



Université du Québec
Institut national de la recherche scientifique
INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

Thèse présentée au centre de recherche
INRS-Institut Armand-Frappier
comme exigence partielle du programme de
Doctorat en Virologie et Immunologie

Par

Louis de Léséleuc

**Rôles divergents du récepteur orphelin Nur77 dans la
régulation de l'apoptose**

Jury d'évaluation

Jacques Bernier, Ph.D.	Président du Jury
Luc Gaudreau, Ph.D.	Examineur Externe
Richard Bertrand, Ph.D.	Examineur Externe
François Denis, Ph.D.	Directeur de Recherche

2005. Louis de Léséleuc, droits réservés.

À Manon, Anaïs et Liliane

RÉSUMÉ

Nur77 (NGFI-B, TR3) est un récepteur nucléaire orphelin impliqué dans des réponses précoces à divers stimuli. Il remplit des fonctions biologiques multiples et parfois opposées. Nur77 est essentiel à l'apoptose des cellules T lors de la sélection négative et de l'activation par le RcT. Il semble également jouer un rôle dans la régulation de l'apoptose chez les cellules normales ou tumorales soumises à divers stimuli, dont des dommages à l'ADN. Dans ce cas, son activité serait régulée par sa localisation intracellulaire. Nur77 est également exprimé en réponse aux facteurs de croissance et est abondant dans plusieurs tumeurs. De plus, son expression protège contre certains stimuli apoptotiques. Le but de ce projet de doctorat fut d'élucider les mécanismes de régulation de l'apoptose par Nur77.

Le premier volet consistait à étudier la localisation de Nur77 lors de l'apoptose par transfection d'un fusion GFP dans des cellules HeLa. La localisation cytoplasmique de Nur77 n'a été affectée par aucun agent génotoxique. Toutefois, nous avons observé l'apparition rapide et réversible de corps nucléaires suite à certains traitements. Les rayons UV, la camptothécine, la cisplatine et le peroxyde d'hydrogène ont provoqué l'apparition rapide (< 4h) de corps nucléaires dans une majorité de cellules. En revanche, un traitement avec de l'étoposide ou des rayons gamma n'a induit que peu ou pas de corps nucléaires après 16 h d'incubation. Une troncation de Nur77 en N-terminal a empêché la formation de corps nucléaires, alors qu'une délétion en C-terminal n'a pas affecté la localisation. Les corps nucléaires ne se sont pas superposés à d'autres structures bien connues. Des inhibiteurs pharmacologiques de voies d'activation ou de fonctions physiologiques n'ont eu aucun impact sur ce phénomène, qui fut observé dans d'autres types cellulaires. Cependant, l'inhibition de la transcription par l'actinomycine D ou le DRB a reproduit le même phénomène, ce qui porte à croire que ces structures sont la conséquence d'un stress transcriptionnel et non pas de dommages en tant que tels. La séquestration de Nur77 dans ces corps nucléaires a mené à une inhibition de son activité transcriptionnelle.

Le second volet consistait à évaluer le rôle apoptotique de Nur77 dans un modèle cellulaire. Des cellules HEK293 exprimant de façon stable Nur77 ainsi qu'une forme dominante-négative (DN-Nur77) ont été générées. Les cellules exprimant Nur77 étaient résistantes à

l'étoposide, la camptothécine et la thapsigargine. Fait intéressant, Nur77 augmentait l'apoptose par de hautes concentrations de FasL mais a diminué l'apoptose suite à un traitement combiné de faibles doses de FasL et de cycloheximide. La localisation cellulaire de Nur77 ne fut pas affectée par aucun traitement. L'activité basale de NF- κ B et la transcription du gène *cIAP1* furent amplifiées chez les cellules 293Nur77. Cette augmentation fut insensible à l'inhibition du protéasome. Des inhibiteurs de la liaison de NF- κ B à l'ADN ont neutralisé l'effet anti-apoptotique de Nur77. Les cellules DN-Nur77 étaient pour leur part très sensibles à FasL et également résistantes à la thapsigargine, ce qui indique que Nur77 peut avoir un potentiel à la fois pro- et anti-apoptotique dans la cellule. L'importance potentielle de Nur77 dans la physiologie des cellules normales et tumorales est discutée.


Louis de Léséleuc
Étudiant


Francois Denis
Directeur de recherche

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Table des matières	v
Liste des abréviations	viii
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
1 Revue bibliographique	1
1.1 L'apoptose.....	2
1.1.1 Les caractéristiques de l'apoptose.....	2
1.1.2 Importance de l'apoptose.....	3
1.1.3 Régulation de l'apoptose.....	6
1.1.4 Les caspases.....	7
1.1.5 Les voies d'activation de l'apoptose.....	9
1.1.5.1 Les récepteurs de mort et la voie extrinsèque.....	9
1.1.5.2 Structure et fonction de Fas/CD95.....	10
1.1.5.3 La signalisation par le TNFR1.....	13
1.1.5.4 Autre récepteur de mort: récepteurs de TRAIL et DR3.....	13
1.1.6 Les voies d'apoptose extrinsèque de type I et de type II.....	14
1.1.7 La voie intrinsèque de l'apoptose et le rôle de mitochondrie.....	16
1.1.7.1 La famille Bcl-2.....	17
1.1.7.2 Autres molécules affectant la mitochondrie.....	20
1.1.7.3 L'apoptosome.....	21
1.1.7.4 Les réticulum endoplasmique et l'apoptose.....	22
1.1.8 La réponse au stress et l'apoptose.....	25
1.1.8.1 La voie p53 et les dommages à l'ADN.....	25
1.1.8.2 La voie des SAPK dans la réponse aux stress.....	27
1.1.8.3 La voie NF-kB.....	28
1.1.9 L'exécution de l'apoptose.....	30
1.1.9.1 Les substrats apoptotiques.....	30
1.1.9.2 Les inhibiteur de caspases.....	31
1.1.9.3 Exécution de l'apoptose indépendante des caspases.....	32
1.2 Les récepteurs nucléaires et Nur77.....	34

1.2.1	Classification des récepteurs nucléaires	34
1.2.2	Anatomic des récepteurs nucléaires	36
1.2.3	Liaison aux éléments de réponse sur l'ADN.....	38
1.2.4	Régulation de la transcription par les récepteurs nucléaires.....	40
1.2.5	La famille de récepteurs orphelins NGFI-B/Nur77	41
1.2.6	Structure de Nur77	44
1.2.7	Interactions de Nur77	45
1.2.7.1	Interaction avec l'ADN	45
1.2.7.2	Interactions protéine-protéine et régulation de Nur77.....	46
1.2.8	Régulation transcriptionnelle de Nur77	48
1.2.8.1	Expression tissulaire	48
1.2.8.2	Induction de la transcription du gène de Nur77.....	48
1.2.8.3	Phosphorylation de Nur77.....	50
1.2.8.4	Localisation cellulaire de Nur77	52
1.2.9	Rôles biologiques de Nur77	53
1.2.9.1	Fonctions pro-apoptotiques dépendantes de la transcription.....	55
1.2.9.2	Fonctions pro-apoptotiques indépendantes de la transcription	56
1.2.9.3	Fonctions anti-apoptotiques de Nur77.....	58
1.2.9.4	Rôle de Nur77 dans la régulation neuroendocrine.....	59
1.3	Le noyau: structure et composantes	61
1.3.1	Survol	61
1.3.2	Les taches nucléaires et l'épissage	61
1.3.3	Les corps de Cajal.....	62
1.3.4	Les corps PML	62
1.3.5	Autres corps nucléaires.....	63
2	Nur77 forms novel nuclear structures following DNA damage and transcriptional arrest	64
2.1	Mise en contexte de l'article I	65
3	Inhibition of apoptosis by Nur77 through NF-kB modulation	87
3.1	Mise en contexte de l'article II	88
4	Résultats supplémentaires.....	100
4.1	Avant-propos.....	101
4.2	Localisation de Nur77 DDBD	101

