatoires de l'intestin, les diabètes de type I, la sclérose en plaque et la polyarthrite rhumatoïde<sup>505</sup>.

Tous les gènes codant pour les récepteurs TLR humains contiennent dans leur promoteur au moins un demi-site canonique de l'élément de réponse à p53. Dès lors, l'induction de dommages chromosomiques chez des individus sains (traitement avec la nutline-3, la doxorubicine ou avec des rayonnements ionisants) modifie le profil d'expression de tous les TLR dans plusieurs types cellulaires comme les lymphocytes du sang périphérique et les macrophages alvéolaires, et cela de façon dépendante de p53. De façon surprenante, l'analyse phylogénétique des promoteurs des TLR révèle que la régulation de l'expression des TLR par p53 semble réservée aux primates.

### 2.4.3 p53 dans le contrôle de l'autoimmunité et de l'immunité antitumorale

Les maladies auto-immunes sont généralement caractérisées par des niveaux élevés de lymphocytes B et T auto-réactifs et impliquent des réponses immunes adaptatives dirigées contre des antigènes du soi. Ces récentes années ont vu émerger une accumulation de travaux suggérant que le dysfonctionnement de p53 peut aboutir au développement de maladies auto-immunes<sup>506-508</sup>. La présence de mutations de *TP53* et d'anticorps sériques dirigés contre p53 a été rapportée chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, de lupus érythémateux systémique, de la maladie de Graves Basedow (maladie auto-immune de la thyroïde) et d'hépatite auto-immune<sup>509,510</sup>. Comme précédemment évoqué, la protéine p53 réprime la transactivation de promoteurs comportant des éléments de réponse à NF- $\kappa$ B et la transcription de certains gènes induits par le TNF- $\alpha$ <sup>511</sup>. De cette façon, la déficience en p53 dans les macrophages augmente la production de cytokines proinflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12 et le TNF- $\alpha$ , qui sont des cibles de NF- $\kappa$ B impliquées dans le développement de pathologies auto-immunes<sup>512</sup>.

La mort cellulaire programmée est un processus vital qui a lieu dans les tissus tout au long de la vie et permet chaque jour le renouvellement de plus d'un milliard de cellules. Une défaillance dans l'élimination des corps cellulaires peut conduire à une accumulation tissulaire d'autoantigènes qui favorise le développement de pathologies inflammatoires chroniques, de maladies autoimmunes et de cancers<sup>513-515</sup>. Dans le système immunitaire normal, la phagocytose des cellule apoptotiques s'accompagne d'un certain degré de tolérance immunitaire *via* l'activation de points de contrôle du système immunitaire afin de prévenir la reconnaissance d'antigènes du soi. L'importance de p53 dans ces évènements postapoptotiques n'a été révélée que récemment grâce à l'identification de DD1 $\alpha$  (*Death domain 1 $\alpha$* ) comme cible de p53<sup>516</sup>. L'expression de DD1 $\alpha$  est contrôlée par p53 dans les cellules en cours d'apoptose ainsi que dans les macrophages. Cette protéine agit à la fois comme un ligand et un récepteur de phagocytose en engageant des interactions intermoléculaires homophiliques au niveau de jonctions entre les cellules en apoptose et les macrophages (un mécanisme qui se distingue nettement de la reconnaissance par des récepteurs *scavengers* des phosphatidylsérines externalisées à la surface des cellules mourantes).

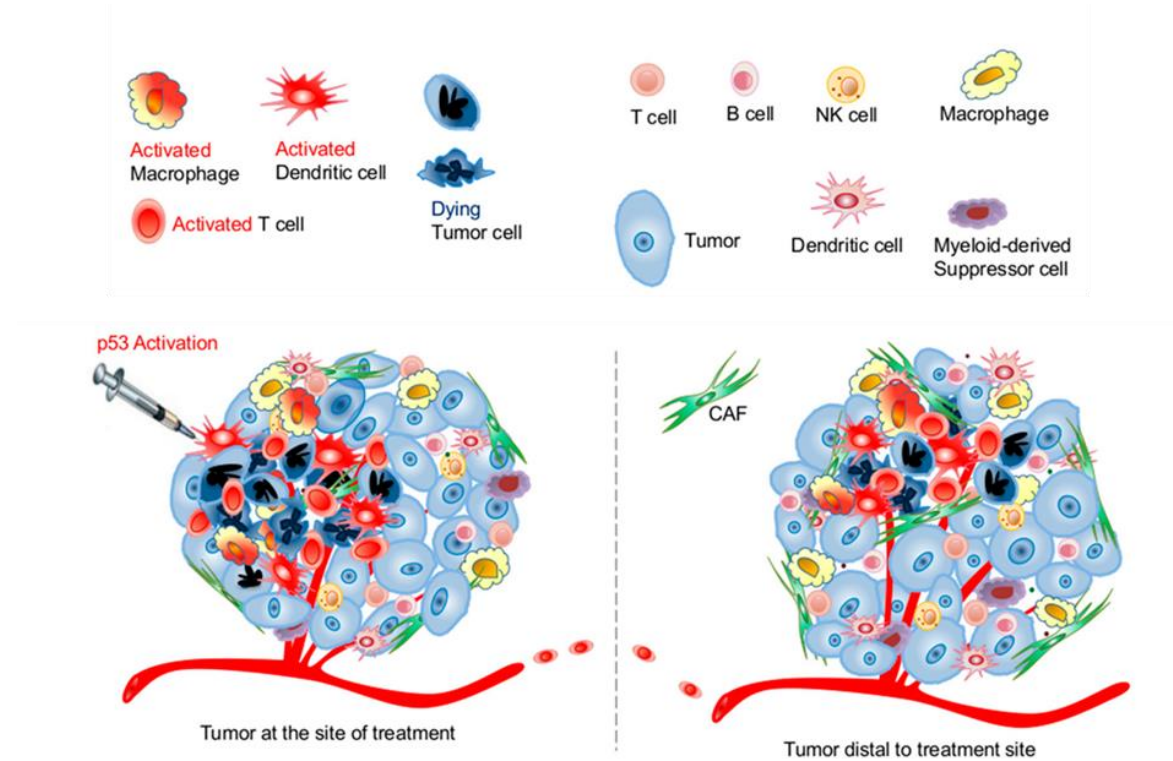


**Figure I-40 : p53 comme gardien de l'intégrité immunitaire<sup>490</sup> ?** Les fonctions de p53 dans la promotion de la tolérance immunitaire ont été révélées récemment par des travaux démontrant l'induction par p53 de molécules de point de contrôle du système immunitaire telles que PD1, PD-L1 et DD1 $\alpha$ , qui régulent négativement les réponses des lymphocytes T effecteurs. De plus, p53 favorise aussi la détection et la clairance des cellules apoptotiques par le système immunitaire, ce qui en fait un acteur central dans la prévention des réactions autoimmunes.

Un autre mécanisme potentiel par lequel p53 pourrait limiter les réactions auto-immunes fait intervenir l'induction transcriptionnelle de *Foxp3* par p53 dans les lymphocytes T<sub>reg</sub>. Chez la souris, il a en effet été démontré que la signalisation du TCR induit une accumulation de p53 qui active alors directement l'expression du facteur de transcription FOXP3 (*Forkhead box P3*), qui est responsable de la différenciation des lymphocytes T<sub>reg</sub><sup>517</sup>. L'expression adéquate de p53 pourrait ainsi être un facteur critique dans le contrôle de l'autoimmunité, faisant de lui un « gardien de l'intégrité immune » (cf. Figure I-40).

Le développement des cancers ne repose pas entièrement sur une altération de la croissance cellulaire. Ces dernières années ont vu une appréciation grandissante du rôle du système immunitaire dans la carcinogenèse, car il s'est révélé être une barrière fondamentale contre son développement, devant obligatoirement être détournée pour permettre la progression tumorale. A l'exception des tumeurs viro-induites, les cellules cancéreuses proviennent de cellules normales de l'hôte ayant acquis des altérations génétiques qui favorisent leur transformation maligne. Les cellules tumorales ont par conséquent souvent été considérées comme des cellules perçues par le système immunitaire comme des cellules du soi. Il est toutefois connu que les cellules cancéreuses peuvent devenir immunogéniques en raison d'une accumulation de protéines mutantes appelées néo-antigènes.

Les cellules tumorales emploient une variété de mécanismes d'échappement au système immunitaire pour subsister malgré l'usage de radiothérapies et de chimiothérapies. Elles peuvent par exemple augmenter l'expression de molécules qui inhibent les fonctions de cellules effectrices telles que les lymphocytes T. Ces molécules de « point de contrôle du système immunitaire », parmi lesquelles se trouvent CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte antigen-4*), PD-L1 (*Programmed death ligand 1*), et DD1 $\alpha$ , sont importantes dans le maintien de la tolérance des lymphocytes T<sup>518</sup>. Leur inhibition améliore considérablement les réponses immunes antitumorales, en déclenchant une réduction du nombre de lymphocytes T<sub>reg</sub> et une augmentation du nombre de monocytes et de cellules dendritiques circulantes<sup>519-521</sup>. Dans les cellules cancéreuses soumises à un stress génotoxique et ayant conservé une protéine p53 fonctionnelle, cette dernière induit l'expression de plusieurs molécules de points de contrôle du système immunitaire - le récepteur PD-1 et son ligand PD-L1, ainsi que DD1 $\alpha$  - ce qui permet à ces cellules d'échapper à l'immunité antitumorale<sup>516,522</sup>.



**Figure I-41 : Cibler la voie p53 dans le microenvironnement tumoral pour activer l'immunité antitumorale et contrôler la progression tumorale de façon systémique<sup>523</sup>.** Le microenvironnement d'une tumeur est composé d'un ensemble complexe de constituants cellulaires et moléculaires subdivisé en deux compartiments : (1) le compartiment des cellules immunitaires d'origine hématopoïétique ayant infiltré la tumeur (lymphocytes T, B et NK, et populations myéloïdes de cellules suppressives, de cellules dendritiques et de macrophages associés à la tumeur) et (2) le compartiment stromal (fibroblastes associés au cancer (CAF) et cellules endothéliales de la vascularisation sanguine). L'inactivation de p53 a été observée dans certaines sous-populations cellulaires du microenvironnement tumoral, ce qui promeut un état inflammatoire chronique et la progression tumorale. Une activation locale de p53 peut être accomplie par injection intratumorale d'activateurs spécifiques de p53. Cela rend la tumeur immunogénique et permet l'activation de macrophages et cellules dendritiques au niveau de zones confinées à proximité du site d'injection. Ces cellules présentent ensuite des antigènes tumoraux qui activent des lymphocytes T qui peuvent alors tuer les cellules tumorales. Les lymphocytes T activés circulent aussi dans le sang et la lymphe à la recherche de tumeurs additionnelles situées à distance du site d'injection. De cette manière, l'activation de l'immunité adaptative en réponse à une activation locale de p53 supporte un contrôle et une régression tumorale à l'échelle systémique.

Toutes ces découvertes ont apporté une perspective nouvelle : l'inactivation de p53 confère aux cellules tumorales un statut « immuno-privilegié » et permet leur échappement à la surveillance du système immunitaire. C'est précisément la raison pour laquelle l'activation de p53 dans le microenvironnement tumoral pour réactiver une immunité antitumorale défailante constitue aujourd'hui une piste intéressante de thérapie anticancéreuse (cf. Figure I-41).



#### 2.4.4 Rôle émergent de p73 dans les fonctions immunes

L'analyse du phénotype des premières souris *knockout* pour *p73* présageait déjà d'un rôle de p73 dans l'immunité innée et la réponse inflammatoire<sup>353</sup>. Les souris *Trp73<sup>-/-</sup>* meurent pour une grande partie d'entre eux quelques jours après la naissance, des suites d'hémorragies gastro-intestinales massives. Les souris survivantes sont pour la plupart affectées de façon chronique par des infections bactériennes, des rhinites, des otites, des conjonctivites et des œdèmes périorbitaires, qui apparaissent rapidement (dès P2) et persistent à l'âge adulte. Chez les souris *Trp73<sup>-/-</sup>*, la présence de signaux inflammatoires constitutifs et la sécrétion excessive de mucus au niveau des différentes muqueuses épithéliales les rendent colonisables par des agents pathogènes.

Les macrophages sont habituellement séparés en deux classes phénotypiques : les macrophages M1 effecteurs (ou classiquement activés) et les macrophages M2 régulateurs (ou activés de façon alternative). Les macrophages exercent des activités microbicides et promeuvent de fortes réponses de type Th1, tandis que les macrophages M2 interviennent plus tard lors d'une infection et participent à la résolution de l'inflammation grâce à une augmentation de leur capacité de phagocytose, à la synthèse de facteurs trophiques, et à une réduction de la production de cytokines proinflammatoires au profit d'une production de cytokines anti-inflammatoires. Le traitement d'un animal avec du LPS induit un relargage massif de cytokines proinflammatoires, provoquant un choc septique qui met en péril la survie de l'animal. Au niveau moléculaire, l'activation du TLR4 par le LPS conduit à l'activation de NF- $\kappa$ B. Au niveau cellulaire, elle induit une différenciation des macrophages en macrophages effecteurs de type M1. Plus tard au cours de la réponse inflammatoire, une partie des macrophages M1 changent de phénotype et se différencient en macrophages de type M2, aux propriétés immunosuppressives. Cette transition M1-M2 se fait de façon dépendante de STAT3/6 et peut aussi être induite par certaines cytokines comme l'IL-4 et le TGF- $\beta$ <sup>524</sup>. Les macrophages M2 continuent de produire des cytokines proinflammatoires, mais en quantités réduites, mais commencent aussi à sécréter des cytokines anti-inflammatoires en même temps que leur capacité à phagocyter des cellules apoptotiques augmente. En conséquence de leur rôle central dans l'immunité innée, l'hyperactivation des macrophages ou le maintien prolongé de leur phénotype M1 causent une inflammation soutenue perturbant le fonctionnement des organes.

Jusque très récemment, peu de choses étaient connues au sujet du rôle de p73 dans l'immunité. Le phénotype des souris *Trp73<sup>-/-</sup>*, qui sont atteintes d'infections chroniques et d'une inflammation persistante, suggérait pourtant une implication de p73 dans le contrôle de l'inflammation. Chez l'Homme, plusieurs travaux ont relié l'expression de *TP73* à des affections inflammatoires comme les otites, les gastrites et les rhinosinusites chroniques (35,36). En 2013, l'étude conduite par Richard Tomasini a permis de délimiter les fonctions des isoformes TAp73 dans l'immunité innée : la perte sélective des isoformes TAp73 chez la souris provoque une exacerbation du phénotype proinflammatoire des macrophages péritonéaux<sup>525</sup>. Les souris *TAp73<sup>-/-</sup>* soumises à un traitement avec du LPS présentent ainsi une hausse de mortalité par choc septique, ce qui n'est pas le cas des souris *ΔNp73<sup>-/-</sup>*. Cette hypersensibilité des souris *TAp73<sup>-/-</sup>* au traitement avec du LPS est corrélée à une hausse de la production de cytokines proinflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP-2, IL-12p70) observée à la fois dans le sérum de ces animaux ainsi que dans les surnageants de culture de macrophages péritonéaux et de MEFs *TAp73<sup>-/-</sup>*. Dans cette même étude, ce phénotype a pu être expliqué par une altération de la polarisation M1/M2 des macrophages *TAp73<sup>-/-</sup>*, qui est nettement orientée vers la différenciation M1 comme en attestent l'augmentation de la production d'IFN- $\gamma$  (cytokine polarisante), la hausse d'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (la présentation antigénique accrue est une marque de prédominance du sous-type M1), et la moindre activité de phagocytose des macrophages *TAp73<sup>-/-</sup>*.

Au regard de ces données, il est légitime d'envisager l'instauration de conditions inflammatoires chroniques chez les souris *TAp73<sup>-/-</sup>*, qui participeraient à l'établissement d'un contexte tumorigénique déjà favorisé par la perte du contrôle exercé par ces isoformes sur l'intégrité du génome.

## 2.5 Interactions entre NO et la famille p53

### 2.5.1 Activation de p53 et TAp73 par NO

Les premiers éléments ayant contribué à établir un lien entre NO et l'activation de p53 sont venus d'observations indiquant que le traitement de macrophages RAW264.7 avec des donneurs de NO induisait une accumulation rapide de p53<sup>526</sup>. Les macrophages dérivant de souris *iNOS<sup>-/-</sup>* ne présentent quant à eux pas de localisation nucléaire de p53 suite à un traitement avec de la bléomycine. La protéine p53 semble aussi essentielle dans l'induction par NO de régulateurs du cycle cellulaire (ex : p21<sup>Waf1/Cip1</sup>) et de protéines proapoptotiques (ex :

Bax)<sup>527</sup>. Enfin, des expériences avec des thymocytes issus de souris p53<sup>-/-</sup> ou avec des cellules lymphoblastoïdes exprimant une forme mutée de p53 ont révélé une forte résistance de ces cellules à l'apoptose induite par NO<sup>528,529</sup>.

Dans les fibroblastes embryonnaires de souris, l'accumulation de protéines p53 en réponse à NO est précédée par une réduction des niveaux de MDM2 et du niveau de polyubiquitination de p53<sup>530</sup>. Dans de nombreux autres types cellulaires, elle est également associée à des phosphorylations au niveau de certains résidus, la sérine 15 étant la plus fréquemment retrouvée<sup>531</sup>. Cette phosphorylation (qui dépend de la kinase ATR) n'affecte pas toujours l'interaction de p53 avec MDM2, ni son ubiquitination. En revanche, elle entrave le système de navette nucléo-cytoplasmique qui dépend aussi de MDM2, ce qui entraîne une rétention et une accumulation nucléaire de p53<sup>532,533</sup>. Une étude plus récente indique que même de plus faibles concentrations de NO (< 200 µM), qui ne sont pas génotoxiques, peuvent aussi entraîner une accumulation nucléaire de p53 *via* la nitration du résidu Tyr327, qui favorise l'oligomérisation de p53 sans qu'elle ne soit phosphorylée par ATR au niveau de son résidu Ser15<sup>534</sup>.

Mais qu'en est-il de l'éventuelle induction d'homologues de p53 par NO ? Les précédents travaux de notre équipe ont démontré que, dans la lignée leucémique humaine K562 qui n'exprime plus la protéine p53 (mutation amorphe du gène *TP53*), la génération de fortes concentrations en NO par l'intermédiaire de donneurs de NO ou l'induction de l'activité iNOS macrophagique provoque une accumulation de l'isoforme TAp73α (au niveau de l'ARNm et de la protéine)<sup>535</sup>. Cette activation transcriptionnelle de TAp73α dépend de la voie déjà décrite auparavant faisant intervenir E2F1. Elle survient très probablement en réponse aux dommages à l'ADN engendrés par le blocage des fourches de réplication consécutif à l'inhibition par NO de la ribonucléotide réductase, puisque des inhibiteurs pharmacologiques de la ribonucléotide réductase déclenchent la même série d'évènements.

### 2.5.2 Régulation de la synthèse de NO par p53

De façon très intéressante, l'équipe de Curtis C. Harris a pu formellement démontrer à la fin des années 1990 que le gène *NOS2* est la cible d'une répression transcriptionnelle par p53. Ainsi, la transfection transitoire de p53 dans différentes lignées humaines ou dans des fibroblastes murins a pour effet de réduire considérablement l'activité basale et induite par des

cytokines du promoteur *NOS2* (analyse en système gène rapporteur luciférase)<sup>536</sup>. Ces résultats ont pu être confortés *in vivo* chez des souris *Trp53<sup>-/-</sup>*. Ces souris présentent en effet des modifications du profil d'expression de la iNOS en réponse à des cytokines libérées de façon systémique, après injection intra-péritonéale de *Propionibacterium acnes*. Après cette injection, l'expression de la iNOS devient persistante dans le foie des souris *Trp53<sup>-/-</sup>*. De plus, la rate de ces souris devient une source importante de production de NO, car la iNOS y est exprimée en condition basale et est fortement induite après une stimulation cytokinique, alors qu'elle n'est jamais exprimée chez les souris WT<sup>537</sup>.

Les résultats de cette équipe sont importants, car non seulement ils confirment que les fortes concentrations en NO générées par la NOS inductible sont à l'origine d'une activation de p53, mais ils indiquent également que p53 exerce un rétrocontrôle négatif sur l'expression de *NOS2*. Le mécanisme par lequel p53 exerce cette répression n'est toutefois pas élucidé, bien que plusieurs pistes existent. Le mécanisme suggéré par les auteurs de cette étude consiste en une interaction de p53 avec la protéine de liaison à la boîte TATA (TBP), qui est un des composants du complexe TFIID d'initiation de la transcription.

En supplément de son rôle transactivateur de nombreux gènes, p53 est aussi capable de réprimer certaines cibles. La répression de gènes par p53 est encore assez peu étudiée, mais plusieurs mécanismes ont été décrits : (1) liaison de p53 à son élément de réponse et recrutement de corépresseurs (ex : HDAC1)<sup>538-541</sup>, (2) activation d'un répresseur (ex : Slug)<sup>542</sup>, et (3) liaison de p53 à son élément de réponse qui entrave la fixation d'un facteur de transcription plus fort ou le prive de coactivateurs transcriptionnels<sup>543,544</sup>. Une autre explication probable provient de la récente description de p53 comme un suppresseur de la réponse inflammatoire chez la souris<sup>501</sup>. Comme évoqué précédemment, la protéine p53 antagonise l'activité transcriptionnelle de NF-κB, qui contrôle l'expression de gènes codant pour des cytokines proinflammatoires, des chimiokines et leurs récepteurs (IL-1β, Il-6, IL-12, TNF-α, CCR2, CCR5...). En conséquence, les souris *Trp53<sup>-/-</sup>* présentent une hypersensibilité au choc septique et des défauts de résolution de l'inflammation.



**CHAPITRE II :**  
**OBJECTIFS DES TRAVAUX**



Comme cela a été mentionné dans l'introduction, les précédents travaux de notre équipe ont démontré l'induction de l'expression de TAp73 par de fortes concentrations en NO dans la lignée leucémique K562. Bien que cette induction repose sur un mécanisme différent de celui aboutissant à l'activation de p53, elle intervient néanmoins dans des conditions similaires, après induction de l'activité iNOS ou pour les mêmes concentrations en précurseurs chimiques de NO. Il est ainsi légitime de se demander si p73 intervient également dans la régulation transcriptionnelle du gène *NOS2*, comme cela a été démontré pour p53.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons donc commencé par comparer l'induction de l'expression de la iNOS et la production de NO dans des fibroblastes 3T3 *WT* et *TAp73<sup>-/-</sup>*. Nous avons peu à peu réalisé que le phénotype observé dans les cellules *TAp73<sup>-/-</sup>* dépendait en grande partie des conditions de culture, ce qui nous a conduit sur la piste d'un ou plusieurs facteurs sécrétés dont la fonction serait altérée par les isoformes TAp73. Nous avons alors émis l'hypothèse que le TGF- $\beta$  pourrait être impliqué dans le phénotype des cellules *TAp73<sup>-/-</sup>*, et l'emploi de différentes stratégies nous a effectivement permis de le démontrer. Nous avons poursuivi les travaux en commençant à explorer les mécanismes sous-jacents à la coopération observée entre les isoformes TAp73 et le TGF- $\beta$  pour réprimer l'expression de la iNOS (promoteur *NOS2*, voies de signalisation du TGF- $\beta$ , etc.).

En parallèle, nous avons souhaité savoir si la perte d'expression des isoformes TAp73, qui modifie la réponse au TGF- $\beta$  et altère la production de NO dans ce modèle cellulaire, pourrait avoir des répercussions fonctionnelles dépendantes de la production de NO. Dans cette optique, nous avons étudié les conséquences du *knockout* de *TAp73* sur l'induction par NO de la réponse antioxydante dépendante de Nrf2, ainsi que la capacité de ces cellules à limiter la prolifération du parasite *Trypanosoma muscili* grâce à la production de NO.

Disposant de souris  *$\Delta Np73<sup>-/-</sup>$*  depuis le mois de mai 2015, nous avons aussi pu envisager de mesurer l'effet de la perte d'expression de ces isoformes sur l'induction de la iNOS et la réponse au TGF- $\beta$  dans des cellules primaires (BMDM et fibroblastes pulmonaires), avec lesquelles des résultats préliminaires ont pu être obtenus.





**CHAPITRE III :**  
**MATERIEL ET METHODES**



# 1 Culture cellulaire

## 1.1 Conditions de culture

L'entretien des lignées cellulaires en culture est effectué en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire (repiquages, ensemencements, traitements, etc.). Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C en atmosphère humide enrichie de 5% de CO<sub>2</sub>. Tous les milieux de culture sont supplémentés en L-glutamine (2 mM) et en antibiotiques (100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine).

## 1.2 Lignées murines immortalisées de fibroblastes embryonnaires *TAp73*<sup>-/-</sup> (3T3)

Les lignées murines utilisées sont un don de Richard Tomasini (Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille ; unité INSERM U1068). Elles ont été établies à partir de fibroblastes d'embryons de souris (MEFs) prélevés au jour embryonnaire 13,5 en suivant le protocole 3T3. Ce protocole consiste à cultiver ces fibroblastes en les maintenant à faible densité jusqu'à l'émergence de clones de cellules spontanément immortalisées (repiquages tous les 3 jours de 3.10<sup>5</sup> cellules / 20cm<sup>2</sup>). Les fibroblastes immortalisés dans ces conditions de culture se multiplient rapidement et indéfiniment, mais leur croissance est interrompue lorsqu'elles parviennent à confluence (pas de perte de l'inhibition de contact). Ces lignées 3T3 sont immortalisées mais n'induisent pas la formation de tumeurs lorsqu'elles sont injectées dans des souris : elles n'ont pas subi de transformation oncogénique.

Les cellules 3T3 utilisées pour ces travaux proviennent de souris de génotype sauvage (souris 1 et 6) ou sélectivement déficientes pour la classe d'isoformes TAp73 (souris 4 et 5). Les souris *TAp73*<sup>-/-</sup> ont été générées en ciblant les exons 2 et 3 de *Trp73*, qui sont absents dans les isoformes ΔNp73 et codent pour le domaine de transactivation de p73. Les cellules 3T3 sont des cellules adhérentes cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, *GE Life Sciences/PAA Laboratories*) avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (*Biowest*) et du β-mercaptoéthanol (55 µM). Pour le stockage à long terme, les cellules sont resuspendues à une densité de 10<sup>6</sup> cellules/ml dans un mélange préalablement filtré composé de 60% de milieu DMEM, 30% de SVF et 10% de DMSO (diméthylsulfoxyde, *Sigma-Aldrich*). Elles sont ensuite transférées dans un tube cryogénique (*Nunc CryoVials*) puis dans une boîte de congélation

contenant de l'isopropanol placée à  $-80^{\circ}\text{C}$  (assure une descente progressive en température qui améliore la viabilité des cellules après la décongélation). Les cryotubes sont finalement transférés dans l'azote liquide ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) le jour suivant.

Avant les expériences, les fibroblastes 3T3 sont décollés de leur boîte de culture grâce à une incubation pendant 5 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$  avec une solution de 0,025% de trypsine et 0,01% d'EDTA, avant d'être centrifugées (1200 rpm, 5 min) et après arrêt de la réaction par ajout de sérum. Après que les cellules aient été resuspendues, une fraction de cette suspension est colorée avec du bleu de trypan afin de pouvoir dénombrer les cellules viables avec un hématimètre de Malassez. Afin d'être utilisables dès le lendemain pour une expérience, les cellules 3T3 sontensemencées à la densité de  $2,5 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>. Toutes les expériences ont été réalisées sur des lignées de 3T3 dont le nombre de passages se situe entre 20 et 35.

La veille des expériences et lors des traitements, les cellules sont passées en milieu RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium, *GE Life Sciences/PAA Laboratories*), car ce dernier est plus riche en L-arginine, avec des pourcentages variables de SVF. En fonction des expériences, les cellules sont privées de sérum (SVF 0,5%) ou non (SVF 5%).

## 1.3 Isolement de cellules primaires $\Delta Np73^{-/-}$

### 1.3.1 Souris *knockout* pour les isoformes $\Delta Np73$

Les souris  $\Delta Np73^{-/-}$  proviennent d'un don du Dr Fadel Tissir (Université catholique de Louvain, équipe Neurobiologie du développement). Elles sont élevées en animalerie avec un accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*. Ces souris transgéniques ont été générées en utilisant des techniques conventionnelles de ciblage de gène. La construction permettant le ciblage contient une cassette Cre-IRES-EGFP insérée en aval de la région d'homologie située en 5' (Mm4\_39308\_37 ; nucléotides 7931161-7933301), qui se termine avec le codon ATG de l'exon 3', une cassette de sélection par la Néomycine flanquée de sites FRT (*Flippase recombinase target*), la région d'homologie en 3' (Mm4\_39308\_37 ; nucléotides 7920072-7923789), et une cassette de sélection négative DTA (*Diphtheria toxin A*). La construction a été introduite par électroporation dans des cellules ES R1 afin d'isoler les cellules ES hétérozygotes. Les blastocystes injectés au stade B6 ont été transférés dans une souris femelle CD1 pseudo-gestante, et une colonie a été générée à partir d'animaux chimériques, puis maintenue par des croisements successifs.

A l'âge de 4 semaines, les souris sont identifiées par le poinçonnage de leurs oreilles et une biopsie de la queue permet d'en faire le génotypage. Pour cela, les morceaux de queue sont mis à bouillir pendant 1h dans 75 µl de tampon alcalin (25 mM NaOH, 200 µM EDTA). Ils sont ensuite transférés sur glace, et 75 µl d'un second tampon (40 mM Tris (pH 7,5), 16 mM HCl) permettent de neutraliser la solution. Les échantillons sont placés à 4°C avant d'en prélever 1 µl pour réaliser une PCR (*Polymerase chain reaction*) avec l'ADN polymérase One Taq (*New England Biolabs*) en suivant les instructions du fabricant avec 35 cycles d'amplification (température d'hybridation des amorces = 60°C).

Il y a une amorce sens commune, et une amorce antisens spécifique pour tester la présence de la séquence *wild type* codant  $\Delta Np73$  (amplicon = 328 bp) ou de la construction comportant le gène *GFP* (souris *knockout*) (amplicon = 796 bp) :

- Primer sens « commun » : 5'-GAATGCCAACTCTCAGTC-3'
- Primer antisens «  $\Delta Np73^{-/-}$  » : 5'-ATTCTCCCACCGTCAGTACG-3'
- Primer antisens «  $\Delta Np73^{+/+}$  » : 5'-GTCTCTCTGAACCCCAACCA-3'

Enfin, les produits de PCR sont déposés sur gel d'agarose à 2% (dissous dans un tampon Tris Acétate EDTA) contenant du bromure d'éthidium (BET) pour une migration électrophorétique (75V) afin de révéler la présence des bandes correspondant aux produits d'amplification sous irradiation UV (*Bio-Rad ChemiDoc MP Imaging System*). Le dépôt de fragments d'ADN de taille connue (DNA ladder 100 bp) permet d'estimer la taille des amplicons obtenus et de déterminer le génotype des souris (cf. Figure III-1 ci-dessous).

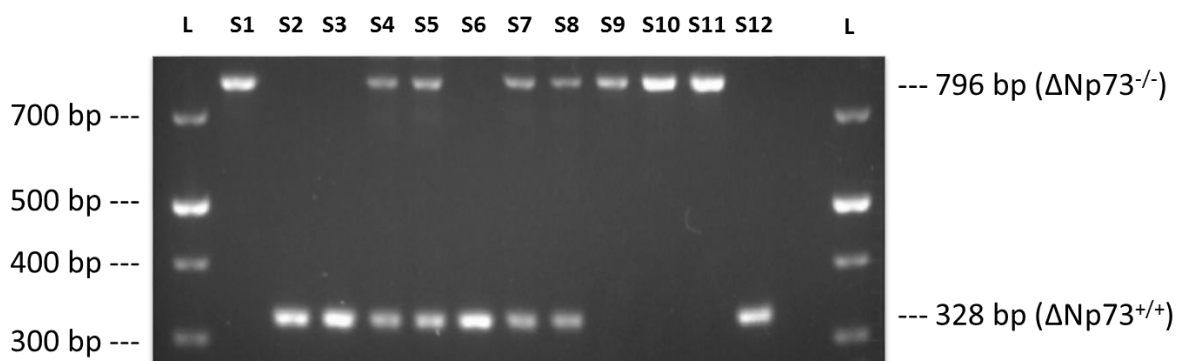


Figure III-1 : Exemple de génotypage réalisé sur une portée de souriceaux.

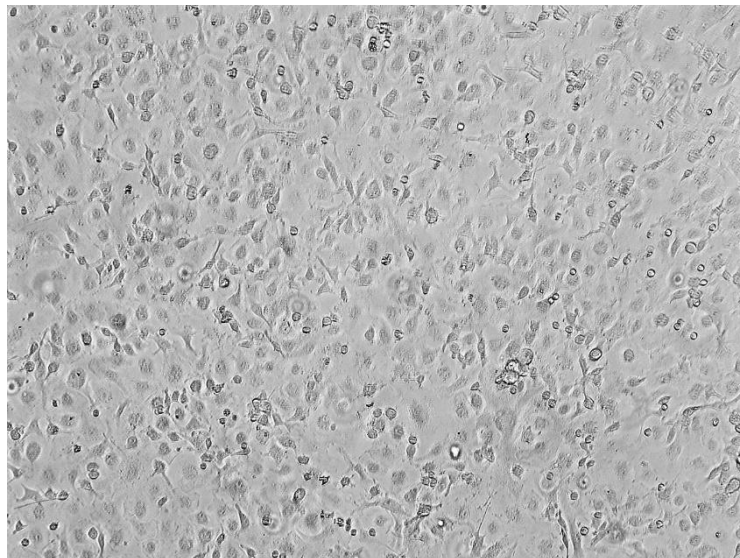
### 1.3.2 Macrophages dérivant de cellules de moelle osseuse

A l'âge de 8 semaines, les souris sont euthanasiées avant de procéder à l'extraction des cellules de moelle osseuse. Elles sont ensuite aspergées d'éthanol à 70%, et les fémurs et tibias sont isolés par dissection à l'aide de pinces et de ciseaux chirurgicaux stériles, ainsi que de compresses afin de dégager les os des muscles attachés et des tendons liés aux articulations. Les os nettoyés sont placés dans une boîte de Pétri contenant du PBS (*Phosphate-buffered saline*), sur de la glace et sous une hotte à flux laminaire. Les os sont ensuite placés 1 min dans un bain d'éthanol à 70%, puis lavés dans un bain de RPMI-1640. Les épiphyses des fémurs tibias et des fémurs sont sectionnées à l'aide d'un scalpel, puis une seringue contenant du RPMI-1640 est introduite à chacune des extrémités afin d'injecter le milieu au travers, au-dessus d'un tube Falcon (50 ml) surmonté d'un tamis cellulaire (40  $\mu\text{m}$ ). Pour éliminer les globules rouges, les cellules sont centrifugées (1000 rpm, 4°C, 5 min) et resuspendues dans 1 ml de tampon de lyse des globules rouges, puis laissées sur la glace pendant 10 min. Du milieu RPMI-1640 est ensuite ajouté en excès (20 ml/souris), et les cellules sont comptées avec un hématimètre de Malassez. Environ  $4 \times 10^7$  cellules de moelle osseuses sont obtenues par souris grâce à cette méthode. Une partie des cellules est conservée pour une différenciation immédiate, l'autre est stockée pour congélation à raison de  $10^7$  cellules par cryotube dans une solution contenant 90% de SVF et 10% de DMSO.

Pour la différenciation des cellules de moelle osseuse en macrophages, un protocole standard, décrit dans de multiples publications, a été utilisé. Ce protocole permet d'obtenir une population homogène composée à plus de 95% de macrophages BMDM exprimant les marqueurs de différenciation des macrophages matures que sont par exemple F4/80 et CD11b.

Un milieu conditionné est d'abord préparé à partir du surnageant de cellules L929 (fibrosarcome murin de tissu conjonctif sous-cutané) qui produisent et sécrètent le facteur de croissance et de différenciation GM-CSF (*Granulocyte macrophage-colony stimulating factor*). Le milieu conditionné (LCCM) est préparé en laissant les cellules L929 croître jusqu'à confluence, puis le milieu est renouvelé et maintenu en présence des cellules pendant 7 jours (Flacons de 150 cm<sup>2</sup>, 30 ml de RPMI-1640 et 10% de SVF). Le surnageant de culture est ensuite prélevé et filtré (0.45  $\mu\text{m}$ ) avant d'être stocké à -20°C jusqu'à son utilisation. Pour la différenciation des BMDM, au premier jour,  $10^7$  cellules de moelle osseuse (fraîches ou décongelées) sont réparties dans une boîte de Pétri de 10 cm (*Non-tissue culture treated Optilux*

*Petri dishes, BD Biosciences*) avec 10 ml de milieu de différenciation R20/30, qui est un mélange de RPMI-1640 avec 20% de SVF et 30% de LCCM. Le troisième jour, la moitié du milieu de différenciation est renouvelé, après centrifugation et récupération des cellules non adhérentes. Le sixième jour, beaucoup de cellules sont devenues adhérentes, elles sont détachées de leur support en les passant dans une solution de PBS dans laquelle elles sont maintenues à 4°C pendant 10 min. Après centrifugation, elles sont resuspendues dans 20 ml de milieu de différenciation R20/30 puis réparties dans deux nouvelles boîtes. Le septième jour, la quasi-totalité des cellules sont désormais différenciées en macrophages adhérents, et le milieu de différenciation est remplacé par un milieu de culture des BMDM R10/5 composé de RPMI-1640 avec 10% de SVF et 5% de LCCM (cf. Figure III-2). Le jour suivant, les cellules sont finalement détachées de leur support (de la même façon que précédemment), puis comptées avant d'être ensemencées dans des puits (MW12, MW24 ou MW96 selon les expériences) à une densité de  $8 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>. La veille des expériences et lors des traitements, les cellules sont passées en milieu RPMI-1640 avec seulement 1% de SVF.



**Figure III-2 : Cliché de microscopie à transmission de BMDM obtenus au septième jour de la différenciation de cellules de moelle osseuse en présence de milieu conditionné de cellules L929.**

### 1.3.3 Fibroblastes pulmonaires

A l'âge de 8 semaines, les souris sont euthanasiées, puis les lobes pulmonaires sont récupérés après l'ouverture de la cage thoracique grâce à des pinces chirurgicales. Les lobes pulmonaires de chaque souris sont transférés dans une boîte de Pétri stérile, recouverts de



quelques gouttes d'une solution contenant de la trypsine à 0,05% et 750 U/ml de collagénase de type IV (don de Boris Julien, ICPH, UMR 1174), et hachés à l'aide d'un scalpel. Ils subissent ensuite une digestion enzymatique dans 6 ml de solution de trypsine-collagénase pendant 30 min et sous agitation avec un barreau aimanté (stérile). La solution digérée est filtrée sur un tamis cellulaire (70  $\mu\text{m}$ ) au-dessus d'un tube Falcon contenant 8 ml de DMEM et 20% de SVF pour stopper la digestion. Les morceaux de poumon restants subissent une seconde étape de digestion dans le même volume de solution de trypsine-collagénase, ensuite refiltrée.

Les cellules sont centrifugées et réparties dans un flacon de 25  $\text{cm}^2$  (un pour chaque souris) avec 7 ml de milieu DMEM et 20% de SVF. Le milieu est renouvelé tous les deux jours en éliminant toutes les cellules non adhérentes, et les fibroblastes pulmonaires forment des clones qui peuvent se multiplier durant plusieurs passages (jusqu'à 10 maximum pour les expériences présentées). Au troisième passage, la proportion de SVF est réduite à 10%. Ces cellules sont repiquées et ensemencées dans des conditions identiques à celles utilisées pour les 3T3. La veille des expériences et lors des traitements, les cellules sont passées en milieu RPMI-1640 avec seulement 1% de SVF.

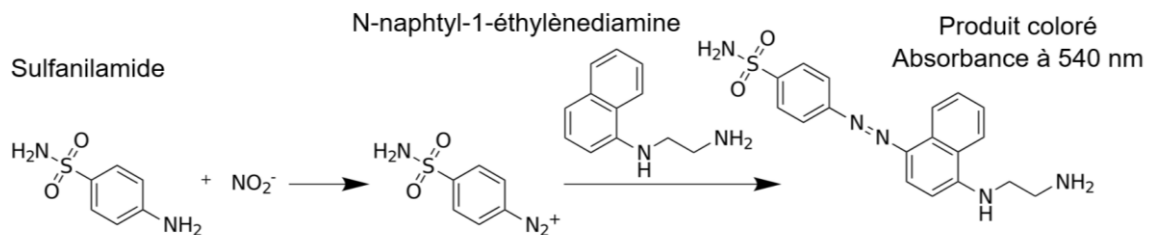
## 2 Cytokines et inhibiteurs pharmacologiques

L'induction de la iNOS dans les cellules 3T3 ou BMDM est déclenchée en présence des cytokines suivantes : rr IFN- $\gamma$  (*Sigma Aldrich*), rh TNF- $\alpha$  (*ImmunoTools*), rm IFN- $\beta$  (*PBL Interferon Source*), rm IL-1 $\beta$  (*ImmunoTools*), rh TGF- $\beta$ 1 (*ImmunoTools*). Le LPS de *Salmonella enteritidis* (*Sigma Aldrich*) est aussi utilisé pour la stimulation lors de certaines expériences.

L'aminoguanidine (*Sigma-Aldrich*) inhibe sélectivement l'activité iNOS et présente l'avantage de ne pas être toxique à la concentration utilisée (2 mM). La SEITU (*S-ethyl isothiourea*) (*Calbiochem*) (50  $\mu\text{M}$ ) et le L-NAME (*Sigma Aldrich*) ont aussi été utilisés pour inhiber l'activité iNOS. La cycloheximide (10  $\mu\text{g/ml}$ ) permet le blocage de la synthèse polypeptidique. Le SB-525334 (5  $\mu\text{M}$ ) (*Selleckchem*) est un inhibiteur sélectif du récepteur ALK5. Le MG-132 (*Selleckchem*) (5  $\mu\text{M}$ ) et la lactacystine (*Calbiochem*) (5  $\mu\text{M}$ ) sont des inhibiteurs du protéasome.

### 3 Mesure de la production de NO avec le réactif de Griess

Le nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) et le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) sont les dérivés finaux et stables de NO. Ils proviennent de la décomposition en milieu aqueux de certains dérivés du NO ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}_4$ ,  $\text{ONOO}^-$ ). La somme de leurs concentrations reflète la production totale de NO, et constitue donc un excellent index de l'activité enzymatique des NOS. Le dosage du nitrate nécessite sa conversion préalable en nitrite (étape supplémentaire faisant intervenir la nitrate réductase). Lors de cette étude, le dosage du nitrite dans les surnageants de culture a été retenu comme un moyen simple et rapide d'évaluer l'activité iNOS résultant des différents traitements. Le dosage du nitrite consiste à le convertir, par l'intermédiaire de deux réactifs composant le réactif de Griess (sulfanilamide à 0,75% et N-Naphtyl-1-éthylènediamine à 0,07% dans une solution de HCl à 5% final), en un produit coloré dont l'absorbance à 540 nm est proportionnelle à la concentration en nitrite initiale.



**Figure III-3 : Schéma de la réaction du réactif de Griess avec les ions  $\text{NO}_2^-$ , qui conduit à la formation d'un produit coloré absorbant à 540 nm.**

Dans un premier temps, une gamme étalon est réalisée avec une solution de  $\text{NaNO}_2$  (cf. Figure III-4). Il existe une relation linéaire entre l'absorbance à 540 nm mesurée et la concentration en ions  $\text{NO}_2^-$ , ce qui permet de calculer cette concentration dans un échantillon biologique (ex : sérum, surnageant de culture, etc.). L'absorbance est lue par un lecteur spectrophotométrique de microplaques VICTOR 1420 Multilabel Counter (Wallac), après le mélange des deux réactifs composant le réactif de Griess en volumes égaux (100  $\mu\text{l}$  de chaque), avec 100  $\mu\text{l}$  de surnageant de culture, et après 30 min d'incubation à température ambiante.

