

Université de Sherbrooke

**Nouveau mécanisme de régulation de l'apoptose par les récepteurs couplés
aux protéines G**

par

Christian Iorio-Morin

Programme de pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de
l'obtention du grade *Philosophiae Doctor* (Ph.D) en pharmacologie

Février 2013

Évaluateurs :

Dr Marc Servant, Faculté de pharmacie, UdeM

Dr Nathalie Rivard, Département d'anatomie et de biologie cellulaire, UdeS

Dr Jean-Bernard Denault, Département de pharmacologie, UdeS

Dr Jean-Luc Parent, Département de médecine, UdeS

1. RÉSUMÉ

L'apoptose est un processus dont l'importance physiologique et pathophysiologique est de mieux en mieux appréciée. Si plusieurs mécanismes expliquant son initiation et son exécution ont été décrits, les détails de sa régulation fine restent à être précisés. Par ces travaux, nous démontrons une interaction directe entre la protéine pro-apoptotique Siva1 et la queue C-terminale de plusieurs récepteurs couplés aux protéines G, incluant TP, IP, PAF, AT₁R et CHRM3. Pour TP, nous prouvons que la stimulation du récepteur par le U46619 entraîne une translocation et une accumulation cytoplasmique de Siva1, ainsi qu'une modulation de ses interactions avec Mdm2, XIAP et TRAF2, résultant en une induction de l'apoptose. Nous rapportons également que l'expression de Siva1 potentialise l'ubiquitinylation de TP en réponse à une stimulation et que cette ubiquitinylation n'affecte ni la dégradation, ni l'internalisation du récepteur. Nous démontrons par ailleurs que la stimulation de TP diminue l'expression totale d'IkBa, l'inhibiteur principal de la voie NFkB et que cet effet corrèle avec le niveau d'expression de Siva1. En démontrant l'existence d'un complexe entre TP et TRAF2 suite à une stimulation réceptorielle, nous proposons que la modulation NFkB par TP pourrait résulter d'une signalisation dépendant de l'ubiquitine et analogue à celle des TNFR. D'autre part, nous présentons une interaction entre Siva1 et l'arrestine et apportons des données suggérant que l'expression de Siva1 pourrait moduler l'activation des MAPK. Nous proposons finalement un modèle réconciliant les fonctions anti- et pro-apoptotiques de TP et dans lequel le phénotype final d'une stimulation dépendrait de l'expression relative de Siva1. Les corollaires de ce modèle pourraient possiblement bonifier la prise en charge d'incidents ischémiques comme l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral, et améliorer le traitement du cancer par une diminution de la toxicité d'agents chimiothérapeutiques et l'amélioration de la sensibilité tumorale.

Mots-clés : Siva, Thromboxane, Apoptose, Prostaglandines, Cancer, Ubiquitinylation, NFkB.

2. ABSTRACT

Apoptosis is a significant physiological process involved not only in normal tissue homeostasis, but also in most pathological processes. Although much has been written about how apoptosis is executed, the details of how it is regulated remain elusive. In this work, we report a direct interaction between the pro-apoptotic protein Siva1 and the C-terminal tail of multiple G protein coupled receptors, including TP, IP, PAF, AT₁R and CHRM3. We show that TP stimulation by its agonist U46619 induces a cytoplasmic translocation and accumulation of Siva1 and modulates its interaction with Mdm2, XIAP and TRAF2, resulting in apoptosis induction. We report that Siva1 expression also potentiates stimulation-induced TP ubiquitination that does not affect receptor degradation or internalization. We demonstrate that TP stimulation decreases total expression of NFκB's main inhibitor, IκBα, and that this effect correlates with Siva1 expression. By showing the existence of a stimulation-induced protein complex involving both TP and TRAF2, we suggest that NFκB activation upon TP stimulation might result from ubiquitin-dependent signalling pathways similar to those seen with TNFR. Moreover, we report an interaction between Siva1 and arrestin and reveal data suggesting that Siva1 expression might modulate MAPK activation upon TP stimulation. We finally present a model unifying TP's anti- and pro-apoptotic functions in which the final stimulation phenotype depends on the relative expression of Siva1. The implications of this model range from the treatment of ischemic events such as myocardial infarction and stroke to the improvement of cancer chemotherapy where both treatment toxicity and cancer cells resistance could be better understood.

Keywords: Siva, Thromboxane, Apoptosis, Prostaglandins, Cancer, Ubiquitination, NFκB.

3. TABLE DES MATIÈRES

1. Résumé	II
2. Abstract	III
3. Table des matières	V
4. Liste des figures	VIII
5. Liste des tableaux	X
6. Liste des abréviations	XI
7. Introduction	1
7.1. L'apoptose	1
7.1.1. Mécanismes initiateurs et effecteurs	2
7.1.1.1. Voie commune effectrice.....	2
7.1.1.2. Voie extrinsèque.....	3
7.1.1.3. Voie intrinsèque.....	5
7.1.1.4. Étapes partagées.....	9
7.1.2. Mécanismes régulateurs.....	11
7.1.2.1. Voie p53.....	11
7.1.2.2. Voie NFκB.....	14
7.1.3. Rôles physiologiques.....	19
7.1.4. Rôles pathologiques	20
7.1.4.1. Cancer	21
7.1.4.2. Ischémie	22
7.2. Les prostanoïdes	23
7.2.1. Synthèse	24
7.2.2. Les prostanoïdes comme cibles thérapeutiques.....	25
7.3. Les récepteurs couplés aux protéines G	27
7.3.1. Mécanismes signalétiques.....	28
7.3.1.1. Signalisation classique par les protéines G.....	28
7.3.1.2. Signalisation protéines G-indépendante	31
7.3.2. Modulation de l'apoptose par les GPCR	33
7.3.2.1. Les récepteurs adrénergiques.....	33
7.3.2.2. Les récepteurs cholinergiques	38
7.3.2.3. Le récepteur du thromboxane A ₂	41
7.3.2.4. Autres points de contrôle de l'apoptose rapportés pour les GPCR.....	44
7.4. Siva1	46
7.4.1. Structure de Siva	47
7.4.2. Mécanismes de régulation de l'apoptose.....	48
7.4.3. Interaction avec des récepteurs membranaires	49
7.4.4. Localisation.....	50
7.5. Objectifs de l'étude	51
8. Article 1	53
8.1. Avant-propos	53
8.2. Résumé	54
8.3. Manuscrit	55

8.3.1. Abstract	55
8.3.2. Introduction.....	55
8.3.3. Results	57
8.3.3.1. TP directly interacts with Siva1	57
8.3.3.2. Endogenous TP stimulation promotes cisplatin-induced apoptosis in HeLa cells	60
8.3.3.3. Cisplatin induces TXA ₂ production.....	62
8.3.3.4. TP stimulation prevents Siva1 degradation.....	63
8.3.3.5. TP stimulation modulates the interaction of Siva1 with its known partners.....	66
8.3.3.6. TP stimulation induces translocation of Siva1 to the cytoplasm	67
8.3.3.7. Siva1 is required for TP-mediated modulation of apoptosis.....	72
8.3.4. Discussion.....	73
8.3.5. Materials and methods	78
8.3.5.1. Reagents	78
8.3.5.2. Plasmid Constructs	78
8.3.5.3. Cell culture, transfection and stimulation.....	79
8.3.5.4. Yeast two-hybrid screen	79
8.3.5.5. Recombinant protein production and binding assays	80
8.3.5.6. Immunoprecipitations.....	81
8.3.5.7. Apoptosis induction and assessment	81
8.3.5.8. Thromboxane production assay.....	82
8.3.5.9. Siva1 expression	83
8.3.5.10. Cycloheximide chase assay	83
8.3.5.11. Confocal microscopy	84
8.3.5.12. Cell fractionation.....	85
8.3.5.13. siRNA knock-down.....	85
8.3.5.14. Image densitometry.....	86
8.3.5.15. Statistical analysis	86
8.3.6. Supplementary methods.....	87
8.3.6.1. Detailed Figure 5 analysis.....	87
8.3.7. Acknowledgments	88
8.3.8. Conflict of interest.....	88
8.3.9. References.....	88

9. Caractérisation de la voie siva1 et Généralisation du mécanisme à d'autres GPCR	95
9.1. Matériel et méthodes.....	96
9.1.1. Culture cellulaire	96
9.1.2. Vecteurs et protéines recombinantes	96
9.1.3. Transfections transitoires.....	99
9.1.4. Génération de lignées stables	99
9.1.5. Stimulation des récepteurs	99
9.1.6. Extraction d'ARN et RT-PCR.....	100
9.1.7. Essais de liaison <i>in vitro</i> et co-immunoprécipitations	100
9.1.8. Analyses d'expression protéique totale.....	100
9.1.9. Analyse de l'apoptose dans les CHO	100
9.1.10. Essais d'ubiquitination <i>in cellulo</i>	101
9.1.11. Analyse d'internalisation de TPβ.....	101
9.1.12. Analyse d'activation des voies NFκB et MAP kinases.....	102
9.2. Résultats	103
9.2.1. Siva1 interagit directement avec les queues C-terminales de plusieurs GPCR	103

9.2.2.	Différents GPCR modulent l'expression totale de Siva1 de façon corrélée à leur effet connu sur l'apoptose	105
9.2.3.	Une délétion de la portion C-terminale de la queue cytoplasmique du récepteur M3 abolit l'interaction avec Siva1.....	108
9.2.4.	Rôle de Siva1 dans la modulation de l'apoptose par les récepteurs muscariniques.....	111
9.2.5.	La co-expression de Siva1 avec des GPCR module leur ubiquitination en réponse à une stimulation par leur agoniste	114
9.2.6.	Une stimulation de TP β entraîne la formation d'un complexe avec TRAF2	117
9.2.7.	L'ubiquitination Siva1-induite de TP β n'est pas associée à une augmentation de leur internalisation.....	119
9.2.8.	La co-expression de Siva1 avec des GPCR module leur signalisation vers la voie NF κ B	120
9.2.9.	Siva1 fait partie d'un complexe protéique impliquant l'arrestine	123
10.	Discussion	126
10.1.	Siva1 : nouvel acteur contrôlé par les GPCR	126
10.1.1.	Généralisation du contrôle de Siva1 à d'autres GPCR.....	126
10.1.2.	Pourquoi Siva1 interagit-elle directement avec les GPCR?	127
10.2.	Nouveau mécanisme de régulation de l'apoptose par le thromboxane A₂	130
10.2.1.	Modulation de TP par Siva1	130
10.2.2.	Modulation de Siva1 par TP	132
10.2.3.	Unification des rôles pro- et anti-apoptotiques de TP	133
10.3.	Implications cliniques des découvertes rapportées.....	134
10.3.1.	Siva1 comme contributeur à l'ischémie.....	134
10.3.2.	Siva1 comme cible de la transformation cancéreuse.....	137
11.	Conclusion.....	140
12.	Remerciements.....	141
13.	Références	142
14.	Annexes	164
14.1.	Effet de Siva1 sur l'activation des MAPK par TP	164
14.2.	Formulaire de consentement.....	165

4. LISTE DES FIGURES

FIGURE 7.1 : Cinétique et morphologie du processus apoptotique	2
FIGURE 7.2 : Activation de la voie extrinsèque par les récepteurs de la mort	4
FIGURE 7.3 : Formation de l'apoptosome	6
FIGURE 7.4 : Interaction entre les membres de la famille des protéines Bcl-2	8
FIGURE 7.5 : Initiation et exécution de l'apoptose	10
FIGURE 7.6 : Régulation et rôle de p53	13
FIGURE 7.7 : Régulation de NFκB par le complexe IKK	16
FIGURE 7.8 : Régulation du complexe IKK par les TRAFs	18
FIGURE 7.9 : Implications pathologiques de l'apoptose	23
FIGURE 7.10 : Métabolites de l'acide arachidonique	24
FIGURE 7.11 : Structure générale des GPCR	28
FIGURE 7.12 : Signalisation par les protéines G	30
FIGURE 7.13 : Contrôle de l'apoptose par les récepteurs β-adrénergiques	37
FIGURE 7.14 : Contrôle de l'apoptose par les récepteurs muscariniques.....	40
FIGURE 7.15 : Contrôle de l'apoptose par TP	43
FIGURE 7.16 : Domaines prédits pour Siva	48
FIGURE 8.1: Siva1 interacts with the C-tail and intra-cellular loops (ICL) of TPβ through its domain spanning amino acids 138 through 175.	59
FIGURE 7.Supp1: Co-immunoprecipitation of endogenous TP with endogenous Siva is impeded by U46619 stimulation but not by a cisplatin treatment alone	59
FIGURE 8.2: Endogenous TP stimulation promotes cisplatin-induced apoptosis in HeLa cells	61
FIGURE 8.3: Cisplatin induces thromboxane production	63
FIGURE 8.4: TP increases total Siva1 expression by decreasing its degradation	65
FIGURE 8.5: TP stimulation enhances the Siva1 interaction with XIAP and TRAF2 while diminishing the interaction between Siva1 and Mdm2	67
FIGURE 7.Supp3: Siva1 accumulates in “dot-like structures” at very high transfection levels, but not at low levels	68

FIGURE 8.6: Siva1 is predominantly nuclear but translocates to the cytoplasm upon TP stimulation	70
FIGURE 7.Supp4: Assessment of siSiva siRNAs efficacy and Siva antibody specificity	71
FIGURE 8.7: Siva1 is required for apoptosis modulation by TP	73
FIGURE 8.8: Proposed schematic model of Siva1 regulation.....	76
FIGURE 9.1 : Essai de liaison <i>in vitro</i> entre Siva1 et la queue C-terminale de différents GPCR	104
FIGURE 9.2 : L'expression totale de Siva1 est modulable par la co-expression ou la stimulation de divers GPCR	107
FIGURE 9.3 : L'extrémité distale de CHRM3, contenant une région polybasique conservée, est importante pour l'interaction entre Siva1 et le récepteur	110
FIGURE 9.4 : Modulation de l'apoptose par le carbachol.....	112
FIGURE 9.5 : Siva1 potentialise l'ubiquitinylation de TP β et β_2 AR.....	116
FIGURE 9.6 : TRAF2 co-immunoprécipite avec TP β suite à une stimulation de 5h par le U46619.....	118
FIGURE 9.7 : La co-expression de Siva1 n'affecte pas la cinétique d'internalisation de TP β	119
FIGURE 9.8 : TP active la voie NF κ B par un mécanisme Siva-dépendant	121
FIGURE 9.9 : Siva1 interagit avec l'arrestine <i>in cellulo</i>	124
FIGURE 10.1 : Rôle potentiel de TP dans l'apoptose observée en ischémie-reperfusion	136
FIGURE 10.2 : Action double du TXA ₂ lors du traitement d'un cancer à la cisplatine	139
FIGURE 14.1 : Siva1 module l'activation des MAPK par TP	164

5. LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 6.1 : Classification des membres de la famille Bcl-2.....	7
TABLEAU 9.1 : Récepteurs clonés antérieurement.....	97
TABLEAU 9.2 : Constructions réalisées dans le cadre du projet	98

6. LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADP	Adénosine Di-Phosphate
AIF	<i>Apoptosis-Inducing Factor</i>
Akt/PKB	Protéine Kinase B
AMP	Adénosine Mono-Phosphate
Apaf1	<i>Apoptotic Protease Activating Factor 1</i>
ASA	<i>AcetylSalicylic Acid</i>
ASK-1	<i>Apoptosis Signal-regulating Kinase 1</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
AT ₁ R	<i>Angiotensin II, Type 1 Receptor</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3 related protein</i>
β ₂ AR	<i>Beta-2 Adrenergic Receptor</i>
BAD	<i>Bcl-2-Associated Death promoter</i>
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist Killer</i>
BAX	<i>Bcl-2-Associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-Cell Lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>Bcl-2 eXtra Large</i>
BH	<i>Bcl-2 Homology domain</i>
BID	<i>BH3 Interacting-domain Death agonist</i>
BIM	<i>Bcl-2-Interacting Mediator of cell death</i>
BOK	<i>Bcl-2-related Ovarian Killer</i>
CAD	<i>Caspase-Activated DNase</i>
CaMK	<i>Ca²⁺/CalModulin-dependent protein Kinase</i>

CARD	<i>CAspase Recruitment Domain</i>
CARMA3	<i>CARD and MAGUK domain-containing protein 3</i>
CBP/p300	<i>Cyclic AMP response element-Binding Protein</i>
Chk	<i>Csk Homologous Kinase</i>
CHRM	<i>CHolinergic Receptor, Muscarinic</i>
COX	<i>Cyclo-Oxygénase</i>
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding</i>
CREM	<i>cAMP Responsive Element Modulator</i>
CRTH2	<i>Chemoattractant Receptor of Th2 cells</i>
CXCR4	<i>C-X-C chemokine Receptor type 4</i>
DAG	<i>DiAcylGlycérol</i>
DD	<i>Death Domain</i>
DISC	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
DNA-PK	<i>DNA-dependent Protein Kinase</i>
DP	<i>Récepteur de la prostaglandine D₂</i>
EET	<i>Acide EpoxyEicosaTrienoique</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EP	<i>Récepteur de la prostaglandine E₂</i>
EPAC	<i>Exchange Protein Directly Activated by cAMP</i>
ERK	<i>Extracellular-signal-Regulated Kinase</i>
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
Fas	<i>Fibroblast ASsociated</i>
FasL	<i>Fas Ligand</i>
G1 (phase)	<i>Gap 1 phase</i>

GAPDH	<i>GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase</i>
GDP	Guanosine Di-Phosphate
GPCR	<i>G protein-coupled Receptor</i>
GRK	<i>G protein-coupled Receptor Kinase</i>
GSK-3 β	<i>Glycogen Synthase Kinase-3β</i>
GST	Glutathion S-Transférase
GTP	Guanosine Tri-Phosphate
HIF-1	<i>Hypoxia-Inducible Factor 1</i>
HTRA2	<i>High Temperature Requirement protein A2</i>
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
iCAD	<i>Inhibitor of Caspase-Activated DNase</i>
ICER	<i>Inducible cAMP Early Repressor</i>
I κ B α	Inhibiteur de N κ FB, α
IKK	<i>IκB Kinase</i>
IL	InterLeukine
IL-R	<i>IL Receptor</i>
IP	Récepteur de la prostacycline
IP ₃	Inositol tri-Phosphate
IRAK	<i>Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase</i>
JAK	<i>JAnus Kinase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
KO	<i>Knock Out</i>
LPA	<i>LysoPhosphatidic Acid</i>
LPS	LipoPolySaccharide
M3K	MKK Kinase (parfois également abrégée MKKK)

MAGUK	<i>Membrane-Associated GUanylate Kinase</i>
MALT1	<i>Mucosa-Associated Lymphoid Tissue lymphoma translocation protein 1</i>
MAP	<i>Mitogen-Activated Protein</i>
MAPK	MAP Kinase
MCL-1	<i>Myeloid Cell Leukemia sequence 1</i>
Mdm2	<i>Mouse Double Minute protein 2</i>
MKK	MAPK Kinase
NEMO	<i>NFκB Essential MOdulator</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor κB</i>
NHERF2	<i>Na⁺-H⁺ Exchanger Regulatory Factor 2</i>
NIK	<i>NFκB-Inducing Kinase</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
Nurr1	<i>NUclear Receptor-Related 1 protein</i>
PAFR	<i>Platelet-Activating Factor Receptor</i>
PARP	Poly(ADP Ribose) Polymérase
PDK1	<i>Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1</i>
PG	ProstaGlandine
PI3K	PhosphoInositide 3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-BisPhosphate
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PLA ₂	PhosphoLipase A ₂
PLC	PhosphoLipase C
PP2A	Protéine Phosphatase 2A

PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
PUMA	<i>p53 Upregulated Modulator of Apoptosis</i>
RANK	<i>Receptor Activator of NFκB</i>
Rho	<i>Ras HOMolog gene family</i>
S (phase)	Phase de synthèse de l'ADN
SMAC	<i>Second Mitochondrial Activator of Caspases</i>
TAK1	<i>TGF-β-Activated Kinase 1</i>
TAB2	<i>TAK1 Binding protein 2</i>
TCR	<i>T-Cell Receptor</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNFR	<i>TNF Receptor</i>
TM	Trans-membrane
TP	Récepteur du thromboxane A ₂
TRAF	<i>TNF Receptor Associated Factor</i>
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
TxA ₂	Thromboxane A ₂
TxS	Thromboxane Synthétase
TRAF	<i>TNF Receptor Associated Factor</i>
TRPC	<i>Transient Receptor Potential Cation channel</i>
XIAP	<i>X-linked IAP (aussi appelé IAP3)</i>

7. INTRODUCTION

Au sein d'un organisme vivant, la survie d'une cellule peut être aussi nocive que sa mort. À juste titre, les processus moléculaires régulant la prolifération cellulaire sont marqués par la redondance. Les voies de signalisation se chevauchent, interagissent entre elles et donnent lieu, au final, à un réseau d'une complexité déroutante. Au delà de la cellule individuelle, différents signaux coordonnent les activités de chaque tissu, organe et système afin de produire des phénotypes aussi divers que la croissance d'un embryon en adulte, la guérison de plaies, l'élimination d'infections bactériennes ou virales et même, la destruction de cellules cancéreuses. Lorsque ces processus échouent, des conséquences catastrophiques peuvent survenir. De la perte irrécupérable des tissus cardiaque ou cérébral, dans l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral, à l'envahissement complet des systèmes par des cellules tumorales, dans le cancer, la majorité des pathologies impliquent, à un moment ou à un autre, une régulation aberrante de la prolifération ou de la mort cellulaire.

Les travaux détaillés ici visent à élucider de nouveaux mécanismes par lesquels les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) parviennent à moduler l'apoptose dans différents types cellulaires.

7.1. L'apoptose

L'apoptose est une forme de mort cellulaire organisée où, par opposition à la nécrose, de l'énergie est investie afin de détruire de façon systématique les différentes composantes cellulaires et les emmagasiner dans des « corps apoptotiques » facilement phagocytés sans réaction inflammatoire associée. Le tout est exécuté selon une séquence d'évènements débutant généralement par une contraction de la cellule et une condensation de sa chromatine, suivi d'un

bourgeonnement extensif de la membrane plasmique (*blebbing*) culminant en une fragmentation complète de la cellule et de son noyau (Elmore, 2007). La figure 7.1 présente la progression d'un processus apoptotique dans des cellules adhérentes, tel que visualisé en microscopie à champ clair.

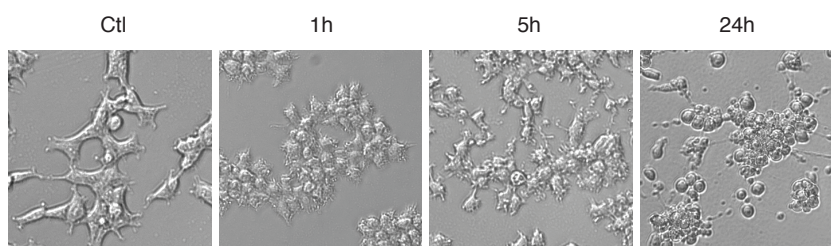


FIGURE 7.1 : Cinétique et morphologie du processus apoptotique

Microscopie à champ clair de cellules HeLa traitées à la staurosporine, un inhibiteur de protéines kinases induisant l'apoptose (Chae et al., 2000). Initialement étalées sur la surface de culture, les cellules se contractent puis se fragmentent, libérant des corps apoptotiques dans le milieu de culture. La durée du processus peut varier de quelques heures à quelques jours, selon la nature du stimulus induisant le processus apoptotique et le type cellulaire étudié.

7.1.1. Mécanismes initiateurs et effecteurs

7.1.1.1. Voie commune effectrice

Il est généralement admis que la morphologie classique de l'apoptose est le résultat de l'activité des caspases 3, 6 et 7 dites « exécutrices ». Les caspases (*Cystein ASPartyl-specific proteASE*) sont des protéases exprimées sous forme de zymogène et devant donc être préalablement activées. Cette activation se fera via la voie extrinsèque ou intrinsèque, dépendamment de la nature du stimulus initial. Dans les deux cas, les caspases exécutrices activées cliveront des substrats spécifiques, incluant les filaments d'actine (induisant une désorganisation du cytosquelette), la lamine nucléaire (induisant la contraction et la fragmentation du noyau), l'inhibiteur iCAD (permettant la translocation nucléaire

de l'endonucléase CAD induisant une fragmentation inter-nucléosomale de l'ADN) et la poly(ADP ribose) polymérase, PARP (normalement impliquée dans la réparation de l'ADN) (Elmore, 2007). Ensemble, ces phénomènes génèreront les caractéristiques morphologiques habituellement associées à l'apoptose.

D'autres mécanismes permettant d'effectuer une « mort cellulaire programmée » indépendamment de l'activité des caspases exécutrices ont également été décrits et incluent la translocation nucléaire d'AIF et de l'endo G, de même que la voie de la granzyme A (Elmore, 2007; Meier & Vousden, 2007). Ces phénomènes, tout comme les processus distincts d'autophagie et de « nécrose programmée », sont de plus en plus étudiés, mais ne seront toutefois pas discutés davantage ici.

7.1.1.2. Voie extrinsèque

La voie extrinsèque décrit l'activation des caspases exécutrices suite à un stimulus externe. Elle est initiée par l'activation de membres de la famille des récepteurs de TNF nommés « récepteurs de la mort ». Les récepteurs de la mort sont des protéines transmembranaires possédant, dans leur portion cytosolique, des domaines DD (*Death Domain*) permettant l'assemblage du complexe DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) comprenant des protéines adaptatrices et plusieurs molécules de pro-caspase 8 ou 10. La formation du DISC permet la dimérisation, l'activation, le trans-clivage puis le relargage des caspases qui le composent. Une fois activées, les caspases 8 et 10 peuvent cliver et activer à leur tour la caspase 3 et ainsi initier le processus apoptotique (Alberts et al., 2007; Boucher & Denault, 2012).

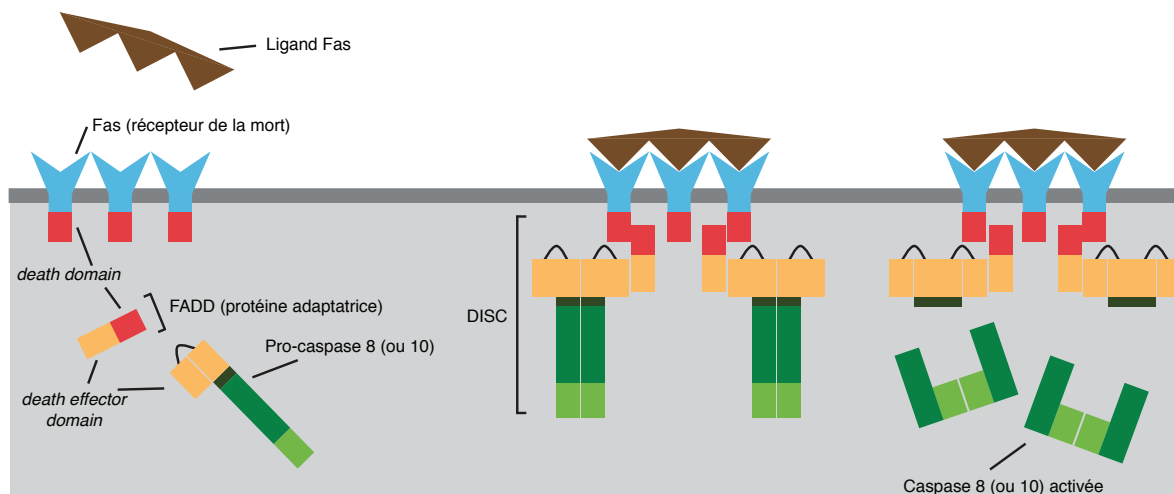


FIGURE 7.2 : Activation de la voie extrinsèque par les récepteurs de la mort

Le ligand Fas est une protéine transmembranaire exprimée à la membrane plasmique de certains leucocytes. Afin d'induire l'apoptose, le ligand Fas se lie à son récepteur trimérique sur la cellule cible et entraîne le recrutement de la protéine adaptatrice FADD et de pro-caspases. Le DISC est alors assemblé et permet l'activation des pro-caspases initiatrices 8 ou 10 qui iront à leur tour activer les caspases exécutrices (Schleich et al., 2012).

La voie extrinsèque est principalement exploitée par les cellules du système immunitaire, notamment certains lymphocytes T, les cellules NK, les macrophages et les cellules dendritiques. Ces différents acteurs expriment des ligands de récepteurs de la mort comme le TNF, FasL ou TRAIL et peuvent déclencher une réponse apoptotique dans les cellules ciblées lors, par exemple, de la détection d'une infection (Sayers, 2011).

Différents membres de la famille des récepteurs de TNF autres que les récepteurs de la mort modulent également la sensibilité de la voie extrinsèque. Les *decoy receptors* possèdent un domaine de liaison au ligand sans domaine DD et compétitionnent ainsi avec les récepteurs de la mort pour la liaison d'un ligand sans toutefois être apte à induire la formation du DISC et l'initiation de l'apoptose (Alberts et al., 2007). Certains récepteurs peuvent quant à eux lier des protéines TRAF (*TNFR-Associated Factor*) via un domaine conservé et activer d'autres voies

de signalisation, notamment les MAP kinases et la voie NFκB (Chaudhari et al., 2006) qui sera discutée plus loin. Globalement, le couple récepteur-ligand, la localisation du complexe (p. ex. internalisé vs à la membrane plasmique) et l'expression relative de différents partenaires protéiques à toutes les étapes signalétiques sont autant de facteurs influençant l'issue de l'activation réceptorielle (Boucher & Denault, 2012).

7.1.1.3. Voie intrinsèque

La voie intrinsèque décrit l'activation des caspases exécutrices par la cellule en réponse à la détection d'un problème interne quelconque (dommage à l'ADN, déplétion en nutriments, déplétion en oxygène, retrait de signaux de survie, etc.). L'activation de cette voie est caractérisée par la libération cytosolique de protéines normalement séquestrées dans l'espace inter-membranaire mitochondrial, notamment le cytochrome *c*. Au cytosol, le cytochrome *c* permet l'assemblage d'un complexe nommé apoptosome qui, à l'instar du DISC pour la voie extrinsèque, permet le recrutement et l'activation de caspases initiatrices (ici, la caspase 9) (Sayers, 2011).

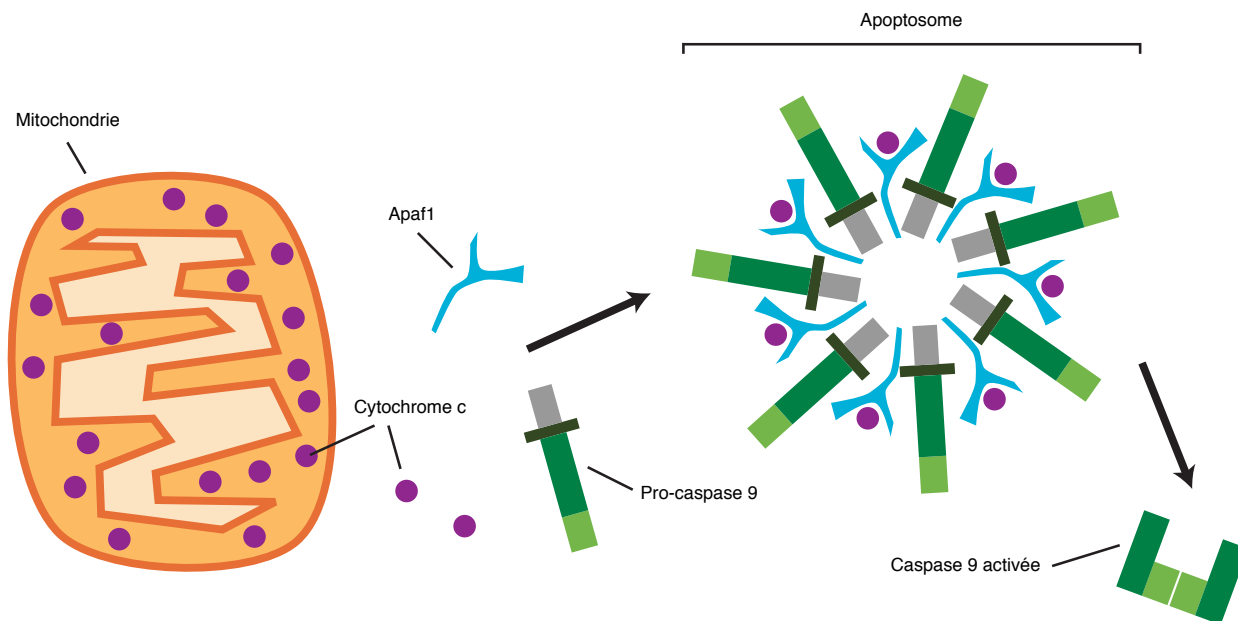


FIGURE 7.3 : Formation de l'apoptosome

L'apoptosome est un complexe constitué de sept molécules d'Apaf1, de cytochrome c et de pro-caspase 9 et permettant leur activation. Le cytochrome c est requis pour l'assemblage de l'apoptosome et est libéré de l'espace intermembranaire mitochondrial lors de l'activation de la voie intrinsèque.

La relâche de cytochrome c au cytosol dépend d'une perméabilisation de la membrane mitochondriale externe par des protéines appartenant à la famille des protéines Bcl-2. Le tableau 7.1 présente différents membres de la famille Bcl-2 divisés en trois catégories : les protéines Bcl-2 pro-apoptotiques, les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques et les protéines Bcl-2 à domaine BH3 uniquement. Les protéines pro-apoptotiques (BAX, BAK et BOK) semblent responsables de la perméabilisation de la membrane, possiblement suite à une oligomérisation (bien que ce modèle demeure controversé et que d'autres mécanismes aient également été proposés) (Danial, 2007). En temps normal, ces protéines sont toutefois séquestrées par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL) qui interfèrent avec leur oligomérisation. L'activation de protéines à domaine BH3 uniquement (BAD, BID) permet toutefois d'inhiber l'action des protéines anti-apoptotiques en compétitionnant avec BAX, BAK et BOK pour leur liaison, libérant

ainsi les protéines pro-apoptotiques et permettant leur oligomérisation et la perméabilisation subséquente de la membrane mitochondriale (Tait & Green, 2010).

Protéines Bcl-2 pro-apoptotiques	Protéines Bcl-2 anti-apoptotiques	Protéines ayant uniquement un domaine BH3
BOK BAK BAX Bcl-xS	Bcl-2 Bcl-xL Bcl-B Bcl-w BFL-1 MCL-1 A1 BOO	Bcl-Rambo Bcl-G BIM BID PUMA BMF BAD BIK HRK NOXA SPIKE

TABLEAU 7.1 : Classification des membres de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 possèdent toutes un domaine BH3 et sont classifiées selon leur effet sur l'apoptose et selon la présence de domaines supplémentaires (ex : BH1, BH2, BH4, TM). Les protéines en caractères gras représentent les membres les plus étudiés (Strasser, 2005; Danial, 2007).

L'équilibre entre les différentes familles de protéines Bcl-2 à la surface de la mitochondrie déterminera donc du sort de la cellule en permettant ou non le relargage du contenu inter-membranaire au cytosol. Chacun des membres de la famille Bcl-2 sera régulé individuellement par différentes voies de signalisation. Ainsi, par exemple, une activation de la protéine kinase Akt entraîne une phosphorylation de BAD et sa séquestration au cytosol par la protéine 14-3-3, alors que BIM sera activée lors de stress au réticulum endoplasmique et NOXA et PUMA seront surexprimées lors de la détection de dommages à l'ADN (Meier & Vousden, 2007). Cette organisation permet donc l'intégration, à la surface de la mitochondrie, de signaux provenant de pratiquement tous les systèmes cellulaires.

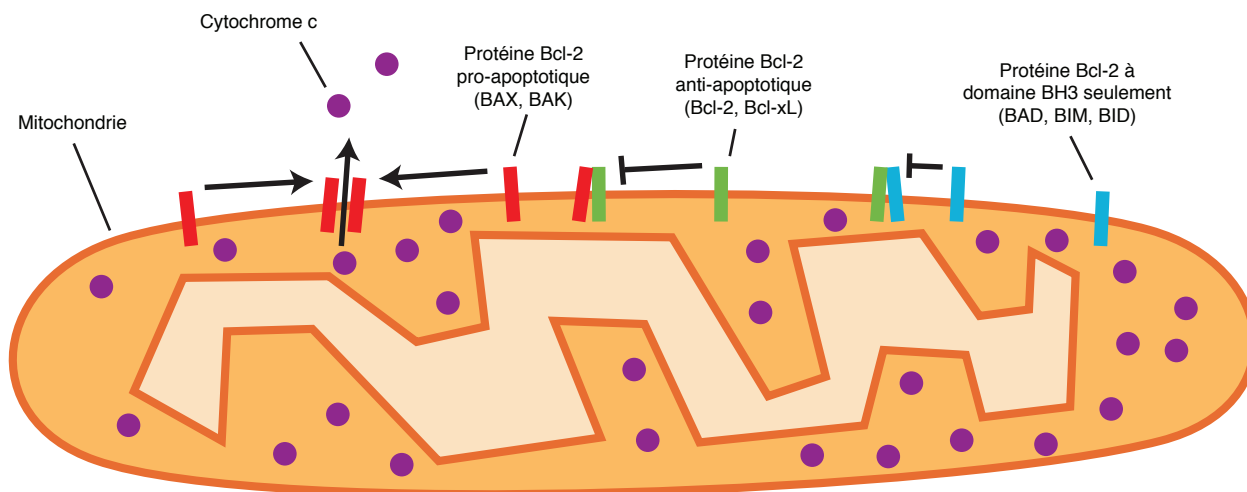


FIGURE 7.4 : Interaction entre les membres de la famille des protéines Bcl-2

Le mécanisme de perméabilisation de la mitochondrie par les protéines de la famille Bcl-2 n'est pas encore élucidé. Le modèle le plus en vogue propose que les membres pro-apoptotiques s'oligomériseraient pour former un pore permettant la translocation cytosolique du cytochrome *c*. Ces protéines seraient inhibées par les membres anti-apoptotiques eux-mêmes sous le contrôle des membres ne possédant qu'un domaine BH3.

Outre le cytochrome *c*, l'espace inter-membranaire mitochondrial contient plusieurs autres protéines contribuant également au processus de mort cellulaire. SMAC (*Second Mitochondrial Activator of Caspases*) est un inhibiteur puissant des IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*). Son relargage au cytosol suite à la perméabilisation mitochondriale potentialise grandement la réponse apoptotique. AIF et l'endo G sont deux autres facteurs également relâchés par la mitochondrie et sont aptes à induire une apoptose indépendamment de l'activité caspase, grâce à leur action directe sur l'ADN. Finalement, la perméabilisation elle-même entraîne une perte du potentiel mitochondrial interférant avec la production d'ATP par la chaîne de transport des électrons. Ceci résulte en une déplétion énergétique pouvant entraîner une nécrose secondaire si le processus apoptotique n'est pas complété dans un délai raisonnable.

7.1.1.4. *Étapes partagées*

Si une distinction franche entre les voies intrinsèque et extrinsèque est utile pour vulgariser les étapes menant au déclenchement du processus apoptotique, il est maintenant convenu que cette division est plutôt artificielle et qu'en réalité, les deux voies contribuent généralement simultanément au processus, indépendamment de par quelle voie il a été initialement enclenché. Certaines étapes signalétiques contribuent spécifiquement à cette coopérativité entre les deux voies. Ainsi, l'activation de la caspase 8, dans la voie extrinsèque, entraîne un clivage de la protéine cytosolique BID (protéine à domaine BH3 uniquement) qui transloque à la membrane mitochondriale et contribue à sa perméabilisation, activant ainsi la voie intrinsèque (Elmore, 2007). À l'inverse, la caspase 6 (une caspase exécutive pouvant être activée tant par la voie extrinsèque qu'intrinsèque) peut cliver et stabiliser la forme active de la caspase 8 (Boucher & Denault, 2012).

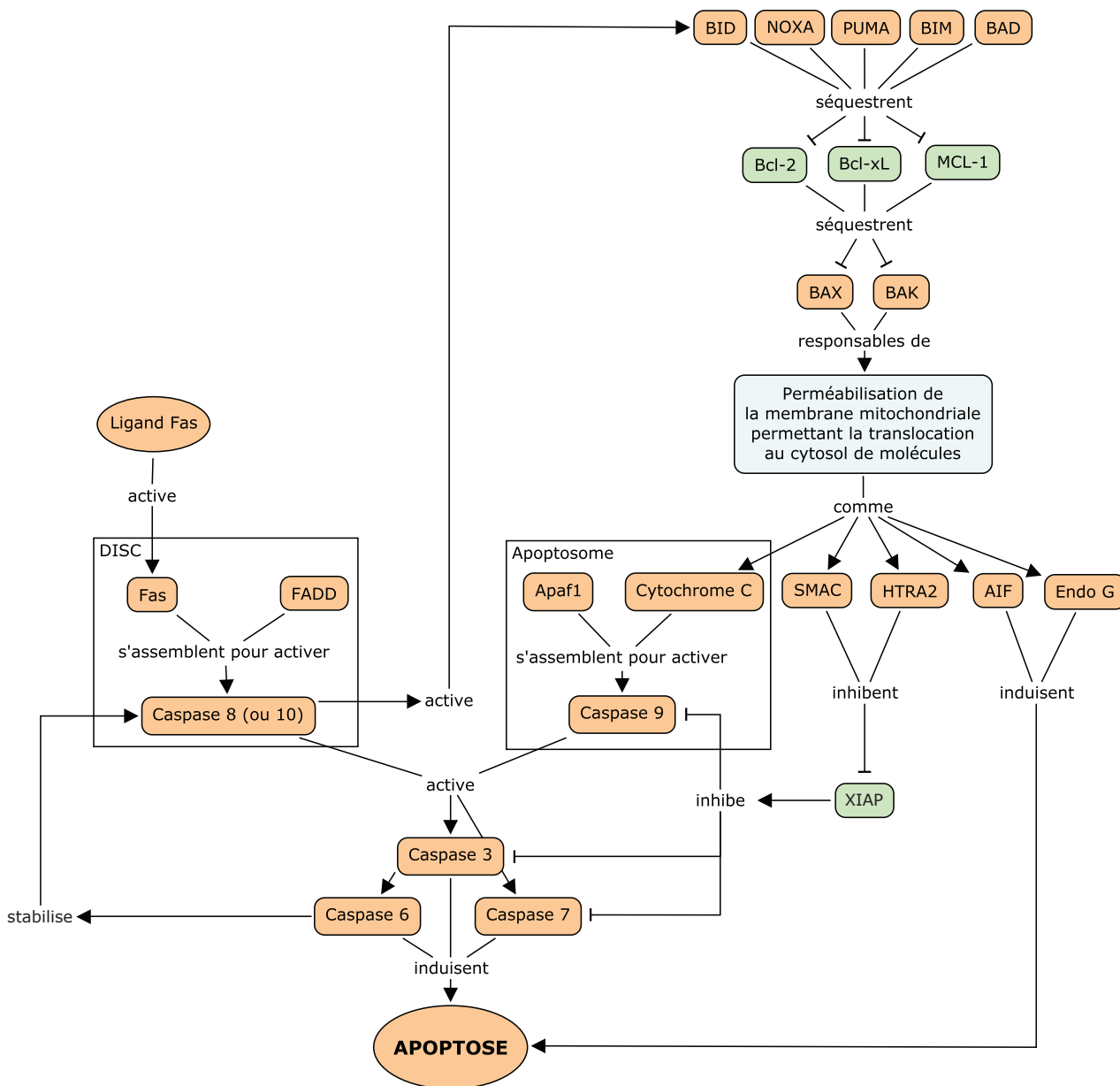


FIGURE 7.5 : Initiation et exécution de l'apoptose

Les voies extrinsèque et intrinsèque constituent deux cascades inter-reliées par lesquelles l'apoptose peut être initiée. La voie extrinsèque culmine en l'activation de la caspase 8 (ou 10) par le DISC (illustré ici avec le récepteur Fas), alors que la voie intrinsèque culmine en l'activation de la caspase 9 par l'apoptosome. La relâche cytosolique de différents facteurs mitochondriaux dans la voie intrinsèque permet également l'exécution d'un processus apoptotique indépendant de l'activité caspase. L'expression relative de chacune des protéines mentionnées ici est propre à chaque type cellulaire. Les protéines identifiées en orange sont généralement pro-apoptotiques, alors que celles identifiées en vert sont plutôt anti-apoptotiques.

Mentionnons en terminant que dans certaines situations, les voies intrinsèque et extrinsèque peuvent être complètement outrepassées. Un des exemples les mieux compris se produit lors de l'attaque d'une cellule ciblée par un lymphocyte T cytotoxique où le lymphocyte peut sécréter une protéine nommée perforine. La perforine est une protéine transmembranaire formant un pore dans la cellule cible et permettant l'incorporation d'enzymes fournies par le lymphocyte, incluant la granzyme B qui est suffisante pour activer les caspases exécutrices directement. (Elmore, 2007).

Combinées à la découverte de mécanismes permettant l'exécution d'une apoptose indépendante de l'activité caspase (Kroemer & Martin, 2005), ces observations témoignent de la complexité et de la redondance qui caractérisent les voies apoptotiques.

7.1.2. Mécanismes régulateurs

Chacun des membres des cascades de signalisation apoptotique peut être régulé de façon indépendante et spécifique. Au niveau de la voie intrinsèque, deux facteurs de transcription sont particulièrement impliqués dans le contrôle de la balance entre les différentes composantes : p53, dit « gardien du génome » (Lane, 1992) et NFκB, un acteur central de la réponse inflammatoire (Karin & Lin, 2002).

7.1.2.1. Voie p53

La protéine p53 n'est que très faiblement exprimée dans des cellules saines. Bien que sa synthèse semble relativement soutenue, p53 est immédiatement poly-ubiquitinyllée par la E3-ligase Mdm2 (*Mouse Double Minute protein 2*) entraînant sa dégradation protéasomale subséquente (Kruse & Gu, 2009). En situation de stress cellulaire (comme lors de la détection de dommages à l'ADN), différentes kinases dont ATM, ATR, DNA-PK et Chk1/Chk2 phosphorylent p53 sur ses

sérines 15 et 20, interférant avec l'interaction p53-Mdm2 et empêchant l'ubiquitinylation de la protéine. Le résultat de ces processus est une stabilisation de p53 et son accumulation nucléaire. Au noyau, p53 agit comme facteur de transcription pour différentes protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire et dans le processus de réparation de l'ADN. Initialement, une activation de p53 entraînera l'expression de p21 induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et empêchant la progression vers la phase S afin de permettre une réparation des dommages détectés. Si les dommages persistent et que p53 continue de s'accumuler, le programme transcriptionnel déviara vers des cibles distinctes incluant les protéines de la voie intrinsèque PUMA et NOXA qui déplaceront l'équilibre mitochondrial vers l'apoptose (Danial, 2007).

La stabilité de p53 est modulée par l'activité de Mdm2, elle-même régulée par la protéine ARF qui la séquestre et empêche son interaction avec p53 (Kruse & Gu, 2009). L'expression de ARF est normalement très faible, mais peut être augmentée de manière importante par différents stress oncogéniques (p. ex. lors d'une activation des ERK) via l'activation de ses facteurs de transcription Myc et E2F. Une activité plus faible de Mdm2 résulte en une mono-ubiquitinylation de p53 qui, au lieu de diriger la protéine vers la dégradation protéasomale, entraîne plutôt sa translocation cytoplasmique. À l'extérieur du noyau, p53 peut exécuter des fonctions indépendantes de son activité transcriptionnelle, incluant la séquestration des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2 et Bcl-xL) de même que la protection de BAK contre son inhibiteur MCL-1. Au final, la présence de p53 au cytoplasme promouvoit l'apoptose de façon importante (Green & Kroemer, 2009).