4.3	Apoptose de lignées stables de cellules MCF-7	102
4.4	Dépendance de la voie FADD dans l'apoptose des cellules HEK293	102
4.5	Modulation par Nur77 de rapporteurs NF-kB	103
5	Discussion	108
5.1	Localisation de Nur77.....	109
5.1.1	Les corps nucléaires	109
5.1.2	Localisation cytoplasmique de Nur77	112
5.2	Utilisations des lignées stables	113
5.3	Nur77 et l'apoptose	114
5.3.1	Modulation de la voie NF-kB par Nur77	116
5.3.2	Nur77 et la voie Fas/FasL.....	117
5.3.3	Nur77 et l'apoptose par les dommages à l'ADN.....	119
5.3.4	Nur77 et le stress du réticulum endoplasmique	119
5.3.5	Nur77 chez les cellules MCF-7	121
6	Conclusion.....	123
	Remerciements	128
	Références bibliographiques	130
	Annexe I.....	156
	Annexe II	160

LISTE DES ABRÉVIATIONS

a.a.	Acide(s) aminé(s)	HNF4	Hepatocyte nuclear factor 4
ADN	Acide Désoxyribonucléique	IAP	Inhibiteur de l'Apoptose
APAF-1	Apoptotic Protease Activating Factor 1	ICAD	Inhibitor of CAD
AR	Androgen receptor	ICE	Interleukin-1 Converting Enzyme
ARN	Acide Ribonucléique	IL-#	Interleukine #
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated	I κ B	Inhibitor of kappa B
ATR	ATM-related	JNK	c-Jun N-terminal Kinase
Bcl	B-Cell Lymphoma	KBK	Kamebakaurine
BH#	Bcl-Homology	LBD	Ligand-binding-domain
CAD	Caspase-Activated Deoxyribonuclease	LTR	Long Terminal Repeat
CAPE	Caffeic acid phenyl ester	LXR	Liver X receptor
CAR	Constitutive androstane receptor	MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
CARD	Caspase Recruitment Domain	MDM2	Transformed 3T3 cell Double Minute 2
CBP	CREB-Binding Protein	MEF2	Myocyte Enhancing Factor 2
CED-#	Caenorhabditis elegans Death #	MR	Mineralocorticoid receptor
CHX	Cycloheximide	NF- κ B	Nuclear Factor of Kappa light chain gene enhancer in B cells
COUP-TF	Chicken Ovalbumin Upstream Transcription Factor	NGFI-B	Nerve growth factor-induced factor B
CPT	Camptothécine	NOR-1	Neuron Orphan Receptor 1
DBD	DNA-binding domain	NURR-1	Nur-Related Receptor 1
DcR	Decoy Receptor	PARP-1	Poly-ADP Ribose Polymerase 1
DED	Death-effector domain	PKC	Protéine Kinase C
DISC	Death-Inducing Signaling Complex	PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acétate
DN	Dominant-Négatif	PML	Promyelocytic Leukemia
DR	Death Receptor	POMC	Pro-opiomélanocortine
ER	Estrogen receptor	PPAR	Peroxisome Proliferator Activator Receptor
ERR	Estrogen receptor-related	PR	Progesterone receptor
ETOP	Étoposide	PTP	Pore de la Transition de la Perméabilité
FADD	Fas-Associated Death Domain	RAR	Retinoic-Acid Receptor
FasL	Fas-Ligand	RcB	Récepteur de cellules B
FLICE	Fas-Linked Interleukin-1 Converting Enzyme-like protease	RcT	Récepteur de cellules T
FLIP	FLICE Inhibitory Protein	RCT	Réparation couplée à la transcription
FXR	Farnesoid X receptor	RE	Réticulum Endoplasmique
GR	Glucocorticoid receptor	RIP	Receptor-Interacting Protein
GFP	Green fluorescent protein		
HEK293	Human Embryonic Kidney 293		

ROR	Retinoid orphan receptor
RT-PCR	Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction
RXR	Retinoid X receptor
SRC	Steroid Receptor Coactivator
TG	Thapsigargin
TLX	Tailless similar to RXR
TNF	Tumor necrosis factor
TPA	12-O-Tetradecanoyl-13-Phorbol Acétate
TR	Thyroid receptor
TR2/3/4	Testis receptor 2/3/4
TRAF	TNF-Receptor-Associated Factor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
VDR	Vitamin D receptor

LISTE DES TABLEAUX

1. Caractéristiques morphologiques et biochimiques des deux types de mort cellulaire. 4
2. Classification des récepteurs nucléaires humains. 35
3. Récapitulation de la modulation de l'apoptose par Nur77. 115

LISTE DES FIGURES

1.	Caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de la nécrose.....	5
2.	Arbre des caspases.....	8
3.	Structure et regroupement des caspases.....	8
4.	Les récepteurs de mort.....	11
5.	Formation du DISC de Fas/CD95 à la membrane.....	15
6.	Voie intrinsèque.....	19
7.	Voies de régulation de p53.....	24
8.	Structure des récepteurs nucléaires.....	39
9.	Structure du LBD des récepteurs nucléaires.....	42
10.	Régulation de la transcription par les récepteurs nucléaires par les co-activateur/co-répresseurs.....	42
11.	Domaines de Nur77 et partenaires d'interactions.....	43
12.	Structure de Nur77.....	51
13.	Signalisation menant à l'activation de Nur77 chez les cellules T.....	54
14.	Exportation nucléaire et association mitochondriale de Nur77.....	54
15.	Localisation de Nur77 Δ DBD.....	104
16.	Apoptose de lignées stables de cellules MCF-7.....	105
17.	Dépendance de FADD dans l'apoptose des cellules HEK293.....	106
18.	Modulation par Nur77 de l'activité de deux rapporteurs NF- κ B.....	107
19.	Modèle d'interaction de Nur77 avec NF- κ B.....	122

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 L'apoptose

La mort est indissociable de la vie. C'est une notion que tout biologiste est amené à comprendre. Il est dans l'ordre des choses que la mort assure la continuité des cycles naturels. Les jeunes doivent remplacer les vieux, le renouvellement continu des individus assure une adaptation de la population et une évolution de l'espèce. Ce concept est une vérité fondamentale. Toutefois, un nouveau concept plus surprenant semble se présenter à nous: la mort semble être régulée de façon presque aussi calculée que la vie. Ce qui nous paraissait auparavant accidentel, voire aléatoire, semble de plus en plus être le résultat d'un processus actif. Les mots " suicide " et " autodestruction " sont évoqués. Les exemples dans la nature sont nombreux, on n'a qu'à penser à la chute des feuilles à l'automne. Le même phénomène se produit à l'intérieur du corps, lorsqu'une cellule doit mourir pour le bien de l'organisme. C'est ce qu'on appelle la mort cellulaire programmée, ou " apoptose ".