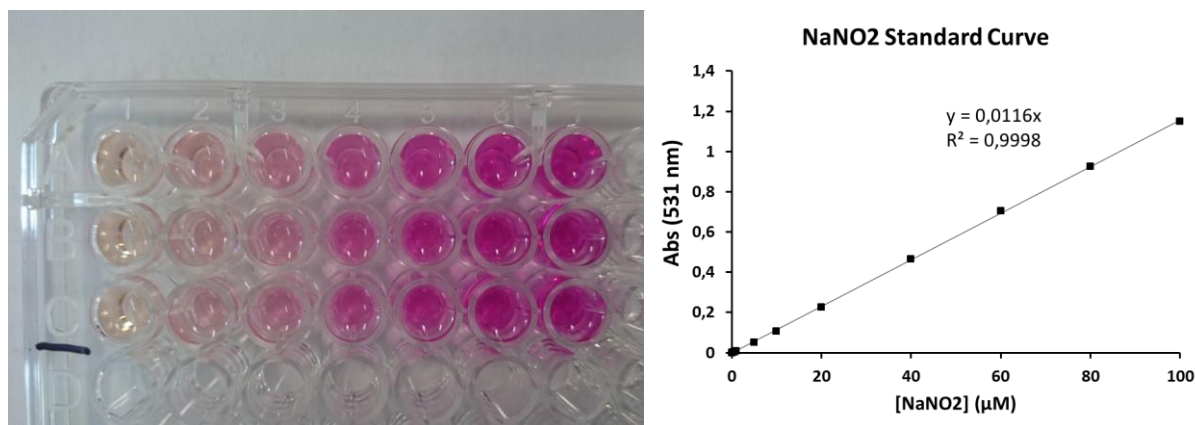


Figure III-4 : Exemple de gamme étalon de  $\text{NaNO}_2$  obtenue avec le réactif de Griess.

## 4 Détermination des niveaux d'expression protéique par western-blot

### 4.1 Extraction et dosage des protéines solubles

Les cellules sont récoltées à différents temps après le début des traitements, après un lavage avec du PBS glacé. Leur lyse est réalisée avec un tampon (50  $\mu\text{l}$  pour 10  $\text{cm}^2$ ) dont la composition est donnée dans le Tableau III-1, en grattant le fond du puits à l'aide d'une spatule en caoutchouc tandis que la plaque est conservée sur de la glace pendant l'opération. Les tubes sont vortexés plusieurs fois, puis les extraits bruts de protéines sont obtenus par centrifugation des lysats cellulaires à 10,000 g pendant 20 min et à 4°C. Le surnageant contenant les protéines solubles est ensuite stocké à -80°C. La concentration en protéines des échantillons est déterminée en utilisant la méthode de Bradford (réactif *BioRad Protein Assay* comportant du Bleu de Coomassie). Il s'agit d'une méthode de dosage colorimétrique : le réactif est de couleur rouge sous sa forme cationique (en solution) et absorbe à 465 nm. Il est capable de se lier aux résidus aromatiques et basiques des protéines, et prend alors sa forme anionique avec un maximum d'absorbance à 590 nm. L'absorbance à 590 nm des échantillons dilués est lue par le lecteur de microplaques VICTOR<sup>2</sup><sub>TM</sub>. La concentration en protéines des échantillons est alors déterminée à l'aide d'une gamme étalon de sérum albumine bovine.

## 4.2 Electrophorèse SDS-PAGE et Western-Blot

La séparation électrophorétique des protéines est réalisée par migration sur gel SDS-PAGE, après dépôt de 30 à 40 µg de protéines préalablement diluées dans un tampon de dénaturant 5X (*Laemmli Buffer*) et bouillies pendant 3 minutes. La partie supérieure du gel SDS-PAGE est un gel de concentration (acrylamide/bis-acrylamide 5% (*Fisher Bio Reagents*), Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), SDS 0,1%), tandis que sa partie inférieure est un gel de séparation (9% d'acrylamide/bis-acrylamide, Tris-HCl 375 mM (pH 8,8), SDS 0,1%). La concentration du gel de séparation permet la séparation facile de protéines dont la masse est comprise entre 20 et 200 kDa. Le dépôt de marqueurs de poids moléculaire (*BioRad*) permet l'identification des protéines d'intérêt en évaluant la taille des bandes. La migration s'effectue en deux temps (30 min à 90V puis environ 1h à 120-130V, jusqu'à sortie du bleu) dans un tampon de migration contenant de la glycine (composition complète dans le Tableau III-1).

Après la fin de la migration, les protéines séparées sur le gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Le transfert se fait en milieu liquide durant 1h30 à 100V. La migration et le transfert sont effectués dans une cuve et un générateur *BioRad*.

Tampon	Composition
<b>Lyse</b>	Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, Désoxycholate de sodium 0,5%, EDTA 1mM. Extemporément : DTT 1 mM, PEFA Bloc 1 mM, Cocktail d'inhibiteurs de protéases et Inhibiteurs de phosphatases lorsque c'est nécessaire (NaF 50 mM, Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 1 mM).
<b>Laemmli 5X</b>	Tris-HCl 1M (pH 6,8), SDS 8%, Glycérol 30%, Bleu de bromophénol 0,4% et β-mercaptoéthanol 4%
<b>Migration</b>	Tris-HCl 25 mM (pH 8,5), Glycine 250 mM et SDS 0,1%
<b>Transfert</b>	Tris-HCl 48 mM, Glycine 39 mM, SDS 0,375 mM et Ethanol 20%

**Tableau III-1 : Composition des tampons utilisés pour la réalisation des extraits protéiques à partir des cellules en culture, pour l'électrophorèse SDS-PAGE et pour le transfert sur membrane de nitrocellulose.**

## 4.3 Révélation des immunoblots et anticorps

A l'issue de l'étape de transfert, la membrane de nitrocellulose est incubée 1h dans une solution de PBS contenant du lait écrémé à 5% afin de saturer les sites de liaison non spécifiques. Après un lavage rapide dans du PBS, les membranes sont incubées une nuit à 4°C

avec des anticorps primaires (cf. Tableau III-2) dilués dans une solution PBS-Tween 0,1% contenant 5% de BSA (*Bovin serum albumin*). Le lendemain, elles subissent trois lavages consécutifs de 10 min dans des bains de PBS-Tween 0,1% avant d'être incubées en présence d'anticorps secondaires pendant 1h (dilution dans PBS-Tween-20 à 0,1% + 5% BSA). Les membranes sont à nouveau lavées trois fois avant la révélation. Les anticorps secondaires anti-souris Alexa Fluor 680 (*Invitrogen*) et anti-lapin Alexa Fluor 800 (*Invitrogen*) sont couplés à un fluorochrome. La fluorescence est détectée par l'intermédiaire d'un scanner de fluorescence infrarouge Odyssey (*LI-COR*). Les membranes sont scannées, et le signal de fluorescence correspondant à chaque bande d'intérêt est quantifié grâce au logiciel fourni avec le scanner. Les résultats sont normalisés en les rapportant aux variations de l'intensité de fluorescence des bandes correspondant à deux protéines de référence, la  $\alpha$ -tubuline et la  $\beta$ -actine.

Antigène	Espèce	Fournisseur	Réf.	MW	Dilution
<b>Actine</b>	Souris	Sigma-Aldrich	A5316	42 kDa	1/10000
<b>HO-1</b>	Lapin	Enzo	BML- HC3001	32 kDa	1/1000
<b>iNOS</b>	Souris	BD Bioscience	610328	130 kDa	1/500
<b>P-Smad2 (Ser465/467) P-Smad3 (Ser423/425)</b>	Lapin	Cell Signaling Technology	8828 (D27F4)	52, 60 kDa	1/1000
<b>Tubuline</b>	Souris	Santa Cruz Biotechnology	sc-5274	50 kDa	1/10000

Tableau III-2 : Anticorps primaires utilisés pour la détection des protéines en immunoblot.

## 5 Mesure d'expression génique par RT-qPCR

### 5.1 Extraction et purification des ARN totaux

Afin de procéder à l'extraction des ARN totaux, les cellules sont dans un premier temps lysées par l'ajout d'1 ml de TRI reagent (*Sigma-Aldrich, ref. T9424*) par puits de plaque MW6. Ce réactif est composé de thiocyanate de guanidine et de phénol. Le principe de l'extraction repose sur l'ajout de chloroforme (200 µl/échantillon) qui permet le fractionnement du lysat en 3 phases : une phase aqueuse supérieure contenant les ARN, une interphase contenant l'ADN génomique et une phase organique contenant les protéines. La phase aqueuse est prélevée et les ARN sont précipités grâce à l'ajout de 500 µl d'isopropanol. Le culot d'ARN est obtenu après centrifugation à 10,000 g pendant 5 min, Il est ensuite lavé avec 1 ml d'éthanol à 70%, puis dissout dans 30 à 50 µl d'eau DEPC. La concentration en ARN de l'échantillon dilué est déterminée par lecture de l'absorbance à 260 nm, avec un spectrophotomètre UV NanoDrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*). Une unité d'absorbance correspond à une concentration en ARN de 40 µg/ml. L'absorbance à 280 nm est également mesurée pour estimer la qualité de l'extraction ; un rapport  $A_{260} / A_{280} \geq 2$  est considéré comme satisfaisant. Un rapport inférieur indique une contamination par des protéines ou par la phase phénol lors de l'extraction. La qualité des ARN est vérifiée par dépôt sur gel d'agarose à 1% en présence de BEt.

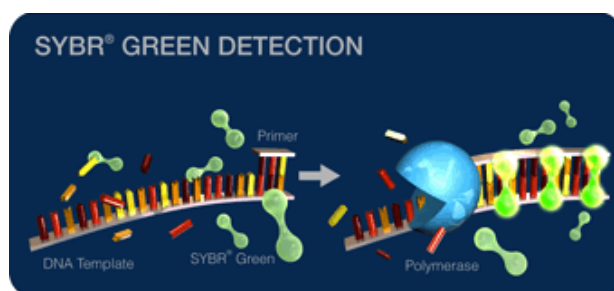
### 5.2 Rétrotranscription

Une quantité de 1 µg des ARN extraits est ensuite prélevée pour effectuer leur rétrotranscription en ADN complémentaires (ADNc), grâce au kit « qScript cDNA SuperMix » (*Quantabio*). Le mélange réactionnel comprend, en plus des ARN, un tampon concentré 5X contenant des dNTPs et du  $MgCl_2$ , des amorces aléatoires hexamériques et des amorces oligo(dT), une protéine recombinante inhibitrice des ribonucléases, ainsi qu'une transcriptase inverse qScript ajoutée extemporanément. La réaction se fait dans un volume final de 20 µl, dans un appareil Thermal HiCycler (*BioRad*), avec le programme suivant :

- 5 minutes à 25°C : Activation de la transcriptase inverse qScript
- 30 minutes à 42°C : Température optimale d'élongation des brins d'ADNc
- 5 min à 85°C : Déshybridation des brins d'ARN et d'ADNc synthétisés

### 5.3 PCR quantitative

L'analyse de l'expression génique est entreprise par PCR quantitative à partir des échantillons d'ADNc issus de la rétrotranscription. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un agent intercalant, le SYBR Green, dont la fluorescence ( $\lambda = 522 \text{ nm}$ ) s'intensifie en liant l'ADN double brin. La fluorescence augmente donc de façon proportionnelle avec les quantités croissantes d'ADN double brin générées au cours des cycles d'amplification, ce qui permet le suivi en temps réel de l'amplification des produits de PCR par une enzyme thermoactivable. Le paramètre critique à prendre en compte est le cycle à partir duquel la fluorescence dépasse le seuil de fluorescence basale (point nommé *Crossing point* ou Cp ou Ct). Dans le cas où les échantillons sont de l'ADNc issus de la rétrotranscription des ARNm, plus Cp est faible, plus cela signifie que les ARNm étaient abondants dans l'échantillon lors de l'étape de rétrotranscription, et plus l'expression du gène d'intérêt est élevée.



L'expression relative d'un gène d'intérêt par rapport à un échantillon contrôle est déterminée grâce à une équation prenant en compte la normalisation de l'expression du gène d'intérêt par un gène de référence dont l'expression est considérée comme invariante dans le système étudié. L'efficacité de l'amplification pour chaque gène considéré est également un paramètre inclus dans cette équation, qui permet donc de définir le niveau d'expression relatif d'un gène d'intérêt dans un échantillon « traité » par rapport à un échantillon contrôle :

$$\text{Niveau d'expression relatif} = \frac{\text{Efficacité}_{\text{cible}}^{\Delta C_p (\text{contrôle-traité})}}{\text{Efficacité}_{\text{référence}}^{\Delta C_p (\text{contrôle-traité})}}$$

L'appareil utilisé pour la PCR quantitative est un thermocycleur à air pulsé couplé à un microspectrofluorimètre Applied Step One Plus (*Applied Biosystems, Life Technologies*). Le kit PerfeCTa SYBR Green SuperMIX (*Quantabio*). La réaction se déroule dans le puits d'une microplaque (96 puits) scellée avec un film plastique pour éviter l'évaporation, en présence de l'échantillon d'ADNc (concentration finale 1/50e), d'amorces d'ADN spécifiques des gènes

cibles étudiés (primers) en concentration finale de 500 nM, et d'un mix dilué dans de l'eau sans nucléases contenant la sonde fluorescente SYBR Green, des dNTPs, du MgCl<sub>2</sub> et la Taq polymérase (ADN polymérase thermoactivable). Les amorces d'ADN (*Eurofins Genomics*) ont toutes été définies à l'aide du programme Primer3 (*Whitehead Institute for Biomedical Research*), au niveau de séquences localisées sur une jonction exon-exon pour prévenir l'amplification d'ADN génomique éventuellement contaminant (température d'hybridation optimale de 60°C) (Tableau III-3). La PCR est effectuée suivant le protocole décrit sur le tableau III-4.

Cible	Sens (S)	Anti-sens (AS)
<i>18S RNA</i>	5'-agttccagcacatttgcgag-3'	5'-tcacctccgtgagttctcca-3'
<i>α-Sma</i>	5'-actactgccgagcgtgagat-3'	5'-aggtagacagcgaagcca-3'
<i>Col1A</i>	5'-tggaagagcggagagtac-3'	5'-gcgcaggaaggtcagctg-3'
<i>Gusb</i>	5'-cttgaggtgaaggtgacacc-3'	5'-aattgccgtgagtggagtc-3'
<i>Hmox1</i>	5'-cacgcatatacccgctacct-3'	5'-ccagagtgttcattcgagca-3'
<i>Hprt</i>	5'-tcctcctcagaccgctttt-3'	5'-cctggtcatcatcgctaac-3'
<i>Mmp2</i>	5'-tcgccatcatcaagttccc-3'	5'-cctggggcagccatagaaa-3'
<i>Mmp9</i>	5'-cgctcatgtaccgctgtat-3'	5'-gcctgggtcaggcttagag-3'
<i>Mmp13</i>	5'-acctacactggcaaaagccat-3'	5'-tagggctgggtcacacttct-3'
<i>Nos2</i>	5'-caccttgagttcaccagt-3'	5'-accactcgtacttgggatgc-3'
<i>Nox4</i>	5'-gaagattgcctggaagaacc-3'	5'-aggtttgttgcctctgatgc-3'
<i>Nqo1</i>	5'-ttctctggccgattcagagt-3'	5'-ggctgcttgagcaaaatag-3'
<i>Pai-1</i>	5'-tgatggctcagagcaacaag-3'	5'-gccaggggtgactaaacat-3'
<i>Sesn2</i>	5'-gcattacctgctgctgata-3'	5'-aaggcctggatatgctcctt-3'
<i>Smad7</i>	5'-cggaagtcaagaggctgtgt-3'	5'-gacagcctgcagttggttg-3'
<i>Spsb1</i>	5'-cggggactcaagggtaaaa-3'	5'-aggggctcaggatcaagtc-3'
<i>Spsb2</i>	5'-aagaagagtggaggaaccacaat-3'	5'-caaaggcagagtgatattgac-3'
<i>Srxn</i>	5'-ggaaggaagaaaggagatgga-3'	5'-agagttcaggctatggggatg-3'
<i>Timp1</i>	5'-attcaaggctgtgggaatg-3'	5'-ctcagagtacgccaggaac-3'

Tableau III-3 : Amorces d'ADN (primers) utilisées en PCR quantitative ( $T_m = 60^\circ\text{C}$ ).



Etape	Température	Temps
<b>Activation de la Taq polymérase + dénaturation initiale</b>	95°C	3 min
<b>Amplification (40 cycles)</b>	Dénaturation	95°C / 15s
	Hybridation + élongation	60°C / 50s
<b>Fusion</b>	65 → 95°C	x

Tableau III-4 : Description des cycles d'amplification de la PCR.

La fluorescence est enregistrée à chaque cycle d'amplification lors de l'étape d'élongation (cf. Figure III-5). A la fin de l'amplification, une étape de fusion est effectuée, qui consiste en une augmentation progressive de la température toutes les 30 s, afin de reconstituer une courbe de fusion permettant de vérifier la présence d'un unique produit d'amplification (cf. Figure III-5). Les produits de qPCR sont également déposés sur un gel d'agarose à 1% en présence de BEt pour confirmer cela. Pour chaque couple d'amorces, deux contrôles négatifs sont aussi effectués en qPCR : des puits avec les échantillons d'ARN non rétrotranscrits (RT-), et des puits avec de l'eau sans nucléases, pour s'assurer de la spécificité de l'amplification. Chaque échantillon est déposé en triplicats pour limiter les risques d'erreurs liées aux prélèvements de faibles volumes.

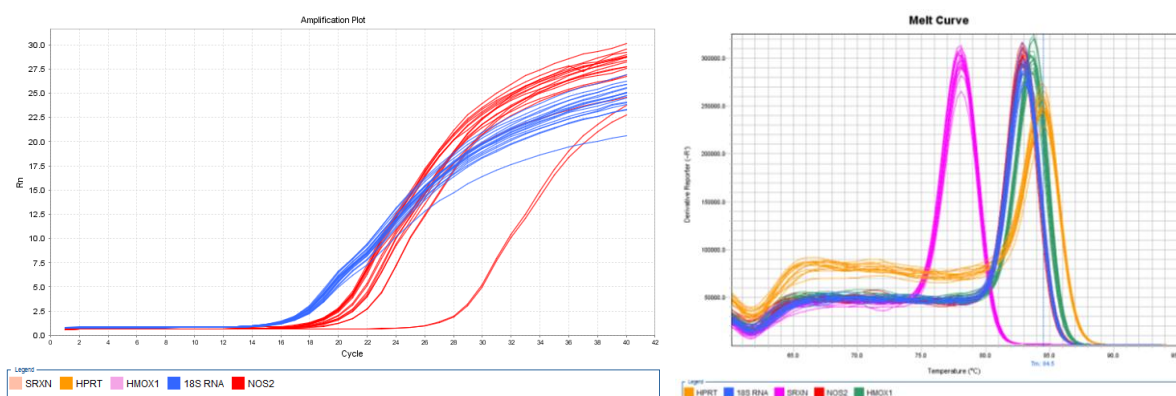


Figure III-5 : Courbes d'amplification et de fusion en PCR quantitative. (A gauche) Courbes d'amplification obtenues avec des échantillons d'ADNc de fibroblastes 3T3 traités ou non avec une combinaison de cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ). Les courbes en rouges correspondent à la fluorescence mesurée au cours des cycles d'amplification en utilisant des amorces spécifiques de Nos2, montrant la forte induction du gène par ces cytokines. Les courbes en bleu correspondent au gène de référence (ARN 18S), dont l'expression est invariante dans toutes les conditions. (A droite) Les courbes de fusion permettent de s'assurer de la présence d'un unique produit d'amplification, ici ceux obtenus avec les amorces ciblant les gènes Hprt (orange), ARN 18S (bleu), Nos2 (rouge), Srxn1 (rose) et Hmox1 (vert).

L'analyse des résultats est réalisée grâce au logiciel StepOne Software v2.3 (*Applied Biosystems, Life Technologies*). Une efficacité de 100% a été retenue pour les calculs, ce qui ramène la formule initiale à la formule suivante :

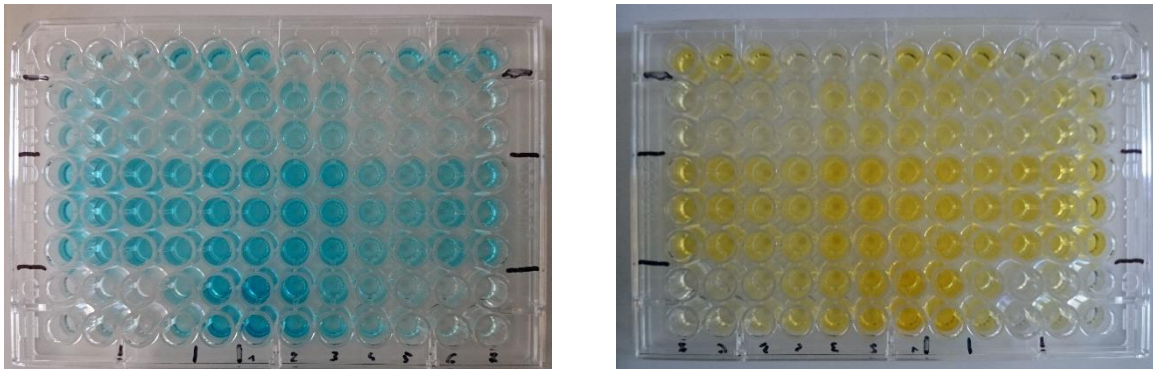
$$\text{Niveau d'expression relatif} = \frac{2^{\Delta\text{Ct cible (contrôle-traité)}}}{2^{\Delta\text{Ct référence (contrôle-traité)}}$$

## 6 Mesure de production de TGF- $\beta$ 1 par ELISA

La production de TGF- $\beta$ 1 par les cellules et la concentration en TGF- $\beta$ 1 du sérum de veau foetal sont quantifiées par l'intermédiaire d'un test ELISA Sandwich (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) « Human/mouse TGF- $\beta$ 1 ELISA Ready-SET-Go ! » (*eBioscience, Affymetrix Company*), en suivant le protocole fourni par le fabricant.

Le *coating* de l'anticorps de capture est effectué dans un premier temps en incubant chaque puits d'une plaque MW96 avec l'anticorps sur la nuit à 4°C. Le matin suivant, les puits sont vidés puis lavés 5 fois avec une solution de PBS-Tween-20 à 0,05%, avant d'être remplis d'une solution de blocage des sites de liaison non spécifiques pendant 1h à température ambiante. Une série de 5 lavages est réeffectuée, avant d'introduire dans les puits les échantillons (sérum, surnageants de culture, etc.) pour une incubation de 2h à température ambiante. L'anticorps ne reconnaît que la forme active (mature) du TGF- $\beta$ 1, lorsqu'il est dissocié du peptide LAP. C'est la raison pour laquelle une étape préalable d'activation acide du TGF- $\beta$ 1 (incubation 10 min en présence de HCl puis neutralisation par l'addition de NaOH) peut être réalisée afin de doser tout le TGF- $\beta$ 1 présent dans l'échantillon. C'est aussi un moyen de mesurer la proportion de TGF- $\beta$ 1 actif au sein de l'échantillon. Une nouvelle série de 5 lavages est faite, avant l'incubation pendant 1h à température ambiante avec l'anticorps de détection qui est conjugué à la biotine. Après 5 lavages additionnels, les puits sont incubés avec une solution d'avidine-HRP (*Horseradish peroxidase*) pendant 30 min. Après une ultime série de 7 lavages en PBS-Tween, le substrat de la HRP est ajouté dans les puits (apparition d'une coloration bleue), et la réaction est stoppée après 15 min par l'ajout de 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (la coloration vire au jaune).

L'absorbance à 450 nm est mesurée par le lecteur spectrophotométrique de microplaques VICTOR 1420, et la concentration en TGF- $\beta$ 1 des échantillons est calculée en se rapportant au coefficient directeur de la gamme étalon obtenue avec des concentrations connues de TGF- $\beta$ 1.



**Figure III-6 : Mesure de la production de TGF- $\beta$ 1 par ELISA.** (A gauche) La présence de l'anticorps de détection anti-TGF- $\beta$ 1, qui est couplé à la biotine, est révélée par l'ajout d'avidine-HRP et du substrat de la HRP. (A droite) La réaction est stoppée par l'ajout d'une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. La coloration, qui vire au jaune, est mesurée par l'absorbance à 450 nm, et est proportionnelle à la concentration en TGF- $\beta$ 1 actif dans l'échantillon.

## 7 Infection parasitaire avec *Trypanosoma musculi*

Les parasites spécifiques de la souris *Trypanosoma musculi* sont un don de Philippe Vincendeau (Laboratoire de Parasitologie, Université de Bordeaux II). La croissance du parasite sur les cellules 3T3 a été mesurée dans des puits de MW96 contenant  $2,5 \times 10^4$  cellules 3T3. Un jour avant l'infection par le parasite, les cellules sont passées dans un milieu pauvre en sérum (RPMI-1640 avec 0,5 de SVF). L'expression de la iNOS est induite par l'ajout de cytokines (IFN- $\gamma$  à 50 U/ml, TNF- $\alpha$  à 20 ng/ml, IL-1 $\beta$  à 20 ng/ml), en présence ou non de TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml), de SEITU (50  $\mu$ M), et de SB-525334 (5  $\mu$ M). L'infection avec  $4 \times 10^4$  parasites *T. musculi* est réalisée au même moment, dans un volume final de 250  $\mu$ l/puits. Le jour suivant le début de l'infection et l'induction de la iNOS par les cytokines, une partie du surnageant (50  $\mu$ l) est prélevée pour effectuer le dosage de Griess. Enfin, 3 jours après le début de l'infection, les parasites de chaque puits sont resuspendus puis transférés dans un eppendorf sur de la glace, afin de réduire leur mobilité lors du comptage sur un hématimètre de Malassez pour estimer leur croissance.

## 8 Statistiques

Tous les résultats présentés sont la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes, pour lesquelles chaque échantillon a été déposé en triplicata (dosages de Griess, RT-qPCR, tests ELISA, comptages des parasites) ou en duplicata (Western-Blot). Ils sont représentés sous la forme d'une moyenne expérimentale et les barres d'erreur correspondent à l'écart type ( $\pm$  SD). Un test *t* bilatéral sur données appariées permet enfin d'estimer leur niveau de significativité.

**CHAPITRE IV :**  
**RESULTATS EXPERIMENTAUX**



# 1 Implication des isoformes TAp73 dans la régulation de l'expression de la iNOS

## 1.1 Détermination des conditions d'induction de la iNOS dans des fibroblastes immortalisés de souris

Avant de commencer à étudier l'effet de la déficience en isoformes TAp73 sur l'expression de la iNOS dans les cellules 3T3, nous avons déterminé les conditions optimales d'induction de l'expression de la iNOS. Les fibroblastes embryonnaires de génotype sauvage (*TAp73<sup>+/+</sup>*), spontanément immortalisés en suivant le protocole 3T3, ont été utilisés dans ces expériences pour tester l'effet de combinaisons de stimuli sur les niveaux d'induction de la iNOS.

La mesure de cette induction a été effectuée à plusieurs niveaux. L'accumulation de la protéine iNOS a été analysée par western-blot, à l'issue de 48h de traitements avec de l'IFN- $\gamma$  (50 U/ml), du TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) et de l'IL-1 $\beta$  (20 ng/ml) (cf. Figure III-1A/B). Les résultats indiquent que ces cytokines seules sont incapables d'induire une accumulation de la protéine. Les combinaisons TNF- $\alpha$  + IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  + IFN- $\gamma$  permettent une très faible induction de l'expression de la protéine iNOS. Seul le traitement simultané avec ces trois cytokines permet d'obtenir une induction conséquente de la iNOS dans les cellules 3T3 (multiplication par 120 si on la rapporte à l'induction obtenue avec les deux cytokines citées). D'autres résultats (non rapportés ici) montrent qu'une induction identique de la iNOS est obtenue en remplaçant l'IL-1 $\beta$  par du LPS (1  $\mu$ g/ml).

Nous avons évalué l'activité enzymatique de la iNOS au cours de chaque expérience en mesurant (grâce au réactif de Griess) la concentration en nitrite (NO $_2^-$ ), un dérivé stable de NO qui s'accumule dans les surnageants de culture des cellules. Les résultats présentés Figure III-1C montrent que la production de NO par les cellules 3T3 après 48h de traitement avec les cytokines est corrélée au niveau d'expression de la iNOS. Tandis que les cellules 3T3 ne produisent pas de NO en absence de cytokines ou avec une cytokine seule, les combinaisons TNF- $\alpha$  + IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  + IFN- $\gamma$  sont à l'origine d'une production modérée de nitrite (respectivement 9,5 et 8,9  $\mu$ M). La combinaison des 3 stimuli induit une forte production de nitrite par ces cellules (environ 75  $\mu$ M à 48h).

Puisque l'induction de la iNOS dépend d'une régulation transcriptionnelle, nous avons également mesuré l'expression du gène *Nos2* par PCR quantitative après une étape de rétrotranscription des ARN totaux, 24h après le début des traitements (cf. Figure III-1D). Le gène est très peu exprimé à l'état basal ( $C_p > 35$  cycles), mais un traitement par le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  pendant 24h suffit pour induire une forte accumulation d'ARNm *Nos2* (x200 environ). Cette induction est donc insuffisante pour permettre une forte expression de la protéine iNOS, dont la présence est à peine détectable en western-blot après 48h de stimulation. Cette induction transcriptionnelle de *Nos2* est largement potentialisée par l'ajout d'IFN- $\gamma$  (x16,8 avec 50 U/ml), mais beaucoup moins par l'IFN- $\beta$ , pourtant en forte concentration (x4,7 avec 1000 U/ml).

Pour la suite de nos travaux, seules les combinaisons de traitements permettant l'induction la plus forte de l'expression de la iNOS ont été retenues :

- IFN- $\gamma$  (50 U/ml) + TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) + IL-1 $\beta$  (20 ng/ml)
- IFN- $\gamma$  (50 U/ml) + TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) + LPS (1  $\mu$ g/ml)

Les concentrations utilisées permettent une induction maximale de la iNOS, car des résultats supplémentaires (non montrés ici) indiquent que la production de NO et l'expression de la protéine iNOS demeurent invariantes pour des concentrations supérieures en cytokines.

## 1.2 Les isoformes TAp73 régulent négativement l'expression de la iNOS

### 1.2.1 Surexpression de la iNOS dans les 3T3 TAp73<sup>-/-</sup>

Afin d'examiner l'effet de la perte d'expression des isoformes TAp73 dans les cellules 3T3 issues de souris TAp73<sup>-/-</sup>, nous avons réalisé des cinétiques d'induction de l'expression de la iNOS dans des clones de 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> (souris wt-1 et wt-6) et TAp73<sup>-/-</sup> (souris ko-4 et ko-5). Les différentes lignées fibroblastiques, après avoir été ensemencées à une densité identique et être parvenues à confluence, ont été stimulées par une combinaison d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  (aux concentrations précédemment définies), puis ont été lysées à différents temps après le début de la stimulation. Les surnageants de culture étaient récoltés au même moment pour mesurer leur concentration en nitrite. Nous avons aussi comparé les cinétiques d'induction

transcriptionnelle de *Nos2* dans ces lignées cellulaires en mesurant les niveaux d'ARNm *Nos2* par RT-qPCR.

Les résultats que nous avons obtenus indiquent une augmentation substantielle de l'induction de l'expression de la protéine iNOS en réponse aux cytokines dans les cellules 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>*, quel que soit le couple de lignées cellulaires analysées et la combinaison de cytokines inductrices utilisée (cf. Figure III-2A/B). Le suivi de l'expression de la protéine iNOS au cours des 48h de stimulation (cf. Figure III-2C/D) révèle une accumulation de la protéine iNOS nettement plus forte et rapide dans les cellules 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>* par rapport aux 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>* en réponse aux cytokines (9,6 fois plus de protéines iNOS au temps 16h, et 6,8 fois plus au temps 24h). L'apparition de la protéine iNOS dans les cellules 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>* a lieu de façon plus précoce : l'analyse visuelle des blots suggère un début d'accumulation de la protéine iNOS visible dès 8h dans ces cellules et une forte expression à partir de la seizième heure de stimulation. Dans les cellules 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>*, la protéine ne devient détectable et quantifiable par western-blot qu'après 16h de stimulation et son expression ne devient vraiment significative qu'après 24h.

La surexpression de la iNOS observée dans les 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>* se répercute sur les quantités de NO produites par ces cellules, comme en attestent les dosages du nitrite que nous avons effectués dans les surnageants de culture (cf. Figure III-2E). Ainsi, 24h après le début de la stimulation, la concentration en nitrite dans le surnageant des 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>* est de 19,8  $\mu\text{M}$ , contre seulement 3,3  $\mu\text{M}$  dans celui des cellules *TAp73<sup>+/+</sup>*. Cette hausse d'activité iNOS des cellules *TAp73<sup>-/-</sup>* perdure, même 72h après le début de l'induction (85,9  $\mu\text{M}$  de nitrite dans les cellules *TAp73<sup>-/-</sup>* au lieu de 30,9  $\mu\text{M}$  dans les cellules *TAp73<sup>+/+</sup>*). La stimulation des fibroblastes avec du LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) au lieu de l'IL-1 $\beta$ , en plus de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$ , aboutit à des résultats très similaires en termes d'expression de la iNOS et de production de NO qui sont nettement à l'avantage des cellules 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>* (non montré).

Nous avons aussi constaté une hausse de l'induction transcriptionnelle du gène *Nos2* dans les 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>*, comme le montrent les résultats présentés sur la Figure III-2F. L'augmentation du niveau de transcrits *Nos2* dans les cellules 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>* est particulièrement marquée durant les 24 premières heures de l'induction, avec des ARNm *Nos2* en moyenne 2,2 fois plus abondants dans les cellules 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>* à 16h, et 3,4 fois plus abondants à 24h. Nous avons remarqué un décalage temporel du niveau maximal d'induction transcriptionnelle de *Nos2* :



celui-ci se situe dès 24h pour les 3T3 *TAp73*<sup>-/-</sup>, et seulement à partir de 36h dans les 3T3 *TAp73*<sup>+/+</sup>. Il est à noter que le niveau de transcrits *Nos2* diminue à partir de 48h dans les deux types de lignées, tandis que la protéine continue de s'accumuler pour atteindre un maximum d'expression à 48h.

### 1.2.2 Les isoformes TAp73 sont nécessaires à la dégradation de la iNOS par le protéasome

Pour savoir si la forte surexpression de la protéine iNOS résultant de la déficience en isoformes TAp73 pourrait provenir, en plus d'une plus forte induction transcriptionnelle, de mécanismes affectant la stabilité de la protéine iNOS, nous avons voulu comparer son temps de demi-vie dans les 3T3 *TAp73*<sup>+/+</sup> et *TAp73*<sup>-/-</sup>. Nous avons mesuré la stabilité de la protéine iNOS en induisant en premier lieu son expression dans les fibroblastes 3T3 avec de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  (mix de cytokines) pendant 24h, puis en incubant les cellules en présence de 10  $\mu$ g/ml de cycloheximide pour interrompre tout processus de synthèse protéique. Des extraits protéiques ont ensuite été récoltés à différents moments pour mesurer par western-blot la dégradation de la protéine iNOS au cours du temps. Les résultats présentés sur la Figure III-3A/B indiquent que la dégradation de la protéine iNOS est significativement plus rapide dans les 3T3 *TAp73*<sup>+/+</sup> par rapport aux 3T3 *TAp73*<sup>-/-</sup>. Dans les cellules *TAp73*<sup>+/+</sup>, la iNOS résiduelle est presque inexistante après 24h de traitement avec la cycloheximide (environ 16% de la quantité de départ), tandis qu'il en reste près de la moitié dans les cellules *TAp73*<sup>-/-</sup>.

Le processus de dégradation de la protéine iNOS suit une loi de décroissance exponentielle, ce qui nous a permis d'estimer le temps de demi-vie de la protéine iNOS dans les cellules *TAp73*<sup>+/+</sup> et *TAp73*<sup>-/-</sup> (cf. Figure III-3C). Nous avons ainsi calculé un temps de demi-vie de la iNOS de 9,6 heures dans les 3T3 *TAp73*<sup>+/+</sup>, tandis que ce temps est de 21,5 heures dans les 3T3 *TAp73*<sup>-/-</sup>, ce qui représente une augmentation substantielle de la stabilité de la protéine iNOS dans ces cellules déficientes en isoformes TAp73. L'expression des protéines de référence (actine et tubuline) s'est révélée stable tout au long du traitement avec la cycloheximide.

Nous avons ensuite souhaité évaluer l'implication du protéasome dans le déficit de dégradation de la protéine iNOS observé dans les 3T3 *TAp73*<sup>-/-</sup>. Pour cela, des expériences similaires à celles décrites précédemment ont été réalisées, en ajoutant des inhibiteurs du

protéasome au moment du traitement avec la cycloheximide. Après un traitement avec le MG-132 (résultats présentés sur la Figure III-3E/F), qui inhibe les activités peptidases multiples du protéasome, la stabilité de la protéine iNOS dans les 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>* après 8h de traitement avec la cycloheximide augmente pour devenir similaire à celle de la iNOS dans les 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>* (respectivement 83 et 85% de iNOS résiduelle après 8h de traitement). L'inhibition du protéasome induit donc un effet stabilisateur de la iNOS très fort dans les cellules *TAp73<sup>+/+</sup>*, tandis qu'il est quasiment imperceptible dans les cellules *TAp73<sup>-/-</sup>*.

Une cinétique de dégradation de la iNOS dans les 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>* et *TAp73<sup>-/-</sup>* a aussi été réalisée en présence de lactacystine (cf. Figure III-3D), un autre inhibiteur du protéasome plus sélectif encore que le MG-132 (qui inhibe aussi les calpaines et certaines sérines protéases). Cette fois encore, nous avons observé une forte augmentation de la stabilité de la protéine iNOS dans les 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>* grâce au traitement avec la lactacystine, alors que celle-ci n'avait aucun effet dans les cellules *TAp73<sup>-/-</sup>*. L'ensemble de ces résultats démontre que l'expression des isoformes *TAp73* est nécessaire pour une dégradation optimale de la protéine iNOS par le protéasome.

### 1.2.3 La régulation négative de la iNOS par les isoformes *TAp73* dépend d'un facteur sécrété par les cellules

En multipliant les expériences d'induction de l'expression de la iNOS dans les 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>* et *TAp73<sup>-/-</sup>*, nous avons finalement remarqué que la surexpression observée dans les cellules *TAp73<sup>-/-</sup>* semblait dépendre des conditions dans lesquelles sont cultivées les cellules avant l'induction : le phénotype nous est apparu beaucoup plus marqué lorsque les cellules sont maintenues en culture plusieurs jours avant le début de l'induction.

Pour tester l'influence de la durée de préculture des cellules sur la capacité d'induction de l'expression de la iNOS, nous avons d'abord maintenu les cellules dans un milieu pauvre en sérum (0,5%) pendant un, trois ou cinq jours, afin de limiter les effets de potentiels facteurs régulateurs présents dans le sérum. A l'issue de cette période d'incubation, nous avons traité les cellules avec le cocktail de cytokines sans avoir renouvelé le milieu de culture. Les résultats montrés sur la Figure III-4A/B indiquent que la régulation négative de l'expression de la iNOS exercée par les isoformes *TAp73* apparaît seulement après que les cellules aient été maintenues en culture plusieurs jours avant l'induction. En effet, l'expression de la iNOS dans les 3T3

*TAp73<sup>+/+</sup>* et *TAp73<sup>-/-</sup>* est identique lorsque l'induction a lieu le lendemain de l'ensemencement dans le milieu pauvre en sérum. En revanche, après 3 jours de préculture, l'expression de la iNOS est réduite de 58% dans les cellules *TAp73<sup>+/+</sup>*, mais de seulement 26% dans les cellules *TAp73<sup>-/-</sup>*. Après 5 jours, la différence d'expression de la iNOS est encore plus influencée par les isoformes TAp73, puisqu'elle se trouve réduite de 76% dans les 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>* et de seulement 35% dans les 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>*. Cette expérience suggère que les cellules 3T3 produisent au moins un facteur qui régule négativement l'expression de la iNOS, et que son effet est très nettement renforcé par la présence des isoformes TAp73 dans les cellules.

Nous suspicions également que la concentration en sérum utilisée au moment de l'induction de la iNOS puisse être à l'origine de la surexpression de la iNOS observée dans les 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>*. Nous avons donc comparé l'induction de l'expression de la iNOS dans les deux lignées cellulaires après les avoir incubées pendant 24h dans un milieu pauvre (0,5%) ou riche (5%) en sérum (cf. Figure III-4C/D). Les résultats montrent que la privation en sérum permet d'augmenter de façon spectaculaire l'induction de l'expression de la iNOS dans les 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>* (avec un facteur 10,2), ce qui lui permet d'atteindre le même niveau que dans les 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>* pour lesquels l'effet de la privation est beaucoup plus modeste (facteur 1,9). Lorsque les cellules ne subissent pas de période prolongée de préculture, la présence d'une forte concentration en sérum est donc nécessaire pour observer la forte différence d'induction d'expression de la iNOS observée entre les cellules *TAp73<sup>+/+</sup>* et *TAp73<sup>-/-</sup>*.

Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que les isoformes TAp73 permettent un maintien de la sensibilité à un ou plusieurs facteurs produits par les fibroblastes 3T3 et présents dans le sérum qui exercent une répression de l'expression de la iNOS.

### 1.3 Réduction de l'effet suppresseur du TGF- $\beta$ sur l'induction de la iNOS dans les 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>*

A la suite des résultats acquis, nous nous sommes mis en quête d'identifier le ou les facteur(s) produit(s) par les cellules 3T3 et présent(s) dans le sérum, dont l'effet négatif sur l'expression de la iNOS serait en partie dépendant des isoformes TAp73. Notre attention s'est assez rapidement portée sur le TGF- $\beta$ , une cytokine immunosuppressive exerçant une régulation négative sur l'expression de la iNOS à de multiples niveaux, notamment transcriptionnels et post-traductionnels. De plus, cette cytokine est produite par les fibroblastes

et les sérums de veau fœtal utilisés en culture cellulaire sont connus pour contenir de fortes concentrations en TGF- $\beta$  sous forme latente<sup>545</sup>. Ces caractéristiques se rapprochant fortement des propriétés d'inhibition de l'expression de la iNOS par les isoformes TAp73 décrites précédemment, nous avons par conséquent entrepris de tester l'implication du TGF- $\beta$  dans cette régulation. Afin de limiter les interférences provenant du TGF- $\beta$  vraisemblablement présent dans le sérum et du TGF- $\beta$  produit par les cellules, nous avons réalisé des cinétiques d'induction de l'expression de la iNOS après privation quasi-complète de sérum (0,5%), le jour suivant l'ensemencement, en absence ou en présence de TGF- $\beta$ 1 exogène. Le TGF- $\beta$ 1 est l'isoforme de TGF- $\beta$  la plus étudiée et celle possédant le plus fort effet répresseur sur l'expression de la iNOS d'après plusieurs études<sup>233</sup>.