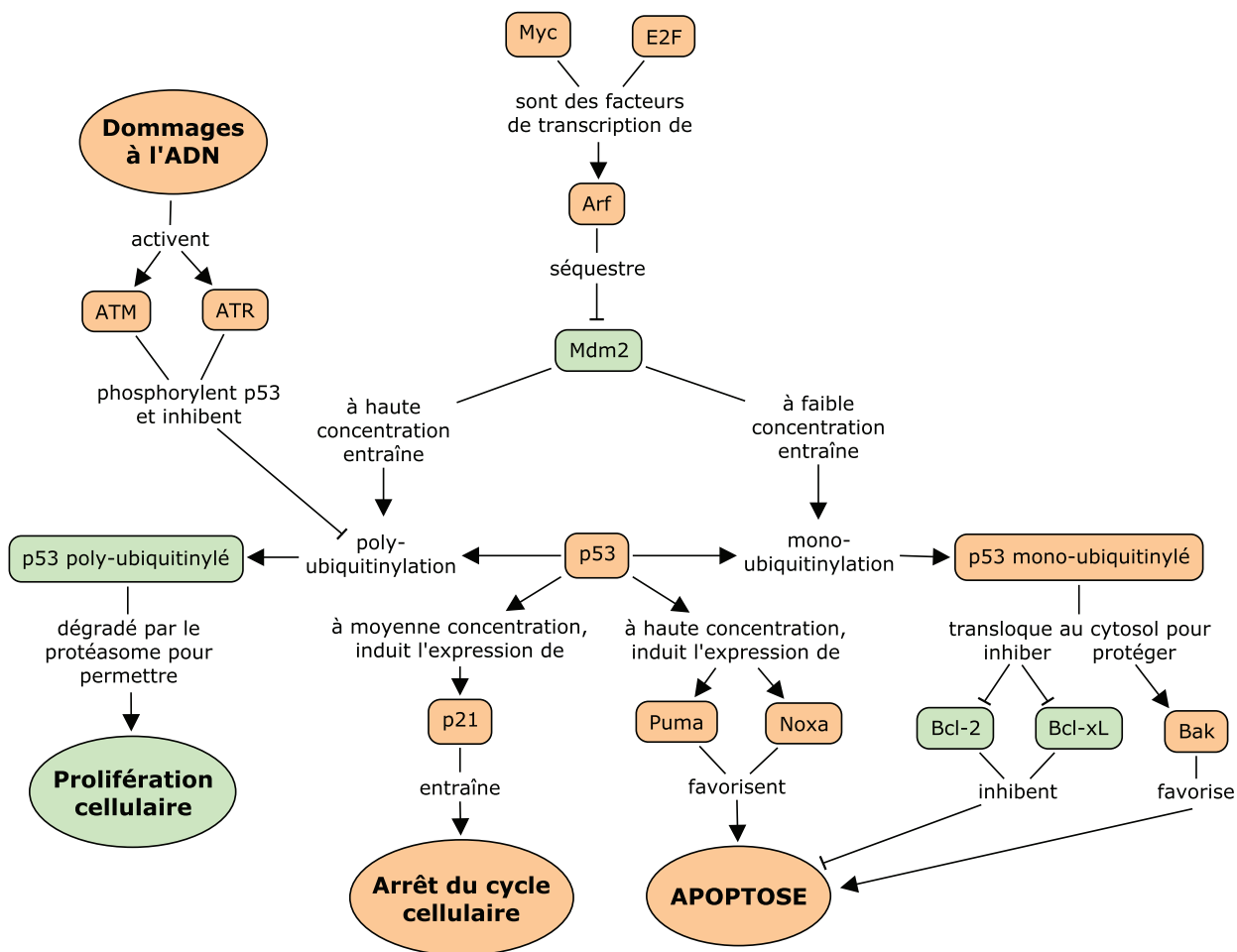


FIGURE 7.6 : Régulation et rôle de p53

L'expression de p53 entraîne l'arrêt du cycle cellulaire (via l'induction de p21) et, si prolongée, l'apoptose via la transcription de PUMA et NOXA, deux protéines de la voie intrinsèque. La stabilité de p53 est régulée par la E3-ligase Mdm2 qui, à forte expression, induit sa poly-ubiquitinylation et sa dégradation protéasomale. La détection de dommages à l'ADN entraîne une phosphorylation de p53 qui la protège de Mdm2. Mdm2 peut également être séquestrée par la protéine Arf contrôlée par les facteurs mitogéniques Myc et E2F. Lorsque les niveaux de Mdm2 diminuent, la poly-ubiquitinylation de p53 fait place à une mono-ubiquitinylation qui induit sa translocation cytosolique et permet des actions pro-apoptotiques indépendantes de la transcription (notamment la séquestration de Bcl-2 et Bcl-xL et la protection de BAK). Ces mécanismes se coordonnent pour maintenir l'intégrité du génome en permettant la réparation des cellules endommagées et en déclenchant le processus apoptotique si les dommages sont jugés irréparables. Les protéines identifiées en orange sont généralement pro-apoptotiques, alors que celles identifiées en vert sont plutôt anti-apoptotiques.

Le rôle central de p53 dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose est illustré de façon remarquable par l'observation de mutations entraînant sa dysfonction dans plus de 50% des cancers (Kruse & Gu, 2009). En étant au carrefour entre la vie et la mort, p53 contrôle non-seulement la destinée de la cellule qui l'exprime, mais également celle de l'organisme dont il fait partie.

7.1.2.2. Voie NF κ B

NF κ B (*Nuclear Factor κ B*) est un facteur de transcription activé en réponse à différents stimuli inflammatoires, tels des cytokines, des agents oxydants ou la reconnaissance d'antigènes. Le facteur actif est un hétéro-dimère de deux protéines, soit RelA/p65 et p50 (un complexe désigné canonique) ou RelB et p52 (un complexe désigné non-canonique). Les deux complexes induiront la transcription de différents gènes codant pour des cytokines, chemokines, récepteurs (dont IL-2, IL-6, IL-8, TNF α et le TCR), enzymes (5-lipoxygénase, COX-2), protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (dont Bcl-2 et Bcl-xL) de même que XIAP (Sarkar et al., 2008; Solt & May, 2008). En général, l'effet final d'une activation de NF κ B est une protection de la cellule contre les processus apoptotiques – une propriété d'ailleurs exploitée par plusieurs cancers (Sethi et al., 2008).

À l'état normal, les complexes NF κ B sont séquestrés au cytosol par des membres de la famille I κ B, dont le plus étudié est I κ B α . Pour activer la voie NF κ B canonique, un stimulus cellulaire doit entraîner la phosphorylation, puis la poly-ubiquitinylation K48 d'I κ B α et diriger ainsi cette protéine vers la dégradation protéasomale. La dissociation d'I κ B α du complexe NF κ B libère un signal de localisation nucléaire permettant à ce dernier de transloquer au noyau et d'activer la transcription des gènes ciblés (Solt & May, 2008). Pour activer la voie non-canonique, un stimulus cellulaire doit plutôt entraîner le clivage de p100 en p52. À l'état basal, non-seulement l'expression de p52 est-elle très faible, mais le

précurseur p100 a également une fonction similaire à I κ B α et séquestre RelB au cytosol, réprimant donc doublement l'activité du complexe non-canonique (S.-C. Sun, 2011).

Des récepteurs distincts mèneront à une activation de NF κ B via des voies de signalisation distinctes. Certains récepteurs favoriseront une activation canonique (p. ex. TLR, TNFR, TCR), alors que d'autres favoriseront une activation non-canonique (p. ex. RANK, CD40, LT β R). Dans tous les cas, ces divers mécanismes convergeront vers l'activation du complexe IKK (*I κ B Kinase*), la kinase responsable de la phosphorylation menant à l'ubiquitinylation puis la dégradation d'I κ B, de même qu'au clivage de p100 en p52 (S.-C. Sun, 2011). Le complexe IKK est constitué de deux sous-unités catalytiques (IKK α et IKK β) et d'une sous-unité régulatrice (NEMO, *NF κ B Essential MOdulator*). Afin d'être actif, l'une des sous-unités catalytiques doit être phosphorylée (IKK β par TAK1 dans la voie canonique ou IKK α par NIK dans la voie non-canonique) (Solt & May, 2008) et NEMO doit subir une poly-ubiquitinylation K63 par TRAF6 (pour la voie canonique) (Fraser, 2008). La figure 7.7 présente un résumé schématique de la régulation de NF κ B à partir d'IKK.

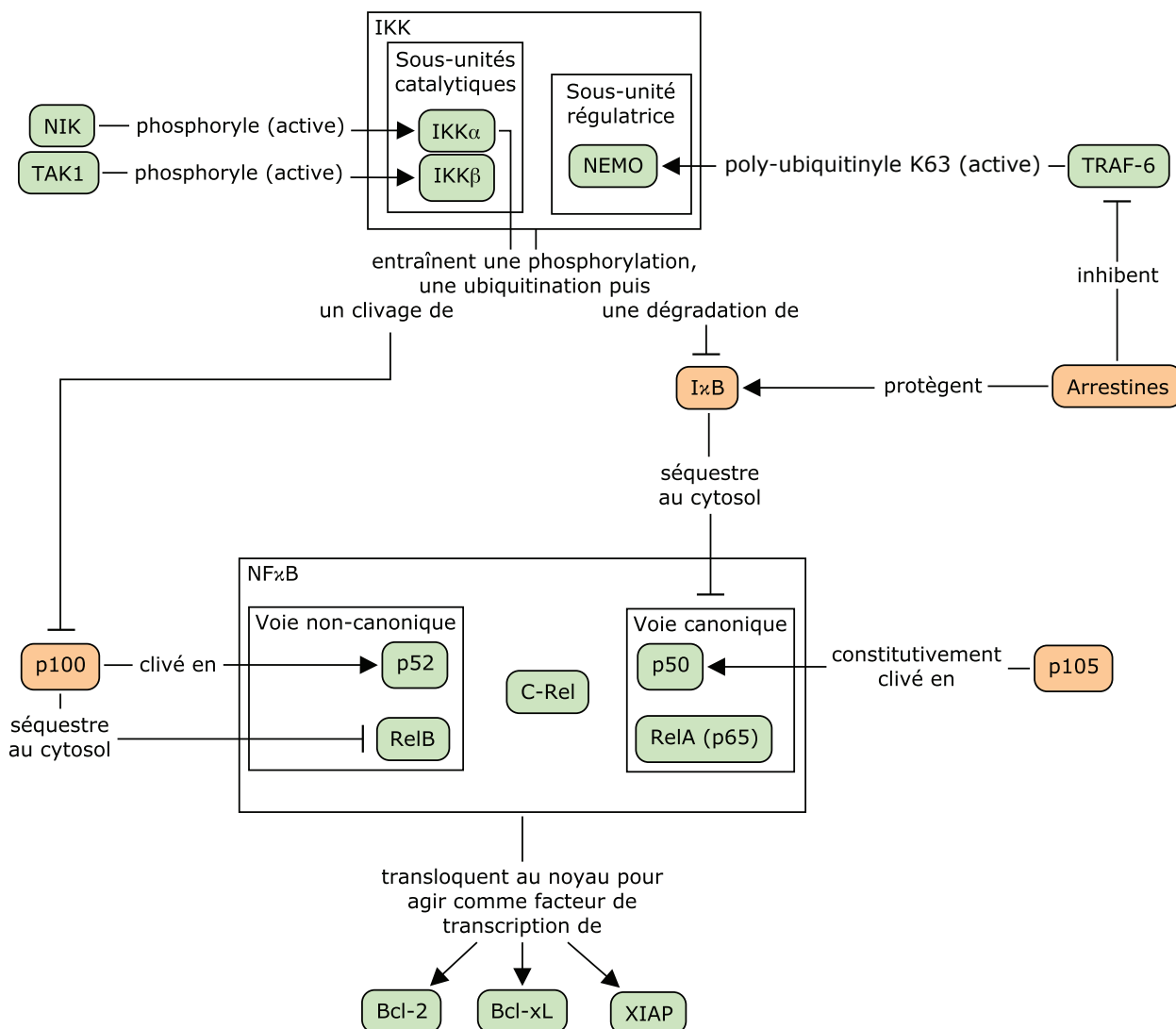


FIGURE 7.7 : Régulation de NFκB par le complexe IKK

Le facteur de transcription NFκB contrôle l'expression de différentes protéines globalement anti-apoptotiques. NFκB est séquestré au cytosol par IκB dont la stabilité est régulée par le complexe IKK. Les protéines identifiées en orange sont généralement pro-apoptotiques, alors que celles identifiées en vert sont plutôt anti-apoptotiques.

En amont du complexe IKK, les mécanismes menant à l'activation de NFκB se multiplient de façon impressionnante. Dans le cadre de nos travaux, le rôle des TRAF (*TNF Receptor-Associated Factor*) mérite une attention particulière. Six protéines, nommées TRAF1 à TRAF6, font partie de cette famille dont la caractéristique principale est la présence d'un domaine TRAF C-terminal médiant

diverses interactions protéiques. À l'exception de TRAF1, tous les membres possèdent également un domaine RING N-terminal suivi de plusieurs domaines « doigt de zinc » conférant, ensemble, une activité E3 ubiquitine-ligase (Chen, 2005). Le modèle actuel propose que, suite à une stimulation réceptorielle, TRAF2 et/ou TRAF5 (dans le cas de la famille des récepteurs de TNF) ou TRAF6 (dans le cas de IL-1R ou des GPCR de LPA) sont recrutés dans un complexe oligomérique au niveau du récepteur qui active leur fonction ligase et entraîne leur auto-poly-ubiquitylation K63. La chaîne d'ubiquitine est alors reconnue par différentes protéines, notamment TAB2 (*TAK1 Binding protein 2*) qui s'associera au TRAF et lui présentera son partenaire TAK1 (*TGF- β -Activated Kinase 1*). TAK1 sera ensuite poly-ubiquitylée K63 par le TRAF, ce qui activera la kinase et lui permettra de phosphoryler IKK β , menant, ultimement, à l'activation de la voie canonique de NF κ B (Chen, 2005; W. Sun & Yang, 2010). La figure 7.8 illustre l'activation du complexe IKK par les TRAFs.

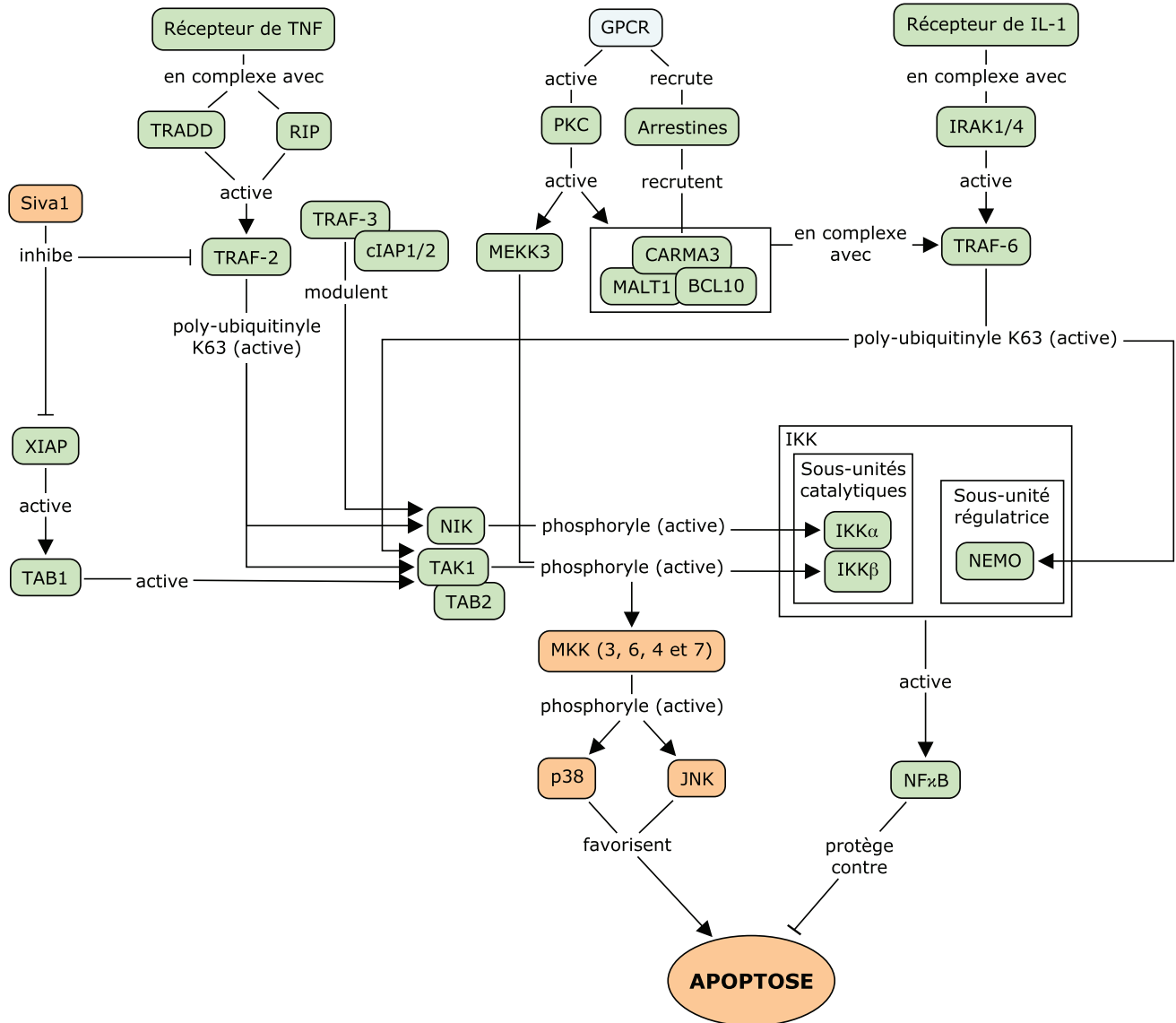


FIGURE 7.8 : Régulation du complexe IKK par les TRAFs

Les TRAFs sont activés suite à une stimulation réceptorielle qui permet leur auto-poly-ubiquitinylation K63. Les chaînes d'ubiquitine permettent le recrutement de kinases qui, une fois ubiquitinyllées à leur tour, pourront activer le complexe IKK en le phosphorylant. En plus d'activer IKK, la kinase TAK1 peut activer les cascades de MAPK p38 et JNK favorisant toutes deux l'apoptose. La balance entre la signalisation de TAK1 vers les MAPK et NFκB peut être régulée par plusieurs facteurs incluant XIAP. Les protéines identifiées en orange sont généralement pro-apoptotiques, alors que celles identifiées en vert sont plutôt anti-apoptotiques.

La protéine TAK1 activée peut également phosphoryler et activer d'autres substrats, dont la MAP kinase kinase MKK6 contrôlant JNK et p38 (Chen, 2005). Tout comme NFκB, les cascades JNK et p38 contribuent à la réponse cellulaire à différents stress, mais semblent plutôt diriger la cellule vers la différenciation et/ou l'apoptose (Keshet & Seger, 2010). Les voies NFκB, JNK et p38 seront activées dans des proportions différentes selon le stimulus initial et le type cellulaire. Plusieurs autres facteurs modulant cet équilibre ont également été identifiés et incluent l'expression relative de TRAF2 par rapport à TRAF5, de même que l'inhibiteur de caspase XIAP (signalant vers JNK par une action sur TAK1, mais dont la l'activité E3 ligase permet également l'activation de NFκB) (Resch et al., 2009).

Ensemble, les différentes voies discutées plus haut établissent, à l'intérieur de la cellule, un environnement plus au moins favorable à l'exécution du processus apoptotique. Alors que les multiples systèmes contrôlés par p53 induiront, dans différentes mesures, la production et l'activation de composantes nécessaires à l'initiation et à l'exécution de l'apoptose (BAX, PUMA, NOXA, p53 cytosolique, etc.), d'autres signaux médiés par la voie NFκB induiront la production de composantes qui augmenteront la tolérance cellulaire aux stimuli pro-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, IAPs, etc.). Comme la discussion précédente le démontre, toutes ces protéines sont intégrées dans des réseaux de signalisation d'une complexité et d'une redondance remarquables, probablement justifiées par les conséquences dramatiques qu'une dérégulation de l'apoptose peut entraîner.

7.1.3. Rôles physiologiques

Au sein de l'organisme normal, l'apoptose répond à plusieurs besoins distincts (Elmore, 2007). Dans l'embryon, le développement des systèmes nerveux et immunitaire passe par la production d'un nombre important de cellules qui sont progressivement éliminées par apoptose afin de ne conserver que celles ayant

atteint un niveau de fonctionnalité adéquat au sein du système. Plus tard, chez l'enfant et l'adulte, l'apoptose permet de gérer les différentes populations clonales du système immunitaire lors d'infections. L'apoptose est nécessaire au remodelage des tissus cicatriciels, à l'atrésie du follicule post-ovulatoire chez la femme en âge de procréer et à l'atrophie de la glande mammaire chez la femme cessant l'allaitement. Tout au long de la vie, l'apoptose permet d'éliminer les cellules endommagées tant par des insultes infectieuses, chimiques ou physiques que par des anomalies génétiques aléatoires apparaissant au fil des divisions cellulaires.

Le processus apoptotique sera déclenché par des voies différentes dépendamment de la « raison » pour laquelle l'apoptose est nécessaire. Ainsi, l'homéostasie du système immunitaire dépendra surtout de la voie extrinsèque, alors que le maintien de l'intégrité génomique sera plutôt médié par la voie intrinsèque. Tel que discuté plus haut, les deux voies sont intimement reliées et la susceptibilité d'une cellule à entrer en apoptose sera différente selon qu'elle réside à l'intérieur d'un tissu sain à renouvellement rapide (comme une muqueuse) ou à l'intérieur d'un processus inflammatoire ou ischémique dans un tissu non-renouvelable (comme le muscle cardiaque ou le cerveau).

7.1.4. Rôles pathologiques

Il est maintenant apprécié que l'apoptose est impliquée, à un niveau ou à un autre, dans la majorité des processus pathologiques (Elmore, 2007). Pour deux classes générales d'affections médicales, le rôle de l'apoptose est particulièrement intéressant dans le contexte des travaux présentés ici.

7.1.4.1. Cancer

Le cancer est un état de prolifération cellulaire soutenu avec invasion des tissus adjacents et colonisation des tissus éloignés par un processus de métastatisation. Bien que plusieurs anomalies simultanées soient nécessaires à la genèse d'un phénotype cancéreux, l'évasion de l'apoptose est une condition *sine qua non* (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011). Plusieurs stratégies employées par les cellules cancéreuses ont été rapportées. Parmi les mieux comprises, notons la perte de fonctionnalité de p53 (rendant la cellule insensible aux dommages génomiques accumulés au fil des divisions cellulaires) (Hanahan & Weinberg, 2011) et la surexpression de Bcl-2 (protégeant de façon générale contre tous les stimuli tentant d'activer la voie intrinsèque) (Elmore, 2007).

Le traitement du cancer est un défi de taille où l'intervention doit non-seulement être efficace pour éliminer complètement les cellules cancéreuses, mais également suffisamment spécifique au cancer pour épargner les cellules saines des autres tissus. Classiquement, la spécificité est obtenue soit en ciblant physiquement les cellules cancéreuses (p. ex. en enlevant chirurgicalement la tumeur ou en la visant directement au moyen de radiothérapie), soit en administrant de façon systémique un agent ciblant la prolifération cellulaire (p. ex. en endommageant l'ADN, en interférant avec le cytosquelette ou en inhibant la production de métabolites essentiels). Si la prolifération est effectivement une caractéristique commune à tous les cancers, les chimiothérapies ciblant la prolifération dépendent généralement du processus apoptotique pour induire leur toxicité – processus auquel la majorité des cancers sont également résistants. La cisplatine, par exemple, agit en générant des dommages à l'ADN détectés par p53. Conséquemment, la fonctionnalité de p53 est un fort prédicteur de la réponse à ce traitement et plusieurs cancers y sont résistants (ou le deviennent après quelques cycles) (Köberle et al., 2010).

L'avancement important des connaissances quant aux mécanismes régulateurs de l'apoptose permet maintenant le développement d'agents agissant en aval des anomalies rencontrées dans la plupart des cellules tumorales. Beaucoup d'espoir repose aujourd'hui sur des molécules agissant de manière analogue aux protéines à domaine BH3 uniquement ou à des mimétiques de SMAC qui permettraient d'activer des étapes de la cascade initiatrice de l'apoptose beaucoup plus proche de l'activation des caspases que les stratégies actuelles agissant sur l'ADN ou différents métabolites (Cotter, 2009). Dans tous les cas, les cancers de différents patients, même s'ils originent du même organe, sont extrêmement diversifiés et la personnalisation du traitement en fonction des anomalies moléculaires présentées par chaque cancer représente une autre approche prometteuse reposant, elle aussi, sur une meilleure compréhension des mécanismes régulant l'initiation et l'exécution de l'apoptose (ASCO, 2011).

7.1.4.2. *Ischémie*

L'ischémie est un état pathologique dans lequel l'apport sanguin est insuffisant pour subvenir aux besoins du tissu affecté. Deux exemples cliniques fréquents sont l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral, tous deux généralement secondaires à l'occlusion d'un vaisseau sanguin par un thrombus. Si l'ischémie soutenue était classiquement associée à une mort cellulaire nécrotique, de plus en plus d'évidences supportent un rôle important et sous-estimé de l'apoptose dans le processus. Une hypothèse avancée serait que l'hypoxie pourrait induire des lésions enclenchant un processus apoptotique qui serait exécuté lors du retour énergétique suite à la reperfusion (Freude et al., 2000). La nécrose surviendrait dans les cellules incapables de mener l'apoptose à terme, probablement lorsque la déplétion énergétique est trop sévère. Différents traitements expérimentaux ciblant notamment les caspases et les protéines de la famille Bcl-2 ont déjà démontré une certaine efficacité dans la réduction des conséquences fonctionnelles de l'infarctus et témoignent certainement de la

contribution sous-estimée de l'apoptose à cette classe de pathologies (Hochhauser et al., 2003; Elmore, 2007).

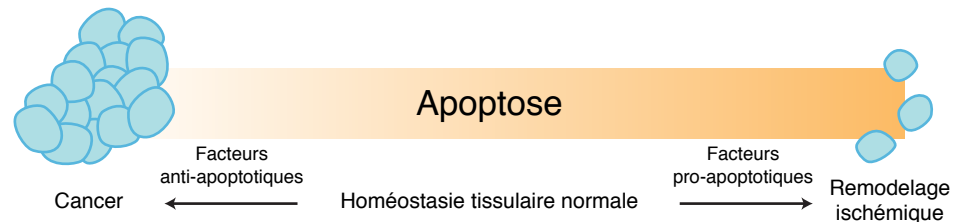


FIGURE 7.9 : Implications pathologiques de l'apoptose

L'apoptose est nécessaire au maintien de l'homéostasie tissulaire. Tant son insuffisance que son excès peuvent contribuer à différents processus pathologiques.

Tant par son insuffisance (comme dans le cancer) que par son excès (comme dans l'ischémie), l'apoptose est un processus impliqué dans plusieurs pathologies humaines. Si cette notion permet aujourd'hui d'envisager l'usage de modulateurs des voies apoptotiques comme traitement adjuvant aux thérapies classiques, beaucoup reste encore à faire avant de comprendre avec précision quelles voies sont spécifiquement responsables de l'apoptose au sein de chaque pathologie et, de façon plus globale, quels facteurs et mécanismes en permettent la coordination au niveau tissulaire et systémique.

7.2. Les prostanoïdes

Les prostanoïdes constituent une famille de médiateurs lipidiques dérivés de l'acide arachidonique et agissant comme autacoïdes. Sécrétés par pratiquement toutes les cellules du corps humain, ils contribuent à la synchronisation locale de phénotypes aussi divers que la vasoconstriction, l'inflammation et les contractions utérines (Narumiya, 2009).

7.2.1. Synthèse

Les prostanoides ne sont pas emmagasinés dans la cellule, mais bien produits sur demande par une cascade de réactions enzymatiques schématisée à la figure 7.10 et dont l'étape limitante est la synthèse de l'acide arachidonique (Narumiya et al., 1999).

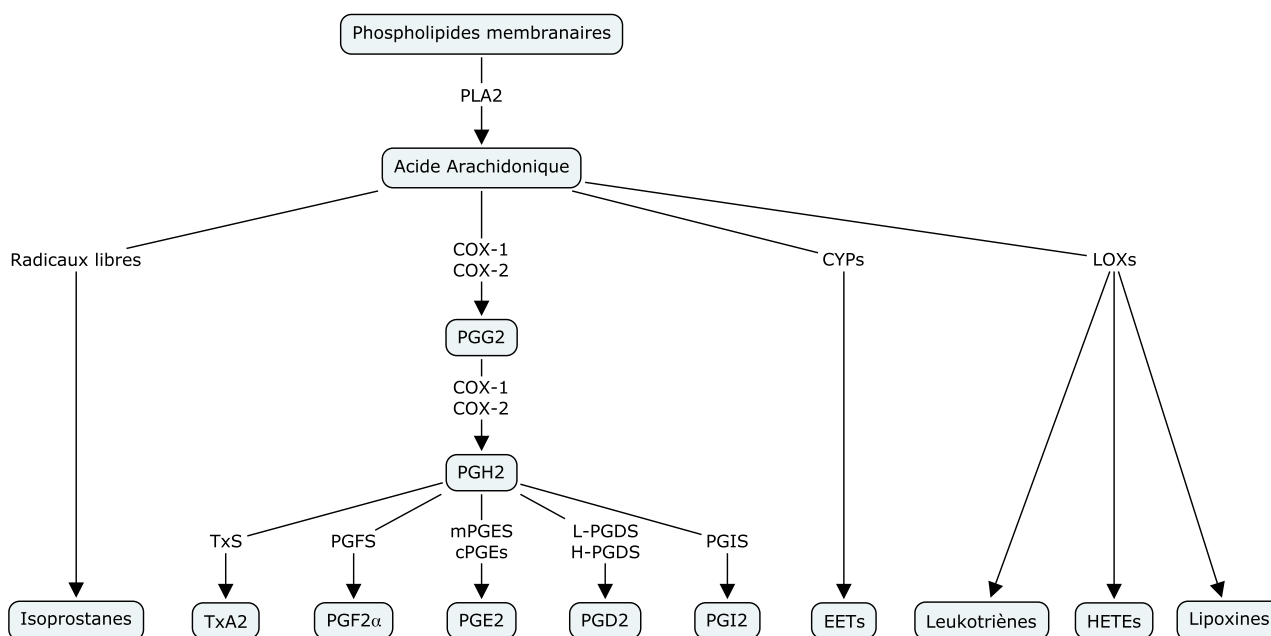


FIGURE 7.10 : Métabolites de l'acide arachidonique

Les prostanoides sont issus de la conversion de l'acide arachidonique par l'action séquentielle des cyclo-oxygénases (COX) et de différentes synthétases. Chacun de ces métabolites possède des propriétés biologiques distinctes et agit sur différents récepteurs. Les lipoxygénases (LOXs) et le cytochrome P450 (CYP) constituent deux autres classes d'enzymes pouvant générer des métabolites actifs. L'acide arachidonique peut également être dégradé de façon non-enzymatique par des attaques de radicaux libres entraînant la formation d'isoprostanes.

L'acide arachidonique est produit par la famille des phospholipases A_2 (PLA_2) à partir de phospholipides membranaires (notamment le phosphatidylcholine et le phosphatidyléthanolamine). Suite à sa synthèse, ce produit est immédiatement

métabolisé soit par les cyclo-oxygénases (COX) (menant aux prostanoides), soit par les lipoxigénases (LOXs) (menant aux leukotriènes), soit par le cytochrome P450 (menant vers, entre autres, l'acide époxyéicosatriénoïque (EET)), soit de façon non-enzymatique par des attaques aux radicaux libres (menant aux isoprostanes) (Brunton et al., 2005).

Dans la voie des prostanoides, la COX transforme l'acide arachidonique d'abord en prostaglandine (PG) G_2 grâce à son activité cyclo-oxygénase, puis en PGH_2 grâce à son activité hydro-péroxydase. Ce produit est ensuite transféré à une synthétase qui produira le prostanoid final (PGD_2 , PGE_2 , PGF_2 , PGI_2 ou thromboxane A_2 (TXA_2)). L'expression des différentes synthétases et leur couplage aux isoformes de la COX est relativement spécifique, permettant ainsi la production préférentielle d'un ou deux prostanoides majeurs pour chaque type cellulaire. Ainsi, les plaquettes produisent surtout du TXA_2 dérivé de la COX-1, alors que les macrophages activés produisent plutôt de la PGE_2 et du TXA_2 dérivés de la COX-2 (Brunton et al., 2005). De cette façon, les prostanoides permettent la transmission de messages chimiques entre les différentes cellules avoisinantes en réponse à différents stimuli et coordonnent ainsi le phénotype au niveau tissulaire (Narumiya, 2009).

7.2.2. Les prostanoides comme cibles thérapeutiques

La synthèse des prostanoides est ciblée pharmacologiquement dans le traitement de plusieurs pathologies. Spécifiquement, des inhibiteurs des COX sont efficaces comme anti-inflammatoires (p. ex. ibuprofène, naproxène, célécoxib), de même que comme tocolytiques (p. ex. indométacine). À faible dose, l'acide acétylsalicylique, un autre inhibiteur de COX, est utilisé comme agent anti-plaquettaire en prévention secondaire de la maladie coronarienne athérosclérotique. Des analogues de prostaglandines peuvent également être administrés directement pour maintenir la circulation sanguine chez des nouveau-nés atteints de

malformations cardiaques (p. ex. alprostadil) ou comme agents accélérant la maturation du col de l'utérus lors de procédures d'induction du travail obstétrical (p. ex. misoprostol, dinoprostone) (Kliegman et al., 2005; DeCherney et al., 2006).

Plusieurs évidences épidémiologiques recueillies auprès de patients atteints de maladies inflammatoires chroniques suggèrent que l'usage à long terme d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens, dont la cible la mieux comprise constitue l'inhibition des COX, pourrait réduire l'incidence de certaines néoplasies colorectales, oesophagiennes, pulmonaires et vésicales (D. Wang & Dubois, 2006). Ces observations ont déclenché un intérêt considérable dans l'usage d'inhibiteurs de COX en prévention primaire du cancer de même que comme adjuvants aux chimiothérapies conventionnelles. Il est maintenant apprécié que l'équilibre des prostaglandines est visiblement modifié dans plusieurs tumeurs et que la PGE₂ et le TXA₂ sont fréquemment augmentés, alors que la PGI₂ tend plutôt à être réprimée (D. Wang & Dubois, 2006; Cathcart et al., 2010; Ekambaram et al., 2011). Malheureusement, l'inhibition à long terme des COXs est associée à un profil d'effets secondaires inacceptables (notamment une toxicité gastro-intestinale pour les inhibiteurs non-sélectifs et une augmentation des incidents cardiovasculaires pour les inhibiteurs sélectifs à COX-2) qui, combiné à un bénéfice clinique mince ou inexistant, a grandement diminué l'utilité clinique réelle de cette classe de médicaments malgré une rationnelle théorique solide (Lilenbaum et al., 2006; Khan & Lee, 2011). Il est espéré qu'une inhibition plus sélective des prostanoïdes spécifiquement en cause dans le phénotype pro-cancéreux permettra éventuellement d'améliorer l'efficacité des traitements anti-cancéreux sans induire d'avantage d'effets secondaires. Par ailleurs, si les prostanoïdes et les leukotriènes sont les métabolites de l'acide arachidonique les mieux compris, des fonctions biologiques pour les isoprostanes et l'EET, autrefois considérés comme des métabolites inactifs, commencent à émerger et pourraient fournir des cibles additionnelles pour des interventions pharmacologiques (Comporti et al., 2008).

7.3. Les récepteurs couplés aux protéines G

Les métabolites de l'acide arachidonique semblent agir via des récepteurs appartenant à la famille de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Les GPCR constituent la plus grande classe de récepteurs membranaires avec 1200-1300 membres chez l'humain occupant ainsi 3-4% du génome (Tuteja, 2009). Ces récepteurs peuvent détecter des signaux aussi divers que la lumière, des odeurs ou des hormones et, en réponse, activer de multiples voies de signalisation intra-cellulaire.

Les GPCR sont composés de sept domaines transmembranaires séparés par des régions hydrophiles formant trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. Des domaines N- et C-terminaux hydrophiles complètent finalement la structure. Ensemble, les domaines extracellulaires de même que l'intérieur de la cavité centrale formée par les domaines transmembranaires servent à la reconnaissance du ligand. La liaison de ce dernier entraîne des changements conformationnels au niveau des domaines transmembranaires induisant une réorganisation des domaines cytoplasmiques. Ceux-ci sont à leur tour responsables de la liaison de partenaires intracellulaires dont l'activation initiera la signalisation vers différents effecteurs plus ou moins spécifiques (Yeagle & Albert, 2007). La figure 7.11 illustre la structure générale des GPCR.

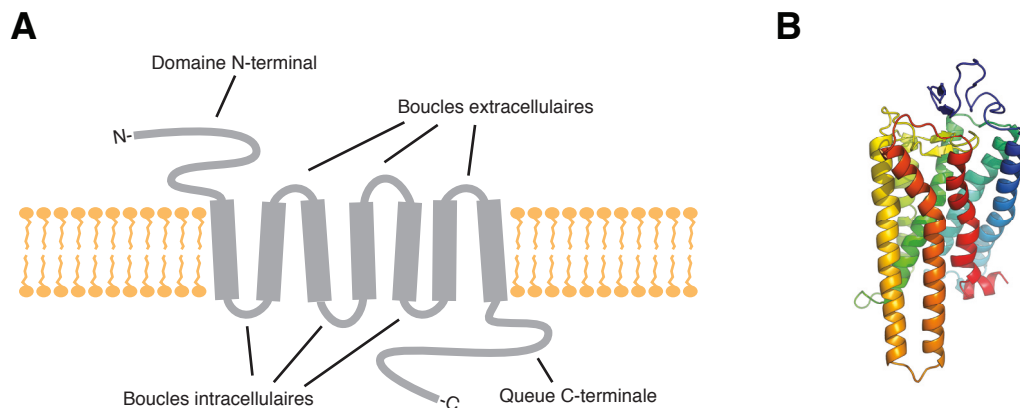


FIGURE 7.11 : Structure générale des GPCR

Les GPCR sont constitués de sept domaines transmembranaires reliés par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. **(A)** Les extrémités N- et C-terminales forment des domaines respectivement extra- et intracellulaires peu structurés. Le récepteur est intégré aux membranes et permet la transduction d'un signal détecté d'un côté vers des effecteurs situés de l'autre. **(B)** Structure cristalline de l'opsine (pdb 3DQB).

7.3.1. Mécanismes signalétiques

La signalisation des GPCR découle classiquement de l'activité des protéines G hétéro-trimériques, bien que de nouvelles voies indépendantes des protéines G soient maintenant caractérisées (Bockaert et al., 2010).

7.3.1.1. Signalisation classique par les protéines G

Les protéines G sont constituées de trois sous-unités identifiées α , β et γ . À l'état basal, la sous-unité α est liée à une molécule de GDP et associée avec β et γ . L'activation d'un GPCR entraîne le recrutement des protéines G au récepteur et cette liaison induit la dissociation du GDP lié à α . Ce GDP est immédiatement remplacé par une molécule de GTP, dont la présence induit une séparation d' α du couple $\beta\gamma$. Les deux complexes ainsi libres iront par la suite activer différents effecteurs dont l'identité dépend de plusieurs facteurs incluant, entre autres, l'isoforme de protéine G activée (Alberts et al., 2007).

Différents isoformes de la sous-unité α ont été décrits et sont séparés en familles selon les effecteurs qu'ils ciblent. Ainsi, α_s entraîne une activation de l'adénylyl cyclase, alors qu' α_i entraîne une inhibition de la même enzyme. L'adénylyl cyclase est responsable de la conversion d'ATP en AMP cyclique, un co-facteur essentiel à la fonction de plusieurs protéines, notamment PKA et le facteur de transcription CREB. Les membres de la famille $\alpha_{12/13}$ activeront plutôt la protéine Rho et seront impliqués dans la réorganisation du cytosquelette via une action sur l'actine. Finalement, la famille α_q entraînera quant à elle une réponse calcique via l'activation de la phospholipase C β (PLC β) clivant le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP $_2$) membranaire en inositol triphosphate (IP $_3$) et diacylglycérol (DAG). L'IP $_3$ activera son récepteur à la surface du réticulum endoplasmique qui permettra la sortie de calcium du réticulum vers le cytosol. Le DAG, de son côté, activera d'autres effecteurs, dont la PKC, certains canaux cationiques de la famille TRPC de même que différentes composantes impliquées dans la synthèse de prostaglandines. Tout comme α_q , le couple $\beta\gamma$ semble également apte à activer PLC β , quoi qu'avec une cinétique beaucoup plus lente. À l'instar des sous-unités α , une quantité importante d'isoformes est observée pour les sous-unités β et γ , bien que les implications d'une telle diversité soient moins bien comprises. La figure 7.12 résume de façon non-exhaustive certaines des cascades classiques de signalisation médiée par les protéines G (Woehler & Ponimaskin, 2009).

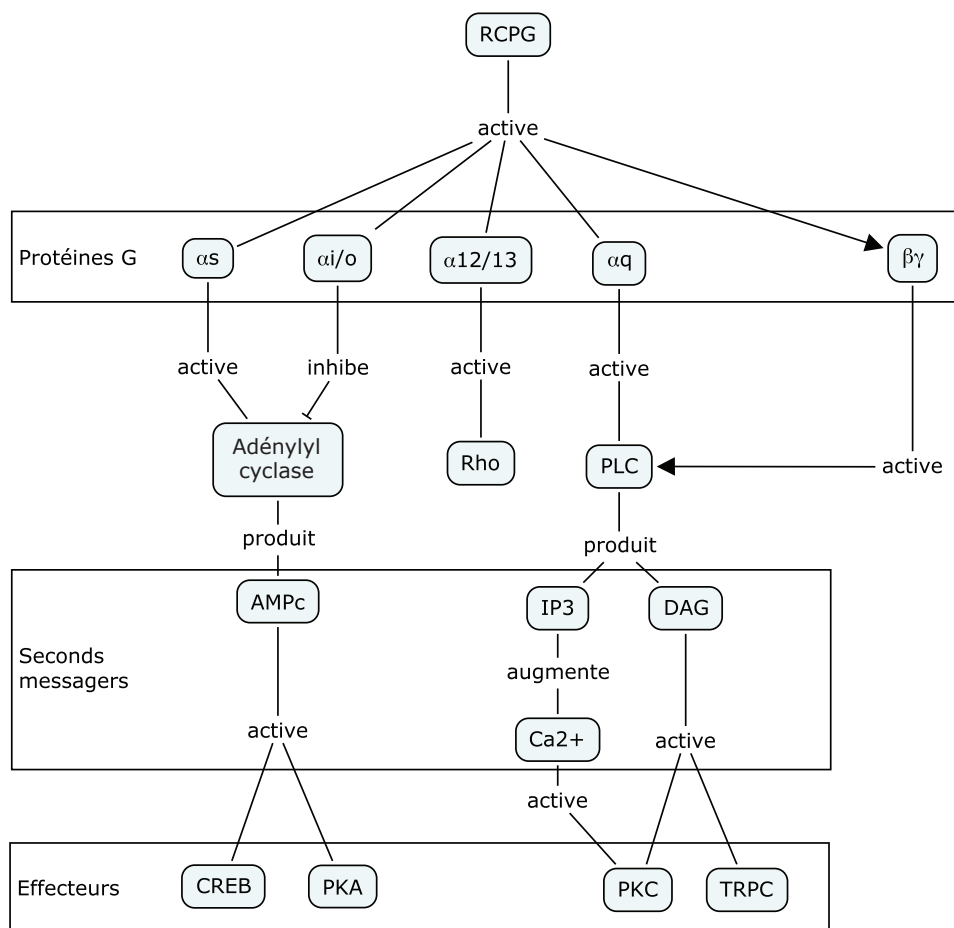


FIGURE 7.12 : Signalisation par les protéines G

Les GPCR peuvent activer différentes familles de protéines G modulant chacune différents seconds messagers. Les seconds messagers sont à leur tour détectés par des effecteurs qui seront responsables d'exécuter les fonctions cellulaires en réponse à la stimulation réceptorielle. Les cascades présentées ici sont non-exhaustives et ne témoignent pas de la signalisation croisée importante qui existe entre les différentes voies.

Il est de plus en plus évident qu'un seul GPCR peut être couplé à plusieurs isoformes de protéines G et ainsi signaler via plusieurs de leurs effecteurs. Les facteurs déterminant la sélectivité du couplage sont encore mal compris, mais semblent inclure la force et la cinétique du stimulus, la séquence primaire de la portion cytoplasmique du GPCR, la localisation du récepteur activé (membrane

plasmique vs réticulum endoplasmique vs endosomes, etc.), son compartiment membranaire, la nature des autres récepteurs et protéines exprimés par la cellule, l'homo- ou hétérodimérisation du GPCR et l'expression relative des différents isoformes de protéines G (Woehler & Ponimaskin, 2009; Tuteja, 2009; Calebiro et al., 2010).

7.3.1.2. *Signalisation indépendante des protéines G*

Il est maintenant établi que la majorité des GPCR peut activer des cascades de signalisation indépendamment de leur couplage aux protéines G. Cette propriété semble être conférée par la liaison du récepteur à différents partenaires qui commencent maintenant à être identifiés. Les plus connus appartiennent probablement à la famille des arrestines, mais d'autres, incluant la calmoduline, Homer, JAK2, NHERF2 et la sous-unité p85 de la PI3K ont également été décrits (Ritter & Hall, 2009).

Les arrestines 1 et 4, dites « arrestines visuelles » sont principalement associées aux photos-GPCR rhodopsine et opsines, respectivement, alors que les arrestines 2 et 3 (anciennement β -arrestines 1 et 2) dites « non-visuelles » sont davantage sélectives pour les autres GPCR (V. V. Gurevich et al., 2008). Les arrestines semblent être en compétition avec les protéines G pour la liaison au GPCR. Le modèle classique propose que, suite à la liaison d'un ligand, les kinases GRK2 et PI3K s'associent et transloquent du cytoplasme à la membrane plasmique où GRK2 phosphoryle le récepteur activé. La phosphorylation du récepteur favorise son interaction avec les arrestines au détriment des protéines G. Les arrestines sont alors recrutées au récepteur et entraînent une mono-ubiquitinylation du récepteur de même que son couplage à un complexe protéique permettant l'internalisation du récepteur et son triage intracellulaire soit vers la dégradation lysosomale, soit vers des endosomes prêts à être recyclés vers la membrane plasmique au besoin (Barki-Harrington & Rockman, 2008). L'ensemble de ce

phénomène permet une désensibilisation de la réponse cellulaire au stimulus initial en modulant la quantité de GPCR disponible à la surface, de même que l'affinité de chacun de ces GPCR pour ses protéines G.