1.1.1 Les caractéristiques de l'apoptose

L'idée d'une mort cellulaire qui ne serait pas accidentelle et serait plutôt contrôlée par des étapes prédéterminées ne date pas d'hier. Le terme mort cellulaire programmé a été lancé pour la première fois en 1964 par Lockshin (revu dans (1)). Le terme apoptose a été proposé par Kerr *et al.* en 1972 (2). Le mot *apoptosis* provient du grec et signifie " chute " dans le sens de pétales de fleurs ou de feuilles d'arbres. Il était traditionnellement utilisé pour décrire les manifestations macroscopiques de cellules mourantes observées dans les tissus, pour bien les distinguer des cellules nécrotiques présentes dans les lésions tissulaires. Avant de décrire les mécanismes complexes liés à l'apoptose, il est important de définir ce qu'est l'apoptose en opposition à un autre type de mort cellulaire, la nécrose. Le tableau I résume les différentes caractéristiques macroscopiques des deux types de mort. Ceci afin de bien comprendre les distinctions fondamentales entre une mort cellulaire programmée et une mort dite " accidentelle ".

Au niveau du noyau, l'apoptose est caractérisée tout d'abord par un renflement, qui lui donne une allure de croissant (voir figure 1). Ensuite, la chromatine du noyau se condense, puis se fragmente en plusieurs portions. Ce phénomène s'explique principalement par l'action d'une nucléase qui clivent l'ADN et par la dégradation de protéines qui assurent l'intégrité du noyau.

Ces phénomènes nucléaires ne se manifestent pas lors de la nécrose, le noyau demeure intact et l'ADN n'est dégradé qu'après un temps prolongé, de façon non spécifique. Une cellule apoptotique voit son volume diminué, ses organites sont contractés, et elle perd sa forme propre ainsi que sa capacité à adhérer. On assiste alors au phénomène de “ zéiose ”, qui signifie “ ébullition ”, et se traduit par un bourgeonnement et la libération de corps apoptotiques formés de membranes closes contenant les restes de la cellule. Contrairement à la nécrose, les cellules ne sont perméables à aucun moment de ce processus, ce qui implique que les contenus cellulaires ne sont pas libérés dans le milieu. Une cellule nécrotique, quant à elle, gonfle et se rompt. La nécrose n'est habituellement pas un processus actif, mais plutôt accidentel, suite à un traitement qui est immédiatement létal, comme une perte d'électrolytes, un choc thermique ou physique, ou une intoxication. L'apoptose dépend d'un processus actif, nécessitant l'action coordonnée d'enzymes et d'autres facteurs cellulaires, et requérant de l'énergie. Le résultat final de l'apoptose est une désintégration systématique de la cellule, produisant des corps apoptotiques qui seront rapidement phagocytés par les cellules environnantes, entraînant peu ou pas d'inflammation. C'est pourquoi on qualifie l'apoptose de “ mort silencieuse ”. Réciproquement, le déversement du contenu cellulaire par les cellules nécrotiques peut activer le système immunitaire et mener à une inflammation (3). Il est toutefois important de mentionner que certains processus actifs peuvent mener à une mort évoquant les caractéristiques de la nécrose; on parle alors de nécrose programmée (4). L'importance biologique d'un tel phénomène est encore imprécise.

1.1.2 Importance de l'apoptose

L'apoptose est essentielle à une variété de fonctions physiologiques. Elle intervient lors de la formation des tissus lors du développement de l'embryon et du fœtus, dans un processus nommé “ morphogénèse ”. Elle est essentielle à l'élimination des tissus interdigitaux, la formation du palais et le développement de la rétine et de la muqueuse intestinale (5). Elle est également importante pour l'homéostasie des cellules hématopoïétiques: elle permet l'élimination des cellules immatures qui reconnaîtraient des antigènes du soi et seraient donc dangereuses pour l'organisme. Les cellules activées et recrutées lors d'une réaction immunitaire doivent également être éliminées par apoptose pour en permettre la résolution (6). De nombreux stress, comme des dommages à l'ADN, des brusques changements de température et une oxydation des protéines vont également induire l'apoptose dans plusieurs types cellulaires (7). Les cellules infectées par

Apoptose	Nécrose
Condensation et fragmentation du noyau	Noyau intact
Bourgeonnement des membranes (zérose), sans perméabilisation	Rupture des membranes
Présence de corps apoptotiques contenant des organites intacts	Cellule morte entière
Clivage de l'ADN nucléaire à des intervalles réguliers, entre les nucléosomes	ADN dégradé tardivement
Rétrécissement de la cellule et compactage des organites	Gonflement des organites et de la cellule
N'induit pas de réponse inflammatoire	Le contenu cellulaire libéré peut induire une inflammation locale
Perte de la symétrie membranaire, c'est-à-dire désorganisation des lipides	Membranes inaffectées
Processus actif, énergie dépendant	Processus généralement passif

Tableau I: Caractéristiques morphologiques et biochimiques des deux types de mort cellulaire.