Dans ces conditions, comme mentionné auparavant, l'induction de la iNOS par le mix de cytokines n'est que légèrement supérieure dans les 3T3 *TAp73*<sup>-/-</sup>, avec une hausse de seulement 50% de l'expression de la protéine (cf. Figure III-5A/B), qui ne se répercute pas sur la production de NO (cf. Figure III-5C). L'ajout de TGF- $\beta$ 1 exogène (5 ng/ml) au moment de l'induction de la iNOS réprime très fortement l'expression de cette dernière dans les 3T3 *TAp73*<sup>+/+</sup> (62% de répression à 16h, 60% à 24h) et la production de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (qui passe de 12,3 à 5,8  $\mu$ M après 24h) (cf. Figure III-5D). Cependant, le TGF- $\beta$ 1 n'exerce qu'un très léger effet répresseur sur l'induction de la iNOS dans les cellules *TAp73*<sup>-/-</sup> (seulement 7% à 16h, et 20% à 24h d'après son expression quantifiée en western-blot). De façon remarquable, grâce au traitement des cellules avec le TGF- $\beta$ 1, le ratio d'expression de la iNOS *TAp73*<sup>+/+</sup> vs *TAp73*<sup>-/-</sup> passe de 1,47 à 2,76. Ainsi, dans des cultures privées de sérum, l'ajout de TGF- $\beta$ 1 exogène est suffisant pour restaurer l'effet négatif des isoformes TAp73 sur l'expression de la iNOS.

Ces résultats semblent suggérer que les isoformes TAp73 nécessitent la présence du TGF- $\beta$  pour limiter l'induction de la iNOS. Dans le cas où cette hypothèse se vérifierait, une inhibition de la voie de signalisation dépendante du TGF- $\beta$  devrait suffire à supprimer l'effet des isoformes TAp73 dans les cellules 3T3. La molécule SB-525334 est un puissant inhibiteur sélectif du récepteur de type I au TGF- $\beta$  (ALK5)<sup>546</sup>. Dans des expériences où la concentration en sérum est élevée (5%) et où il y a donc une forte surexpression de la iNOS dans les cellules *TAp73*<sup>-/-</sup>, le SB-525334 (5  $\mu$ M) augmente de façon spectaculaire l'expression de la iNOS dans les cellules *TAp73*<sup>+/+</sup> avec un facteur 4 (cf. Figure III-5E/F), de telle sorte qu'en sa présence l'expression de la iNOS devient identique dans les deux lignées. Cet inhibiteur a un effet beaucoup plus modéré sur l'induction de l'expression de la iNOS dans les 3T3 *TAp73*<sup>-/-</sup> (facteur

1,8). Ceci est en accord avec le plus faible effet répresseur exercé par le TGF- $\beta$ 1 exogène sur l'expression de la iNOS dans ces cellules. Ces résultats suggèrent, comme nous l'avions supposé, que le TGF- $\beta$  contenu dans le sérum est impliqué dans la régulation négative de l'expression de la iNOS par les isoformes TAp73. Nous pouvons en outre remarquer que le SB-525334 permet de supprimer complètement les effets cumulés du TGF- $\beta$  contenu dans le sérum et de celui ajouté de façon exogène, puisque dans les conditions où les deux sont présents l'expression de la iNOS est aussi rétablie au même niveau dans les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> et TAp73<sup>-/-</sup>. Enfin, ces résultats ont pu être confirmés par le dosage des ions NO<sub>2</sub><sup>-</sup> dans les surnageants de culture, avec une hausse très importante de la concentration en NO<sub>2</sub><sup>-</sup> lorsque les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> sont traités avec le SB-525334, tandis que cette hausse est très légère pour les 3T3 TAp73<sup>-/-</sup> (cf. Figure III-5G). Prises dans leur globalité, ces données indiquent qu'il existe un dialogue entre les isoformes TAp73 et la voie de signalisation du TGF- $\beta$  qui permet la répression de l'expression de la iNOS.

## 1.4 Mécanismes de coopération entre les isoformes TAp73 et le TGF- $\beta$ dans la répression de la iNOS

Afin de chercher des pistes mécanistiques qui pourraient expliquer par quels moyens les isoformes TAp73 potentialisent l'effet répresseur du TGF- $\beta$  sur l'induction de la iNOS, nous avons choisi de suivre l'état de phosphorylation de SMAD2 dans les cellules TAp73<sup>+/+</sup> et TAp73<sup>-/-</sup> dans différentes conditions. L'activation par phosphorylation de SMAD2 sur les résidus Ser465 et Ser467 est l'un des premiers événements à initier la voie de signalisation du TGF- $\beta$ . Elle se produit lors d'une interaction transitoire entre SMAD2 et le récepteur de type I au TGF- $\beta$  (T $\beta$ RI/ALK5) qui est lui-même phosphorylé par le récepteur T $\beta$ RII après sa liaison au TGF- $\beta$ . Cette phosphorylation de SMAD2 est un préalable à son association avec SMAD4 et à la translocation du complexe dans le noyau<sup>547</sup>. Dans les 3T3 TAp73<sup>-/-</sup>, nous avons effectivement mesuré une forte accumulation de la forme phosphorylée de SMAD2 en réponse au TGF- $\beta$ 1 ajouté de façon exogène (avec un facteur 10 suite à un traitement avec 5 ng/ml de TGF- $\beta$ 1) (cf. Figure III-6D). Le traitement préalable des cellules avec le SB-525334 prévient totalement l'activation de SMAD2 par phosphorylation. Le niveau de phosphorylation augmente très rapidement après la stimulation avec le TGF- $\beta$ 1, et il atteint son maximum au bout d'une heure (cf. Figure III-6C). Ce niveau de phosphorylation est ensuite maintenu au moins pendant 8h.

Nous avons commencé par mesurer l'impact de la concentration en sérum (deux lots provenant de fournisseurs différents) sur le niveau de phosphorylation de SMAD2, 24h après l'induction de la iNOS dans les 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>* et *TAp73<sup>-/-</sup>* (cf. Figure III-6A/B). Les résultats montrent que le niveau basal de phosphorylation de SMAD2 dans un milieu de culture appauvri en sérum est très faible, et associé à une induction équivalente de la iNOS dans les cellules *TAp73<sup>+/+</sup>* et *TAp73<sup>-/-</sup>*. De façon très intéressante, le passage des cellules dans un milieu riche en sérum (10%) induit une accumulation significative de la forme phosphorylée de SMAD2 dans les 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>* (avec un facteur 3,10) qui ne se produit aucunement dans les 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>*. Dans ces mêmes conditions, le SB-525334 ramène le niveau de phosphorylation de SMAD2 à un niveau semblable à celui observé dans le milieu pauvre en sérum. Ces résultats suggèrent que l'activation de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  par le TGF- $\beta$  présent dans le sérum est amoindrie dans les 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>* lorsqu'ils sont cultivés de façon prolongée dans ces conditions. Ils peuvent être corrélés à la surexpression de la iNOS observée dans ces cellules dans des conditions où le milieu de culture est riche en TGF- $\beta$  endogène présent dans le sérum ou produit par les cellules.

La totalité du TGF- $\beta$  présent sous forme latente dans le sérum peut être activé grâce à la chaleur suite à une incubation préalable du sérum pendant 10 minutes à 80°C. En incubant les 3T3 avec ce sérum activé par la chaleur, nous avons observé une forte augmentation de la phosphorylation de SMAD2 à la fois dans les 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>* et *TAp73<sup>-/-</sup>* (avec un facteur voisin de 6). Ceci démontre que la concentration en TGF- $\beta$  latent présente dans le sérum est suffisamment importante pour activer efficacement SMAD2 par phosphorylation dans les deux types de lignées. Le SB-525334 inhibe complètement la phosphorylation de SMAD2 induite par le TGF- $\beta$  activé par la chaleur.

A partir de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que la perte d'effet répresseur du TGF- $\beta$  sur l'expression de la iNOS constatée dans les cellules génétiquement déficientes en isoformes *TAp73* pourrait provenir d'un déficit d'activation du récepteur ALK5 en réponse au TGF- $\beta$  dans ces cellules. Nous avons donc entrepris de tester la sensibilité des 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>* et *TAp73<sup>-/-</sup>* au TGF- $\beta$ , en mesurant le niveau de phosphorylation de SMAD2 en réponse à des doses croissantes de TGF- $\beta$ 1 (après 1h de stimulation dans un milieu appauvri en sérum). Les résultats démontrent un niveau identique de phosphorylation de SMAD2 dans les cellules *TAp73<sup>+/+</sup>* et *TAp73<sup>-/-</sup>* en réponse à ces concentrations de TGF- $\beta$ 1 (cf. Figure III-6E/F). Le niveau de phosphorylation maximal de SMAD2 est atteint pour la même concentration en TGF- $\beta$ 1,

soit 1 ng/ml, et une concentration de 100 pg/ml est suffisante pour parvenir à la moitié de ce niveau maximal dans les deux types de lignées.

Les résultats précédents suggèrent que si le niveau basal de phosphorylation de SMAD2 semble supérieur dans les 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>* lorsque les cellules sont cultivées de façon prolongée (24h) dans un milieu contenant une forte concentration en sérum, l'activation précoce (1h) de la voie en réponse à du TGF- $\beta$ 1 exogène ne semble en revanche pas altérée par la déficience en isoformes TAp73. Ces résultats suggèrent que les isoformes TAp73 pourraient moduler la réponse à long terme des cellules au TGF- $\beta$ , mais ils ne permettent pas encore d'expliquer la perte d'effet suppresseur du TGF- $\beta$ 1 exogène utilisé en forte concentration (5 ng/ml) sur l'induction de la iNOS dans les cellules *TAp73<sup>-/-</sup>*, car dans ces conditions les niveaux d'activation par phosphorylation de SMAD2 sont identiques pour les deux génotypes après 1h de traitement.

Nous avons pu confirmer, par l'intermédiaire d'un dosage ELISA, que les différents lots de sérum utilisés lors de cette étude contiennent une quantité importante de TGF- $\beta$ 1 ( $\geq 500$  pg/ml), suffisante pour expliquer l'effet répresseur du sérum sur l'induction de la iNOS et le fort niveau basal de phosphorylation de SMAD2 constatés dans les 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>* (cf. Figure III-7A). Nous avons aussi mesuré la production totale de TGF- $\beta$ 1 par les 3T3, que nous n'avons pas trouvé affectée par le statut de *TAp73* : la production journalière s'élève à 65 pg/ml pour les cellules des deux génotypes (cf. Figure III-7B/C).

Afin de trouver une explication au déficit de dégradation de la protéine iNOS par le protéasome observé dans les 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>*, nous avons décidé de suivre l'expression des gènes *Spsb1* et *Spsb2*. Ces deux gènes codent pour des protéines SOCS-box à domaine SPRY (*SplA/ryanodine receptor*) qui servent de sous-unité de reconnaissance de la iNOS au sein de complexes E3 ubiquitine ligase de type ECS (cf. Introduction, partie 1.5.3). De façon très intéressante, nous avons constaté une forte induction de l'expression du gène *Spsb1* en réponse au TGF- $\beta$ 1 dans les 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>* (avec un facteur 3,4 après 24h de traitement), qui n'a pas lieu dans les 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>* (cf. Figure III-7D/E). Les isoformes TAp73 semblent ainsi nécessaires à l'induction de l'expression de SPSB1 en réponse au TGF- $\beta$ 1, ce qui pourrait expliquer au moins en partie la plus grande stabilité de la iNOS dans les 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>*. Nous avons enfin remarqué que l'expression de *Spsb2* n'est pas significativement modifiée par le traitement avec le TGF- $\beta$ 1, que ce soit dans les cellules *TAp73<sup>+/+</sup>* ou *TAp73<sup>-/-</sup>*.

## 1.5 Conséquences fonctionnelles de la surproduction de NO induite par la déficience en isoformes TAp73

### 1.5.1 Renforcement de la réponse antioxydante dépendante de Nrf2 et de NO dans les 3T3 TAp73<sup>-/-</sup>

Comme cela a été décrit dans l'introduction, les fortes concentrations en NO peuvent induire l'activation de multiples facteurs de transcription tels que p53 et HIF-1. Le facteur de transcription Nrf2 (facteur apparenté à NF-E2) est lui aussi un effecteur activé par l'activité iNOS. Il coordonne l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et qui protègent les cellules d'un stress oxydatif (ROS) ou nitrosant causé par une forte concentration en NO et en ses dérivés.

Malgré la forte augmentation de la production de NO par les 3T3 TAp73<sup>-/-</sup>, nous n'avons pas constaté de hausse de leur mortalité en comparaison avec les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup>. C'est la raison pour laquelle nous avons fait l'hypothèse d'un renforcement de la réponse cytoprotectrice dépendante de Nrf2 dans ces cellules. Pour évaluer les conséquences éventuelles de la perte d'expression des isoformes TAp73 sur l'activation de Nrf2, nous avons mesuré par RT-qPCR l'induction de l'expression de plusieurs gènes cibles classiquement activés par ce facteur de transcription dans les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> et TAp73<sup>-/-</sup>, en réponse au mix de cytokines proinflammatoires. L'expression des gènes codant la sulfirédoxine (*Srxn1*), l'hème oxygénase 1 (*Hmox1*), la NADPH quinone déshydrogénase 1 (*Nqo1*) et la sestrine 2 (*Sesn2*) a été analysée 24h après le début de la stimulation cytokinique des cellules 3T3.

Les résultats présentés sur la Figure III-8 montrent tout d'abord que, comme cela était attendu, la stimulation des cellules 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> avec une combinaison d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  a pour conséquence d'induire de façon substantielle l'expression des quatre gènes cibles de Nrf2 analysés : l'expression de *Hmox1* est multipliée par 5,2, celle de *Srxn* par 2,2, celle de *Nqo1* par 3,7 et celle de *Sesn2* par 2,1 (cf. Figures III-8C/D/E/F respectivement). Ceci suggère que le facteur de transcription Nrf2 est bien activé dans cette lignée de fibroblastes en réponse à une stimulation par les cytokines proinflammatoires qui induisent l'expression de la iNOS. De façon remarquable, nous avons constaté qu'une augmentation importante de l'induction de ces gènes cibles de Nrf2 apparaît dans les 3T3 TAp73<sup>-/-</sup> en réponse au traitement par le mix de cytokines dans un milieu riche en sérum (5%). Après 24h, l'expression du gène



*Hmox1* dans les cellules 3T3 *TAp73*<sup>-/-</sup> est multipliée par 26, celle de *Srxn* par 4,3, celle de *Nqo1* par 6,8 et celle de *Sesn2* par 3,1. Le niveau basal d'expression de ces différents gènes est très comparable pour les deux génotypes, ce qui implique que leur niveau d'expression relatif est très largement supérieur dans les cellules *TAp73*<sup>+/+</sup> à l'issue des 24h de stimulation, avec un ratio *TAp73*<sup>-/-</sup> vs *TAp73*<sup>+/+</sup> culminant par exemple à 10 pour *Hmox1*.

Pour déterminer si l'augmentation de l'induction de ces gènes cibles de Nrf2 dans les 3T3 *TAp73*<sup>-/-</sup> est bien la conséquence d'une surproduction de NO, nous avons mesuré leur expression après 24h de traitement avec le mix de cytokines en présence d'un inhibiteur de l'activité iNOS. L'aminoguanidine (2 mM) a été choisie car elle permet d'inhiber en totalité l'activité enzymatique de la iNOS (cf. Figure III-8A), mais aussi car elle n'a pas d'effet sur l'expression du gène *NOS2* (cf. Figure III-8B) et ne présente pas de toxicité à cette concentration. L'analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes *Hmox1*, *Srxn* et *Nqo1* montre que le traitement des cellules avec l'aminoguanidine prévient en totalité leur induction par le mix de cytokines (cf. Figure III-8C/D/E). Ceci démontre donc que la hausse de leur induction par le mix de cytokines dans les 3T3 *TAp73*<sup>-/-</sup> est bien la conséquence de la surproduction de NO dans ces cellules. Nous n'avons pas observé de perte de l'induction du gène *Sesn2* lors du traitement avec l'aminoguanidine, ce qui suggère que son induction par le cocktail de cytokines dans les 3T3 *TAp73*<sup>-/-</sup> ne dépend apparemment pas de la synthèse de NO (cf. Figure III-8F). En conclusion, nous pouvons donc affirmer que les isoformes TAp73 limitent fortement l'expression de gènes cibles de Nrf2 dont l'induction est dépendante de la production de NO.

Après avoir démontré que la surexpression de la iNOS dans les 3T3 *TAp73*<sup>-/-</sup> a pour conséquence de renforcer l'induction de gènes sous la dépendance de Nrf2 et assurant une adaptation au stress nitrosant et oxydant, nous avons voulu savoir si ce phénomène était aussi dépendant de la signalisation par le TGF- $\beta$ . Nous avons pour cela réalisé une série d'expériences similaires aux précédentes en analysant l'effet d'un traitement avec du TGF- $\beta$ 1 exogène et avec l'inhibiteur sélectif d'ALK5 (SB-525334). Les résultats indiquent que le TGF- $\beta$ 1 exogène permet de réduire l'accumulation d'ARNm *Nos2* en réponse à la stimulation par le mix de cytokines de 34% dans les 3T3 *TAp73*<sup>+/+</sup>, tandis qu'il n'a pas d'effet significatif sur les 3T3 *TAp73*<sup>-/-</sup> (cf. Figure III-9A). De façon intéressante, ces variations d'expression du gène *Nos2* se répercutent directement sur le niveau d'induction des gènes cibles de Nrf2 analysés dans les mêmes conditions : les inductions de *Hmox1*, *Srxn* et *Nqo1* sont respectivement réduites de 66%, 30% et 64% par le TGF- $\beta$ 1 dans les cellules *TAp73*<sup>+/+</sup>, alors qu'elles ne sont

pas affectées dans les cellules *TAp73<sup>-/-</sup>* (cf. Figure III-9B/C/D).

De même que le traitement des cellules avec le SB-525334 supprime l'effet négatif exercé par les isoformes *TAp73* sur l'induction du gène *Nos2* (cf. Figure III-9A), il permet aussi de rétablir un niveau identique d'induction des trois gènes cibles de Nrf2 testés (cf. Figure III-9B/C/D). L'inhibition de la voie de signalisation dépendante d'ALK5 permet en effet de multiplier l'expression de *Hmox1* par 7,9, celle de *Srxn* par 6,2 et celle de *Nqo1* par 5,4 dans les 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>* en comparaison aux mêmes cellules non traitées. D'un autre côté, le traitement des 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>* avec le SB-525334 n'a aucun effet significatif sur l'induction de *Hmox1* et *Nqo1* par le mix de cytokines, et seulement un faible effet sur celle de *Srxn* (facteur 2,1). L'expression de la protéine HMOX1 a aussi été suivie par Western-Blot dans ces conditions, et elle confirme les résultats obtenus par RT-qPCR sur les variations des niveaux de transcrits *Hmox1* : la protéine HMOX1 apparaît fortement induite par le mix de cytokines et très surexprimée dans les cellules 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>* lorsque ces dernières sont cultivées en présence d'une forte concentration de sérum (cf. Figure III-9E). Le traitement avec le TGF- $\beta$ 1 exalte ce différentiel d'expression tandis que le SB-525334 permet de rétablir, dans les 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>*, une expression similaire de HMOX1 à celle observée dans les 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>*. En conclusion, toutes ces données indiquent que la coopération entre les isoformes *TAp73* et la voie de signalisation du TGF- $\beta$  permet de moduler la réponse génique dépendante de Nrf2 par l'intermédiaire de leur effet répresseur sur l'induction de la iNOS.

Afin de montrer la pertinence du choix des gènes cibles de Nrf2 que nous avons choisi d'étudier, nous avons analysé l'induction de ces gènes dans des macrophages dérivant de cellules de moelle osseuse de souris *Nrf2<sup>+/+</sup>* et *Nrf2<sup>-/-</sup>*. L'induction de la iNOS dans ces macrophages BMDM est réalisée par un traitement des cellules avec du LPS (100 ng/ml) et de l'IFN- $\gamma$  (10 U/ml) pendant 24h, à l'issue de leur différenciation. La dépendance à la production de NO de l'induction des différents gènes cibles analysés a aussi été testée en traitant les cellules avec différents inhibiteurs de NO synthases : l'aminoguanidine (AG), la S-éthyl thiourée (SEITU) et l'ester méthylique de N-Nitroarginine (L-NAME).

Les résultats que nous avons obtenus montrent une très forte induction des gènes *Hmox1* (facteur 22,3), *Srxn* (facteur 5,0), *Nqo1* (facteur 2,3) et *Sesn2* (facteur 6,8) dans les BMDM *Nrf2<sup>+/+</sup>* en réponse au traitement avec le LPS et l'IFN- $\gamma$  (cf. Figure III-10A/B/C/D). Alors que la iNOS semble induite de façon similaire dans les BMDM *Nrf2<sup>+/+</sup>* et *Nrf2<sup>-/-</sup>*, comme en atteste

la production de  $\text{NO}_2^-$  identique pour les macrophages des deux génotypes (cf. Figure III-10E), l'induction des quatre gènes testés est très fortement réduite dans les BMDM *Nrf2*<sup>-/-</sup> : réduction de 92% pour *Hmox1*, de 73% pour *Srxn*, de 63% pour *Nqo1* et de 93% pour *Sesn2*. Ceci suggère que Nrf2 est en grande partie responsable de l'induction de ces quatre gènes en réponse au traitement avec le LPS et l'IFN- $\gamma$ . De façon similaire à nos expériences sur les 3T3, l'inhibition de l'activité iNOS avec les trois inhibiteurs différents permet d'inhiber l'induction des gènes *Hmox1*, *Srxn* et *Nqo1* par le traitement avec le LPS et l'IFN- $\gamma$ , mais pas celle de *Sesn2*. Ces résultats démontrent que si ces quatre gènes sont bien des cibles du facteur de transcription Nrf2, seuls *Hmox1*, *Srxn* et *Nqo1* sont transcriptionnellement activés en réponse à une forte production de NO par les macrophages.

### 1.5.2 Les isoformes TAp73 et le TGF- $\beta$ 1 affectent les effets antiparasitaires dépendants de NO lors d'une infection avec *T. musculi*

*Trypanosoma musculi* est un parasite spécifique de la souris qui se développe de façon extracellulaire et circule dans le flux sanguin. Plusieurs études ont rapporté une activité cytostatique et cytotoxique de l'activité iNOS des macrophages activés sur ce parasite<sup>548,549</sup>. Nous avons étudié l'impact de la coopération entre les isoformes TAp73 et le TGF- $\beta$  sur la capacité des cellules 3T3 à limiter la prolifération de *T. musculi* grâce à la synthèse de NO.

Pour cela, la croissance des parasites a été estimée par numération après une coculture de trois jours des 3T3 et de *T. musculi* suite à un traitement avec le mix de cytokines, du TGF- $\beta$ 1 exogène, l'inhibiteur SB-525334 et l'inhibiteur SEITU (cf. Figure III-11A). La production de  $\text{NO}_2^-$  par les 3T3 en réponse aux différents traitements a été contrôlée en parallèle, après 24h de traitement (cf. Figure III-11B). Les résultats de nos comptages montrent qu'en absence de traitement, les cellules 3T3 *TAp73*<sup>+/+</sup> et *TAp73*<sup>-/-</sup> soutiennent la croissance du parasite de façon identique, avec une multiplication du nombre de parasites par un facteur voisin de 3.

Lorsque les 3T3 sont traités avec le mix de cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) dans un milieu pauvre en sérum, nous observons une forte réduction de la prolifération du parasite, de 42% avec les 3T3 *TAp73*<sup>+/+</sup> et de 66% avec les 3T3 *TAp73*<sup>-/-</sup>. Cet effet antiprolifératif légèrement supérieur avec les 3T3 *TAp73*<sup>-/-</sup> est associé à une légère augmentation de la production de  $\text{NO}_2^-$  par ces cellules (17,6  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_2^-$  contre seulement 12,3  $\mu\text{M}$  avec les 3T3

*TAp73<sup>+/+</sup>*). L'effet antiprolifératif du traitement des 3T3 avec les cytokines proinflammatoires est totalement perdu lorsque les cellules sont aussi traitées avec la SEITU, qui inhibe la production de NO, tandis qu'elle n'a pas d'effet sur la croissance du parasite utilisée seule. Ce résultat démontre que les 3T3 exercent un effet antiprolifératif sur *T. musculi* au travers de l'induction de la iNOS et la production de NO.

De façon très intéressante, le traitement des 3T3 avec le TGF- $\beta$ 1 exogène et le mix de cytokines, en même temps qu'il provoque une réduction importante de la production de NO par les 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>* (seulement 6  $\mu$ M de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> produits), limite aussi très fortement l'effet antiprolifératif des 3T3 sur le parasite, dont la multiplication est seulement réduite de 19%. A l'opposé, le TGF- $\beta$ 1 n'a pas d'effet sur la production de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> par les 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>* ni sur l'effet antiprolifératif exercé par ces cellules en réponse au mix de cytokines. De plus, le SB-525334 permet à la fois de rétablir une forte production de NO par les 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>* à un niveau identique aux 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>*, mais il permet également aux cellules des deux génotypes d'exercer un très fort effet cytostatique sur *T. musculi* : l'inhibition de la croissance est de 74% avec les 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>*, et de 72% avec les 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>*.

En conclusion, ces résultats montrent que les isoformes TAp73 et le TGF- $\beta$ , en coopérant et en modulant la production de NO *via* leur effet répresseur sur l'expression de la iNOS, sont capables d'affecter les effets antiparasitaires exercés par les cellules 3T3 en réponse à des cytokines proinflammatoires.

## 2 Etude préliminaire des effets des isoformes $\Delta$ Np73 dans la régulation de la iNOS et la réponse au TGF- $\beta$

### 2.1 Régulation de l'expression de la iNOS par les isoformes $\Delta$ Np73 dans les BMDM

Nous avons entrepris une étude préliminaire des effets des isoformes  $\Delta$ Np73 et du TGF- $\beta$  dans des macrophages dérivant de cellules de moelle osseuse de souris (BMDM). Pour cela, des cellules de moelle osseuse de souris  *$\Delta$ Np73<sup>+/+</sup>* et  *$\Delta$ Np73<sup>-/-</sup>* ont été extraites puis différenciées en culture grâce à du milieu conditionné de cellules L929 (cf. Matériel & méthodes pour plus

de précisions), avant de subir un traitement avec une combinaison de LPS (30 ng/ml) et d'IFN- $\gamma$  (10 U/ml) pendant 24h pour permettre l'induction de la iNOS dans ces cellules. A noter que ces concentrations en agents inducteurs permettent une induction maximale de l'expression de la iNOS dans ces cellules d'après nos tests d'induction (résultats non montrés de mesure de production de nitrite et d'expression de la iNOS en réponse à des concentrations croissantes en IFN- $\gamma$  et/ou en LPS).

Nos résultats indiquent tout d'abord qu'en absence de TGF- $\beta$ , l'induction de la iNOS est identique dans les BMDM  $\Delta Np73^{+/+}$  et  $\Delta Np73^{-/-}$ , comme l'illustre la production de nitrite identique mesurée dans le surnageant de ces cellules (cf. Figure III-12A, environ 50  $\mu$ M de nitrite après 24h de stimulation). Lorsque les BMDM sont traités avec du TGF- $\beta$ 1 exogène (0,5 ng/ml) dans des conditions similaires aux 3T3 (privation de sérum et ajout du TGF- $\beta$ 1 seulement 1h avant le LPS et l'IFN- $\gamma$ ), l'effet répresseur du TGF- $\beta$ 1 n'est pas affecté par la déficience en isoformes  $\Delta Np73$ . Le TGF- $\beta$ 1 réduit significativement la production de nitrite de 35% environ dans les BMDM  $\Delta Np73^{+/+}$  et  $\Delta Np73^{-/-}$  (cf. Figure III-12A). Pour les deux génotypes, nous avons observé un effet répresseur maximal du TGF- $\beta$ 1 sur l'expression de la protéine iNOS et la production de nitrite atteint pour une concentration en TGF- $\beta$ 1 de 0,25 ng/ml (résultat non présenté).

Nous nous sommes ensuite demandé si un traitement prolongé de ces cellules avec du TGF- $\beta$ 1 ne pourrait pas avoir un effet différentiel sur l'induction de la iNOS en fonction du statut de  $\Delta Np73$ . Les BMDM  $\Delta Np73^{+/+}$  et  $\Delta Np73^{-/-}$ , à l'issue de leur différenciation, ont donc été soumis à un traitement de 48h avec du TGF- $\beta$ 1 exogène avant de subir une stimulation avec du LPS et de l'IFN- $\gamma$  pendant 24h (aux cours desquelles le milieu de culture et le traitement avec le TGF- $\beta$ 1 sont renouvelés). Les résultats, présentés sur la Figure III-12A/B, montrent que l'effet répresseur du TGF- $\beta$ 1 sur la iNOS est perdu en grande partie dans les BMDM  $\Delta Np73^{-/-}$ . En effet, tandis que le TGF- $\beta$ 1 exerce toujours un effet significatif sur les BMDM  $\Delta Np73^{+/+}$ , avec une réduction de la production de nitrite et de l'expression de la iNOS de respectivement 40% et 66%, son effet sur les BMDM  $\Delta Np73^{-/-}$  a quasiment disparu. De plus, l'ajout de l'inhibiteur de ALK5 (SB-525334) pendant toute la durée des traitements permet de rétablir un niveau identique de production de nitrite et d'expression de la iNOS dans les BMDM  $\Delta Np73^{+/+}$  et  $\Delta Np73^{-/-}$ . Nous avons aussi remarqué une réduction de la capacité d'induction de la iNOS dans les BMDM, qui est indépendante du TGF- $\beta$ 1, après que les cellules aient été maintenues 48h dans un milieu sans cytokines exogènes (cf. Figure III-12A, seulement 25  $\mu$ M de nitrite

produit après 24h, soit une réduction de 50%, qui n'est pas prévenue par le SB-525334). Nos résultats suggèrent que les isoformes  $\Delta Np73$  permettent un maintien au long terme du potentiel répresseur du TGF- $\beta$  sur l'induction de la iNOS dans les BMDM.

Nous avons souhaité savoir si, de façon analogue à ce que nous observions dans les cellules 3T3, la modulation de l'expression de la iNOS par les isoformes  $\Delta Np73$  et le TGF- $\beta$  pouvait se répercuter sur la réponse génique dépendante de Nrf2 (cf. Figure III-12C/D/E/F). Nous avons observé une forte induction transcriptionnelle des trois gènes cibles de Nrf2 (*Hmox1*, *Nqo1*, *Srxn*) dans les BMDM (entre un facteur 5 et un facteur 10) en réponse au traitement avec le LPS et l'IFN- $\gamma$ . Comme dans les cellules 3T3, cette induction est aussi dépendante de la production de NO, car un traitement avec l'aminoguanidine la prévient totalement (résultat non montré). La faible surexpression de la iNOS dans les BMDM  $\Delta Np73^{-/-}$  (facteur 1,72 d'après la Figure III-12B) est aussi visible au niveau transcriptionnel (facteur 1,66 ; cf. Figure III-12C). De façon intéressante, elle se répercute sur le niveau d'induction de *Srxn* et de *Nqo1*, avec une hausse de 32% et de 38%, respectivement (cf. Figure III-12D/F). Elle n'a pas d'effet significatif sur l'induction de *Hmox1* (cf. Figure III-12E). En revanche, le traitement prolongé des BMDM  $\Delta Np73^{+/+}$  avec le TGF- $\beta$ 1 réduit fortement l'induction de ces trois gènes (entre 45% et 64% selon le gène), alors qu'il n'a aucun effet significatif dans les BMDM  $\Delta Np73^{-/-}$ . Ces résultats sont parfaitement corrélés au niveau d'expression du gène *Nos2*, puisque le TGF- $\beta$ 1 réprime fortement son expression dans les BMDM  $\Delta Np73^{+/+}$ , mais pas dans les BMDM  $\Delta Np73^{-/-}$  (cf. Figure III-12C). Enfin, le SB-525334 permet d'annuler l'effet du TGF- $\beta$ 1 et rétabli un niveau identique d'induction de *Nos2* et des gènes cibles de Nrf2 analysés.

## 2.2 Potentialisation de l'induction de gènes cibles du TGF- $\beta$ par les isoformes $\Delta Np73$ dans les fibroblastes pulmonaires

Le TGF- $\beta$  est une cytokine régulant de nombreuses fonctions cellulaires telles que la prolifération, la migration et l'invasion, qui sont responsables de nombreux processus physiologiques (ex : transition épithélio-mésenchymateuse, cicatrisation, etc). Des régulations croisées entre la voie de signalisation du TGF- $\beta$  et des membres de la famille p53 ont été rapportées à de multiples reprises au cours de ces dernières années. Il a par exemple été découvert que l'interaction entre les isoformes  $\Delta Np73$  et les protéines SMAD2/3 permet de potentialiser l'activité de promoteurs de gènes cibles du TGF- $\beta$  dans des lignées tumorales

transfectées avec différentes constructions de gènes-rapporteurs<sup>550</sup>.

Nous avons voulu savoir si une telle coopération pouvait également intervenir dans un contexte plus physiologique, dans des cellules primaires fibroblastiques, que nous avons isolées à partir de poumons de souris  $\Delta Np73^{+/+}$  et  $\Delta Np73^{-/-}$ . Les fibroblastes pulmonaires sont un modèle particulièrement bien adapté à l'étude des fonctions du TGF- $\beta$ , notamment très utilisé dans des modèles de pathologies comme la fibrose pulmonaire. Nous avons comparé la réponse au TGF- $\beta$ 1 des fibroblastes pulmonaires  $\Delta Np73^{+/+}$  et  $\Delta Np73^{-/-}$  en suivant le niveau d'expression génique d'une batterie de gènes connus pour être induits par le TGF- $\beta$  : *Nox4*, *Pai-1*, *Smad7*, *Col1A*, *Timp1*,  $\alpha$ -*Sma*, *Mmp2*, *Mmp9* et *Mmp13* (cf. Figure III-13). Nous avons également choisi de mesurer l'expression de *Spsb1*, une autre cible du TGF- $\beta$  nouvellement décrite dans d'autres modèles cellulaires et impliquée, entre autres, dans la dégradation de l'expression de la iNOS (cf. Discussion). Parmi les gènes cibles testés, seul *Mmp2* n'a pas été induit en réponse à un traitement avec du TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml pendant 24h). Tous les autres gènes testés sont induits dans des proportions variables : certains sont induits très fortement (*Pai-1* (x18), *Timp1* (x10),  $\alpha$ -*Sma* (x32) et *Mmp9* (x19)), tandis que d'autres le sont plus modestement (*Nox4* (x3,1), *Smad7* (x2,2), *Col1A* (x3,4), *Mmp13* (x3,9) et *Spsb1* (x2,1)).

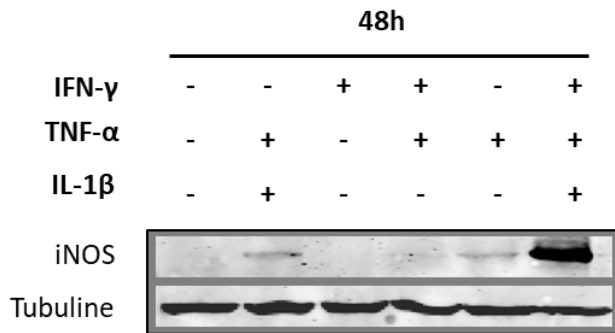
De façon très intéressante, nous avons constaté une très forte baisse de l'induction de certains de ces gènes dans les fibroblastes pulmonaires  $\Delta Np73^{-/-}$  : c'est le cas pour les gènes *Nox4* (réduction de 67%),  $\alpha$ -*Sma* (réduction de 79%), *Mmp9* (réduction de 90%), *Mmp13* (réduction de 72%) et *Spsb1* (réduction de 82%). L'induction des autres gènes cibles analysés n'est pas significativement altérée par la déficience en isoformes  $\Delta Np73$ . Le blocage de la voie de la voie de signalisation dépendante du récepteur ALK5 avec le SB-525334 permet de prévenir en totalité l'induction de l'ensemble de ces gènes. Dans les fibroblastes pulmonaires, les isoformes  $\Delta Np73$  semblent donc nécessaires à l'induction optimale d'un sous-ensemble de gènes cibles du TGF- $\beta$ .



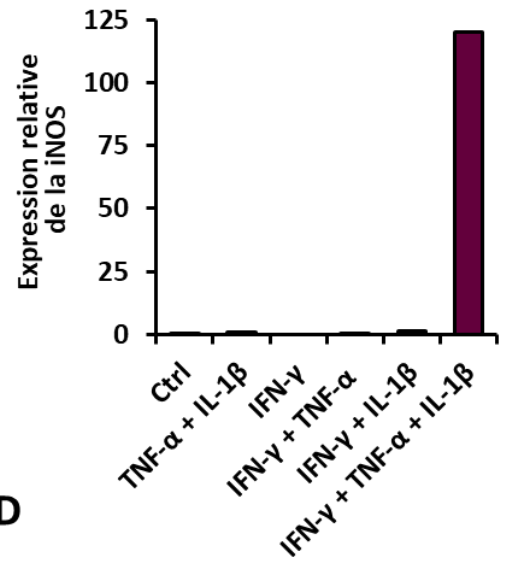


**Figure III-1: Détermination des conditions optimales d'induction de l'expression de la iNOS dans les cellules 3T3.** (A) et (B) L'induction de l'expression de la protéine iNOS dans des fibroblastes 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> est analysée par western-blot, 48h après un traitement avec de l'IFN- $\gamma$  (50 U/ml), du TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) et de l'IL-1 $\beta$  (20 ng/ml). La quantification est normalisée en fonction des variations d'expression de la  $\alpha$ -tubuline (protéine de référence), et rapportée à l'expression de la iNOS obtenue avec un traitement TNF- $\alpha$  + IL-1 $\beta$ . (C) La production de NO par les cellules ayant subi des traitements identiques à ceux décrits en (A) et (B) est évaluée par un dosage des ions NO<sub>2</sub><sup>-</sup> dans les surnageants de culture, grâce au réactif de Griess. (D) L'induction transcriptionnelle de Nos2 est déterminée par RT-qPCR, après un traitement de 24h avec les différentes cytokines (1000 U/ml pour l'IFN- $\beta$ , les autres cytokines sont utilisées à la même concentration que précédemment). Le niveau de transcrits est normalisé en fonction de l'expression du gène de référence Gusb, et rapporté au niveau de transcrits Nos2 mesuré avec le traitement TNF- $\alpha$  + IL-1 $\beta$ .