Il est maintenant clair que le rôle des arrestines dépasse toutefois largement cette simple fonction d'internalisation (E. V. Gurevich & Gurevich, 2006). En outre, les arrestines peuvent interagir avec plusieurs composantes des cascades de MAPK où elles semblent servir de plateforme d'échafaudage (p. ex. entre JNK3 et sa MKK4 ASK1-map kinase kinase 4, ou entre ERK2 et c-Raf-1). Si en général cet assemblage promeut la signalisation par ces voies, dans certaines circonstances, l'arrestine 3 peut demeurer en complexe avec ERK2 ou JNK3 aux endosomes et empêcher leur translocation nucléaire, inhibant ainsi la cascade (McDonald et al., 2000). Pour le récepteur de la dopamine, l'arrestine 3 peut également lier la kinase anti-apoptotique Akt/PKB et la désactiver en formant un complexe avec son régulateur négatif PP2A (Beaulieu et al., 2005). L'arrestine est également un répresseur de la voie NFκB. D'une part, l'arrestine 3 interagit directement avec IκBα et empêche sa phosphorylation (H. Gao et al., 2004), d'autre part, les arrestines 2 et 3 peuvent réprimer l'auto-ubiquitinylation de TRAF6 nécessaire à l'activation du complexe IKK (voir figure 7.8) (Y. Wang et al., 2006).

En modulant simultanément la signalisation dans des cascades autrefois perçues comme distinctes (protéines G, PI3K, MAPK, NFκB), les arrestines permettent de diversifier substantiellement les phénotypes secondaires à l'activation d'un GPCR. Par ailleurs, plusieurs études récentes ont démontré que différents ligands d'un même récepteur pouvaient activer les multiples voies de signalisation des GPCR dans des proportions différentes. Cette observation a donné naissance au concept « d'agonisme biaisé » et appelé à une réévaluation de molécules autrefois dites « antagonistes » qui présentent finalement une activité biologique dans certaines voies non-conventionnelles non-investiguées à l'époque, comme les MAPK ou NFκB (Galandrin et al., 2007; Evans et al., 2010).

7.3.2. Modulation de l'apoptose par les GPCR

De par la multitude de cascades signalétiques qu'ils peuvent influencer, les phénotypes observables suite à la stimulation d'un GPCR sont particulièrement diversifiés, allant de l'induction (ou la répression) de potentiels d'action dans des neurones, au chimiotactisme des leukocytes, en passant par la sécrétion d'hormones ou d'autacoïdes.

En rapport à l'apoptose, même si sa modulation est un phénotype accepté de plusieurs GPCR, ces derniers sont rarement mentionnés dans les discussions portant sur les voies apoptotiques, car un mécanisme généralisable expliquant le phénomène n'a pas encore été établi. Pour quelques récepteurs, toutefois, plusieurs études ont permis de confirmer certains principes moléculaires.

7.3.2.1. *Les récepteurs adrénergiques*

La modulation de l'apoptose par les récepteurs adrénergiques a été particulièrement étudiée en raison de son rôle dans la genèse et la progression de l'insuffisance cardiaque (Adams & Brown, 2001). Si une stimulation adrénergique semble initialement induire l'hypertrophie des cardiomyocytes et entraîner un effet bénéfique pour la fonction cardiaque, il est maintenant reconnu qu'une stimulation prolongée semble plutôt induire leur apoptose. Cliniquement, plusieurs études de grande qualité ont démontré une amélioration des symptômes, une diminution des hospitalisations et, ultimement, une amélioration de la survie lorsque des patients souffrant d'insuffisance cardiaque sont traités avec des antagonistes des récepteurs β -adrénergiques (Foody et al., 2002). Les mécanismes moléculaires expliquant la réponse clinique impressionnante à cette classe de médicament demeurent incertains, mais au niveau des cardiomyocytes du moins, la modulation de l'apoptose par les récepteurs adrénergiques semble de plus en plus être un facteur important (Fujita & Ishikawa, 2011).

Trois isoformes des récepteurs β -adrénergiques sont exprimés dans les cardiomyocytes : β_1 AR, β_2 AR et β_3 AR. Ces trois récepteurs sont des GPCR couplés principalement à $G\alpha_s$, bien qu'un couplage à $G\alpha_i$ soit également observé pour β_2 AR et β_3 AR. Lorsque les récepteurs β -adrénergiques sont couplés à $G\alpha_i$, leur stimulation semble protéger contre l'apoptose via une activation de la PI3K par les sous-unités $\beta\gamma$, indépendamment des niveaux d'AMPc (Fujita & Ishikawa, 2011). La PI3K active Akt/PKB dont l'activité sur ses substrats (p. ex. Mdm2, BAD, IKK α) favorise la répression de la signalisation apoptotique (Lawlor & Alessi, 2001; Jiang & Liu, 2008).

Dans la majorité des cas, toutefois, les récepteurs β -adrénergiques signalent plutôt par la sous-unité $G\alpha_s$ dont l'activation semble être, au final, pro-apoptotique. Quatre mécanismes ont été décrits, le premier semblant particulièrement important :

- L'activation de $G\alpha_s$ entraîne une élévation des niveaux d'AMPc intracellulaires menant à une activation de la PKA. Parmi les substrats de cette kinase, notons CREB, un facteur de transcription trans-activant les protéines du groupe *Inducible cAMP Early Repressor* (ICER) menant à une inhibition de la transcription des protéines anti-apoptotiques sous le contrôle de CREM/CREB, notamment Bcl-2, dans une boucle de rétro-inhibition (Fujita & Ishikawa, 2011).
- Élévation du calcium intracellulaire via le *L-type Calcium Channel* induisant l'activation de la CaMK et de la calcineurine. Ces deux protéines semblent contribuer à la signalisation pro-apoptotique du récepteur, bien que les mécanismes demeurent incertains (Zhu et al., 2003);
- Activation de l'*Exchange Protein Directly Activated by cAMP* (EPAC) directement par l'AMPc et induisant l'expression de BIM. Cette voie a été

démontrée dans des cellules neuronales, mais l'absence d'expression de BIM au niveau du cœur sème un doute sur sa contribution à la pathophysiologie de l'insuffisance cardiaque (Suzuki et al., 2010).

- Modulation de la voie p53. Ce concept émergent découle de l'appréciation de la contribution de p53 à la pathogenèse de l'insuffisance cardiaque (Fujita & Ishikawa, 2011). Bien qu'un seul groupe ait jamais démontré directement une activation de p53 en réponse à une stimulation par un agoniste adrénergique (Zhou et al., 2006), quatre étapes signalétiques supportent théoriquement cette observation :
 - Un complexe transcriptionnel actif est formé par l'association de p53 à CREB et à la *Cyclic AMP response element-Binding Protein* (CBP/p300) (Giebler et al., 2000). La formation de ce complexe est favorisée par la phosphorylation de CREB par PKA, CaMK ou PKC – les deux premiers étant activés par la signalisation β -adrénergique.
 - Akt/PKB induit la phosphorylation de Mdm2 et entraîne sa translocation nucléaire préalable à l'ubiquitinylation et la dégradation de p53 (Oren, 2003). Si les sous-unités $\beta\gamma$ des récepteurs β_2 AR couplés $G\alpha_i$ peuvent activer Akt/PKB via la PI3K et donc inhiber l'activité p53, une augmentation d'AMPc induite par $G\alpha_s$, à l'inverse, inhibe la *Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1* (PDK1), un activateur d'Akt/PKB (Kim et al., 2001). La proportion relative de la signalisation par $G\alpha_s$ ou les $\beta\gamma$ de $G\alpha_i$ pourrait donc être un déterminant important de l'activation p53 en réponse à une stimulation. Notons finalement que p53 lui-même, via l'induction de PTEN, peut réprimer l'activation d'Akt/PKB et ainsi moduler la signalisation du GPCR.

- Paradoxalement, Akt/PKB induit également l'expression de HIF-1, un inhibiteur de Mdm2 entraînant une accumulation de p53 (Jiang & Liu, 2008).
- Finalement, la *Glycogen Synthase Kinase-3 β* (GSK-3 β) phosphoryle p53 et la protège contre l'ubiquitinylation par Mdm2. La GSK-3 β peut-être inhibée par une phosphorylation tant par PKA qu'Akt/PKB, dont l'activité sur cette voie est donc anti-apoptotique (Menon et al., 2007).

Ces voies de signalisation sont présentées à la figure 7.13. qui permet d'apprécier le potentiel tant pro- qu'anti-apoptotique des récepteurs adrénergiques. L'importance relative de chacune des voies dans la cellule au moment de la stimulation déterminera le phénotype final obtenu. Dans les cardiomyocytes en culture, ce phénotype final sera généralement pro-apoptotique (Fujita & Ishikawa, 2011).

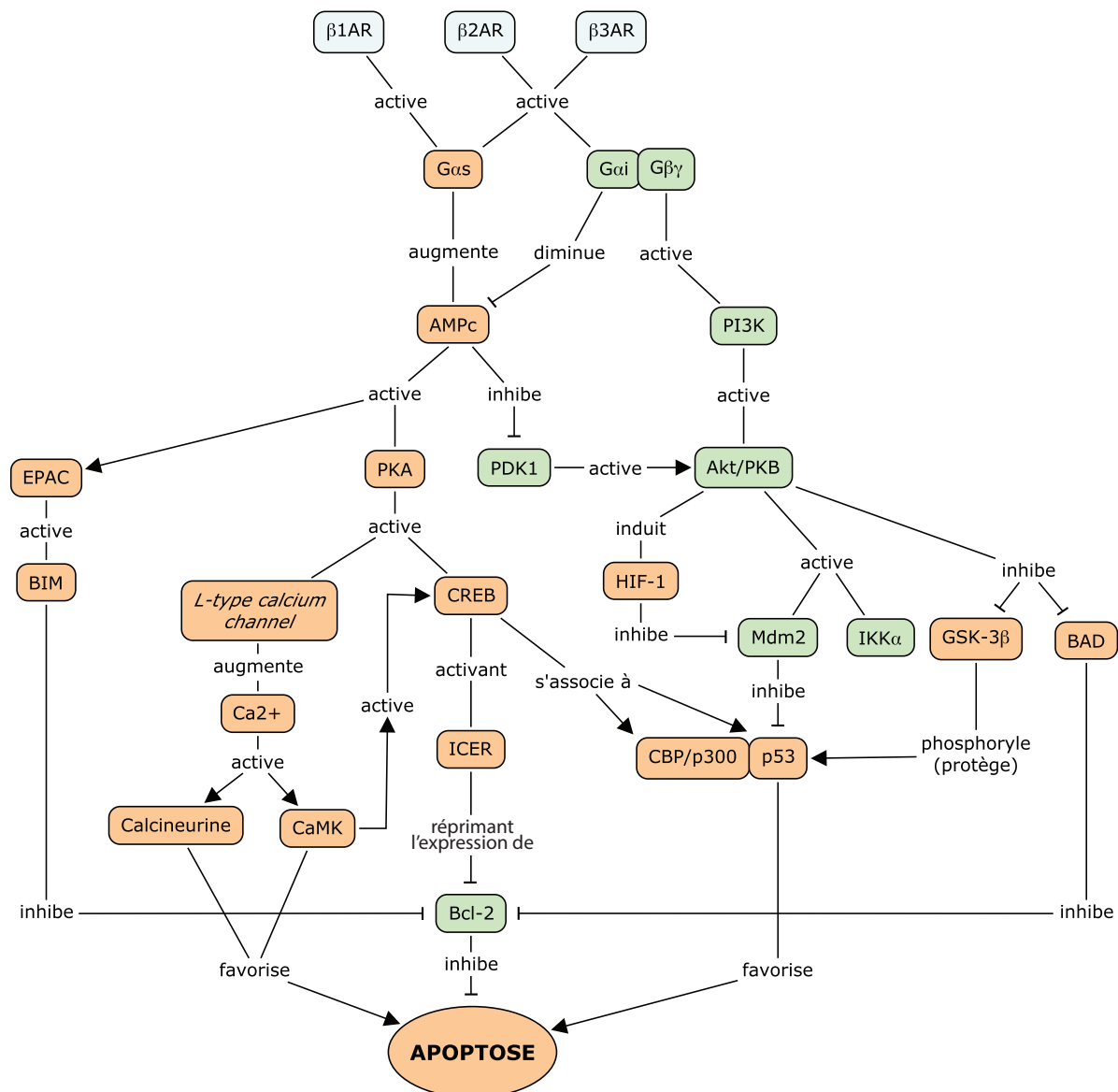


FIGURE 7.13 : Contrôle de l'apoptose par les récepteurs β-adrénergiques

L'activation des récepteurs β-adrénergiques résulte le plus souvent en une promotion de l'apoptose. Plusieurs voies parallèles peuvent être activées pour générer cet effet. Les protéines identifiées en orange sont généralement pro-apoptotiques, alors que celles identifiées en vert sont plutôt anti-apoptotiques.

7.3.2.2. Les récepteurs cholinergiques

Les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine constituent une seconde catégorie de GPCR dont l'effet sur l'apoptose est actuellement en investigation. Non-seulement sont-ils les antagonistes physiologiques des récepteurs adrénergiques du cœur, ils sont également des acteurs importants au sein du système nerveux central avec une implication démontrée dans la pathophysiologie de la maladie d'Alzheimer (où les traitements actuels visent à augmenter la concentration de leur agoniste) (Wess, 2004).

On compte cinq isoformes de récepteurs muscariniques désignés CHRM1 à CHRM5. Les isoformes CHRM2 et CHRM4 sont couplés à $G\alpha_{i/o}$ et ne semblent pas être impliqués dans la modulation de l'apoptose, alors que les isoformes CHRM1, CHRM5 et particulièrement CHRM3 sont couplés à $G\alpha_{q/11}$ et semblent avoir un effet protecteur (Tobin & Budd, 2003). Bien que les mécanismes anti-apoptotiques déclenchés par la stimulation cholinergique soient moins bien compris que pour les récepteurs adrénergiques, quelques observations sont particulièrement intéressantes :

- Une production d'acétylcholine a été démontrée pour certains cancers du colon et du poumon. Cette production semble associée à une prolifération accrue pouvant être inhibée par des antagonistes muscariniques (Shah et al., 2009).
- Dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (p. ex. prostate, colon, sein, poumon, astrocytomes, mélanomes), une stimulation muscarinique entraîne une augmentation importante de l'activité NF κ B et/ou ERK (Lanzafame et al., 2003; Shah et al., 2009). Selon le type cellulaire en cause, cette activation pourrait être médiée soit par PKC (secondairement à la signalisation par les protéines G), soit par les arrestines 2 et 3, tel que

discuté précédemment, ou soit par une transactivation du récepteur à l'EGF. L'activation des ERK est souvent associée à une différenciation cellulaire et/ou à une prolifération, phénotype par lequel les récepteurs muscariniques pourraient contribuer à la progression du cancer (Shah et al., 2009; Keshet & Seger, 2010).

- Dans un modèle d'expression ectopique de récepteurs muscariniques recombinants dans des cellules CHO, la protection contre l'apoptose conférée par CHRM3 semble dépendre d'une région polybasique de six acides aminés située dans la queue C-terminale du récepteur. La fonction de cette zone demeure inconnue, mais la protection qu'elle confère semble être indépendante des voies $G\alpha_{q/11}$ -PLC, ERK-1/2, JNK, p38 et PI3K, suggérant qu'un mécanisme encore non-élucidé pourrait être impliqué dans l'effet anti-apoptotique du récepteur (Budd et al., 2003).

La figure 7.14 présente les voies de signalisation de CHRM3 potentiellement impliquées dans la régulation de l'apoptose.

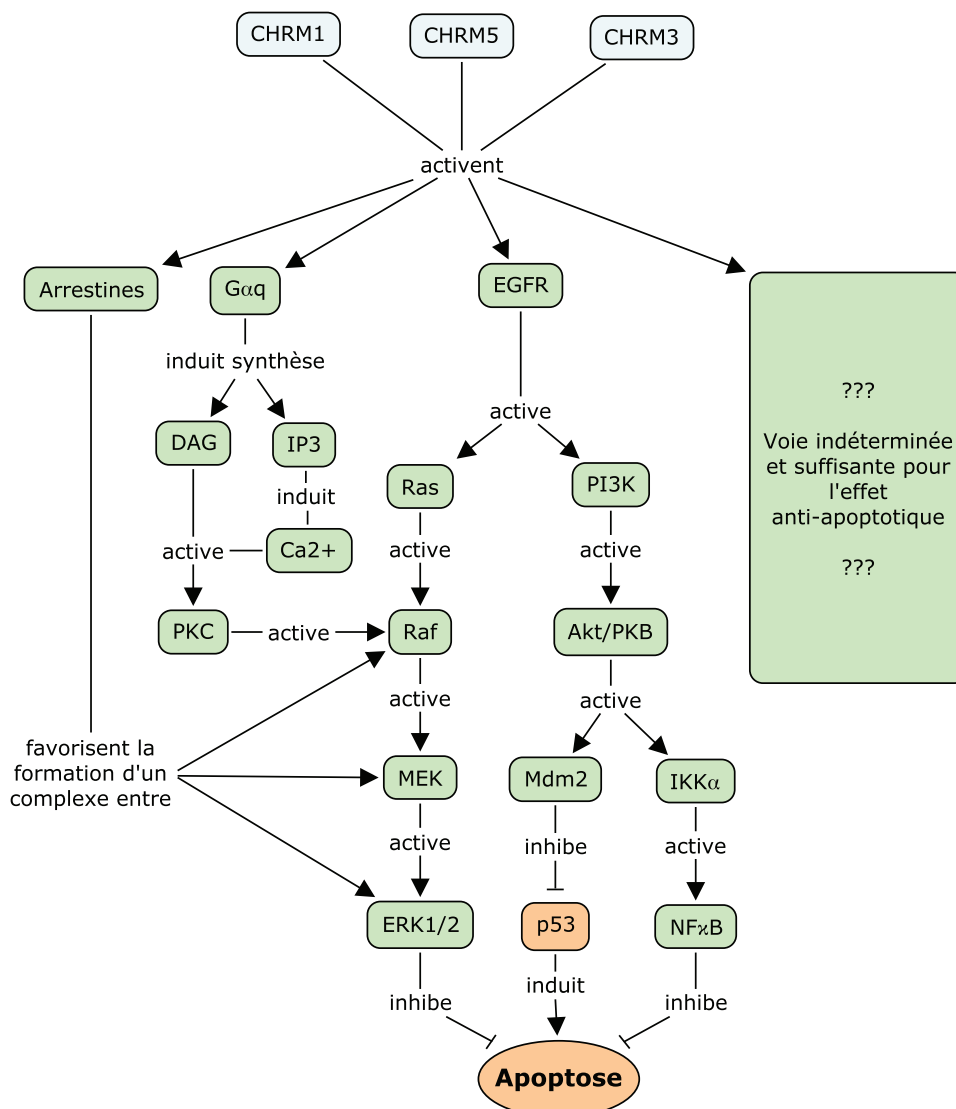


FIGURE 7.14 : Contrôle de l'apoptose par les récepteurs muscariniques

Les récepteurs muscariniques peuvent protéger contre l'apoptose via des mécanismes dépendant ou non des protéines G. Ces mécanismes incluent l'activation des ERK par une cascade dépendante de $G\alpha_q$, par une cascade dépendant des arrestines et par une cascade dépendant d'une trans-activation du récepteur à l'EGF qui active également NF κ B. Certaines évidences suggèrent également l'existence d'au moins une voie parallèle indépendante à toutes ces cascades, mais dépendante de la portion C-terminale du récepteur CHRM3. Les protéines identifiées en orange sont généralement pro-apoptotiques, alors que celles identifiées en vert sont plutôt anti-apoptotiques.

7.3.2.3. *Le récepteur du thromboxane A₂*

Le récepteur du thromboxane A₂ (TP) est exprimé de façon très importante dans les plaquettes, le thymus et la rate, de même qu'en quantité moindre dans la majorité des autres organes, notamment les poumons, reins, utérus, cerveau cœur, foie, estomac, intestins et testicules. TP est également exprimé par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (Nakahata, 2008). Deux isoformes dénommées TP α et TP β ont été rapportées et diffèrent de par leur queue cytosolique. Au niveau physiologique, TP est l'un des médiateurs les plus importants de l'agrégation plaquettaire et la synthèse de son agoniste endogène, le thromboxane A₂, est ciblée par l'acide acétylsalicylique donné à tous les patients en prévention secondaire de maladie cardiaque athérosclérotique (S. L. Hall & Lorenc, 2010).

L'effet de TP sur l'apoptose est extrêmement variable et les mécanismes qui le régissent sont encore peu détaillés. La majorité des observations rapportées peuvent toutefois être regroupées par technique et type cellulaire utilisées et résumées comme suit :

- Une stimulation directe de TP par un agoniste semble sensibiliser ou induire l'apoptose dans la majorité des études utilisant des cultures primaires de cellules non-cancéreuses (thymocytes (Ushikubi et al., 1993; Rocha et al., 2005), lymphocytes T (Remuzzi et al., 1994), cellules endothéliales (Y. Gao et al., 2000; Zou et al., 2002; Ashton & Ware, 2004), cardiomyocytes (Shizukuda & Buttrick, 2002) et plaquettes (K. H. Lin et al., 2009)). Les mécanismes sous-jacents ont été peu étudiés et la seule voie publiée à ce jour expliquant l'induction de l'apoptose par TP semble impliquer une activation de PKC ζ et la répression de la voie Akt/PKB (Shizukuda & Buttrick, 2002).

- Une stimulation de TP par un agoniste semble plutôt induire un phénotype prolifératif dans les études utilisant des cellules cancéreuses (néoplasies pulmonaires (Li & Tai, 2009; Huang et al., 2011)). Parmi les mécanismes proposés, notons l'activation de CREB par les voies PI3K-Akt/PKB et ERK (Huang et al., 2011), l'induction du récepteur nucléaire orphelin Nurr1 (Li & Tai, 2009), la réduction des niveaux nucléaires de p27 (Leung et al., 2009) et possiblement l'activation de NFκB (Ekambaram et al., 2011).
- La thromboxane synthétase et/ou TP semblent être surexprimées par les cellules cancéreuses (gliomes (Giese et al., 1999), carcinome prostatique (Nie et al., 2004) ou colorectal (Sakai et al., 2006), spécimens de cancers du sein (Watkins et al., 2005) ou de la vessie (Moussa et al., 2005)), suggérant un rôle prolifératif de TP dans ces types soit via la surexpression du récepteur lui-même, soit via une augmentation de la synthèse de son agoniste agissant de façon auto- ou paracrine (Pradono et al., 2002).
- Une inhibition de la thromboxane synthétase induit l'apoptose dans certaines cellules cancéreuses (gliomes (Kürzel et al., 2002; Yoshizato et al., 2002), néoplasies pulmonaires (Leung et al., 2009)) possiblement en inhibant la stimulation auto- ou paracrine d'un TP anti-apoptotique, bien qu'une production compensatrice de prostacycline pro-apoptotique pourrait théoriquement expliquer cet effet également (Datar et al., 1987; Hatae et al., 2001).

Cette dichotomie du phénotype de TP entre les cellules primaires supposées « normales » et les cellules cancéreuses dérégulées n'a, à notre connaissance, jamais été relevée ou discutée dans la littérature. Cette observation empirique permet toutefois de contextualiser les différentes voies de signalisation, tel que présenté à la figure 7.15.

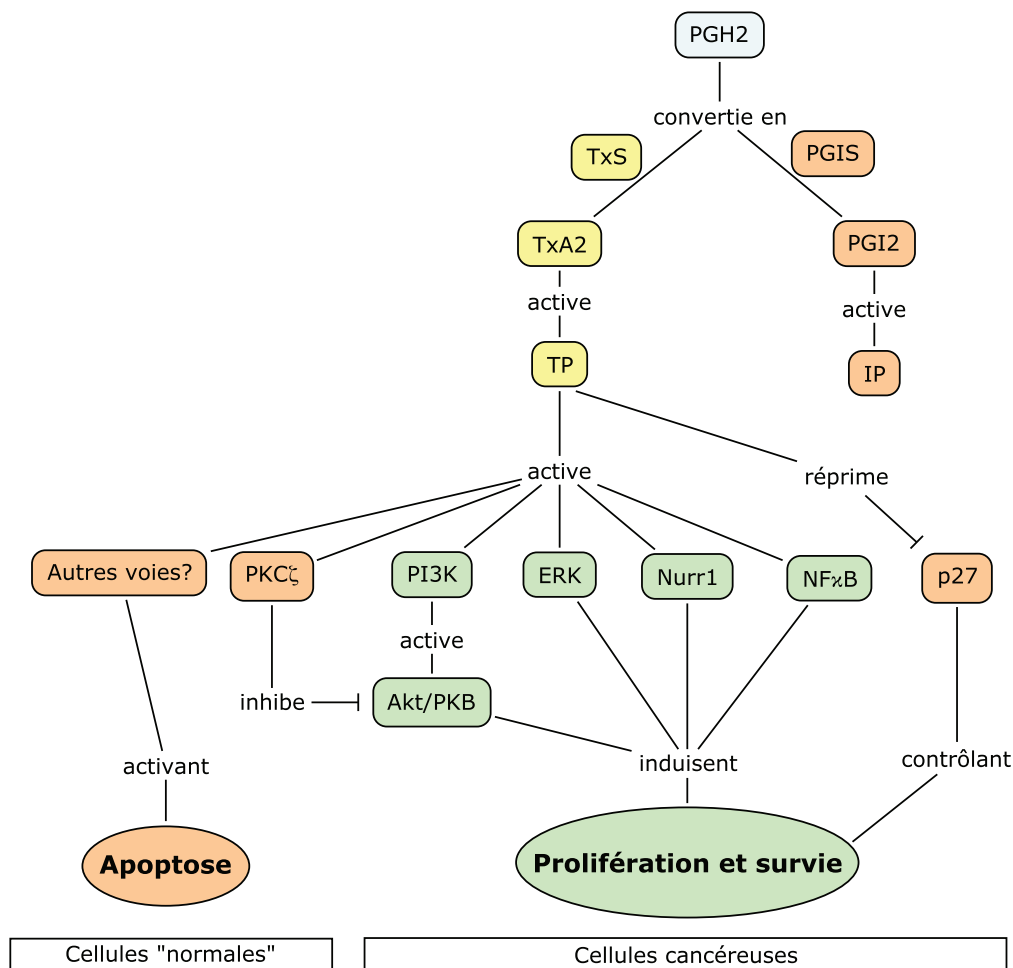


FIGURE 7.15 : Contrôle de l'apoptose par TP

Les mécanismes par lesquels TP module l'apoptose sont multiples et imprécis. Dans les cellules non-cancéreuses, TP semble généralement pro-apoptotique et cette caractéristique pourrait dépendre de l'activation de PKC ζ . Dans les cellules cancéreuses, TP semble plutôt anti-apoptotique et ce phénotype semble associé à l'activation, suite à une stimulation du récepteur par un agoniste, d'une panoplie de voies de signalisation incluant les ERK, la PI3K et NF κ B. Les protéines identifiées en orange sont généralement pro-apoptotiques, alors que celles identifiées en vert sont plutôt anti-apoptotiques. L'effet des protéines identifiées en jaune varie fortement d'une étude à l'autre.

7.3.2.4. *Autres points de contrôle de l'apoptose rapportés pour les GPCR*

En plus des mécanismes décrits précédemment, l'étude de d'autres GPCR et de leurs voies de signalisation a permis de mettre en évidence quelques points de contrôles supplémentaires :

- Plusieurs effecteurs classiques des protéines G peuvent moduler directement la voie NFκB. PKA et PKC sont bien reconnus pour tantôt promouvoir, tantôt réprimer l'activité transcriptionnelle de NFκB soit par une phosphorylation directe d'une sous-unité, soit via le contrôle de différents partenaires maintenant identifiés. L'effet final d'un GPCR sur la voie NFκB demeure toutefois très difficile à prédire et semble dépendre non-seulement du type cellulaire étudié, mais également de signaux secondaires présents dans l'environnement cellulaire et co-activant d'autres récepteurs (Ye, 2001; Fraser, 2008). Spécifiquement, les récepteurs de LPA peuvent activer directement la voie NFκB via différents isoformes de la PKC. Cette fonction semble dépendre de la formation d'un complexe impliquant les protéines CARMA3, BCL10, MALTI1 et TRAF6 ainsi que de la protéine MEFF3 (voir figure 7.8). Le mécanisme d'action de ces interactions reste à clarifier, notamment si ces protéines constituent des substrats de PKC ou plutôt des partenaires physiques activateurs ou stabilisateurs. Dans tous les cas, PKC entraînerait la phosphorylation d'IKKβ par MEKK3 de même que l'ubiquitinylation du complexe IKK par un complexe CARMA3-BCL10,MALTI1-TRAF6 (W. Sun & Yang, 2010). Le recrutement de ce complexe au récepteur par une interaction directe entre l'arrestine 3 et CARMA3 serait également nécessaire à l'activation de NFκB (J. Sun & Lin, 2008);

- À l'inverse, les arrestines, tel que discuté plus tôt, peuvent promouvoir l'apoptose en inhibant la voie NF κ B soit par une interaction avec I κ B la protégeant de la dégradation (Witherow et al., 2004; H. Gao et al., 2004; Luan et al., 2005), soit en inhibant l'auto-ubiquitinylation et activation de TRAF6 en amont du complexe IKK (voir figure 7.7) (Y. Wang et al., 2006). L'effet d'une stimulation de GPCR sur cette fonction est très variable et peut tant favoriser que défavoriser l'interaction des arrestines avec I κ B et TRAF6 (Fraser, 2008);
- Les arrestines, en permettant l'assemblage de complexes supra-moléculaires, favorisent ou entravent, selon le contexte, la signalisation vers les MAPK. Le phénotype final peut être hautement variable, mais il est généralement accepté qu'une activation des voies ERK1/2 entraîne une prolifération ou une différenciation cellulaire, alors qu'une activation des voies JNK et p38 favorise plutôt l'apoptose (Keshet & Seger, 2010).
- Finalement, les arrestines peuvent elles-même interagir avec Mdm2 qui en module la localisation et, conséquemment, la signalisation (Yin et al., 2011). Le lien entre la fonction de p53, l'activité Mdm2, la localisation des arrestines et la signalisation des GPCR suscite un intérêt grandissant et promet de diversifier les fonctions attribuées à chacun des membres de cette cascade.

La discussion précédente démontre bien la diversité des mécanismes permettant de lier l'activation de GPCR à la modulation de l'apoptose. Elle démontre également l'ampleur des travaux encore nécessaires pour intégrer tous ces résultats en un modèle unificateur. Chaque type cellulaire et chaque récepteur étudié démontre des particularités qui limitent sa généralisation aux autres types cellulaires et GPCR, expliquant l'absence quasi-systématique de cette famille de récepteurs dans les schémas et discussions portant sur les voies apoptotiques.

Les travaux présentés ici s'inscrivent dans ce contexte et proposent un nouveau mécanisme qui, selon les résultats recueillis jusqu'à présent, pourrait s'avérer généralisable à plusieurs récepteurs et même expliquer certaines différences phénotypiques d'un même récepteur lorsqu'exprimé dans différents types cellulaires. Ce mécanisme repose sur la découverte d'une interaction entre plusieurs GPCR et la protéine Siva1.

7.4. Siva1

Siva1 fut découverte en 1997 par Prasad *et al.* lors d'une expérience de double hybride visant à identifier les mécanismes par lesquels l'activation de CD27 par CD70 pouvait induire l'apoptose dans différentes lignées de lymphocytes B (Prasad *et al.*, 1997).

L'ARNm de Siva1 a été détecté dans la majorité des tissus humains (Prasad *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 1999). Le niveau d'expression basal est augmenté de façon importante dans plusieurs situations où l'apoptose est induite, notamment lors d'ischémie (Padanilam *et al.*, 1998; Singaravelu & Padanilam, 2011), d'infection virale (Henke *et al.*, 2000), d'exposition au LPS (Saban *et al.*, 2006), d'exposition aux rayons UV (Severino *et al.*, 2007) et de traitements par différents agents chimiothérapeutiques incluant la cisplatine (Qin *et al.*, 2002; Barking *et al.*, 2009) et le topotecan (Daoud *et al.*, 2003). La transcription du gène de Siva1 semble être sous le contrôle des suppresseurs de tumeur p53 et E2F1 (Fortin *et al.*, 2004; Jacobs *et al.*, 2007), tous deux impliqués dans la modulation des processus apoptotiques et connus pour répondre aux stimuli précédents. À l'inverse, dans plusieurs cancers, Siva1 est souvent fortement diminuée (Okuno *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2009), voir indétectable (Têtu *et al.*, 2008) et une diminution de son expression dans les tumeurs ovariennes est associée à une résistance accrue à la chimiothérapie de première ligne (Bachvarov *et al.*, 2006). Globalement, la fonction de Siva1 semble donc être pro-apoptotique.

7.4.1. Structure de Siva

La protéine Siva1 est composée de 175 acides aminés (voir figure 7.16). Une analyse bioinformatique a prédit l'existence potentielle d'une hélice alpha amphipatique (Xue et al., 2002), d'un domaine *B-box like ring finger* et d'un domaine « doigt de zinc » (Prasad et al., 1997). Grâce à des modélisations par homologie de séquence, différentes structures ont pu être proposées pour ces domaines (Xue et al., 2002; Goulielmos et al., 2010), bien qu'aucune d'entre elles ne repose actuellement sur des données expérimentales. L'hélice alpha semble impliquée dans la liaison de Siva1 à Bcl-xL et Bcl-2 et la transfection de ce domaine seul semble suffisante pour potentialiser l'apoptose induite par une irradiation aux rayons ultraviolets (Chu et al., 2004). La fonction des deux autres domaines de Siva1 n'est pas encore élucidée. Les domaines *B-box ring fingers* sont des domaines liant le zinc, souvent impliqués dans des réactions enzymatiques, notamment au sein d'E3-ubiquitine ligases (Burroughs et al., 2011). Lorsque vérifié expérimentalement, toutefois, Siva1 ne semble pas avoir d'activité E3-ligase *in vitro* (Du et al., 2009). Les doigts de zinc sont quant à eux reconnus pour leur rôle dans la liaison de protéines à l'ADN ou l'ARN, mais l'absence de résidus histidine dans cette région de Siva1, malgré sa liaison prouvée à plusieurs molécules de zinc, en fait une structure distincte des autres séquences doigt de zinc connues jusqu'à présent et sa fonction demeure donc spéculative (Nestler et al., 2006).

Siva2, une isoforme plus courte de Siva1, a également été décrite (Yoon et al., 1999) et semble résulter de l'épissage alternatif du transcrit du gène SIVA, duquel l'exon 2 aurait été excisé, tronquant ainsi la majeure partie de l'hélice alpha amphipatique. Bien qu'un groupe ait initialement proposé que cette isoforme ne serait pas en mesure d'induire l'apoptose (Yoon et al., 1999), cette allégation est aujourd'hui contestée (Py et al., 2004). Dans tous les cas, la fonction de Siva2

demeure très peu étudiée par rapport à l'isoforme plus longue et la majorité des connaissances acquises jusqu'à présent porte exclusivement sur Siva1.

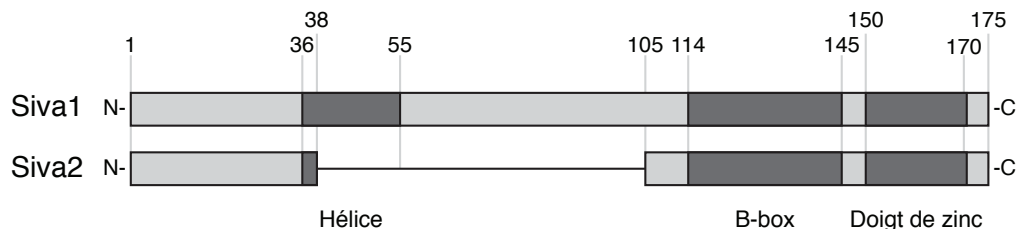


FIGURE 7.16 : Domaines prédits pour Siva

Les deux isoformes de Siva résultent de l'épissage alternatif du gène SIVA. L'isoforme le plus long contient une hélice alpha amphipatique (acides aminés 36-55), un domaine *B-box like* (acides aminés 114-145) et un domaine « doigt de zinc » (acides aminés 150-170). L'isoforme le plus court ne contient pas les acides aminés 38-105 de Siva1 et se verrait ainsi amputé de la majeure partie de l'hélice alpha amphipatique. Le rôle précis des deux isoformes reste à être précisé.

7.4.2. Mécanismes de régulation de l'apoptose

La capacité de Siva1 de moduler l'apoptose peut actuellement être expliquée par trois mécanismes :

- Siva1 peut activer la voie intrinsèque en interagissant directement avec les protéines Bcl-xL et Bcl-2 via ses acides aminés 36-55 (Chu et al., 2004). Cette interaction permettrait la séquestration de Bcl-xL et Bcl-2 et favoriserait la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, permettant la sortie du cytochrome c et l'activation des caspases initiatrices (Xue et al., 2002).
- Siva1 peut réprimer l'activité de NFκB (Gudi et al., 2006) en induisant la poly-ubiquitinylation K48 de TRAF2, entraînant sa dégradation

protéasomale et interférant ainsi avec l'activation du complexe IKK (voir figure 7.8) (Gudi et al., 2009). Par ailleurs, en interagissant directement avec XIAP et en interférant avec son activité ubiquitine ligase, Siva1 pourrait bloquer l'activation de TAK1 par XIAP, entravant ainsi l'activation de NFκB sans toutefois affecter la signalisation pro-apoptotique du complexe TAK1-XIAP vers JNK (Resch et al., 2009).

- Siva1 potentialise l'ubiquitylation et la dégradation de p53 par Mdm2 en interagissant simultanément avec les deux protéines. En participant à la rétro-inhibition de p53, Siva1 pourrait donc avoir une fonction anti-apoptotique (Du et al., 2009), du moins dans certaines circonstances.

Ces trois mécanismes rendent Siva1 difficile à positionner dans les schémas habituels de régulation de l'apoptose : d'une part, une implication dans la régulation de p53 et une interaction avec des protéines de la famille Bcl-2 suggèrent deux rôles opposés dans la voie intrinsèque, tandis que d'autre part, la régulation des TRAF est classiquement associée aux cascades de la voie extrinsèque.

7.4.3. Interaction avec des récepteurs membranaires

En plus de ses partenaires effecteurs intracellulaires, Siva1 est connue pour interagir directement avec cinq récepteurs de surface : les membres de la famille des récepteurs à TNF (TNFR) CD27 (Prasad et al., 1997), GITR et OX-40 (Spinicelli et al., 2002), de même que les GPCR LPA₂ (F.-T. Lin et al., 2007) et S1P₄ (E et al., 2009).

Sur GITR, Siva1 semble lier un motif P(I/E)(Q/E)E (Spinicelli et al., 2002) et sur CD27, le domaine de liaison à TRAF2. La région de Siva1 responsable de l'interaction avec les TNFR fait toutefois l'objet d'un débat (Yoon et al., 1999;

Nestler et al., 2006) et la fonction de cette interaction n'a jamais été démontrée directement. Il est postulé que l'association Siva1-CD27 pourrait compétitionner l'interaction entre CD27 et TRAF2 et permettre à une stimulation du récepteur d'induire l'apoptose.

Pour les GPCR, la portion C-terminale de Siva1 (114-175) semble être le principal déterminant de l'interaction (F.-T. Lin et al., 2007). Un motif CXXC a été décrit dans la queue C-terminale de LPA₂ et sa mutation semble abolir l'interaction avec Siva1 (E et al., 2009), mais la validité de ce motif n'a pas été vérifiée sur d'autres récepteurs. Tout comme pour les TNFR, le rôle spécifique de l'interaction entre Siva1 et les GPCR n'a jamais été démontré. Il a été rapporté qu'une stimulation de LPA₂ induisait l'ubiquitinylation de Siva1 et du récepteur résultant en une dégradation protéasomale des deux protéines. Ce phénomène semble être corrélé à une protection contre l'apoptose induite par l'adriamycine, mais la nécessité de Siva1 pour l'exécution de ce phénotype n'a pas été confirmée (F.-T. Lin et al., 2007).

7.4.4. Localisation

La majorité des études supportent la notion que Siva1 serait une protéine essentiellement nucléaire (Py et al., 2004; Py et al., 2007; Balci Peynircioglu et al., 2008; E et al., 2009; Shiozaki et al., 2011), bien que certains auteurs aient détecté sa présence au cytosol (Xue et al., 2002; Diegmann et al., 2006; Mihatsch et al., 2009), à la mitochondrie (Xue et al., 2002), à la membrane plasmique (Jacobs et al., 2007), de même qu'à la strie Z des cellules de muscle squelettique (Cottle et al., 2009). Au noyau, Siva1 semble s'accumuler en structures ponctiformes distinctes des nucléoles, des complexes de pores nucléaires, de la lamine nucléaire et des *promyelocytic leukemia oncoprotein bodies* (Py et al., 2004). Certaines études ont rapporté une distribution plutôt péri-nucléaire (Py et al.,

2004; Singaravelu & Padanilam, 2011) alors que les autres n'ont pas noté d'organisation particulière.

Une modulation de la localisation de Siva1 a pu être observée dans deux situations :

- La surexpression des récepteurs LPA₂ ou S1P₄ semble induire une translocation de Siva1 au cytosol (F.-T. Lin et al., 2007; E et al., 2009).
- Siva1 semble être localisée au réticulum sarcoplasmique dans le muscle squelettique de souris normale, alors qu'elle est nucléaire dans le muscle squelettique de souris atteintes de dystrophie de Duchenne (Cottle et al., 2009).

Ensemble, ces observations suggèrent que la localisation de Siva1 est relativement versatile et probablement finement régulée (Singaravelu & Padanilam, 2011).

7.5. Objectifs de l'étude

Nous avons pêché Siva1 lors d'une expérience de double-hybride visant à identifier des protéines interagissant avec la queue C-terminale de TP β . À la lumière de la controverse quant au rôle de TP dans la modulation de l'apoptose et vu les différents effets de Siva1 rapportés sur la signalisation et l'ubiquitinylation, nous présentons l'hypothèse que Siva1 pourrait être un acteur important dans la modulation de l'apoptose par les GPCR. Les travaux présentés ici ont été entamés avec comme objectifs spécifiques :

- d'évaluer le rôle de Siva1 dans la modulation de l'apoptose par TP;

- d'évaluer l'impact de Siva1 sur les différentes voies de signalisation activées par TP;
- d'établir si l'interaction avec Siva1 est une caractéristique partagée par d'autres GPCR.

8. ARTICLE 1

THROMBOXANE A2 MODULATES CISPLATIN-INDUCED APOPTOSIS THROUGH A SIVA1-DEPENDENT MECHANISM

Christian Iorio-Morin^{1,2,3}, Pascale Germain^{1,2,3}, Sébastien Roy^{1,2,3}, Samuel
Génier^{1,2,3}, Pascale Labrecque^{1,2,3} et Jean-Luc Parent^{1,2,3}

¹Service de rhumatologie, Département de Médecine, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, ²Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel, et ³Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, Sherbrooke, Qc, Canada, J1H 5N4.

Article publié dans le journal *Cell Death and Differentiation*, août 2012,
19(8): 1347-57. Epub 17 février 2012

8.1. Avant-propos

Cet article a été écrit en totalité par Christian Iorio-Morin sous la supervision du Dr Jean-Luc Parent. Toutes les expériences ont été conçues et réalisées par Christian Iorio-Morin, à l'exception des mesures de production de TXA₂ et des précipitations GST (réalisés par Pascale Germain) et du double-hybride (conçu et réalisé par Pascale Labrecque). Certains immunobuvardages ont également été repris par Pascale Germain afin de présenter les protéines endogènes, à la demande des réviseurs.

8.2. Résumé

Le thromboxane A_2 est un important médiateur lipidique dont la fonction dans la régulation de l'apoptose fait l'objet de rapports contradictoires. À l'aide d'une expérience de double hybride en levures, Siva1 a été identifiée comme nouvelle protéine interagissant avec la queue C-terminale de l'isoforme β du récepteur du thromboxane A_2 (TP β). Différentes évidences suggèrent à la fois un rôle pro- et anti-apoptotique pour Siva1. Dans ces travaux, nous démontrons qu'un traitement à la cisplatine induit la synthèse de thromboxane A_2 dans les cellules HeLa. Nous prouvons qu'une stimulation des récepteurs TP endogènes sensibilise les cellules HeLa à l'apoptose induite par la cisplatine et que cette modulation nécessite l'expression de Siva1, vu l'inhibition du phénotype obtenue par la répression de Siva1 endogène au moyen d'ARNs interférants. Nous rapportons que, lors d'une stimulation de TP β , la dégradation de Siva1 est entravée, résultant en une accumulation de la protéine qui transloque alors du noyau vers le cytosol. La translocation de Siva1 corrèle avec une réduction de son interaction avec Mdm2 (un inhibiteur de l'activité p53) ainsi qu'une augmentation de son interaction avec TRAF2 et XIAP (connus pour induire une signalisation pro-apoptotique). Nos données fournissent un modèle qui réconcilie les rôles pro- et anti-apoptotiques rapportés pour Siva1 et identifient un nouveau mécanisme liant les GPCR à la régulation de la sensibilité à l'apoptose. Ces résultats pourraient avoir des implications quant à l'utilisation des inhibiteurs de la COX pendant les traitements chimiothérapeutiques à la cisplatine et proposent une cible permettant potentiellement d'en minimiser la toxicité sur les cellules non-cancéreuses.

8.3. Manuscript

8.3.1. Abstract

Thromboxane A₂ is an important lipid mediator whose function in apoptosis is the subject of conflicting reports. Here, a yeast two-hybrid screen for proteins that interact with the C-terminus of the thromboxane A₂ receptor (TP) identified Siva1 as a new TP-interacting protein. Contradictory evidence suggests pro- and anti-apoptotic roles for Siva1. We show that a cisplatin treatment induces thromboxane A₂ synthesis in HeLa cells. We demonstrate that endogenous TP stimulation promotes cisplatin-induced apoptosis of HeLa cells and that such modulation requires the expression of Siva1, as evidenced by inhibiting its endogenous expression using siRNAs. We reveal that, upon stimulation of TP, degradation of Siva1 is impeded, resulting in an accumulation of the protein, which translocates from the nucleus to the cytosol. Translocation of Siva1 correlates with its reduced interaction with Mdm2 (an inhibitor of p53 signalling) as well as with its increased interaction with TRAF2 and XIAP (known to enhance pro-apoptotic signalling). Our data provide a model that reconciles the pro- and anti-apoptotic roles that were reported for Siva1 and identify a new mechanism for promoting apoptosis by G protein-coupled receptors. Our findings may have implications in the use of COX inhibitors during cisplatin chemotherapy and might provide a target to reduce cisplatin toxicity on non-cancerous tissues.

8.3.2. Introduction

Thromboxane A₂ (TXA₂) is a potent lipid mediator best known for its central role in platelet activation, although other functions are emerging as well (1). It is synthesized from arachidonic acid through sequential processing by the cyclooxygenase (COX) 1 or 2 and the thromboxane synthase – a cascade inhibited by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). TXA₂ has been shown to act

through its receptor (TP), a G protein-coupled receptor that mainly signals through $G\alpha_q$ and $G\alpha_{13}$ (1). TP comes in two isoforms, TP α and TP β , differing in their C-terminal cytoplasmic tails. We previously reported that TP β , but not TP α , undergoes significant constitutive and agonist-induced endocytosis (2). We performed a yeast two-hybrid screen looking for proteins interacting with the C-terminal tail of TP β (3). We report here that the Siva1 protein directly interacts with the C-tail of TP β .