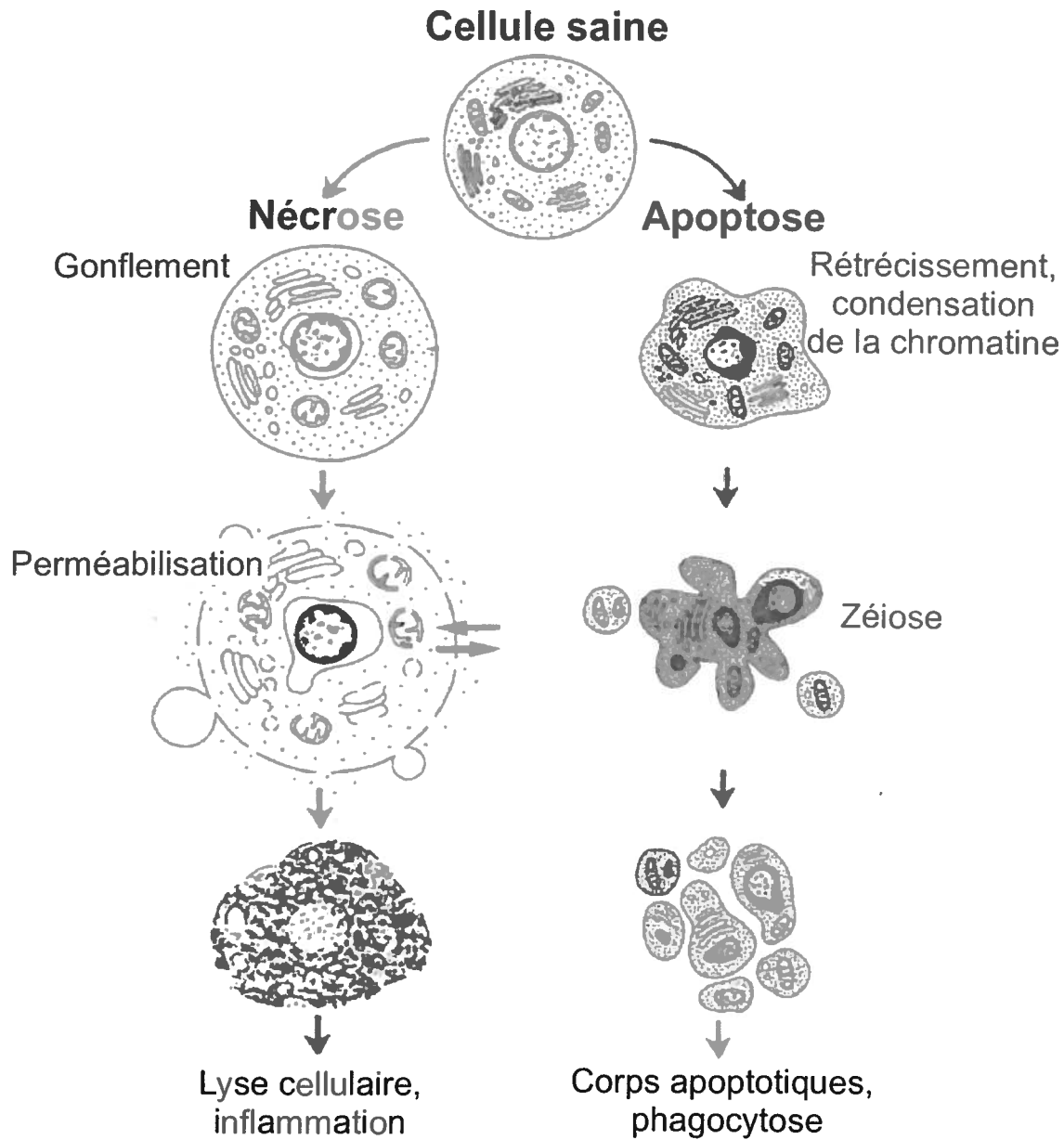


Figure 1: Caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de la nécrose. La cellule apoptotique diminue de taille et sa chromatine se condense. On assiste ensuite au phénomène de zéiose et la formation de corps apoptotiques qui seront phagocytés. Une cellule nécrotique augmente de taille et devient perméable. Les débris cellulaires peuvent entraîner de l'inflammation. Adapté de (289).

des virus vont également être éliminées par un processus menant à l'apoptose. La mort cellulaire programmée est donc à la fois un outil pour façonner l'organisme et un moyen de défense contre les dangers qui guettent celui-ci. Toutefois, il est à noter que bien que l'apoptose soit probablement la principale manifestation de la mort cellulaire programmée, il pourrait exister d'autres types de mort programmées non apoptotiques jouant également un rôle dans l'organisme.

Un dérèglement de l'apoptose peut également être associé avec la maladie. Un bon exemple d'une pathologie associée à une apoptose insuffisante est celle du cancer. Les cellules cancéreuses expriment très souvent non seulement des oncogènes qui activent la prolifération cellulaire, mais également des gènes qui protègent contre l'apoptose. Elles peuvent aussi perdre l'expression ou la fonction de gènes qui activent celle-ci. Ceci leur permet de se développer dans l'organisme sans égard aux signaux internes ou externes qui induiraient l'apoptose de cellules normales, en plus de résister à diverses thérapies anti-tumorales (7). En outre, l'incapacité d'éliminer par apoptose les cellules immunitaires activées peut mener à des maladies auto-immunes comme le diabète. Des affections neurologiques comme la sclérose en plaques ou le Parkinson, de même que le sida et d'autres maladies virales, sont pour leur part causées en partie par une apoptose trop abondante (8).

1.1.3 Régulation de l'apoptose

Une grande partie des premières informations sur le rôle, le fonctionnement, et la régulation de l'apoptose a été obtenue par l'étude du nématode *Caenorhabditis elegans*. Trois produit de *C. elegans* jouent un rôle fondamental lors de l'apoptose qui intervient au cours du développement du vers: CED-3 et CED-4 activent l'apoptose et CED-9 l'inhibe (9, 10). CED-3 est une cystéine protéase ayant des caractéristiques se rapprochant des protéases de la famille ICE (*Interleukin 1 β -Converting Enzyme*). CED-4 est homologue à APAF-1 chez les mammifères et est une protéine faisant partie de l'apoptosome. Chez *C. elegans*, CED-3 se lie la CED-4 et est activé par auto-protéolyse. CED-9 s'associe à CED-4 et CED-3 et empêche l'activation de ce dernier. CED-9 est un membre de la famille Bcl-2, qui compte des membres pro- apoptotiques et anti-apoptotiques. Il est frappant de constater que la structure et la fonction des facteurs régulant l'apoptose sont conservés du vers à l'Homme en passant par la mouche *Drosophila*. L'évolution a doté les mammifères d'une plus grande variété de protéines régulatrices et effectrices de

l'apoptose, mais l'action de plusieurs protéines du vers et de l'homme sont interchangeables *in vitro* (11, 12). Ces différents facteurs seront décrits dans les sections suivantes, en commençant avec les protéases de la famille ICE : les caspases.

1.1.4 Les caspases

Les caspases (pour cystéine aspartases) sont les médiateurs et exécuteurs centraux de l'apoptose. Elles instaurent une cascade protéolytique dont le résultat est la dégradation d'un certain nombre de substrats menant irréversiblement à la mort cellulaire. Les caspases sont numérotées de 1 à 14, selon l'ordre de leur découverte (voir figure 2). Elles sont regroupées en sous-familles selon leur structure et leur fonction (voir figure 3). Les caspases 1, 4, 5, 11 et 12 sont des caspases pro-inflammatoires, leur fonction est principalement de cliver les formes immatures de cytokines comme l'interleukine-1 β (pro-IL-1 β) et l'interleukine-18 (pro-IL-18) (13). Leur rôle dans la régulation de l'apoptose est mineur, comme en font foi les souris knock-out de la caspase-1 et de la caspase-11, dont les cellules demeurent sensibles à la mort cellulaire programmée (14, 15). La seconde sous-famille est composée des caspases 3, 6, 7, 8 et 10. La dernière sous-famille n'a que deux membres: les caspases 2 et 9. Les membres de ces deux dernières familles jouent un rôle important dans la régulation de l'apoptose, comme l'ont démontré des expériences avec des souris knock-out, et *in vitro* dans des modèles cellulaires. En effet, des souris dépourvues de caspase-3 et de caspase-9 meurent peu de temps après la naissance des suites d'un développement anormal du cerveau (16, 17). Des embryons déficients en caspase-8 meurent après 12 jours (18). Les caspases 13 et 14 furent récemment caractérisées et leurs propriétés biochimiques de même que leurs rôles biologiques restent encore à élucider (19, 20).
En