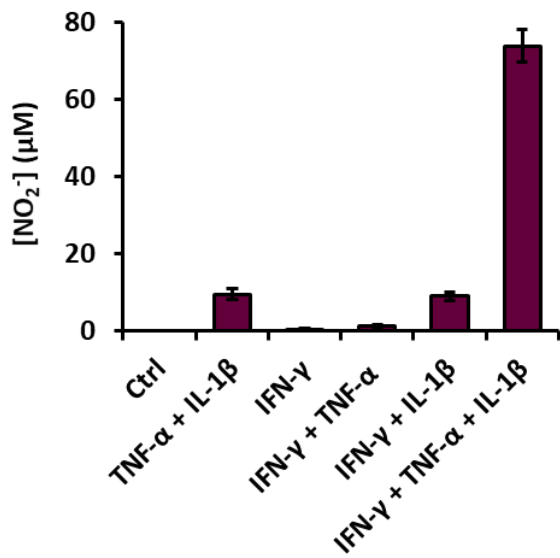
**A**



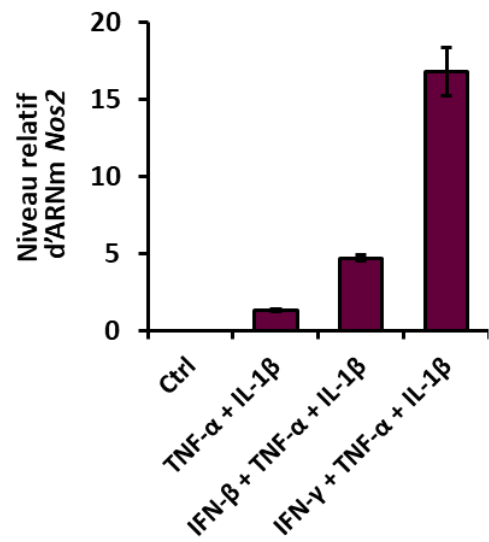
**B**



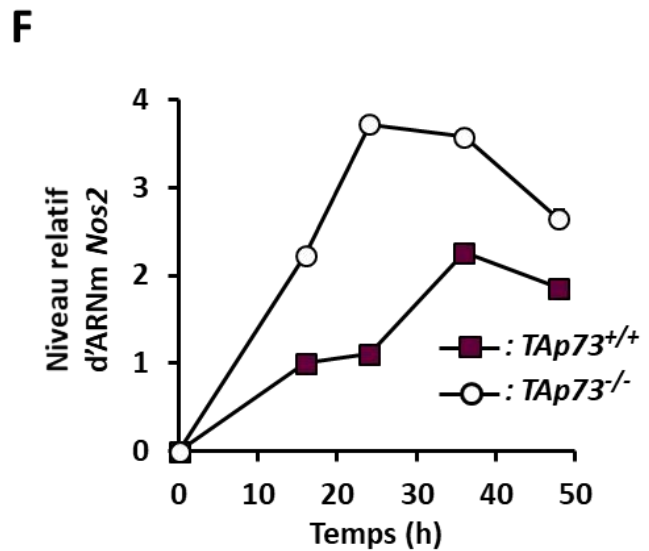
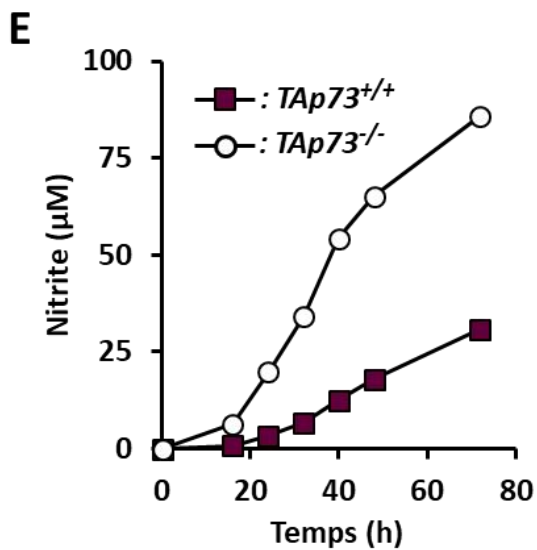
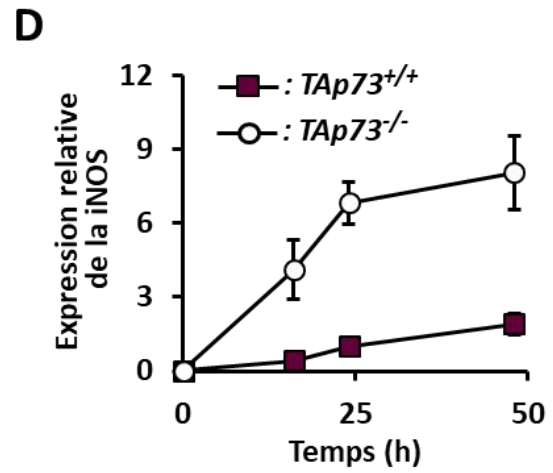
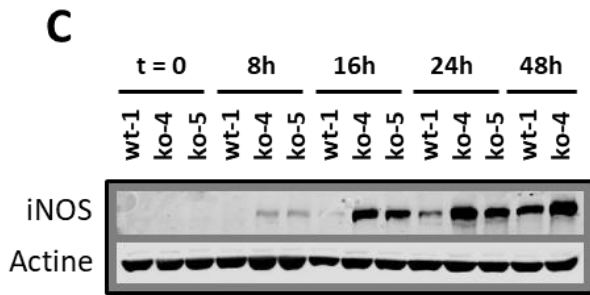
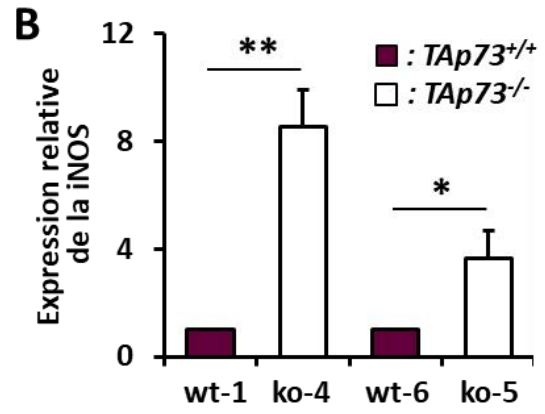
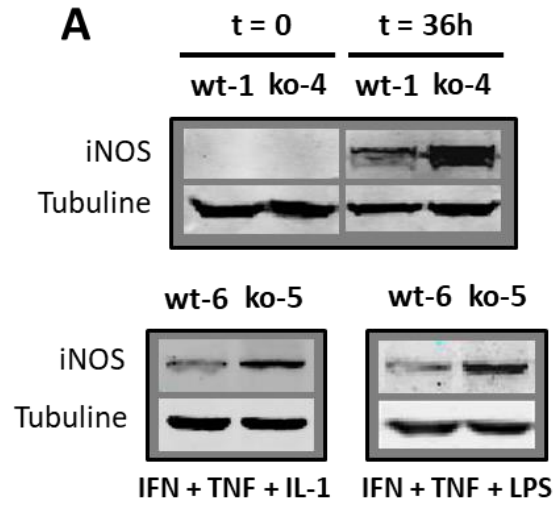
**C**



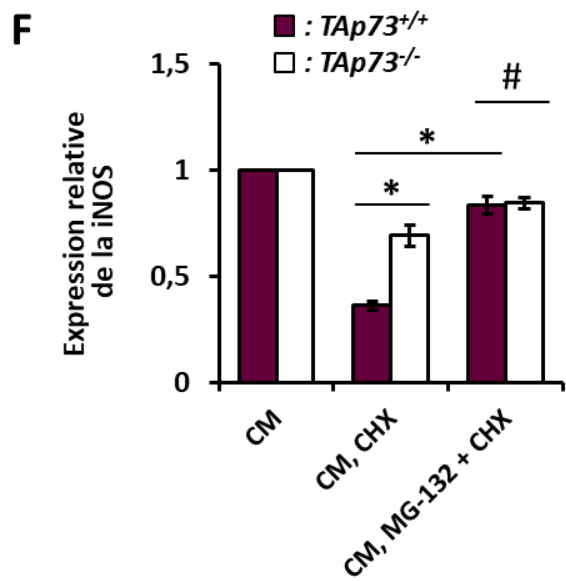
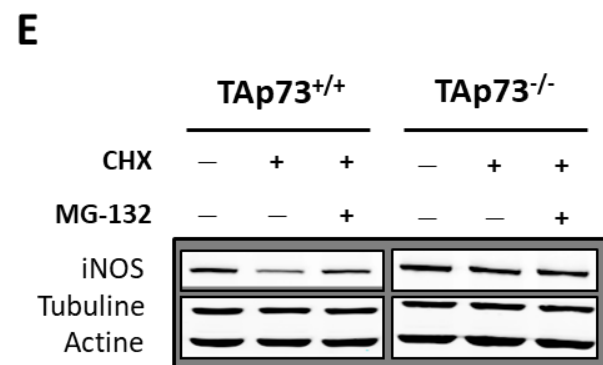
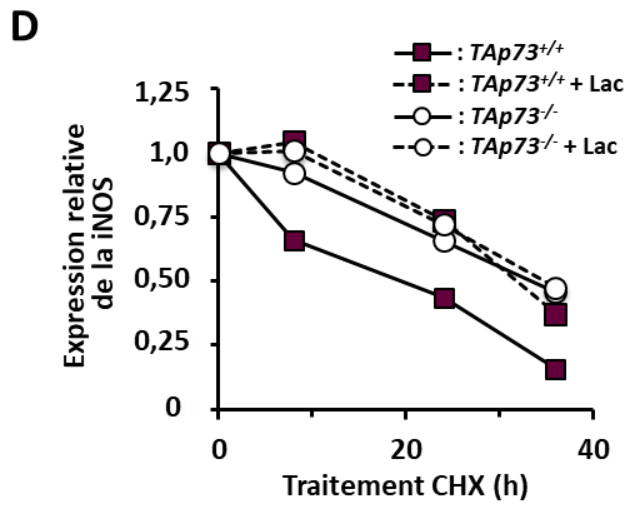
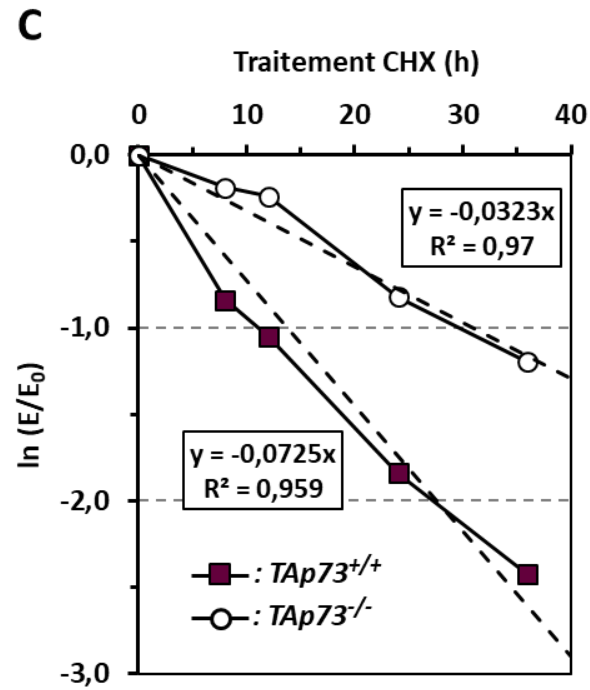
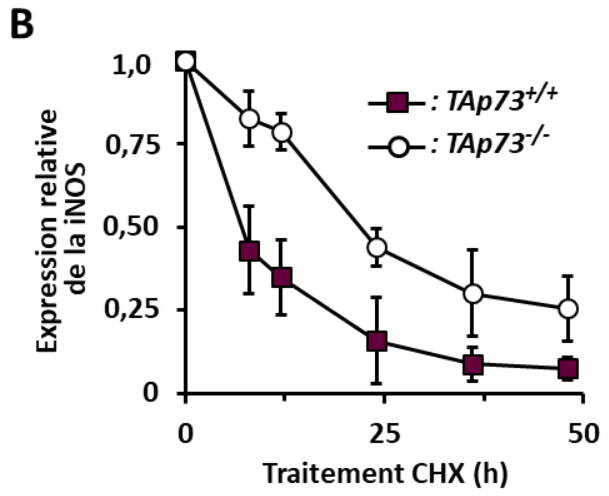
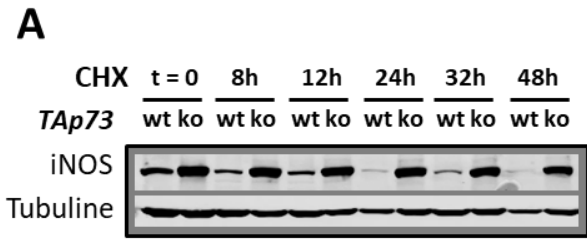
**D**



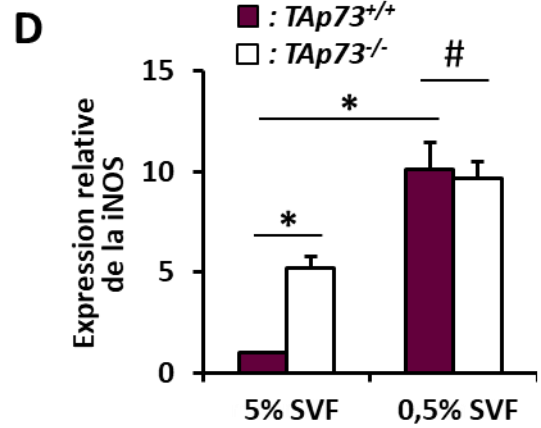
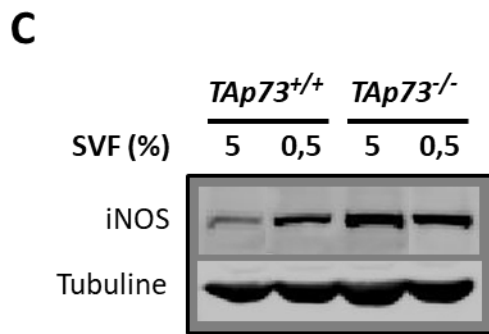
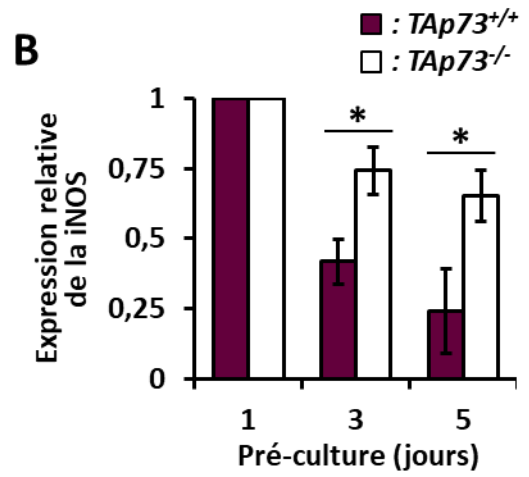
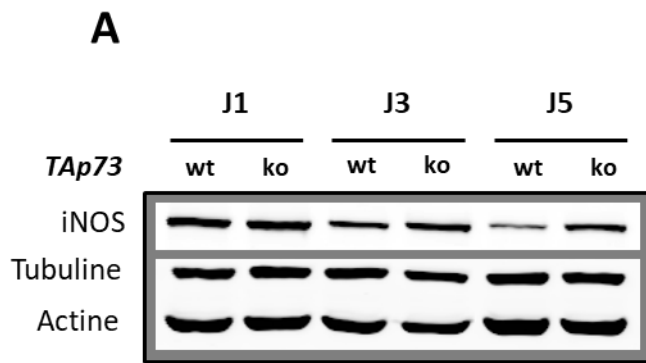
**Figure III-2: Hausse de l'induction de l'expression de la iNOS dans les 3T3 TAp73<sup>-/-</sup>.** (A) Analyse par western-blot de l'expression de la protéine iNOS dans deux clones de 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> (1 et 6) et deux clones de 3T3 TAp73<sup>-/-</sup> (4 et 5), 24h après un traitement avec deux types de stimulation (panneaux du bas) ou 36h après un traitement avec de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  (panneau du haut). (B) Quantification de l'expression de la protéine iNOS analysée par western-blot 24h après une stimulation avec de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  (= mix de cytokines). Les valeurs sont normalisées en fonction des protéines de référence (tubuline et actine) et rapportées à celles obtenues avec les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> ( $n = 3$ ,  $p \leq 0.01$  (\*\*)) ou  $\leq 0.05$  (\*). (C) et (D) Cinétique d'induction de l'expression de la protéine iNOS par un mix de cytokines dans des 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> et TAp73<sup>-/-</sup>, analysée et quantifiée par western-blot. Les valeurs sont rapportées à l'expression de la iNOS dans les cellules TAp73<sup>+/+</sup> après 16h de stimulation ( $n = 3$ ). (E) Cinétique de production de nitrite par les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> et TAp73<sup>-/-</sup> en réponse au mix de cytokines, déterminée par un dosage de Griess dans les surnageants de culture (expérience représentative, moyenne de triplicates). (F) Cinétique d'induction transcriptionnelle du gène *Nos2* par le mix de cytokines dans les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> et TAp73<sup>-/-</sup>, analysée par RT-qPCR après extraction des ARN totaux à différents temps après le début de l'induction. Les niveaux d'ARNm *Nos2* sont rapportés à ceux des 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> au temps 16h. Toutes ces expériences sont effectuées dans un milieu RPMI contenant 5% de SVF.



**Figure III-3: Baisse de la dégradation de la iNOS par le protéasome dans les 3T3 TAp73<sup>-/-</sup>.** (A) et (B) L'impact de la déficience en isoformes TAp73 sur la stabilité de la protéine iNOS est étudié en mesurant l'expression résiduelle de la iNOS dans les cellules après les avoir traitées pendant 24h avec le mix de cytokines puis avec de la cycloheximide (CHX, 10 µg/ml) sur des durées variables (RPMI 5% SVF). Les western-blots sont quantifiés et l'expression de la iNOS est rapportée aux contrôles respectifs (TAp73<sup>+/+</sup> ou TAp73<sup>-/-</sup> à t=0, sans traitement avec la CHX) (n = 4). (C) Pour calculer le temps de demi-vie de la iNOS dans les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> et TAp73<sup>-/-</sup>, la dégradation de la protéine est modélisée selon la loi de décroissance exponentielle  $E = E_0 \cdot e^{-kt}$  avec  $E_0$  l'expression de la iNOS au temps 0 (après 24h de stimulation mais sans CHX),  $E$  l'expression résiduelle de la iNOS aux différents temps de traitements avec la CHX,  $k$  la constante de décroissance et  $t$  le temps de traitement. La demi-vie est calculée grâce à la formule dérivée  $\ln(2)/k = t_{1/2}$ ,  $k$  étant déterminé à partir du coefficient directeur de la droite  $\ln(E/E_0) = -kt$ . (D) L'effet de la lactacystine (5 µM) sur la cinétique de dégradation de la iNOS dans les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> et TAp73<sup>-/-</sup> est quantifié par western-blot, après son ajout en présence de CHX et suite à l'induction préalable de la iNOS pendant 24h. (E) et (F) L'effet du MG-132 (5 µM) sur la stabilité de la iNOS est analysé et quantifié par western-blot en l'ajoutant avec la CHX pendant 8h, après que le mix de cytokines (CM) ait stimulé l'induction de la iNOS pendant 24h (n = 3,  $p > 0,05$  (#) et  $p \leq 0,05$  (\*)).

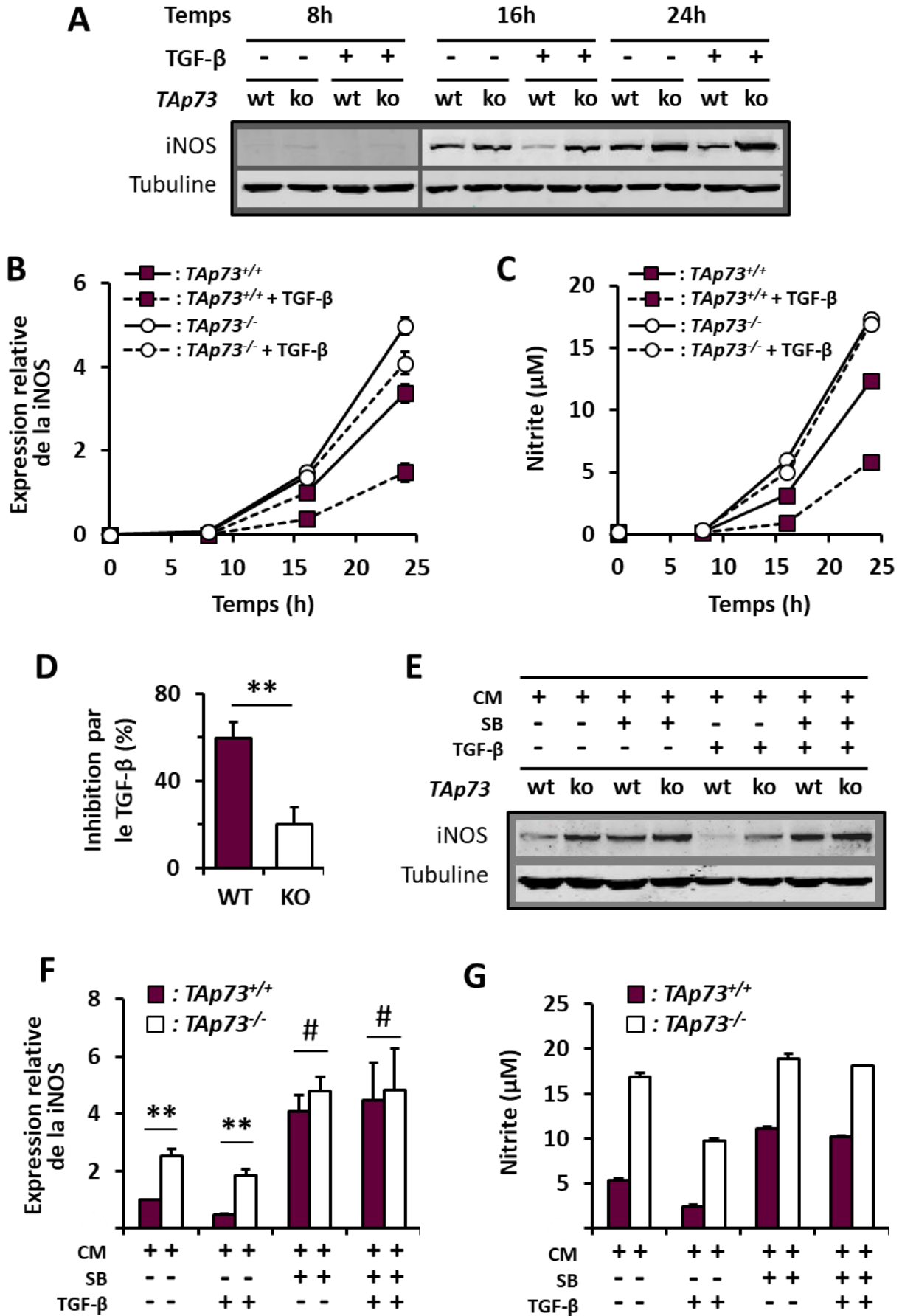


**Figure III-4 : La régulation de l'expression de la iNOS par les isoformes TAp73 dépend de la présence d'un facteur produit et sécrété par les cellules présent également dans le sérum.** (A) et (B) Pour étudier l'influence de la durée de préculture des cellules 3T3 sur leur capacité d'induction de l'expression de la iNOS, les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> et TAp73<sup>-/-</sup> sontensemencés puis maintenus dans un milieu pauvre en sérum (0,5%) pendant un, trois ou cinq jours avant leur traitement avec le mix de cytokines (sans renouvellement du milieu). L'expression de la iNOS est ensuite mesurée par western-blot pour ces différentes conditions, puis quantifiée et normalisée (vs actine et tubuline). Les valeurs sont rapportées à l'expression respective des cellules TAp73<sup>+/+</sup> ou TAp73<sup>-/-</sup> après seulement un jour de préculture ( $n = 3, p \leq 0.05(*)$ ). (C) et (D) Analyse par western-blot et quantification de l'expression de la iNOS 24h après la stimulation par le mix de cytokines et après une incubation préalable de 24h supplémentaires dans un milieu riche (5% SVF) ou appauvri (0,5% SVF) en sérum. Les valeurs sont normalisées en fonction de la tubuline et rapportées à l'expression de la iNOS dans les cellules 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> en présence de 5% de sérum ( $n = 3, p > 0,05 (\#)$  et  $p \leq 0.05 (*)$ ).

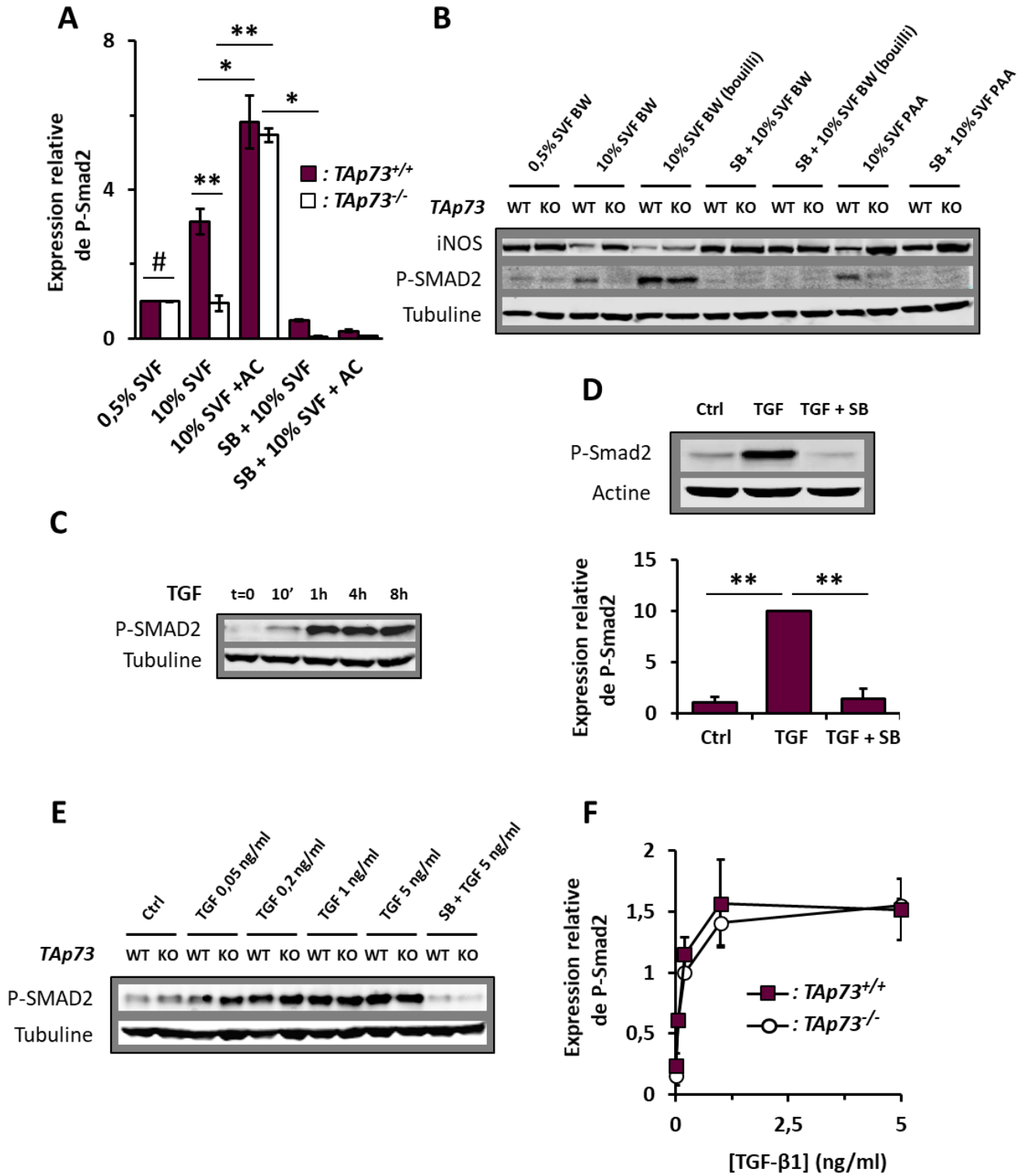




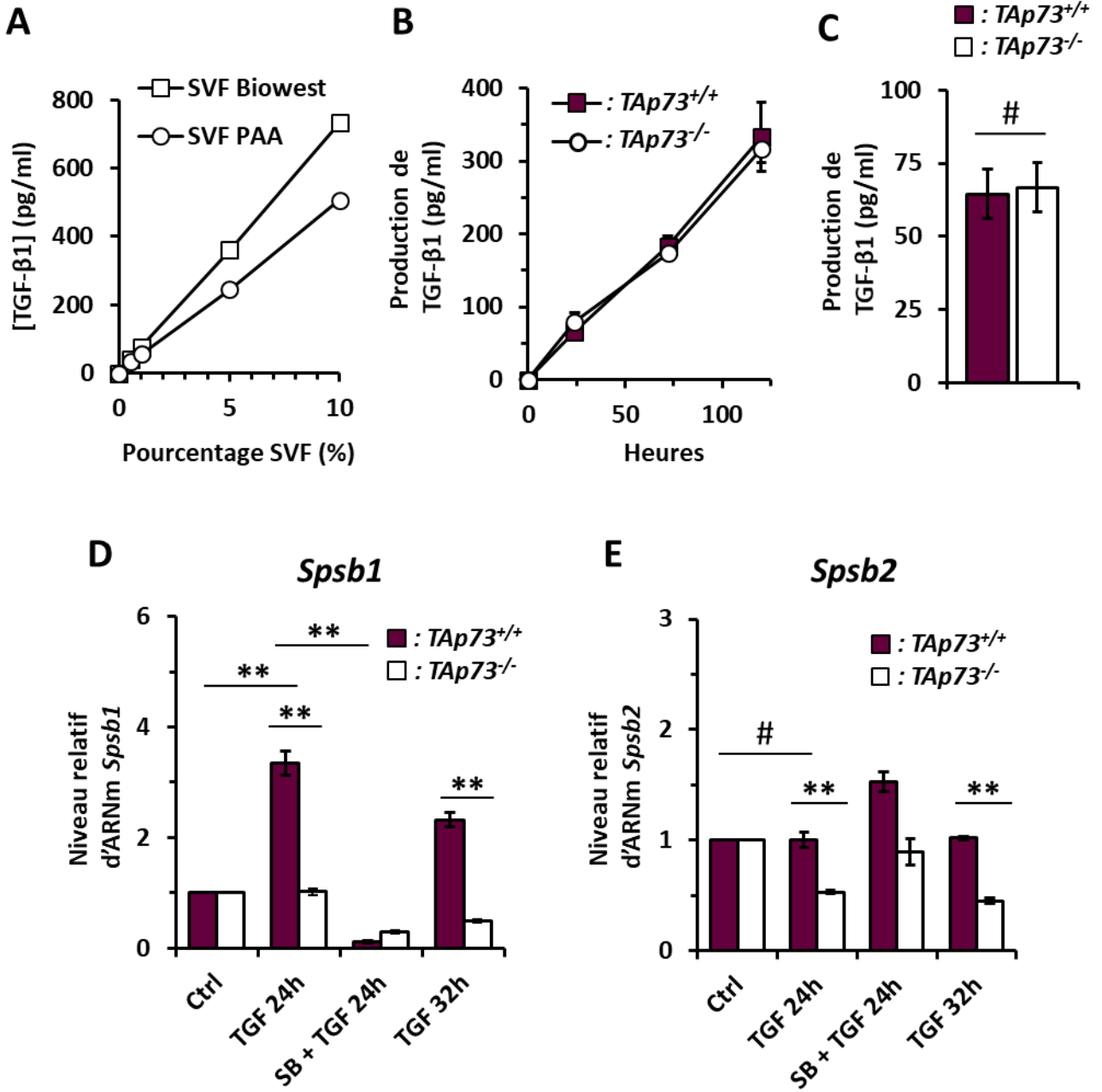
**Figure III-5 : La régulation négative de l'expression de la iNOS par les isoformes TAp73 dépend du TGF- $\beta$ .** (A) et (B) Cinétique d'induction de l'expression de la iNOS par le mix de cytokines dans les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> et TAp73<sup>-/-</sup>, dans un milieu appauvri en sérum (0,5% SVF) et en présence ou non de TGF- $\beta$ 1 exogène (5 ng/ml). L'expression est quantifiée par western-blot et normalisée en fonction de la tubuline, puis les valeurs sont rapportées à l'expression de la iNOS dans les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> après 16h de stimulation par le mix de cytokine sans TGF- $\beta$ 1 ( $n = 3$ ,  $p \leq 0.05$  (\*)). (C) Mesure de l'activité iNOS dans les mêmes conditions qu'en (A) et (B), par dosage des ions NO<sub>2</sub><sup>-</sup> dans les surnageants de culture des cellules avec le réactif de Griess (moyenne de triplicatas, SD < 2%). (D) Pourcentage moyen d'inhibition de l'expression de la iNOS par le TGF- $\beta$ 1 exogène (5 ng/ml) après 24h de traitement des 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> et TAp73<sup>-/-</sup>, calculé à partir de la quantification de l'expression de la iNOS en western-blot ( $n = 8$ ,  $p \leq 0.01$  (\*\*)). (E) et (F) L'effet de l'inhibiteur d'ALK5, le SB-525334 (5  $\mu$ M), sur le niveau d'induction de l'expression de la iNOS par le mix de cytokines (CM) dans les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> et TAp73<sup>-/-</sup> est analysé puis quantifié par western-blot 24h après le début du traitement dans un milieu riche en sérum (5% SVF), en présence ou non de TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) ( $n = 4$ ,  $p > 0,05$  (#) et  $p \leq 0.01$  (\*\*)). (G) Mesure de production de NO par les 3T3 dans les conditions décrites en (E) et (F) (moyenne de triplicatas dans une expérience représentative).



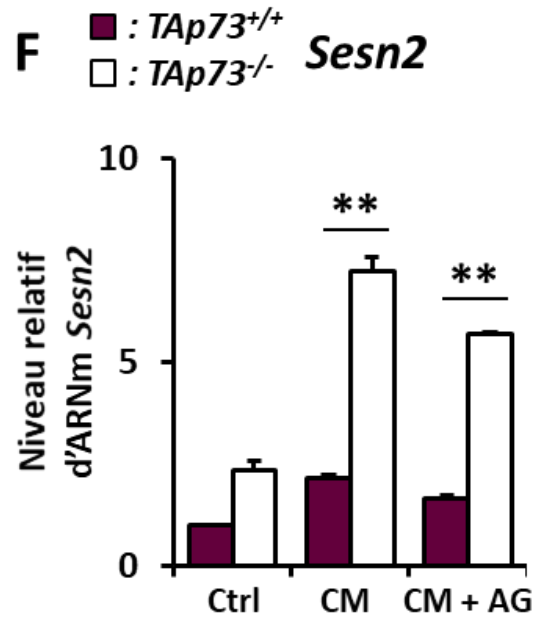
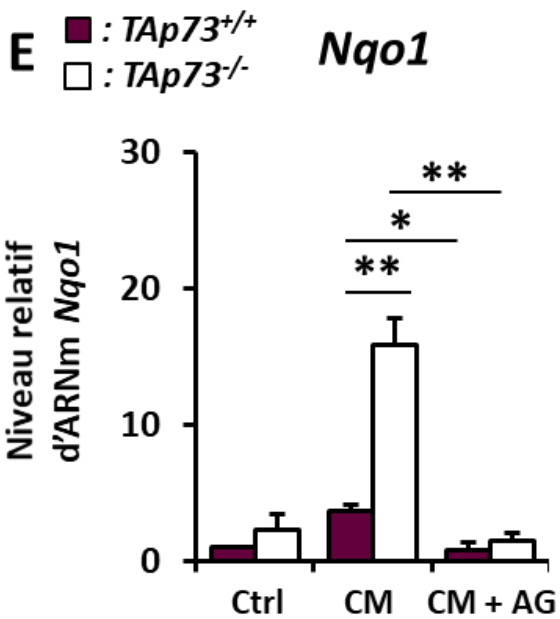
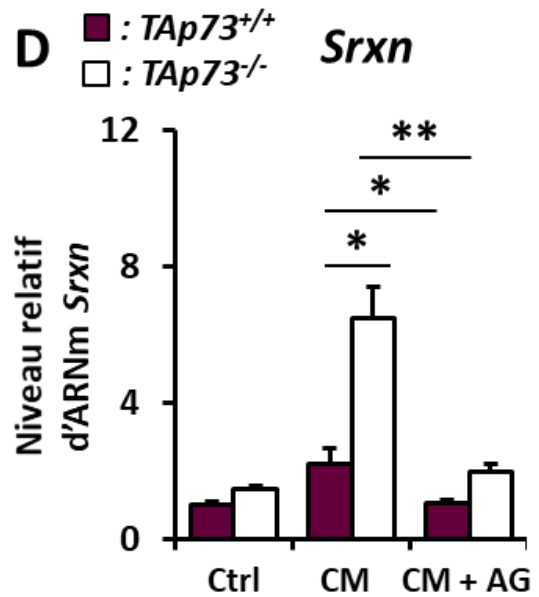
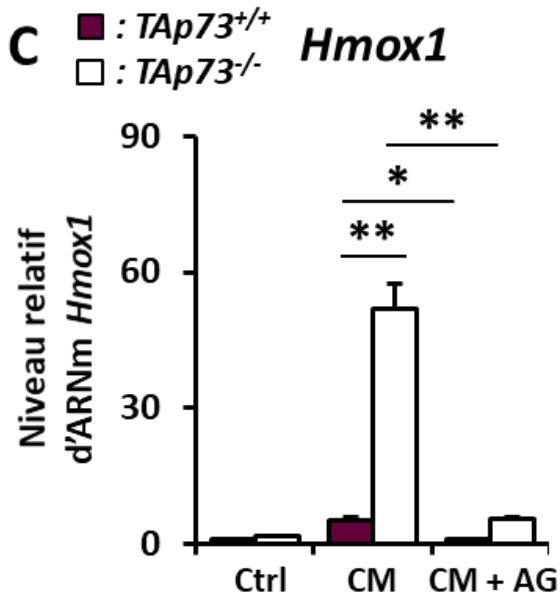
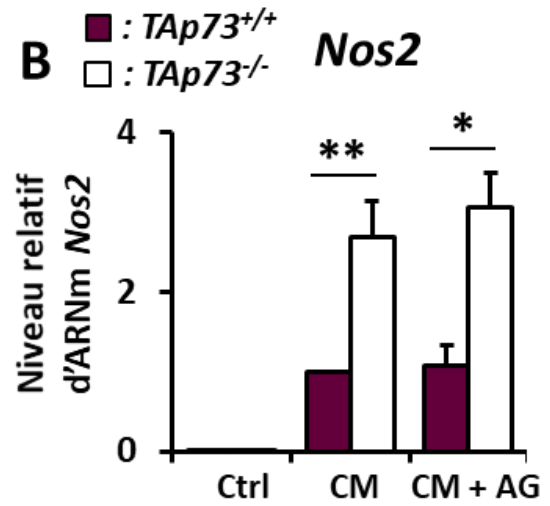
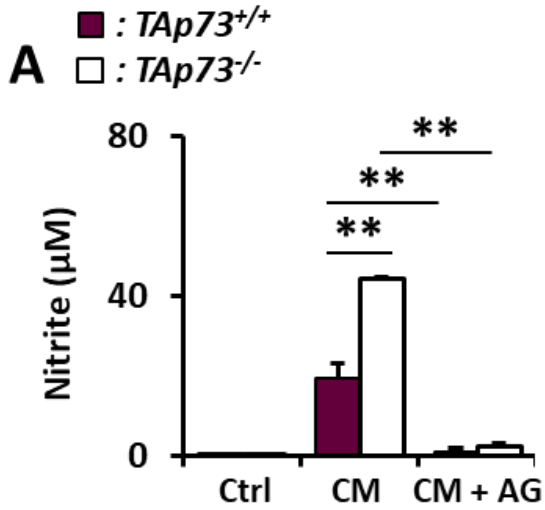
**Figure III-6 : Comparaison des niveaux d'activation par phosphorylation de SMAD2 en réponse au TGF- $\beta$  dans les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> et TAp73<sup>-/-</sup>. (A) et (B) L'impact de la concentration en sérum (deux fournisseurs : Biowest et PAA Laboratories) sur le niveau de phosphorylation de SMAD2 est mesuré et quantifié par western-blot. Les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> et TAp73<sup>-/-</sup> sont précultivés 24h dans les différentes conditions avant l'induction de la iNOS avec le mix de cytokines, et la lyse des cellules est réalisée 24h plus tard. Le TGF- $\beta$  contenu dans le sérum est activé en le chauffant pendant 10 minutes à 80°C (AC = bouilli). L'effet du SB-525334 (5  $\mu$ M) est aussi testé dans ces conditions. Le niveau d'expression de la forme phosphorylée de SMAD2 est rapporté à son niveau dans les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> en présence de 0,5% de sérum ( $n = 3$ ,  $p > 0,05$  (#),  $p \leq 0.05$  (\*) et  $p \leq 0.01$  (\*\*)). (C) Cinétique d'activation de SMAD2 par phosphorylation en réponse à du TGF- $\beta$ 1 exogène (5 ng/ml) dans des 3T3 TAp73<sup>+/+</sup>, analysée par western-blot. (D) Contrôle de l'effet inhibiteur du SB-525334 (5  $\mu$ M) sur la phosphorylation de SMAD2 induite par du TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml), analysé par western-blot après 1h de traitement des 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> dans un milieu pauvre en sérum (0,5%) ( $n = 3$ ,  $p \leq 0.01$  (\*\*)). (E) et (F) Effet de doses croissantes de TGF- $\beta$ 1 sur le niveau de phosphorylation de SMAD2 dans les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> et TAp73<sup>-/-</sup>, analysé, normalisé (vs Tubuline) et quantifié par western-blot après 1h de traitement dans un milieu pauvre en sérum (0,5%) ( $n = 3$ ).**



**Figure III-7 : Les isoformes TAp73 n'affectent pas la production de TGF- $\beta$ 1 par les 3T3 mais sont nécessaires à l'induction de SPSB1 en réponse au TGF- $\beta$ 1. (A) Dosage ELISA du TGF- $\beta$ 1 total (activé ou non) présent dans le milieu de culture avec des quantités croissantes de sérums provenant de deux lots et fournisseurs différents (moyennes de triplicatas,  $\pm$ SD). (B) Cinétique de production totale de TGF- $\beta$ 1 par les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> et TAp73<sup>-/-</sup> mesurée par dosage ELISA sur des surnageants de culture à des temps variables après l'ensemencement des cellules dans un milieu pauvre en sérum (0,5%) (moyennes  $\pm$ SD des valeurs obtenues en triplicatas sur les deux couples de cellules TAp73<sup>+/+</sup> (wt-1 et wt-6) et TAp73<sup>-/-</sup> (ko-4 et ko-5)). (C) Production totale et journalière de TGF- $\beta$ 1 par les 3T3 calculée à partir des cinétiques présentées en (B) ( $p > 0,05$  (#)). (D) et (E) Mesure de l'expression de Spsb1 et Spsb2 analysée par RT-qPCR dans les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> et TAp73<sup>-/-</sup> après un traitement de 24 ou 32h avec du TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml), et avec ou sans SB-525334 (5 ng/ml) ( $n = 3$ ,  $p > 0,05$  (#) et  $p \leq 0.01$  (\*\*)).**

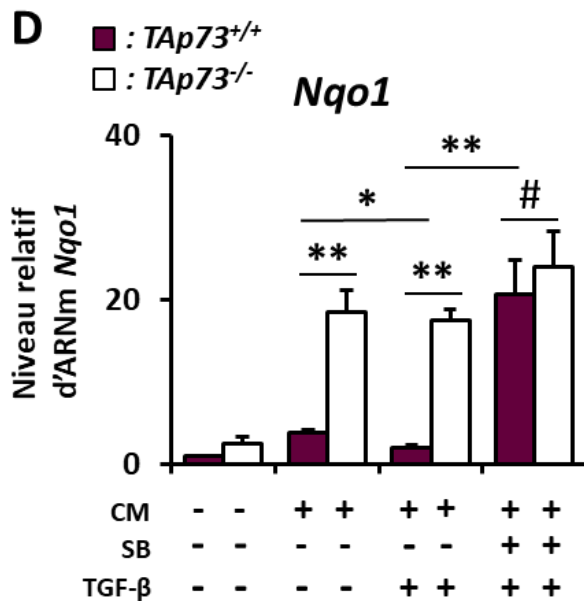
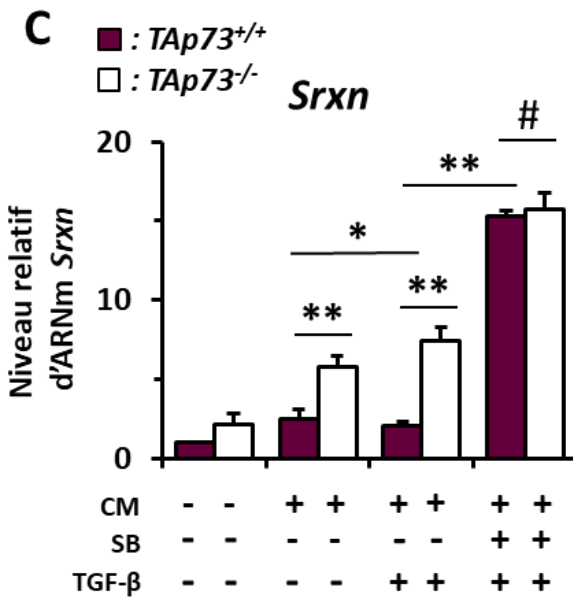
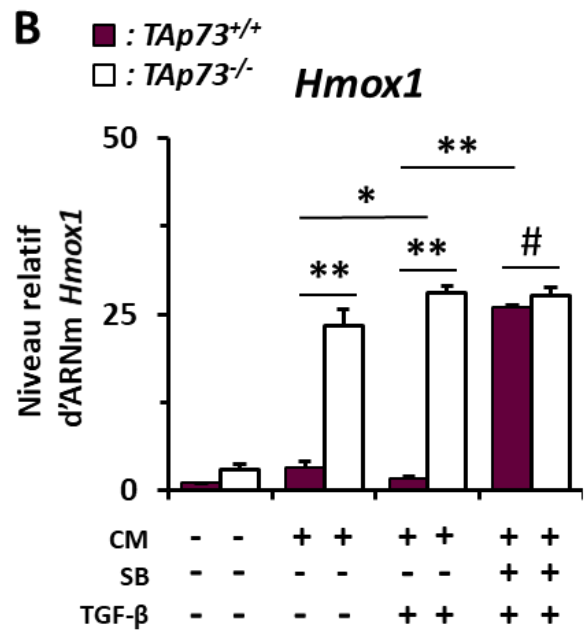
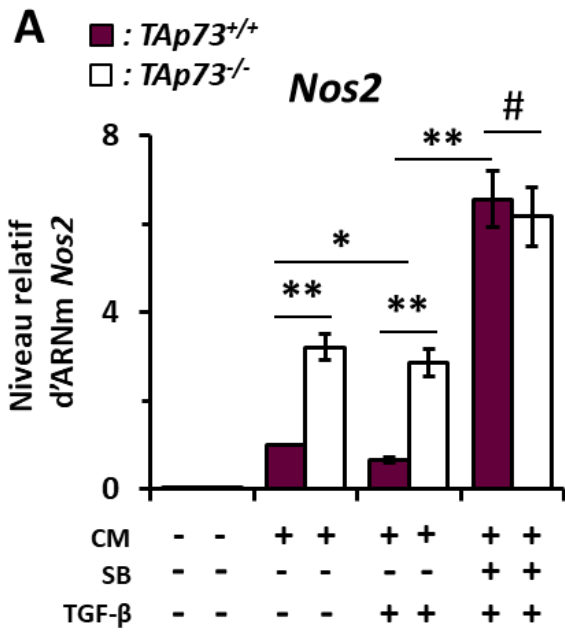


**Figure III-8 : Augmentation de l'induction de gènes cibles de Nrf2 par NO dans les 3T3 TAp73<sup>-/-</sup>.** (A) L'effet inhibiteur de l'aminoguanidine (AG, 2 mM) sur l'activité iNOS est vérifié par un dosage de Griess dans le surnageant des 3T3 après 24h de traitement avec les cytokines dans un milieu riche en sérum (5%) ( $n = 3, p \leq 0.01$  (\*\*)). (B), (C), (D), (E) et (F) L'expression des gènes Nos2 (B), Hmox1 (C), Srxn (D), Nqo1 (E) et Sesn2 (F) est mesurée par RT-qPCR dans les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> et TAp73<sup>-/-</sup> traités dans les mêmes conditions que celles décrites en (A). Le gène de référence utilisé est Gusb, et les valeurs sont rapportées à l'expression génique dans les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> traités avec le mix de cytokines pour Nos2 ou non traités pour Hmox1, Srxn, Nqo1 et Sesn2 ( $n = 4, p \leq 0.05$  (\*) et  $p \leq 0.01$  (\*\*)).