Siva1 is a 175 amino-acids protein known to induce apoptosis through multiple pathways (4,5). Various studies demonstrated that Siva1 expression is up-regulated in contexts where apoptosis is induced, such as ischemic insults (6) and treatments with chemotherapeutic agents like cisplatin (7). Siva1 was shown to be a direct transcriptional target of p53 and E2F1 (8) and suggested mechanisms of apoptosis induction include Siva1 interaction with and inhibition of Bcl-xL (9) as well as binding to TRAF2 (1) or XIAP (10) to inhibit NF κ B activity and promote sustained JNK activation. On the other hand, a recent study highlighted a powerful anti-apoptotic role for Siva1 where, by simultaneously binding to both p53 and Mdm2, Siva1 suppressed p53 signalling (11). To this day, this functional dichotomy remains unresolved. Interestingly, Siva1 interacts with five cell-surface receptors – three members of the TNF receptors family (CD27, GITR and OX-40 (12)) as well as the LPA $_2$ and S1P $_4$ receptors (13). While Siva1 seemed instrumental in inducing pro-apoptotic signalling in the case of the TNF receptors, agonist stimulation of the LPA $_2$ receptor, in contrast, appeared to enhance Siva1 degradation and protect from apoptosis (13,14).

Apoptosis modulation by TXA $_2$ is a controversial subject and depending on the studied cell type, both apoptosis protection and promotion have been observed as an outcome of TP stimulation (15-18). The aim of the present study was to assess the involvement of Siva1 in the modulation of apoptosis by TXA $_2$. Our data reconcile, for the first time, the conflicting reports on Siva1 as a pro- or anti-

apoptotic protein and provide insights as to how the outcome of TP signalling might be shifted as a result of changing Siva1 expression and localization.

8.3.3. Results

8.3.3.1. *TP directly interacts with Siva1*

We have previously shown that the C-terminus of TP β (C-tail) contains regulatory domains responsible for the trafficking properties of the receptor (3). To identify putative proteins that interact with the receptor, we performed a yeast two-hybrid screen using the TP β C-tail as bait. A total of 1.5×10^6 independent clones were screened, yielding over 300 positives, seven of which contained the full-length Siva1 coding sequence (data not shown). To confirm the interaction and map the domains involved on both proteins, constructs of the whole coding sequence and deletion mutants of Siva1 fused to a histidine repeat sequence were generated along with fragments of the C-tail and intra-cellular loops (ICL) of TP β fused to the glutathione-S transferase (Figure 1A-B). The constructs were expressed and purified from bacteria and *in vitro* pulldowns were performed. As shown in Figure 1C, full-length Siva1 directly interacted with the C-tail and ICLs of the receptor. The complete TP β C-tail (C-tail A) was the most effective in pulling down Siva1. Pulldown of Siva1 was markedly decreased for the C-tail B and E constructs, suggesting the presence of an important interaction determinant between amino acids 334 and 345. Both ICL1 and ICL2 also showed significant interaction with full-length Siva1, indicating that TP β -Siva1 binding is likely dependent upon multiple sites on the receptor. The binding site on Siva1, on the other hand, appeared to be dependent on the very C-terminal end of the protein (Figure 1D) with substantial loss of interaction seen when removing amino acids 138-175 and further loss of the residual interaction when removing amino acids 114-175, suggesting that this region of Siva1 is required for the binding of the multiple receptor domains. The interaction was further confirmed in HEK293 cells.

As shown in Figure 1E, Siva1-HA co-immunoprecipitated with Flag-TP β while the interaction between the receptor and Siva1 Δ C-HA was greatly reduced, corroborating our *in vitro* interaction mapping on Siva1. The TP-Siva1 interaction was detected between the endogenous proteins in HeLa cervical cancer cells that endogenously express both TP (1) and Siva1 (14) (Supplementary material 1). A 5h stimulation of TP reduced the TP-Siva1 co-immunoprecipitation.

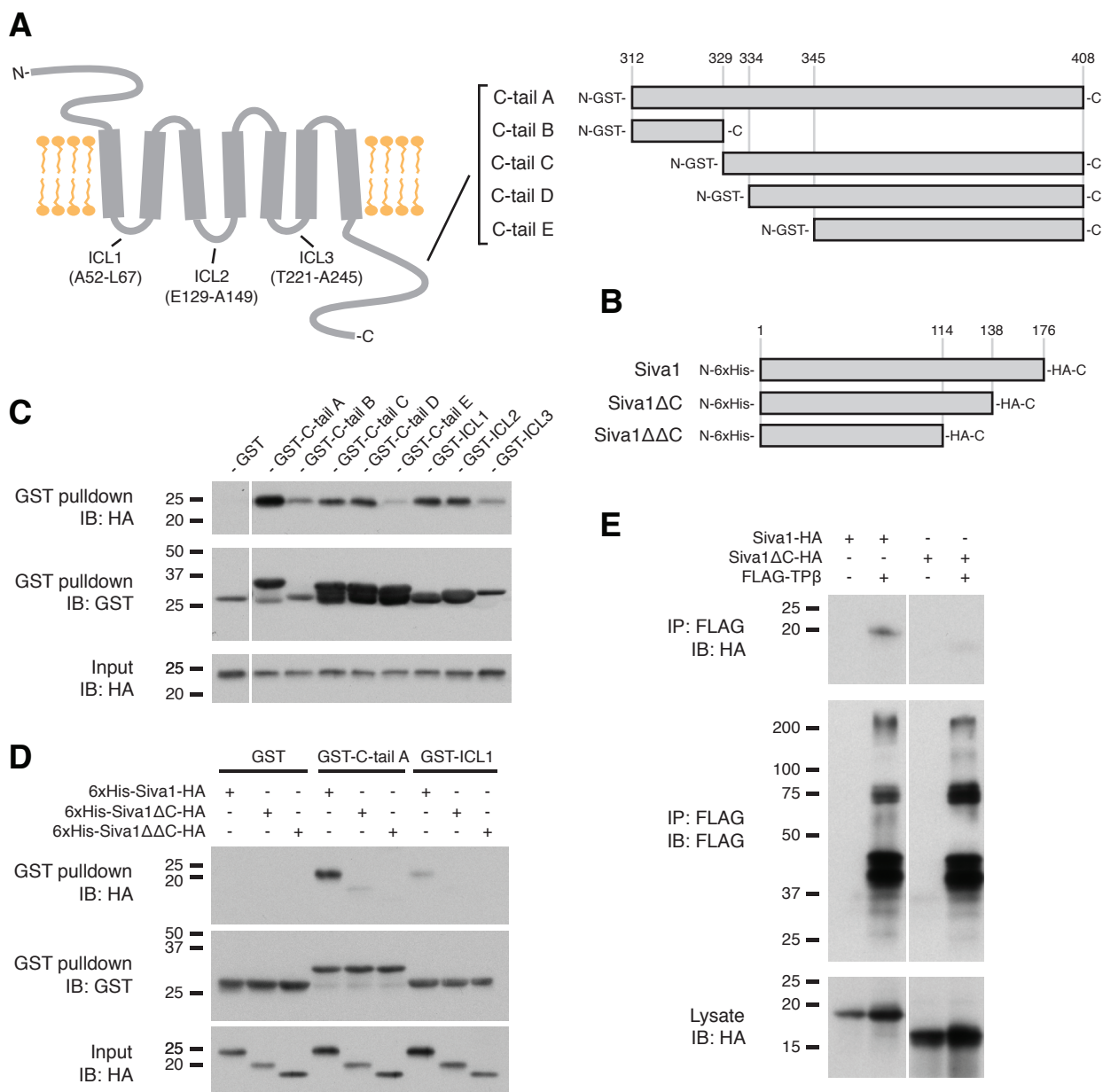


FIGURE 8.1: Siva1 interacts with the C-tail and intra-cellular loops (ICL) of TP β through its domain spanning amino acids 138 through 175.

(A) Various fragments of the TP β C-tail were cloned into the pGEX-4T-1 vector to generate GST fusion proteins. (B) Three deletion mutants of Siva1 with a C-terminal HA epitope were also cloned into the pRSETa vector, adding six in-frame histidines at the N-terminal end of the Siva1 insert. (C) Siva1 pull-downs. Purified full-length His-Siva1-HA was incubated with various GST-tagged TP ICLs and C-tail fragments. Siva1 was pulled-down by all TP β constructs, but ICL1, ICL2 and the C-tail constructs containing amino-acids 334-345 were the most effective. (D) Truncation of the Siva1 C-terminal end prevented Siva1 pull-down by both the complete TP β C-tail (Ctail A) and ICL1. (E) Formation of a TP/Siva1 complex *in cellulo*. Siva1-HA and FLAG-TP β were co-expressed in HEK293 cells and immunoprecipitations were performed on the lysate using an anti-FLAG monoclonal antibody and protein G-coated agarose beads. Siva1-HA co-immunoprecipitated with FLAG-TP β (lane 2), while truncation of the Siva1 C-terminal end severely diminished the interaction (lane 4). IP: immunoprecipitation, IB: immunoblotting.

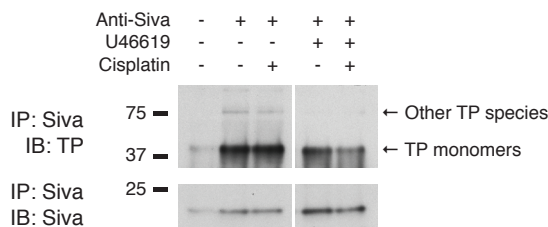


FIGURE 7.Supp1: Co-immunoprecipitation of endogenous TP with endogenous Siva is impeded by U46619 stimulation but not by a cisplatin treatment alone

HeLa cells were treated overnight with 50 μ M cisplatin or vehicle and stimulated the following morning for 5 h with 100 nM U46619 or vehicle. Cells were lysed, immunoprecipitations using goat anti-Siva antibodies were performed and then blotted as described in the Material and methods section. Lane 2 shows that endogenous TP co-immunoprecipitates with Siva. A cisplatin treatment does not modulate the co-immunoprecipitation (lane 3 vs 2) whereas U46619 impedes TP co-immunoprecipitation (lane 4 vs 2). Signal at ~40 kDa in the TP blots represents TP monomers, while signal at ~80 kDa represents glycosylated dimers (39).

8.3.3.2. *Endogenous TP stimulation promotes cisplatin-induced apoptosis in HeLa cells*

Because both pro- and anti-apoptotic roles for Siva1 had been reported (4,11), we wondered if and how Siva1 could be involved in the modulation of apoptosis by TXA₂. HeLa cells were treated overnight with the DNA-damaging agent cisplatin in order to induce a basal level of apoptosis. Concomitantly, the cells were stimulated with increasing concentrations of U46619 and apoptosis was assessed using two independent techniques, annexin V staining of externalized phosphatidylserines and Western blotting of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), a caspase substrate cleaved during apoptosis. As shown in Figure 2A and B, U46619 dose-dependently promoted HeLa cells cisplatin-induced apoptosis with an EC₅₀ of about 87 nM, similar to the 82 nM EC₅₀ reported for human platelet aggregation (19). Promotion of apoptosis by U46619 was abolished by treatment with the TP antagonist SQ29548 (Figure 2C and D), further supporting that U46619 acts through TP to enhance cisplatin-induced apoptosis. Interestingly, U46619 could not induce apoptosis in the absence of cisplatin treatment (Figure 2A), indicating that co-stimulatory signals triggered by cisplatin are required for this TP phenotype.

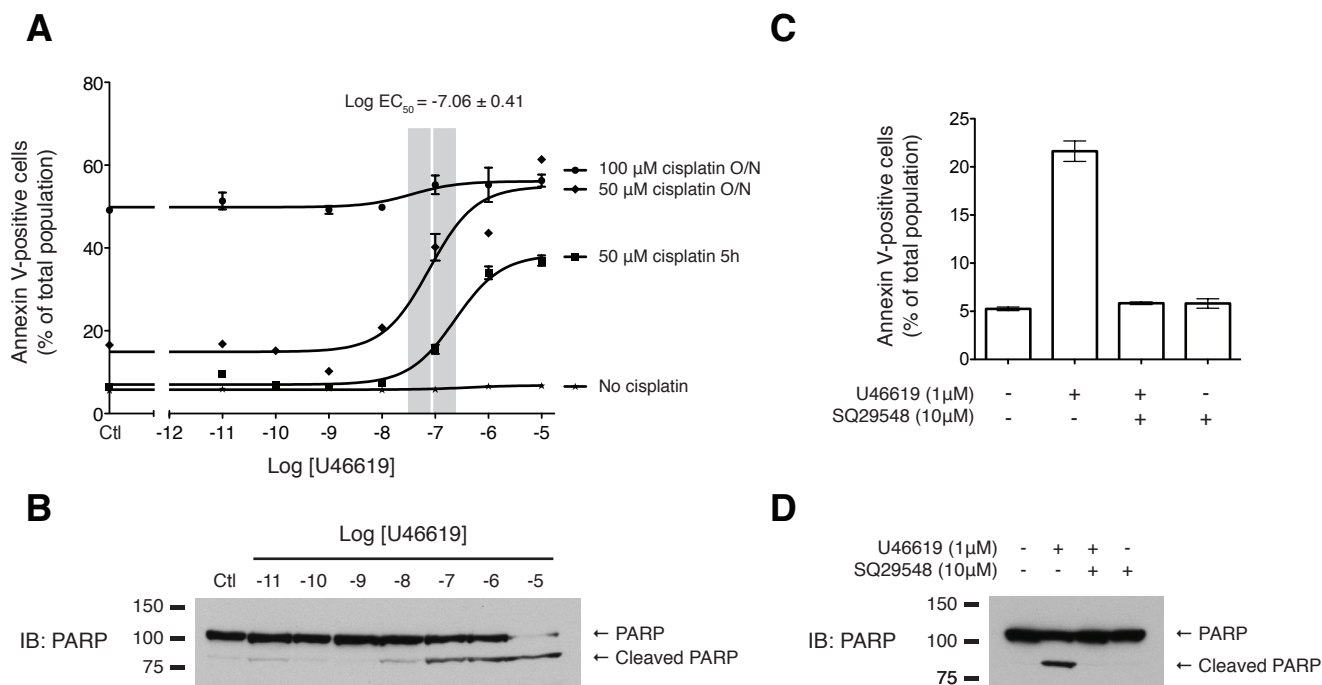


FIGURE 8.2: Endogenous TP stimulation promotes cisplatin-induced apoptosis in HeLa cells

(A) HeLa cells were incubated for 5 h with various concentrations of U46619 and concomitantly treated with 50 or 100 μ M cisplatin or vehicle for 5 h or overnight (O/N). Phosphatidylserine exposure was assessed by flow-cytometry analysis of a fluorescent annexin V staining 24 h following the start of the cisplatin treatment. U46619 dose-dependently induced phosphatidylserine exposure in cisplatin-treated HeLa cells (see three top curves), but not in untreated cells (lower curve). Mean calculated EC_{50} for U46619 was of 87 nM. Drawn in grey is the standard deviation from the mean, which spans from 34 nM to 224 nM. Each point in the scatter plot is the mean and SEM of three identical conditions in a single experiment. The four independent experiments using various cisplatin treatments shown are representative of multiple experiments using each individual treatment.

(B) Following flow-cytometry analysis, samples were lysed and SDS-PAGE and immunoblotting using a monoclonal anti-PARP antibody were performed. U46619 dose-dependently induced PARP cleavage following cisplatin treatment. The blot shown here is that of a 50 μ M overnight treatment, but is representative of the other 100 μ M O/N and 50 μ M 5h treatments as well.

(C, D) The effect of U46619 on phosphatidylserine exposure and PARP cleavage can be inhibited by a concomitant 10 μ M treatment with the TP antagonist SQ29548.

8.3.3.3. *Cisplatin induces TXA₂ production*

While performing the EC₅₀ calculations for the previous experiments, we noticed that although U46619 consistently promoted cisplatin-induced apoptosis in HeLa cells, the EC₅₀ of this effect appeared inversely correlated with the harshness of the cisplatin treatment. Indeed, in Figure 2A, the EC₅₀ are ~36 nM, ~77 nM and ~236 nM for the experiments where the cells were treated with 100 μM cisplatin overnight, 50 μM cisplatin overnight, or 50 μM for 5 h respectively. This observation led us to believe that cisplatin might induce endogenous production of TXA₂ by HeLa cells which could change the actual agonist concentration in our culture medium, consequently shifting our apparent dose-response curve to the left. We thus measured the concentration of TXB₂ – a stable TXA₂ metabolite – as a proxy for TXA₂ synthesis. As shown in Figure 3, cisplatin treatment increased TXB₂ concentration in the culture medium by 5-10 folds to about 2.25 nM, up from 0.22 nM in untreated conditions, indicating that HeLa cells can synthesize TXA₂ and secrete it in the culture medium during the DNA-damage response. This increased synthesis correlates with, and qualitatively explains, the apparent apoptosis EC₅₀ reduction upon cisplatin treatment. However, since TXA₂ production is likely to be underestimated due to detection limitations, it cannot quantitatively be linked to the shift in EC₅₀ of cisplatin-induced apoptosis in Figure 2.

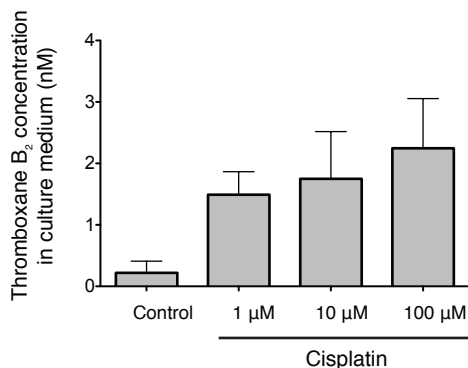


FIGURE 8.3: Cisplatin induces thromboxane production

HeLa cells were treated for 48 h with various concentrations of cisplatin. The culture medium was then collected and thromboxane B₂ levels were assessed using a commercially available ELISA-based kit. Shown here is a representative result of five independent experiments.

8.3.3.4. TP stimulation prevents Siva1 degradation

With the clear pro-apoptotic outcome of TP stimulation observed in our model, we next investigated how Siva1 function might be controlled by TXA₂. To assess whether TPβ or its stimulation had any control over Siva1 expression, Siva1-HA and Flag-TPβ were expressed in HEK293 cells together or separately and treated with U46619 for up to 5 h. As shown in Figure 4A, agonist stimulation of TPβ for 2 and 5 h increased the amount of Siva1 protein that was detected. This effect was also observed with Siva1ΔC (data not shown). An increase in total expression can be the result of either enhanced synthesis or decreased degradation. Because the previous experiments were performed using expression constructs under the control of the constitutive CMV promoter, we conjectured that an augmentation in total Siva1 expression was most likely the result of a reduction in the degradation of the protein. A cycloheximide chase was performed in order to calculate the half-life of Siva1 *in cellulo*. Cells expressing TPβ and Siva1 were incubated with vehicle or U46619 for 3 h and then treated with the protein synthesis inhibitor cycloheximide for the indicated times (Figure 4B). In the most conservative experiment, Siva1 half-life was ~18 min in cells treated with vehicle and increased

to ~29 min in cells stimulated with U46619 (Figure 4B-C), indicating that TP stimulation slowed Siva1 turnover by about 60 %. Other experiments showed Siva1 half-life to be of 19, 26 or 31 min in basal condition, which increased to respectively 74, 65 or 106 min upon stimulation. We postulate that the high variability of the absolute half-life between each experiment might result from variations in passage number and/or cell confluence, as Siva1 expression is notoriously affected by these factors (20). In any case, statistical analysis of all four experiments using a two-way repeated measures ANOVA found the interaction between the two variables (TP stimulation and total Siva1 expression with time) to be extremely significant at $P = 0.0060$, indicating that regardless of the initial absolute half-life, TP stimulation increased Siva1 stability. TP-induced increase in Siva1 expression was also confirmed in HeLa cells using endogenous proteins and found to be of similar magnitude to that induced by cisplatin treatment (Figure 4D). Concomitant treatment with both U46619 and cisplatin resulted in a further increase in Siva1 expression relative to either treatment alone. Together, these results indicate that TP stimulation increases total Siva1 expression by impeding its degradation and that the presence of cisplatin further elevates Siva1 levels, possibly through enhanced transcription, as described by others (7).

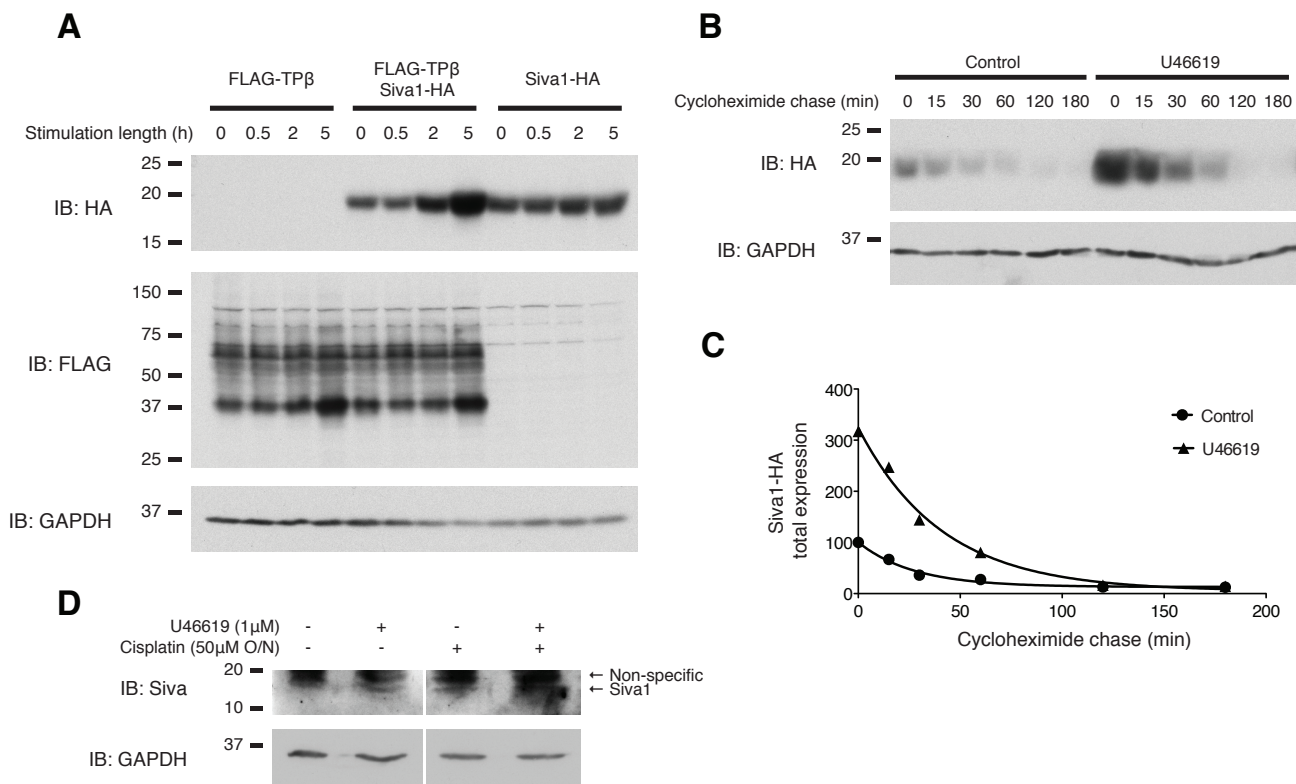


FIGURE 8.4: TP increases total Siva1 expression by decreasing its degradation

(A) HEK293 cells were transfected with FLAG-TP β and/or Siva1-HA. Two days later, cells were treated with 100 nM U46619 for 0.5, 2 or 5 h and then lysed. Western blot analysis demonstrates that U46619 treatment time-dependently induced an increase in Siva1-HA expression when Siva1 and TP were co-transfected (lanes 5-8), but not when Siva1 was transfected alone (lanes 9-12). (B, C) A time-course of cycloheximide treatment was performed to evaluate Siva1 degradation kinetics. HEK293 cells were transfected with FLAG-TP β and Siva1-HA. After 48 h, cells were treated for 3 h with 100 nM U46619. Cycloheximide was then added to the culture medium to reach a final concentration of 100 μ g/mL and cells were harvested after the indicated times. Cells were then lysed and analysed by SDS-PAGE, western blotting and immunoblotting of transfected Siva1-HA using an HRP-coupled anti-HA antibody. Band intensity in (B) was quantified and plotted in (C) to calculate the *in cellulo* half-life of Siva1 in presence or absence of TP β stimulation. In the most conservative experiment (shown here), Siva1 was found to have an 18 min half-life in untreated cells, which increased by 60% to 29 min upon U46619 stimulation. A two-way repeated measures ANOVA performed using the results from all experiments found the half-lives increased seen upon stimulation to be extremely significant at $P = 0.0060$. (D) Endogenous Siva1 expression also increased following U46619 stimulation of endogenous TP in HeLa cells. The increase was comparable to that induced by an overnight 50 μ M cisplatin treatment and the combination of TP stimulation and cisplatin

treatment had additive effect on Siva1 expression (lane 4). All blots shown are representative of at least three independent experiments.

8.3.3.5. TP stimulation modulates the interaction of Siva1 with its known partners

Siva1 promotes apoptosis through various mechanisms including the direct binding of XIAP (10) and TRAF2 (21). A recent report, however, highlighted that Siva1 could directly bind to both Mdm2 and p53 simultaneously and enhance p53 ubiquitination and degradation, thereby protecting against apoptosis (11). We thus wondered if TP might be able to regulate those interactions, two of which are pro-apoptotic and one of which is anti-apoptotic. Co-immunoprecipitations of Siva1-HA with Myc-tagged Mdm2, XIAP or TRAF2 were performed following a 5 h FLAG-TP stimulation by U46619 or vehicle. As shown in Figure 5, TPb stimulation enhanced the pro-apoptotic Siva1 interactions with XIAP and TRAF2 while decreasing the anti-apoptotic interaction between Siva1 and Mdm2 (see methods for detailed results analysis).

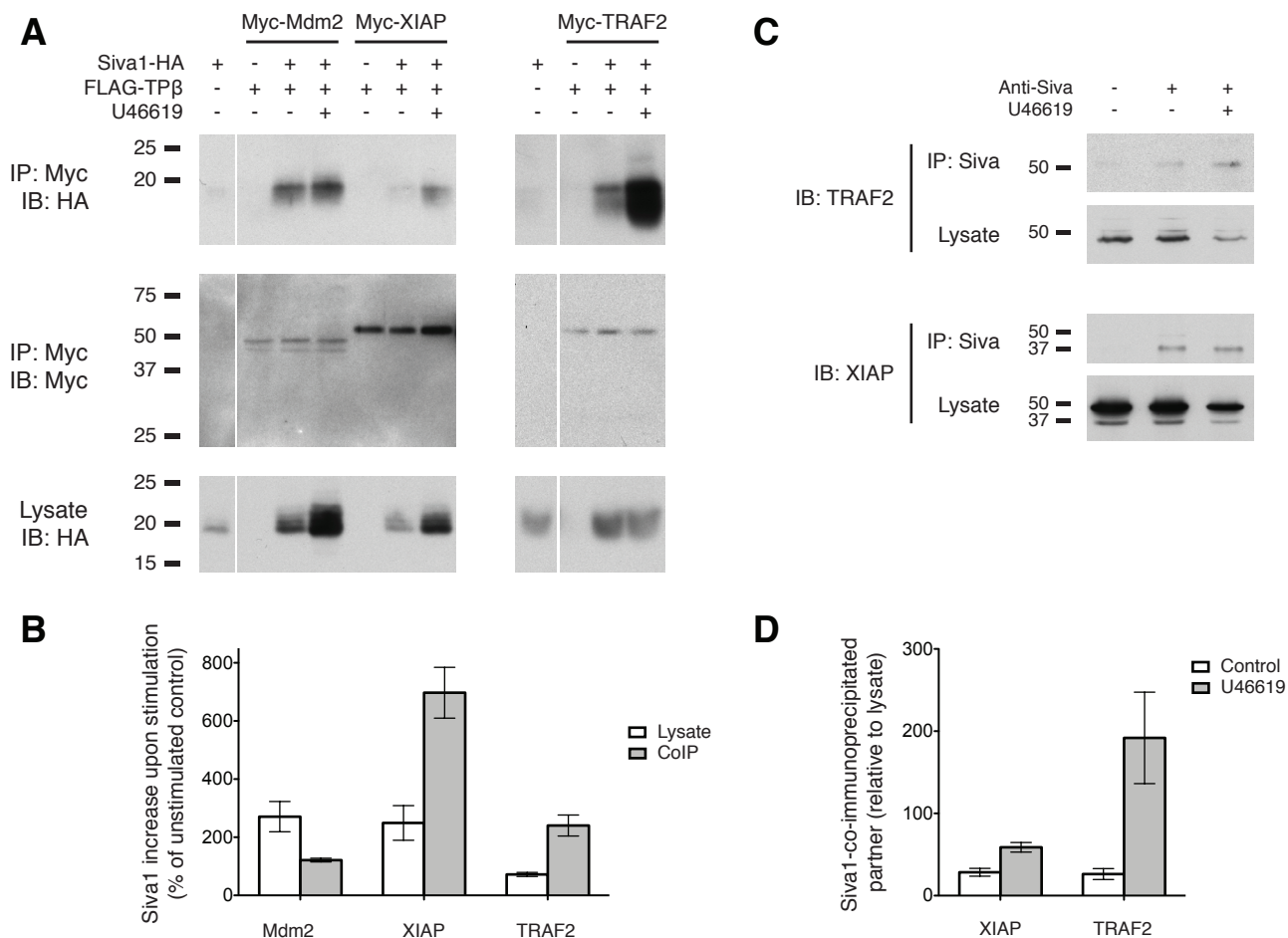


FIGURE 8.5: TP stimulation enhances the Siva1 interaction with XIAP and TRAF2 while diminishing the interaction between Siva1 and Mdm2

(A) HEK293 cells were co-transfected with Siva1-HA, FLAG-TP β and Myc-Mdm2, Myc-XIAP or Myc-TRAF2. After 48 h, cells were treated or not with U46619 for 5 h before performing the co-immunoprecipitations. (B) The Siva1 increase upon U46619 stimulation shown in (A) was quantified in the lysate panels (white series) and in the co-immunoprecipitation panels (grey series) of three independent experiments. (C, D) Co-immunoprecipitation of endogenous XIAP or TRAF2 by goat anti-Siva antibodies was performed in HeLa cells and confirmed the results obtained in (A) and (B). Results shown in both histograms are the mean \pm S.D. of three independent experiments.

8.3.3.6. TP stimulation induces translocation of Siva1 to the cytoplasm

Siva1 was reported to be predominantly located in the nucleus (4), although subpopulations have been described in the cytosol, plasma membrane and

mitochondria (5,7). Because Mdm2 is mostly nuclear (22) while XIAP and TRAF2 are both cytosolic proteins (23,24), we hypothesized that TP stimulation might induce a translocation of Siva1 from its nuclear location to the cytoplasm, thereby decreasing its interaction with Mdm2 and enhancing its association with XIAP and TRAF2. We thus performed live confocal microscopy imaging of HeLa cells expressing low levels of a Cherry-HA-Siva1 construct (Figure 6 and Supplementary material 3).

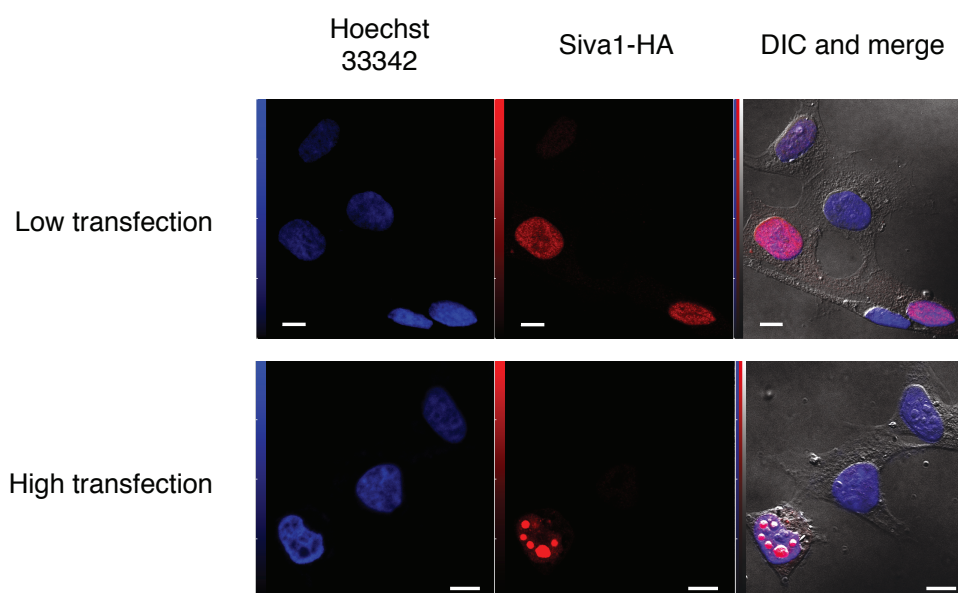


FIGURE 7.Supp3: Siva1 accumulates in “dot-like structures” at very high transfection levels, but not at low levels

Siva1 was previously observed to accumulate in yet unidentified nuclear “dot-like structures” (4,5). Although we were able to reproduce such phenomenon in HEK293 cells, this required extremely high transfection levels about 100 times above what was used for all of our other experiments. Shown in the figure are HEK293 cells transfected with low (0.02 μ g) or high (2 μ g) quantities of Siva1-HA plasmid using *TransIT-LT1* Reagent (Mirus, WI) and stained with a monoclonal anti-HA antibody (MMS-101P, Covance, NJ) and an Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse secondary antibody (A21202, Molecular Probes, CA) as described in the Material and methods section. LUT table on the left. Scale bar is 10 μ m.

In accordance with our earlier demonstration of increased Siva1 expression following TP stimulation, the Cherry-HA-Siva1 fluorescence markedly increased after 3 to 6 h of U46619 treatment. Progressive Siva1 translocation to the cytoplasm could be observed until about 12 h after receptor stimulation, where Siva1 appeared in equivalent proportions at the nucleus and the cytoplasm. Cytosolic staining was usually diffuse, but punctate accumulations could often be seen (Figure 6B), as reported by others (5). In some cells, apoptosis – as evidenced by blebbing seen in the differential interference contrast channel and Hoechst condensation – followed Siva1 translocation by 2 to 12 h (Figure 6A). Co-transfection of GFP-TP β along with Cherry-HA-Siva1 appeared to accelerate and amplify all of the aforementioned processes (Figure 6B), with Siva1 translocation to the cytoplasm usually complete after 4-6 h and cell blebbing/contraction initiated after 6-8 h of receptor stimulation. Translocation and increase of expression of Siva1, as well as Siva1-induced apoptosis were also observed by immunostaining of the endogenous proteins (Figure 6E and Supplementary material 4). However, in the absence of a transfection elevating total Siva1 expression, the apparition of apoptotic cells following U46619 stimulation required a concomitant treatment with sub-toxic doses of cisplatin, further supporting our dose-response results presented in Figure 2A. Finally, Siva1 translocation from the nucleus to the cytoplasm following endogenous TP stimulation was confirmed biochemically by performing cell fractionation experiments (Figure 6C and D).

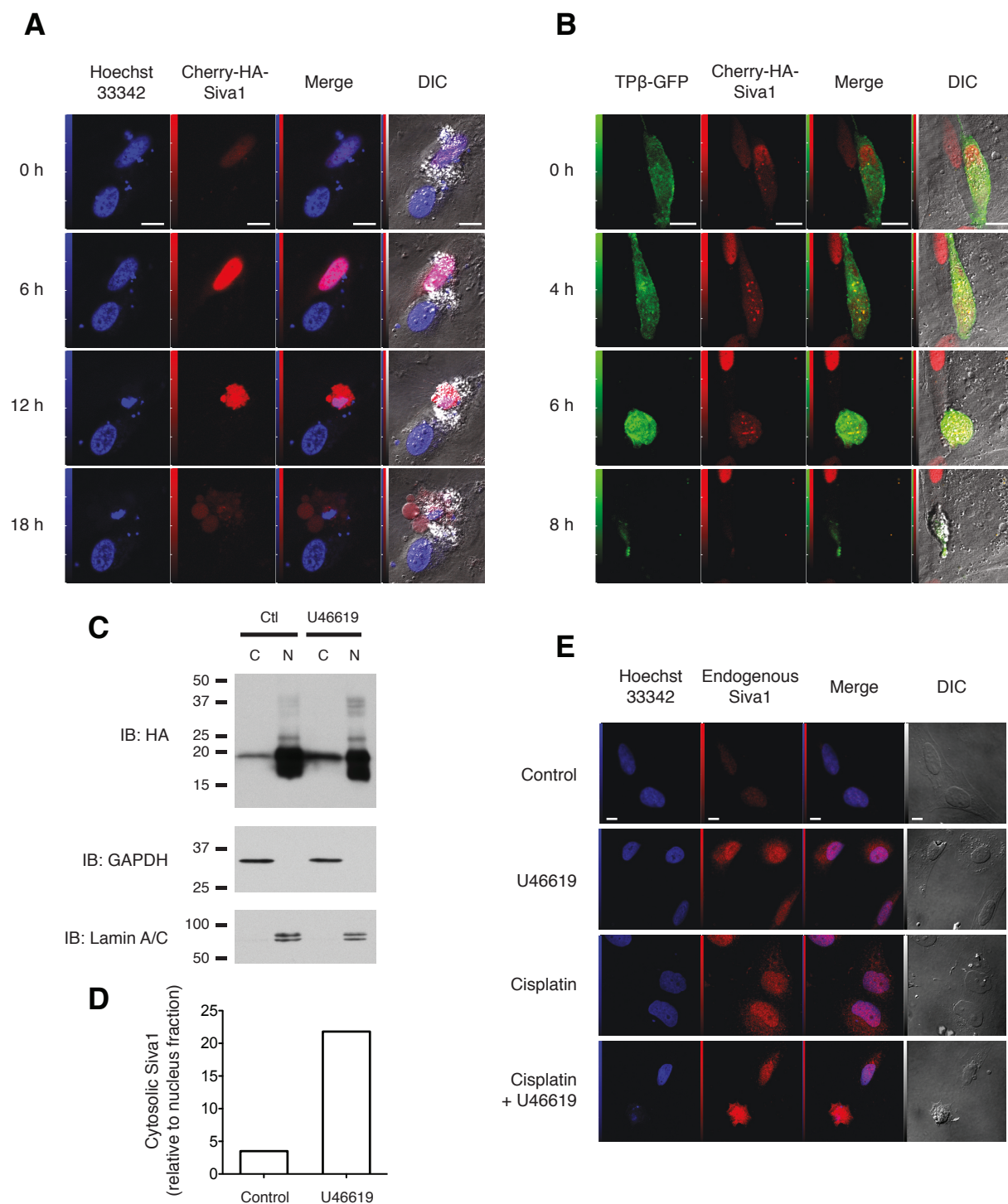


FIGURE 8.6: Siva1 is predominantly nuclear but translocates to the cytoplasm upon TP stimulation

(A) Live confocal microscopy of Cherry-Siva1-transfected HeLa cells. Before stimulation, Siva1 mostly co-localizes with the Hoechst 33342-stained nucleus. After a 6 h U46619 stimulation of endogenous TP, Cherry-Siva1 fluorescence is noticeably increased, enabling the visualization of a cytosolic population. This

population progressively increases until the nucleus is undistinguishable from the cytoplasm, at about 12 h of receptor stimulation. At this point in time, apoptosis hallmarks such as DNA condensation and cell contraction can be seen, culminating in extensive blebbing after 18 h of TP stimulation. **(B)** Co-transfection of GFP-TP β with Cherry-Siva1 accelerates the process, with complete loss of nuclear demarcation on the Siva1 channel by 4 h and apparition of apoptosis hallmarks by 8 h of receptor stimulation. **(E)** Confocal microscopy of fixed HeLa cells stained for endogenous Siva1 reveals similar results. Initially low, Siva1 signal is increased upon a 16 h 1 mM U46619 stimulation where a cytoplasmic population also appears. As reported in figure 2, concomitant sub-toxic 50 μ M 16 h cisplatin treatment is required to visualize apoptosis in non-transfected cells. Scale bar is 10 μ m. LUT table for all channels is shown on the left. **(C)** Fractionation experiments in HeLa cells show transfected Siva1-HA to be mainly localized to the nucleus, although, as with the confocal experiments, a cytosolic population can be seen. Upon endogenous TP stimulation, signal from the cytosolic fraction is increased relative to the nuclear fraction. Immunoblotting of GAPDH and lamin A/C show the adequate separation of the cytosolic and nuclear fractions, respectively. **(D)** Quantification of Siva1 found in the cytosolic fraction relative to that detected in the nuclear fraction.

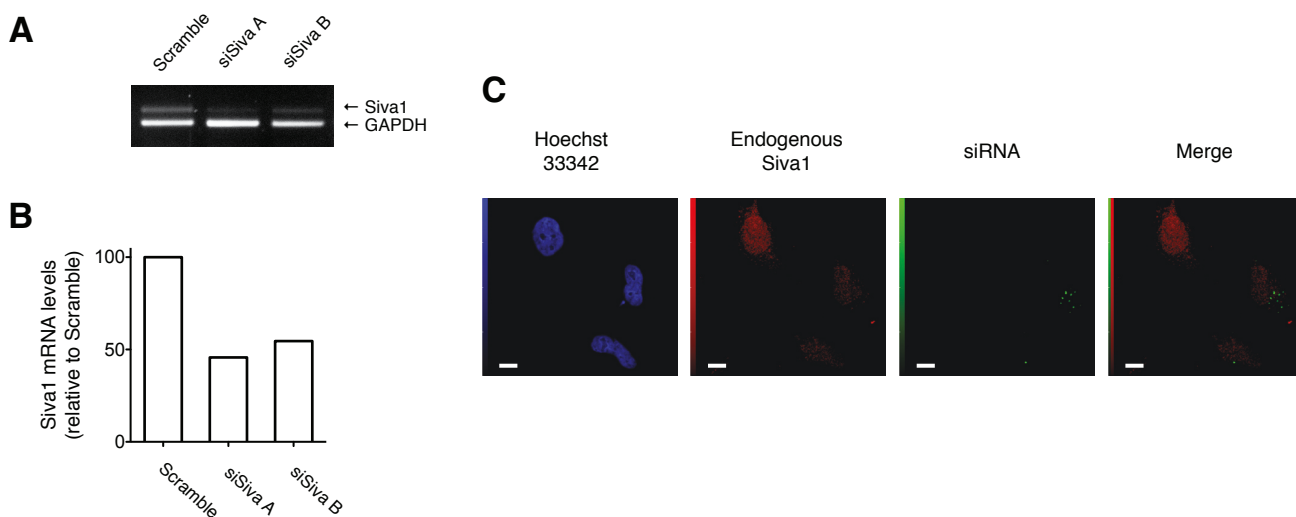


FIGURE 7.Supp4: Assessment of siSiva siRNAs efficacy and Siva antibody specificity

(A) Both siSiva siRNAs effectively repress Siva1 mRNA levels by ~50%. mRNA levels were assessed by reverse transcription and semi-quantitative PCR. Total cellular RNAs were isolated with the TRIZOL reagent (cat. 15596-018 Invitrogen, CA) from HeLa cells transfected with scrambled or Siva1-specific siRNA for 24 h. cDNAs were synthesized with oLido(dT) Superscript II RT (cat. 18064-014 Invitrogen, CA), and amplified with *Taq* DNA polymerase (cat. M0267S New

England BioLabs, MA) with the following primers: Forward-5', 5'-GTGAAGGCCGACTTTTGAGA-3', and Reverse-3', 5'-GATTTGGGTACTTTGGGTGG-3' (500 bp). Controls consisted of RT-PCR of Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA. PCR products were separated on a 1.5 % agarose gel and revealed by ethidium bromide staining. **(B)** Quantification of (A). **(C)** The confocal microscopy signal of anti-Siva (FL-175)-stained HeLa cells is abrogated by the transfection of the FITC-labeled siSivaB siRNA, confirming that the antibody is specific to Siva and that the siRNA effectively suppresses Siva at the protein level. Confocal microscopy and siRNA transfection were performed as described in the Materials and methods section. LUT is shown on the left. Scale bar is 10 μ m.

8.3.3.7. *Siva1 is required for TP-mediated modulation of apoptosis*

We next evaluated whether Siva1 expression was required for the modulation of apoptosis by TP. Two different FITC-labelled siRNAs targeting exon 2 and 4 of human Siva1 were transfected into HeLa cells (Fig. 7A and Supplementary material 4). Twenty-four hours after siRNA transfections, cells were treated overnight with cisplatin and concomitantly stimulated with 1 μ M U46619, the agonist concentration that maximally promoted the cisplatin-induced apoptosis in Figure 2A. Apoptosis assessment by annexin V staining and PARP cleavage demonstrated that the promotion of cisplatin-induced apoptosis by TP stimulation was severely compromised in cells transfected with the siRNAs targeting Siva1 compared to cells transfected with the control scrambled siRNA (Figure 7), confirming the importance of Siva1 in the modulation of apoptosis by TP.

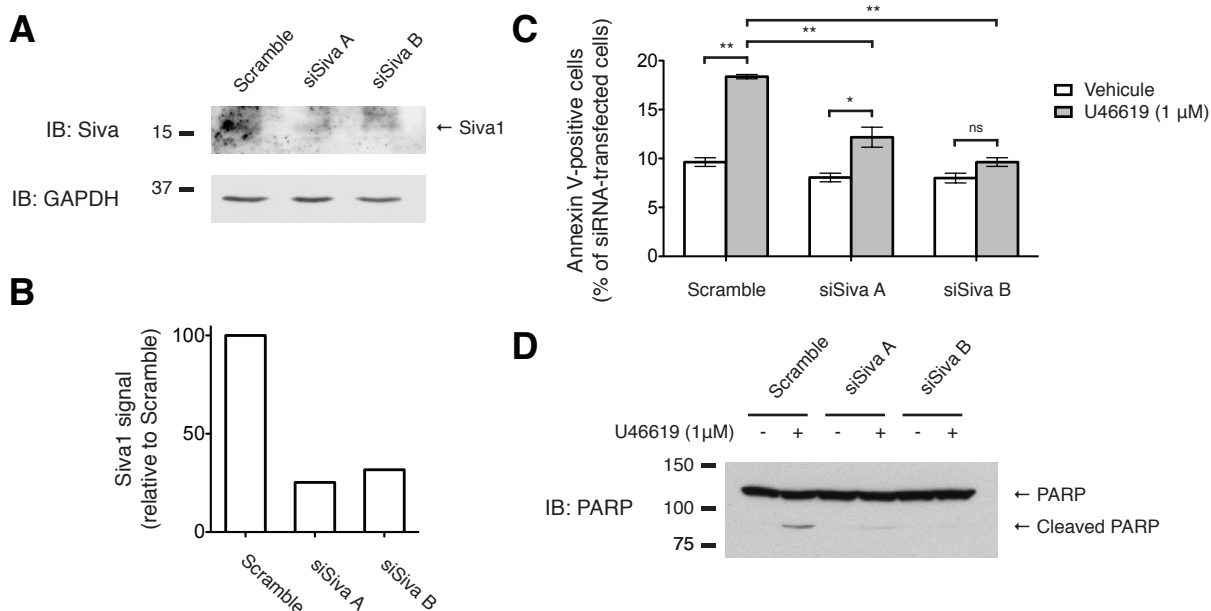


FIGURE 8.7: Siva1 is required for apoptosis modulation by TP

(A) Knock-down efficacy of siRNAs targeting exon 2 (siSiva A) and exon 4 (siSiva B) of Siva1 was assessed by Western blotting of endogenous Siva. (B) Quantification of (A). (C, D) Cells were transfected with FITC-labeled siRNAs and treated with 1 μM U46619 or vehicle for 5 h, concomitant with an overnight 50 μM cisplatin treatment. Annexin V staining of transfected cells (C) and PARP cleavage (D) analysis show that Siva1 knock-down by both siRNAs significantly reduced promotion of apoptosis by U46619. Statistical analysis performed using unpaired t test. * is $P < 0.05$ and ** is $P < 0.01$.