Les caspases sont synthétisés sous forme de zymogènes inertes (précurseurs inactifs) nommés pro-caspases, qui sont composées d'un pro-domaine inhibiteur, et de deux domaines catalytiques, p20 et p10. Ces domaines sont délimités par des sites internes de clivage dont le dernier acide aminé est un acide aspartique. La structure de ces protéases est illustrée dans la figure 3. Les caspases inflammatoires sont caractérisées par un pro-domaine de grande taille et par un segment reliant les deux domaines catalytiques. Les caspases exécutrices 3, 6 et 7 ont des pro-domaines très courts. Ceux des caspases initiatrices 2, 8, 9 et 10 sont utilisés pour se lier à des

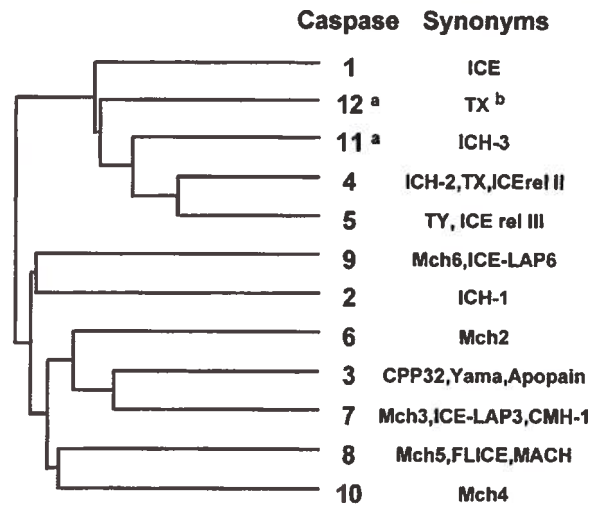


Figure 2: Arbre des caspases. Les caspases sont regroupées selon leur degré d'homologie. Les caspases 11 et 12 sont d'origine murine. Les synonymes de chaque caspases sont spécifiés à gauche. Tiré de (22).

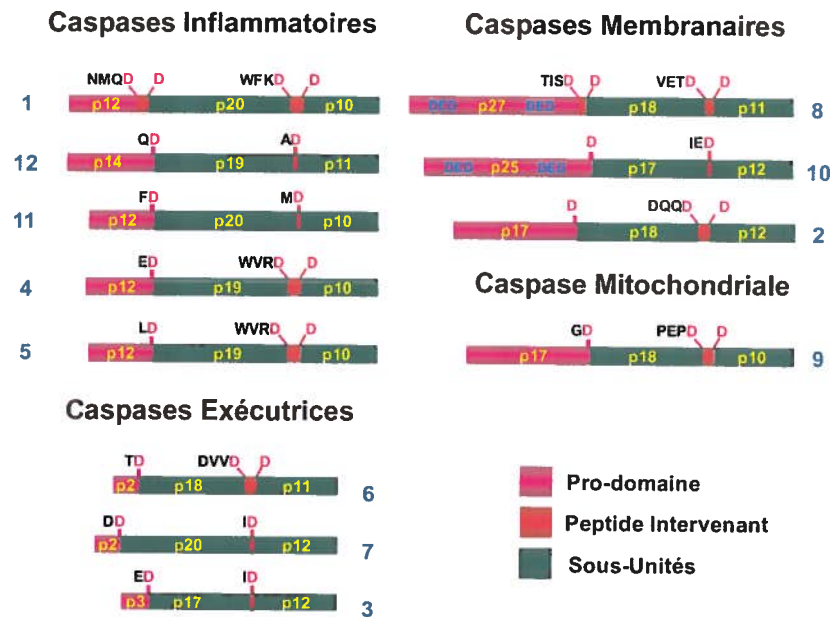


Figure 3: Structure et regroupement des caspases. Les caspases sont illustrées sous leur forme zymogène, avec leur pro-domaine et le peptide intervenant. Ceux-ci seront clivés lors de la maturation, et les deux sous-unités (vert) formeront un hétérodimère actif. Les sites de clivage sont indiqués, avec les résidus aspartate en rouge. Le pro-domaine des caspases 8 et 10 contiennent un domaine DED (*Death Effector Domain*) liant la forme inactive à l'adaptateur FADD, lié aux récepteurs de mort localisés à la membrane. Les caspases membranaires initient la voie extrinsèque, alors que la caspases mitochondriale fait partie de la voie intrinsèque.

molécules adaptatrices lors de la transduction des signaux de mort, et se nomment ainsi “ domaines effecteurs de mort ” (*death effector domain – DED*) dans le cas des pro-caspases 8 et 10, et “ domaines de recrutement des caspases ” (*caspase recruitment domain – CARD*) dans le cas des pro-caspases 2 et 9. Lorsque le pro-domaine d'une caspase est clivé, soit par auto-catalyse ou par une autre caspase, la protéine subit un changement de conformation qui provoque le clivage du/des site(s) séparant les deux domaines catalytiques. Les segments obtenus s'assemblent pour former un hétéro-tétramère composé de deux petites et deux grandes sous-unités, qui est la forme active de la caspase. Les caspases peuvent cliver des protéines, y compris d'autres caspases, selon une spécificité bien caractérisée et parfois redondante. Ainsi, les caspases-3 et 7 reconnaissent les mêmes sites de clivage, soit le térapeptide consensus aspartate-glutamate-valine-aspartate ou DEVD. Toutefois, leur expression tissulaire de même que leur régulation post-traductionnelle sont différentes (21, 22).

Comme il fut mentionné, les caspases pro-apoptotiques se divisent en deux catégories, selon leur fonction : les caspases initiatrices et les caspases exécutrices. Les premières transmettent le signal de mort capté par la cellule et le transmettent aux secondes, qui hydrolysent des substrats apoptotiques variés menant à l'apoptose en tant que telle.

1.1.5 Les voies d'activation de l'apoptose

La mort cellulaire programmée peut être initiée par deux séries de mécanismes bien caractérisés: la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. La première est déclenchée par la liaison d'un récepteur de mort avec son ligand et met en jeu plusieurs protéines recrutées à la membrane cytoplasmique. La seconde est déclenchée par des facteurs de stress (oxydation, irradiation, infection, etc.) captés à l'intérieur de la cellule, et intègre ses signaux au niveau de la mitochondrie. Toutefois, il est bon de mentionner qu'il existe pas de dichotomie formelle entre les deux voies. Ainsi, la voie extrinsèque peut parfois utiliser des facteurs de la voie intrinsèque de manière à amplifier le signal de mort, et vice versa.