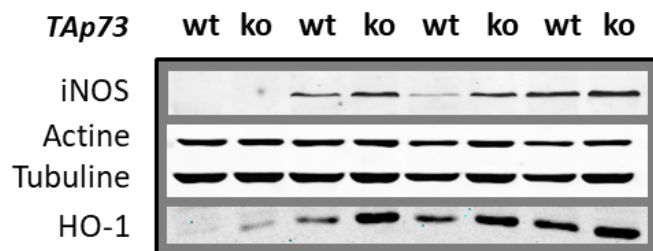


**Figure III-9 : L'inhibition de la signalisation TGF- $\beta$  permet de restaurer une induction similaire de l'expression des gènes cibles de Nrf2 dans les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> et TAp73<sup>-/-</sup>. (A), (B), (C) et (D) Mesure du niveau de transcrits des gènes *Nos2* (A), *Hmox1* (B) ; *Srxn* (C) et *Nqo1* dans les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> et TAp73<sup>-/-</sup> après 24h de traitement avec le mix de cytokines et avec ou sans TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) et SB-525334 (5  $\mu$ M), dans un milieu riche en sérum (5%). Le gène de référence utilisé est *Gusb*, et les valeurs sont rapportées à l'expression génique dans les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> traités avec le mix de cytokines pour *Nos2* ou non traités pour *Hmox1*, *Srxn* et *Nqo1* ( $n = 4$ ,  $p > 0,05$  (#),  $p \leq 0.05$  (\*) et  $p \leq 0.01$  (\*\*)). (E) Analyse par western-blot du niveau d'expression de la protéine HO-1 dans les mêmes conditions qu'en (A)-(D) (expérience représentative).**

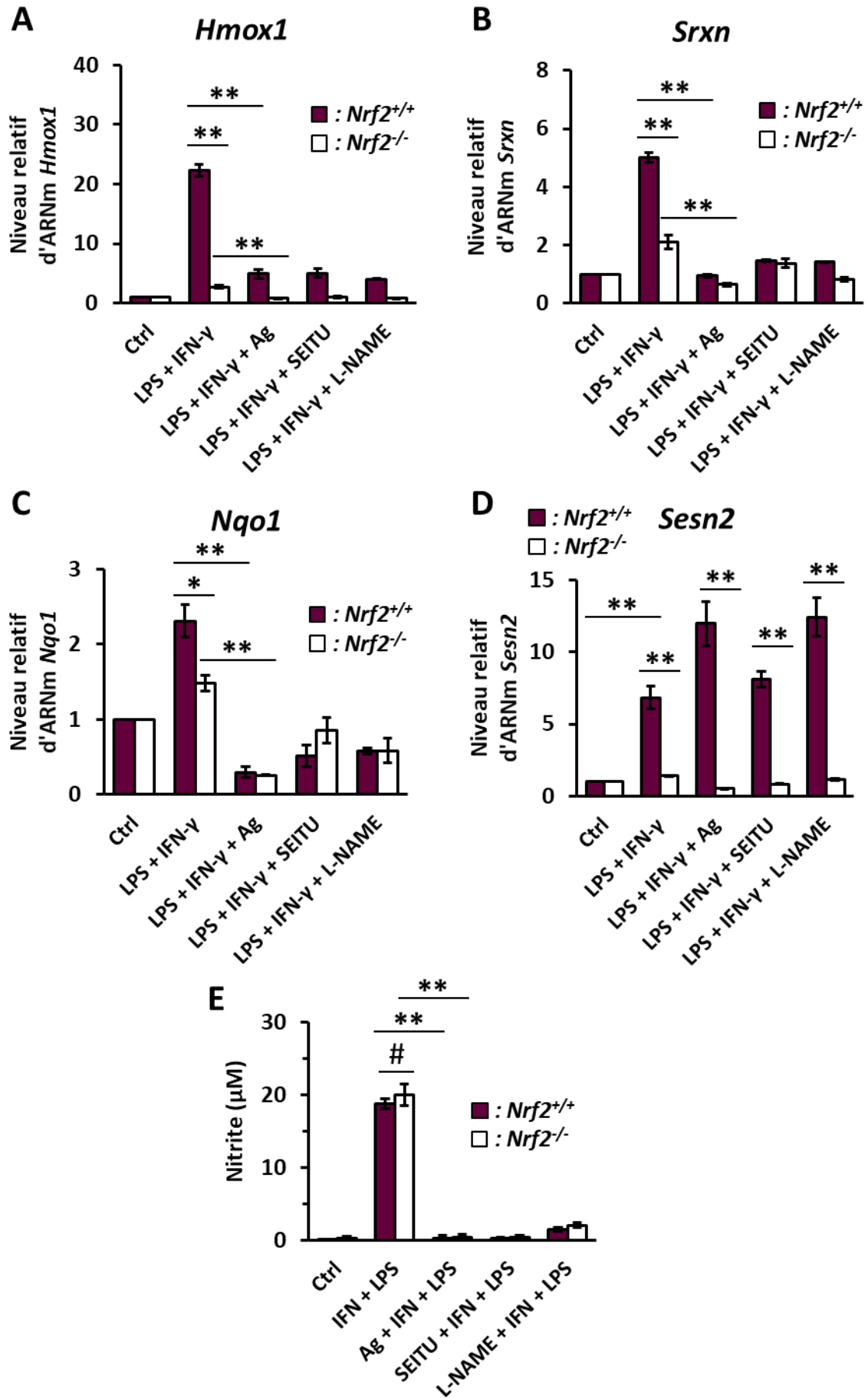


**E**

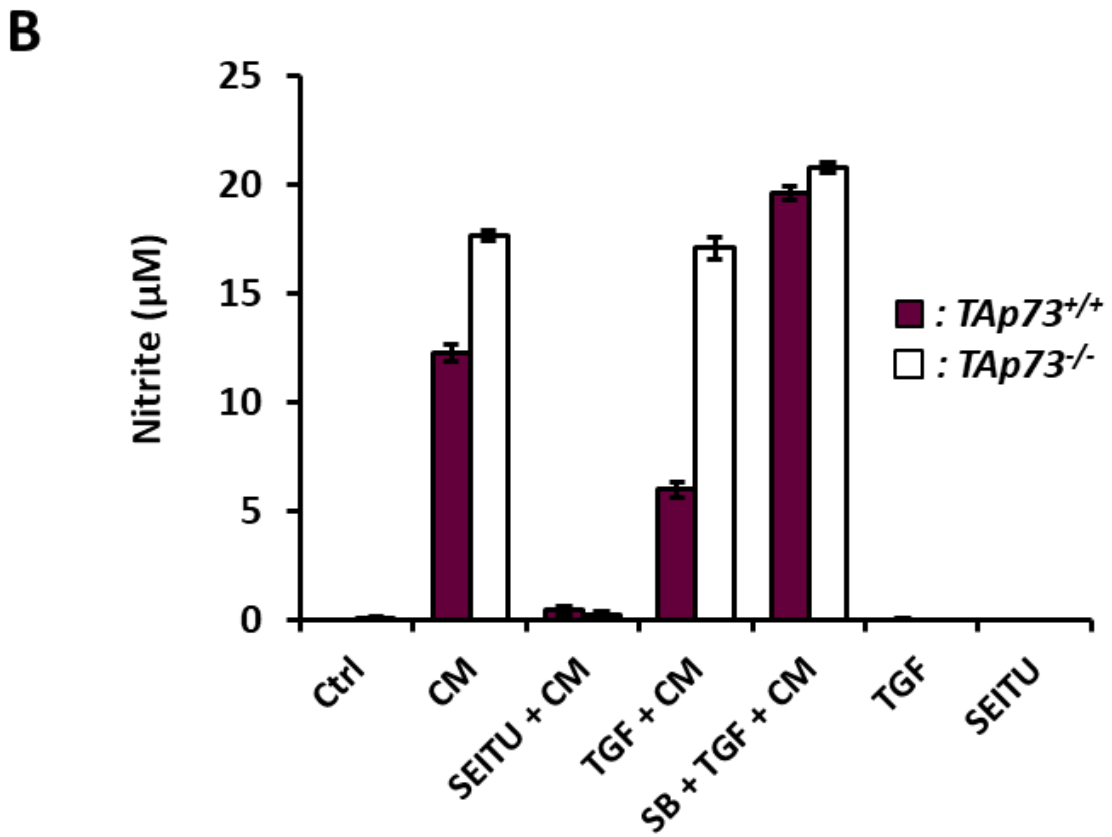
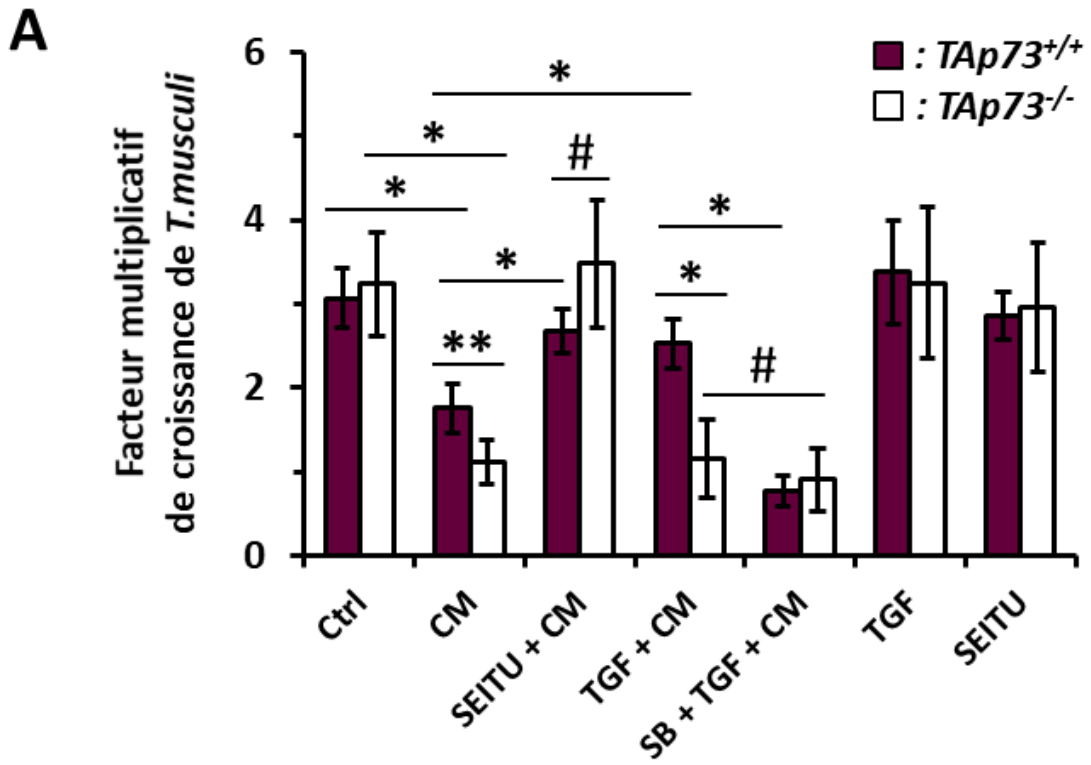
CM	-	-	+	+	+	+	+	+
SB	-	-	-	-	-	-	-	+
TGF-β	-	-	-	-	+	+	+	+



**Figure III-10 : L'induction des gènes *Hmox1*, *Srxn* et *Nqo1* par le LPS et l'IFN- $\gamma$  dans les macrophages dépend de *Nrf2* et de la production de NO.** (A), (B), (C) et (D) Pour étudier la dépendance à *Nrf2* et à NO de l'induction des gènes *Hmox1* (A), *Srxn* (B), *Nqo1* (C) et *Sesn2* (D), leur niveau d'expression est mesuré par RT-qPCR dans des macrophages issus de la différenciation de cellules de moelle osseuse (BMDM) de souris *Nrf2*<sup>+/+</sup> ou *Nrf2*<sup>-/-</sup>, après un traitement de 24h avec du LPS (100 ng/ml) et de l'IFN- $\gamma$  (10 U/ml), et en présence ou non d'inhibiteurs des NO synthases : Aminoguanidine (AG, 2 mM), S-éthyl isothiourée (SEITU, 50  $\mu$ M) ou N-Nitroarginine méthyl ester (L-NAME, 50  $\mu$ M). Les valeurs sont normalisées en fonction des variations d'expression du gène de référence ARN 18S, puis sont rapportées aux valeurs des contrôles respectifs (Ctrl TAp73<sup>+/+</sup> ou Ctrl TAp73<sup>-/-</sup>) ( $n = 3$ ,  $p \leq 0,05$  (\*) et  $p \leq 0.01$  (\*\*)). (E) L'induction de la iNOS dans les BMDM *Nrf2*<sup>+/+</sup> et *Nrf2*<sup>-/-</sup> et l'effet des différents inhibiteurs est contrôlé en effectuant un dosage de Griess sur les surnageants prélevés 24h après le début du traitement ( $n = 3$ ,  $p > 0,05$  (#) et  $p \leq 0.01$  (\*\*)).

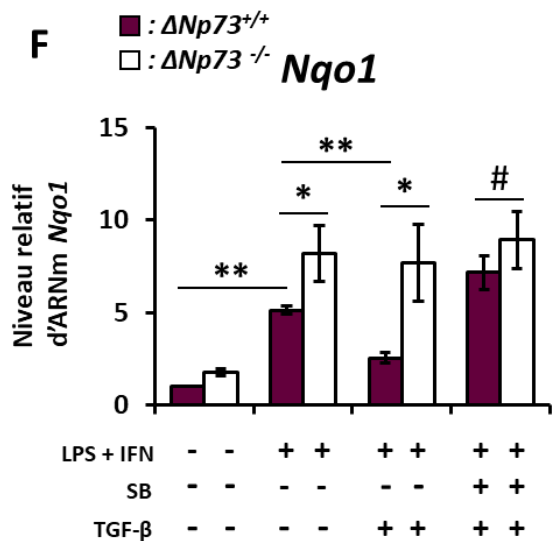
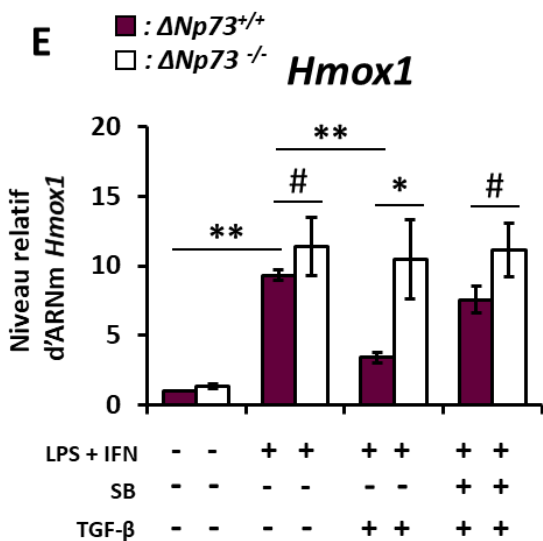
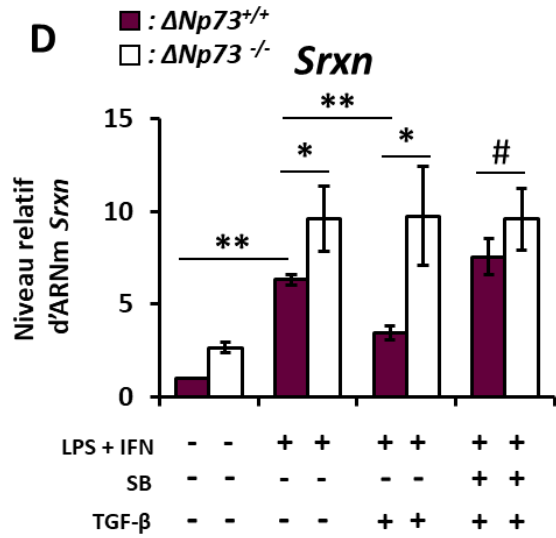
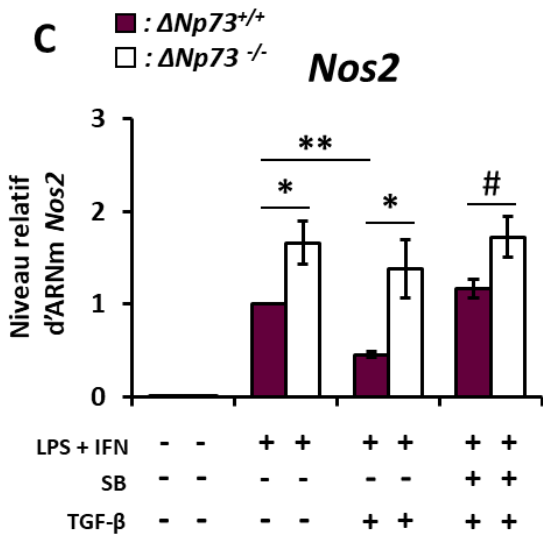
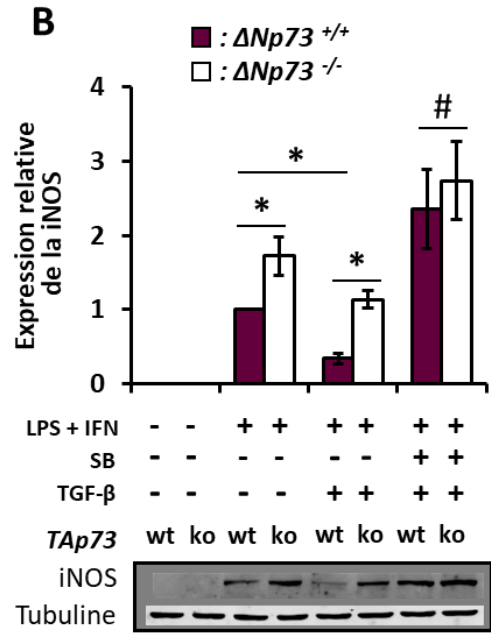
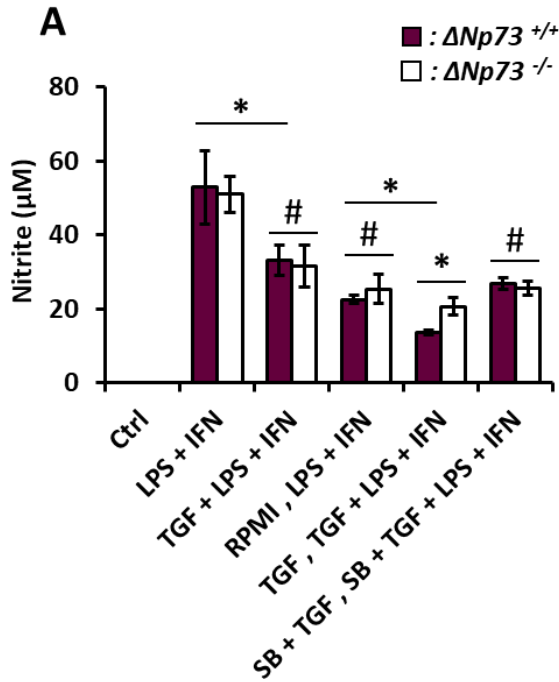


**Figure III-11 : Les isoformes TAp73 et le TGF- $\beta$  modulent les effets cyostatiques exercés par NO sur le parasite *T. muscoli*. (A) L'effet du mix de cytokines (IFN- $\gamma$  50 U/ml, TNF- $\alpha$  20 ng/ml et IL-1 $\beta$  20 ng/ml) et du TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) sur la croissance du parasite en présence des 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> ou TAp73<sup>-/-</sup> est étudié en procédant à un comptage des parasites 3 jours après le début de l'infection et du traitement. Le facteur multiplicatif de croissance est estimé en rapportant la valeur de trois comptages indépendants au nombre initial de parasites infectants ( $4 \cdot 10^4$  *T. muscoli* par puits avec  $2,5 \cdot 10^4$  3T3 dans un milieu avec 0,5% SVF). L'effet de l'inhibiteur SEITU (50  $\mu$ M) et du SB-525334 (5  $\mu$ M) sont aussi analysés dans ces conditions ( $n = 3$ ,  $p > 0,05$  (#),  $p \leq 0,05$  (\*) et  $p \leq 0,01$  (\*\*)). (B) La production de NO par les 3T3 TAp73<sup>+/+</sup> et TAp73<sup>-/-</sup> est mesurée par un dosage de Griess sur une fraction du surnageant, 24h après le début du traitement et de l'infection (moyenne de triplicatas).**



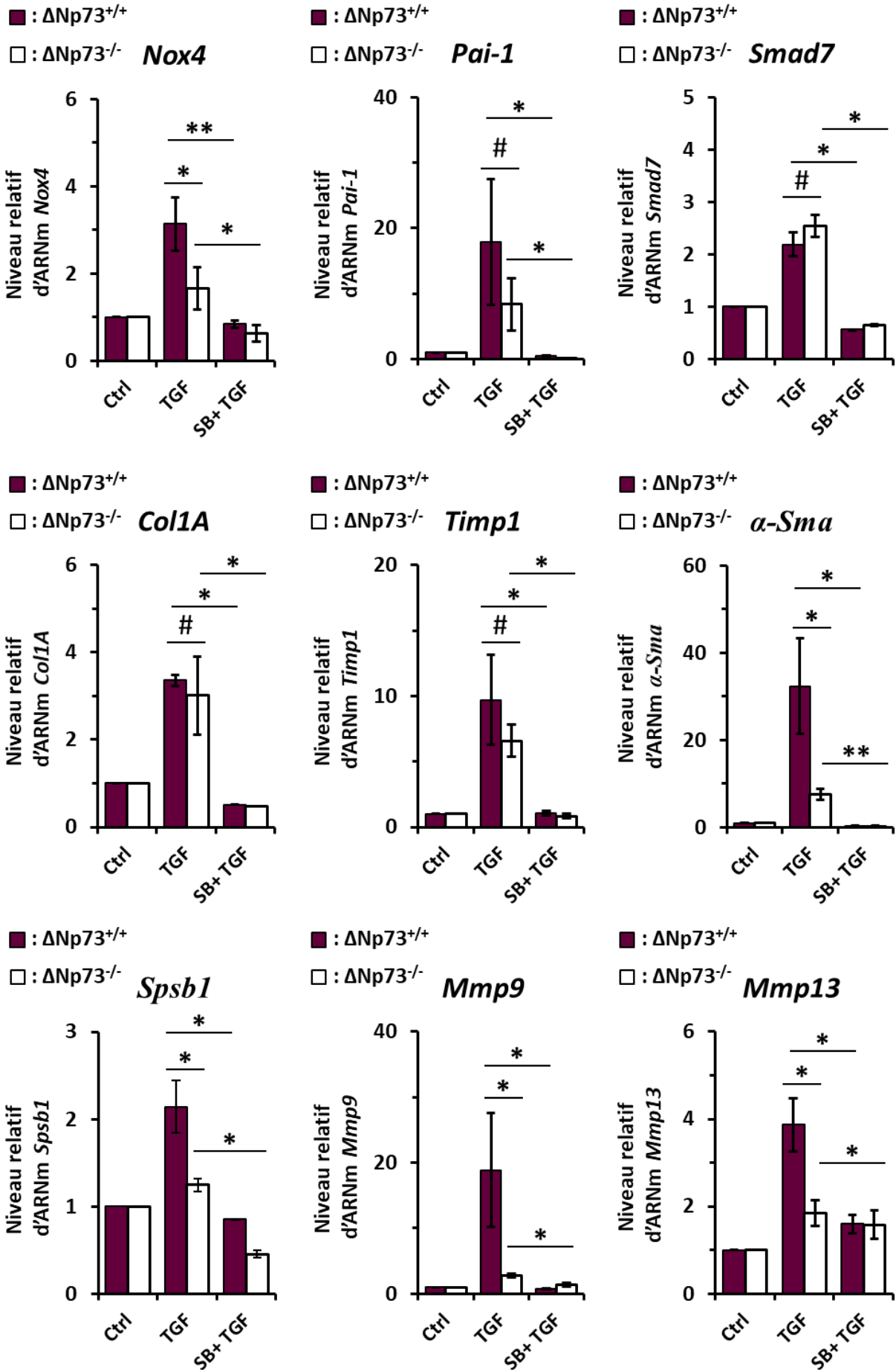
**Figure III-12 : La déficience en isoformes  $\Delta Np73$  affecte l'induction de la iNOS et la réponse génique dépendante de Nrf2 dans les BMDM lors d'un traitement prolongé avec le TGF- $\beta$ 1.**

(A) Dosages de Griess réalisés à partir de surnageants de culture de BMDM de souris  $\Delta Np73^{+/+}$  et  $\Delta Np73^{-/-}$  différenciés en milieu conditionné L929 après 24h de traitement avec du LPS (30 ng/ml) et de l'IFN- $\gamma$  (10 U/ml) en présence ou non de TGF- $\beta$ 1 (0,5 ng/ml) ajouté 1h (moitié gauche de l'histogramme) ou 48h (moitié droite de l'histogramme) avant la stimulation. Ces expériences sont réalisées avec des cellules préalablement privées de sérum (0,5% SVF). L'effet du SB-525334 (5  $\mu$ M) a aussi été mesuré lors d'un traitement prolongé des cellules (48h) avec le TGF- $\beta$ 1 ( $n = 4$ ,  $p > 0,05$  (#) et  $p \leq 0,05$  (\*)). (B) Analyse et quantification de l'expression de la protéine iNOS dans les BMDM  $\Delta Np73^{+/+}$  et  $\Delta Np73^{-/-}$  dans les mêmes conditions qu'en (A), suite à un traitement prolongé des cellules avec du TGF- $\beta$ 1 (48h, 0,5 ng/ml). Les valeurs sont rapportées à l'expression de la iNOS dans les cellules  $\Delta Np73^{+/+}$  en absence de TGF- $\beta$ 1 exogène ( $n = 3$ ,  $p > 0,05$  (#) et  $p \leq 0,05$  (\*)). (C), (D), (E) et (F) L'expression des gènes *Nos2* (C), *Srxn* (D), *Hmox1* (E) et *Nqo1* (F) est analysée par RT-qPCR dans les BMDM  $\Delta Np73^{+/+}$  et  $\Delta Np73^{-/-}$  traités de façon identique à l'expérience présentée en (B). Les gènes de référence utilisés sont l'ARN 18S et *Hprt*, et les valeurs sont rapportées à celles de l'échantillon de BMDM  $\Delta Np73^{+/+}$  traités seulement avec le LPS et l'IFN- $\gamma$  à l'issue d'une incubation de 48h dans un milieu sans TGF- $\beta$ 1 exogène ( $n = 3$ ,  $p > 0,05$  (#),  $p \leq 0,05$  (\*) et  $p \leq 0,01$  (\*\*)).





**Figure III-13 : L'induction maximale d'un ensemble de gènes cibles du TGF- $\beta$  dans les fibroblastes pulmonaires requiert la présence des isoformes  $\Delta Np73$ . L'effet du TGF- $\beta 1$  exogène (5 ng/ml) et du SB-525334 (5  $\mu M$ ) sur l'induction d'une série de gènes cibles du TGF- $\beta$  est analysé par RT-qPCR dans les fibroblastes pulmonaires de souris  $\Delta Np73^{+/+}$  et  $\Delta Np73^{-/-}$  après 24h de traitement des cellules dans un milieu appauvri en sérum (0,5% SVF). Les valeurs sont normalisées en fonction des variations d'expression du gène de référence ARN 18S, puis sont rapportées aux valeurs des contrôles respectifs (Ctrl  $\Delta Np73^{+/+}$  ou Ctrl  $\Delta Np73^{-/-}$ ) (n = 4, p > 0,05 (#), p  $\leq$  0,05 (\*) et p  $\leq$  0.01 (\*\*)).**





**CHAPITRE V :**  
**DISCUSSION ET PERSPECTIVES**



Les régulations réciproques entre la iNOS et p53 ont fait l'objet de nombreuses études. La description relativement récente des deux homologues de p53 a ouvert de nouvelles perspectives dans ce domaine. Notre laboratoire a donc abordé il y a quelques années une analyse des interactions potentielles entre NO et p73, et c'est dans ce cadre qu'a été découverte l'induction de TAp73 par de fortes concentrations en NO. Le principal objectif de mes travaux fut d'étudier le rôle potentiel de p73 dans la régulation de l'expression de la iNOS. Nous disposions pour cela de cellules 3T3 de génotype sauvage ou issues de souris sélectivement déficientes pour les isoformes TAp73, ce qui nous permit d'étudier le rôle particulier de cette classe d'isoformes.

Il est à noter que, contrairement à ce qui a été démontré chez des macrophages de souris par exemple, la seule stimulation des récepteurs à l'IFN- $\gamma$  ou au LPS est insuffisante pour induire efficacement la iNOS dans les cellules 3T3. Ceci confirme qu'il existe des propriétés d'induction du gène *Nos2* spécifiques à chaque type cellulaire qui peuvent par exemple provenir de différences d'accessibilité des éléments de réponse du promoteur *Nos2* aux facteurs de transcription ou de l'existence de voies de signalisation différemment activées selon le type cellulaire. De plus, et contrairement aux macrophages, les fibroblastes ne sécrètent que peu de cytokines proinflammatoires (ex : TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) susceptibles d'agir de façon autocrine et paracrine pour amplifier la stimulation par les cytokines ajoutées dans le milieu de culture.

## 1 Régulation négative de l'expression de la iNOS par les isoformes TAp73

Considérant le rôle répresseur de p53 sur le gène *Nos2*, nous envisagions initialement que si les isoformes TAp73 exerçaient un rôle analogue, nous devrions observer une augmentation de l'expression de la iNOS dans les cellules *TAp73*<sup>-/-</sup>. Nous avons en effet constaté une forte hausse de l'induction de l'expression de la iNOS dans les cellules 3T3 *TAp73*<sup>-/-</sup>. Cette surexpression a été observée à la fois au niveau de la quantité de transcrits *Nos2* et de protéines iNOS, en réponse au traitement avec une combinaison d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  (ainsi qu'en substituant le LPS à l'IL-1 $\beta$ ). Elle a pour conséquence une augmentation de la production de NO, reflétée par l'augmentation de la production de nitrite. Nos observations suggèrent que les isoformes TAp73 exercent un effet négatif sur l'induction de la iNOS qui n'avait encore à ce jour jamais été décrit.

Il sera à l'avenir intéressant d'aborder la question du statut de p53 dans la régulation de la iNOS exercée par les isoformes TAp73, car les 3T3 sont des lignées immortalisées pour lesquelles il est probable que la voie de signalisation dépendante de p53 soit inactivée. A l'instar d'autres fonctions pour lesquelles les différents membres de la famille p53 présentent une redondance fonctionnelle, il est possible que le phénotype observé dans notre modèle cellulaire dépende strictement des isoformes TAp73 en raison d'une perte de fonction de la protéine p53. L'analyse de l'implication des isoformes TAp73 dans la régulation de la iNOS dans des lignées primaires permettra de répondre à ces questions. Des premiers résultats obtenus avec des MEFs primaires non immortalisés semblent cependant indiquer que le contrôle de l'induction de la iNOS par les isoformes TAp73 peut s'exercer en présence d'une protéine p53 fonctionnelle.

## 1.1 Coopération entre les isoformes TAp73 et le TGF- $\beta$ dans le processus de répression de la iNOS

Après avoir fait la démonstration que la surexpression de la iNOS observée dans les cellules *TAp73<sup>-/-</sup>* provenait d'une réponse différentielle à un facteur sécrété par les 3T3 eux-mêmes et présent dans le sérum de culture, nous avons rapidement suspecté une implication potentielle du TGF- $\beta$  dans le phénotype observé. Les résultats de nos travaux permettent de conclure à une perte significative de l'effet répresseur du TGF- $\beta$  sur l'induction de l'expression de la iNOS dans les 3T3 *TAp73<sup>-/-</sup>*. L'inhibition de la voie de signalisation dépendante du récepteur ALK5 permet en effet de rétablir un niveau identique d'induction de la iNOS dans les lignées des deux génotypes, tandis que le TGF- $\beta$  apporté de façon exogène exerce un fort effet répresseur sur l'induction de la iNOS qui est perdu en quasi-totalité dans les cellules *TAp73<sup>-/-</sup>*. Malgré tout, de nombreuses questions restent en suspens pour expliquer la synergie entre les isoformes TAp73 et le TGF- $\beta$  à l'origine de ce phénomène.

### 1.1.1 Effet des isoformes TAp73 et du TGF- $\beta$ sur l'induction transcriptionnelle du gène *Nos2*

Nos résultats montrent que le TGF- $\beta$  et les isoformes TAp73 exercent une partie de leur effet répresseur en réduisant la quantité de transcrits du gène *Nos2* en réponse au mix de cytokines utilisé pour l'induction. Il reste à déterminer si ces observations sont la conséquence d'une répression transcriptionnelle ou d'un mécanisme de déstabilisation post-transcriptionnelle des ARNm *Nos2*. Si plusieurs études font état d'une répression de la iNOS

par p53, le mécanisme sous-jacent reste aujourd'hui inconnu, et rien n'indique qu'il nécessite une coopération avec le TGF- $\beta$ <sup>536,537</sup>. Dans la plupart de ces travaux, les auteurs suggèrent que la protéine p53 entrerait en compétition avec d'autres facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B et AP-1 pour la liaison à des quantités limitées de coactivateurs transcriptionnels comme p300 et CBP<sup>551</sup>. Une multitude de facteurs de transcription (ex : NF- $\kappa$ B, IRF1, IRF3, STAT-1 $\alpha$ ) sont activés en réponse aux cytokines et concourent à l'induction de l'expression de la iNOS. Il sera nécessaire de mesurer l'impact du TGF- $\beta$  et de la déficience en isoformes TAp73 sur leur état d'activation (par phosphorylation de résidus spécifiques) ainsi que sur leur capacité à stimuler l'activité du promoteur *Nos2*.

Il existe de très nombreux exemples de régulations croisées entre les voies de signalisation induites par l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et le LPS d'une part, et la voie de signalisation du TGF- $\beta$  d'autre part, au sein desquelles les isoformes TAp73 et leurs homologues pourraient s'immiscer pour moduler l'induction de la iNOS. Dans les macrophages RAW 264.7 par exemple, la répression transcriptionnelle de la iNOS par le TGF- $\beta$  passe par une suppression de l'activation de STAT1 : le récepteur T $\beta$ RI s'associe au récepteur IFNGR1 et le phosphoryle, ce qui empêche l'activation de STAT1 par phosphorylation<sup>326</sup>. Dans les macrophages dérivant de cellules de moelle osseuse (BMDM), les macrophages péritonéaux et les macrophages associés à des tumeurs (TAMs), SMAD2 et SMAD3 sont nécessaires à la répression de la iNOS par le TGF- $\beta$ , en limitant l'activation d'IRF3 et donc la production d'IFN- $\beta$  en réponse au LPS qui contribue normalement à amplifier l'activation de STAT1<sup>328</sup>. En marge de la régulation de l'expression de la iNOS, le TGF- $\beta$  réprime aussi la transcription génique dépendante de STAT1 dans les cellules épithéliales, en favorisant son interaction avec la protéine PIAS1 (*Protein inhibitor of activated STAT1*), qui inhibe son activité transcriptionnelle<sup>552</sup>. A l'inverse, l'IFN- $\gamma$  produit par les macrophages recrutés au niveau de lésions cutanées retarde le processus de cicatrisation en antagonisant la signalisation TGF- $\beta$  des fibroblastes, *via* une réduction de l'expression de SMAD2 et une augmentation de l'expression de SMAD7<sup>553</sup>.

Il existe aussi des connexions entre la voie de signalisation du TGF- $\beta$  et NF- $\kappa$ B, qui est un facteur de transcription au rôle capital dans l'induction transcriptionnelle de *Nos2* et est activé dans notre modèle en réponse à l'IL-1 $\beta$ , au TNF- $\alpha$  et au LPS. Dans des fibroblastes de souris, NF- $\kappa$ B/RelA induit l'expression de SMAD7, qui inhibe la phosphorylation de SMAD2/3 en s'associant au récepteur T $\beta$ RI<sup>554</sup>. Dans des cellules cancéreuses des voies aériennes supérieures, le TGF- $\beta$  induit l'activation séquentielle de la kinase TAK1 (*TGF- $\beta$ -activated*



kinase 1), IKK, I $\kappa$ B et RelA/p65, ce qui aboutit à la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B et à la promotion de la carcinogénèse<sup>555</sup>. En retour, l'expression de SMAD7 est aussi induite par NF- $\kappa$ B dans ces cellules. Indépendamment de NF- $\kappa$ B, la kinase IKK $\alpha$  forme un complexe avec SMAD3 pour induire la transcription de SNAIL et de SLUG dans un modèle cellulaire de cancer pancréatique (Panc1)<sup>556</sup>. Ces derniers répriment l'expression de la E-cadhérine (protéines des jonctions adhérentes), un phénomène caractéristique de l'EMT induite en réponse au TGF- $\beta$ . Enfin, il a dernièrement été démontré que l'activation du TLR4 induit une réduction de l'expression du récepteur BAMBI (*BMP and activin membrane-bound inhibitor*)<sup>557</sup>. BAMBI est un pseudorécepteur apparenté au récepteur T $\beta$ RI qui ne possède pas de domaine tyrosine kinase intracytoplasmique fonctionnel et agit donc comme un inhibiteur de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ . De cette façon, le TLR4 favoriserait l'EMT induite par le TGF- $\beta$  et participerait au développement d'une hyperplasie de la prostate. Ces études mettent en évidence une divergence de réponse au LPS entre les cellules inflammatoires, pour lesquelles il y a une régulation négative de la signalisation TGF- $\beta$  par NF- $\kappa$ B, et les cellules épithéliales et mésenchymateuses, pour lesquelles le TLR4 renforce les effets du TGF- $\beta$ .

Le récepteur PPAR- $\gamma$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*) figure aussi parmi les molécules capables de limiter l'induction de la iNOS en interférant avec ces voies de signalisation. Il antagonise l'activité de NF- $\kappa$ B, STAT1 et AP-1<sup>558-560</sup>. Or, ce récepteur hormonal fait partie des cibles réprimées par le TGF- $\beta$ , et il se trouve exprimé dans différentes lignées de fibroblastes. Toutefois, dans l'hypothèse où les isoformes TAp73 coopèreraient avec le TGF- $\beta$  pour réprimer l'expression de PPAR- $\gamma$ , ceci devrait limiter l'activation transcriptionnelle de *Nos2* dans les cellules TAp73<sup>-/-</sup>. Cependant, le cas de PPAR- $\gamma$  demeure intéressant au niveau de son mécanisme de répression transcriptionnelle par le TGF- $\beta$ , très récemment décrit dans deux études indépendantes. Une première équipe a montré que lors d'une stimulation de fibroblastes cardiaques murins avec du TGF- $\beta$ , SMAD3 forme un complexe avec SMAD4 ainsi qu'avec le corépresseur mSin3A, ce qui permet le recrutement de HDAC1 sur deux sites SBE situés dans le promoteur de *Pparg*<sup>561</sup>. La désacétylation des histones génère un environnement restrictif autour de la chromatine, qui empêche la liaison et l'assemblage de la machinerie de transcription sur le promoteur. Dans des fibroblastes pulmonaires de fœtus humain (IMR-90), une seconde équipe a identifié dans le promoteur de *Pparg* deux sites consensus consécutifs de type SBE (séquence GTCT suivie de son palindrome AGAC) et un autre site de type TIE (*TGF- $\beta$ -inhibitory element* = séquence du type 5'-GNNTTGGA-3')<sup>562</sup>. Les mêmes auteurs démontrent que la répression par le TGF- $\beta$  peut

être médiée de façon indépendante par une fixation de SMAD3 et SMAD4 sur chacun de ces deux sites, *via* la formation de complexes SMAD-E2F4-p107, de la même façon que pour *c-myc* (autre cible réprimée par le TGF- $\beta$ )<sup>563</sup>. La répression d'un gène cible par le TGF- $\beta$  par l'intermédiaire d'une fixation des SMADs sur une séquence TIE fut découverte dans le cadre de la répression du gène *Mmp3*<sup>564</sup>.

Il serait intéressant d'étudier l'existence d'un mécanisme similaire conduisant à la répression par le TGF- $\beta$  du gène *Nos2*. Le premier obstacle auquel nous nous heurtons toutefois est qu'il n'a jusqu'à présent jamais été identifié de tels sites (SBE ou TIE) dans le promoteur de ce gène. En réalisant une analyse informatique du promoteur du gène *Nos2*, nous avons identifié plusieurs sites SBE potentiels (dont deux sites consécutifs à la manière de ceux retrouvés dans le promoteur de *Pparg*) ainsi qu'un site TIE potentiel dont la séquence correspond parfaitement à la séquence consensus décrite dans les travaux cités précédemment. Un travail de validation reste nécessaire pour pouvoir les impliquer dans le mécanisme de répression transcriptionnelle de *Nos2* par le TGF- $\beta$ . Nous disposons désormais de constructions gène rapporteur qui nous permettront de comparer l'effet du mix de cytokines et du TGF- $\beta$  sur l'activité du promoteur *Nos2* dans les 3T3 *TAp73*<sup>+/+</sup> et *TAp73*<sup>-/-</sup>. Ceci nous servira à identifier et localiser de potentiels éléments de réponse nécessaires à la répression de *Nos2* par le TGF- $\beta$  et les isoformes TAp73. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ou de retard sur gel pourraient également indiquer si le TGF- $\beta$  et les isoformes TAp73 affectent la capacité de différents facteurs de transcription à se lier à leurs éléments de réponse dans le promoteur du gène *Nos2*.

### 1.1.2 Leçons tirées des autres exemples d'interactions entre la voie de signalisation du TGF- $\beta$ et la protéine p53 ou ses homologues

Nous décrivons ici pour la première fois une coopération entre les isoformes TAp73 et la voie de signalisation du TGF- $\beta$  qui potentialise l'effet répresseur de ce dernier sur l'induction de l'expression de la iNOS. Il ne faut toutefois pas ignorer que nos données rejoignent les résultats de plusieurs autres études qui rapportaient déjà l'existence d'interactions entre des membres de la famille p53 et la voie de signalisation du TGF- $\beta$  dans des contextes différents<sup>565</sup>.

La convergence entre les voies de signalisation du TGF- $\beta$  et de p53 a été décrite dès 1991 : l'inactivation de p53 par le virus SV40 résulte en une perte des effets antitumoraux du TGF- $\beta$ <sup>566</sup>. En 2003, une équipe a fait la démonstration que p53 est nécessaire à la différenciation mésoendodermique au cours du développement embryonnaire chez le xénope, en potentialisant la réponse à l'activine, un ligand de la même famille que le TGF- $\beta$ <sup>567</sup>. En comparaison, la déficience en p53 n'a pas d'effet sur ce processus de différenciation chez la souris. Les auteurs font l'hypothèse d'un rôle compensatoire de p63 et p73, qui sont coexprimées avec p53 dès le stade *gastrula* dans les embryons de xénope, tandis qu'elles ne sont exprimées qu'à des stades plus tardifs chez la souris. Dans des cellules humaines HepG2, la présence d'un élément de réponse à p53 dans le promoteur de *Mix.2*, un marqueur de différenciation mésoendodermique, est en effet requise pour son induction maximale en réponse au TGF- $\beta$ , et les trois membres de la famille p53 se sont révélés capables d'assurer un effet potentialisateur dans ce contexte. Les auteurs de ces travaux rapportent aussi la formation de complexes fonctionnels de p53 avec SMAD2/3, qui modulent l'induction de gènes dont le promoteur contient des éléments de réponse spécifiques à ces deux facteurs de transcription, tels que *p21<sup>WAF1</sup>*, *Pai-1* et *Mmp2*. Dans des lignées primaires murines utilisées au cours de la même étude (fibroblastes embryonnaires et cellules progénitrices hématopoïétiques), la protéine p53 renforce aussi nettement les effets antiprolifératifs du TGF- $\beta$  qui dépendent de l'induction de p21.

Plus récemment, dans un modèle de néphropathie rénale obstructive, la protéine p53 est apparue phosphorylée sur les résidus Ser9 et Ser15 en réponse au TGF- $\beta$ , de façon dépendante de la production de ROS *via* la sous-unité p22<sup>phox</sup> de la NADPH oxydase<sup>568</sup>. Ces modifications post-traductionnelles lui permettent d'être recrutée au niveau du p53RE du promoteur *Pai-1*, où p53 potentialise l'induction de PAI-1 en coopération avec SMAD3. Une étude supplémentaire fait également part de la nécessaire présence de séquences SBE dans le promoteur de *Pai-1* pour permettre le recrutement de p53 et l'assemblage d'un complexe avec SMAD2/3<sup>569</sup>. L'interaction de p53 avec SMAD2/3 se produit spécifiquement entre le domaine N-terminal phosphorylé de p53 et le domaine MH1 N-terminal de SMAD2/3, ce qui laisse leur domaine MH2 libre de pouvoir interagir avec SMAD4.