8.3.4. Discussion

When trying to sum up the results of various studies on the role of TXA_2 in the modulation of apoptosis, one striking element that emerges is that most studies performed in primary cell cultures reported TP as a pro-apoptotic receptor (e.g. T lymphocytes (18), cardiomyocytes (17), platelets (16)), whereas the majority of studies reporting TXA_2 as a pro-proliferative mediator were performed using either cancer cells (e.g. human bladder cancer specimens (25), pulmonary cancer cell line NCI-H23 (26)), or thromboxane synthase inhibitors (25,27). In the latter case, deducing the outcome of TP signalling by using synthase inhibitors is challenging because, by blocking TXA_2 synthesis, those inhibitors also drive the balance of

eicosanoids towards other mediators such as prostacyclin (28) that itself possesses pro-apoptotic properties (29). As for studies performed in cancerous cells, one must keep in mind that one of their most important features is their ability to evade apoptosis. To that end, the preponderance of cancerous cells show impaired p53 function (30). It is tempting to speculate that the outcome of TP signalling might shift from pro-apoptotic in “healthy cells” to proliferative in cancer cells. Here, we demonstrated that siRNA-mediated knock-down of Siva1 severely reduced the promotion of apoptosis by TP. Because Siva1 is a direct transcriptional target of p53 (7), we suggest that impaired p53 function might prevent Siva1 expression and therefore the promotion of apoptosis by TP. In support of this hypothesis, promotion of apoptosis by TXA₂ required a concomitant cisplatin treatment in HeLa cells (Figure 2). Because Siva1 induction by U46619 and cisplatin is additive (Figure 4D), we believe that the co-treatment might be required to elevate Siva1 levels past the threshold required for TP signalling towards apoptosis – a situation that might not happen in p53-deficient cells.

In addition, we showed that the cisplatin treatment induced TXA₂ production by HeLa cells. This suggests the presence of a positive feedback loop in which the DNA-damage-response in one cell might sensitize itself or neighbouring cells to DNA-damage-induced apoptosis. To the best of our knowledge, ours is the first *in vitro* demonstration of TXA₂ production upon cisplatin treatment. Clinically, it was reported that urinary excretion of TXB₂ was increased 4.5-fold during and immediately after cisplatin infusion in patients treated for various malignancies (31). TXA₂ production was also observed following treatment with other cytotoxic drugs such as gentamicin (32) and cyclosporine (33). This further supports the clinical relevance of our findings and implies that not only might a defective TP-Siva axis contribute to apoptosis resistance in tumours, but a functional TP-Siva axis in surrounding normal tissues and organs might also contribute to the toxicity of the chemotherapeutic treatment.

Whether Siva1 is pro- or anti-apoptotic has recently been the subject of debate (4,11) which could be resolved in part by our data. While Siva1 was mainly known to induce apoptosis through extrinsic, intrinsic and caspases-independent pathways (4,5), an elegant study by Du *et al.* revealed that, by simultaneously binding p53 and Mdm2, Siva1 potentiated p53 ubiquitination and proteasomal degradation, effectively inhibiting apoptosis (11). Here, we demonstrate that following TP stimulation, Siva1 translocates from the nucleus to the cytosol where it progressively accumulates because of hindered degradation. Since others reported that Siva1 stability could be decreased by LPA₂-induced ubiquitination (34), we tried to assess whether the opposite would hold true with TP, where U46619 might decrease Siva1 ubiquitination. However, we found basal Siva1 ubiquitination levels to be so low that no further decrease could be observed (data not shown), suggesting that Siva1 stabilization by TP might occur through mechanisms other than regulation of protein ubiquitination, which might include phosphorylation, other ubiquitin-like modifiers or the N-end rule pathway. Aside from Siva1 stabilization, we also showed that TP stimulation enhances both pro-apoptotic Siva1/TRAF2 and Siva1/XIAP interactions whilst reducing the anti-apoptotic Siva1/Mdm2 interaction. With regards to the Siva1/Mdm2 interaction, the bearing of the residual co-immunoprecipitation signal observed following stimulation (Figure 5A) remains to be ascertained. It could be that some level of this anti-apoptotic interaction is actually maintained, but overrun by the stabilised cytoplasmic Siva1 interacting with XIAP and TRAF2. Another possibility would be that in cells destined to enter apoptosis, the anti-apoptotic Siva1/Mdm2 interaction is completely lost and that the impression of its conservation results from the fact that western blots study an unsynchronized cell population. Whatever the case, we do suggest that the Siva1 function at the nucleus might indeed be anti-apoptotic through the reported p53-Mdm2 scaffold and that its pro-apoptotic properties might appear once it has translocated to the cytoplasm where it can access not only TRAF2 and XIAP, but also the mitochondria (5) where Bcl-2 and Bcl-xL are located. We believe this is the first model unifying the pro-

and anti-apoptotic roles of Siva1 and showcasing a live modulation of Siva1 localization and function by agonist stimulation of a receptor. A schematic representation of our proposed mechanism is illustrated in Figure 8.

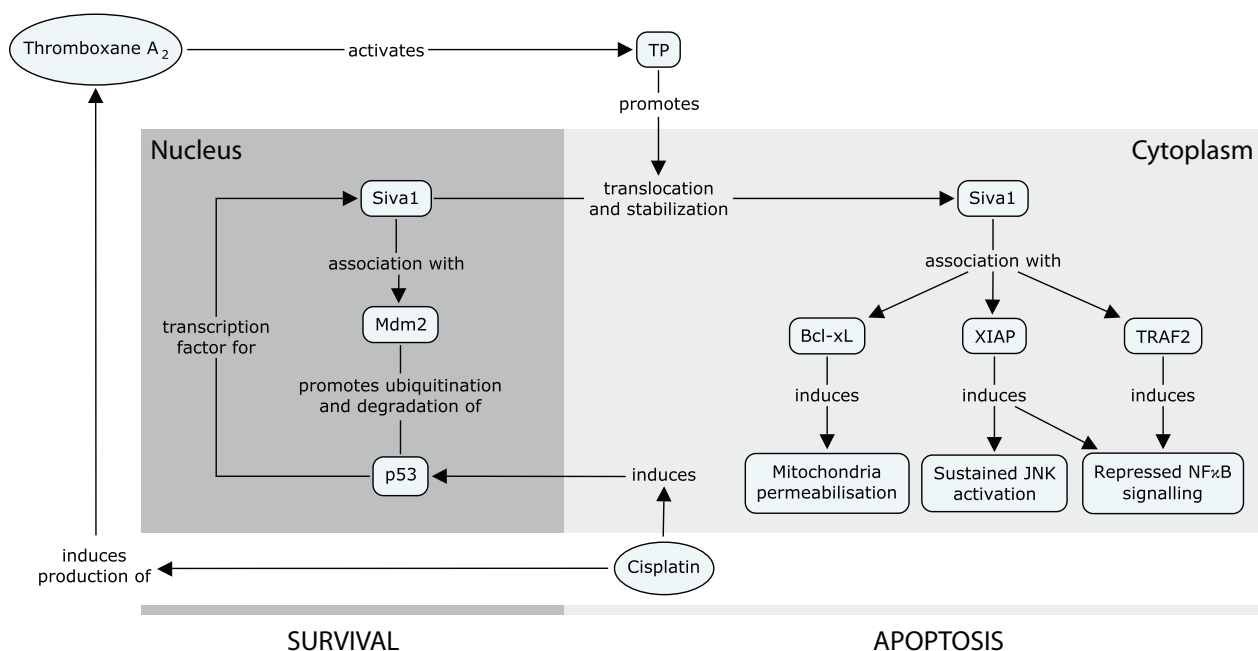


FIGURE 8.8: Proposed schematic model of Siva1 regulation

Siva is expressed at low levels in normal cells and is mainly localized at the nucleus, where it can bind Mdm2 and suppress p53 activity, thus promoting cell survival. TP stimulation induces a translocation of Siva1 to the cytoplasm, where it accumulates and interacts with Bcl-xL, XIAP and TRAF2 to promote apoptosis. Cisplatin treatment induces thromboxane A₂ production as well as p53 activity through its DNA-damaging action, resulting in an induction of Siva1 transcription. Finally, Siva1 is required for the promotion of apoptosis by TP. We postulate that this prerequisite might not be met in cancerous cell lines with impeded p53 activity, possibly explaining why, to the best of our knowledge, TP was only ever shown to induce apoptosis in primary cell cultures.

Lastly, we demonstrated that Siva1 directly interacts with the C-tail and intracellular loops of TPβ. Interestingly, total expression and localisation of Siva1ΔC, which displayed dramatically reduced interaction with TPβ, could be modulated by TP stimulation similarly to full-length Siva1 (data not shown). This could suggest that 1) the interaction is not involved in those two processes, which

might be triggered by other receptor signalling pathways; or 2) that the residual TP β -Siva1 interaction is sufficient for TP β to mediate its effects on Siva1. The fact that receptor stimulation decreased the co-immunoprecipitation with Siva1 suggests that the association might be constitutive, where TP could sequester a small cytoplasmic Siva1 fraction existing at the basal state and release it upon stimulation. This could further contribute to the TP-induced cytoplasmic Siva1 accumulation and enhanced interaction with pro-apoptotic partners. The correlation between TP-Siva1 dissociation and Siva1 stabilisation would also support the observations reported for the anti-apoptotic LPA₂ receptor where an agonist-induced stabilisation of the LPA₂-Siva1 interaction lead to increased Siva1 ubiquitination and degradation (34). In any case, ours is the first report of Siva1 interacting with a pro-apoptotic GPCR and the first to demonstrate that Siva1 expression is required to couple the receptor to apoptosis modulation. Whether the direct interaction between TP and Siva is required for this effect to occur or rather serve a distinct unknown function remains to be seen, but our data does reveal a completely new mechanism of GPCR-mediated apoptosis modulation that had never been appreciated before.

Better understanding of apoptosis regulation is critical not only to cancer research, but also to our comprehension of inflammatory and hypoxia responses. With its proven involvement in cardiovascular diseases, immune regulation and cancer (1), TXA₂ is at the crossroads of all of those processes. We showed here that a DNA-damaging cisplatin treatment induced TXA₂ synthesis in HeLa cells. In turn, stimulation of TP promoted cisplatin-induced apoptosis, which required Siva1 expression. We demonstrated that TP stimulation caused Siva1 to accumulate by inhibiting its degradation and provoked its translocation from the nucleus to the cytoplasm. This translocation resulted in decreased interaction with Mdm2, and enhanced association with XIAP and TRAF2. The model derived from our data explains, at least in part, the dual pro- and anti-apoptotic roles that were reported for Siva1. Together, our findings may have clinical implications in the use

of COX inhibitors during cisplatin chemotherapy and provide mechanistic insight required to improve treatment effectiveness (35) and alleviate some of its complications (36).

8.3.5. Materials and methods

8.3.5.1. Reagents

Anti-GST polyclonal anti-body (cat. A190-122A) was from Bethyl Laboratories, TX. Rat monoclonal HRP-coupled anti-HA antibody (clone 3F10) was from Roche Diagnostics, Switzerland. Anti-PARP monoclonal antibody (cat. 556494) was from BD Pharmingen, NJ. Anti-GAPDH (FL-335), anti-Lamin A/C (H-110) anti-c-Myc (A-14) and anti-Siva (FL-175, C-20 and N-19) polyclonal antibodies, anti-Mdm2 (SMP14) monoclonal antibody as well as protein G PLUS-agarose were purchased from Santa Cruz Biotechnology, CA. Anti-FLAG monoclonal (M2) and polyclonal (F7425) antibodies were from Sigma-Aldrich, MO. Anti-human TP receptor polyclonal antibody (cat. 10004452) was from Cayman Chemical Company, MI. XIAP (3B6) and TRAF2 (C192) polyclonal antibodies were from Cell Signalling Technology, MA. HRP-linked anti-Myc polyclonal antibody (ab1261) was from Abcam, UK. HRP-linked anti-rabbit (NA934V) and anti-mouse (NA931V) secondary antibodies were from GE Healthcare, UK. Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit (cat. A-11035) secondary antibody was from Molecular Probes, CA. Cisplatin (cis-Diammineplatinum(II) dichloride, cat. P4394) and cycloheximide (cat. C4859) were from Sigma-Aldrich, MO. U46619 (cat. 16450) and SQ29548 (cat. 19025) were from Cayman Chemical Company, MI.

8.3.5.2. Plasmid Constructs

The full-length open reading frame of Siva1 was cloned by RT-PCR using template RNA extracted from HeLa cells. The HA-tagged Siva1 constructs were generated by PCR using the Phusion High-Fidelity PCR system (New England

Biolabs, MA) and with primers containing the HA epitope in-frame with the C terminus of the Siva1 ORF. The PCR products were inserted into either the pcDNA3 expression vector (Invitrogen, CA) to yield the Siva1-HA and Siva1 Δ C-HA constructs or into the pRSETa expression vector (Invitrogen, CA) to yield the 6xHis-Siva1-HA, 6xHis-Siva1 Δ C-HA and 6xHis-Siva1 $\Delta\Delta$ C-HA constructs. The Cherry-HA-Siva1 construct was generated by inserting the HA-tagged Siva1 ORF in the pmCherry plasmid (cat. 632522, Clontech, CA). Generation of the TP constructs in the pGEX-4T-1 vector (GE Healthcare, UK) was described previously (3). Myc-Mdm2, Myc-TRAF2 and Myc-XIAP were all cloned by RT-PCR from HeLa cells mRNA and inserted into the pcDNA3 expression vector (Invitrogen, CA).

8.3.5.3. *Cell culture, transfection and stimulation*

HEK293 and HeLa cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum (Invitrogen, CA) at 37 °C in a 5 % CO₂ humidified atmosphere. Transfections of both cell types were performed at 50-70 % confluence using *TransIT-LT1* Reagent (Mirus, WI) according to the manufacturer's protocol. Whenever agonist or antagonist treatments were required, the culture medium was changed to medium containing the relevant compound (DMEM 0,5 % BSA, 20 mM Hepes) 30 min prior to stimulation start and kept for the remaining of the experiment.

8.3.5.4. *Yeast two-hybrid screen*

The yeast two-hybrid screen was performed as described previously (3). Briefly, a plasmid containing the C-terminus of TPb (pAS2-1-TPbCT) was transformed into the yeast strain pJ69-4a according to the lithium yeast transformation protocol. This stably transformed clone was then transformed with a Human HeLa MATCHMAKER cDNA Library or with the empty pGad424 plasmid (Clontech, CA).

Positive clones were initially selected for growth in the absence of histidine. Clones showing positive interactions were then isolated, and these interactions were confirmed by growth on quadruple selective media (Trp⁻, Leu⁻, His⁻ and Ade⁻). pGADGH plasmids containing the library inserts from positive colonies were isolated and transformed into the DH10B bacterial strain. Plasmids were extracted from DH10B cells and transformed once more into yeast with either the bait (pAS2-1/TPbCT) or the negative control (pAS2-1) and plated on quadruple selective medium (Trp⁻, Leu⁻, His⁻ and Ade⁻) to confirm the interaction. The selected plasmids were then sequenced by dideoxy sequencing, and the identities of the clones were determined by using the NCBI BLAST alignment tool.

8.3.5.5. *Recombinant protein production and binding assays*

His- and GST-tagged fusion proteins were produced in OverExpress C41(DE3) *Escherichia coli* strain (Avidis, France) according to the manufacturer's instructions. His-tagged recombinant proteins were purified using nickel-nitrilotriacetic acid-agarose resin (cat. 1018244 Qiagen, Germany), while GST-tagged recombinant proteins were purified using glutathione-Sepharose 4B (cat. 17-0756-01 GE Healthcare, UK) as per the manufacturers' instructions. Purified recombinant proteins were analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining. Glutathione-Sepharose bound GST-tagged fusion protein was incubated with purified histidine protein in binding buffer (10 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % glycerol, and 0.5 % Igepal) supplemented with protease inhibitors (9 mM pepstatin, 9 mM antipain, 10 mM leupeptin, and 10 mM chymostatin) and 2 mM DTT overnight at 4 °C. The binding reactions were then washed 4 times with binding buffer. SDS sample buffer was added to the binding reactions, and the tubes were boiled for 5 min. The binding reactions were analyzed by SDS-PAGE, and immunoblotting was performed with the indicated specific antibodies.

8.3.5.6. *Immunoprecipitations*

HEK293 cells were transiently transfected with the indicated constructs and maintained as described above for 48 h in 60 mm petri dishes. Immunoprecipitations of endogenous proteins were performed in HeLa cells. Where indicated, cells were then stimulated with TP agonist U46619 at a 100 nM concentration for 5 h. Cells were subsequently washed with ice-cold PBS and harvested in 200 μ l of lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8, 1 % Igepal, 0.5 % Sodium-deoxycholate, 0.1 % SDS, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, and 5 mM EDTA) supplemented with protease inhibitors (9 nM pepstatin, 9 nM antipain, 10 nM leupeptin, and 10 nM chymostatin (Sigma-Aldrich, MO)). After incubation in lysis buffer for 60 min at 4 °C, the lysates were cleared by centrifugation for 20 min at 14 000 RPM at 4 °C. Lysates were brought to equal protein concentration following protein dosage with the DC protein assay kit (cat. 500-0112, Bio-Rad, CA) and 1 μ g of specified antibody was added to between 500 and 900 μ g of supernatant, depending on the experiment. After an overnight incubation at 4 °C, 30 μ l of 50 % protein G-agarose was added, followed by a 1 h incubation at 4 °C. Samples were then centrifuged for 1 min and washed three times with 1 ml of lysis buffer. Immunoprecipitated proteins were eluted by the addition of 25 μ l of Laemmli buffer followed by a 30 min incubation at 37 °C. Initial lysates and immunoprecipitated proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using specific antibodies.

8.3.5.7. *Apoptosis induction and assessment*

HeLa cells were harvested to 50 % confluence. Culture medium was then changed for stimulation medium (DMEM 0,5 % BSA, 20 mM HEPES) containing cisplatin at the specified concentration, along with the indicated agonists or antagonists. If siRNAs were to be transfected, cells were allowed to reach 80-90 % confluence and transfection occurred one day prior to the start of the

cisplatin treatment. Sixteen to 24 h following the start of the cisplatin treatment, cells were washed with 1 mL of room temperature PBS and trypsinized for 15 min. Trypsinization was stopped by the addition of DMEM 10 % FBS culture medium and cells collected in 15 mL tubes using polystyrene pipettes. During this procedure, initial culture medium and washing buffer were collected along with the trypsinized cells to ensure that cells floating prior to trypsinization were included in the experiment. Pipette “up and downs” were avoided as much as possible. Cells were pelleted by centrifugation at no more than 300 g and washed in 1 mL of annexin V binding buffer (150 mM NaCl, 10 mM Hepes, 2,5 mM CaCl₂), before being finally resuspended in 100 µL of annexin V binding buffer containing 3 µL of Alexa fluor 647-conjugated annexin V (cat. 640912, BioLegend, CA) and 1 µM propidium iodide (Molecular Probes, CA). Cells were incubated 15 min on ice before being read on a FACSCalibur (BD Biosciences, NJ) flow cytometer using appropriate lasers and filter sets. BD’s CellQuest Pro 5.2.1 software was used to acquire and analyze 30 000 events. If siRNAs were transfected, the green FL-1 channel was used to assess transfection efficiency (usually about 60-70 %) and non-transfected cells were excluded from the analysis. Remaining cells after the FACS reading were then pelleted and lysed in 50 µL of a highly denaturing lysis buffer (100 mM NaCl, 50 mM pH 8 Tris, 1 mM EDTA, 1 % Igepal, 0.5 % sodium-deoxycholate, 1 % SDS and 4 M urea) for 60 min. Lysates were cleared by centrifugation, dosed using the DC protein assay kit (cat. 500-0112, Bio-Rad, CA) and SDS-PAGE and immunoblotting were performed using 50 µg to reveal PARP cleavage.

8.3.5.8. *Thromboxane production assay*

HeLa cells harvested to 50 % confluence were treated with various concentrations of cisplatin for 48 h. Culture medium was collected and analyzed using the thromboxane B₂ EIA kit (cat. 519031) from Cayman Chemical Company, MI, as per the manufacturer’s instructions.

8.3.5.9. *Siva1* expression

HEK293 cells were plated on day 1, transfected as indicated on day 2 and stimulated on day 4. For experiments assessing the expression of endogenous proteins, stimulations were performed in HeLa cells upon achievement of desired confluency. Cells were then washed with ice-cold PBS and harvested in 50 μ l of lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8, 1 % Igepal, 0.5 % Sodium-deoxycholate, 0.1 % SDS, 10 mM Na₄P₂O₇, and 5 mM EDTA) supplemented with protease inhibitors (9 nM pepstatin, 9 nM antipain, 10 nM leupeptin, and 10 nM chymostatin (Sigma-Aldrich, MO)). After incubation in lysis buffer for 60 min at 4 °C, the lysates were cleared by centrifugation for 20 min at 14 000 RPM at 4 °C. Lysate concentration was assessed with the DC protein assay kit (cat. 500-0112, Bio-Rad, CA) and 30-50 μ g of proteins were denatured using Laemmli sample buffer and submitted to SDS-PAGE, western blotting on nitrocellulose membranes (BA85 Protran, Whatman, UK) and immunolabelling using the specified antibodies. When multiple immunolabelings were required, membranes were striped by two sequential 7 min room-temperature incubations in water 0,2 M NaOH. After extensive washing to remove residual NaOH, membranes were immunolabeled again.

8.3.5.10. *Cycloheximide chase assay*

HEK293 cells were transfected with FLAG-TP β and Siva1-HA. After 48 h, culture medium was changed for the stimulation medium and cells were treated for 3 h with 100 nM U46619. Cycloheximide was then added to reach a final concentration of 100 μ g/mL and cells were harvested for 15, 30, 60, 120 or 180 min. At the required times, cells were washed with ice-cold PBS, collected, pelleted and flash-frozen in liquid nitrogen. Once all samples were frozen, cells were lysed as described for the Siva1 expression experiment and 30-50 μ g of

lysate proteins were analyzed by SDS-PAGE, western blotting and immunolabelling using the specified antibodies.

8.3.5.11. *Confocal microscopy*

Live confocal microscopy was performed in HeLa cells plated and transfected with appropriate plasmids in Lab-Tek II chambered coverglass (cat. 155379, Thermo Fischer Scientific, MA). The day following transfection, the cell culture medium was changed to stimulation medium containing 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342 (cat. H21492, Invitrogen, CA) and cells were serum-starved for 4 h. The slide was then loaded on a H117 ProScan II (Prior Scientific, UK) high-precision motorized stage coupled to a FV1000 confocal microscope (Olympus, Japan). Environmental control systems from Solent Scientific, UK, were used to maintain a 37 °C temperature and constant CO₂ and moisture levels throughout the experiment. Five to 6 fields containing 3-10 transfected cells were selected in each of the two chambers and their coordinates were entered as a multi-area time-lapse protocol in the FV10-ASW 2.1.3.10 software (Olympus, Japan). Five-layers Z-stack acquisitions were performed using a 63x oil immersion objective. Each field was imaged once prior to stimulation and then once per hour for 18 hours after the addition of agonist in one of the two chambers. To minimize laser exposure, the confocal aperture was set to 300 μM and, in addition to the differential interference contrast signal, no more than two fluorescence channels were acquired in a single experiment. Hoechst and Cherry channels were acquired simultaneously, but a sequential acquisition was favoured for the GFP and Cherry combination because of fluorescence spectrum overlay concerns. ZDC focus drift compensation was used throughout the experiment. For fixed-cells confocal microscopy, HeLa cells were plated onto coverslips and grown overnight in DMEM 10% FBS. Cells were fixed with 3% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), washed with PBS, permeabilized with 0.1% Triton X-100 (cat. ICN807423, Thermo Fisher Scientific, MA) in PBS, and blocked with 0.1%

Triton X-100 in PBS containing 5% nonfat dry milk. Cells were then incubated with primary antibodies diluted in blocking solution, washed twice with PBS, blocked again with 0.1% Triton X-100 in PBS containing 5% nonfat dry milk, and incubated with appropriate secondary antibodies diluted in blocking solution. The cells were washed twice with permeabilization buffer, incubated 5 minutes in a Hoechst 33342-containing PBS solution and washed thrice with PBS. Coverslips were finally mounted using ProLong Gold antifade reagent (cat. P36934, Molecular Probes, CA). Confocal acquisitions were performed sequentially for each channel and every microscope slides within a single experiment were read on the same day and using the same settings. Following acquisition, images were pseudocolored using the FV10-ASW 2.0.1.0 viewer software (Olympus, Japan).

8.3.5.12. Cell fractionation

Fractionation was performed according to the Rapid, Efficient And Practical method (37). Briefly, HeLa cells transfected with the Siva1-HA construct were stimulated 5 h with 100 nM U46619, washed in ice-cold PBS and resuspended in 900 μ L of PBS 0.1 % Igepal to permeate the plasma membrane. After a 10 s pop-spin, 300 μ L of the supernatant was collected and considered the cytosolic fraction, which was then denaturated using 100 μ L of 4x Laemmli sample buffer. The remaining pellet was then washed with 1 mL of PBS 0.1 % Igepal and resuspended in 180 μ L of Laemmli sample buffer to become the nuclear fraction. The nuclear fraction was sonicated and both fractions were boiled for 5 min before being loaded for SDS-PAGE, western blotting and immunolabelling.

8.3.5.13. siRNA knock-down

Custom FITC-labeled Stealth siRNAs were purchased from Invitrogen, CA. The siSiva A (sense: AGUGCUGUGCACCAGCUGUTT anti-sense: ACAGCUGGUGCACAGCACUTT) was targeted at exon 2, while the siSiva B

(sense: GACCAAGCGACUCCUGUUCTT, anti-sense: GAACAGGAGUCGCUUGGUUCTT) was targeted at exon 4. A scrambled version of siSiva A was also ordered (sense: GUGCUCUGCGACGUUGACATT anti-sense: UGUCAACGUCGCAGAGCACTT) and used as a control. siRNAs were transfected in HeLa cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA) following the manufacturer's HeLa cell specific protocol.

8.3.5.14. *Image densitometry*

Western blot quantification was meticulously performed using a procedure we developed based on the recommendations of Gassmann *et al.* (38). Specifically, all quantified immunoblots were revealed using the same type of films (X-OMAT Blue XB, cat. 1776699, Kodak, NY) and carefully exposed to avoid saturation. Films were scanned using a dual lens Epson Perfection v700 Photo scanner (Epson, Japan) and the EPSON Scan Ver. 3.25A (Universal) software. Acquisition was performed at 400 dpi in 16-bits grayscale with auto-exposure and color-correction options turned off. Images were analyzed using the ImageJ 1.42q software. Lanes were selected and plotted using the "Gel analyzer" functions with only the central third of the lanes width being included by the lane selection rectangle. Peaks on the plots were individually closed to the background level of each lane using the "Straight line" tool and the enclosed area was measured using the "Wand" tool. Results were compiled in Microsoft Excel for Mac 2011 v14.1.0 (Microsoft Corporation, WA) and reported as the mean of all quantified experiments with standard deviation.

8.3.5.15. *Statistical analysis*

EC₅₀ and half-life calculations were performed in Prism 5.0b (GraphPad Software, CA) using respectively the "log (agonist) vs. response (three parameters)" and the "One phase decay" pre-set analyses and reported accordingly. Statistical analysis

were also performed in Prism 5.0b using the test and parameters mentioned in the figure legends.

8.3.6. Supplementary methods

8.3.6.1. Detailed Figure 5 analysis

We performed immunoprecipitations of Myc-tagged Mdm2, XIAP or TRAF2 transiently expressed in HEK293 cells along with Siva1-HA and Flag-TP β . As shown in Figure 5, Siva1 co-immunoprecipitated with Mdm2, XIAP and TRAF2 as reported by others (10-11, 21). In agreement with our previous results (Figure 4A), Siva1 expression increased in our total cell extract upon 5 h U46619 stimulation (Figure 5A, lysate panel), except when co-transfected with TRAF2. This could be explained by the E3-ligase activity of TRAF2 (40) that could blunt the U46619-induced increase in Siva1 expression. Interestingly, the increase in Siva1 detection (stimulated *versus* unstimulated lanes) in the co-immunoprecipitations (Figure 5A, upper panel) was not directly proportional to the amount of Siva1 protein seen in the lysates (Figure 5A, bottom panel). Densitometry was performed to quantify the amount of Siva1 detected in the stimulated samples relative to that in the unstimulated samples for each interaction partner and a comparison between the individual ratio calculated for the lysates and co-immunoprecipitations is shown in Figure 5B. The increase in Siva1 detected in the co-immunoprecipitation with XIAP and TRAF2 following U46619 stimulation was more than four times greater than that observed in the lysates. These findings held true when assessed on the endogenous proteins (Figure 5C). On the other hand, the increase in Siva1 that co-immunoprecipitated with Mdm2 after U46619 treatment was only half of that seen in the Siva1 lysates. Should TP stimulation not influence the interaction between Siva1 and its partners Mdm2, XIAP and TRAF2, we would expect the co-immunoprecipitation blots to look like that of the lysates and the calculated ratio in Figure 5B to be the same between the lysates and the co-immunoprecipitates.

Together, these results indicate that TP β stimulation enhanced the pro-apoptotic Siva1 interactions with XIAP and TRAF2 while decreasing the anti-apoptotic interaction between Siva1 and Mdm2.

8.3.7. Acknowledgments

CIM would like to thank Dr Audrey Parent for helpful advice and training in the early phases of this project. The authors are also grateful to Dr Leonid Volkov for his expertise in confocal microscopy and flow cytometry, and to Dr Jean-Bernard Denault for his guidance with regards to apoptosis detection techniques. CIM has a MD-PhD scholarship from the Fonds de la recherche en santé du Québec. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (to J.-L.P). J.-L.P. receives a “Chercheur boursier-Sénior” salary award from the Fonds de la recherche en santé du Québec and is the holder of the “André-Lussier Research Chair”.

8.3.8. Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

8.3.9. References

1. Nakahata N. Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics*. 2008 Apr.;118(1):18–35.
2. Parent JL, Labrecque P, Orsini MJ, Benovic JL. Internalization of the TXA2 receptor alpha and beta isoforms. Role of the differentially spliced cooh terminus in agonist-promoted receptor internalization. *J. Biol. Chem*. 1999 Mar. 26;274(13):8941–8948.

3. Parent A, Laroche G, Hamelin E, Parent J-L. RACK1 regulates the cell surface expression of the G protein-coupled receptor for thromboxane A(2). *Traffic*. 2008 Mar.;9(3):394–407.
4. Py B, Slomianny C, Auburger P, Petit PX, Benichou S. Siva-1 and an alternative splice form lacking the death domain, Siva-2, similarly induce apoptosis in T lymphocytes via a caspase-dependent mitochondrial pathway. *J. Immunol*. 2004 Apr. 1;172(7):4008–4017.
5. Singaravelu K, Padanilam BJ. p53 target Siva regulates apoptosis in ischemic kidneys. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2011 May;300(5):F1130–41.
6. Padanilam BJ, Lewington AJ, Hammerman MR. Expression of CD27 and ischemia/reperfusion-induced expression of its ligand Siva in rat kidneys. *Kidney Int*. 1998 Dec.;54(6):1967–1975.
7. Barkinge JL, Gudi R, Sarah H, Chu F, Borthakur A, Prabhakar BS, et al. The p53-induced Siva-1 plays a significant role in cisplatin-mediated apoptosis. *J Carcinog*. 2009;8:2.
8. Fortin A, MacLaurin JG, Arbour N, Cregan SP, Kushwaha N, Callaghan SM, et al. The proapoptotic gene SIVA is a direct transcriptional target for the tumor suppressors p53 and E2F1. *J. Biol. Chem*. 2004 Jul. 2;279(27):28706–28714.
9. Chu F, Borthakur A, Sun X, Barkinge J, Gudi R, Hawkins S, et al. The Siva-1 putative amphipathic helical region (SAH) is sufficient to bind to BCL-XL

and sensitize cells to UV radiation induced apoptosis. *Apoptosis*. 2004 Jan.;9(1):83–95.

10. Resch U, Schichl YM, Winsauer G, Gudi R, Prasad K, de Martin R. Siva1 is a XIAP-interacting protein that balances NFkappaB and JNK signalling to promote apoptosis. *Journal of Cell Science*. 2009 Aug. 1;122(Pt 15):2651–2661.
11. Du W, Jiang P, Li N, Mei Y, Wang X, Wen L, et al. Suppression of p53 activity by Siva1. *Cell Death Differ*. 2009 Nov.;16(11):1493–1504.
12. Spinicelli S, Nocentini G, Ronchetti S, Krausz LT, Bianchini R, Riccardi C. GTR interacts with the pro-apoptotic protein Siva and induces apoptosis. *Cell Death Differ*. 2002 Dec.;9(12):1382–1384.
13. E S, Lai Y-J, Tsukahara R, Chen C-S, Fujiwara Y, Yue J, et al. Lysophosphatidic acid 2 receptor-mediated supramolecular complex formation regulates its antiapoptotic effect. *J. Biol. Chem*. 2009 May 22;284(21):14558–14571.
14. Prasad KV, Ao Z, Yoon Y, Wu MX, Rizk M, Jacquot S, et al. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 1997 Jun. 10;94(12):6346–6351.
15. Ekambaram P, Lambiv W, Cazzolli R, Ashton AW, Honn KV. The thromboxane synthase and receptor signaling pathway in cancer: an emerging paradigm in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2011 Oct. 27;

16. Lin KH, Chang HC, Lu WJ, Jayakumar T, Chou HC, Fong TH, et al. Comparison of the relative activities of inducing platelet apoptosis stimulated by various platelet-activating agents. *Platelets*. 2009 Dec.;20(8):575–581.
17. Shizukuda Y, Buttrick PM. Protein kinase C-zeta modulates thromboxane A(2)-mediated apoptosis in adult ventricular myocytes via Akt. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002 Jan.;282(1):H320–7.
18. Remuzzi G, Noris M, Benigni A, Imberti O, Sayegh MH, Perico N. Thromboxane A2 receptor blocking abrogates donor-specific unresponsiveness to renal allografts induced by thymic recognition of major histocompatibility allopeptides. *J. Exp. Med.* 1994 Nov. 1;180(5):1967–1972.
19. Liel N, Mais DE, Halushka PV. Binding of a thromboxane A2/prostaglandin H2 agonist [3H]U46619 to washed human platelets. *Prostaglandins*. 1987 Jun.;33(6):789–797.
20. Severino A, Abbruzzese C, Manente L, Valderas AA, Mattarocci S, Federico A, et al. Human papillomavirus-16 E7 interacts with Siva-1 and modulates apoptosis in HaCaT human immortalized keratinocytes. *J. Cell. Physiol.* 2007 Jul.;212(1):118–125.
21. Gudi R, Barkinge J, Hawkins S, Prabhakar B, Kanteti P. Siva-1 promotes K-48 polyubiquitination of TRAF2 and inhibits TCR-mediated activation of NF-kappaB. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 2009;28(1):25–38.

22. Brown DR, Thomas CA, Deb SP. The human oncoprotein MDM2 arrests the cell cycle: elimination of its cell-cycle-inhibitory function induces tumorigenesis. *EMBO J.* 1998 May 1;17(9):2513–2525.
23. Vischioni B, van der Valk P, Span SW, Kruyt FAE, Rodriguez JA, Giaccone G. Expression and localization of inhibitor of apoptosis proteins in normal human tissues. *Hum. Pathol.* 2006 Jan.;37(1):78–86.
24. Lin Y, Ryan J, Lewis J, Wani MA, Lingrel JB, Liu Z-G. TRAF2 exerts its antiapoptotic effect by regulating the expression of Krüppel-like factor LKLF. *Mol. Cell. Biol.* 2003 Aug.;23(16):5849–5856.
25. Moussa O, Riker JM, Klein J, Fraig M, Halushka PV, Watson DK. Inhibition of thromboxane synthase activity modulates bladder cancer cell responses to chemotherapeutic agents. *Oncogene.* 2008 Jan. 3;27(1):55–62.
26. Huang R-Y, Li M-Y, Hsin MKY, Underwood MJ, Ma LT, Mok TSK, et al. 4-Methylnitrosamino-1-3-pyridyl-1-butanone (NNK) promotes lung cancer cell survival by stimulating thromboxane A2 and its receptor. *Oncogene.* 2011 Jan. 6;30(1):106–116.
27. Yoshizato K, Zapf S, Westphal M, Berens ME, Giese A. Thromboxane synthase inhibitors induce apoptosis in migration-arrested glioma cells. *Neurosurgery.* 2002 Feb.;50(2):343–354.
28. Datar S, McCauley FA, Wilson TW. Testing the “redirection hypothesis” of prostaglandin metabolism in the kidney. *Prostaglandins.* 1987 Feb.;33(2):275–285.

29. Hatae T, Wada M, Yokoyama C, Shimonishi M, Tanabe T. Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR delta. *J. Biol. Chem.* 2001 Dec. 7;276(49):46260–46267.
30. Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J. Cell. Biochem.* 2008 Jul. 1;104(4):1124–1149.
31. Blöchl-Daum B, Pehamberger H, Kurz C, Kyrle PA, Wagner O, Müller M, et al. Effects of cisplatin on urinary thromboxane B2 excretion. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1995 Oct.;58(4):418–424.
32. Papanikolaou N, Peros G, Morphake P, Gkikas G, Maraghianne D, Tsipas G, et al. Does gentamicin induce acute renal failure by increasing renal TXA2 synthesis in rats? *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 1992 Feb.;45(2):131–136.
33. Rossini M, Belloni A, Remuzzi G, Perico N. Thromboxane receptor blockade attenuates the toxic effect of cyclosporine in experimental renal transplantation. *Circulation.* 1990 Jan.;81(1 Suppl):I61–7; discussion I68.
34. Lin F-T, Lai Y-J, Makarova N, Tigyi G, Lin W-C. The lysophosphatidic acid 2 receptor mediates down-regulation of Siva-1 to promote cell survival. *J. Biol. Chem.* 2007 Dec. 28;282(52):37759–37769.
35. Czemberek C, Eder-Czemberek C, Erovc BM, Turhani D, Selzer E, Thurnher D. Inhibition of cytotoxicity of cisplatin by cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide in head and neck cancer cell lines. *Oncol. Rep.* 2005 Dec.;14(6):1523–1526.

36. Togna GI, Togna AR, Franconi M, Caprino L. Cisplatin triggers platelet activation. *Thromb. Res.* 2000 Sep. 1;99(5):503–509.
37. Suzuki K, Bose P, Leong-Quong RY, Fujita DJ, Riabowol K. REAP: A two minute cell fractionation method. *BMC Res Notes.* 2010;3:294.
38. Gassmann M, Grenacher B, Rohde B, Vogel J. Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry. *Electrophoresis.* 2009 Jun.;30(11):1845–1855.
39. Laroche G, Lépine M-C, Thériault C, Giguère P, Giguère V, Gallant MA, et al. Oligomerization of the alpha and beta isoforms of the thromboxane A2 receptor: relevance to receptor signaling and endocytosis. *Cell. Signal.* 2005 Nov.;17(11):1373–1383.
40. Alvarez SE, Harikumar KB, Hait NC, Allegood J, Strub GM, Kim EY, et al. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature.* 2010 Jun. 24;465(7301):1084–1088.

9. CARACTÉRISATION DE LA VOIE SIVA1 ET GÉNÉRALISATION DU MÉCANISME À D'AUTRES GPCR

Les résultats présentés au chapitre précédent offrent une perspective intéressante sur la fonction potentielle de Siva1 en la positionnant comme une nouvelle composante centrale d'une voie de signalisation contrôlée par un GPCR. Au mieux de notre connaissance, il s'agit de la première étude démontrant la nécessité de Siva1 pour la génération d'un phénotype cellulaire en réponse à une stimulation réceptorielle. Cette découverte s'inscrivait dans un contexte où plusieurs groupes avaient pourtant déjà rapporté des interactions entre Siva1 et certains récepteurs de surface incluant non-seulement LPA₂ (F.-T. Lin et al., 2007) et S1P₄ (E et al., 2009), deux GPCR, mais également CD27 (Prasad et al., 1997) et GITR (Spinicelli et al., 2002), membres de la famille des récepteurs de TNF.

Devant le nombre grandissant de récepteurs interagissant avec Siva1, nous avons émis l'hypothèse que Siva1 était un partenaire général d'interaction des GPCR dont la fonction pourrait être modulée différemment par plusieurs agonistes via plusieurs récepteurs. Les résultats de ces travaux sont présentés ici et démontrent que Siva1 fait partie d'une voie de signalisation partagée par différents récepteurs de prostanoïdes, neurotransmetteurs et hormones qui modulent son expression totale de façon corrélée à leur phénotype pro- ou anti-apoptotique généralement rapporté. Le contrôle de l'expression totale de Siva1 s'accompagne de changements dans les motifs d'ubiquitination observés sur les récepteurs ainsi que d'altérations au niveau de la signalisation vers les voies NFκB et potentiellement ERK1/2 et p38. Nous démontrons également une interaction *in vitro* entre Siva1 et l'arrestine (modulateur bien connu des voies de signalisation des GPCR) pouvant être atténuée par une stimulation de TP.

Ensemble, ces résultats suggèrent que Siva1 pourrait contribuer à la signalisation de GPCR via un rôle dans l'assemblage/désassemblage de complexes signalétiques régulés par des chaînes d'ubiquitine, de manière analogue à certains mécanismes de signalisation proposés pour les récepteurs de TNF (Chaudhari et al., 2006). D'autres travaux seront nécessaires pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, mais les phénomènes que nous rapportons ici semblent certainement positionner Siva1 comme un acteur insoupçonné au sein de la régulation signalétique des GPCR.

9.1. Matériel et méthodes

9.1.1. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires utilisées pour cette étude comprennent les HEK293 (précurseurs neuronaux isolés de reins humains), HeLa (cellules humaines d'un cancer du col de l'utérus), CHO (cellules provenant d'un ovaire de hamster chinois) et MEF (fibroblastes embryonnaires de souris). Les MEF KO pour les arrestines 2 et/ou 3 ont été gracieusement fournies par le laboratoire du Dr R.J. Lefkowitz où elles ont été générées (Kohout et al., 2001). Les HEK293, HeLa et MEF ont été cultivées dans du milieu DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) 10% FBS (*fetal bovine serum*) alors que du *Ham's F12 nutrient mixture* 10% FBS fut utilisé pour les cellules CHO.

9.1.2. Vecteurs et protéines recombinantes

Le clonage et la génération des différentes constructions de Siva1 a été décrit dans l'article présenté au chapitre 8. Le clonage et les constructions des récepteurs TP α , TP β , β_2 AR, DP, CRTH $_2$, IP, CXCR $_4$, PAFR et AT $_1$ R et de leurs queues C-terminales ont été réalisées au fil des ans par plusieurs étudiants du laboratoire et sont décrits dans des publications antérieures (voir tableau 9.1).

Construction	Vecteur	Référence
GST-AT ₁ R	pGEX-4T-1	(Pérodin et al., 2002)
FLAG-β ₂ AR	pcDNA3.1 FLAG	(A. Parent et al., 2009)
GST-β ₂ AR	pGEX-4T-1	(A. Parent et al., 2009)
FLAG-CRTH ₂	pcDNA3.1 FLAG	(Roy et al., 2010)
GST-CRTH ₂	pGEX-4T-1	(Gallant et al., 2007)
GST-CXCR4	pGEX-4T-1	(Orsini et al., 1999)
FLAG-DP	pcDNA3.1 FLAG	(A. Parent et al., 2010)
GST-DP	pGEX-4T-1	(A. Parent et al., 2010)
GST-IP	pGEX-4T-1	(Giguère et al., 2004)
GST-PAFR	pGEX-4T-1	(Le Gouill et al., 1999)
GST-TPα	pGEX-4T-1	(J. L. Parent et al., 1999)
FLAG-TPβ	pcDNA3.1 FLAG	(J. L. Parent et al., 1999)
GST-TPβ	pGEX-4T-1	(Rochdi et al., 2004)

TABLEAU 9.1 : Récepteurs clonés antérieurement

Liste des constructions utilisées dans ce projet, mais réalisées par d'autres. Les références en détaillent le protocole de clonage.

Les récepteurs TPβΔK, CHRM2, CHRM3, CHRM3ΔC de même que les différents fragments des queues C-terminales des récepteurs CHRM2 et CHRM3 ont été spécifiquement clonés dans le cadre de ces travaux. Ces récepteurs furent clonés par PCR à partir de bibliothèques d'ADNc humains tirés de leukocytes ou de tissus cérébraux et insérés dans un vecteur pcDNA3 contenant la séquence codante de l'étiquette FLAG (DYKDDDD) clonée précédemment entre les sites KpnI et EcoRI. Les constructions résultantes débutaient par la méthionine du vecteur, suivie d'une dizaine d'acides aminés générés par le site de clonage multiple, suivis de la séquence FLAG, suivie des acides aminés générés par le site de restriction à partir duquel débutait la séquence du récepteur, incluant la méthionine initiale. Toutes les étiquettes de GPCR étaient donc situées en N-

terminal du récepteur. Les fragments de queues C-terminales furent quant à eux amplifiés par PCR à partir des vecteurs contenant la séquence complète et inséré dans le vecteur pGEX-4T-1 (cat. 28-9545-49, GE Healthcare, UK) contenant la séquence codant pour la GST. Les amorces, librairies et sites de clonage utilisés pour chaque construction sont détaillés au tableau 9.2.

Construction	Source	Amorces	Vecteur (Sites)
FLAG-CHRM2	MAR0200000-02	S : ctaggaattcatgaataactcaacaaactc A : ctagctcgagttacctttagcgcctatgttc	pcDNA3.1 FLAG (EcoRI et XhoI)
GST-CHRM2	FLAG-CHRM2	S : ctaggaattcaatgccacctcaagaag A : ctaggcgccgctacctttagcgcctatgttc	pGEX-4T-1 (EcoRI et NotI)
FLAG-CHRM3	MAR0300000-02	S : ctaggaattcatgaccttgacacataacag A : ctaggcgccgctacaaggcctgctcgggtg	pcDNA3.1 FLAG (EcoRI et NotI)
GST-CHRM3	FLAG-CHRM3	S : ctaggaattcaacaaaacattcagaaccac A : ctaggcgccgctacaaggcctgctcgggtg	pGEX-4T-1 (EcoRI et NotI)
FLAG-CHRM3 Δ C	MAR0300000-02	S : ctaggaattcatgaccttgacacataacag A : ctaggcgccgctactgacactggcacagcag	pcDNA3.1 FLAG (EcoRI et NotI)
GST-CHRM3 Δ C	FLAG-CHRM3 Δ C	S : ctaggaattcaacaaaacattcagaaccac A : ctaggcgccgctactgacactggcacagcag	pGEX-4T-1 (EcoRI et NotI)
FLAG-TP β Δ K	FLAG-TP β	S : ctagggatccggcaccatggactacaaagacga tgacgacaagtggccaacggcagttc A : ctaggaattctaccctgttgagggtcaaagg	pcDNA3.1 (BamHI et EcoRI)

TABLEAU 9.2 : Constructions réalisées dans le cadre du projet

Liste des constructions réalisées dans le cadre de ce projet. Les séquences furent amplifiées par PCR à partir du vecteur indiqué dans la colonne « source » à l'aide d'amorces sens (S) et anti-sens (A). Les séquences des amorces sont retranscrites ici dans le sens 5'-3'. Les constructions FLAG-CHRM2, FLAG-CHRM3 et FLAG-CHRM3 Δ C furent amplifiées à partir de vecteurs achetés du Missouri S&T cDNA Resource Center (www.cdna.org), MO, USA (numéro de catalogue dans la colonne « source »). Les séquences amplifiées furent par la suite insérées dans le vecteur approprié aux sites indiqués.