1.1.5.1 Les récepteurs de mort et la voie extrinsèque

La voie extrinsèque de l'activation de l'apoptose est caractérisée à la base par le recrutement et l'activation de la caspase-8, une caspase initiatrice, à la membrane cellulaire. Ce

recrutement est effectué par le biais de récepteurs de mort. Ces récepteurs jouent un rôle capital dans la transmission de signaux de mort provenant de l'extérieur de la cellule. Les récepteurs de mort appartiennent à la superfamille du récepteur du TNF (*tumor necrosis factor* – facteur de nécrose des tumeurs), qui sont définis par des domaines extracellulaires analogues, riches en cystéines (23). Tous les membres de cette famille sont des protéines transmembranaires de type I. Cette famille compte de nombreux membres, résumés dans la figure 4, dont les mieux connus sont Fas (aussi connu sous le nom de CD95 et Apo1) et TNFR1 (aussi appelé p55 ou CD120a). Les ligands qui activent ces récepteurs sont des protéines de type I également apparentées entre elles et appartenant à la famille du TNF. La figure 5 résume les événements et les acteurs impliqués dans le déclenchement de l'apoptose par les principaux récepteurs de mort.

1.1.5.2 Structure et fonction de Fas/CD95

Peut-être le mieux connu et le plus important des récepteurs de mort, le récepteur Fas joue un rôle important dans au moins trois processus physiologiques: (i) la délétion périphérique de cellules T activées; (ii) la destruction de cibles telles que des cellules infectées par des virus ou des cellules tumorales par des cellules T cytotoxiques et par des cellules tueuses naturelles (NK); (iii) la destruction de cellules inflammatoires dans des sites immuno-privilégiés comme l'œil ou les testicules (24).

Le ligand de Fas (FasL) existe sous forme d'homotrimère à la surface de la cellule et en solution. La forme soluble de la molécule est produite suite à un clivage par des métalloprotéases de la matrice (25). La liaison du trimère au récepteur induit un changement de conformation qui mène à l'assemblage des domaines de mort (ou DD pour *death domain*) présents dans sa queue cytoplasmique et à l'agglomération des récepteurs. Un tel événement entraîne le recrutement d'un assortiment de protéines pour former le DISC (*death-inducing signaling complex*). Les différentes composantes du DISC ainsi que les étapes menant à sa formation sont résumées dans la figure 5. La première molécule à être recrutée au DISC est la protéine adaptatrice FADD. Celle-ci est composée d'un domaine de mort qui interagit de manière homotypique avec celui de Fas, et d'un domaine effecteur de la mort (ou DED *death effector domain*) présent sa partie C-terminale. FADD interagit à son tour avec des protéines contenant des DED, telles que les caspases 8 et 10 (26). L'agrégation des caspases mène à son tour à une protéolyse auto-catalytique et ainsi à

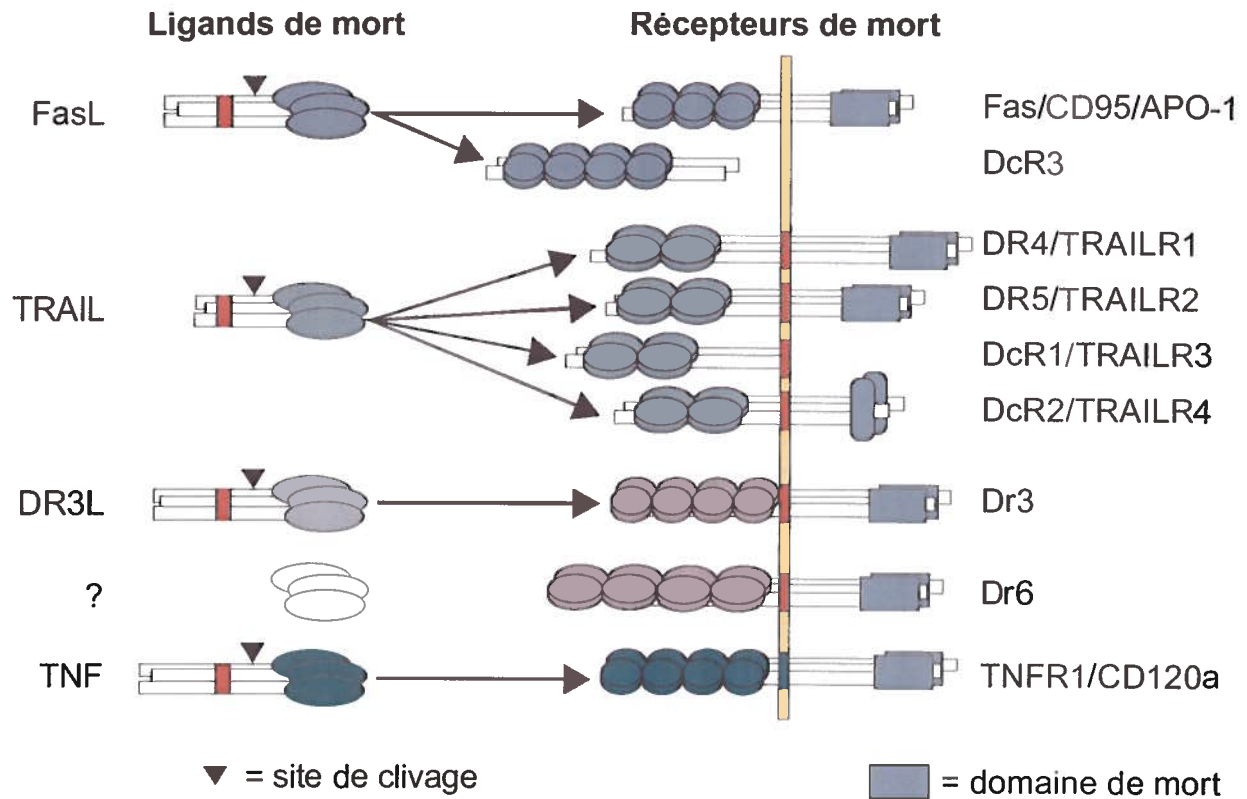


Figure 4: Les récepteurs de mort. Les récepteurs de mort appartenant à la superfamille du récepteur du TNF sont énumérés à droite et leurs ligands respectifs sont illustrés à gauche. Les récepteurs se présentent sous forme de trimères et contiennent tous des "domaines de mort" dans leur queue cytoplasmique. Certains membres sont des récepteurs "leurres" (*Decoy receptor* ou DcR) solubles, sans domaine de mort. Les triangles représentent les sites de clivage dans la partie extracellulaire des ligands, par des métalloprotéinases de la matrice, afin de générer les formes solubles. Adapté de (7).

l'activation de celles-ci. L'enzyme mature est ensuite libérée du complexe et peut aller cliver ses substrats dans la cellule. Un mutant de FADD dépourvu de DED agit comme un dominant-négatif (DN) et bloque l'apoptose induite par Fas et TNFR1 (27). Fait intéressant, dans certains types cellulaires, divers stress tels que des dommages à l'ADN semblent pouvoir activer FADD et mener à son agrégation sans toutefois passer par FasL, entraînant l'activation de la caspase-8 et l'initiation de l'apoptose (28, 29). Cette capacité semble être liée à la phosphorylation de FADD (30). FADD semble également réguler d'autres voies physiologiques, puisque des souris FADD knock-out ne sont pas viables, et les thymocytes dépourvus de FADD sont incapables de proliférer. (31).