Les ROS produites par l'activité NOX4 sont impliquées dans de multiples processus contrôlés par le TGF- $\beta$ , tels que la migration cellulaire, la prolifération, la cicatrisation, et la modulation de marqueurs de l'EMT dans une grande variété de types cellulaires<sup>570</sup>. De récents travaux révèlent que le statut de p53 impacte différenciellement l'expression et l'activité de

NOX4<sup>571</sup>. La forme WT de p53 exerce une régulation négative de la NOX4 induite en réponse au TGF- $\beta$ , dans des cellules épithéliales pulmonaires tumorales humaines (H1299) ainsi que dans des cellules épithéliales normales (MCF-10A) et tumorales (MDA-MB-231) du sein. Elle protège ainsi les cellules épithéliales de l'EMT et de la migration induites par le TGF- $\beta$ . A l'opposé, les formes mutantes de p53 (R175H et R280K) perdent cette fonction répressive voire potentialisent (R280K) l'induction de NOX4 par le TGF- $\beta$ , ce qui s'accompagne d'une hausse de la production de ROS, de la migration cellulaire, de l'expression de la fibronectine, et de l'activation de FAK (*Focal adhesion kinase*). Ceci explique en partie le comportement invasif des cellules exprimant une forme mutante de p53. Les derniers travaux de cette équipe ont permis de révéler les mécanismes sous-jacents à cette régulation différentielle de NOX4 en fonction du statut de p53<sup>572</sup>. La forme WT de p53 exerce une répression de *Nox4* en se fixant à un p53RE situé en position -4729, sans stimulation préalable au TGF- $\beta$ , et en recrutant une histone désacétylase (HDAC). Le domaine transactivateur de p53 joue un rôle capital lors de cette répression. A l'inverse, différentes formes mutantes de p53 (R175H, R249S, R273H, D281G) potentialisent l'induction transcriptionnelle de *Nox4* en se fixant à un autre p53RE localisé en position -4694 uniquement en présence de TGF- $\beta$ , et en recrutant l'histone acétyltransférase p300. Dans les deux cas, p53 forme un complexe avec SMAD3 qui se trouve associée à un SBE en position -4644.

L'ancrage à p53 de SMADs activés et de mSin3A dans le promoteur de *AFP* (*Alpha-fetoprotein*) joue aussi un rôle critique dans sa répression transcriptionnelle induite par le TGF- $\beta$  dans les cellules hépatiques<sup>573</sup>. L'AFP est une protéine du sérum normalement exprimée uniquement au cours du développement du fœtus, mais une mutation perte de fonction de p53 peut provoquer sa réexpression dans des cellules tumorales chez l'adulte. De plus, il a été découvert que la forme oncogénique de Ras induit la phosphorylation de la forme mutante de p53, qui forme alors des complexes ternaires avec SMAD2/3 et p63, ce qui antagonise l'action antimétastatique de cette dernière et favorise la progression tumorale<sup>574</sup>. De façon générale, il semblerait que la forme WT de p53 potentialise les effets antitumoraux du TGF- $\beta$ , tandis que les formes mutantes de p53 seraient au moins en partie responsables du détournement des fonctions du TGF- $\beta$  en faveur de la progression tumorale<sup>575</sup>.

Pour la plupart des mécanismes coopératifs décrits faisant intervenir p53 ou ses homologues et le TGF- $\beta$ , la fixation de SMADs et de p53 sur leurs éléments de réponse respectifs était une obligation pour permettre leur interaction. De fait, il faut donc remarquer

que comme pour les SBE/TIE potentiels, aucun élément de réponse classique à p53 n'a encore été identifié dans le promoteur du gène *Nos2*. Il est ainsi probable que sa régulation transcriptionnelle par p53 et p73 passe par d'autres mécanismes qu'une simple fixation sur des éléments de réponse de type p53RE.

### 1.1.3 Régulation de la signalisation TGF- $\beta$ par les isoformes TAp73

De nombreux éléments doivent encore être analysés pour connaître l'impact global des isoformes TAp73 dans la voie de signalisation du TGF- $\beta$ , parmi lesquels nous pouvons citer : (1) L'expression des récepteurs de type I (ALK5) et de type II ainsi que leur état d'activation par phosphorylation. (2) L'activation de SMAD3 car cette protéine a déjà été décrite comme nécessaire et suffisante pour assurer l'effet répresseur du TGF- $\beta$  sur la iNOS (macrophages RAW 264.7)<sup>576</sup>. (3) L'expression de SMAD4 (co-SMAD) et SMAD7 (inhibiteur de SMAD). (4) L'activation de voies indépendantes des SMADs (p38 MAPK, JNK, ERK1/2, PI3K-Akt). Si nous avons démontré que la production totale de TGF- $\beta$ 1 n'est pas affectée par la déficience en isoformes TAp73, il conviendra de s'assurer que cette déficience ne puisse pas intervenir dans le processus d'activation du TGF- $\beta$  latent. Déterminer l'effet des isoformes TAp73 sur tous ces évènements est d'autant plus important que récemment, dans un modèle cellulaire murin de cancer pancréatique, les voies de signalisation indépendantes des protéines SMADs (tout du moins les voies MAPK ERK1/2 et Akt) sont apparues favorisées au dépend de la voie classique dépendante des protéines SMADs dans les cellules *TAp73*<sup>-/-</sup><sup>577</sup>. La perte d'expression des isoformes TAp73 a ainsi été associée à un mauvais pronostic, et à une hausse des marqueurs phénotypiques caractéristiques de l'EMT, indépendamment du statut de p53.

Les premiers éléments que nous avons obtenus suggèrent que le niveau basal de phosphorylation de SMAD2 est très réduit dans les 3T3 *TAp73*<sup>-/-</sup> cultivés en présence de fortes concentrations de sérum pendant un temps prolongé. Toutefois, la présence des isoformes TAp73 n'a pas d'effet sur la sensibilité au TGF- $\beta$  à court terme, d'après les niveaux de phosphorylation de SMAD2 que nous avons quantifiés en présence de concentrations croissantes de TGF- $\beta$ 1 après 1h de stimulation. Il se pourrait donc que les isoformes TAp73 exercent un effet sur le maintien de la sensibilité au long terme au TGF- $\beta$ . Les 3T3 étant des cellules immortalisées, elles sont exposées de façon prolongée au TGF- $\beta$  qu'elles produisent elles-mêmes et au TGF- $\beta$  présent dans le sérum, ce qui laisserait suffisamment de temps à ce

type de mécanisme pour se mettre en place. Dans ce cadre, il serait intéressant d'analyser leur rôle dans le trafic des récepteurs, dont l'expression à la surface des cellules est régulée de façon spatio-temporelle et dynamique par de nombreux processus<sup>578</sup>.

#### 1.1.4 Implication des isoformes TAp73 et du TGF- $\beta$ dans la régulation de la stabilité de la protéine iNOS.

L'analyse de nos données concernant la stabilité de la protéine iNOS dans les 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>* et *TAp73<sup>-/-</sup>* indique que les isoformes TAp73 exercent un second effet négatif sur l'expression de la iNOS en réduisant significativement son temps de vie. Si nous n'avons pas testé l'effet d'inhibiteurs de calpaïnes (seconde voie majeure de dégradation de la iNOS), nous avons cependant démontré que la plus forte dégradation de la iNOS dans les cellules 3T3 *TAp73<sup>+/+</sup>* est strictement dépendante de l'activité du protéasome, lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu riche en sérum. Il faudra s'assurer que la déficience en isoformes TAp73 augmente le temps de vie de la iNOS en provoquant une perte des effets du TGF- $\beta$ , en mesurant l'effet d'un traitement avec du TGF- $\beta$ 1 exogène et avec l'inhibiteur d'ALK5 sur la stabilité de la protéine.

Les complexes SPSB1 et SPSB2 ont été récemment identifiés comme les principaux responsables de la polyubiquitination et de la dégradation de la iNOS par le protéasome<sup>220</sup>. Ils interagissent avec des résidus localisés dans la région N-terminale de la iNOS (motif DINNN) via leur domaine SPRY<sup>579</sup>. Le complexe est stabilisé grâce à la formation de nombreuses liaisons hydrogène inter- et intramoléculaires, puis les 40 résidus du domaine SOCS permettent le recrutement et l'assemblage des composants du complexe E3 ubiquitine ligase (Elongine B et C, Culline 5 et RBX2). Plusieurs groupes développent actuellement des peptides mimétiques à visée anti-infectieuse capables de prévenir l'interaction entre la iNOS et le domaine SPRY des protéines de la famille de SPSB<sup>580,581</sup>. Il faut remarquer que ce mécanisme se distingue nettement de celui permettant aux isoformes  $\Delta$ Np63 $\alpha$  d'induire la dégradation de la iNOS<sup>582</sup>. En réponse à un traitement avec du cisplatine, les isoformes  $\Delta$ Np63 $\alpha$  sont phosphorylées par ATM et, en coopération avec NF- $\kappa$ B, induisent transcriptionnellement l'expression de RPN13 (*Regulatory particle non-ATPase subunit 13*), une protéine qui inhibe la dimérisation de la iNOS et entraîne sa dégradation par le protéasome.

Nos résultats suggèrent que les isoformes TAp73 sont nécessaires à l'induction de SPSB1 par le TGF- $\beta$ 1 dans les 3T3, tandis que l'expression de SPSB2 n'est pas affectée significativement. Ceci constitue une piste très intéressante pour expliquer le déficit de dégradation de la iNOS observé dans les 3T3 *TAp73*<sup>-/-</sup>. Il faudra éteindre l'expression de SPSB1 (grâce à l'emploi de siRNA en notre possession) pour déterminer si l'induction de son expression par le TGF- $\beta$ 1 et les isoformes TAp73 est effectivement responsable de la dégradation de la iNOS par le protéasome. Une étude antérieure rapportait déjà l'induction de SPSB1 (mais pas des autres membres de la famille SPSB) par le TGF- $\beta$ 1, mais aussi par le TLR4 qui est activé dans notre modèle en réponse au LPS<sup>583</sup>. De façon intéressante, le récepteur T $\beta$ R2 a récemment été identifié comme une cible de SPSB1, qui induit sa dégradation protéasomale dans plusieurs lignées tumorales HEK-293T, U87MG et NIH3T3<sup>584</sup>. Ces résultats vont à l'encontre de nos observations car nous n'avons pour notre part pas constaté de réduction de la réponse au TGF- $\beta$ 1 dans les cellules *TAp73*<sup>+/+</sup> malgré une plus forte expression de SPSB1 en comparaison aux cellules *TAp73*<sup>-/-</sup>.

Cependant, la découverte d'une nécessaire coopération entre les isoformes TAp73 et le TGF- $\beta$ 1 lors de l'induction de SPSB1 constitue une avancée importante dans la compréhension des mécanismes de dégradation de la iNOS. Elle permet aussi de contextualiser les effets de cette coopération, car l'expression basale de SPSB1 varie de façon importante d'un tissu à l'autre<sup>585</sup>. En ce qui nous concerne, nous avons mesuré un niveau d'expression basale de *Spsb1* beaucoup plus faible dans les macrophages en comparaison aux fibroblastes, ce qui pourrait expliquer des différences de régulation de l'expression de la iNOS par les isoformes TAp73 entre ces deux types cellulaires. Le complexe SPSB2 ayant des effets non négligeables sur la stabilité de la iNOS dans certains types cellulaires comme les macrophages, le ratio d'expression entre SPSB1 et SPSB2 devrait aussi être considéré, et l'un ou l'autre des deux complexes pourrait prédominer en fonction du type cellulaire.

## 2 Conséquences de la coopération entre le TGF et les isoformes TAp73 sur des fonctions cellulaires dépendantes de la production de NO

### 2.1 Régulation de la réponse génique dépendante de Nrf2 et des effets anti-parasitaires dépendants de NO

Après avoir mis en évidence pour la première fois l'existence d'une coopération entre le TGF- $\beta$  et les isoformes TAp73 opérante dans la régulation de la iNOS, il nous a paru important de déterminer si cette régulation pouvait avoir des conséquences fonctionnelles dans des processus dépendant de la production de NO.

C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de mesurer les effets du TGF- $\beta$  et des isoformes TAp73 sur l'induction de gènes cibles de Nrf2. Ce facteur de transcription exerce un rôle majeur dans la protection des cellules contre le stress oxydant. Nos résultats indiquent que les isoformes TAp73, en réprimant l'induction la iNOS en coopération avec le TGF- $\beta$ , impactent l'induction de gènes cibles de Nrf2 dans les cellules 3T3. Parmi les gènes cibles de Nrf2 dont l'induction s'est trouvée notablement augmentée dans les cellules 3T3 TAp73<sup>-/-</sup>, on compte les gènes *Hmox1*, *Nqo1*, *Sesn2* et *Srxn*. L'hème oxygénase 1 catalyse la dégradation de l'hème et a des propriétés anti-inflammatoires (notamment *via* l'inhibition de l'activité NO synthase et *via* la production de monoxyde de carbone). La NADPH quinone déshydrogénase 1 prévient la réduction monoélectronique des quinones et donc la formation d'espèce réactives qui en résulte (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). La sulfirédoxine appartient quant à elle à la famille des sulfinyles réductases, au même titre que les sestrines. Cette famille d'enzymes est essentielle à la restauration de la fonction des peroxyréductases (enzymes de détoxification des peroxydes) inactivées par sulfinylation (état de suroxydation). Les isoformes TAp73 exercent donc un effet négatif sur l'induction de gènes aux propriétés anti-inflammatoires (*Hmox1*) et antioxydantes (*Nqo1*, *Srxn*, *Sesn2*) dans le modèle cellulaire étudié. Cet effet est en grande partie dépendant de la production de NO. En effet, l'inhibition de l'activité iNOS par l'aminoguanidine prévient en totalité l'induction de l'expression des gènes cibles de Nrf2 analysés, à l'exception de *Sesn2*. La stimulation des récepteurs aux cytokines initie sans doute des processus indépendants de la production de NO qui activent également Nrf2 (par exemple la production d'EROs déclenchée par le TNF- $\alpha$ ).



La supposée hausse d'activation par phosphorylation et de translocation nucléaire de Nrf2 dans les cellules *TAp73<sup>-/-</sup>* en réponse à l'induction de la iNOS n'a pas pu être observée en immunoblot avec des extraits totaux de protéines. Une analyse plus spécifique de la relocalisation nucléaire de Nrf2 devra être entreprise, par un fractionnement cellulaire ou en immunocytochimie. L'implication de Nrf2 dans la régulation des gènes analysés a été démontrée à de multiples reprises dans des modèles différents, et nos résultats dans les BMDM *Nrf2<sup>-/-</sup>* confortent cette conclusion. Il faut toutefois souligner que d'autres facteurs de transcription peuvent aussi induire leur expression. Par exemple, l'induction de HO-1 est aussi contrôlée par NF- $\kappa$ B et p53<sup>586</sup>. Celles de la sulfirédoxine et de NQO1 le sont par AP-1<sup>587,588</sup>. Enfin, la sestrine 2 est régulée positivement par p53, AP-1 et HIF-1<sup>589</sup>. Etant donné que ces facteurs de transcription peuvent tous être activés par les concentrations de NO générées par la iNOS, il convient de rester prudent quant à l'interprétation des résultats que nous avons obtenus, notamment en ce qui concerne l'induction de la sestrine 2 qui s'avère indépendante de la production de NO dans notre modèle.

Notre découverte de la régulation négative de l'expression de la iNOS par les isoformes *TAp73* pourrait avoir des conséquences importantes en cancérologie, puisqu'il est très souvent observé une surexpression de la iNOS dans les tumeurs n'exprimant plus de protéine p53 fonctionnelle<sup>590</sup>. Dans ces situations, les isoformes *TAp73* pourraient constituer une voie de sauvegarde pour limiter les effets protumoraux de la iNOS. Dans un contexte tumoral, le fait que cette coopération entre les isoformes *TAp73* et le TGF- $\beta$  puisse impacter la production de NO et l'activité de Nrf2 pourrait avoir des conséquences importantes sur le devenir de la tumeur. A ce sujet, les fibroblastes font partie intégrante du stroma, qui joue un rôle majeur dans le développement des tumeurs : les fibroblastes du stroma déficients en p53 surexpriment la iNOS, et l'augmentation de l'activité iNOS qui en résulte supporte la croissance tumorale<sup>591</sup>. De façon générale, l'activité transitoire de Nrf2 est bénéfique pour prévenir l'oncogenèse et la progression tumorale. Cependant, la stabilisation constitutive de Nrf2, telle qu'elle a pu être observée dans de nombreuses tumeurs portant des mutations somatiques dans les gènes *Nrf2* ou *Keap1*, peut au contraire avoir des conséquences néfastes en conférant une plus grande résistance des cellules tumorales à la chimiothérapie ou à la radiothérapie, et en augmentant leur vitesse de prolifération<sup>592</sup>.

La production de NO par des cellules inflammatoires est un mécanisme majeur de défense anti-microbienne et anti-parasitaire. Nous rapportons ici une modulation des effets anti-

parasitaires dépendants de la production de NO par le TGF- $\beta$  et les isoformes TAp73 dans des fibroblastes soumis à des stimuli proinflammatoires en présence du parasite extracellulaire *Trypanosoma musculi*. Ces effets pourraient avoir une signification en contexte physiologique puisqu'il a par exemple été démontré que les fibroblastes (lignée L929) sont capables d'exercer des effets anti-parasitaires contre *Trypanosoma cruzi* en exprimant la iNOS en réponse à l'IFN- $\gamma$  produit par les cellules NK<sup>593</sup>. En raison des nombreux rôles de l'activité iNOS et du TGF- $\beta$  dans la régulation de fonctions immunes variées (ex : maturation et modulation de l'activité des lymphocytes T et des MDSCs), la coopération entre les isoformes TAp73 et le TGF- $\beta$  pourrait avoir bien d'autres implications dans l'immunité innée et adaptative. A l'issue de ces travaux, il nous est donc possible de proposer un modèle provisoire de régulation de l'expression de la iNOS, qui dépend d'une coopération entre les isoformes TAp73 et le TGF- $\beta$  et permet de moduler des fonctions cellulaires reposant sur la production de NO (cf. Figure V-1).

## 2.2 Autres conséquences potentielles de la régulation par les isoformes TAp73 de l'expression de la iNOS

Nous venons de décrire un mécanisme coopératif de régulation de la iNOS par les isoformes TAp73 et le TGF- $\beta$  dans un modèle cellulaire fibroblastique. Il est donc utile de rappeler que l'activité iNOS des cellules de ce type exerce de multiples fonctions physiologiques, que ce soit chez l'Homme ou les rongeurs. Les effets bénéfiques de l'activité iNOS des fibroblastes dans le processus de cicatrisation ont par exemple été décrits à de multiples reprises. Chez la souris, les fibroblastes cicatriciels produisent des quantités importantes de NO qui augmentent leur synthèse de collagène et diminuent leur activité contractile<sup>594,595</sup>. Le NO libéré par les fibroblastes dans la zone lésée stimule aussi la production de TGF- $\beta$  qui favorise l'angiogenèse et la cicatrisation<sup>596,597</sup>. Chez l'Homme, NO augmente la migration des fibroblastes et le dépôt de collagène au niveau des lésions cutanées<sup>597</sup>.

Les isoformes TAp73 et le TGF- $\beta$  pourraient aussi jouer un rôle dans certaines pathologies où l'activité iNOS fibroblastique est impliquée. Les fibroblastes localisés au niveau de la membrane synoviale sont une source importante de NO et contribuent à l'inflammation dans certaines pathologies articulaires telles que la polyarthrite rhumatoïde et l'ostéoarthritis<sup>598-600</sup>. Au niveau vasculaire, les fibroblastes du tissu conjonctif de l'adventice exposés à NO se différencient en myofibroblastes et migrent vers l'intima, où ils deviennent de nouveaux composants cellulaires de la plaque d'athérome<sup>601</sup>. De plus, l'hypertension aiguë provoquée

chez le rat par constriction aortique entraîne l'induction de la iNOS dans les fibroblastes de l'adventice en réponse à la production d'IL-1 $\beta$  par les macrophages, ce qui est à l'origine d'une fibrose de l'adventice<sup>602</sup>.

### 3 Le cas des isoformes $\Delta Np73$ , vers un modèle global d'intégration de la famille p53 dans les fonctions du TGF- $\beta$ ?

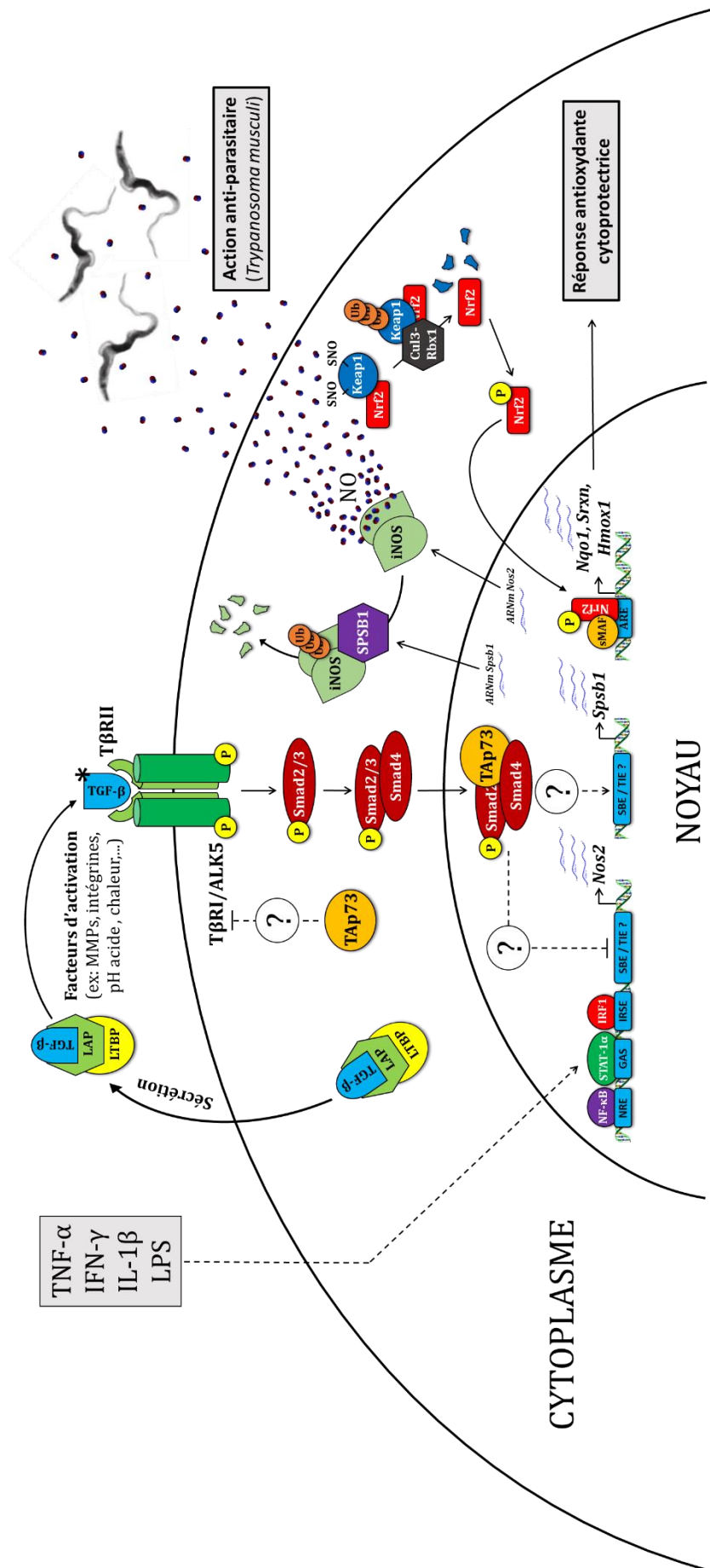
Les résultats préliminaires que nous avons obtenus dans des macrophages BMDM  $\Delta Np73^{-/-}$  indiquent que ces isoformes n'affectent pas l'effet répresseur exercé par le TGF- $\beta$  sur la iNOS lorsque les cellules sont traitées dans des conditions similaires aux 3T3 (ajout du TGF- $\beta$ 1 exogène seulement 1h avant l'induction de la iNOS par les cytokines et le LPS). En revanche, la répression de la iNOS par le TGF- $\beta$  est perdue dans les BMDM  $\Delta Np73^{-/-}$  suite à un prétraitement de 48h des BMDM avec du TGF- $\beta$ 1 exogène, suivi d'un traitement supplémentaire de 24h avec le LPS et l'IFN- $\gamma$ , toujours en présence de TGF- $\beta$ . Le TGF- $\beta$ 1 est une cytokine connue pour orienter la polarisation des macrophages vers un phénotype de type M2. Il est probable que ces résultats puissent refléter une altération du processus de polarisation par les isoformes  $\Delta Np73$ , car dans cette situation les macrophages sont soumis à un stimulus pro-M2 (TGF- $\beta$ ) avant de recevoir simultanément des signaux pro-M1 (LPS + IFN- $\gamma$ ) et pro-M2 (TGF- $\beta$ ). Les isoformes  $\Delta Np73$  sont une cible transcriptionnelle des isoformes TAp73 mais aussi du TGF- $\beta$ <sup>465,603</sup>. Il serait intéressant de savoir si le traitement de 48h avec le TGF- $\beta$  permet effectivement d'induire l'expression des isoformes  $\Delta Np73$  dans ce modèle cellulaire. De plus, il n'est pas exclu que l'effet des isoformes TAp73 dans les cellules 3T3 puisse aussi provenir de l'induction des isoformes  $\Delta Np73$  qui ne devrait plus avoir lieu dans les 3T3 TAp73<sup>-/-</sup>.

Une étude datant de 2012 a démontré que les isoformes  $\Delta Np73$  peuvent se lier à SMAD3 et SMAD4 pour promouvoir l'induction de plusieurs gènes cibles du TGF- $\beta$  (*Pai-1*, *Pten* et *Col1A*)<sup>550</sup>. D'après leurs auteurs, la formation de ces complexes en réponse à un traitement avec du TGF- $\beta$  stabiliserait l'interaction de SMAD3 et SMAD4 avec les sites SBE. A la différence de p53 cependant, cet effet ne nécessite pas la présence d'éléments p53RE dans le promoteur des gènes cibles pour être opérant. Les isoformes TAp73 et  $\Delta Np73$  possèdent toutes le même domaine de liaison à l'ADN. Il serait donc très intéressant de comparer la dépendance de ces

deux catégories d'isoformes à la présence de p53RE dans le promoteur de gènes cibles du TGF- $\beta$  ainsi qu'à la présence d'un domaine de liaison à l'ADN fonctionnel. Les travaux précédemment évoqués ont été réalisés dans plusieurs lignées tumorales soumises à une surexpression ectopique des isoformes  $\Delta Np73$ , ce qui ne présageait pas de l'existence d'une telle coopération *in vivo*. Les résultats que nous avons obtenus dans des fibroblastes pulmonaires primaires semblent cependant confirmer que cette coopération se produit lors de l'induction d'un sous-ensemble spécifique de gènes cibles du TGF- $\beta$ . Ainsi, l'induction des gènes *Nox4*,  *$\alpha$ -Sma*, *Mmp9* et *Mmp13* est apparue significativement réduite en réponse au TGF- $\beta$ 1 dans les fibroblastes pulmonaires  $\Delta Np73^{-/-}$ , tandis que celle des gènes *Pai-1*, *Timp1* et *Col1A* n'était pas affectée par la présence des isoformes  $\Delta Np73$ . Le fait que les isoformes  $\Delta Np73$  soient nécessaires à une induction efficace de *Spsb1* par le TGF- $\beta$  rend aussi particulièrement intéressante l'étude de la régulation de l'expression de la iNOS dans ces cellules.

Au vu de l'importance de toutes ces cibles dans de nombreux phénomènes physiologiques et physiopathologiques (cicatrisation, EMT, fibrose, formation de métastases, etc)<sup>570,604-606</sup>, l'étude des interactions entre les différentes isoformes de p73 et la réponse génique dépendante du TGF- $\beta$  devra obligatoirement être poursuivie, notamment par l'emploi d'approches plus globales de transcriptomique et de protéomique, ou de techniques telles que le ChIP-on-chip qui combine immunoprécipitation de chromatine et puces à ADN pour rendre possible la localisation des sites de liaison à l'ADN de protéines d'intérêt à l'échelle du génome entier.

A l'issue de ces travaux et de l'analyse de la littérature, il nous apparait finalement que la protéine p53 et ses homologues forment un réseau complexe et intégré de protéines qui régulent et orientent les fonctions du TGF- $\beta$  en fonction du contexte cellulaire ou tissulaire. Il ne fait aucun doute que la compréhension approfondie de ces mécanismes moléculaires permettra à terme de proposer de nouvelles approches thérapeutiques pour les nombreuses pathologies dans lesquelles l'activité et les fonctions de la iNOS, de la famille p53 et du TGF- $\beta$  sont altérées.



**Figure V-1 : Modèle provisoire de régulation de l'expression de la iNOS par les isoformes TAp73 et le TGF- $\beta$ .**

Nos travaux mettent en évidence une coopération entre le TGF- $\beta$  et les isoformes TAp73 pour réprimer l'induction de l'expression de la iNOS. Les isoformes TAp73 et le TGF- $\beta$  régulent négativement l'expression de la iNOS induite en réponse à des stimuli proinflammatoire (LPS, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) au moins par deux mécanismes : une réduction du niveau de transcrits du gène Nos2 et une augmentation de la dégradation de la protéine iNOS par le protéasome. Nous avons constaté que les isoformes TAp73 sont nécessaires à l'induction de SpSB1 en réponse au TGF- $\beta$ . Ce mécanisme est probablement responsable de la hausse de la stabilité de la protéine iNOS observée dans les 3T3 TAp73<sup>-/-</sup>, car le complexe E3 ubiquitine ligase SPSB1 est un complexe au rôle majeur lors de l'adressage de la protéine iNOS au protéasome.

213

Le mécanisme de répression transcriptionnelle de Nos2 par le TGF- $\beta$  et les isoformes TAp73 est en cours d'investigation, mais nous faisons l'hypothèse d'une interaction fonctionnelle entre TAp73 et les protéines SMAD2/3, qui sont connues pour interagir avec p53 et certains de ses homologues, et dont il a été démontré qu'elles sont responsables de la répression de la iNOS par le TGF- $\beta$ . La production totale de TGF- $\beta$  n'est pas altérée par la déficience en isoformes TAp73, mais le niveau basal de phosphorylation de SMAD2 est apparu plus élevé dans les cellules TAp73<sup>+/+</sup> cultivées de façon prolongée avec de fortes concentrations en sérum, suggérant la présence de mécanismes supplémentaires de régulation de la signalisation du TGF- $\beta$  au niveau de ses récepteurs.

Enfin, nous avons démontré que la modulation de la production de NO par les isoformes TAp73 et le TGF- $\beta$  impacte directement la réponse cytoprotectrice dépendante de Nrf2 et les effets anti-parasitaires des cellules 3T3. La régulation que nous avons mise en évidence est donc susceptible d'altérer les très nombreuses fonctions exercées par la iNOS dans les cellules soumises à l'action du TGF- $\beta$ .

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Jackson, M. I. *et al.* Kinetic feasibility of nitroxyl reduction by physiological reductants and biological implications. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 1130–1139 (2009).
2. Thomas, D. D., Liu, X., Kantrow, S. P. & Lancaster, J. R. The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O<sub>2</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 355–360 (2001).
3. Lancaster, J. R. A Tutorial on the Diffusibility and Reactivity of Free Nitric Oxide. *Nitric Oxide* **1**, 18–30 (1997).
4. Porterfield, D. M. *et al.* Proteins and lipids define the diffusional field of nitric oxide. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **281**, L904–912 (2001).
5. Pacher, P., Beckman, J. S. & Liaudet, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* **87**, 315–424 (2007).
6. Lancaster, J. R. Nitric oxide: a brief overview of chemical and physical properties relevant to therapeutic applications. *Future Sci. OA* **1**, FSO59 (2015).
7. Thomas, D. D., Liu, X., Kantrow, S. P. & Lancaster, J. R. The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O<sub>2</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 355–360 (2001).
8. Thomas, D. D. Breathing new life into nitric oxide signaling: A brief overview of the interplay between oxygen and nitric oxide. *Redox Biol.* **5**, 225–233 (2015).
9. Beckman, J. S. & Koppenol, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* **271**, C1424–1437 (1996).
10. Heinrich, T. A. *et al.* Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology. *Br. J. Pharmacol.* **169**, 1417–1429 (2013).
11. Jourd'heuil, D. *et al.* The oxidative and nitrosative chemistry of the nitric oxide/superoxide reaction in the presence of bicarbonate. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 92–100 (1999).
12. Derbyshire, E. R. & Marletta, M. A. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 533–559 (2012).
13. Drapier, J. C. & Bouton, C. Modulation by nitric oxide of metalloprotein regulatory activities. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **18**, 549–556 (1996).
14. Goretski, J. & Hollocher, T. C. Trapping of nitric oxide produced during denitrification by extracellular hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **263**, 2316–2323 (1988).
15. Castro, C. E. & Bartnicki, E. W. The Interconversion of Nucleic Acid Bases by Iron(III) Porphyrins and Nitric Oxide. *J. Org. Chem.* **59**, 4051–4052 (1994).
16. Marletta, M. A. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem. Res. Toxicol.* **1**, 249–257 (1988).
17. Guittet, O. *et al.* Peroxynitrite-mediated nitration of the stable free radical tyrosine residue of the ribonucleotide reductase small subunit. *Biochemistry (Mosc.)* **39**, 4640–4648 (2000).
18. Guittet, O., Roy, B. & Lepoivre, M. Nitric oxide: a radical molecule in quest of free radicals in proteins. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **55**, 1054–1067 (1999).
19. Murata, M., Thanan, R., Ma, N. & Kawanishi, S. Role of nitrative and oxidative DNA damage in inflammation-related carcinogenesis. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 623019 (2012).

20. Martínez-Ruiz, A. & Lamas, S. S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovasc. Res.* **62**, 43–52 (2004).
21. Physiology or Medicine for 1998 - Press Release. Available at: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1998/press.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1998/press.html). (Accessed: 8th February 2017)
22. Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373–376 (1980).
23. Arnold, W. P., Mittal, C. K., Katsuki, S. & Murad, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 3203–3207 (1977).
24. Palmer, R. M., Ferrige, A. G. & Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524–526 (1987).
25. Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. & Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 9265–9269 (1987).
26. Alderton, W. K., Cooper, C. E. & Knowles, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* **357**, 593–615 (2001).
27. Chambliss, K. L. & Shaul, P. W. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr. Rev.* **23**, 665–686 (2002).
28. Harris, M. B., Blackstone, M. A., Ju, H., Venema, V. J. & Venema, R. C. Heat-induced increases in endothelial NO synthase expression and activity and endothelial NO release. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H333–340 (2003).
29. Laughlin, M. H. *et al.* Training induces nonuniform increases in eNOS content along the coronary arterial tree. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* **1985** **90**, 501–510 (2001).
30. Lam, C.-F. *et al.* Increased blood flow causes coordinated upregulation of arterial eNOS and biosynthesis of tetrahydrobiopterin. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290**, H786–793 (2006).
31. Roberts, P. J. *et al.* The physiological expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human colon. *J. Clin. Pathol.* **54**, 293–297 (2001).
32. Asano, K. *et al.* Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10089–10093 (1994).
33. McNaughton, L. *et al.* Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 17161–17166 (2002).
34. Villanueva, C. & Giulivi, C. Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 307–316 (2010).
35. Barouch, L. A. *et al.* Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* **416**, 337–339 (2002).
36. Loughran, P. A. *et al.* Monomeric inducible nitric oxide synthase localizes to peroxisomes in hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13837–13842 (2005).
37. Glynne, P. A., Darling, K. E. A., Picot, J. & Evans, T. J. Epithelial inducible nitric-oxide synthase is an apical EBP50-binding protein that directs vectorial nitric oxide output. *J. Biol. Chem.* **277**, 33132–33138 (2002).
38. Oess, S., Icking, A., Fulton, D., Govers, R. & Müller-Esterl, W. Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases. *Biochem. J.* **396**, 401–409 (2006).
39. Hecker, M., Mülsch, A. & Busse, R. Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. *J. Neurochem.* **62**, 1524–1529 (1994).



40. Spratt, D. E., Taiakina, V., Palmer, M. & Guillemette, J. G. Differential binding of calmodulin domains to constitutive and inducible nitric oxide synthase enzymes. *Biochemistry (Mosc.)* **46**, 8288–8300 (2007).
41. Fulton, D. *et al.* Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **399**, 597–601 (1999).
42. Chen, P.-F. & Wu, K. K. Structural elements contribute to the calcium/calmodulin dependence on enzyme activation in human endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **278**, 52392–52400 (2003).
43. Roman, L. J. *et al.* The C termini of constitutive nitric-oxide synthases control electron flow through the flavin and heme domains and affect modulation by calmodulin. *J. Biol. Chem.* **275**, 29225–29232 (2000).
44. Crane, B. R. *et al.* Structure of Nitric Oxide Synthase Oxygenase Dimer with Pterin and Substrate. *Science* **279**, 2121 (1998).
45. Fischmann, T. O. *et al.* Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 233–242 (1999).
46. Klatt, P. *et al.* Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and L-arginine in the formation of an SDS-resistant dimer. *EMBO J.* **14**, 3687–3695 (1995).
47. Raman, C. S. *et al.* Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell* **95**, 939–950 (1998).
48. Hemmens, B., Goessler, W., Schmidt, K. & Mayer, B. Role of bound zinc in dimer stabilization but not enzyme activity of neuronal nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **275**, 35786–35791 (2000).
49. Stuehr, D. J. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**, 217–230 (1999).
50. Siddhanta, U. *et al.* Domain swapping in inducible nitric-oxide synthase. Electron transfer occurs between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer. *J. Biol. Chem.* **273**, 18950–18958 (1998).
51. Panda, K., Ghosh, S. & Stuehr, D. J. Calmodulin activates intersubunit electron transfer in the neuronal nitric-oxide synthase dimer. *J. Biol. Chem.* **276**, 23349–23356 (2001).
52. Tejero, J. & Stuehr, D. Tetrahydrobiopterin in nitric oxide synthase. *IUBMB Life* **65**, 358–365 (2013).
53. Morris, S. M. Recent advances in arginine metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **7**, 45–51 (2004).
54. Tran, C. T. L., Leiper, J. M. & Vallance, P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler. Suppl.* **4**, 33–40 (2003).
55. Pou, S., Keaton, L., Surichamorn, W. & Rosen, G. M. Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **274**, 9573–9580 (1999).
56. Mason, M. G., Nicholls, P., Wilson, M. T. & Cooper, C. E. Nitric oxide inhibition of respiration involves both competitive (heme) and noncompetitive (copper) binding to cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 708–713 (2006).
57. Fulton, D., Gratton, J. P. & Sessa, W. C. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 818–824 (2001).
58. Thomas, D. D. *et al.* The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 18–31 (2008).

59. Thomas, D. D. *et al.* Hypoxic inducible factor 1alpha, extracellular signal-regulated kinase, and p53 are regulated by distinct threshold concentrations of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8894–8899 (2004).
60. Arnelo, D. R. & Stamler, J. S. NO<sup>+</sup>, NO, and NO<sup>-</sup> donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch. Biochem. Biophys.* **318**, 279–285 (1995).
61. Dunn, J. *et al.* S-nitrosation of arginase 1 requires direct interaction with inducible nitric oxide synthase. *Mol. Cell. Biochem.* **355**, 83–89 (2011).
62. Xu, L., Han, C., Lim, K. & Wu, T. Activation of cytosolic phospholipase A2alpha through nitric oxide-induced S-nitrosylation. Involvement of inducible nitric-oxide synthase and cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* **283**, 3077–3087 (2008).
63. Iwakiri, Y. S-nitrosylation of proteins: a new insight into endothelial cell function regulated by eNOS-derived NO. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **25**, 95–101 (2011).
64. Mitchell, D. A., Michel, T. & Marletta, M. A. Effects of S-nitrosation of nitric oxide synthase. in *Advances in Experimental Biology* (ed. Trimmer, B. T. and B.) **1**, 151–456 (Elsevier, 2007).
65. Kornberg, M. D. *et al.* GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins. *Nat. Cell Biol.* **12**, 1094–1100 (2010).
66. Jia, J. *et al.* Target-selective protein S-nitrosylation by sequence motif recognition. *Cell* **159**, 623–634 (2014).
67. Smith, B. C. & Marletta, M. A. Mechanisms of S-nitrosothiol formation and selectivity in nitric oxide signaling. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **16**, 498–506 (2012).
68. Stoyanovsky, D. A. *et al.* Thioredoxin and lipoic acid catalyze the denitrosation of low molecular weight and protein S-nitrosothiols. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 15815–15823 (2005).
69. Benhar, M. Nitric oxide and the thioredoxin system: a complex interplay in redox regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1850**, 2476–2484 (2015).
70. Ben-Lulu, S., Ziv, T., Admon, A., Weisman-Shomer, P. & Benhar, M. A substrate trapping approach identifies proteins regulated by reversible S-nitrosylation. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **13**, 2573–2583 (2014).
71. Ben-Lulu, S., Ziv, T., Weisman-Shomer, P. & Benhar, M. Nitrosothiol-Trapping-Based Proteomic Analysis of S-Nitrosylation in Human Lung Carcinoma Cells. *PLoS One* **12**, e0169862 (2017).
72. Forrester, M. T., Foster, M. W., Benhar, M. & Stamler, J. S. Detection of protein S-nitrosylation with the biotin-switch technique. *Free Radic. Biol. Med.* **46**, 119–126 (2009).
73. Seth, D. & Stamler, J. S. The SNO-proteome: causation and classifications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 129–136 (2011).
74. Matthews, J. R., Botting, C. H., Panico, M., Morris, H. R. & Hay, R. T. Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2236–2242 (1996).
75. Metzzen, E., Zhou, J., Jelkmann, W., Fandrey, J. & Brüne, B. Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol. Biol. Cell* **14**, 3470–3481 (2003).
76. Yasinska, I. M. & Sumbayev, V. V. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.* **549**, 105–109 (2003).
77. Kröncke, K. D. Zinc finger proteins as molecular targets for nitric oxide-mediated gene regulation. *Antioxid. Redox Signal.* **3**, 565–575 (2001).
78. Gu, Z. *et al.* S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* **297**, 1186–1190 (2002).