9.1.3. Transfections transitoires

Pour les expériences nécessitant une transfection transitoire d'ADN, les cellules furent transfectées 24 h après l'ensemencement initial et 24-48 h avant la réalisation de l'expérience. Les cellules HEK293, HeLa et CHO furent transfectées au moyen de TransIT-LT1 selon les conditions de départ des protocoles spécifiques fournis par le manufacturier. Les cellules MEF furent transfectées au moyen de TransIT-2020 et toutes les transfections d'ARNs interférants furent réalisées au moyen de Lipofectamine 2000 selon les protocoles des compagnies.

9.1.4. Génération de lignées stables

Des cellules exprimant de façon stable différentes constructions furent générées en transfectant le vecteur d'intérêt au moyen de TransIT-LT1 puis en poursuivant la culture habituelle en présence de G418 (cat. 400-130, Wisent bioproducts, Qc) à 1 mg/mL pendant deux à trois semaines. Après la période de sélection, la concentration de G418 fut abaissée à 200 µg/mL et maintenue à ce niveau par la suite. Toutes les expériences furent effectuées en absence de G418. Les résultats présentés furent tous obtenus à partir des populations complètes polyclonales de cellules stables pour le vecteur d'intérêt.

9.1.5. Stimulation des récepteurs

Lorsqu'une stimulation des récepteurs était nécessaire, TPβ, DP ou CHRM3 furent stimulés avec, respectivement, du U46619 (100 nM), de la PGD₂ (1 µM) et du carbachol (1 mM) dans un milieu DMEM 20 mM HEPES 0.05 % BSA. β₂AR fut stimulé avec de l'isoprotérénol (5 µM) dans un milieu DMEM 20 mM HEPES 0,1 mM ascorbate.

9.1.6. Extraction d'ARN et RT-PCR

Les extractions d'ARN et les RT-PCR ont été réalisés selon le protocole décrit dans l'article présenté précédemment.

9.1.7. Essais de liaison *in vitro* et co-immunoprécipitations

Tous les essais de liaison *in vitro* de même que les co-immunoprécipitations ont été effectués tel que décrit dans l'article.

9.1.8. Analyses d'expression protéique totale

Les analyses d'expression protéique totale ont été effectuées tel que décrit dans l'article. En plus des réactifs déjà présentés, ces expériences ont fait usage d'anti-IkBa (C-21) produit par Santa Cruz Biotechnology, CA.

9.1.9. Analyse de l'apoptose dans les CHO

L'apoptose dans les cellules CHO fut étudiée en mesurant par cytométrie de flux l'externalisation des phosphatidylsérines et en observant le clivage de la protéine PARP par immunobuvardage. Ces deux protocoles sont détaillés dans l'article inclus précédemment. Pour toutes les expériences présentées ci-après, les traitements à la cisplatine ou à l'étoposide (cat. E1383, Sigma-Aldrich, MO) sont des traitements de 16 h effectués de façon concomitante à la stimulation par l'agoniste mentionné dans les figures. Les deux agents étaient dissouts dans du DMEM sans FBS puis les solutions filtrées dans un filtre à seringue Acrodisc de 0,45 µm (cat. PN4184, Pall Life Sciences, NY) et ajoutées au milieu de culture afin d'atteindre la concentration finale désirée.

9.1.10. Essais d'ubiquitination *in cellulo*

L'ubiquitination des GPCR fut évaluée par une immunodétection de l'ubiquitine dans des immunoprécipitats de récepteurs. Brièvement, des cellules HEK293 furentensemencées en pétris de 60 mm et transfectées, 24 h plus tard, avec le vecteur codant pour Siva1-HA, et/ou un vecteur codant pour un récepteur (FLAG-TP β , FLAG-TP β Δ K ou FLAG- β_2 AR). Un vecteur codant pour Myc-Ubiquitine était également transfecté dans toutes les conditions. Deux jours suivant la transfection, le milieu de culture était changé pour du milieu de stimulation et l'agoniste approprié ajouté pour la durée indiquée. Suite à la stimulation, le protocole d'immunoprécipitation habituel (décrit en 8.3.5.6) fut appliqué et les membranes révélées au moyen d'anticorps directement couplés à la HRP et dirigés soit contre l'épitope Myc de notre ubiquitine recombinante (cat. ab1261, Abcam, MA), soit contre l'ubiquitine endogène (cat. BML-PW0150, Enzo Life Sciences, NY).

9.1.11. Analyse d'internalisation de TP β

La quantification de l'internalisation du récepteur TP β fut effectuée au moyen d'ELISA dirigés contre un épitope extracellulaire du récepteur, tel que décrit dans une publication antérieure (Roy et al., 2010). Des puits de plaques à 24 puits préalablement traités par une solution de poly-L-lysine (cat. P 9155, Sigma-Aldrich, MO) à 0,1 mg/mL furentensemencées avec $7,5 \times 10^4$ cellules HEK293. Les cellules furent par la suite transfectées au moyen de TransIT-LT1 avec les vecteurs mentionnés pour chaque condition, puis cultivées 48 h dans du milieu DMEM 10 % FBS. Le jour de l'expérience, les puits furent lavés au moyen de PBS, le milieu remplacé par du milieu DMEM 20 mM HEPES 0,05 % BSA et l'agoniste U46619 (100 nM) ajouté afin d'obtenir des stimulations de 5 min, 30 min, 1 h, 2 h ou 5 h. À la fin de la période de stimulation, les cellules furent fixées par une solution de TBS 3,7 % formaldéhyde (V/V) (cat. F79-4, Thermo

Fisher Scientific, MA) pour 5 min à température ambiante. Les cellules furent lavées 3 fois dans du TBS 1 mM CaCl₂ puis incubées 45 min dans du TBS 1 mM CaCl₂ 1 % BSA afin de bloquer les interactions non-spécifiques. L'anticorps monoclonal FLAG M1 (cat. F 3040, Sigma-Aldrich, MO) dirigé contre l'épitope FLAG fusionné au N-terminal de nos constructions de récepteurs fut ensuite ajouté à chaque puits et incubé pendant 1 h. Trois lavages de TBS 1 mM CaCl₂ furent ensuite effectués, de même qu'un nouveau blocage de 15 min dans du TBS 1 mM CaCl₂ 1 % BSA avant de finalement ajouter, pour 1 h, un anticorps anti-*Mouse* couplé à la phosphatase alcaline (cat. A 3562, Sigma-Aldrich, MO). Les cellules furent par la suite rincées trois fois au TBS 1 mM CaCl₂, puis 250 µL d'un substrat colorimétrique de phosphatase ajouté pour 25 min à 37 °C (1 mg/mL de p-Nitrophenyl phosphate (cat. S 0942, Sigma-Aldrich, MO) dans un tampon 1 M diethanolamie (cat. D 8885, Sigma-Aldrich, MO), pH 9,8, 0,5 MgCl₂). La réaction fut cessée par l'addition de 250 µL de NaOH 0,4 M et l'absorbance à 405 nm d'un aliquot de 200 µL fut mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Titertek Multiskan MCC/340. Des cellules transfectées avec le vecteur pcDNA3 vide furent utilisées comme contrôle de signal non-spécifique. Les résultats de chaque condition sont présentés en pourcentage d'atténuation du signal par rapport aux conditions non-stimulées.

9.1.12. Analyse d'activation des voies NFκB et MAP kinases

L'activation des MAP kinases a été étudiée dans des cellules HeLa mises en culture en plaques à 24 puits à une densité de 5×10^5 cellules par puits et simultanément transfectées au moyen de TransIT-LT1 avec le vecteur pcDNA3-Siva1-HA ou pcDNA3. Après 24 h, les cellules ont été privées de sérum pour la nuit en les incubant avec du DMEM 20 mM HEPES 0.05 % BSA. L'agoniste U46619 (100 nM) fut ajouté le lendemain et les stimulations cessées au temps prescrit par un lavage au PBS froid contenant 1 mM de NaF et Na₃VO₄ de même que par une lyse directe dans le puits au moyen de 75 µL de tampon Laemmli 2x.

Les échantillons furent ensuite vortexés 2 min, bouillis 5 min et centrifugés 5 min à 20 000 g. Les protéines furent finalement séparées par SDS-PAGE et chaque gel transféré sur deux membranes de nitrocellulose superposées afin d'obtenir des membranes duplicatas. L'activation des MAP kinases fut analysée au moyen des anticorps p44/42 MAPK, SAPK/JNK et p38 MAPK fournis dans les trousse de détection des MAPK (cat. 9926S) et des phospho-MAPK (cat. 9910S) de chez Cell Signalling Technology, MA. L'expression d'I κ B α fut également évaluée à l'aide d'un anticorps commercial (cat. sc-371, Santa Cruz Biotechnology, CA).

9.2. Résultats

9.2.1. Siva1 interagit directement avec les queues C-terminales de plusieurs GPCR

À l'instar de l'interaction directe démontrée précédemment entre Siva1 et TP β , les queues C-terminales de différents GPCR ont été testées pour leur capacité à lier Siva1. Les récepteurs choisis incluent cinq récepteurs de médiateurs lipidiques (l'isoforme α du récepteur du thromboxane A₂, TP α , les récepteurs DP et CRTH₂ de la prostaglandine D₂, le récepteur IP de la prostacycline et le récepteur du PAF, PAFR), un récepteur de chimiokine (CXCR₄), un récepteur d'hormone peptidique (AT₁R) et trois récepteurs de neurotransmetteurs (le récepteur β_2 de l'adrénaline, β_2 AR, de même que les récepteurs CHRM2 et CHRM3 de l'acétylcholine). Les queues C-terminales de ces récepteurs (définies comme débutant trois acides aminés après le site consensus NPXXY ou DPXXY) ont été clonées et fusionnées à la glutathion S-transferase, produites en bactéries puis purifiées au moyen de billes de glutathion. Les protéines purifiées furent incubées en présence de Siva1-HA-His (purifiée à l'aide d'une résine d'agarose-nitrilotriacétate de nickel) puis précipitées par centrifugation. La figure 9.1 démontre que Siva1 interagit *in vitro* avec les queues C-terminales de TP α , TP β , IP, PAFR, AT₁R et CHRM3. Par contre, aucune interaction spécifique n'a pu être détectée pour les récepteurs CXCR₄ et CHRM2, indiquant que Siva1 est sélective quant à sa liaison à différents

récepteurs. Pour les récepteurs β_2AR , DP et CRTH₂, les résultats obtenus sont inconstants (données non-présentées) et ne permettent pas de conclure à la présence ou l'absence d'interaction.

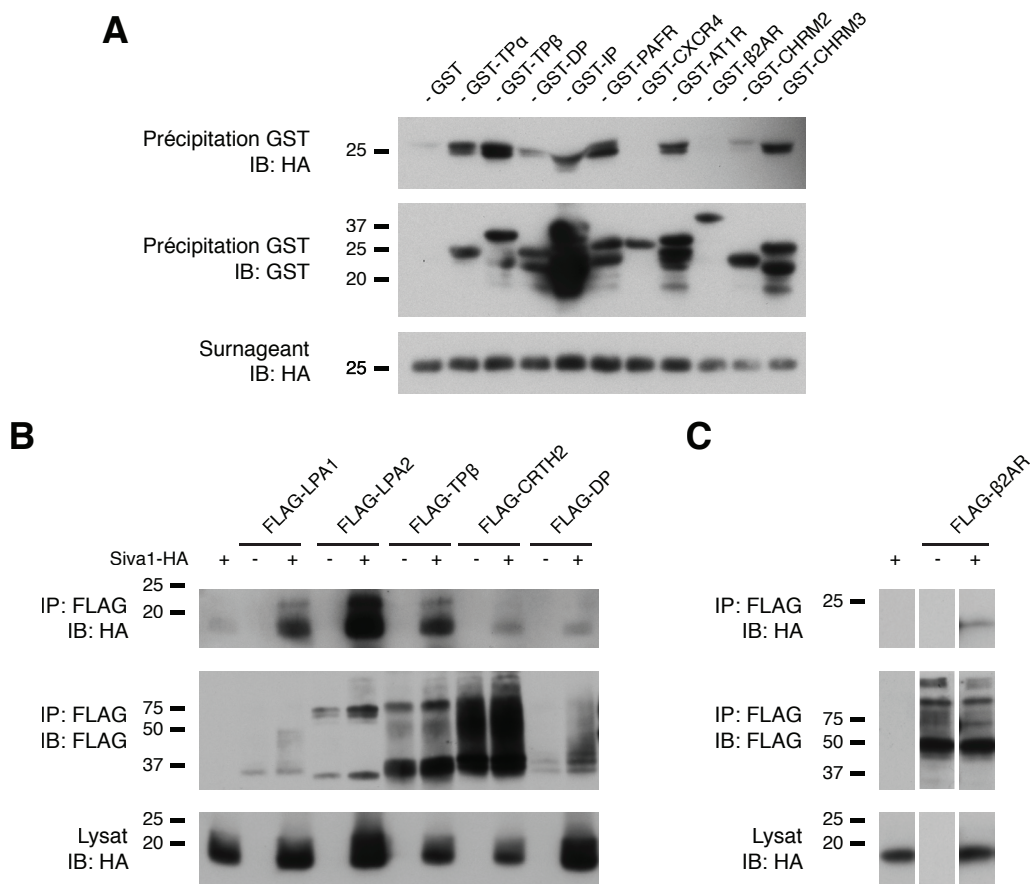


FIGURE 9.1 : Essai de liaison *in vitro* entre Siva1 et la queue C-terminale de différents GPCR

(A) Les queues C-terminales de différents récepteurs fusionnées à l'enzyme GST furent produites en bactéries, purifiées, puis incubées en présence de His-Siva1-HA (panneau inférieur). La précipitation des complexes au moyen de billes de glutathion (panneau central) démontre que His-Siva1-HA interagit directement avec les queues C-terminales des récepteurs TP α , TP β , IP, PAFR, AT₁R et CHRM3 *in vitro* (panneau supérieur). À l'inverse, les queues C-terminales des récepteurs CXCR₄ et CHRM2 n'interagissent pas avec Siva1. Cette figure est représentative de quatre expériences, sauf pour les récepteurs β_2AR et DP dont les résultats se sont avérés trop inconstants pour permettre une conclusion. Dans le panneau central, les espèces de poids moléculaire supérieur représentent les constructions complètes, alors que les signaux inférieurs représentent des produits de dégradation de ces constructions. (B-C) Co-immunoprécipitation

entre Siva1-HA et différents GPCR. Les récepteurs furent exprimés en présence ou en l'absence de Siva1-HA dans des cellules HEK293 lysées 48 h suivant la transfection. L'immunoprécipitation de tous les récepteurs (panneau central) par un anticorps dirigé contre l'épitope FLAG a permis de co-immunoprécipiter Siva1 (panneau supérieur). Tous les buvardages sont représentatifs d'au moins quatre expériences.

L'interaction entre Siva1 et plusieurs GPCR a également été étudiée au moyen de co-immunoprécipitations (figure 9.1A et B). Des récepteurs complets ont été fusionnés à une étiquette FLAG, clonés dans pcDNA3 puis exprimés avec ou sans Siva1 dans des cellules HEK293T. Les récepteurs ont été immunoprécipités puis analysés, avec un extrait du lysat initial, par SDS-PAGE et immunobuvardage. Une forte co-immunoprécipitation fut détectée pour les récepteurs LPA₁, LPA₂ et TPβ. Un faible signal était détectable pour les récepteurs DP, CRTH₂, β₂AR et CHRM3 et aucune co-immunoprécipitation n'était visible pour CHRM2 (figure 9.3C). Ces résultats corrélerent globalement avec les observations en précipitation GST, valident l'existence de complexes et Siva1-récepteurs et supportent la notion que Siva1 est sélective quand à sa liaison à différents récepteurs.

9.2.2. Différents GPCR modulent l'expression totale de Siva1 de façon corrélée à leur effet connu sur l'apoptose

L'expression totale de Siva1 est connue pour être modulable par les GPCR avec lesquels elle interagit. En 2007, Lin *et al.* ont rapporté qu'une stimulation du récepteur LPA₂ par l'acide lysophosphatidique réprimait l'expression de Siva1 en entraînant son ubiquitinylation et sa dégradation subséquente (F.-T. Lin *et al.*, 2007). Vu la fonction pro-apoptotique de Siva1 reconnue à l'époque, les auteurs proposaient la dégradation accrue de Siva1 comme mécanisme contribuant à l'effet anti-apoptotique du récepteur LPA₂. À l'inverse, nous avons précédemment démontré qu'une stimulation de TPβ par l'agoniste U46619 stabilisait Siva1 et entraînait une accumulation de la protéine associée à une sensibilisation à l'apoptose induite par la cisplatine.

Afin de vérifier si des effets semblables pouvaient être observés avec d'autres récepteurs, l'effet d'une stimulation réceptorielle sur l'expression totale de Siva1 a été étudié pour certains des récepteurs identifiés à la figure 9.1 et les résultats sont rapportés à la figure 9.2A. TP β , β_2 AR, DP, CHRM2 ou CHRM3 furent exprimés avec ou sans Siva1-HA dans des cellules HEK293T stimulées pour une durée variable par un agoniste du récepteur étudié. On constate qu'une stimulation de TP β , β_2 AR et DP induit une accumulation de Siva1 après 5 h, contrairement à la stimulation de CHRM2 qui n'a aucun effet. Pour le récepteur CHRM3, la simple co-expression du récepteur avec Siva1 diminue l'expression de Siva1 à des niveaux frôlant notre seuil de détection, rendant ininterprétable l'effet de la stimulation elle-même. Par ailleurs, outre la modulation de l'expression de Siva1 secondaire aux stimulations, on constate que la simple co-expression des récepteurs est suffisante pour générer des différences d'expression de Siva1. Cet effet peut être observé en comparant les différentes conditions non-stimulées de la figure 9.2A, de même qu'à la figure 9.2B où Siva1 a été co-exprimée avec des quantités croissantes de différents récepteurs. De manière analogue aux résultats de stimulation, un effet stabilisateur de Siva1 est observé suite à la co-expression de TP β , β_2 AR (voir figure 9.2C pour l'analyse densitométrique). À l'inverse, une diminution de l'expression est observée suite à la co-expression de CHRM3. Finalement, la co-expression de DP ne semble peu ou pas affecter l'expression de Siva1. Cette expérience n'a pas été tentée avec le récepteur CHRM2, mais la figure 9.2A suggère fortement que la co-expression de CHRM2 avec Siva1 n'influence pas le niveau total de Siva1 non-plus (comparer les puits non-stimulés du panneau CHRM2).

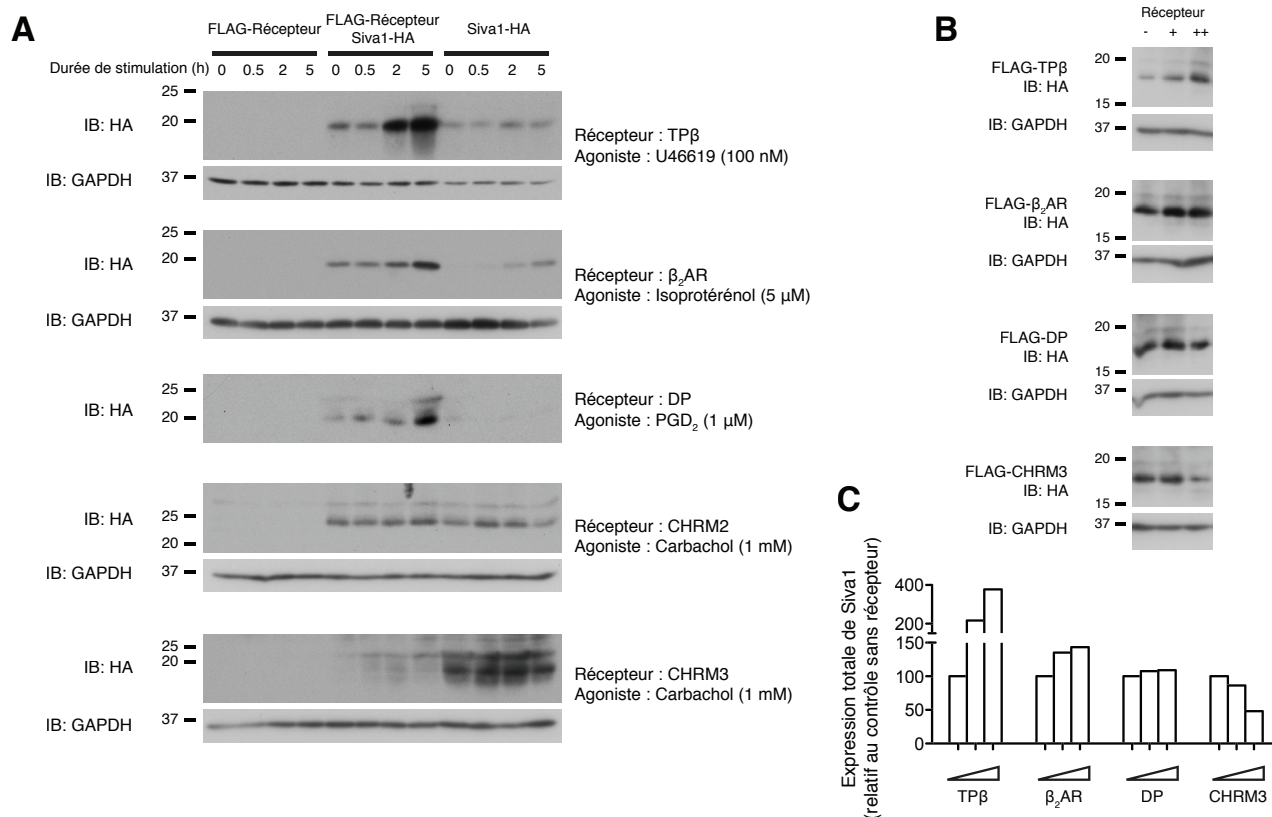


FIGURE 9.2 : L'expression totale de Siva1 est modulable par la co-expression ou la stimulation de divers GPCR

(A) Les récepteurs FLAG-TPβ, FLAG-β₂AR, FLAG-DP, FLAG-CHRM2 ou FLAG-CHRM3 furent exprimés en cellules HEK293 en présence ou en l'absence de Siva1-HA, puis stimulés par leur agoniste respectif pendant 0, 0,5, 2 ou 5h. Les cellules furent par la suite lysées puis analysées par SDS-PAGE et immunobuvardage. Les résultats démontrent que l'expression totale de Siva1-HA est augmentée par la stimulation de TPβ, β₂AR et DP, alors qu'elle demeure in affectée par une stimulation de CHRM2. L'effet de la stimulation de CHRM3 ne peut être évalué, car la co-expression du récepteur abolit trop fortement l'expression de Siva1. Ces résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences pour chacun des récepteurs. (B) Siva1-HA fut exprimé en l'absence ou en présence de quantités croissantes des récepteurs FLAG-TPβ, FLAG-β₂AR, FLAG-DP ou FLAG-CHRM3. Les cellules furent ensuite lysées, puis analysées par SDS-PAGE et immunobuvardage. L'expression de Siva1-HA est augmentée par la co-expression de FLAG-TPβ et FLAG-β₂A, n'est pas affectée par la co-expression de FLAG-DP et est diminuée par la co-expression de CHRM3. Ces figures sont représentatives de deux expériences. (C) Quantification des buvardages présentés en (B).

Ensemble, ces résultats démontrent que l'expression totale de Siva1 peut être modulée différemment par la co-expression et la stimulation de différents récepteurs. Il est intéressant de noter que l'effet sur l'expression de Siva1 est similaire à l'effet généralement reconnu du récepteur en cause sur l'apoptose. Ainsi, TP β et β_2 AR, des récepteurs reconnus comme pro-apoptotiques (Y. Gao et al., 2000; Fujita & Ishikawa, 2011), augmentent l'expression totale de Siva1, alors que CHRM3, un récepteur anti-apoptotique (Budd et al., 2003), la diminue. Ce dernier effet est d'ailleurs similaire à la déstabilisation anti-apoptotique rapportée pour le récepteur LPA $_2$ (F.-T. Lin et al., 2007). Finalement, CHRM2, le seul des récepteurs testé ne modulant pas l'expression totale de Siva1 est également reconnu comme l'un des récepteurs muscariniques ne modulant pas l'apoptose (Tobin & Budd, 2003).

9.2.3. Une délétion de la portion C-terminale de la queue cytoplasmique du récepteur M3 abolit l'interaction avec Siva1

La dichotomie observée entre les récepteurs CHRM2 et CHRM3 est particulièrement intéressante. Alors que CHRM3 interagit directement avec Siva1 et réprime son expression totale, nous n'avons pas réussi à détecter une interaction entre Siva1 et CHRM2 *in vitro*, ni à observer une modulation de l'expression de Siva1 par CHRM2 *in cellulo*. Ces résultats corrélerent particulièrement bien avec une étude effectuée en 2003 par Budd *et al.* dans laquelle les auteurs rapportent un effet anti-apoptotique pour les récepteurs CHRM1, CHRM3 et CHRM5, mais n'observent aucun effet particulier en regard de l'apoptose pour les récepteurs CHRM2 et CHRM4 (Budd et al., 2003). Ce groupe tenta d'établir quelle voie de signalisation médiait la protection conférée par CHRM3 contre l'apoptose induite par l'étoposide (un agent chimiothérapeutique) et démontra qu'une inhibition des voies G $\alpha_{q/11}$ -PLC, ERK-1/2, JNK, p38 ou PI3K n'était pas suffisante pour inhiber le phénotype (Budd et al., 2003). Toutefois, la mutation d'une zone polybasique située dans la queue C-terminale du récepteur

ou la délétion complète de la seconde moitié de la queue C-terminale (figure 9.3A) abolissait complètement l'effet protecteur, sans toutefois altérer la capacité du récepteur de signaler vers le calcium ou les MAP kinases. Les auteurs n'ont pas réussi à identifier précisément le mécanisme par lequel cette région du récepteur pouvait influencer les voies apoptotiques, mais notaient que cette région semblait conservée dans les récepteurs CHRM1, CHRM3 et CHRM5 tout en étant absente des séquences primaires de CHRM2 et CHRM4. Nous avons donc généré un mutant de la queue C-terminale de CHRM3 tronqué à partir de la lyse 565 (désigné CHRM3 Δ C) afin de vérifier si la portion distale du récepteur pouvait être responsable de l'interaction observée à la figure 9.1 entre le récepteur et Siva1 (figure 9.3A). Des essais de liaison *in vitro* furent effectués selon le protocole décrit plus haut et sont présentés à la figure 9.3B. Conformément à notre hypothèse, une ablation de la portion distale de la queue C-terminale de CHRM3 diminue grandement sa capacité à interagir avec Siva1. Des co-immunoprécipitations utilisant les récepteurs complets furent également effectuées dans des cellules HEK293T et confirment que l'interaction entre Siva1 et CHRM3 dépend de la présence du fragment distal 565-590 (figure 9.3C). D'autres expériences seront nécessaires afin d'établir si la région polybasique rapportée par Budd *et al.* est spécifiquement responsable de l'interaction ou si cette propriété est plutôt conférée par l'ensemble du fragment que nous avons tronqué. Dans tous les cas, lorsque corrélés avec les essais fonctionnels de Budd *et al.* démontrant qu'une ablation de cette même portion du C-terminal abolit la protection contre l'apoptose conférée par une stimulation du récepteur, nos résultats supportent l'hypothèse que Siva1 pourrait potentiellement être impliquée dans la modulation de l'apoptose par CHRM3.

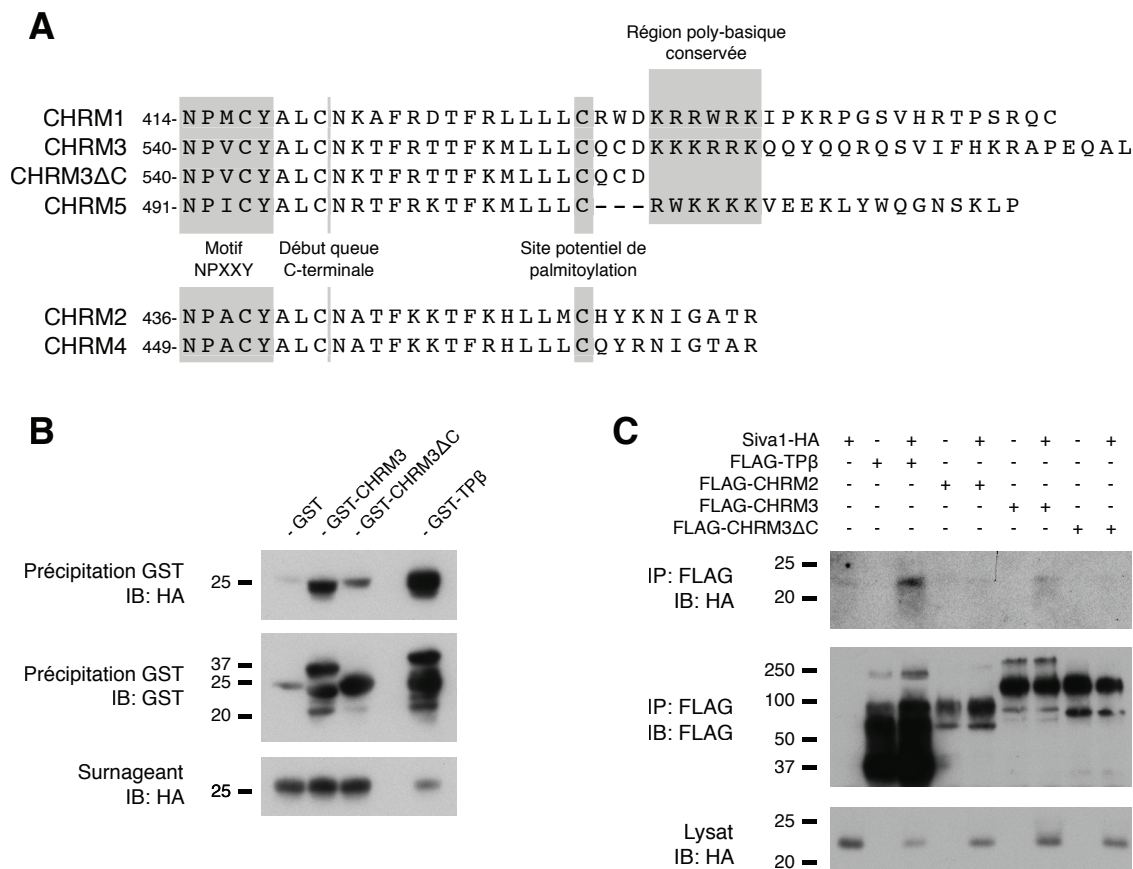


FIGURE 9.3 : L'extrémité distale de CHRM3, contenant une région polybasique conservée, est importante pour l'interaction entre Siva1 et le récepteur

(A) Les récepteurs anti-apoptotiques CHRM1, CHRM3 et CHRM5 partagent, dans leur portion C-terminale, une région polybasique conservée essentielle à la protection contre l'apoptose par CHRM3. Cette zone est absente des récepteurs CHRM2 et CHRM4 n'ayant pas été rapportés comme aptes à moduler l'apoptose. Notre construction CHRM3ΔC est un mutant du récepteur CHRM3 tronqué au début de la zone polybasique. (B) Les queues C-terminales de CHRM3, CHRM3C ou TP fusionnées à la GST furent exprimées en bactéries, purifiées puis incubées en présence de His-Siva1-HA (panneau inférieur). Une précipitation des complexes au moyen de billes de glutathion (panneau central) démontre que l'interaction directe entre His-Siva1-HA et GST-CHRM3 est fortement diminuée par une ablation du fragment distal de la queue C-terminale de CHRM3 (panneau supérieur). La construction GST-TPβ est présentée comme contrôle positif d'interaction Siva1-récepteur. Dans le panneau central, les espèces de poids moléculaire supérieur représentent les constructions complètes, alors que les signaux inférieurs représentent des fragments de ces constructions. (C) Co-immunoprécipitation entre Siva1-HA et les récepteurs FLAG-TPβ, FLAG-CHRM2, FLAG-CHRM3 ou FLAG-CHRM3ΔC. Les récepteurs furent exprimés en présence

ou en l'absence de Siva1-HA dans des cellules HEK293 lysées 48 h suivant la transfection. L'immunoprécipitation de tous les récepteurs (panneau central) par un anticorps dirigé contre l'épitope FLAG a permis de co-immunoprécipiter Siva1 dans les conditions exprimant FLAG-TP β ou FLAG-CHRM3, mais non dans les conditions exprimant FLAG-CHRM2 ou FLAG-CHRM3 Δ C. Tous les buvardages sont représentatifs d'au moins quatre expériences.

9.2.4. Rôle de Siva1 dans la modulation de l'apoptose par les récepteurs muscariniques

Puisque l'interaction entre Siva1 et CHRM3 dépend d'une zone du récepteur également essentielle pour la protection contre l'apoptose, nous avons par la suite tenté d'établir si l'expression de Siva1 était requise pour ce phénotype du récepteur. L'objectif était d'activer, par l'agoniste cholinergique carbachol, les récepteurs CHRM2, CHRM3 ou CHRM3 Δ C dans des cellules où Siva1 aurait été réprimée ou non au moyen d'ARN interférant et d'évaluer la protection offerte contre une apoptose préalablement induite. L'étude de Budd *et al.* démontrant l'importance du C-terminal de CHRM3 pour la protection contre l'apoptose avait été effectuée dans des cellules CHO d'ovaire de hamster chinois. Ce choix découlait de l'absence de récepteur muscarinique endogène dans ce type cellulaire, permettant la transfection d'un type spécifique de récepteur (CHRM2, CHRM3, CHRM4, etc.) auquel le phénotype observé suite à une stimulation au carbachol pouvait ensuite être complètement attribué. Nous avons donc tenté de reproduire le modèle rapporté par ces auteurs.

Des cellules CHO exprimant de façon stable les récepteurs CHRM2, CHRM3 ou CHRM3 Δ C ou un contrôle GFP furent générées en transfectant des vecteurs contenant ces différentes constructions puis en cultivant les cellules en présence de G418 à 1 mg/mL. Ces cellules stables furent incubées pendant 24 h en présence de cisplatine et de carbachol 1 mM, puis évaluées pour l'externalisation des phosphatidylsérines et le clivage de leur protéine PARP tel que décrit

précédemment. La figure 9.4 démontre que, contrairement au résultat attendu, le carbachol ne protège pas les cellules contre l'apoptose dans nos conditions.

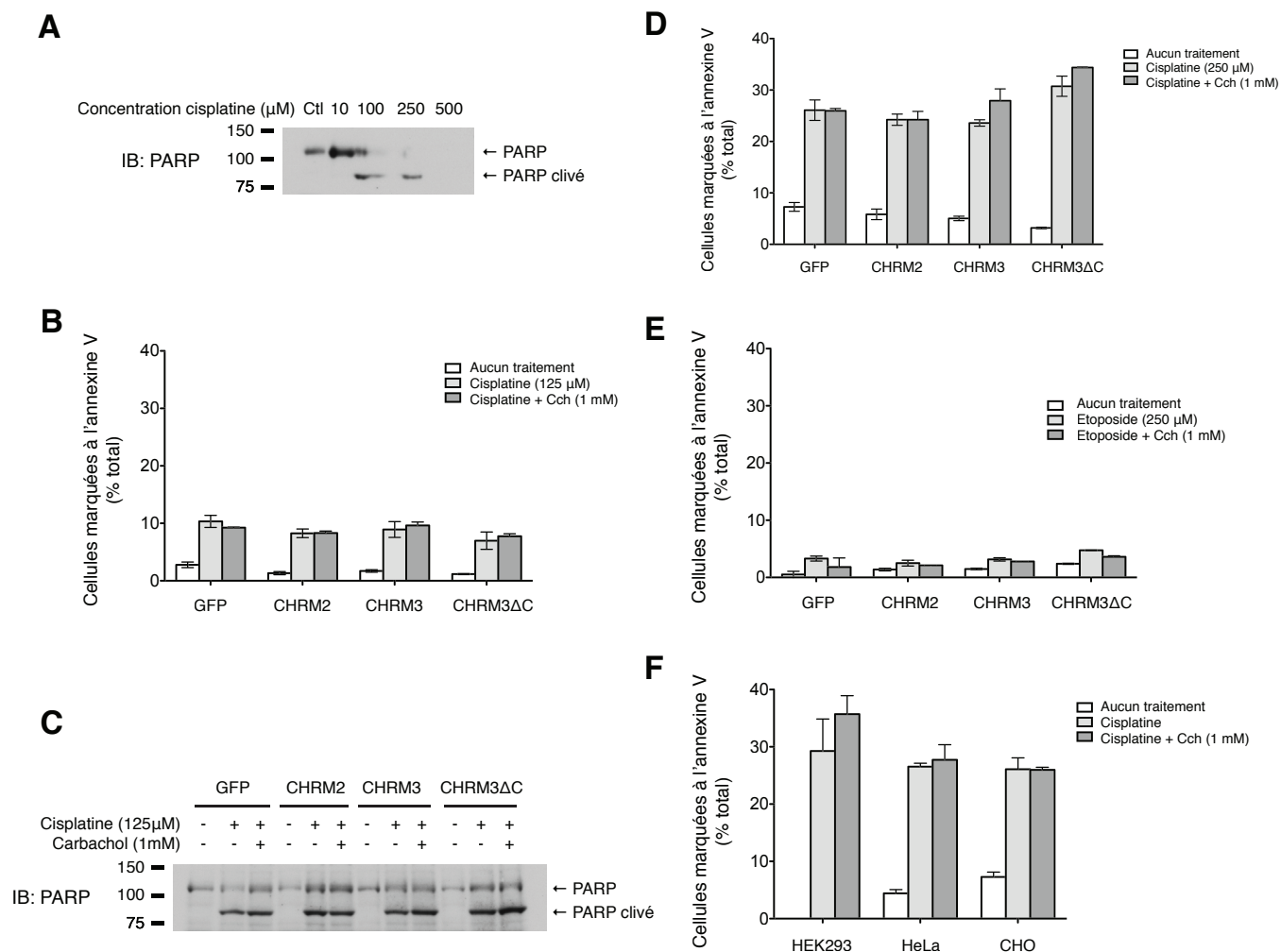


FIGURE 9.4 : Modulation de l'apoptose par le carbachol

(A) Des cellules CHO furent traitées 16h avec des doses croissantes de cisplatine, récoltées puis analysées par SDS-PAGE pour le clivage de la protéine PARP. La cisplatine induit l'apoptose dans les cellules CHO de façon dose-dépendante. (B-E) Des cellules CHO stables pour GFP, FLAG-CHRM2, FLAG-CHRM3 ou FLAG-CHRM3 ΔC furent stimulées au carbachol (1 mM) pendant 16h de façon concomitante à un traitement à la cisplatine à 125 μM (B-C), 250 μM (D) ou à l'étoposide 250 μM (E), puis récoltées et analysées par cytométrie de flux pour l'externalisation de leurs phosphatidylsérines par un marquage à l'annexine-V fluorescente. Dans les deux expériences, la stimulation au carbachol ne protège pas les différentes lignées contre l'apoptose. (F) Une analyse de cytométrie de flux selon le même protocole démontre qu'une stimulation au carbachol (1 mM) ne

protège pas les cellules HEK293, HeLa ou CHO contre l'apoptose induite par un traitement concomitant à la cisplatine (125 μ M).

Différentes conditions furent testées, incluant :

- varier la concentration de cisplatine (afin de varier le niveau basal d'apoptose duquel le carbachol devrait protéger);
- analyser l'apoptose à 24, 48 ou 72h suivant le début du traitement pro-apoptotique;
- varier l'agent pro-apoptotique (la cisplatine et l'étoposide furent testés);
- varier le type cellulaire (la stimulation de cellules HEK293, HeLa et CHO fut testée, avec et sans transfection transitoire de récepteurs).

Dans tous les cas, il nous a été impossible de répéter les observations de Budd *et al.* selon lesquelles une stimulation de CHRM3 protège contre l'apoptose. Sans la capacité d'observer cet effet fonctionnel de façon reproductible, il nous est impossible de poursuivre notre investigation du rôle de Siva1 dans la modulation de l'apoptose par les récepteurs muscariniques. Au moment d'écrire ces lignes, l'optimisation de notre modèle cellulaire est donc toujours en cours. Avant tout, l'expression efficace des récepteurs, initialement validée par immunobuvardage (données non-présentées), devra être confirmée par la démonstration d'une réponse en calcium ou en inositol phosphate suite à une stimulation par l'agoniste. Ces essais permettront de confirmer que les récepteurs sont non-seulement exprimés, mais surtout fonctionnels dans notre système. Par la suite, des protocoles supplémentaires de traitement à l'étoposide seront à essayer, incluant des traitements utilisant des concentrations substantiellement plus

élevées d'étoposide, des traitements plus longs et des pré-stimulations au carbachol avant le début du traitement pro-apoptotique. Cette recherche systématique des conditions optimales devrait nous permettre de soit réussir à répéter l'effet rapporté par Budd *et al.* et poursuivre notre étude par la suite, soit apporter un doute sur la généralisation possible des résultats obtenus par le groupe.

Nous avons démontré que la co-expression de CHRM3 diminuait l'expression totale de Siva1 (figure 9.2A-B) – un effet analogue à la répression de Siva1 rapportée pour le récepteur anti-apoptotique LPA₂ (F.-T. Lin *et al.*, 2007). Nous avons également démontré que l'abolition de la portion distale de la queue C-terminale de CHRM3 – connue comme requise pour la protection contre l'apoptose (Budd *et al.*, 2003) – diminuait fortement l'interaction entre Siva1 et le récepteur (figure 9.3). À la lumière de ces résultats, nous maintenons l'hypothèse que Siva1 pourrait être impliquée dans la modulation de l'apoptose par CHRM3 et postulons que notre difficulté actuelle à observer un effet du carbachol sur l'apoptose est principalement d'origine technique. Ce chapitre demeure donc ouvert pour l'instant.

9.2.5. La co-expression de Siva1 avec des GPCR module leur ubiquitination en réponse à une stimulation par leur agoniste

Indépendamment du phénotype cellulaire final généré par la stimulation au carbachol, l'interaction Siva-récepteur est associée à d'autres phénomènes moléculaires intéressants et méritant d'être investigués chez les récepteurs partenaires nouvellement identifiés. Notamment, dans leur étude sur l'interaction entre Siva1 et le récepteur LPA₂, Lin *et al.* attribuent la diminution de l'expression totale de Siva1 en réponse à une stimulation par l'acide lysophosphatidique à une ubiquitinylation de Siva1 et à sa dégradation protéasomale subséquente (F.-T. Lin *et al.*, 2007). Au cours de ces travaux, les auteurs ont remarqué que la stimulation

diminuait également l'expression totale du récepteur et rapportent que Siva1 semble potentialiser l'ubiquitylation du récepteur. Parallèlement à ces résultats, l'équipe de Gudi *et al.* a découvert, en 2009, qu'une réticulation du TCR induisait une poly-ubiquitylation K48 de TRAF2 médiée par Siva1 et que cet effet semblait corrélérer avec une diminution de l'activité de NF κ B (Gudi *et al.*, 2009). Ces différentes observations suggèrent que Siva1 pourrait être impliquée dans la régulation de phénomènes d'ubiquitylation pouvant potentiellement être importants pour sa fonction.

Vu les rapports précédents, nous avons décidé d'évaluer l'effet d'une co-expression de Siva1 sur l'ubiquitylation des récepteurs TP β et β_2 AR en réponse à une stimulation par leur agoniste. Les récepteurs d'intérêt furent donc transfectés avec ou sans Siva1-HA dans des cellules HEK293, puis stimulés par leur agoniste à 48 h post-transfection. Les cellules furent par la suite lysées et les récepteurs d'intérêt immunoprécipités puis analysés par SDS-PAGE et immunobuvardage contre l'ubiquitine. Tel que présenté à la figure 9.5A, la stimulation du récepteur TP β par le U46619 à une concentration de 100 nM induit une augmentation de son ubiquitylation après 5 h (puits 5 et 6). Ce phénomène est fortement potentialisé par la co-transfection de Siva1-HA (puits 7 et 8). De plus, cette fluctuation de l'ubiquitylation du récepteur ne semble pas être présente lorsque l'expérience est effectuée avec un mutant tronqué du récepteur ne contenant aucune lysine dans sa queue C-terminale (TP β Δ K), appuyant le rôle de la queue C-terminale comme cible de l'ubiquitylation induite par la stimulation (puits 9-12). Cette conclusion est toutefois tirée sous réserve d'une expression et d'une maturation différentes entre les constructions FLAG-TP β et FLAG-TP β Δ K, visible sur l'immunobuvardage FLAG.

Du côté du récepteur β_2 AR, une stimulation à l'isoprotérénol 5 μ M induit également une ubiquitylation du récepteur lorsque ce dernier est transfecté seul, mais la simple co-transfection de Siva1 augmente le niveau basal

d'ubiquitinylation de façon telle qu'en surexpression de Siva1, une augmentation subséquente secondaire à la stimulation n'est plus visualisée. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour établir avec certitude le niveau final obtenu après stimulation en présence de Siva1. Il peut toutefois être conclu que cette dernière semble être un modulateur positif de l'ubiquitinylation générale de β_2 AR.