Il existe une protéine d'herpesvirus nommée v-FLIP (*viral-FLICE-like inhibitory protein*) capable d'inhiber la cascade apoptotique initiée par Fas en bloquant l'activation de la caspase-8 (32). Deux homologues de cette protéine ont été identifiés chez l'humain, nommés c-FLIP(S) (court) et c-FLIP(L) (long). Les deux protéines contiennent des domaines DED et peuvent se lier à FADD. c-FLIP(L) contient également un domaine protéase apparenté à celui de la caspase-8, mais inactif. Le rôle de c-FLIP(L) est encore mystérieux, puisque certains ont montré qu'il pouvait inhiber l'apoptose (33), alors que d'autres ont démontré le contraire (34). Divers types cellulaires résistants à l'apoptose par le biais de Fas présentent une expression élevée de c-FLIP(L) (35, 36). Toutefois, des souris déficientes en c-FLIP ont un phénotype semblable à celles dépourvues du gène de la caspase-8 ou de FADD (37).

Plusieurs autres protéines ont été identifiées en association avec Fas. Leur rôle dans l'apoptose est moins bien défini et semble varier d'un type cellulaire à l'autre. L'une d'elles a pour nom Daxx. Il a été démontré que Daxx pourrait se lier à la portion intracytoplasmique de Fas, à un site différent de celui de FADD (38). Daxx peut déclencher une voie apoptotique indépendante de FADD, et activer la kinase sensible au stress JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) (39). En parallèle, il fut démontré que Daxx était une composante des corps nucléaires PML, et jouait également un rôle de répresseur transcriptionnel (40). Dans le DISC, on retrouve également RIP (*receptor-interacting protein*), une kinase contenant un domaine de mort qui peut interagir avec Fas. On lui prête un rôle dans l'initiation d'une voie de signalisation indépendante de la caspase-8 menant à la mort par nécrose chez des cellule T (41).

1.1.5.3 La signalisation par le TNFR1

Bien que partageant plusieurs propriétés structurales de même que des partenaires d'interaction, l'activation du TNFR1 et de Fas n'ont pas les mêmes conséquences sur la cellule. Le TNF est avant tout une cytokine pro-inflammatoire; l'engagement du TNFR1 se solde donc dans la plupart des cas par l'activation de gènes importants dans la réponse immunitaire. La cascade de signalisation déclenchée par le TNFR1 est beaucoup plus complexe que pour Fas; elle est composée d'une branche pro-apoptotique impliquant FADD et une branche anti-apoptotique menant à l'activation des facteurs de transcription tels que NF- κ B et AP-1 (42). La branche apoptotique est rarement activée, à moins que la synthèse des protéines ne soit inhibée. La protéine TRADD est requise pour la transmission de signal par le TNFR1. C'est une protéine adaptatrice contenant un domaine de mort, qui fait le lien entre le récepteur et les protéines FADD et RIP. Dans le contexte du TNFR1, RIP peut à son tour recruter une autre protéine adaptatrice, RAIDD, via leurs domaines de mort respectifs. RAIDD possède un domaine CARD capable de recruter et d'activer la caspase-2, une caspase initiateur de l'apoptose (43). RIP participe également à la voie anti-apoptotique. Des souris déficientes en RIP démontrent une apoptose massive dans leurs tissus lymphoïdes et adipeux, qui pourrait s'expliquer par le rôle de cette molécule dans l'activation du facteur NF- κ B (44). En se liant à la protéine TRAF2 (*TNF-Receptor-Associated Factor 2* – facteur 2 associé au récepteur du TNF), RIP peut également transmettre un signal activant la voie des MAPK, avec pour résultat l'activation de JNK et de AP-1 (45). On soupçonne que l'équilibre entre les complexes pro- et anti-apoptotiques ainsi formés détermine le sort de la cellule (46). Contrairement à Fas, la formation des complexes au niveau de TNFR1 s'effectuerait en deux étapes: d'abord un complexe membranaire pré-apoptotique (complexe I) contenant RIP et TRAF2 et apte à activer NF- κ B puis un complexe soluble (complexe II) pro-apoptotique contenant FADD et la caspase-8 (47).

1.1.5.4 Autre récepteur de mort: récepteurs de TRAIL et DR3.

Le ligand TRAIL/Apo2L (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*) et ses récepteurs (DR4, DR5, DcR1 et DcR2) présentent de fortes homologues avec la voie FasL/Fas, tant aux niveaux de la structure que de la fonction. Son rôle biologique est toutefois moins bien connu. Contrairement aux autres ligands, dont l'expression est fortement régulée, celle de TRAIL est détectable dans une plus grande variété de tissus: lymphocytes, rate, thymus, prostate, ovaires,

côlon et placenta (48). À part certaines tumeurs, les seules cellules identifiées jusqu'à maintenant qui sont susceptibles à l'apoptose induite par TRAIL sont des lymphocytes T activés, suggérant un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire (49, 50). La signalisation par les récepteurs fonctionnels de TRAIL est encore nébuleuse. Comme pour Fas, elle semble mettre en jeu un DISC contenant TRADD, FADD, TRAF2, et RIP (51, 52). La voie TRAIL est très intéressante pour la lutte contre le cancer, car plusieurs tumeurs sont sensibles à l'apoptose par ce facteur. Une combinaison de TRAIL et de la chimiothérapie est particulièrement efficace pour l'élimination des tumeurs, probablement parce que plusieurs agents génotoxiques stimulent l'expression du récepteur DR5, de manière p53-dépendante (53, 54).

Le récepteur DR3, dont le ligand est Apo3L, démontre de fortes similarités avec le TNFR1 dans la transduction des signaux et les effets sur la cellule. Les différences dans leurs rôles biologiques se situeraient plutôt au niveau de l'expression des ligands et des récepteurs dans les différents tissus (55).