79. Hart, J. D. & Dulhunty, A. F. Nitric oxide activates or inhibits skeletal muscle ryanodine receptors depending on its concentration, membrane potential and ligand binding. *J. Membr. Biol.* **173**, 227–236 (2000).
80. Hess, D. T. & Stamler, J. S. Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification. *J. Biol. Chem.* **287**, 4411–4418 (2012).
81. Juedes, M. J. & Wogan, G. N. Peroxynitrite-induced mutation spectra of pSP189 following replication in bacteria and in human cells. *Mutat. Res.* **349**, 51–61 (1996).
82. Brown, G. C. & Cooper, C. E. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* **356**, 295–298 (1994).
83. Clementi, E., Brown, G. C., Feelisch, M. & Moncada, S. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7631–7636 (1998).
84. Li, C.-Q. & Wogan, G. N. Nitric oxide as a modulator of apoptosis. *Cancer Lett.* **226**, 1–15 (2005).
85. Brüne, B., von Knethen, A. & Sandau, K. B. Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. *Cell Death Differ.* **6**, 969–975 (1999).
86. Moriya, R., Uehara, T. & Nomura, Y. Mechanism of nitric oxide-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *FEBS Lett.* **484**, 253–260 (2000).
87. Yabuki, M., Tsutsui, K., Horton, A. A., Yoshioka, T. & Utsumi, K. Caspase activation and cytochrome c release during HL-60 cell apoptosis induced by a nitric oxide donor. *Free Radic. Res.* **32**, 507–514 (2000).
88. Li, C.-Q. *et al.* Apoptotic signaling pathways induced by nitric oxide in human lymphoblastoid cells expressing wild-type or mutant p53. *Cancer Res.* **64**, 3022–3029 (2004).
89. Wang, Y., Vodovotz, Y., Kim, P. K. M., Zamora, R. & Billiar, T. R. Mechanisms of hepatoprotection by nitric oxide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **962**, 415–422 (2002).
90. Sciorati, C. *et al.* Autocrine nitric oxide modulates CD95-induced apoptosis in gammadelta T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 23211–23215 (1997).
91. DeMeester, S. L. *et al.* Nitric oxide inhibits stress-induced endothelial cell apoptosis. *Crit. Care Med.* **26**, 1500–1509 (1998).
92. Kim, Y. M. *et al.* Nitric oxide protects PC12 cells from serum deprivation-induced apoptosis by cGMP-dependent inhibition of caspase signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **19**, 6740–6747 (1999).
93. Brüne, B. *et al.* Superoxide formation and macrophage resistance to nitric oxide-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**, 7253–7258 (1997).
94. Jaiswal, A. K. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 1199–1207 (2004).
95. Uruno, A. & Motohashi, H. The Keap1-Nrf2 system as an in vivo sensor for electrophiles. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **25**, 153–160 (2011).
96. Kang, M.-I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S.-G. & Yamamoto, M. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 2046–2051 (2004).
97. Motohashi, H. & Yamamoto, M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol. Med.* **10**, 549–557 (2004).
98. Lin, W. *et al.* Sulforaphane suppressed LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages through Nrf2 dependent pathway. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 967–973 (2008).

99. McNally, S. J., Harrison, E. M., Ross, J. A., Garden, O. J. & Wigmore, S. J. Curcumin induces heme oxygenase 1 through generation of reactive oxygen species, p38 activation and phosphatase inhibition. *Int. J. Mol. Med.* **19**, 165–172 (2007).
100. Andreadi, C. K., Howells, L. M., Atherfold, P. A. & Manson, M. M. Involvement of Nrf2, p38, B-Raf, and nuclear factor-kappaB, but not phosphatidylinositol 3-kinase, in induction of hemoxygenase-1 by dietary polyphenols. *Mol. Pharmacol.* **69**, 1033–1040 (2006).
101. Bloom, D. A. & Jaiswal, A. K. Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J. Biol. Chem.* **278**, 44675–44682 (2003).
102. Wakabayashi, N. *et al.* Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 2040–2045 (2004).
103. Kobayashi, A. *et al.* Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 221–229 (2006).
104. Pei, D.-S., Sun, Y.-F. & Song, Y.-J. S-nitrosylation of PTEN Involved in ischemic brain injury in rat hippocampal CA1 region. *Neurochem. Res.* **34**, 1507–1512 (2009).
105. Fujii, S. *et al.* The critical role of nitric oxide signaling, via protein S-guanylation and nitrated cyclic GMP, in the antioxidant adaptive response. *J. Biol. Chem.* **285**, 23970–23984 (2010).
106. Um, H.-C., Jang, J.-H., Kim, D.-H., Lee, C. & Surh, Y.-J. Nitric oxide activates Nrf2 through S-nitrosylation of Keap1 in PC12 cells. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **25**, 161–168 (2011).
107. Motohashi, H., Katsuoka, F., Shavit, J. A., Engel, J. D. & Yamamoto, M. Positive or negative MARE-dependent transcriptional regulation is determined by the abundance of small Maf proteins. *Cell* **103**, 865–875 (2000).
108. Förstermann, U. & Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* **33**, 829–837 (2012).
109. Huang, P. L. *et al.* Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* **377**, 239–242 (1995).
110. Zhao, Y., Vanhoutte, P. M. & Leung, S. W. S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J. Pharmacol. Sci.* **129**, 83–94 (2015).
111. Griffith, T. M., Edwards, D. H., Davies, R. L., Harrison, T. J. & Evans, K. T. EDRF coordinates the behaviour of vascular resistance vessels. *Nature* **329**, 442–445 (1987).
112. Graham, A. *et al.* Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett.* **330**, 181–185 (1993).
113. Beckmann, J. S. *et al.* Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler* **375**, 81–88 (1994).
114. Zeiher, A. M., Fisslthaler, B., Schray-Utz, B. & Busse, R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ. Res.* **76**, 980–986 (1995).
115. Kubes, P., Suzuki, M. & Granger, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 4651–4655 (1991).
116. Alheid, U., Frölich, J. C. & Förstermann, U. Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. *Thromb. Res.* **47**, 561–571 (1987).

117. Rudic, R. D. *et al.* Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J. Clin. Invest.* **101**, 731–736 (1998).
118. Aicher, A. *et al.* Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat. Med.* **9**, 1370–1376 (2003).
119. Tsutsui, M. *et al.* Significance of nitric oxide synthases: Lessons from triple nitric oxide synthases null mice. *J. Pharmacol. Sci.* **127**, 42–52 (2015).
120. Landmesser, U. *et al.* Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J. Clin. Invest.* **111**, 1201–1209 (2003).
121. Zou, M.-H., Shi, C. & Cohen, R. A. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J. Clin. Invest.* **109**, 817–826 (2002).
122. Simon, A. *et al.* Role of neutral amino acid transport and protein breakdown for substrate supply of nitric oxide synthase in human endothelial cells. *Circ. Res.* **93**, 813–820 (2003).
123. Xu, W. *et al.* Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **18**, 1746–1748 (2004).
124. Antoniadou, C. *et al.* Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis. *Eur. Heart J.* **30**, 1142–1150 (2009).
125. Chen, C.-A. *et al.* S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Nature* **468**, 1115–1118 (2010).
126. Lange, M., Enkhbaatar, P., Nakano, Y. & Traber, D. L. Role of nitric oxide in shock: the large animal perspective. *Front. Biosci. Landmark Ed.* **14**, 1979–1989 (2009).
127. Wood, J. & Garthwaite, J. Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology* **33**, 1235–1244 (1994).
128. Nitric Oxide Contribution in the CNS | Cayman Chemical. Available at: <https://www.caymanchem.com/Article/2159>. (Accessed: 15th April 2017)
129. Vincent, S. R. Nitric oxide neurons and neurotransmission. *Prog. Neurobiol.* **90**, 246–255 (2010).
130. Džoljić, E., Grbatinić, I. & Kostić, V. Why is nitric oxide important for our brain? *Funct. Neurol.* **30**, 159–163 (2015).
131. O’Dell, T. J., Hawkins, R. D., Kandel, E. R. & Arancio, O. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 11285–11289 (1991).
132. Izumi, Y. & Zorumski, C. F. Nitric oxide and long-term synaptic depression in the rat hippocampus. *Neuroreport* **4**, 1131–1134 (1993).
133. Böhme, G. A. *et al.* Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 9191–9194 (1993).
134. Hölscher, C. & Rose, S. P. An inhibitor of nitric oxide synthesis prevents memory formation in the chick. *Neurosci. Lett.* **145**, 165–167 (1992).
135. Costa, E. D., Rezende, B. A., Cortes, S. F. & Lemos, V. S. Neuronal Nitric Oxide Synthase in Vascular Physiology and Diseases. *Front. Physiol.* **7**, 206 (2016).
136. Rajfer, J., Aronson, W. J., Bush, P. A., Dorey, F. J. & Ignarro, L. J. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N. Engl. J. Med.* **326**, 90–94 (1992).

137. Steinert, J. R., Chernova, T. & Forsythe, I. D. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* **16**, 435–452 (2010).
138. Brown, G. C. & Neher, J. J. Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol. Neurobiol.* **41**, 242–247 (2010).
139. Lefebvre, R. A. Pharmacological characterization of the nitrergic innervation of the stomach. *Verh. - K. Acad. Voor Geneesk. Van Belg.* **64**, 151–166 (2002).
140. Hibbs, J. B., Vavrin, Z. & Taintor, R. R. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **138**, 550–565 (1987).
141. Hibbs, J. B., Taintor, R. R. & Vavrin, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* **235**, 473–476 (1987).
142. Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. & Hill, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **164**, 6166–6173 (2000).
143. Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* **122**, 787–795 (2012).
144. Gordon, S. & Martinez, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* **32**, 593–604 (2010).
145. Biswas, S. K. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* **11**, 889–896 (2010).
146. Murray, P. J. *et al.* Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41**, 14–20 (2014).
147. Bogdan, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends Immunol.* **36**, 161–178 (2015).
148. Richardson, A. R. *et al.* Multiple targets of nitric oxide in the tricarboxylic acid cycle of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Cell Host Microbe* **10**, 33–43 (2011).
149. Savidge, T. C. *et al.* Host S-nitrosylation inhibits clostridial small molecule-activated glucosylating toxins. *Nat. Med.* **17**, 1136–1141 (2011).
150. Olekhovitch, R., Ryffel, B., Müller, A. J. & Bousso, P. Collective nitric oxide production provides tissue-wide immunity during *Leishmania* infection. *J. Clin. Invest.* **124**, 1711–1722 (2014).
151. Müller, A. J. *et al.* Photoconvertible pathogen labeling reveals nitric oxide control of *Leishmania* major infection in vivo via dampening of parasite metabolism. *Cell Host Microbe* **14**, 460–467 (2013).
152. Zwaferink, H., Stockinger, S., Reipert, S. & Decker, T. Stimulation of inducible nitric oxide synthase expression by beta interferon increases necrotic death of macrophages upon *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immun.* **76**, 1649–1656 (2008).
153. Herbst, S., Schaible, U. E. & Schneider, B. E. Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. *PLoS One* **6**, e19105 (2011).
154. Nairz, M. *et al.* Nitric oxide-mediated regulation of ferroportin-1 controls macrophage iron homeostasis and immune function in *Salmonella* infection. *J. Exp. Med.* **210**, 855–873 (2013).
155. Ramphul, U. N., Garver, L. S., Molina-Cruz, A., Canepa, G. E. & Barillas-Mury, C. *Plasmodium falciparum* evades mosquito immunity by disrupting JNK-mediated apoptosis of invaded midgut cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 1273–1280 (2015).
156. Bogdan, C. Regulation of lymphocytes by nitric oxide. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **677**, 375–393 (2011).

157. Bronte, V. & Zanovello, P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 641–654 (2005).
158. Niedbala, W. *et al.* Nitric oxide preferentially induces type 1 T cell differentiation by selectively up-regulating IL-12 receptor beta 2 expression via cGMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 16186–16191 (2002).
159. Niedbala, W. *et al.* Nitric oxide enhances Th9 cell differentiation and airway inflammation. *Nat. Commun.* **5**, 4575 (2014).
160. Jianjun Yang, null *et al.* T cell-derived inducible nitric oxide synthase switches off Th17 cell differentiation. *J. Exp. Med.* **210**, 1447–1462 (2013).
161. Obermajer, N. *et al.* Induction and stability of human Th17 cells require endogenous NOS2 and cGMP-dependent NO signaling. *J. Exp. Med.* **210**, 1433–1445 (2013).
162. Jayaraman, P. *et al.* iNOS expression in CD4+ T cells limits Treg induction by repressing TGFβ1: combined iNOS inhibition and Treg depletion unmask endogenous antitumor immunity. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 6439–6451 (2014).
163. Predonzani, A., Calì, B., Agnellini, A. H. & Molon, B. Spotlights on immunological effects of reactive nitrogen species: When inflammation says nitric oxide. *World J. Exp. Med.* **5**, 64–76 (2015).
164. Giordano, D., Draves, K. E., Li, C., Hohl, T. M. & Clark, E. A. Nitric oxide regulates BAFF expression and T cell-independent antibody responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **193**, 1110–1120 (2014).
165. Eriksson, S., Chambers, B. J. & Rhen, M. Nitric oxide produced by murine dendritic cells is cytotoxic for intracellular *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. *Scand. J. Immunol.* **58**, 493–502 (2003).
166. Aldridge, J. R. *et al.* TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 5306–5311 (2009).
167. De Trez, C. *et al.* iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania major* infection phase of C57BL/6 resistant mice. *PLoS Pathog.* **5**, e1000494 (2009).
168. Ryan, B. J., Nissim, A. & Winyard, P. G. Oxidative post-translational modifications and their involvement in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Redox Biol.* **2**, 715–724 (2014).
169. Birnboim, H. C., Lemay, A.-M., Lam, D. K. Y., Goldstein, R. & Webb, J. R. Cutting edge: MHC class II-restricted peptides containing the inflammation-associated marker 3-nitrotyrosine evade central tolerance and elicit a robust cell-mediated immune response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **171**, 528–532 (2003).
170. Ohmori, H. *et al.* Immunogenicity of autologous IgG bearing the inflammation-associated marker 3-nitrotyrosine. *Immunol. Lett.* **96**, 47–54 (2005).
171. Kalluri, R., Cantley, L. G., Kerjaschki, D. & Neilson, E. G. Reactive oxygen species expose cryptic epitopes associated with autoimmune goodpasture syndrome. *J. Biol. Chem.* **275**, 20027–20032 (2000).
172. Binder, C. J. *et al.* Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *Nat. Med.* **9**, 736–743 (2003).
173. Khan, F. & Siddiqui, A. A. Prevalence of anti-3-nitrotyrosine antibodies in the joint synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **370**, 100–107 (2006).

174. Ahsan, H. 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. *Hum. Immunol.* **74**, 1392–1399 (2013).
175. Ribbons, K. A. *et al.* Potential role of nitric oxide in a model of chronic colitis in rhesus macaques. *Gastroenterology* **108**, 705–711 (1995).
176. Balkwill, F. & Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet Lond. Engl.* **357**, 539–545 (2001).
177. Porta, C., Riboldi, E. & Sica, A. Mechanisms linking pathogens-associated inflammation and cancer. *Cancer Lett.* **305**, 250–262 (2011).
178. Hanahan, D. & Coussens, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **21**, 309–322 (2012).
179. Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A. & Allavena, P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 1065–1073 (2009).
180. Molon, B. *et al.* Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J. Exp. Med.* **208**, 1949–1962 (2011).
181. Bingisser, R. M., Tilbrook, P. A., Holt, P. G. & Kees, U. R. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **160**, 5729–5734 (1998).
182. Burke, A. J., Sullivan, F. J., Giles, F. J. & Glynn, S. A. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis* **34**, 503–512 (2013).
183. Choudhari, S. K., Chaudhary, M., Bagde, S., Gadbail, A. R. & Joshi, V. Nitric oxide and cancer: a review. *World J. Surg. Oncol.* **11**, 118 (2013).
184. Kim, J. *et al.* Regulation of STAT3 and NF- $\kappa$ B activations by S-nitrosylation in multiple myeloma. *Free Radic. Biol. Med.* **106**, 245–253 (2017).
185. Yang, Y. *et al.* Nitric oxide synthase inhibitors: a review of patents from 2011 to the present. *Expert Opin. Ther. Pat.* **25**, 49–68 (2015).
186. Ganzarolli de Oliveira, M. S-Nitrosothiols as Platforms for Topical Nitric Oxide Delivery. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **119 Suppl 3**, 49–56 (2016).
187. Hickok, J. R. & Thomas, D. D. Nitric oxide and cancer therapy: the emperor has NO clothes. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 381–391 (2010).
188. Bettaieb, A. *et al.* S-Nitrosylation in Cancer Cells: To Prevent or to Cause? in *Nitric Oxide and Cancer: Pathogenesis and Therapy* 97–109 (Springer, Cham, 2015). doi:10.1007/978-3-319-13611-0\_7
189. Pautz, A. *et al.* Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **23**, 75–93 (2010).
190. Zhang, X. *et al.* Transcriptional basis for hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene to lipopolysaccharide/interferon-gamma. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 575–585 (1996).
191. Gross, T. J. *et al.* Epigenetic silencing of the human NOS2 gene: rethinking the role of nitric oxide in human macrophage inflammatory responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192**, 2326–2338 (2014).
192. Chan, G. C. *et al.* Epigenetic basis for the transcriptional hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene in vascular endothelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 3846–3861 (2005).
193. de Vera, M. E. *et al.* Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1054–1059 (1996).



194. Chu, S. C., Marks-Konczalik, J., Wu, H. P., Banks, T. C. & Moss, J. Analysis of the cytokine-stimulated human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene: characterization of differences between human and mouse iNOS promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**, 871–878 (1998).
195. Xie, Q. W., Whisnant, R. & Nathan, C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **177**, 1779–1784 (1993).
196. Fukuda, K., Akao, S., Ohno, Y., Yamashita, K. & Fujiwara, H. Inhibition by costunolide of phorbol ester-induced transcriptional activation of inducible nitric oxide synthase gene in a human monocyte cell line THP-1. *Cancer Lett.* **164**, 7–13 (2001).
197. Kolyada, A. Y., Savikovsky, N. & Madias, N. E. Transcriptional regulation of the human iNOS gene in vascular-smooth-muscle cells and macrophages: evidence for tissue specificity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 600–605 (1996).
198. Rico, D., Vaquerizas, J. M., Dopazo, H. & Boscá, L. Identification of conserved domains in the promoter regions of nitric oxide synthase 2: implications for the species-specific transcription and evolutionary differences. *BMC Genomics* **8**, 271 (2007).
199. Taylor, B. S. & Geller, D. A. Molecular regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Shock Augusta Ga* **13**, 413–424 (2000).
200. Lü, X. *et al.* [A short tandem repeat polymorphism in the inducible nitric oxide synthase gene in Chinese population]. *Yi Chuan Xue Bao* **29**, 290–293 (2002).
201. Xu, W. *et al.* Survey of the allelic frequency of a NOS2A promoter microsatellite in human populations: assessment of the NOS2A gene and predisposition to infectious disease. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **4**, 379–383 (2000).
202. Goldring, C. E., Reveneau, S., Algarté, M. & Jeannin, J. F. In vivo footprinting of the mouse inducible nitric oxide synthase gene: inducible protein occupation of numerous sites including Oct and NF-IL6. *Nucleic Acids Res.* **24**, 1682–1687 (1996).
203. Xie, Q. W., Kashiwabara, Y. & Nathan, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **269**, 4705–4708 (1994).
204. Taylor, B. S. *et al.* Multiple NF-kappaB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* **273**, 15148–15156 (1998).
205. Farlik, M. *et al.* Nonconventional initiation complex assembly by STAT and NF-kappaB transcription factors regulates nitric oxide synthase expression. *Immunity* **33**, 25–34 (2010).
206. Kleinert, H. *et al.* Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappaB-signaling pathways. *Br. J. Pharmacol.* **125**, 193–201 (1998).
207. Guo, Z., Shao, L., Du, Q., Park, K. S. & Geller, D. A. Identification of a classic cytokine-induced enhancer upstream in the human iNOS promoter. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **21**, 535–542 (2007).
208. Jantsch, J. *et al.* Toll-like receptor activation and hypoxia use distinct signaling pathways to stabilize hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1A) and result in differential HIF1A-dependent gene expression. *J. Leukoc. Biol.* **90**, 551–562 (2011).
209. Kleinert, H., Euchenhofer, C., Ihrig-Biedert, I. & Förstermann, U. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Mol. Pharmacol.* **49**, 15–21 (1996).
210. Pance, A., Chantome, A., Reveneau, S., Bentrari, F. & Jeannin, J.-F. A repressor in the proximal human inducible nitric oxide synthase promoter modulates transcriptional activation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **16**, 631–633 (2002).

211. Linker, K. *et al.* Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression-complex interplay of KSRP with TTP and HuR. *Nucleic Acids Res.* **33**, 4813–4827 (2005).
212. Pautz, A. *et al.* Similar regulation of human inducible nitric-oxide synthase expression by different isoforms of the RNA-binding protein AUF1. *J. Biol. Chem.* **284**, 2755–2766 (2009).
213. Guo, Z. *et al.* miRNA-939 regulates human inducible nitric oxide synthase posttranscriptional gene expression in human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 5826–5831 (2012).
214. Zhu, H. *et al.* NPM-ALK up-regulates iNOS expression through a STAT3/microRNA-26a-dependent mechanism. *J. Pathol.* **230**, 82–94 (2013).
215. Felley-Bosco, E., Bender, F. C., Courjault-Gautier, F., Bron, C. & Quest, A. F. Caveolin-1 down-regulates inducible nitric oxide synthase via the proteasome pathway in human colon carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14334–14339 (2000).
216. Felley-Bosco, E., Bender, F. & Quest, A. F. G. Caveolin-1-mediated post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase in human colon carcinoma cells. *Biol. Res.* **35**, 169–176 (2002).
217. Hausel, P., Latado, H., Courjault-Gautier, F. & Felley-Bosco, E. Src-mediated phosphorylation regulates subcellular distribution and activity of human inducible nitric oxide synthase. *Oncogene* **25**, 198–206 (2006).
218. Musial, A. & Eissa, N. T. Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 24268–24273 (2001).
219. Kolodziejcki, P. J., Musial, A., Koo, J.-S. & Eissa, N. T. Ubiquitination of inducible nitric oxide synthase is required for its degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 12315–12320 (2002).
220. Matsumoto, K. *et al.* The ECS(SPSB) E3 ubiquitin ligase is the master regulator of the lifetime of inducible nitric-oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **409**, 46–51 (2011).
221. Kuang, Z. *et al.* The SPRY domain-containing SOCS box protein SPSB2 targets iNOS for proteasomal degradation. *J. Cell Biol.* **190**, 129–141 (2010).
222. Nishiya, T. *et al.* Regulation of inducible nitric-oxide synthase by the SPRY domain- and SOCS box-containing proteins. *J. Biol. Chem.* **286**, 9009–9019 (2011).
223. Lewis, R. S. *et al.* TLR regulation of SPSB1 controls inducible nitric oxide synthase induction. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187**, 3798–3805 (2011).
224. Jones, R. J., Jourdeuil, D., Salerno, J. C., Smith, S. M. E. & Singer, H. A. iNOS regulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292**, H2634-2642 (2007).
225. Yoshida, M. & Xia, Y. Heat shock protein 90 as an endogenous protein enhancer of inducible nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **278**, 36953–36958 (2003).
226. Ratovitski, E. A. *et al.* An inducible nitric-oxide synthase (NOS)-associated protein inhibits NOS dimerization and activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 30250–30257 (1999).
227. Ratovitski, E. A. *et al.* Kalirin inhibition of inducible nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **274**, 993–999 (1999).
228. Zhang, Y., Alexander, P. B. & Wang, X.-F. TGF- $\beta$  Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, (2017).
229. Meng, X.-M., Nikolic-Paterson, D. J. & Lan, H. Y. TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* **12**, 325–338 (2016).
230. Travis, M. A. & Sheppard, D. TGF- $\beta$  activation and function in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 51–82 (2014).

231. Vaidya, A. & Kale, V. P. TGF- $\beta$  signaling and its role in the regulation of hematopoietic stem cells. *Syst. Synth. Biol.* **9**, 1–10 (2015).
232. Sanjabi, S., Oh, S. A. & Li, M. O. Regulation of the Immune Response by TGF- $\beta$ : From Conception to Autoimmunity and Infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, (2017).
233. Vodovotz, Y. Control of Nitric Oxide Production by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1: Mechanistic Insights and Potential Relevance to Human Disease. *Nitric Oxide* **1**, 3–17 (1997).
234. Massagué, J. TGF $\beta$  signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 616–630 (2012).
235. Hata, A. & Chen, Y.-G. TGF- $\beta$  Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, (2016).
236. Heldin, C.-H. & Moustakas, A. Signaling Receptors for TGF- $\beta$  Family Members. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, (2016).
237. Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor-beta. *J. Cell Biol.* **109**, 3137–3145 (1989).
238. Heldin, C. H., Miyazono, K. & ten Dijke, P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**, 465–471 (1997).
239. Macias, M. J., Martin-Malpartida, P. & Massagué, J. Structural determinants of Smad function in TGF- $\beta$  signaling. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 296–308 (2015).
240. Chaikuad, A. & Bullock, A. N. Structural Basis of Intracellular TGF- $\beta$  Signaling: Receptors and Smads. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, (2016).
241. Nakao, A. *et al.* Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* **389**, 631–635 (1997).
242. Miyazawa, K. & Miyazono, K. Regulation of TGF- $\beta$  Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, (2017).
243. Zwaagstra, J. C., Collins, C., Langlois, M.-J. & O'Connor-McCourt, M. D. Analysis of the contribution of receptor subdomains to the cooperative binding and internalization of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I and type II receptors. *Exp. Cell Res.* **314**, 2553–2568 (2008).
244. Huang, T. *et al.* TGF- $\beta$  signalling is mediated by two autonomously functioning T $\beta$ RI:T $\beta$ RII pairs. *EMBO J.* **30**, 1263–1276 (2011).
245. Feng, X.-H. & Derynck, R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 659–693 (2005).
246. Lo, R. S., Chen, Y. G., Shi, Y., Pavletich, N. P. & Massagué, J. The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF-beta receptors. *EMBO J.* **17**, 996–1005 (1998).
247. Xiao, Z., Latek, R. & Lodish, H. F. An extended bipartite nuclear localization signal in Smad4 is required for its nuclear import and transcriptional activity. *Oncogene* **22**, 1057–1069 (2003).
248. Xiao, Z., Liu, X. & Lodish, H. F. Importin beta mediates nuclear translocation of Smad 3. *J. Biol. Chem.* **275**, 23425–23428 (2000).
249. Xu, L., Kang, Y., Cöl, S. & Massagué, J. Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Mol. Cell* **10**, 271–282 (2002).
250. Kurisaki, A., Kose, S., Yoneda, Y., Heldin, C. H. & Moustakas, A. Transforming growth factor-beta induces nuclear import of Smad3 in an importin-beta1 and Ran-dependent manner. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1079–1091 (2001).

251. Weiss, A. & Attisano, L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **2**, 47–63 (2013).
252. Blahna, M. T. & Hata, A. Smad-mediated regulation of microRNA biosynthesis. *FEBS Lett.* **586**, 1906–1912 (2012).
253. Zhang, Y. E. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- $\beta$  Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, (2017).
254. Lai, C.-F. & Cheng, S.-L. Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 15514–15522 (2002).
255. Chen, X.-F. *et al.* Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces epithelial-to-mesenchymal transition in human lung cancer cells via PI3K/Akt and MEK/Erk1/2 signaling pathways. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 3549–3556 (2012).
256. Galliher, A. J. & Schiemann, W. P. Src phosphorylates Tyr284 in TGF-beta type II receptor and regulates TGF-beta stimulation of p38 MAPK during breast cancer cell proliferation and invasion. *Cancer Res.* **67**, 3752–3758 (2007).
257. Sorrentino, A. *et al.* The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1199–1207 (2008).
258. Yamashita, M. *et al.* TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Mol. Cell* **31**, 918–924 (2008).
259. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J. & Nieto, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871–890 (2009).
260. Yan, C. *et al.* Epithelial to mesenchymal transition in human skin wound healing is induced by tumor necrosis factor-alpha through bone morphogenic protein-2. *Am. J. Pathol.* **176**, 2247–2258 (2010).
261. Zhang, J., Tian, X.-J. & Xing, J. Signal Transduction Pathways of EMT Induced by TGF- $\beta$ , SHH, and WNT and Their Crosstalks. *J. Clin. Med.* **5**, (2016).
262. Schäfer, M. & Werner, S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 628–638 (2008).
263. Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M. & Ford, H. L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **15**, 117–134 (2010).
264. Lamouille, S. & Derynck, R. Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J. Cell Biol.* **178**, 437–451 (2007).
265. Masszi, A. *et al.* Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **284**, F911-924 (2003).
266. Bakin, A. V., Tomlinson, A. K., Bhowmick, N. A., Moses, H. L. & Arteaga, C. L. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J. Biol. Chem.* **275**, 36803–36810 (2000).
267. Ungefroren, H., Witte, D. & Lehnert, H. The role of small GTPases of the Rho/Rac family in TGF- $\beta$ -induced EMT and cell motility in cancer. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* (2017). doi:10.1002/dvdy.24505
268. Robertson, I. B. & Rifkin, D. B. Regulation of the Bioavailability of TGF- $\beta$  and TGF- $\beta$ -Related Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, (2016).
269. Saharinen, J., Taipale, J. & Keski-Oja, J. Association of the small latent transforming growth factor-beta with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1. *EMBO J.* **15**, 245–253 (1996).

270. Gleizes, P. E., Beavis, R. C., Mazziere, R., Shen, B. & Rifkin, D. B. Identification and characterization of an eight-cysteine repeat of the latent transforming growth factor-beta binding protein-1 that mediates bonding to the latent transforming growth factor-beta1. *J. Biol. Chem.* **271**, 29891–29896 (1996).
271. Dubois, C. M., Laprise, M. H., Blanchette, F., Gentry, L. E. & Leduc, R. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J. Biol. Chem.* **270**, 10618–10624 (1995).
272. Fontana, L. *et al.* Fibronectin is required for integrin alphavbeta6-mediated activation of latent TGF-beta complexes containing LTBP-1. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **19**, 1798–1808 (2005).
273. Dallas, S. L. *et al.* Fibronectin regulates latent transforming growth factor-beta (TGF beta) by controlling matrix assembly of latent TGF beta-binding protein-1. *J. Biol. Chem.* **280**, 18871–18880 (2005).
274. Isogai, Z. *et al.* Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 2750–2757 (2003).
275. Neptune, E. R. *et al.* Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat. Genet.* **33**, 407–411 (2003).
276. Munger, J. S. *et al.* The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* **96**, 319–328 (1999).
277. Mu, D. *et al.* The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. *J. Cell Biol.* **157**, 493–507 (2002).
278. Yang, Z. *et al.* Absence of integrin-mediated TGFbeta1 activation in vivo recapitulates the phenotype of TGFbeta1-null mice. *J. Cell Biol.* **176**, 787–793 (2007).
279. Henderson, N. C. *et al.* Targeting of av integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nat. Med.* **19**, 1617–1624 (2013).
280. Travis, M. A. *et al.* Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature* **449**, 361–365 (2007).
281. Worthington, J. J. *et al.* Integrin  $\alpha\beta 8$ -Mediated TGF- $\beta$  Activation by Effector Regulatory T Cells Is Essential for Suppression of T-Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* **42**, 903–915 (2015).
282. Abe, M., Oda, N. & Sato, Y. Cell-associated activation of latent transforming growth factor-beta by calpain. *J. Cell. Physiol.* **174**, 186–193 (1998).
283. Jenkins, G. The role of proteases in transforming growth factor-beta activation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 1068–1078 (2008).
284. Brown, P. D., Wakefield, L. M., Levinson, A. D. & Sporn, M. B. Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2, and 3. *Growth Factors Chur Switz.* **3**, 35–43 (1990).
285. Ehrhart, E. J., Segarini, P., Tsang, M. L., Carroll, A. G. & Barcellos-Hoff, M. H. Latent transforming growth factor beta1 activation in situ: quantitative and functional evidence after low-dose gamma-irradiation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **11**, 991–1002 (1997).
286. Barcellos-Hoff, M. H., Derynck, R., Tsang, M. L. & Weatherbee, J. A. Transforming growth factor-beta activation in irradiated murine mammary gland. *J. Clin. Invest.* **93**, 892–899 (1994).
287. Barcellos-Hoff, M. H. & Dix, T. A. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **10**, 1077–1083 (1996).
288. Ahamed, J. *et al.* In vitro and in vivo evidence for shear-induced activation of latent transforming growth factor-beta1. *Blood* **112**, 3650–3660 (2008).

289. Amarnath, S., Dong, L., Li, J., Wu, Y. & Chen, W. Endogenous TGF-beta activation by reactive oxygen species is key to Foxp3 induction in TCR-stimulated and HIV-1-infected human CD4+CD25- T cells. *Retrovirology* **4**, 57 (2007).
290. Wang, H. & Kochevar, I. E. Involvement of UVB-induced reactive oxygen species in TGF-beta biosynthesis and activation in keratinocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 890–897 (2005).
291. Oreffo, R. O., Mundy, G. R., Seyedin, S. M. & Bonewald, L. F. Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**, 817–823 (1989).
292. Jullien, P., Berg, T. M. & Lawrence, D. A. Acidic cellular environments: activation of latent TGF-beta and sensitization of cellular responses to TGF-beta and EGF. *Int. J. Cancer* **43**, 886–891 (1989).
293. Ding, A. *et al.* Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **145**, 940–944 (1990).
294. Haregewoin, A., Alexander, E., Black, P. M. & Loeffler, J. S. Autocrine regulation of the production of the gaseous messenger nitric oxide in a glioblastoma cell line. *Exp. Cell Res.* **210**, 137–139 (1994).
295. Roland, C. R., Goss, J. A., Mangino, M. J., Hafenrichter, D. & Flye, M. W. Autoregulation by eicosanoids of human Kupffer cell secretory products. A study of interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, and nitric oxide. *Ann. Surg.* **219**, 389–399 (1994).
296. Vodovotz, Y. *et al.* Control of nitric oxide production by endogenous TGF-beta1 and systemic nitric oxide in retinal pigment epithelial cells and peritoneal macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **60**, 261–270 (1996).
297. Blanco, F. J., Geng, Y. & Lotz, M. Differentiation-dependent effects of IL-1 and TGF-beta on human articular chondrocyte proliferation are related to inducible nitric oxide synthase expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **154**, 4018–4026 (1995).
298. Nussler, A. K. *et al.* Further characterization and comparison of inducible nitric oxide synthase in mouse, rat, and human hepatocytes. *Hepatology. Baltim. Md* **21**, 1552–1560 (1995).
299. Oswald, I. P., Gazzinelli, R. T., Sher, A. & James, S. L. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **148**, 3578–3582 (1992).
300. Junquero, D. C., Scott-Burden, T., Schini, V. B. & Vanhoutte, P. M. Inhibition of cytokine-induced nitric oxide production by transforming growth factor-beta 1 in human smooth muscle cells. *J. Physiol.* **454**, 451–465 (1992).
301. Vodovotz, Y., Bogdan, C., Paik, J., Xie, Q. W. & Nathan, C. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* **178**, 605–613 (1993).
302. Schoedon, G., Schneemann, M., Blau, N., Edgell, C. J. & Schaffner, A. Modulation of human endothelial cell tetrahydrobiopterin synthesis by activating and deactivating cytokines: new perspectives on endothelium-derived relaxing factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 1343–1348 (1993).
303. Arany, I., Brysk, M. M., Brysk, H. & Tying, S. K. Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by differentiation and cytokines in human keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 618–622 (1996).

304. Chesrown, S. E., Monnier, J., Visner, G. & Nick, H. S. Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by LPS, INF-gamma, TGF-beta, and IL-10 in murine macrophage cell lines and rat peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**, 126–134 (1994).
305. Perrella, M. A. *et al.* Suppression of Interleukin-1 $\beta$ -induced Nitric-oxide Synthase Promoter/Enhancer Activity by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in Vascular Smooth Muscle Cells EVIDENCE FOR MECHANISMS OTHER THAN NF- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* **271**, 13776–13780 (1996).
306. Pinsky, D. J. *et al.* The lethal effects of cytokine-induced nitric oxide on cardiac myocytes are blocked by nitric oxide synthase antagonism or transforming growth factor beta. *J. Clin. Invest.* **95**, 677–685 (1995).
307. Hausmann, E. H., Hao, S. Y., Pace, J. L. & Parmely, M. J. Transforming growth factor beta 1 and gamma interferon provide opposing signals to lipopolysaccharide-activated mouse macrophages. *Infect. Immun.* **62**, 3625–3632 (1994).
308. Stenger, S., Thüring, H., Röllinghoff, M. & Bogdan, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* **180**, 783–793 (1994).
309. Shull, M. M. *et al.* Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359**, 693–699 (1992).
310. Kulkarni, A. B. *et al.* Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 770–774 (1993).
311. Vodovotz, Y. *et al.* Spontaneously increased production of nitric oxide and aberrant expression of the inducible nitric oxide synthase in vivo in the transforming growth factor beta 1 null mouse. *J. Exp. Med.* **183**, 2337–2342 (1996).
312. Perrella, M. A. *et al.* Arrest of endotoxin-induced hypotension by transforming growth factor beta1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 2054–2059 (1996).
313. Barral, A. *et al.* Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Pathol.* **147**, 947–954 (1995).
314. de Belder, A. *et al.* Megakaryocytes from patients with coronary atherosclerosis express the inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 637–641 (1995).
315. Grainger, D. J. *et al.* The serum concentration of active transforming growth factor-beta is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat. Med.* **1**, 74–79 (1995).
316. Rachmilewitz, D. *et al.* Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* **36**, 718–723 (1995).
317. Babyatsky, M. W., Rossiter, G. & Podolsky, D. K. Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **110**, 975–984 (1996).
318. Ohtani, H., Kagaya, H. & Nagura, H. Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta receptors I and II in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* **30 Suppl 8**, 76–77 (1995).
319. Mokhtarian, F. *et al.* Defective production of anti-inflammatory cytokine, TGF-beta by T cell lines of patients with active multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **152**, 6003–6010 (1994).
320. Bö, L. *et al.* Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. *Ann. Neurol.* **36**, 778–786 (1994).
321. Dorheim, M. A., Tracey, W. R., Pollock, J. S. & Grammas, P. Nitric oxide synthase activity is elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 659–665 (1994).

322. Vodovotz, Y. *et al.* Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.* **184**, 1425–1433 (1996).
323. Flanders, K. C., Lippa, C. F., Smith, T. W., Pollen, D. A. & Sporn, M. B. Altered expression of transforming growth factor-beta in Alzheimer's disease. *Neurology* **45**, 1561–1569 (1995).
324. Boutard, V. *et al.* Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **155**, 2077–2084 (1995).
325. Arsura, M., Wu, M. & Sonenshein, G. E. TGF beta 1 inhibits NF-kappa B/Rel activity inducing apoptosis of B cells: transcriptional activation of I kappa B alpha. *Immunity* **5**, 31–40 (1996).
326. Takaki, H. *et al.* TGF-beta1 suppresses IFN-gamma-induced NO production in macrophages by suppressing STAT1 activation and accelerating iNOS protein degradation. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **11**, 871–882 (2006).
327. Mitani, T., Terashima, M., Yoshimura, H., Nariai, Y. & Tanigawa, Y. TGF-beta1 enhances degradation of IFN-gamma-induced iNOS protein via proteasomes in RAW 264.7 cells. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **13**, 78–87 (2005).
328. Sugiyama, Y. *et al.* Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the suppression of iNOS synthesis in macrophages by regulating IRF3 and STAT1 pathways. *Int. Immunol.* **24**, 253–265 (2012).
329. Berg, D. T. *et al.* Negative regulation of inducible nitric-oxide synthase expression mediated through transforming growth factor-beta-dependent modulation of transcription factor TCF11. *J. Biol. Chem.* **282**, 36837–36844 (2007).
330. Lane, D. P. & Crawford, L. V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**, 261–263 (1979).
331. Linzer, D. I. & Levine, A. J. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**, 43–52 (1979).
332. DeLeo, A. B. *et al.* Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 2420–2424 (1979).
333. Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. & Howley, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**, 1129–1136 (1990).
334. Werness, B. A., Levine, A. J. & Howley, P. M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**, 76–79 (1990).
335. Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D. & Oren, M. Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* **312**, 646–649 (1984).
336. Parada, L. F., Land, H., Weinberg, R. A., Wolf, D. & Rotter, V. Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* **312**, 649–651 (1984).
337. Malkin, D. *et al.* Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* **250**, 1233–1238 (1990).
338. Donehower, L. A. *et al.* Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215–221 (1992).
339. Olivier, M., Hollstein, M. & Hainaut, P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a001008 (2010).
340. Bártek, J. *et al.* Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* **6**, 1699–1703 (1991).



341. Pflaum, J., Schlosser, S. & Müller, M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front. Oncol.* **4**, 285 (2014).
342. Lane, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15–16 (1992).
343. Lane, D. & Levine, A. p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000893 (2010).
344. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C. C. p53 mutations in human cancers. *Science* **253**, 49–53 (1991).
345. Kandoth, C. *et al.* Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* **502**, 333–339 (2013).
346. Kaghad, M. *et al.* Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* **90**, 809–819 (1997).
347. Yang, A. *et al.* p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell* **2**, 305–316 (1998).
348. Nedelcu, A. M. & Tan, C. Early diversification and complex evolutionary history of the p53 tumor suppressor gene family. *Dev. Genes Evol.* **217**, 801–806 (2007).
349. Pankow, S. & Bamberger, C. The p53 tumor suppressor-like protein nvp63 mediates selective germ cell death in the sea anemone *Nematostella vectensis*. *PLoS One* **2**, e782 (2007).
350. Belyi, V. A. *et al.* The origins and evolution of the p53 family of genes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a001198 (2010).
351. Mills, A. A. *et al.* p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* **398**, 708–713 (1999).
352. Yang, A. *et al.* p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* **398**, 714–718 (1999).
353. Yang, A. *et al.* p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* **404**, 99–103 (2000).
354. Khoury, M. P. & Bourdon, J.-C. p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor? *Genes Cancer* **2**, 453–465 (2011).
355. Sayan, A. E. *et al.* Generation of DeltaTAp73 proteins by translation from a putative internal ribosome entry site. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1095**, 315–324 (2007).
356. Müller, M. *et al.* One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **9**, 288–306 (2006).
357. Murray-Zmijewski, F., Lane, D.P. & Bourdon, J.-C. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ.* **13**, 962–972 (2006).
358. Ethayathulla, A. S., Nguyen, H. T. & Viadiu, H. Crystal structures of the DNA-binding domain tetramer of the p53 tumor suppressor family member p73 bound to different full-site response elements. *J. Biol. Chem.* **288**, 4744–4754 (2013).
359. Ethayathulla, A. S. *et al.* Structure of p73 DNA-binding domain tetramer modulates p73 transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 6066–6071 (2012).
360. Coutandin, D. *et al.* Conformational stability and activity of p73 require a second helix in the tetramerization domain. *Cell Death Differ.* **16**, 1582–1589 (2009).
361. Di Como, C. J., Gaiddon, C. & Prives, C. p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1438–1449 (1999).

362. Brachmann, R. K., Vidal, M. & Boeke, J. D. Dominant-negative p53 mutations selected in yeast hit cancer hot spots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 4091–4095 (1996).
363. Inga, A. *et al.* Simple identification of dominant p53 mutants by a yeast functional assay. *Carcinogenesis* **18**, 2019–2021 (1997).
364. Monti, P. *et al.* Tumour p53 mutations exhibit promoter selective dominance over wild type p53. *Oncogene* **21**, 1641–1648 (2002).
365. Xu, J. *et al.* Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 285–295 (2011).
366. Chan, W. M., Siu, W. Y., Lau, A. & Poon, R. Y. C. How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer? *Mol. Cell. Biol.* **24**, 3536–3551 (2004).
367. Silva, J. L., De Moura Gallo, C. V., Costa, D. C. F. & Rangel, L. P. Prion-like aggregation of mutant p53 in cancer. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 260–267 (2014).
368. Grob, T. J. *et al.* Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ.* **8**, 1213–1223 (2001).
369. Stiewe, T., Theseling, C. C. & Pützer, B. M. Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 14177–14185 (2002).
370. Billant, O. *et al.* The dominant-negative interplay between p53, p63 and p73: A family affair. *Oncotarget* **7**, 69549–69564 (2016).
371. Monti, P. *et al.*  $\Delta N$ -P63 $\alpha$  and TA-P63 $\alpha$  exhibit intrinsic differences in transactivation specificities that depend on distinct features of DNA target sites. *Oncotarget* **5**, 2116–2130 (2014).
372. Liu, G., Nozell, S., Xiao, H. & Chen, X. DeltaNp73beta is active in transactivation and growth suppression. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 487–501 (2004).
373. Dohn, M., Zhang, S. & Chen, X. p63alpha and DeltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene* **20**, 3193–3205 (2001).
374. Tanaka, Y., Kameoka, M., Itaya, A., Ota, K. & Yoshihara, K. Regulation of HSF1-responsive gene expression by N-terminal truncated form of p73alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 865–872 (2004).
375. Tanaka, Y., Ota, K., Kameoka, M., Itaya, A. & Yoshihara, K. Up-regulation of NFkappaB-responsive gene expression by DeltaNp73alpha in p53 null cells. *Exp. Cell Res.* **312**, 1254–1264 (2006).
376. Nikulenkov, F. *et al.* Insights into p53 transcriptional function via genome-wide chromatin occupancy and gene expression analysis. *Cell Death Differ.* **19**, 1992–2002 (2012).
377. Chang, G. S. *et al.* A comprehensive and high-resolution genome-wide response of p53 to stress. *Cell Rep.* **8**, 514–527 (2014).
378. el-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet.* **1**, 45–49 (1992).
379. Funk, W. D., Pak, D. T., Karas, R. H., Wright, W. E. & Shay, J. W. A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2866–2871 (1992).
380. Hearnese, J. M. *et al.* Chromatin immunoprecipitation-based screen to identify functional genomic binding sites for sequence-specific transactivators. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 10148–10158 (2005).
381. Wei, C.-L. *et al.* A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* **124**, 207–219 (2006).