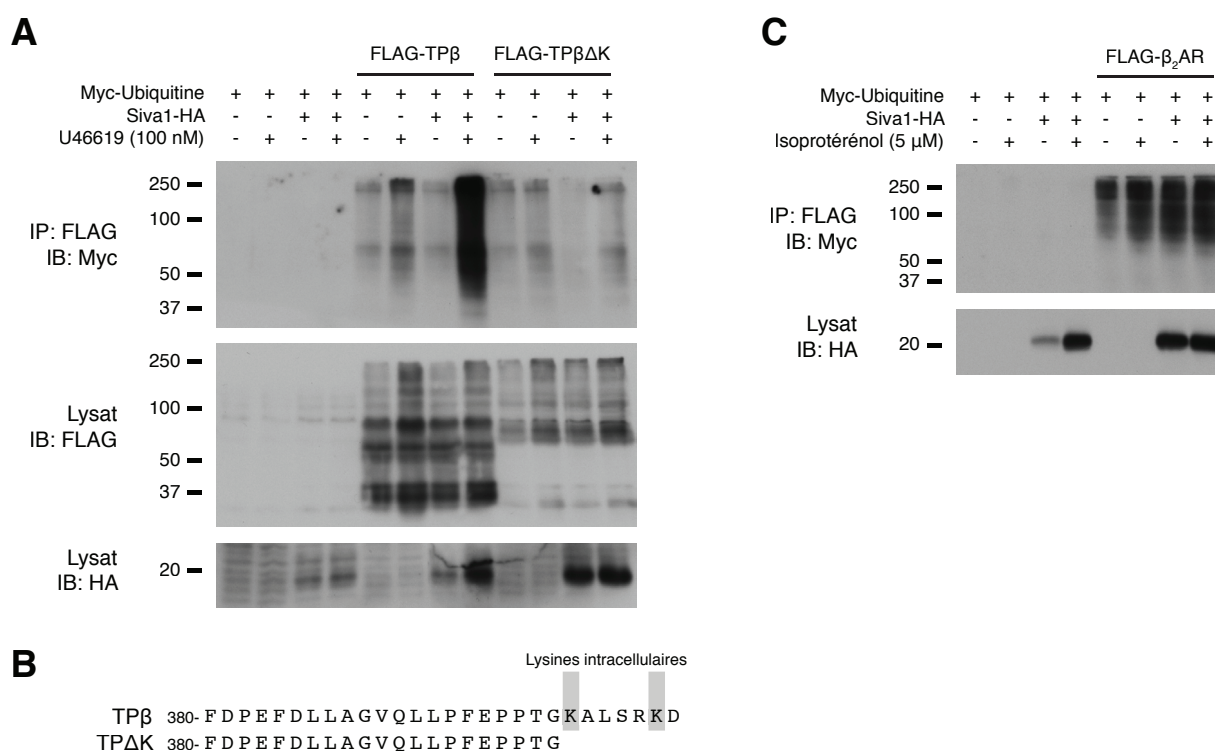


FIGURE 9.5 : Siva1 potentialise l'ubiquitinylation de TP β et β_2 AR

(A) Des cellules HEK293 transfectées avec Myc-Ubiquitine, Siva1-HA, FLAG-TP β et FLAG-TP $\beta\Delta$ K furent stimulées au U16619 (100 nM) pendant 5 h, puis lysées. Les récepteurs furent immunoprécipités au moyen d'un anticorps ciblé contre l'épitope FLAG, puis les lysats et les immunoprécipitats furent analysés par SDS-PAGE et immunobuvardage. Une stimulation de TP par son agoniste entraîne une ubiquitinylation du récepteur. En présence de Siva1, cette ubiquitinylation induite par l'agoniste est fortement augmentée. L'ubiquitinylation n'est pas visualisée sur un mutant du récepteur n'ayant pas de lysine intracellulaire (TP $\beta\Delta$ K) et n'est pas associée à une diminution de l'expression totale du récepteur. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences. (B) Structure primaire de la construction TP $\beta\Delta$ K. (C) Une expérience similaire fut effectuée en utilisant le récepteur FLAG- β_2 AR et en le stimulant avec l'agoniste isoprotérénol (5 μ M). La stimulation de

β_2 AR entraîne également une ubiquitinylation du récepteur. La co-expression de Siva1 suffit à augmenter l'ubiquitinylation basale du récepteur. Ce résultat préliminaire est représentatif de deux expériences.

9.2.6. Une stimulation de TP β entraîne la formation d'un complexe avec TRAF2

L'ubiquitinylation est un processus nécessitant l'action séquentielle de trois enzymes : 1) l'ubiquitine est d'abord activée par une E1; 2) l'ubiquitine est ensuite transférée sur une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2; 3) l'ubiquitine est finalement attachée à sa protéine cible par une ligase E3 (Chen, 2005). Si Siva1 ne semble pas avoir d'activité E3 ligase intrinsèque (Du et al., 2009), cette dernière est connue pour s'associer à minimalement trois E3 ligases établies : Mdm2 (Du et al., 2009), XIAP (Resch et al., 2009) et TRAF2 (Gudi et al., 2009). Vu l'effet potentialisateur important d'une expression de Siva1 sur l'ubiquitinylation de TP β , nous avons vérifié si Siva1 pouvait favoriser la formation d'un complexe entre l'une de ces ligases et le récepteur.

Des cellules HEK293 exprimant Siva1-HA, FLAG-TP β de même que Myc-Mdm2, Myc-XIAP ou Myc-TRAF2 furent stimulées au U46619 (100 nM) pendant 5 h, puis lysées. Le récepteur fut immunoprécipité au moyen d'anticorps ciblant l'épitope FLAG, puis les lysats et immunoprécipitats furent analysés par SDS-PAGE et immunobuvardage. La figure 9.6 démontre qu'à l'état basal, TP β n'interagit de façon significative avec aucune des E3 ligases testées. Par contre, après une stimulation de 5 h, Myc-TRAF2 co-immunoprécipite de façon importante avec le récepteur, suggérant l'existence d'un complexe récepteur-TRAF2 dans ces conditions.

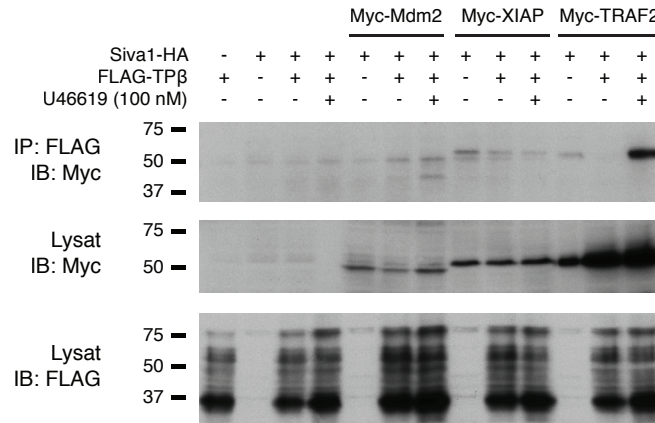


FIGURE 9.6 : TRAF2 co-immunoprécipite avec TP β suite à une stimulation de 5 h par le U46619

Le récepteur FLAG-TP β , co-exprimé dans des cellules HEK293 avec les protéines Siva1-HA et différentes E3 ligases, fut immunoprécipité après une stimulation de 5 h au U46619 (100 nM). Myc-Mdm2, Myc-XIAP et Myc-TRAF2 ne semblent pas interagir avec le récepteur à l'état basal, mais une forte co-immunoprécipitation de TRAF2 est détectée après 5 h de stimulation.

D'autres expériences seront nécessaires afin d'établir si Siva1 est requise pour la formation de ce complexe et si TRAF2 est effectivement une E3 ligase de TP β . Par ailleurs, au mieux de notre connaissance, il s'agit de la première démonstration de l'existence d'un complexe entre TRAF2 – une protéine classiquement réservée à la signalisation par la famille des TNFR – et un GPCR. La caractérisation de ce complexe par d'autres techniques de même que l'investigation de sa localisation (à la membrane plasmique vs en intracellulaire) promettent d'offrir des pistes intéressantes quant à sa fonction potentielle.

Dans tous les cas, la fonction la mieux comprise de l'ubiquitinylation consiste en l'étiquetage d'une protéine vers la dégradation (Ciechanover, 2005). En observant les immunobuvardages FLAG des immunoprécipitats de la figure 9.5A, il est intéressant de noter que l'ubiquitinylation accrue de TP β ne semble pas être associée à une variation de son expression totale, suggérant que l'ubiquitinylation induite par Siva1 ne dirige pas le récepteur vers les voies de dégradation. Ce

résultat contraste avec les trouvailles de Lin *et al.*, qui observaient une dégradation accrue du récepteur LPA₂ suite à la potentialisation de leur ubiquitinylation par Siva1 (F.-T. Lin *et al.*, 2007).

9.2.7. L'ubiquitinylation de TPβ induite par Siva1 n'est pas associée à une augmentation de son internalisation

Parmi les rôles reconnus de l'ubiquitinylation induite par l'agoniste d'un récepteur membranaire, l'un des plus établi est sans doute la régulation du processus de désensibilisation et d'internalisation du récepteur ou de récepteurs associés (Marchese *et al.*, 2008). Afin d'évaluer si l'ubiquitinylation accrue de TPβ lorsque co-exprimé avec Siva1 pouvait être associée à une altération de son internalisation, la cinétique d'internalisation du récepteur fut étudiée au moyen d'ELISA. L'expression de surface d'un récepteur recombinant FLAG-TPβ fut suivie suite à une stimulation par son agoniste U46619 (100 nM) en présence ou en l'absence de Siva1-HA. Tel que présenté à la figure 9.7, la co-transfection de Siva1-HA ne semble pas altérer la cinétique d'internalisation du récepteur par rapport aux cellules exprimant TPβ seul.

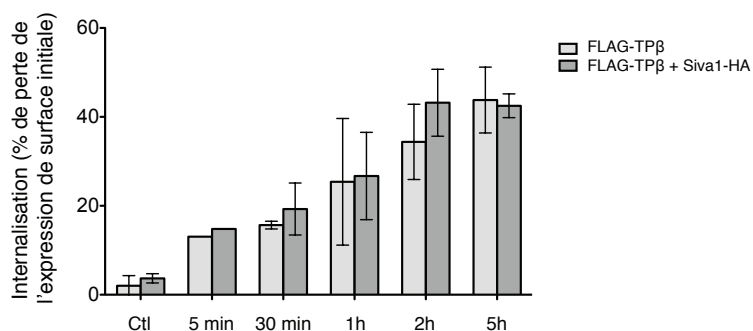


FIGURE 9.7 : La co-expression de Siva1 n'affecte pas la cinétique d'internalisation de TPβ

Les protéines Siva1-HA et FLAG-TPβ furent transfectées dans des cellules HEK293. Suite à une stimulation au U46619 (100 nM), les cellules furent fixées à différents temps, puis marquées en surface au moyen d'anticorps dirigés contre l'épitope FLAG. Le marquage fut révélé par ELISA. L'internalisation du récepteur FLAG-TPβ fut calculée à partir de l'expression de surface du récepteur aux

différents temps comparée à l'expression de surface dans le contrôle non-stimulé. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'atténuation du signal par rapport au contrôle. Après 5 h de stimulation, environ 40% du récepteur est internalisé. La transfection de Siva1-HA ne semble pas influencer cette cinétique. Ce graphique combine les résultats de quatre expériences.

Ce résultat implique donc que, en plus de n'avoir aucun effet sur l'expression totale du récepteur, l'ubiquitinylation accrue de TP β lorsque stimulé en présence de Siva1 n'entraîne pas non-plus une internalisation accrue du récepteur.

9.2.8. La co-expression de Siva1 avec TP module sa signalisation vers la voie NF κ B

Outre le contrôle de la dégradation et de l'internalisation, l'ubiquitine peut agir comme molécule de signalisation de manière analogue (et souvent subséquente) à la phosphorylation (Chen, 2005). De vastes réseaux de signalisation dépendant de la polyubiquitine ont été décrits, notamment pour les récepteurs de la famille du TNFR où une phosphorylation primaire sert de signal à l'ajout d'une chaîne de poly-ubiquitine K63 servant de site de liaison à divers partenaires, dont les TRAF qui se font phosphoryler puis ubiquitinyler à leur tour (Gudi et al., 2009). Dans ce modèle, les chaînes d'ubiquitines permettent l'assemblage de complexes supra-moléculaires qui convergent généralement vers le facteur de transcription NF κ B. Siva1 est déjà connue comme une protéine apte à réprimer l'activation de NF κ B (Gudi et al., 2006), probablement via une action en amont au niveau de TRAF2 (Gudi et al., 2009). Vu le rôle démontré de Siva1 dans la régulation de NF κ B, l'importance de l'ubiquitinylation dans ce système et notre observation d'une modulation de l'ubiquitinylation de divers GPCR par Siva1 sans conséquence apparente sur l'internalisation ou la dégradation du récepteur, nous avons entrepris d'évaluer l'effet d'une stimulation de TP sur la voie NF κ B.

Pour ce faire, des cellules HeLa exprimant de façon endogène Siva1 et TP furent traitées pendant 16 h à la cisplatine à une concentration de 50 μM et simultanément stimulées avec des doses croissantes de U46619. Ces conditions sont les mêmes que celles dans lesquelles l'effet du U46619 sur l'apoptose a été évalué à la figure 8.2. Tel que démontré à la figure 9.8A, le U46619 induit de façon dose-dépendante une diminution de l'expression de I κ B α (dont l'expression est normalement inversement corrélée à l'activation NF κ B) lorsque mesurée après 16 h de stimulation. Cet effet est antagonisé par un traitement concomitant au SQ29548 (figure 9.8B). Ces résultats suggèrent donc que le U46619 peut activer la voie NF κ B (ou minimalement diminuer son inhibiteur I κ B α) via le récepteur TP endogène des cellules HeLa.

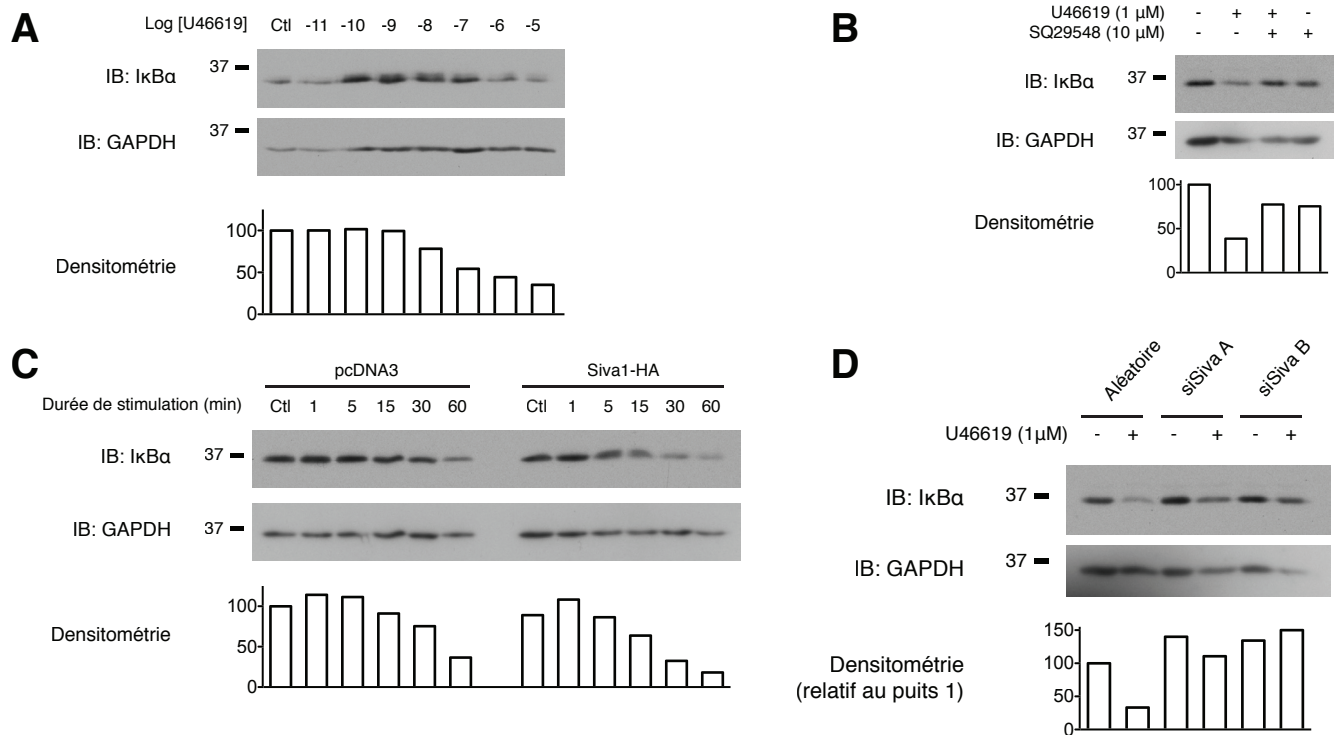


FIGURE 9.8 : TP active la voie NF κ B par un mécanisme dépendant de Siva

(A) Des cellules HeLa furent traitées pendant 16 h à la cisplatine (50 μM) et simultanément stimulées par des doses croissantes de U46619. Les cellules furent lysées puis analysées par SDS-PAGE et immunobuvardage. La stimulation du TP endogène des cellules HeLa entraîne une diminution dose-dépendante de l'expression totale d'I κ B α . (B) Cet effet peut être antagonisé par le SQ29548

(10 μ M). **(C)** Des cellules HEK293 exprimant Siva1-HA ou le vecteur pcDNA3 furent stimulées au U46619 (100 nM), puis lysées et analysées par SDS-PAGE et immunobuvardage. La diminution de l'expression totale d'I κ B α est visible après 30-60 minutes de stimulation au U46619. Une transfection de Siva1-HA accélère cette cinétique. **(D)** Des ARNs interférants ciblés contre Siva1 ou une séquence aléatoire furent transfectés en cellules HeLa. Les cellules furent par la suite traitées pendant 16 h à la cisplatine (50 μ M) et simultanément stimulées au U46619 (1 μ M). Comme en (A), la stimulation de TP endogène réprime l'expression d'I κ B α . Cet effet est inhibé par la transfection des ARN interférant. Ces figures sont représentatives de trois expériences distinctes.

Afin d'évaluer l'implication de Siva1 dans l'activation de la voie NF κ B par TP, Siva1-HA fut exprimée de façon transitoire dans des cellules HeLa pendant 48 h. Les cellules furent stimulées au U46619 à une concentration de 100 nM pendant 0 à 60 minutes, puis lysées et analysées par SDS-PAGE et immunobuvardage. Dans les cellules contrôles, une cinétique de stimulation démontre que le U46619 entraîne une diminution de l'expression d'I κ B α après 30-60 minutes (figure 9.8C). Par ailleurs, la co-expression de Siva1-HA accélère le processus de façon importante et entraîne une diminution d'I κ B α après seulement 5 minutes. L'expression initiale d'I κ B α semble similaire avec et sans Siva1-HA. Ces résultats suggèrent que Siva1 pourrait moduler l'activation de la voie NF κ B par TP. Afin d'évaluer la nécessité de Siva1 endogène sur la fonctionnalité de cette voie de signalisation, des ARN interférant ciblant l'exon 2 (siSiva A) ou l'exon 4 (siSiva B) de Siva1 furent transfectés dans des cellules HeLa 24 h avant le début du traitement à la cisplatine et au U46619 (figure 9.8D). Comme dans les autres expériences, la stimulation au U46619 diminue de façon importante l'expression de I κ B α , mais cet effet est fortement atténué dans les cellules siSiva A et B. Ensemble, ces résultats suggèrent un rôle important de Siva1 dans l'activation de la voie NF κ B par TP et impliquent que cette protéine pourrait potentiellement être une étape nécessaire au couplage du récepteur à cette voie.

9.2.9. Siva1 fait partie d'un complexe protéique impliquant l'arrestine

La capacité de Siva1 de moduler la signalisation des GPCR, de contrôler leur ubiquitinylation et de s'y associer directement sont des propriétés qui chevauchent étroitement les fonctions d'une importante classe de modulateurs de GPCR : les arrestines. Tout comme Siva1, les arrestines 2 et 3 peuvent s'associer physiquement aux GPCR et participent au processus d'ubiquitinylation des récepteurs (V. V. Gurevich et al., 2008) et de régulation des TRAF (E. V. Gurevich & Gurevich, 2006). L'arrestine 3 peut également interagir avec I κ B α et stabiliser la protéine en inhibant sa phosphorylation par IKK et sa dégradation subséquente (figure 7.7). Vu la similarité entre les fonctions connues des arrestines et les fonctions que nous avons rapportées pour Siva1, nous avons par la suite évalué si Siva1 pouvait être une composante d'un complexe protéique impliquant l'arrestine.

Siva1-HA fut co-exprimée en cellules HEK293T avec différentes constructions d'arrestine bovine recombinante, puis des co-immunoprécipitations furent effectuées. Tel qu'indiqué à la figure 9.9A, Siva1-HA co-immunoprécipite avec l'arrestine 2 et encore davantage avec l'arrestine 3. Des expériences similaires furent effectuées par la suite afin de vérifier la co-immunoprécipitation entre l'arrestine 3 et, cette fois-ci, différents mutants de Siva1. La figure 9.9B démontre qu'une ablation progressive de la portion C-terminale de Siva1 n'altère pas la co-immunoprécipitation de Siva1 par l'arrestine, suggérant que c'est la portion N-terminale ou centrale de Siva1 qui est responsable de l'interaction, contrairement à l'interaction entre Siva1 et TP β où le C-terminal de Siva1 semblait être un déterminant majeur.

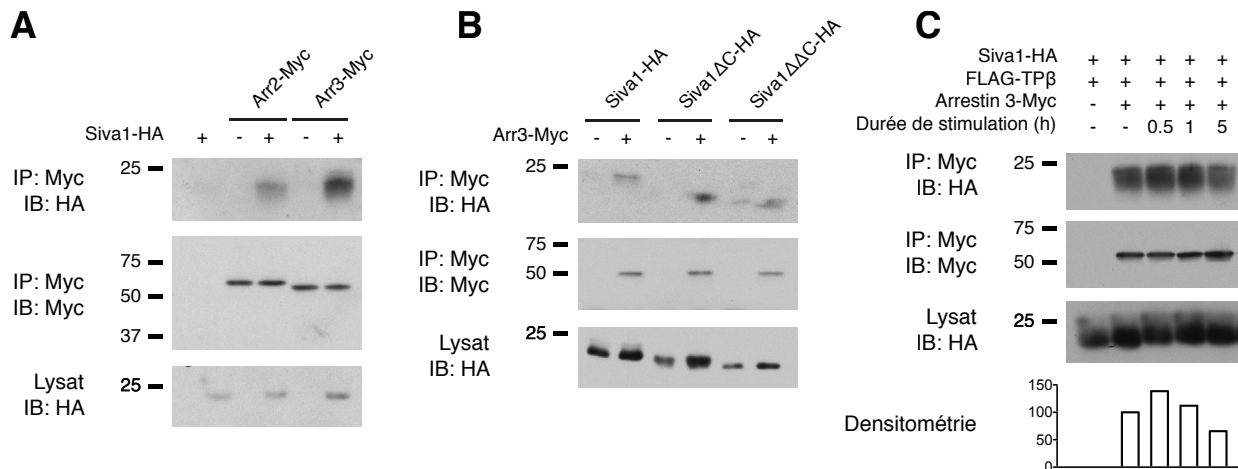


FIGURE 9.9 : Siva1 interagit avec l'arrestine *in cellulo*

(A) Des cellules HEK293 exprimant Siva1-HA et l'arrestine2-Myc ou l'arrestine3-Myc furent lysées. Des immunoprécipitations furent effectuées en utilisant des anticorps ciblant l'épitope Myc, puis les lysats et immunoprécipitats furent analysés par SDS-PAGE et immunobuvardages. Les arrestines co-immunoprécipitent avec Siva1. L'arrestine 3 semble co-immunoprécipiter davantage. (B) L'arrestine3-Myc exprimée dans des cellules HEK293 fut immunoprécipitée en présence de Siva1-HA, Siva1ΔC ou Siva1ΔΔC. Une ablation progressive du domaine C-terminal de Siva1 n'altère pas la co-immunoprécipitation avec l'arrestine 3, suggérant que le C-terminal n'est pas nécessaire à cette interaction. Siva1-HA : protéine complète (1-175); Siva1ΔC : 1-138; Siva1ΔΔC : 1-114. Les constructions utilisées sont les mêmes qu'à la figure 8.1B. (C) Des cellules HEK293 exprimant simultanément Siva1-HA, FLAG-TPβ et l'arrestine 3-Myc furent stimulées au U46619 (100 nM). Les cellules furent lysées, puis l'arrestine immunoprécipitée. Les lysats et immunoprécipitats furent analysés par SDS-PAGE et immunobuvardage. La co-immunoprécipitation entre Siva1 et l'arrestine 3 peut être modulée par une stimulation de TPβ. L'interaction est maximale entre 0,5 et 1 h et minimale après 5 h de stimulation. Ces résultats sont représentatifs de quatre expériences.

Afin d'établir si TP était apte à moduler l'interaction Siva1-Arrestine 3, des co-immunoprécipitations entre Siva1 et l'arrestine 3 furent finalement effectuées suite à une stimulation au U46619 à 100 nM pendant 30 minutes, 1 h ou 5 h. Les résultats sont présentés à la figure 9.9C où l'on observe une augmentation légère de la co-immunoprécipitation après 0,5-1 h de stimulation, suivie d'une diminution en dessous du niveau basal après 5 h. Ces résultats indiquent que le complexe

Siva1-Arrestine 3 peut être modulé par un agoniste du récepteur TP β selon une cinétique où l'interaction, probablement transitoire, serait maximale après 0,5-1 h et fortement diminuée à 5 h.

Le rôle de cette interaction demeure toutefois à préciser. Sachant que l'arrestine est impliquée dans la signalisation vers les MAP kinases, nous sommes actuellement à évaluer l'impact de Siva1 sur ces différentes voies. Des résultats préliminaires présentés en annexe 14.1 confirment qu'une stimulation du TP endogène des cellules HeLa active les trois voies MAPK testées. La transfection de Siva1 semble 1) réprimer l'activation initiale de p38, mais soutenir son activation prolongée; 2) réprimer l'activation soutenue des ERKs sans affecter son activation initiale; 3) ne pas affecter la voie JNK. ERK étant une voie surtout anti-apoptotique alors que p38 est plutôt pro-apoptotique, la transfection de Siva1 pourrait donc moduler la balance des MAPK activées par TP vers les voies pro-apoptotiques. Bien que les cinétiques précises de ces effets s'avèrent difficiles à reproduire, l'effet global de Siva tend vers ces conclusions. Des expériences supplémentaires (notamment en inhibant l'expression de Siva1 au moyen d'ARN interférant) seront nécessaires afin de confirmer l'effet de Siva1 sur la signalisation vers les MAPK et d'attester si l'expression de Siva1 est requise pour cet effet, mais ces investigations suggèrent déjà que l'effet modulateur de Siva1 sur la signalisation de TP pourrait ne pas se limiter à NF κ B, mais également impliquer des voies MAPK classiquement contrôlées par les arrestines.

10. DISCUSSION

Les travaux présentés ici permettent de mieux comprendre le rôle de Siva1, particulièrement au niveau de la signalisation des GPCR. Nous avons démontré que Siva1 interagit avec plusieurs récepteurs qui peuvent en moduler l'expression totale et, dans le cas de TP, la localisation et l'interaction avec différents partenaires connus. À l'inverse, Siva1 peut agir directement sur certains récepteurs et moduler l'ubiquitinylation des complexes protéiques associés. Pour TP, Siva1 semble impliquée dans le contrôle de l'expression totale d'IkBa et son interaction avec l'arrestine peut être modulée par une stimulation réceptorielle. Ensemble, ces résultats proposent un mécanisme expliquant comment la signalisation de TP pourrait être complètement déviée par Siva1 dans certaines pathologies ou situations physiologiques où l'expression de Siva1 varie, expliquant potentiellement la grande variabilité de phénotypes rapportés pour ce récepteur. Nos travaux jettent par ailleurs la base d'un nouveau mécanisme de régulation de l'apoptose par les GPCR qui pourrait ouvrir la voie à de nouvelles thérapies pour les pathologies où une dérégulation de l'apoptose est un facteur contributif.

10.1. Siva1 : nouvel acteur contrôlé par les GPCR

10.1.1. Généralisation du contrôle de Siva1 à d'autres GPCR

Nous avons démontré que l'expression de Siva1 peut être contrôlée par plusieurs GPCR. Pour les récepteurs TP, β_2 AR et DP, une stimulation par un agoniste augmente l'expression de Siva1 (figure 9.2). Dans le cas de TP, l'augmentation semble conséquence d'une diminution de la dégradation de Siva1 par un mécanisme que nous n'avons pas investigué en détail, mais qui ne semble pas impliquer l'ubiquitinylation de Siva1. TP et β_2 AR sont deux récepteurs reconnus pour leurs propriétés pro-apoptotiques, ce qui concorderait avec une fonction

globalement pro-apoptotique de Siva1, tel que décrit par plusieurs groupes (Prasad et al., 1997; Py et al., 2004). La littérature portant sur la modulation de l'apoptose par DP est beaucoup moins abondante et ne permet pas encore de conclure à un rôle clair. CHR3, quant à lui, est un récepteur anti-apoptotique et sa simple co-expression avec Siva1 est suffisante pour grandement inhiber l'expression totale de Siva1, supportant encore une fois la notion que Siva1 serait globalement pro-apoptotique. CHR2 n'est pas connu pour moduler l'apoptose (Tobin & Budd, 2003) et ne semble pas non-plus moduler l'expression totale de Siva1. Cette corrélation entre l'effet d'une stimulation réceptorielle sur l'expression de Siva1 et le phénotype anti- ou pro-apoptotique du récepteur porte à croire que l'implication de Siva1 dans la modulation de l'apoptose pourrait être généralisée à plusieurs GPCR. Cette hypothèse a été validée pour TP, où l'inhibition de l'expression de Siva1 par ARN interférant abolit la capacité du récepteur d'induire l'apoptose. Il sera intéressant de confirmer la nécessité de Siva1 pour la modulation de l'apoptose par les autres GPCR. Si Siva1 s'avère essentielle, le fait que son expression soit également contrôlable par plusieurs autres facteurs (incluant l'activation de p53 (Jacobs et al., 2007), l'ischémie (Padanilam et al., 1998), les infections virales ou même la confluence cellulaire (Severino et al., 2007)) démontre bien comment le contexte cellulaire global peut influencer la signalisation d'un récepteur et sa capacité d'induire un phénotype.

10.1.2. Pourquoi Siva1 interagit-elle directement avec les GPCR?

Au moment de débiter nos travaux, Siva1 était connue pour interagir avec cinq récepteurs de surface dont trois appartiennent à la famille des récepteurs de TNF (Prasad et al., 1997; Spinicelli et al., 2002) et deux appartiennent à la famille des GPCR (E et al., 2009). Le rôle spécifique de l'interaction de Siva1 avec ces récepteurs n'a jamais été établi. Il a été postulé que Siva1 pourrait agir pour CD27 comme un adaptateur qui permettrait au récepteur d'induire l'apoptose, bien qu'aucune donnée confirmant ou infirmant cette hypothèse n'ait encore été

publiée. Concernant les GPCR, si une activation de LPA₂ peut entraîner une ubiquitinylation et une dégradation accrues de Siva1, le rôle de l'interaction directe entre les deux protéines n'a jamais été vérifié, ni même la nécessité de Siva1 dans la protection contre l'apoptose conférée par LPA₂.

Pour la première fois, nous avons démontré ici que Siva1 interagit avec TP et que l'expression de Siva1 est nécessaire à la modulation de l'apoptose par le thromboxane A₂. Comme pour les autres groupes, nos résultats ne permettent pas d'établir si l'interaction directe entre le récepteur et Siva1 est nécessaire à la réalisation de cet effet. Toutefois, nous confirmons qu'en conditions de transfection, Siva1ΔC, dont l'interaction avec TP est fortement atténuée, est stabilisée par une stimulation de TP et peut transloquer au cytoplasme à la manière de Siva1. Ces résultats suggèrent que la stabilisation et la translocation de Siva1 pourraient être contrôlés par des voies de signalisation du récepteur indépendantes de l'interaction Siva1-récepteur, laissant ouverte la question du rôle spécifique de cette interaction.

Par ailleurs, nous avons démontré que Siva1 interagit avec une variété de GPCR, incluant IP, PAFR, AT₁R et CHRM3 en plus des récepteurs TPα, TPβ, LPA₂ et S1P₄, mais n'interagit pas avec CHRM2. Il est intéressant de constater que tous les récepteurs interagissant avec Siva1 sont des récepteurs couplés Gα_q, alors que les récepteurs couplés Gα_s ou Gα_i testés n'interagissaient soit pas avec Siva1 ou généraient des résultats contradictoires nous empêchant de nous prononcer. La pertinence biologique de cette observation reste à valider, mais ces résultats impliquent minimalement que, sans être particulièrement spécifique, l'interaction de Siva1 avec des GPCR possède tout de même une certaine sélectivité.

En analysant les séquences primaires, nous ne sommes pas parvenus à trouver de motif commun aux queues C-terminales de tous ces récepteurs qui pourrait prédire leur capacité de liaison à Siva1 (données non-présentées). L'observation

que Siva1 peut interagir tant avec la queue C-terminale de TP qu'avec ses boucles intracellulaires 1 et 2 suggère d'ailleurs que Siva1 pourrait lier simultanément plusieurs domaines du récepteur, compliquant d'autant plus la recherche de motifs dans la structure primaire de ces récepteurs. Cette situation pourrait toutefois permettre à la conformation tridimensionnelle du récepteur de directement réguler l'affinité de ce dernier pour Siva1 et, conséquemment, permettre aux agonistes de contrôler l'interaction Siva-récepteur de manière analogue au contrôle de l'activation des protéines G. De plus, l'observation que la portion C-terminale de Siva1 est impliquée dans l'interaction avec les GPCR pourrait laisser la portion N-terminale libre d'aller lier ses autres effecteurs. En effet, p53, XIAP, Bcl-xL et Bcl-2 semblent tous lier Siva1 dans des domaines N-terminaux à la cystéine 114 (Chu et al., 2004; Du et al., 2009; Resch et al., 2009). Pour TRAF2, la zone d'interaction sur Siva1 n'a pas été rapportée (Gudi et al., 2009). Pour l'arrestine, nous avons démontré que la portion C-terminale de Siva1 n'est pas nécessaire à la co-immunoprécipitation (figure 9.9B). À l'inverse, la portion C-terminale de Siva1 a été impliquée dans sa liaison aux récepteurs CD27 et LPA₂, en plus de TP, suggérant une ségrégation fonctionnelle où Siva1 pourrait lier directement des récepteurs par son C-terminal et des effecteurs par son N-terminal. S'il s'avère exact, ce modèle pourrait donc décrire une nouvelle voie de signalisation indépendante des protéines G exécutée par Siva1 et diversifiant la variété des issues possibles d'une stimulation d'un GPCR.

À cet égard, le modèle des récepteurs muscariniques est particulièrement intéressant, car d'autres ont déjà prouvé que la protection contre l'apoptose conférée par le carbachol via CHRM3 était indépendante de G $\alpha_{q/11}$ -PLC, ERK-1/2, JNK, p38 et PI3K, mais dépendait complètement d'une région polybasique de la queue C-terminale (Budd et al., 2003). Comme nous l'avons démontré, cette même région, une fois tronquée, abolit l'interaction du récepteur avec Siva1 (figure 9.3C). L'interaction Siva1-CHRM3 pourrait donc être le facteur par lequel CHRM3 module l'apoptose en formant une nouvelle voie de signalisation distincte

des voies connues pour les GPCR. D'autres expériences seront nécessaires afin de valider cette hypothèse, mais la perspective d'une nouvelle voie de signalisation vers l'apoptose indépendante des protéines G est très attrayante, surtout lorsque combinée au concept d'agonisme biaisé par le ligand (Evans et al., 2010) où différents ligands pourraient induire différents changements conformationnels activant différentes cascades intracellulaires.

Par ailleurs, le fait que Siva1 interagisse tant avec des GPCR qu'avec des membres de la famille des TNFR pourrait permettre aux événements découlant de cette interaction d'être déclenchés par les deux familles de récepteurs, faisant de Siva1 un point de convergence au niveau signalétique. Ici, l'activation de la voie NF κ B par des échaffaudages dépendant de l'ubiquitine (à l'instar de TRAF2, TAK1, NIK et IKK) pourrait justement constituer un bel exemple de voie partagée par les TNFR et les GPCR via Siva1.

10.2. Nouveau mécanisme de régulation de l'apoptose par le thromboxane A₂

10.2.1. Modulation de TP par Siva1

Pour le récepteur LPA₂, il a été démontré que la transfection de Siva1 potentialisait l'ubiquitinylation du récepteur suite à une stimulation (F.-T. Lin et al., 2007). Les auteurs associaient par la suite cette ubiquitinylation à une dégradation accrue du récepteur qu'ils postulaient être médiée par le protéasome. Nous avons démontré que la co-expression de Siva1 potentialise également l'ubiquitinylation de TP (figure 9.5). Le rôle de cette ubiquitinylation demeure toutefois à confirmer. Nous ne sommes pas parvenu à détecter de différence significative au niveau de l'expression totale du récepteur ou au niveau de son internalisation en présence ou en l'absence de Siva1 (figure 9.7), suggérant que

l'induction d'ubiquitylation de TP pourrait servir d'autres fonctions. Parmi elles, on pourrait imaginer un rôle signalétique vers NFκB.

Nous avons démontré qu'une stimulation de TP pouvait diminuer l'expression totale d'IκBα, un inhibiteur important de NFκB (figure 9.8). Cet effet pouvait être inhibé par des ARN interférants ciblant Siva1, démontrant que cette dernière est nécessaire à ce phénotype du récepteur. D'autres expériences seront requises pour démontrer que la modulation de l'expression d'IκBα se traduit réellement en une activation de l'activité NFκB, mais nos résultats démontrent qu'en présence de Siva1, la signalisation de TP peut minimalement converger jusqu'à IκBα. Pour les récepteurs de TNF, l'inhibition d'IκBα est contrôlée par le complexe IKK (figure 7.7) que le récepteur active en recrutant TRAF2 (figure 7.8). TRAF2 entraîne la poly-ubiquitylation K63 de plusieurs effecteurs qui utilisent les chaînes d'ubiquitines comme motif de reconnaissance et comme plateforme d'échafaudage. Il sera intéressant de vérifier si les chaînes d'ubiquitines sur TP sont polymérisées via leur lysine 48 ou 63. La poly-ubiquitine K48 étant un signal de reconnaissance protéasomale, nous croyons qu'une poly-ubiquitylation K63 du récepteur est plus probable. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que TRAF2 pourrait co-immunoprécipiter avec TP suite à une stimulation au U46619 en présence de Siva1, mais pas à l'état basal ou sans co-expression de Siva1 (figure 9.6). Cette observation suggère que TRAF2 pourrait être la E3-ligase de TP et que l'interaction entre les deux pourrait dépendre de Siva1. Il est probable que la cinétique de formation du complexe sera également importante à la compréhension du mécanisme. Nous avons démontré qu'une stimulation de TP pendant 5 h augmentait l'interaction entre Siva1 et TRAF2 (figure 8.5), mais diminuait l'interaction basale entre TP et Siva1 (figure 7.supp1). Notre hypothèse de travail actuelle est que Siva1 pourrait interagir avec TP de façon constitutive et qu'une stimulation du récepteur pourrait entraîner un recrutement de TRAF2 par Siva1 au récepteur. Une fois le complexe formé, TRAF2 pourrait entraîner une

poly-ubiquitinylation K63 de TP menant au relargage cytosolique du complexe Siva1-TRAF2. Ce modèle préliminaire reste à être validé expérimentalement.

10.2.2. Modulation de Siva1 par TP

L'ensemble de nos résultats permet d'apprécier un nouveau mécanisme par lequel TP, en contrôlant la protéine Siva1, module la sensibilité cellulaire à l'apoptose. Nous avons démontré que, dans des cellules HeLa, une activation des récepteurs TP endogènes entraîne une translocation cytoplasmique du Siva1 nucléaire (figure 8.6) et provoque sa stabilisation en entravant sa dégradation (figure 8.4). La stimulation semble également promouvoir les interactions pro-apoptotiques entre Siva1 et TRAF2 ou XIAP, et diminuer l'interaction anti-apoptotique entre Siva1 et Mdm2 (figure 8.5). Dans des cellules préalablement traitées à des doses non-toxiques de cisplatine, ces phénomènes sont associés à une induction de l'apoptose (figure 8.2). Nous avons démontré que cette induction peut être bloquée par l'antagoniste de TP SQ-29548 et qu'elle dépend complètement de l'expression de Siva1 (figure 8.7).

Étonnamment, en l'absence d'un traitement à la cisplatine, une stimulation de TP ne résulte pas en une induction de l'apoptose (figure 8.2). Cette observation pourrait s'expliquer de deux façons : d'une part, la cisplatine pourrait induire un facteur en aval de Siva1 absent des cellules à l'état basal et essentiel à l'induction de l'apoptose; d'autre part, la stimulation de TP à elle seule pourrait ne pas être suffisante pour élever l'expression de Siva1 au niveau requis pour l'induction de l'apoptose.

En faveur de la deuxième hypothèse, l'expression totale de Siva1 induite par la cisplatine et le U46619 combinés est substantiellement plus élevée que celle induite par chacun des deux traitements seul (figure 8.4). De plus, plusieurs rapports mentionnent qu'une simple transfection de Siva1 est suffisante pour

induire l'apoptose dans plusieurs types cellulaires (Prasad et al., 1997; Py et al., 2004). Indépendamment de la cause réelle, ce phénomène démontre que le phénotype obtenu suite à une stimulation de TP peut être fortement modulé par le contexte cellulaire (ici, vraisemblablement, la présence ou non de dommages à l'ADN induits par la cisplatine).

10.2.3. Unification des rôles pro- et anti-apoptotiques de TP

De façon surprenante, nos travaux démontrent que, si Siva1 est nécessaire à l'induction de l'apoptose par TP, elle permet également au récepteur d'activer la voie NF κ B, dont les actions finales sont plutôt reconnues comme anti-apoptotique (A. Lin & Karin, 2003). Ce paradoxe est à l'image de la littérature où de multiples groupes ont démontré des effets opposés de la stimulation de TP (Ekambaram et al., 2011).

En regard de nos résultats, nous proposons que l'activation NF κ B induite par TP pourrait contribuer à la réponse inflammatoire cellulaire classiquement associée aux prostanoïdes (Brunton et al., 2005) et conférer une certaine résistance à l'apoptose via la transcription des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Karin & Lin, 2002). Vu l'effet d'une transfection de Siva1 sur la cinétique de répression d'I κ B α en réponse à une stimulation (voir figure 9.8C) et puisque l'activation NF κ B peut être observée en l'absence de traitement à la cisplatine – moment où l'expression totale de Siva1 est très faible (voir figure 8.4D) – il est possible que la quantité de Siva1 requise pour l'obtention de ce phénotype soit minimale. À l'inverse, l'induction de l'apoptose par TP nécessite un traitement sub-toxique à la cisplatine qui élève l'expression totale de Siva1 au delà des niveaux induits par le U46619 seul (figure 8.4D).

Nous croyons donc qu'en présence d'une quantité faible de Siva1, TP pourrait induire une protection contre l'apoptose via une activation de la voie NF κ B. En

présence d'une forte quantité de Siva1, l'activation NFκB serait contre-balanç e par la translocation et l'accumulation cytoplasmique de Siva1 en complexe avec XIAP, TRAF2, Bcl-2 ou Bcl-xL pour, au final, induire l'apoptose.

Plusieurs facteurs sont connus pour faire varier l'expression totale de Siva1 incluant le statut de p53 (Fortin et al., 2004), l'ischémie (Singaravelu & Padanilam, 2011), les infections virales (Henke et al., 2001) et les traitements par diff erents agents chimiothérapeutiques (Barkinge et al., 2009). Notre découverte que Siva1 peut essentiellement dévier le phénotype obtenu suite à une stimulation de TP permet maintenant d'apprécier comment la signalisation du récepteur pourrait être affectée par le contexte dans lequel ce dernier est activé.

10.3. Implications cliniques des découvertes rapportées

10.3.1. Siva1 comme contributeur à l'ischémie

L'ischémie est un processus commun à plusieurs maladies, incluant l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral. Dans l'infarctus du myocarde, le mécanisme pathophysiologique implique généralement la rupture d'une paroi vasculaire affaiblie par des dépôts athérosclérotiques. Cette brèche entraîne alors un recrutement et une activation des plaquettes qui tenteront de la colmater. Dépendamment de l'importance de la brèche et de l'état de coagulabilité du patient, ce processus de réparation peut mener à une occlusion complète du vaisseau qui prive les tissus distaux de l'irrigation sanguine apportant le glucose et l'oxygène nécessaire à la fonction cellulaire. L'activation plaquettaire est un processus médié par le thromboxane A₂ et, conséquemment, le traitement initial d'un infarctus du myocarde consiste en l'administration immédiate d'acide acétylsalicylique inhibant la COX plaquettaire et la synthèse de TXA₂ (Antithrombotic Trialists' Collaboration, 2002). S'il était initialement postulé que la mort cellulaire, dans l'infarctus, était le résultat d'un processus nécrotique, il est

maintenant apprécié qu'une certaine proportion des pertes cellulaires résultent plutôt d'un processus apoptotique complété au moment de la reperfusion (Freude et al., 2000). À cet effet, des traitements expérimentaux avec des inhibiteurs de caspases ou des molécules antagonistes de Bcl-2 ont déjà démontré une certaine efficacité dans la réduction des pertes tissulaires dans l'infarctus (Hochhauser et al., 2003; Elmore, 2007).

Il est maintenant connu que l'expression de Siva1 peut être induite par l'ischémie (Padanilam et al., 1998; Singaravelu & Padanilam, 2011). Nous avons également démontré qu'en présence d'un traitement à la cisplatine élevant l'expression de Siva, TP acquiert la capacité d'induire l'apoptose. Il serait donc permis de croire qu'en situation ischémique, où l'expression de Siva1 et la synthèse de TXA₂ sont tous deux augmentés, l'activation de TP pourrait contribuer au processus apoptotique délétère (en plus d'induire l'agrégation plaquettaire initialement responsable de l'ischémie). Bien que la thérapie actuelle cible déjà la synthèse de TXA₂ par les COX, d'autres molécules peuvent agir comme agoniste sur TP, notamment les isoprostanes. Les isoprostanes sont des métabolites de l'acide arachidonique obtenus par une dégradation non-enzymatique de ce précurseur suite à des attaques de radicaux libres (Brunton et al., 2005). Il a été démontré que leur synthèse est augmentée lors de l'ischémie-reperfusion et que ces derniers pourraient agir comme agonistes partiels de TP, sans toutefois reproduire le phénotype d'agrégation plaquettaire (Cracowski, 2004). Il serait intéressant d'évaluer l'effet des isoprostanes sur la modulation de l'apoptose par TP. Puisque leur synthèse semble bien corrélée au stress oxydatif en général (Comporti et al., 2009) – une situation associée à l'apoptose – il serait envisageable que, par rapport au TXA₂, ces médiateurs soient des agonistes biaisés pour l'induction de l'apoptose au lieu de l'agrégation plaquettaire. Pour le traitement des maladies ischémiques comme l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral, une telle trouvaille pourrait justifier l'utilisation aiguë d'antagonistes de TP pendant l'ischémie-reperfusion pour protéger contre

l'apoptose induite par TP via les isoprostanes, qui s'ajouteraient à la prise chronique d'inhibiteurs de COX visant à prévenir les récurrences d'occlusion vasculaire. Cette double couverture permettrait d'atténuer le processus causatif de l'ischémie (l'agrégation plaquettaire) tout en fournissant une protection des tissus ischémiques contre l'apoptose induite via TP par des médiateurs indépendants de des COX.