382. Kaneshiro, K., Tsutsumi, S., Tsuji, S., Shirahige, K. & Aburatani, H. An integrated map of p53-binding sites and histone modification in the human ENCODE regions. *Genomics* **89**, 178–188 (2007).
383. Menendez, D. *et al.* Diverse stresses dramatically alter genome-wide p53 binding and transactivation landscape in human cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **41**, 7286–7301 (2013).
384. Ramos, A., Tse, P.-W., Wang, J., Ethayathulla, A. S. & Viadiu, H. Sequence Variation in the Response Element Determines Binding by the Transcription Factor p73. *Biochemistry (Mosc.)* **54**, 6961–6972 (2015).
385. Avantaggiati, M. L. *et al.* Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* **89**, 1175–1184 (1997).
386. Gu, W. & Roeder, R. G. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**, 595–606 (1997).
387. Inga, A., Storici, F., Darden, T. A. & Resnick, M. A. Differential transactivation by the p53 transcription factor is highly dependent on p53 level and promoter target sequence. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8612–8625 (2002).
388. Weinberg, R. L., Veprintsev, D. B., Bycroft, M. & Fersht, A. R. Comparative binding of p53 to its promoter and DNA recognition elements. *J. Mol. Biol.* **348**, 589–596 (2005).
389. Samuels-Lev, Y. *et al.* ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol. Cell* **8**, 781–794 (2001).
390. Harms, K., Nozell, S. & Chen, X. The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **61**, 822–842 (2004).
391. Guo, X. *et al.* TAp63 induces senescence and suppresses tumorigenesis in vivo. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1451–1457 (2009).
392. Tomasini, R. *et al.* TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev.* **22**, 2677–2691 (2008).
393. Costanzo, A. *et al.* TP63 and TP73 in cancer, an unresolved ‘family’ puzzle of complexity, redundancy and hierarchy. *FEBS Lett.* **588**, 2590–2599 (2014).
394. Fontemaggi, G. *et al.* Identification of direct p73 target genes combining DNA microarray and chromatin immunoprecipitation analyses. *J. Biol. Chem.* **277**, 43359–43368 (2002).
395. Petrenko, O., Zaika, A. & Moll, U. M. deltaNp73 facilitates cell immortalization and cooperates with oncogenic Ras in cellular transformation in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5540–5555 (2003).
396. Flores, E. R. *et al.* Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell* **7**, 363–373 (2005).
397. Tomasini, R. *et al.* TAp73 regulates the spindle assembly checkpoint by modulating BubR1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 797–802 (2009).
398. Fulco, M. *et al.* p73 is regulated by phosphorylation at the G2/M transition. *J. Biol. Chem.* **278**, 49196–49202 (2003).
399. Talos, F., Nemajerova, A., Flores, E. R., Petrenko, O. & Moll, U. M. p73 suppresses polyploidy and aneuploidy in the absence of functional p53. *Mol. Cell* **27**, 647–659 (2007).
400. Inoue, S. *et al.* TAp73 is required for spermatogenesis and the maintenance of male fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 1843–1848 (2014).
401. Holembowski, L. *et al.* TAp73 is essential for germ cell adhesion and maturation in testis. *J. Cell Biol.* **204**, 1173–1190 (2014).

402. Melino, G. *et al.* p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J. Biol. Chem.* **279**, 8076–8083 (2004).
403. Buhlmann, S. & Pützer, B. M. DNp73 a matter of cancer: mechanisms and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta* **1785**, 207–216 (2008).
404. Ishimoto, O. *et al.* Possible oncogenic potential of DeltaNp73: a newly identified isoform of human p73. *Cancer Res.* **62**, 636–641 (2002).
405. Stiewe, T., Zimmermann, S., Frilling, A., Esche, H. & Pützer, B. M. Transactivation-deficient DeltaTA-p73 acts as an oncogene. *Cancer Res.* **62**, 3598–3602 (2002).
406. Wilhelm, M. T. *et al.* Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes Dev.* **24**, 549–560 (2010).
407. Tannapfel, A. *et al.* Autonomous growth and hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing the p53 family inhibitor DNp73. *Carcinogenesis* **29**, 211–218 (2008).
408. Rocco, J. W., Leong, C.-O., Kuperwasser, N., DeYoung, M. P. & Ellisen, L. W. p63 mediates survival in squamous cell carcinoma by suppression of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell* **9**, 45–56 (2006).
409. Zaika, A. I. *et al.* DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J. Exp. Med.* **196**, 765–780 (2002).
410. Stiewe, T. *et al.* Inactivation of retinoblastoma (RB) tumor suppressor by oncogenic isoforms of the p53 family member p73. *J. Biol. Chem.* **278**, 14230–14236 (2003).
411. Yoshikawa, H. *et al.* Mutational analysis of p73 and p53 in human cancer cell lines. *Oncogene* **18**, 3415–3421 (1999).
412. Nomoto, S. *et al.* Search for mutations and examination of allelic expression imbalance of the p73 gene at 1p36.33 in human lung cancers. *Cancer Res.* **58**, 1380–1383 (1998).
413. Becker, K. *et al.* Patterns of p73 N-terminal isoform expression and p53 status have prognostic value in gynecological cancers. *Int. J. Oncol.* **29**, 889–902 (2006).
414. Concin, N. *et al.* Transdominant DeltaTAp73 isoforms are frequently up-regulated in ovarian cancer. Evidence for their role as epigenetic p53 inhibitors in vivo. *Cancer Res.* **64**, 2449–2460 (2004).
415. Guan, M. & Chen, Y. Aberrant expression of DeltaNp73 in benign and malignant tumours of the prostate: correlation with Gleason score. *J. Clin. Pathol.* **58**, 1175–1179 (2005).
416. Tuve, S., Wagner, S. N., Schitteck, B. & Pützer, B. M. Alterations of DeltaTA-p 73 splice transcripts during melanoma development and progression. *Int. J. Cancer* **108**, 162–166 (2004).
417. Casciano, I. *et al.* Expression of DeltaNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients. *Cell Death Differ.* **9**, 246–251 (2002).
418. Müller, M. *et al.* TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ.* **12**, 1564–1577 (2005).
419. Puig, P. *et al.* p73 Expression in human normal and tumor tissues: loss of p73alpha expression is associated with tumor progression in bladder cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **9**, 5642–5651 (2003).
420. Crook, T., Nicholls, J. M., Brooks, L., O’Nions, J. & Allday, M. J. High level expression of deltaN-p63: a mechanism for the inactivation of p53 in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC)? *Oncogene* **19**, 3439–3444 (2000).
421. Berkers, C. R., Maddocks, O. D. K., Cheung, E. C., Mor, I. & Vousden, K. H. Metabolic regulation by p53 family members. *Cell Metab.* **18**, 617–633 (2013).

422. Cantor, J. R. & Sabatini, D. M. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov.* **2**, 881–898 (2012).
423. Du, W. *et al.* TAp73 enhances the pentose phosphate pathway and supports cell proliferation. *Nat. Cell Biol.* **15**, 991–1000 (2013).
424. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. & Oren, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296–299 (1997).
425. Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D. & Levine, A. J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**, 1237–1245 (1992).
426. Conforti, F., Sayan, A. E., Sreekumar, R. & Sayan, B. S. Regulation of p73 activity by post-translational modifications. *Cell Death Dis.* **3**, e285 (2012).
427. Urist, M., Tanaka, T., Poyurovsky, M. V. & Prives, C. p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2. *Genes Dev.* **18**, 3041–3054 (2004).
428. Pediconi, N. *et al.* Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* **5**, 552–558 (2003).
429. Ozaki, T., Okoshi, R., Sang, M., Kubo, N. & Nakagawara, A. Acetylation status of E2F-1 has an important role in the regulation of E2F-1-mediated transactivation of tumor suppressor p73. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **386**, 207–211 (2009).
430. Jones, E. V., Dickman, M. J. & Whitmarsh, A. J. Regulation of p73-mediated apoptosis by c-Jun N-terminal kinase. *Biochem. J.* **405**, 617–623 (2007).
431. Gong, J. G. *et al.* The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* **399**, 806–809 (1999).
432. Yuan, Z. M. *et al.* p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* **399**, 814–817 (1999).
433. Agami, R., Blandino, G., Oren, M. & Shaul, Y. Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* **399**, 809–813 (1999).
434. Wang, X. *et al.* A positive role for c-Abl in Atm and Atr activation in DNA damage response. *Cell Death Differ.* **18**, 5–15 (2011).
435. Sanchez-Prieto, R., Sanchez-Arevalo, V. J., Servitja, J.-M. & Gutkind, J. S. Regulation of p73 by c-Abl through the p38 MAP kinase pathway. *Oncogene* **21**, 974–979 (2002).
436. Costanzo, A. *et al.* DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. *Mol. Cell* **9**, 175–186 (2002).
437. Gaiddon, C. *et al.* Cyclin-dependent kinases phosphorylate p73 at threonine 86 in a cell cycle-dependent manner and negatively regulate p73. *J. Biol. Chem.* **278**, 27421–27431 (2003).
438. Nyman, U. *et al.* Protein kinase C-dependent phosphorylation regulates the cell cycle-inhibitory function of the p73 carboxy terminus transactivation domain. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 1814–1825 (2009).
439. Ren, J. *et al.* p73beta is regulated by protein kinase Cdelta catalytic fragment generated in the apoptotic response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* **277**, 33758–33765 (2002).
440. Ongkeko, W. M. *et al.* MDM2 and MDMX bind and stabilize the p53-related protein p73. *Curr. Biol. CB* **9**, 829–832 (1999).
441. Dobbelstein, M., Wienzek, S., König, C. & Roth, J. Inactivation of the p53-homologue p73 by the mdm2-oncoprotein. *Oncogene* **18**, 2101–2106 (1999).

442. Bálint, E., Bates, S. & Vousden, K. H. Mdm2 binds p73 alpha without targeting degradation. *Oncogene* **18**, 3923–3929 (1999).
443. Zeng, X. *et al.* MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3257–3266 (1999).
444. Watson, I. R., Blanch, A., Lin, D. C. C., Ohh, M. & Irwin, M. S. Mdm2-mediated NEDD8 modification of TAp73 regulates its transactivation function. *J. Biol. Chem.* **281**, 34096–34103 (2006).
445. Rossi, M. *et al.* The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *EMBO J.* **24**, 836–848 (2005).
446. Levy, D., Adamovich, Y., Reuven, N. & Shaul, Y. The Yes-associated protein 1 stabilizes p73 by preventing Itch-mediated ubiquitination of p73. *Cell Death Differ.* **14**, 743–751 (2007).
447. Wu, H. & Leng, R. P. MDM2 mediates p73 ubiquitination: a new molecular mechanism for suppression of p73 function. *Oncotarget* **6**, 21479–21492 (2015).
448. Asher, G., Lotem, J., Sachs, L., Kahana, C. & Shaul, Y. Mdm-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 13125–13130 (2002).
449. Watanabe, K. *et al.* Physical interaction of p73 with c-Myc and MM1, a c-Myc-binding protein, and modulation of the p73 function. *J. Biol. Chem.* **277**, 15113–15123 (2002).
450. Strano, S. *et al.* Physical interaction with Yes-associated protein enhances p73 transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 15164–15173 (2001).
451. Basu, S., Totty, N. F., Irwin, M. S., Sudol, M. & Downward, J. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol. Cell* **11**, 11–23 (2003).
452. Irwin, M. *et al.* Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* **407**, 645–648 (2000).
453. Seelan, R. S. *et al.* The human p73 promoter: characterization and identification of functional E2F binding sites. *Neoplasia N. Y. N* **4**, 195–203 (2002).
454. Fontemaggi, G. *et al.* The transcriptional repressor ZEB regulates p73 expression at the crossroad between proliferation and differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8461–8470 (2001).
455. Wu, S., Murai, S., Kataoka, K. & Miyagishi, M. Yin Yang 1 induces transcriptional activity of p73 through cooperation with E2F1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **365**, 75–81 (2008).
456. Vossio, S. *et al.* DN-p73 is activated after DNA damage in a p53-dependent manner to regulate p53-induced cell cycle arrest. *Oncogene* **21**, 3796–3803 (2002).
457. Kartasheva, N. N., Contente, A., Lenz-Stöppler, C., Roth, J. & Dobbelstein, M. p53 induces the expression of its antagonist p73 Delta N, establishing an autoregulatory feedback loop. *Oncogene* **21**, 4715–4727 (2002).
458. Nakagawa, T. *et al.* Autoinhibitory Regulation of p73 by  $\Delta$ Np73 To Modulate Cell Survival and Death through a p73-Specific Target Element within the  $\Delta$ Np73 Promoter. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2575–2585 (2002).
459. Nakagawa, T. *et al.* Autoinhibitory regulation of p73 by Delta Np73 to modulate cell survival and death through a p73-specific target element within the Delta Np73 promoter. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2575–2585 (2002).
460. Kartasheva, N. N., Contente, A., Lenz-Stöppler, C., Roth, J. & Dobbelstein, M. p53 induces the expression of its antagonist p73 Delta N, establishing an autoregulatory feedback loop. *Oncogene* **21**, 4715–4727 (2002).

461. Sayan, B. S. *et al.* Differential control of TAp73 and DeltaNp73 protein stability by the ring finger ubiquitin ligase PIR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 12877–12882 (2010).
462. Toh, W. H., Siddique, M. M., Boominathan, L., Lin, K. W. & Sabapathy, K. c-Jun regulates the stability and activity of the p53 homologue, p73. *J. Biol. Chem.* **279**, 44713–44722 (2004).
463. Danovi, S. A. *et al.* Yes-associated protein (YAP) is a critical mediator of c-Jun-dependent apoptosis. *Cell Death Differ.* **15**, 217–219 (2008).
464. Stantic, M. *et al.* TAp73 suppresses tumor angiogenesis through repression of proangiogenic cytokines and HIF-1 $\alpha$  activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 220–225 (2015).
465. Fernandez-Alonso, R. *et al.* p73 is required for endothelial cell differentiation, migration and the formation of vascular networks regulating VEGF and TGF $\beta$  signaling. *Cell Death Differ.* **22**, 1287–1299 (2015).
466. Sabapathy, K. p73: a Positive or Negative Regulator of Angiogenesis, or Both? *Mol. Cell. Biol.* **36**, 848–854 (2015).
467. Marin, M. C. & Marques, M. M. Novel role of p73 as a regulator of developmental angiogenesis: Implication for cancer therapy. *Mol. Cell. Oncol.* **3**, e1019973 (2016).
468. Senoo, M., Pinto, F., Crum, C. P. & McKeon, F. p63 is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell* **129**, 523–536 (2007).
469. Keyes, W. M. *et al.* p63 deficiency activates a program of cellular senescence and leads to accelerated aging. *Genes Dev.* **19**, 1986–1999 (2005).
470. Su, X. *et al.* TAp63 prevents premature aging by promoting adult stem cell maintenance. *Cell Stem Cell* **5**, 64–75 (2009).
471. Koster, M. I., Kim, S., Mills, A. A., DeMayo, F. J. & Roop, D. R. p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev.* **18**, 126–131 (2004).
472. Medawar, A. *et al.* DeltaNp63 is essential for epidermal commitment of embryonic stem cells. *PLoS One* **3**, e3441 (2008).
473. Lee, H. & Kimelman, D. A dominant-negative form of p63 is required for epidermal proliferation in zebrafish. *Dev. Cell* **2**, 607–616 (2002).
474. Truong, A. B., Kretz, M., Ridky, T. W., Kimmel, R. & Khavari, P. A. p63 regulates proliferation and differentiation of developmentally mature keratinocytes. *Genes Dev.* **20**, 3185–3197 (2006).
475. Guerrini, L., Costanzo, A. & Merlo, G. R. A symphony of regulations centered on p63 to control development of ectoderm-derived structures. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 864904 (2011).
476. Celli, J. *et al.* Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell* **99**, 143–153 (1999).
477. Pozniak, C. D. *et al.* An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science* **289**, 304–306 (2000).
478. Lee, A. F. *et al.* Evidence that DeltaNp73 promotes neuronal survival by p53-dependent and p53-independent mechanisms. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **24**, 9174–9184 (2004).
479. Walsh, G. S., Orike, N., Kaplan, D. R. & Miller, F. D. The invulnerability of adult neurons: a critical role for p73. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **24**, 9638–9647 (2004).
480. Pozniak, C. D. *et al.* p73 is required for survival and maintenance of CNS neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **22**, 9800–9809 (2002).
481. Yankner, B. A., Lu, T. & Loerch, P. The aging brain. *Annu. Rev. Pathol.* **3**, 41–66 (2008).
482. Flores, E. R. p73 is critical for the persistence of memory. *Cell Death Differ.* **18**, 381–382 (2011).

483. Fujitani, M. *et al.* TAp73 acts via the bHLH Hey2 to promote long-term maintenance of neural precursors. *Curr. Biol. CB* **20**, 2058–2065 (2010).
484. De Laurenzi, V. *et al.* Induction of neuronal differentiation by p73 in a neuroblastoma cell line. *J. Biol. Chem.* **275**, 15226–15231 (2000).
485. Hooper, C. *et al.* TAp73 isoforms antagonize Notch signalling in SH-SY5Y neuroblastomas and in primary neurones. *J. Neurochem.* **99**, 989–999 (2006).
486. Napoli, M. & Flores, E. R. Unifying the p73 knockout phenotypes: TAp73 orchestrates multiciliogenesis. *Genes Dev.* **30**, 1253–1254 (2016).
487. Fliegauf, M., Benzing, T. & Omran, H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 880–893 (2007).
488. Marshall, C. B. *et al.* p73 Is Required for Multiciliogenesis and Regulates the Foxj1-Associated Gene Network. *Cell Rep.* **14**, 2289–2300 (2016).
489. Nemajero, A. *et al.* TAp73 is a central transcriptional regulator of airway multiciliogenesis. *Genes Dev.* **30**, 1300–1312 (2016).
490. Muñoz-Fontela, C., Mandinova, A., Aaronson, S. A. & Lee, S. W. Emerging roles of p53 and other tumour-suppressor genes in immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 741–750 (2016).
491. Takaoka, A. *et al.* Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* **424**, 516–523 (2003).
492. Muñoz-Fontela, C. *et al.* Transcriptional role of p53 in interferon-mediated antiviral immunity. *J. Exp. Med.* **205**, 1929–1938 (2008).
493. Rivas, C., Aaronson, S. A. & Munoz-Fontela, C. Dual Role of p53 in Innate Antiviral Immunity. *Viruses* **2**, 298–313 (2010).
494. Taura, M. *et al.* p53 regulates Toll-like receptor 3 expression and function in human epithelial cell lines. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 6557–6567 (2008).
495. Mori, T. *et al.* Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53. *Oncogene* **21**, 2914–2918 (2002).
496. Yan, W. *et al.* Transcriptional analysis of immune-related gene expression in p53-deficient mice with increased susceptibility to influenza A virus infection. *BMC Med. Genomics* **8**, 52 (2015).
497. O’Shea, C. C. & Fried, M. Modulation of the ARF-p53 pathway by the small DNA tumor viruses. *Cell Cycle Georget. Tex* **4**, 449–452 (2005).
498. Pampin, M., Simonin, Y., Blondel, B., Percherancier, Y. & Chelbi-Alix, M. K. Cross talk between PML and p53 during poliovirus infection: implications for antiviral defense. *J. Virol.* **80**, 8582–8592 (2006).
499. Menendez, D., Shatz, M. & Resnick, M. A. Interactions between the tumor suppressor p53 and immune responses. *Curr. Opin. Oncol.* **25**, 85–92 (2013).
500. Gudkov, A. V., Gurova, K. V. & Komarova, E. A. Inflammation and p53. *Genes Cancer* **2**, 503–516 (2011).
501. Komarova, E. A. *et al.* p53 is a suppressor of inflammatory response in mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **19**, 1030–1032 (2005).
502. Menendez, D. *et al.* The Toll-like receptor gene family is integrated into human DNA damage and p53 networks. *PLoS Genet.* **7**, e1001360 (2011).
503. Shatz, M., Menendez, D. & Resnick, M. A. The human TLR innate immune gene family is differentially influenced by DNA stress and p53 status in cancer cells. *Cancer Res.* **72**, 3948–3957 (2012).



504. Shatz, M., Shats, I., Menendez, D. & Resnick, M. A. p53 amplifies Toll-like receptor 5 response in human primary and cancer cells through interaction with multiple signal transduction pathways. *Oncotarget* **6**, 16963–16980 (2015).
505. Mills, K. H. G. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 807–822 (2011).
506. Takatori, H., Kawashima, H., Suzuki, K. & Nakajima, H. Role of p53 in systemic autoimmune diseases. *Crit. Rev. Immunol.* **34**, 509–516 (2014).
507. Herkel, J. *et al.* Autoimmunity to the p53 protein is a feature of systemic lupus erythematosus (SLE) related to anti-DNA antibodies. *J. Autoimmun.* **17**, 63–69 (2001).
508. Yamanishi, Y. *et al.* Regulation of joint destruction and inflammation by p53 in collagen-induced arthritis. *Am. J. Pathol.* **160**, 123–130 (2002).
509. Kovacs, B. *et al.* Antibodies against p53 in sera from patients with systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* **40**, 980–982 (1997).
510. Kuhn, H. M. *et al.* p53 autoantibodies in patients with autoimmune diseases: a quantitative approach. *Autoimmunity* **31**, 229–235 (1999).
511. Lowe, J. M. *et al.* p53 and NF- $\kappa$ B coregulate proinflammatory gene responses in human macrophages. *Cancer Res.* **74**, 2182–2192 (2014).
512. Zheng, S.-J., Lamhamedi-Cherradi, S.-E., Wang, P., Xu, L. & Chen, Y. H. Tumor suppressor p53 inhibits autoimmune inflammation and macrophage function. *Diabetes* **54**, 1423–1428 (2005).
513. Arandjelovic, S. & Ravichandran, K. S. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat. Immunol.* **16**, 907–917 (2015).
514. Elliott, M. R. & Ravichandran, K. S. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J. Cell Biol.* **189**, 1059–1070 (2010).
515. Medina, C. B. & Ravichandran, K. S. Do not let death do us part: ‘find-me’ signals in communication between dying cells and the phagocytes. *Cell Death Differ.* **23**, 979–989 (2016).
516. Yoon, K. W. *et al.* Control of signaling-mediated clearance of apoptotic cells by the tumor suppressor p53. *Science* **349**, 1261669 (2015).
517. Jung, D.-J. *et al.* Foxp3 expression in p53-dependent DNA damage responses. *J. Biol. Chem.* **285**, 7995–8002 (2010).
518. Le Mercier, I., Lines, J. L. & Noelle, R. J. Beyond CTLA-4 and PD-1, the Generation Z of Negative Checkpoint Regulators. *Front. Immunol.* **6**, 418 (2015).
519. Deng, L. *et al.* Irradiation and anti-PD-L1 treatment synergistically promote antitumor immunity in mice. *J. Clin. Invest.* **124**, 687–695 (2014).
520. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252–264 (2012).
521. Sharma, P. & Allison, J. P. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell* **161**, 205–214 (2015).
522. Wang, L. *et al.* VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. *J. Exp. Med.* **208**, 577–592 (2011).
523. Cui, Y. & Guo, G. Immunomodulatory Function of the Tumor Suppressor p53 in Host Immune Response and the Tumor Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
524. Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A. & Locati, M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **13**, 453–461 (2008).

525. Tomasini, R. *et al.* TAp73 is required for macrophage-mediated innate immunity and the resolution of inflammatory responses. *Cell Death Differ.* **20**, 293–301 (2013).
526. Davis, D. W., Weidner, D. A., Holian, A. & McConkey, D. J. Nitric oxide-dependent activation of p53 suppresses bleomycin-induced apoptosis in the lung. *J. Exp. Med.* **192**, 857–869 (2000).
527. Okada, H. & Mak, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 592–603 (2004).
528. Li, C.-Q., Trudel, L. J. & Wogan, G. N. Nitric oxide-induced genotoxicity, mitochondrial damage, and apoptosis in human lymphoblastoid cells expressing wild-type and mutant p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10364–10369 (2002).
529. Brüne, B. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? *Cell Death Differ.* **10**, 864–869 (2003).
530. Wang, X., Michael, D., de Murcia, G. & Oren, M. p53 Activation by nitric oxide involves down-regulation of Mdm2. *J. Biol. Chem.* **277**, 15697–15702 (2002).
531. Hofseth, L. J. *et al.* Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 143–148 (2003).
532. Schneiderhan, N., Budde, A., Zhang, Y. & Brüne, B. Nitric oxide induces phosphorylation of p53 and impairs nuclear export. *Oncogene* **22**, 2857–2868 (2003).
533. Wang, X., Zalcnstein, A. & Oren, M. Nitric oxide promotes p53 nuclear retention and sensitizes neuroblastoma cells to apoptosis by ionizing radiation. *Cell Death Differ.* **10**, 468–476 (2003).
534. Yakovlev, V. A., Bayden, A. S., Graves, P. R., Kellogg, G. E. & Mikkelsen, R. B. Nitration of the tumor suppressor protein p53 at tyrosine 327 promotes p53 oligomerization and activation. *Biochemistry (Mosc.)* **49**, 5331–5339 (2010).
535. Tebbi, A., Guittet, O., Cottet, M.-H., Vesin, M.-F. & Lepoivre, M. TAp73 induction by nitric oxide: regulation by checkpoint kinase 1 (CHK1) and protection against apoptosis. *J. Biol. Chem.* **286**, 7873–7884 (2011).
536. Forrester, K. *et al.* Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 2442–2447 (1996).
537. Ambs, S. *et al.* Up-regulation of inducible nitric oxide synthase expression in cancer-prone p53 knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 8823–8828 (1998).
538. Murphy, M. *et al.* Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev.* **13**, 2490–2501 (1999).
539. Zhang, Y. *et al.* Repression of hsp90beta gene by p53 in UV irradiation-induced apoptosis of Jurkat cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 42545–42551 (2004).
540. Lin, T. *et al.* p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat. Cell Biol.* **7**, 165–171 (2005).
541. Ho, J. S. L., Ma, W., Mao, D. Y. L. & Benchimol, S. p53-Dependent transcriptional repression of c-myc is required for G1 cell cycle arrest. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7423–7431 (2005).
542. Wu, W.-S. *et al.* Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma. *Cell* **123**, 641–653 (2005).
543. Lee, K. C., Crowe, A. J. & Barton, M. C. p53-mediated repression of alpha-fetoprotein gene expression by specific DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1279–1288 (1999).
544. St Clair, S. *et al.* DNA damage-induced downregulation of Cdc25C is mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the cdc25C promoter. *Mol. Cell* **16**, 725–736 (2004).

545. Oida, T. & Weiner, H. L. Depletion of TGF- $\beta$  from fetal bovine serum. *J. Immunol. Methods* **362**, 195–198 (2010).
546. Grygielko, E. T. *et al.* Inhibition of gene markers of fibrosis with a novel inhibitor of transforming growth factor-beta type I receptor kinase in puromycin-induced nephritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **313**, 943–951 (2005).
547. Abdollah, S. *et al.* T $\beta$ RI Phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 Is Required for Smad2-Smad4 Complex Formation and Signaling. *J. Biol. Chem.* **272**, 27678–27685 (1997).
548. Vincendeau, P. & Daulouède, S. Macrophage cytostatic effect on *Trypanosoma muscili* involves an L-arginine-dependent mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **146**, 4338–4343 (1991).
549. Gugssa, A., Gebru, S., Lee, C. M., Baccetti, B. & Anderson, W. Apoptosis of *Trypanosoma muscili* co-cultured with LPS activated macrophages: enhanced expression of nitric oxide synthase INF-gamma and caspase. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **37**, 99–107 (2005).
550. Niemantsverdriet, M. *et al.*  $\Delta$ Np73 Enhances Promoter Activity of TGF- $\beta$  Induced Genes. *PLoS ONE* **7**, (2012).
551. Ravi, R. *et al.* p53-mediated repression of nuclear factor-kappaB RelA via the transcriptional integrator p300. *Cancer Res.* **58**, 4531–4536 (1998).
552. Reardon, C. & McKay, D. M. TGF-beta suppresses IFN-gamma-STAT1-dependent gene transcription by enhancing STAT1-PIAS1 interactions in epithelia but not monocytes/macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 4284–4295 (2007).
553. Ishida, Y., Kondo, T., Takayasu, T., Iwakura, Y. & Mukaida, N. The essential involvement of cross-talk between IFN-gamma and TGF-beta in the skin wound-healing process. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **172**, 1848–1855 (2004).
554. Bitzer, M. *et al.* A mechanism of suppression of TGF- $\beta$ /SMAD signaling by NF- $\kappa$ B/RelA. *Genes Dev.* **14**, 187–197 (2000).
555. Freudlsperger, C. *et al.* TGF- $\beta$  and NF- $\kappa$ B signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers. *Oncogene* **32**, 1549–1559 (2013).
556. Brandl, M. *et al.* IKK( $\alpha$ ) controls canonical TGF( $\beta$ )-SMAD signaling to regulate genes expressing SNAIL and SLUG during EMT in panc1 cells. *J. Cell Sci.* **123**, 4231–4239 (2010).
557. He, Y. *et al.* LPS/TLR4 Signaling Enhances TGF- $\beta$  Response Through Downregulating BAMBI During Prostatic Hyperplasia. *Sci. Rep.* **6**, 27051 (2016).
558. Ricote, M., Li, A. C., Willson, T. M., Kelly, C. J. & Glass, C. K. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **391**, 79–82 (1998).
559. Li, M., Pascual, G. & Glass, C. K. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4699–4707 (2000).
560. Scirpo, R. *et al.* Stimulation of nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  limits NF- $\kappa$ B-dependent inflammation in mouse cystic fibrosis biliary epithelium. *Hepatol. Baltim. Md* **62**, 1551–1562 (2015).
561. Gong, K. *et al.* Smad3-mSin3A-HDAC1 Complex is Required for TGF- $\beta$ 1-Induced Transcriptional Inhibition of PPAR $\gamma$  in Mouse Cardiac Fibroblasts. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **40**, 908–920 (2016).
562. Lakshmi, S. P., Reddy, A. T. & Reddy, R. C. Transforming growth factor  $\beta$  suppresses peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  expression via both SMAD binding and novel TGF- $\beta$  inhibitory elements. *Biochem. J.* **474**, 1531–1546 (2017).

563. Frederick, J. P., Liberati, N. T., Waddell, D. S., Shi, Y. & Wang, X.-F. Transforming growth factor beta-mediated transcriptional repression of c-myc is dependent on direct binding of Smad3 to a novel repressive Smad binding element. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 2546–2559 (2004).
564. Kerr, L. D., Miller, D. B. & Matrisian, L. M. TGF-beta 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence. *Cell* **61**, 267–278 (1990).
565. Elston, R. & Inman, G. J. Crosstalk between p53 and TGF- $\beta$  Signalling. *J. Signal Transduct.* **2012**, 294097 (2012).
566. Wyllie, F. S. *et al.* Correlated abnormalities of transforming growth factor-beta 1 response and p53 expression in thyroid epithelial cell transformation. *Mol. Cell. Endocrinol.* **76**, 13–21 (1991).
567. Cordenonsi, M. *et al.* Links between tumor suppressors: p53 is required for TGF-beta gene responses by cooperating with Smads. *Cell* **113**, 301–314 (2003).
568. Overstreet, J. M., Samarakoon, R., Meldrum, K. K. & Higgins, P. J. Redox control of p53 in the transcriptional regulation of TGF- $\beta$ 1 target genes through SMAD cooperativity. *Cell. Signal.* **26**, 1427–1436 (2014).
569. Kawarada, Y. *et al.* TGF- $\beta$  induces p53/Smads complex formation in the PAI-1 promoter to activate transcription. *Sci. Rep.* **6**, 35483 (2016).
570. Bedard, K. & Krause, K.-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **87**, 245–313 (2007).
571. Boudreau, H. E., Casterline, B. W., Burke, D. J. & Leto, T. L. Wild-type and mutant p53 differentially regulate NADPH oxidase 4 in TGF- $\beta$ -mediated migration of human lung and breast epithelial cells. *Br. J. Cancer* **110**, 2569–2582 (2014).
572. Boudreau, H. E. *et al.* Histone modifications affect differential regulation of TGF $\beta$ - induced NADPH oxidase 4 (NOX4) by wild-type and mutant p53. *Oncotarget* **8**, 44379–44397 (2017).
573. Wilkinson, D. S., Tsai, W.-W., Schumacher, M. A. & Barton, M. C. Chromatin-bound p53 anchors activated Smads and the mSin3A corepressor to confer transforming-growth-factor-beta-mediated transcription repression. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 1988–1998 (2008).
574. Adorno, M. *et al.* A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis. *Cell* **137**, 87–98 (2009).
575. Ji, L. *et al.* Mutant p53 promotes tumor cell malignancy by both positive and negative regulation of the transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) pathway. *J. Biol. Chem.* **290**, 11729–11740 (2015).
576. Werner, F. *et al.* Transforming growth factor-beta 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *J. Biol. Chem.* **275**, 36653–36658 (2000).
577. Thakur, A. K. *et al.* TAp73 loss favors Smad-independent TGF- $\beta$  signaling that drives EMT in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Death Differ.* **23**, 1358–1370 (2016).
578. Zi, Z., Chapnick, D. A. & Liu, X. Dynamics of TGF- $\beta$ /Smad signaling. *FEBS Lett.* **586**, 1921–1928 (2012).
579. You, T. *et al.* Crystal structure of SPSB2 in complex with a rational designed RGD-containing cyclic peptide inhibitor of SPSB2-iNOS interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **489**, 346–352 (2017).
580. Yap, B. K. *et al.* A potent cyclic peptide targeting SPSB2 protein as a potential anti-infective agent. *J. Med. Chem.* **57**, 7006–7015 (2014).
581. Harjani, J. R. *et al.* Design, Synthesis, and Characterization of Cyclic Peptidomimetics of the Inducible Nitric Oxide Synthase Binding Epitope That Disrupt the Protein-Protein Interaction Involving SPRY Domain-Containing Suppressor of Cytokine Signaling Box Protein (SPSB) 2 and Inducible Nitric Oxide Synthase. *J. Med. Chem.* **59**, 5799–5809 (2016).

582. Huang, Y. & Ratovitski, E. A. Phosphorylated TP63 induces transcription of RPN13, leading to NOS2 protein degradation. *J. Biol. Chem.* **285**, 41422–41431 (2010).
583. Lewis, R. S. *et al.* TLR regulation of SPSB1 controls inducible nitric oxide synthase induction. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187**, 3798–3805 (2011).
584. Liu, S., Nheu, T., Luwor, R., Nicholson, S. E. & Zhu, H.-J. SPSB1, a Novel Negative Regulator of the Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling Pathway Targeting the Type II Receptor. *J. Biol. Chem.* **290**, 17894–17908 (2015).
585. Fagerberg, L. *et al.* Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **13**, 397–406 (2014).
586. Sikorski, E. M., Hock, T., Hill-Kapturczak, N. & Agarwal, A. The story so far: Molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **286**, F425–441 (2004).
587. Soriano, F. X. *et al.* Transcriptional regulation of the AP-1 and Nrf2 target gene sulfiredoxin. *Mol. Cells* **27**, 279–282 (2009).
588. Korashy, H. M. & El-Kadi, A. O. S. NF-kappaB and AP-1 are key signaling pathways in the modulation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene by mercury, lead, and copper. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **22**, 274–283 (2008).
589. Kim, M. G. *et al.* Regulation of Toll-like receptor-mediated Sestrin2 induction by AP-1, Nrf2, and the ubiquitin-proteasome system in macrophages. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **144**, 425–435 (2015).
590. Vannini, F., Kashfi, K. & Nath, N. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol.* **6**, 334–343 (2015).
591. Wada, S. *et al.* Loss of p53 in stromal fibroblasts enhances tumor cell proliferation through nitric-oxide-mediated cyclooxygenase 2 activation. *Free Radic. Res.* **49**, 269–278 (2015).
592. Menegon, S., Columbano, A. & Giordano, S. The Dual Roles of NRF2 in Cancer. *Trends Mol. Med.* **22**, 578–593 (2016).
593. Lieke, T., Steeg, C., Graefe, S. E. B., Fleischer, B. & Jacobs, T. Interaction of natural killer cells with Trypanosoma cruzi-infected fibroblasts. *Clin. Exp. Immunol.* **145**, 357–364 (2006).
594. Schäffer, M. R. *et al.* Nitric oxide, an autocrine regulator of wound fibroblast synthetic function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **158**, 2375–2381 (1997).
595. Shi, H. P. *et al.* The role of iNOS in wound healing. *Surgery* **130**, 225–229 (2001).
596. Kitano, T. *et al.* Impaired Healing of a Cutaneous Wound in an Inducible Nitric Oxide Synthase-Knockout Mouse. *Dermatol. Res. Pract.* **2017**, 2184040 (2017).
597. Han, G. *et al.* Nitric oxide-releasing nanoparticles accelerate wound healing by promoting fibroblast migration and collagen deposition. *Am. J. Pathol.* **180**, 1465–1473 (2012).
598. Grabowski, P. S., Macpherson, H. & Ralston, S. H. Nitric oxide production in cells derived from the human joint. *Br. J. Rheumatol.* **35**, 207–212 (1996).
599. McInnes, I. B. *et al.* Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J. Exp. Med.* **184**, 1519–1524 (1996).
600. Grabowski, P. S. *et al.* Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br. J. Rheumatol.* **36**, 651–655 (1997).
601. Cai, X. *et al.* Adiponectin inhibits lipopolysaccharide-induced adventitial fibroblast migration and transition to myofibroblasts via AdipoR1-AMPK-iNOS pathway. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **24**, 218–228 (2010).

602. Zhang, G. *et al.* Macrophages activate iNOS signaling in adventitial fibroblasts and contribute to adventitia fibrosis. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **61**, 20–28 (2016).
603. Nakagawa, T. *et al.* Autoinhibitory Regulation of p73 by  $\Delta$ Np73 To Modulate Cell Survival and Death through a p73-Specific Target Element within the  $\Delta$ Np73 Promoter. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2575–2585 (2002).
604. Richter, K., Konzack, A., Pihlajaniemi, T., Heljasvaara, R. & Kietzmann, T. Redox-fibrosis: Impact of TGF $\beta$ 1 on ROS generators, mediators and functional consequences. *Redox Biol.* **6**, 344–352 (2015).
605. Boudreau, H. E., Casterline, B. W., Rada, B., Korzeniowska, A. & Leto, T. L. Nox4 involvement in TGF-beta and SMAD3-driven induction of the epithelial-to-mesenchymal transition and migration of breast epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 1489–1499 (2012).
606. Krstic, J. & Santibanez, J. F. Transforming growth factor-beta and matrix metalloproteinases: functional interactions in tumor stroma-infiltrating myeloid cells. *ScientificWorldJournal* **2014**, 521754 (2014).







**Titre :** Coopération entre les isoformes TAp73 la voie de signalisation du TGF- $\beta$  dans la régulation de l'expression de la NO Synthase inductible.

**Mots clés :** Monoxyde d'azote (NO) ; iNOS ; p73 ; TGF- $\beta$  ; Nrf2

**Résumé :** Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule gazeuse synthétisée par les NO Synthases à partir de L-arginine. NO est une puissante molécule de signalisation dans de nombreux processus physiologiques comme la vasodilatation et la neurotransmission. Il module l'activité de multiples protéines (ex : guanylate cyclase soluble et ribonucléotide réductase) grâce à la nitrosylation de groupements thiol ou de métaux de transition. En tant que radical libre, NO peut réagir avec de nombreuses espèces comme l'oxygène moléculaire, et ainsi former des dérivés réactifs. Grâce à ces propriétés, NO est un acteur majeur de l'immunité innée et de l'inflammation. Les phagocytes produisent de grandes quantités de NO en réponse à des stimuli proinflammatoires, via l'activité NO Synthase inductible (iNOS). En raison des effets délétères des dérivés de NO, l'activité iNOS doit être finement régulée.

Le suppresseur de tumeur p53 est capable de réprimer l'expression du gène *Nos2* après avoir été lui-même activé en réponse à une accumulation de NO. La protéine p73 est un homologue de p53 encodé par un gène qui génère à la fois des isoformes actives (TAp73) et des isoformes qui sont dépourvues du domaine de transactivation N-terminal et exercent un effet dominant négatif ( $\Delta$ Np73). Cette étude se focalise sur le rôle des isoformes TAp73 dans la régulation de l'expression de la iNOS. Nous démontrons que les isoformes TAp73 régulent négativement l'expression de la iNOS aux niveaux transcriptionnel et post-traductionnel en potentialisant l'effet répresseur du TGF- $\beta$ , ce qui résulte en une forte surexpression de la iNOS dans les cellules *TAp73*<sup>-/-</sup>. Ces résultats confortent le rôle de la famille p53 comme un réseau essentiel de protéines régulatrices des fonctions du TGF- $\beta$ .

**Title :** TAp73 isoforms and TGF- $\beta$  signaling cooperate to suppress inducible Nitric Oxide Synthase expression

**Keywords :** Nitric oxide (NO) ; iNOS ; p73 ; TGF- $\beta$  ; Nrf2

**Abstract :** Nitric oxide (NO) is a gaseous molecule synthesized from L-arginine by Nitric Oxide Synthases. NO acts as a potent signaling molecule in various physiological processes like vasorelaxation and neurotransmission. It modulates the activity of many proteins (e.g. soluble guanylate cyclase and ribonucleotide reductase) through nitrosylation of thiol moieties or transition metal ions. As a free radical, NO can also react with a number of cellular species, notably molecular oxygen, to form reactive oxygen species and reactive nitrogen species. Thanks to these properties, NO appears as a major component of innate immune response and inflammation. Phagocytes produce large amounts of NO in response to proinflammatory through inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) activity.

Because of the harmful effects of NO derivatives on cellular components, iNOS activity needs to be tightly regulated. The p53 tumor suppressor has been shown to repress *Nos2* after being activated by NO itself. The p73 protein is an homologous encoded by the TP73 gene that generate transcriptionally active TAp73 isoforms and  $\Delta$ Np73 isoforms that lack the transactivation domain and exert a dominant negative effect. This study focuses on the role of TAp73 isoforms in regulation of iNOS expression. We demonstrate that TAp73 isoforms potentiate the repressive effect of TGF- $\beta$  on iNOS expression at transcriptional and post-traductional levels, resulting in a substantial iNOS overexpression in *TAp73*<sup>-/-</sup> cells. These results emphasize the emerging role of p53 family as a master regulator of TGF- $\beta$  functions.