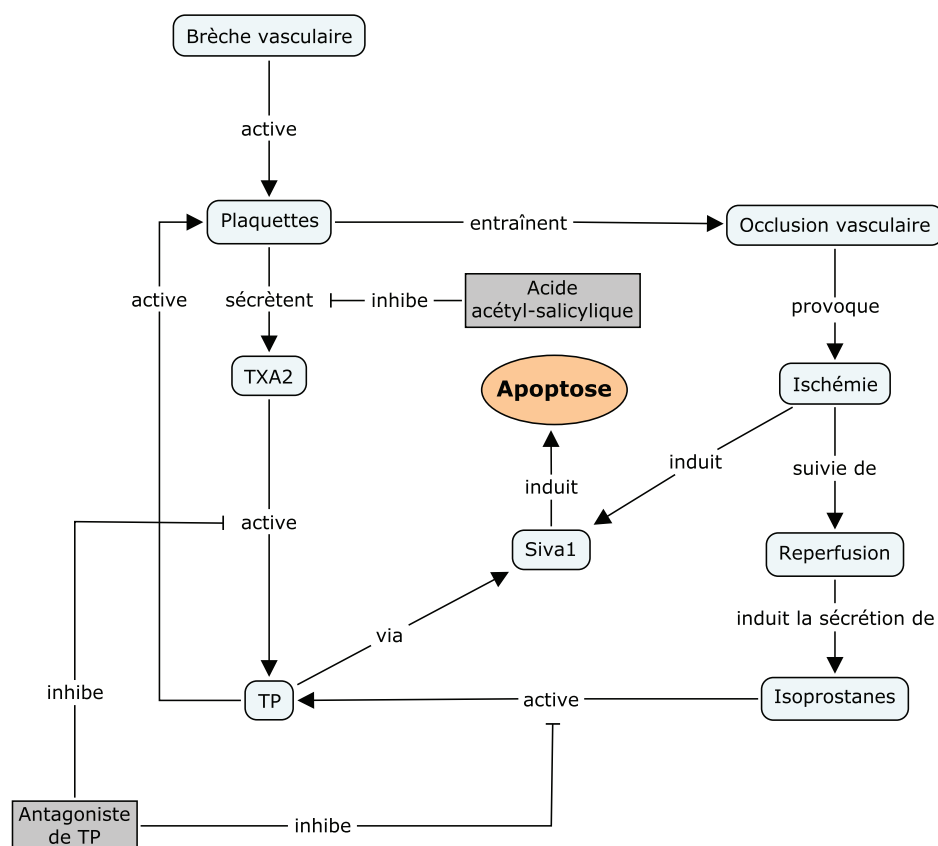


FIGURE 10.1 : Rôle potentiel de TP dans l'apoptose observée en ischémie-reperfusion

TP peut être activé tant par le thromboxane A₂ que par les isoprostanes. En présence de Siva1, une stimulation de TP induit l'apoptose. Une intervention pharmacologique ciblant la synthèse de TXA₂ est bénéfique, car elle minimise la progression de l'occlusion vasculaire causant l'ischémie. Cette stratégie ne cible toutefois pas les isoprostanes, qui pourraient possiblement constituer un acteur important de l'apoptose induite lors de la reperfusion. L'ajout d'un antagoniste de TP pendant la période de reperfusion pourrait potentiellement protéger les tissus contre l'apoptose et ainsi minimiser les conséquences de l'incident ischémique sur la fonction de l'organe affecté.

10.3.2. Siva1 comme cible de la transformation cancéreuse

Nos travaux ont également des implications dans la pathophysiologie et le traitement du cancer. D'une part, Siva1 est sous le contrôle transcriptionnel de p53 (Jacobs et al., 2007), dont la fonctionnalité est entravée dans la majorité des cancers humains (Oren, 2003). Certains auteurs ont d'ailleurs noté que, dans plusieurs cancers, l'expression de Siva1 est fortement diminuée (Okuno et al., 2001; Miller et al., 2009), voire indétectable (Têtu et al., 2008) et cette diminution, dans les tumeurs ovariennes, semble associée à une résistance accrue à la chimiothérapie de première ligne (Bachvarov et al., 2006). Selon notre modèle (figure 10.2), une faible expression de Siva1 pourrait expliquer pourquoi TP, dans les cellules cancéreuses, semble protéger contre l'apoptose (Ekambaram et al., 2011) alors qu'il semble plutôt l'induire dans la majorité des tissus non-cancéreux étudiés (Jariyawat et al., 1997; Beauchamp et al., 2001; Yusuf et al., 2001). Probablement conséquence de cette protection, plusieurs cancers surexpriment la thromboxane synthétase et présentent une production accrue de TXA₂ de même qu'une production diminuée de PGI₂ pro-apoptotique (Cathcart et al., 2010). Dans le cancer de la vessie, une surexpression de la thromboxane synthétase est associée à un mauvais pronostic (Moussa et al., 2005).

Par ailleurs, le traitement de plusieurs cancers, notamment gynécologiques, oto-rhino-laryngologiques et vésicaux implique l'administration de cisplatine. Nous avons démontré, pour la première fois, que la cisplatine induisait la production de TXA₂ *in vitro* (figure 8.3). Cet effet a également été observé par d'autres groupes de façon systémique, chez l'humain (Aitokallio-Tallberg et al., 1989; Blöchl-Daum et al., 1995). Au niveau de la tumeur, où l'expression de Siva1 est possiblement très faible et où p53 est inactivé, il serait envisageable que cette sécrétion de TXA₂ contribue au processus de résistance à la cisplatine en protégeant les cellules tumorales contre l'apoptose via une activation NFκB. À l'inverse, dans les tissus et organes sains où l'expression de Siva1 peut être adéquatement élevée par la

cisplatine (via p53) et TP, cette même sécrétion de TXA₂ pourrait plutôt favoriser l'induction de l'apoptose et ainsi contribuer à la toxicité du traitement chimiothérapeutique, notamment au niveau rénal (Jariyawat et al., 1997). Nous sommes actuellement en préparation d'une étude clinique de phase II qui visera à déterminer la validité de ces hypothèses et évaluer la pertinence d'une inhibition de l'axe du thromboxane à l'aide de Terbogrel (un antagoniste de TP et un inhibiteur de la thromboxane synthétase) lors de traitements chimiothérapeutiques de cancers du col de l'utérus. Nous croyons que cette stratégie pourrait minimiser la toxicité rénale de la cisplatine chez une majorité de patients et même améliorer la réponse tumorale au traitement, particulièrement pour les patients chez qui la thromboxane synthétase est surexprimée.

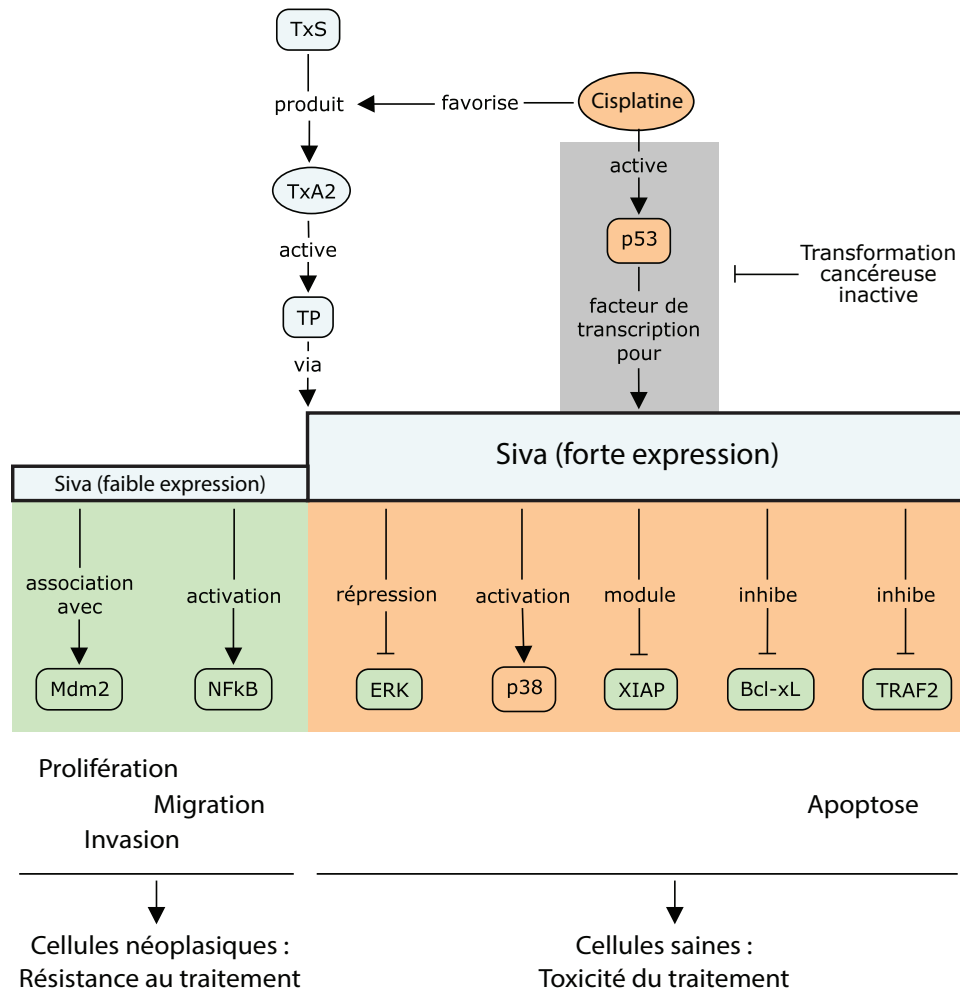


FIGURE 10.2 : Action double du TXA₂ lors du traitement d'un cancer à la cisplatine

Un traitement à la cisplatine induit une sécrétion de TXA₂ et le phénotype cellulaire en réponse à une stimulation de TP dépend en partie du niveau d'expression de Siva1. Dans les cellules néoplasiques où l'expression de Siva1 est réprimée, la stimulation de TP en réponse au traitement à la cisplatine pourrait favoriser la résistance au traitement chimiothérapeutique en induisant une résistance à l'apoptose et une prolifération cellulaire. À l'inverse, dans les cellules saines où Siva1 est exprimée à des niveaux supérieurs, la production de TXA₂ pourrait favoriser l'apoptose en réponse à la chimiothérapie et ainsi amplifier la toxicité du traitement. Le corolaire de ce modèle est qu'un antagonisme de TP dans ces deux situations pourrait améliorer l'efficacité du traitement et en diminuer la toxicité. Les protéines identifiées en orange sont généralement pro-apoptotiques, alors que celles identifiées en vert sont plutôt anti-apoptotiques.

11. CONCLUSION

L'apoptose est un processus impliqué dans un grand nombre de pathologies (Elmore, 2007). Sa régulation est d'une complexité impressionnante et implique l'action concertée d'une grande variété d'acteurs. Par ces travaux, nous avons démontré que Siva1 est une protéine impliquée dans la signalisation du récepteur TP, en plus de ses actions connues aux récepteurs LPA₂ et CD27. Nous avons prouvé que la stimulation de TP entraîne une translocation et une accumulation cytoplasmique de Siva1 résultant en une induction de l'apoptose. Nous avons également démontré que l'expression de Siva1 potentialise l'ubiquitinylation du récepteur en réponse à une stimulation et que cette ubiquitinylation n'est associée ni à une dégradation accrue du récepteur, ni à une internalisation accrue. Nous avons par ailleurs observé que Siva1 permet à la stimulation de TP de diminuer IκBα, l'inhibiteur principal de la voie NFκB et proposons que cet effet pourrait résulter d'une signalisation dépendant de l'ubiquitine et analogue à celle des TNFR, mais déclenchée par un GPCR. D'autre part, nous avons présenté une interaction entre Siva1 et l'arrestine et explorons actuellement l'effet de l'expression de Siva1 sur l'activation des MAPK. Nous proposons un modèle réconciliant les fonctions anti- et pro-apoptotiques de TP et dans lequel le phénotype final d'une stimulation dépend de l'expression relative de Siva1. Les corollaires de ce modèle pourraient possiblement bonifier la prise en charge d'incidents ischémiques comme l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral, et améliorer le traitement du cancer par une diminution de la toxicité d'agents chimiothérapeutiques et l'amélioration de la sensibilité tumorale. En plus de ces retombées directes, la généralisation de la voie Siva1 à des récepteurs autres que TP (incluant β₂AR, DP et CHRM3) permettra peut-être des avancées concernant d'autres récepteurs pour lesquels régulation de l'apoptose demeure à ce jour incomprise.

12. REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier chaleureusement les collaborateurs suivants pour leur aide et précieux conseils tout au long de ces travaux :

Dr Jean-Luc Parent

Dr Audrey Parent

Pascale Germain

Dr Léonid Volkov

Dr Jean-Bernard Denault

Jérôme Cabana

13. RÉFÉRENCES

Adams, J. W.; Brown, J. H. G-proteins in growth and apoptosis: lessons from the heart. *Oncogene* **2001**, *20*, 1626–1634.

Aitokallio-Tallberg, A.; Viinikka, L.; Ylikorkala, O. Urinary excretion of prostacyclin and thromboxane degradation products in patients with ovarian malignancy: effect of cytostatic treatment. *Br. J. Cancer* **1989**, *60*, 785–788.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*; 5(5th) ed. Garland Science, 2007.

Antithrombotic Trialists' Collaboration Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* **2002**, *324*, 71–86.

ASCO Accelerating Progress Against Cancer: ASCO's Blueprint for Transforming Clinical and Translational Cancer Research. **2011**, 1–32.

Ashton, A. W.; Ware, J. A. Thromboxane A2 receptor signaling inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell differentiation and migration. *Circ. Res.* **2004**, *95*, 372–379.

Bachvarov, D.; L'Esperance, S.; Popa, I.; Bachvarova, M.; Plante, M.; Têtu, B. Gene expression patterns of chemoresistant and chemosensitive serous epithelial ovarian tumors with possible predictive value in response to initial chemotherapy. *Int. J. Oncol.* **2006**, *29*, 919–933.

Balci Peynircioglu, B.; Waite, A. L.; Hu, C.; Richards, N.; Staubach Grosse, A.;

- Yilmaz, E.; Gumucio, D. L. Pynin, product of the MEFV locus, interacts with the proapoptotic protein, Siva. *J. Cell. Physiol.* **2008**, *216*, 595–602.
- Barki-Harrington, L.; Rockman, H. A. Beta-arrestins: multifunctional cellular mediators. *Physiology (Bethesda)* **2008**, *23*, 17–22.
- Barkinge, J. L.; Gudi, R.; Sarah, H.; Chu, F.; Borthakur, A.; Prabhakar, B. S.; Prasad, K. V. S. The p53-induced Siva-1 plays a significant role in cisplatin-mediated apoptosis. *J. Carcinog* **2009**, *8*, 2.
- Beauchamp, M. H.; Martinez-Bermudez, A. K.; Gobeil, F.; Marrache, A. M.; Hou, X.; Speranza, G.; Abran, D.; et al. Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy. *J. Appl. Physiol.* **2001**, *90*, 2279–2288.
- Beaulieu, J.-M.; Sotnikova, T. D.; Marion, S.; Lefkowitz, R. J.; Gainetdinov, R. R.; Caron, M. G. An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* **2005**, *122*, 261–273.
- Blöchl-Daum, B.; Pehamberger, H.; Kurz, C.; Kyrle, P. A.; Wagner, O.; Müller, M.; Monitzer, B.; et al. Effects of cisplatin on urinary thromboxane B2 excretion. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1995**, *58*, 418–424.
- Bockaert, J.; Perroy, J.; Bécamel, C.; Marin, P.; Fagni, L. GPCR interacting proteins (GIPs) in the nervous system: Roles in physiology and pathologies. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, *50*, 89–109.
- Boucher, D.; Denault, J.-B. Caspase Family. In *Encyclopedia of Signaling Molecules*; Choi, S., Ed. Springer New York: New-York, 2012; pp. 242–256.

- Brunton, L.; Lazo, J.; Parker, K. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Eleventh Edition*; 11(null) ed. McGraw-Hill Professional, 2005.
- Budd, D. C.; McDonald, J.; Emsley, N.; Cain, K.; Tobin, A. B. The C-terminal tail of the M3-muscarinic receptor possesses anti-apoptotic properties. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 19565–19573.
- Burroughs, A. M.; Iyer, L. M.; Aravind, L. Functional diversification of the RING finger and other binuclear treble clef domains in prokaryotes and the early evolution of the ubiquitin system. *Mol Biosyst* **2011**, *7*, 2261–2277.
- Calebiro, D.; Nikolaev, V. O.; Persani, L.; Lohse, M. J. Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* **2010**, *31*, 221–228.
- Cathcart, M.-C.; Reynolds, J. V.; O'Byrne, K. J.; Pidgeon, G. P. The role of prostacyclin synthase and thromboxane synthase signaling in the development and progression of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1805*, 153–166.
- Chae, H. J.; Kang, J. S.; Byun, J. O.; Han, K. S.; Kim, D. U.; Oh, S. M.; Kim, H. M.; et al. Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacol. Res.* **2000**, *42*, 373–381.
- Chaudhari, B. R.; Murphy, R. F.; Agrawal, D. K. Following the TRAIL to apoptosis. *Immunol. Res.* **2006**, *35*, 249–262.
- Chen, Z. J. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 758–765.

- Chu, F.; Borthakur, A.; Sun, X.; Barkinge, J.; Gudi, R.; Hawkins, S.; Prasad, K. V. S. The Siva-1 putative amphipathic helical region (SAH) is sufficient to bind to BCL-XL and sensitize cells to UV radiation induced apoptosis. *Apoptosis* **2004**, *9*, 83–95.
- Ciechanover, A. Intracellular Protein Degradation: From a Vague Idea, through the Lysosome and the Ubiquitin-Proteasome System, and onto Human Diseases and Drug Targeting (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5944–5967.
- Comporti, M.; Arezzini, B.; Signorini, C.; Vecchio, D.; Gardi, C. Oxidative stress, isoprostanes and hepatic fibrosis. *Histol. Histopathol.* **2009**, *24*, 893–900.
- Comporti, M.; Signorini, C.; Arezzini, B.; Vecchio, D.; Monaco, B.; Gardi, C. F2-isoprostanes are not just markers of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *44*, 247–256.
- Cotter, T. G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 501–507.
- Cottle, D. L.; McGrath, M. J.; Wilding, B. R.; Cowling, B. S.; Kane, J. M.; D'Arcy, C. E.; Holdsworth, M.; et al. SLIMMER (FHL1B/KyoT3) interacts with the proapoptotic protein Siva-1 (CD27BP) and delays skeletal myoblast apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 26964–26977.
- Cracowski, J.-L. Isoprostanes: an emerging role in vascular physiology and disease? *Chem. Phys. Lipids* **2004**, *128*, 75–83.
- Danial, N. N. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death.

Clin. Cancer Res. **2007**, *13*, 7254–7263.

Daoud, S. S.; Munson, P. J.; Reinhold, W.; Young, L.; Prabhu, V. V.; Yu, Q.; LaRose, J.; et al. Impact of p53 knockout and topotecan treatment on gene expression profiles in human colon carcinoma cells: a pharmacogenomic study. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 2782–2793.

Datar, S.; McCauley, F. A.; Wilson, T. W. Testing the “redirection hypothesis” of prostaglandin metabolism in the kidney. *Prostaglandins* **1987**, *33*, 275–285.

DeCherney, A.; Nathan, L.; Goodwin, T. M.; Laufer, N. *CURRENT Diagnosis & Treatment Obstetrics & Gynecology, Tenth Edition (LANGE CURRENT Series)*; 10(null) ed. McGraw-Hill Medical, 2006.

Diegmann, J.; Junker, K.; Loncarevic, I. F.; Michel, S.; Schimmel, B.; Eggeling, von, F. Immune escape for renal cell carcinoma: CD70 mediates apoptosis in lymphocytes. *Neoplasia* **2006**, *8*, 933–938.

Du, W.; Jiang, P.; Li, N.; Mei, Y.; Wang, X.; Wen, L.; Yang, X.; et al. Suppression of p53 activity by Siva1. *Cell Death Differ* **2009**, *16*, 1493–1504.

E, S.; Lai, Y.-J.; Tsukahara, R.; Chen, C.-S.; Fujiwara, Y.; Yue, J.; Yu, J.-H.; et al. Lysophosphatidic acid 2 receptor-mediated supramolecular complex formation regulates its antiapoptotic effect. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 14558–14571.

Ekambaram, P.; Lambiv, W.; Cazzolli, R.; Ashton, A. W.; Honn, K. V. The thromboxane synthase and receptor signaling pathway in cancer: an emerging paradigm in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **2011**.

- Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **2007**, *35*, 495–516.
- Evans, B. A.; Sato, M.; Sarwar, M.; Hutchinson, D. S.; Summers, R. J. Ligand-directed signalling at beta-adrenoceptors. *British Journal of Pharmacology* **2010**, *159*, 1022–1038.
- Foody, J. M.; Farrell, M. H.; Krumholz, H. M. beta-Blocker therapy in heart failure: scientific review. *JAMA* **2002**, *287*, 883–889.
- Fortin, A.; MacLaurin, J. G.; Arbour, N.; Cregan, S. P.; Kushwaha, N.; Callaghan, S. M.; Park, D. S.; et al. The proapoptotic gene SIVA is a direct transcriptional target for the tumor suppressors p53 and E2F1. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 28706–28714.
- Fraser, C. C. G protein-coupled receptor connectivity to NF-kappaB in inflammation and cancer. *Int Rev Immunol* **2008**, *27*, 320–350.
- Freude, B.; Masters, T. N.; Robicsek, F.; Fokin, A.; Kostin, S.; Zimmermann, R.; Ullmann, C.; et al. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2000**, *32*, 197–208.
- Fujita, T.; Ishikawa, Y. Apoptosis in heart failure. -The role of the β -adrenergic receptor-mediated signaling pathway and p53-mediated signaling pathway in the apoptosis of cardiomyocytes-. *Circ. J.* **2011**, *75*, 1811–1818.
- Galandrin, S.; Oligny-Longpré, G.; Bouvier, M. The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends in Pharmacological Sciences* **2007**, *28*, 423–430.

- Gallant, M. A.; Slipetz, D.; Hamelin, E.; Rochdi, M. D.; Talbot, S.; de Brum-Fernandes, A. J.; Parent, J.-L. Differential regulation of the signaling and trafficking of the two prostaglandin D2 receptors, prostanoid DP receptor and CRTH2. *European Journal of Pharmacology* **2007**, *557*, 115–123.
- Gao, H.; Sun, Y.; Wu, Y.; Luan, B.; Wang, Y.; Qu, B.; Pei, G. Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways. *Mol. Cell* **2004**, *14*, 303–317.
- Gao, Y.; Yokota, R.; Tang, S.; Ashton, A. W.; Ware, J. A. Reversal of angiogenesis in vitro, induction of apoptosis, and inhibition of AKT phosphorylation in endothelial cells by thromboxane A(2). *Circ. Res.* **2000**, *87*, 739–745.
- Giebler, H. A.; Lemasson, I.; Nyborg, J. K. p53 recruitment of CREB binding protein mediated through phosphorylated CREB: a novel pathway of tumor suppressor regulation. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 4849–4858.
- Giese, A.; Hagel, C.; Kim, E. L.; Zapf, S.; Djawaheri, J.; Berens, M. E.; Westphal, M. Thromboxane synthase regulates the migratory phenotype of human glioma cells. *Neuro-oncology* **1999**, *1*, 3–13.
- Giguère, V.; Gallant, M. A.; de Brum-Fernandes, A. J.; Parent, J.-L. Role of extracellular cysteine residues in dimerization/oligomerization of the human prostacyclin receptor. *European Journal of Pharmacology* **2004**, *494*, 11–22.
- Goulielmos, G. N.; Petraki, E.; Vassou, D.; Eliopoulos, E.; Iliopoulos, D.; Sidiropoulos, P.; Aksentijevich, I.; et al. The role of the pro-apoptotic protein Siva in the pathogenesis of Familial Mediterranean fever: A structural and functional analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*

2010, 402, 141–146.

Green, D. R.; Kroemer, G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* **2009**, 458, 1127–1130.

Gudi, R.; Barkinge, J.; Hawkins, S.; Chu, F.; Manicassamy, S.; Sun, Z.; Duke-Cohan, J. S.; et al. Siva-1 negatively regulates NF-kappaB activity: effect on T-cell receptor-mediated activation-induced cell death (AICD). *Oncogene* **2006**, 25, 3458–3462.

Gudi, R.; Barkinge, J.; Hawkins, S.; Prabhakar, B.; Kanteti, P. Siva-1 promotes K-48 polyubiquitination of TRAF2 and inhibits TCR-mediated activation of NF-kappaB. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **2009**, 28, 25–38.

Gurevich, E. V.; Gurevich, V. V. Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol.* **2006**, 7, 236.

Gurevich, V. V.; Gurevich, E. V.; Cleghorn, W. M. Arrestins as multi-functional signaling adaptors. *Handb Exp Pharmacol* **2008**, 15–37.

Hall, S. L.; Lorenc, T. Secondary prevention of coronary artery disease. *Am Fam Physician* **2010**, 81, 289–296.

Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, 100, 57–70.

Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, 144, 646–674.

Hatae, T.; Wada, M.; Yokoyama, C.; Shimonishi, M.; Tanabe, T. Prostacyclin-

dependent apoptosis mediated by PPAR delta. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 46260–46267.

Henke, A.; Launhardt, H.; Klement, K.; Stelzner, A.; Zell, R.; Munder, T. Apoptosis in coxsackievirus B3-caused diseases: interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic protein siva. *J. Virol.* **2000**, *74*, 4284–4290.

Henke, A.; Nestler, M.; Strunze, S.; Saluz, H.-P.; Hortschansky, P.; Menzel, B.; Martin, U.; et al. The apoptotic capability of coxsackievirus B3 is influenced by the efficient interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic host protein Siva. *Virology* **2001**, *289*, 15–22.

Hochhauser, E.; Kivity, S.; Offen, D.; Maulik, N.; Otani, H.; Barhum, Y.; Pannet, H.; et al. Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2003**, *284*, H2351–9.

Huang, R.-Y.; Li, M.-Y.; Hsin, M. K. Y.; Underwood, M. J.; Ma, L. T.; Mok, T. S. K.; Warner, T. D.; et al. 4-Methylnitrosamino-1-3-pyridyl-1-butanone (NNK) promotes lung cancer cell survival by stimulating thromboxane A2 and its receptor. *Oncogene* **2011**, *30*, 106–116.

Jacobs, S. B. R.; Basak, S.; Murray, J. I.; Pathak, N.; Attardi, L. D. Siva is an apoptosis-selective p53 target gene important for neuronal cell death. *Cell Death Differ* **2007**, *14*, 1374–1385.

Jariyawat, S.; Takeda, M.; Kobayashi, M.; Endou, H. Thromboxane A2 mediates cisplatin-induced apoptosis of renal tubule cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1997**, *42*, 113–121.

Jiang, B.-H.; Liu, L.-Z. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1784*, 150–158.

Karin, M.; Lin, A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 221–227.

Keshet, Y.; Seger, R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *661*, 3–38.

Khan, M. N. A.; Lee, Y. S. Cyclooxygenase inhibitors: scope of their use and development in cancer chemotherapy. *Med Res Rev* **2011**, *31*, 161–201.

Kim, S.; Jee, K.; Kim, D.; Koh, H.; Chung, J. Cyclic AMP inhibits Akt activity by blocking the membrane localization of PDK1. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 12864–12870.

Kliegman, R.; Marcdante, K.; Jenson, H.; Behrman, R. *Nelson Essentials of Pediatrics, 5E with STUDENT CONSULT Access Fifth Edition*(*Nelson Essentials of Pediatrics*); 5(null) ed. Saunders, 2005.

Kohout, T. A.; Lin, F. S.; Perry, S. J.; Conner, D. A.; Lefkowitz, R. J. beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 1601–1606.

Köberle, B.; Tomicic, M. T.; Usanova, S.; Kaina, B. Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1806*, 172–182.

- Kroemer, G.; Martin, S. J. Caspase-independent cell death. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 725–730.
- Kruse, J.-P.; Gu, W. Modes of p53 regulation. *Cell* **2009**, *137*, 609–622.
- Kürzel, F.; Hagel, C.; Zapf, S.; Meissner, H.; Westphal, M.; Giese, A. Cyclooxygenase inhibitors and thromboxane synthase inhibitors differentially regulate migration arrest, growth inhibition and apoptosis in human glioma cells. *Acta Neurochirurgica* **2002**, *144*, 71–87.
- Lane, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **1992**, *358*, 15–16.
- Lanzafame, A. A.; Christopoulos, A.; Mitchelson, F. Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. *Recept. Channels* **2003**, *9*, 241–260.
- Lawlor, M. A.; Alessi, D. R. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *Journal of Cell Science* **2001**, *114*, 2903–2910.
- Le Gouill, C.; Parent, J. L.; Caron, C. A.; Gaudreau, R.; Volkov, L.; Rola-Pleszczynski, M.; Stanková, J. Selective modulation of wild type receptor functions by mutants of G-protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 12548–12554.
- Leung, K. C.; Hsin, M. K. Y.; Chan, J. S. Y.; Yip, J. H. Y.; Li, M.; Leung, B. C. S.; Mok, T. S. K.; et al. Inhibition of thromboxane synthase induces lung cancer cell death via increasing the nuclear p27. *Exp. Cell Res.* **2009**, *315*, 2974–2981.
- Li, X.; Tai, H.-H. Activation of thromboxane A(2) receptors induces orphan nuclear

receptor Nurr1 expression and stimulates cell proliferation in human lung cancer cells. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 1606–1613.

Lilenbaum, R.; Socinski, M. A.; Altorki, N. K.; Hart, L. L.; Keresztes, R. S.; Hariharan, S.; Morrison, M. E.; et al. Randomized phase II trial of docetaxel/irinotecan and gemcitabine/irinotecan with or without celecoxib in the second-line treatment of non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 4825–4832.

Lin, A.; Karin, M. NF-kappaB in cancer: a marked target. *Semin. Cancer Biol.* **2003**, *13*, 107–114.

Lin, F.-T.; Lai, Y.-J.; Makarova, N.; Tigyi, G.; Lin, W.-C. The lysophosphatidic acid 2 receptor mediates down-regulation of Siva-1 to promote cell survival. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 37759–37769.

Lin, K. H.; Chang, H. C.; Lu, W. J.; Jayakumar, T.; Chou, H. C.; Fong, T. H.; Hsiao, G.; et al. Comparison of the relative activities of inducing platelet apoptosis stimulated by various platelet-activating agents. *Platelets* **2009**, *20*, 575–581.

Luan, B.; Zhang, Z.; Wu, Y.; Kang, J.; Pei, G. Beta-arrestin2 functions as a phosphorylation-regulated suppressor of UV-induced NF-kappaB activation. *EMBO J.* **2005**, *24*, 4237–4246.

Marchese, A.; Paing, M. M.; Temple, B. R. S.; Trejo, J. G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2008**, *48*, 601–629.

McDonald, P. H.; Chow, C. W.; Miller, W. E.; Laporte, S. A.; Field, M. E.; Lin, F. T.;

- Davis, R. J.; et al. Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* **2000**, *290*, 1574–1577.
- Meier, P.; Vousden, K. H. Lucifer's labyrinth--ten years of path finding in cell death. *Mol. Cell* **2007**, *28*, 746–754.
- Menon, B.; Johnson, J. N.; Ross, R. S.; Singh, M.; Singh, K. Glycogen synthase kinase-3beta plays a pro-apoptotic role in beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult rat ventricular myocytes: Role of beta1 integrins. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2007**, *42*, 653–661.
- Mihatsch, K.; Nestler, M.; Saluz, H.-P.; Henke, A.; Munder, T. Proapoptotic protein Siva binds to the muscle protein telethonin in cardiomyocytes during coxsackieviral infection. *Cardiovasc. Res.* **2009**, *81*, 108–115.
- Miller, J. C.; Blake, D. C.; Herzog, C. R. Adenylosuccinate synthetase 1 gene is a novel target of deletion in lung adenocarcinoma. *Mol. Carcinog.* **2009**, *48*, 1116–1122.
- Moussa, O.; Yordy, J. S.; Abol-Enein, H.; Sinha, D.; Bissada, N. K.; Halushka, P. V.; Ghoneim, M. A.; et al. Prognostic and functional significance of thromboxane synthase gene overexpression in invasive bladder cancer. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 11581–11587.
- Nakahata, N. Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics* **2008**, *118*, 18–35.
- Narumiya, S. Prostanoids and inflammation: a new concept arising from receptor

- knockout mice. *J. Mol. Med.* **2009**, *87*, 1015–1022.
- Narumiya, S.; Sugimoto, Y.; Ushikubi, F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* **1999**, *79*, 1193–1226.
- Nestler, M.; Martin, U.; Hortschansky, P.; Saluz, H.-P.; Henke, A.; Munder, T. The zinc containing pro-apoptotic protein siva interacts with the peroxisomal membrane protein pmp22. *Mol. Cell. Biochem.* **2006**, *287*, 147–155.
- Nie, D.; Che, M.; Zacharek, A.; Qiao, Y.; Li, L.; Li, X.; Lamberti, M.; et al. Differential expression of thromboxane synthase in prostate carcinoma: role in tumor cell motility. *Am. J. Pathol.* **2004**, *164*, 429–439.
- Okuno, K.; Yasutomi, M.; Nishimura, N.; Arakawa, T.; Shiomi, M.; Hida, J.; Ueda, K.; et al. Gene expression analysis in colorectal cancer using practical DNA array filter. *Dis. Colon Rectum* **2001**, *44*, 295–299.
- Oren, M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* **2003**, *10*, 431–442.
- Orsini, M. J.; Parent, J. L.; Mundell, S. J.; Marchese, A.; Benovic, J. L. Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 31076–31086.
- Padanilam, B. J.; Lewington, A. J.; Hammerman, M. R. Expression of CD27 and ischemia/reperfusion-induced expression of its ligand Siva in rat kidneys. *Kidney Int.* **1998**, *54*, 1967–1975.

- Parent, A.; Hamelin, E.; Germain, P.; Parent, J.-L. Rab11 regulates the recycling of the β 2-adrenergic receptor through a direct interaction. *Biochem. J.* **2009**, *418*, 163.
- Parent, A.; Roy, S. J.; Iorio-Morin, C.; Lépine, M.-C.; Labrecque, P.; Gallant, M. A.; Slipetz, D.; et al. ANKRD13C acts as a molecular chaperone for G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 40838–40851.
- Parent, J. L.; Labrecque, P.; Orsini, M. J.; Benovic, J. L. Internalization of the TXA₂ receptor alpha and beta isoforms. Role of the differentially spliced cooh terminus in agonist-promoted receptor internalization. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 8941–8948.
- Pérodin, J.; Deraët, M.; Auger-Messier, M.; Boucard, A. A.; Rihakova, L.; Beaulieu, M.-È.; Lavigne, P.; et al. Residues 293 and 294 Are Ligand Contact Points of the Human Angiotensin Type 1 Receptor †. *Biochemistry* **2002**, *41*, 14348–14356.
- Pradono, P.; Tazawa, R.; Maemondo, M.; Tanaka, M.; Usui, K.; Saijo, Y.; Hagiwara, K.; et al. Gene transfer of thromboxane A₂ synthase and prostaglandin I₂ synthase antithetically altered tumor angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 63–66.
- Prasad, K. V.; Ao, Z.; Yoon, Y.; Wu, M. X.; Rizk, M.; Jacquot, S.; Schlossman, S. F. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 6346–6351.
- Py, B.; Bouchet, J.; Jacquot, G.; Sol-Foulon, N.; Basmaciogullari, S.; Schwartz,

- O.; Biard-Piechaczyk, M.; et al. The Siva protein is a novel intracellular ligand of the CD4 receptor that promotes HIV-1 envelope-induced apoptosis in T-lymphoid cells. *Apoptosis* **2007**, *12*, 1879–1892.
- Py, B.; Slomianny, C.; Auberger, P.; Petit, P. X.; Benichou, S. Siva-1 and an alternative splice form lacking the death domain, Siva-2, similarly induce apoptosis in T lymphocytes via a caspase-dependent mitochondrial pathway. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 4008–4017.
- Qin, L. F.; Lee, T. K. W.; Ng, I. O. L. Gene expression profiling by cDNA array in human hepatoma cell line in response to cisplatin treatment. *Life Sci.* **2002**, *70*, 1677–1690.
- Remuzzi, G.; Noris, M.; Benigni, A.; Imberti, O.; Sayegh, M. H.; Perico, N. Thromboxane A2 receptor blocking abrogates donor-specific unresponsiveness to renal allografts induced by thymic recognition of major histocompatibility allopeptides. *J. Exp. Med.* **1994**, *180*, 1967–1972.
- Resch, U.; Schichl, Y. M.; Winsauer, G.; Gudi, R.; Prasad, K.; de Martin, R. Siva1 is a XIAP-interacting protein that balances NFkappaB and JNK signalling to promote apoptosis. *Journal of Cell Science* **2009**, *122*, 2651–2661.
- Ritter, S. L.; Hall, R. A. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 819–830.
- Rocha, P. N.; Plumb, T. J.; Robinson, L. A.; Spurney, R.; Pisetsky, D.; Koller, B. H.; Coffman, T. M. Role of thromboxane A2 in the induction of apoptosis of immature thymocytes by lipopolysaccharide. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2005**, *12*, 896–903.

- Rochdi, M. D.; Laroche, G.; Dupré, É.; Giguère, P.; Lebel, A.; Watier, V.; Hamelin, E.; et al. Nm23-H2 interacts with a G protein-coupled receptor to regulate its endocytosis through an Rac1-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 18981–18989.
- Roy, S. J.; Parent, A.; Gallant, M. A.; de Brum-Fernandes, A. J.; Stanková, J.; Parent, J.-L. Characterization of C-terminal tail determinants involved in CRTH2 receptor trafficking: identification of a recycling motif. *European Journal of Pharmacology* **2010**, *630*, 10–18.
- Saban, M. R.; Hellmich, H. L.; Turner, M.; Nguyen, N.-B.; Vadigepalli, R.; Dyer, D. W.; Hurst, R. E.; et al. The inflammatory and normal transcriptome of mouse bladder detrusor and mucosa. *BMC Physiol.* **2006**, *6*, 1.
- Sakai, H.; Suzuki, T.; Takahashi, Y.; Ukai, M.; Tauchi, K.; Fujii, T.; Horikawa, N.; et al. Upregulation of thromboxane synthase in human colorectal carcinoma and the cancer cell proliferation by thromboxane A₂. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 3368–3374.
- Sarkar, F. H.; Li, Y.; Wang, Z.; Kong, D. NF- κ B signaling pathway and its therapeutic implications in human diseases. *Int Rev Immunol* **2008**, *27*, 293–319.
- Sayers, T. J. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **2011**, *60*, 1173–1180.
- Schleich, K. K.; Warnken, U. U.; Fricker, N. N.; Oztürk, S. S.; Richter, P. P.; Kammerer, K. K.; Schnölzer, M. M.; et al. Stoichiometry of the CD95 death-inducing signaling complex: experimental and modeling evidence for a death

- effector domain chain model. *Mol. Cell* **2012**, *47*, 306–319.
- Sethi, G.; Sung, B.; Aggarwal, B. B. Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **2008**, *233*, 21–31.
- Severino, A.; Abbruzzese, C.; Manente, L.; Valderas, Á. A.; Mattarocci, S.; Federico, A.; Starace, G.; et al. Human papillomavirus-16 E7 interacts with Siva-1 and modulates apoptosis in HaCaT human immortalized keratinocytes. *J. Cell. Physiol.* **2007**, *212*, 118–125.
- Shah, N.; Khurana, S.; Cheng, K.; Raufman, J.-P. Muscarinic receptors and ligands in cancer. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **2009**, *296*, C221–32.
- Shiozaki, T.; Iwai, A.; Kawaoka, Y.; Takada, A.; Kida, H.; Miyazaki, T. Requirement for Siva-1 for replication of influenza A virus through apoptosis induction. *J. Gen. Virol.* **2011**, *92*, 315–325.
- Shizukuda, Y.; Buttrick, P. M. Protein kinase C-zeta modulates thromboxane A₂-mediated apoptosis in adult ventricular myocytes via Akt. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2002**, *282*, H320–7.
- Singaravelu, K.; Padanilam, B. J. p53 target Siva regulates apoptosis in ischemic kidneys. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2011**, *300*, F1130–41.
- Solt, L. A.; May, M. J. The IκB kinase complex: master regulator of NF-κB signaling. *Immunol. Res.* **2008**, *42*, 3–18.
- Spinicelli, S.; Nocentini, G.; Ronchetti, S.; Krausz, L. T.; Bianchini, R.; Riccardi, C. GITR interacts with the pro-apoptotic protein Siva and induces apoptosis. *Cell*

Death Differ **2002**, *9*, 1382–1384.

Strasser, A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 189–200.

Sun, J.; Lin, X. Beta-arrestin 2 is required for lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 17085–17090.

Sun, S.-C. Non-canonical NF-κB signaling pathway. *Cell Res.* **2011**, *21*, 71–85.

Sun, W.; Yang, J. Molecular basis of lysophosphatidic acid-induced NF-κB activation. *Cell. Signal.* **2010**, *22*, 1799–1803.

Suzuki, S.; Yokoyama, U.; Abe, T.; Kiyonari, H.; Yamashita, N.; Kato, Y.; Kurotani, R.; et al. Differential roles of Epac in regulating cell death in neuronal and myocardial cells. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 24248–24259.

Tait, S. W. G.; Green, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 621–632.

Têtu, B.; Popa, I.; Bairati, I.; L'Esperance, S.; Bachvarova, M.; Plante, M.; Harel, F.; et al. Immunohistochemical analysis of possible chemoresistance markers identified by micro-arrays on serous ovarian carcinomas. *Mod. Pathol.* **2008**, *21*, 1002–1010.

Tobin, A. B.; Budd, D. C. The anti-apoptotic response of the Gq/11-coupled muscarinic receptor family. *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31*, 1182–1185.

Tuteja, N. Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal Behav*

2009, 4, 942–947.

Ushikubi, F.; Aiba, Y.; Nakamura, K.; Namba, T.; Hirata, M.; Mazda, O.; Katsura, Y.; et al. Thromboxane A2 receptor is highly expressed in mouse immature thymocytes and mediates DNA fragmentation and apoptosis. *J. Exp. Med.* **1993**, 178, 1825–1830.

Wang, D.; Dubois, R. N. Prostaglandins and cancer. *Gut* **2006**, 55, 115–122.

Wang, Y.; Tang, Y.; Teng, L.; Wu, Y.; Zhao, X.; Pei, G. Association of beta-arrestin and TRAF6 negatively regulates Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat. Immunol.* **2006**, 7, 139–147.

Watkins, G.; Douglas-Jones, A.; Mansel, R. E.; Jiang, W. G. Expression of thromboxane synthase, TBXAS1 and the thromboxane A2 receptor, TBXA2R, in human breast cancer. *Int Semin Surg Oncol* **2005**, 2, 23.

Wess, J. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, 44, 423–450.

Witherow, D. S.; Garrison, T. R.; Miller, W. E.; Lefkowitz, R. J. beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor I kappa B alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, 101, 8603–8607.

Woehler, A.; Ponimaskin, E. G. G protein--mediated signaling: same receptor, multiple effectors. *Curr Mol Pharmacol* **2009**, 2, 237–248.

Xue, L.; Chu, F.; Cheng, Y.; Sun, X.; Borthakur, A.; Ramarao, M.; Pandey, P.; et al. Siva-1 binds to and inhibits BCL-X(L)-mediated protection against UV

- radiation-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 6925–6930.
- Ye, R. D. Regulation of nuclear factor kappaB activation by G-protein-coupled receptors. *J. Leukoc. Biol.* **2001**, *70*, 839–848.
- Yeagle, P. L.; Albert, A. D. G-protein coupled receptor structure. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 808–824.
- Yin, C.; Zhang, R.; Xu, Y.; Chen, Q.; Xie, X. Intact MDM2 E3 ligase activity is required for the cytosolic localization and function of {beta}-arrestin2. *Mol. Biol. Cell* **2011**, *22*, 1608–1616.
- Yoon, Y.; Ao, Z.; Cheng, Y.; Schlossman, S. F.; Prasad, K. V. Murine Siva-1 and Siva-2, alternate splice forms of the mouse Siva gene, both bind to CD27 but differentially transduce apoptosis. *Oncogene* **1999**, *18*, 7174–7179.
- Yoshizato, K.; Zapf, S.; Westphal, M.; Berens, M. E.; Giese, A. Thromboxane synthase inhibitors induce apoptosis in migration-arrested glioma cells. *Neurosurgery* **2002**, *50*, 343–354.
- Yusuf, K.; Smith, S. D.; Levy, R.; Schaiff, W. T.; Wyatt, S. M.; Sadovsky, Y.; Nelson, D. M. Thromboxane A(2) limits differentiation and enhances apoptosis of cultured human trophoblasts. *Pediatr. Res.* **2001**, *50*, 203–209.
- Zhou, B.; Wu, L.-J.; Tashiro, S.-I.; Onodera, S.; Uchiumi, F.; Ikejima, T. Silibinin protects rat cardiac myocyte from isoproterenol-induced DNA damage independent on regulation of cell cycle. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 1900–1905.

Zhu, W.-Z.; Wang, S.-Q.; Chakir, K.; Yang, D.; Zhang, T.; Brown, J. H.; Devic, E.; et al. Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II. *J. Clin. Invest.* **2003**, *111*, 617–625.

Zou, M.-H.; Shi, C.; Cohen, R. A. High glucose via peroxynitrite causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with thromboxane/prostaglandin H(2) receptor-mediated apoptosis and adhesion molecule expression in cultured human aortic endothelial cells. *Diabetes* **2002**, *51*, 198–203.

14. ANNEXES

14.1. Effet de Siva1 sur l'activation des MAPK par TP

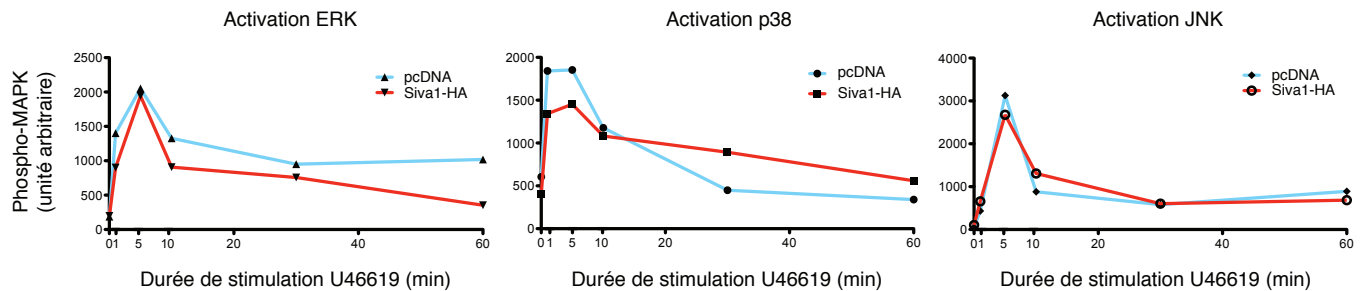


FIGURE 14.1 : Siva1 module l'activation des MAPK par TP

Les récepteurs TP endogènes de cellules HeLa transfectées de façon transitoire avec Siva1-HA ou pcDNA furent stimulés au U46619 (100 nM) pendant des durées variables. Les cellules furent par la suite lysées, puis analysées par SDS-PAGE et immunobuvardage contre ERK1/2, p38 ou SAPK/JNK au moyen d'une série d'anticorps détectant uniquement les formes phosphorylées et d'une deuxième série dirigée contre un épitope indépendant de la phosphorylation. Les graphiques présentent le ratio des formes phosphorylées sur l'expression totale. La stimulation de TP active les voies MAPK ERK1/2, p38 et JNK. Une transfection transitoire de Siva1-HA n'altère pas la cinétique d'activation de JNK, mais semble réprimer l'activation initiale de p38 tout en soutenant son activation prolongée et réprimer l'activation soutenue des ERK. Ces graphiques sont représentatifs de quatre expériences.

14.2. Formulaire de consentement

Formulaires de consentement à inclusion d'article dans une thèse