1.1.6 Les voies d'apoptose extrinsèque de type I et de type II

La complexité dans la transmission de signal extrinsèque ne s'arrête pas au niveau de la membrane. En effet, la formation du DISC et l'activation de la caspase-8 peut mener à l'activation des caspases effectrices par le biais de deux types de cascade, selon la nature de la cellule. Dans les cellules de type I, le recrutement de FADD et la formation du DISC sont très efficaces, ce qui entraîne une conversion massive de pro-caspase-8 en enzyme mature, capable d'activer directement la caspase-3 et de mener rapidement à l'exécution de l'apoptose. (56). Dans les cellules de type II, la formation du DISC est inefficace et peu de caspase-8 est produite. Afin d'amplifier le signal, ces cellules ont besoin d'activer une voie mitochondriale. Celle-ci est initiée par le clivage de Bid, un membre de la famille Bcl-2, par la caspase-8. La forme tronquée de Bid (tBid) est transloquée vers la mitochondrie où elle induit la libération de cytochrome c et d'autres facteurs pro-apoptotiques appartenant à la voie intrinsèque, dont les détails seront exposés dans le chapitre suivant. Le résultat ultime de ce phénomène est l'activation de la caspase-3. Cette dernière peut à son tour cliver davantage de caspase-8 et amorcer une boucle d'amplification, en plus de cliver des substrats apoptotiques. Ce type d'apoptose est sensible à la surexpression de Bcl-2 ou Bcl-XL. Elle est plus facilement bloquée par c-FLIP, puisqu'une moins grande quantité

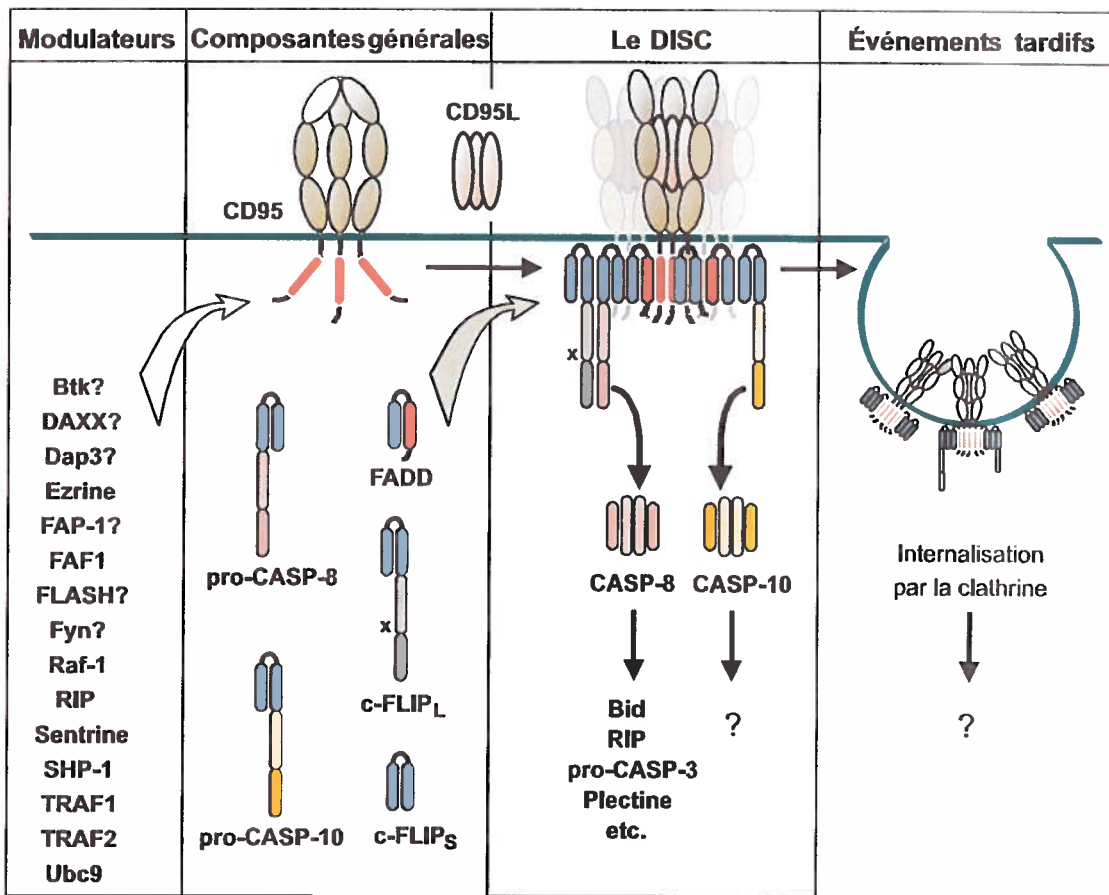


Figure 5: Formation du DISC de Fas/CD95 à la membrane. Sur engagement par FasL/CD95L, le récepteur subit un changement de conformation et recrute à sa queue cytoplasmique les divers éléments du DISC. L'agglomération de FADD, FLIP et autres molécules accessoires mène à l'activation auto-catalytique des caspases 8 et 10. Plus tard, les complexes sont internalisés par endocytose par la voie de la clathrine. Adapté de (290).

de cet inhibiteur est requise pour empêcher la conversion de la pro-caspase-8 (33). Des études avec des souris déficientes en Bid ont montré que les thymocytes empruntent la voie Fas classique et sont donc des cellules de type I, alors que les hépatocytes sont de type II et empruntent la voie mitochondriale (57). Ces résultats ont été corroborés chez des souris surexprimant Bcl-2, dont les hépatocytes mais non les thymocytes étaient protégés contre l'apoptose induite par Fas (58).

1.1.7 La voie intrinsèque de l'apoptose et le rôle de mitochondrie

Pour faire face aux dangers et aux stress qu'elle rencontre tout au long de son développement, la cellule est munie d'une foule de mécanismes assurant son homéostasie. Elle est ainsi capable de réparer son ADN si celui-ci est endommagé, de produire des facteurs pour stabiliser les protéines lors d'un choc thermique, et d'arrêter sa croissance ou même de digérer certaines de ses composantes si les nutriments viennent à manquer. Néanmoins, si cette homéostasie est perturbée au-delà d'un certain seuil, ou “ point de contrôle ”, la voie intrinsèque de l'apoptose est déclenchée. Même si les éléments perturbateurs sont nombreux, les mécanismes menant à l'apoptose par cette voie sont étonnamment bien coordonnés et sont conservés quelque soit le stimulus. Ils ont pour centre d'intégration un organe dont le rôle est aussi important qu'inattendu: la mitochondrie.

La mitochondrie est bien connue pour son rôle dans la respiration cellulaire. Cependant, cet organe renferme également une panoplie de facteurs pro-apoptotiques qui sont en temps normal séquestrés du reste de la machinerie utile à l'exécution de l'apoptose. Lorsque des signaux pro-apoptotiques sont captés par la mitochondrie, celle-ci subit des changements physico-chimiques: une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\psi$) et une transition de la perméabilité (TP). La dissipation du $\Delta\psi$ mène à la dépolarisation de la membrane interne de la mitochondrie et à l'arrêt de la respiration cellulaire. La TP serait rendu possible par la formation d'un pore de la transition de la perméabilité (PTP) à la surface de la mitochondrie, qui laisserait s'échapper les solutés et les molécules de masse inférieure à 1,5 kDa (59). La perméabilisation de la mitochondrie provoque un choc osmotique et la rupture de sa membrane externe, ce qui libère les facteurs pro-apoptotiques de la matrice. Le plus important d'entre eux est le cytochrome *c*, un transporteur d'électrons dans la mitochondrie qui devient une composante de l'apoptosome dans le cytoplasme (60, 61). D'autres protéines comme le facteur inducteur d'apoptose (AIF – *Apoptosis*

inducing factor) (62), l'endonucléase G (63), Smac/DIABLO (64), et HtrA2/Omi (65), sont également expulsés. Ce phénomène libère également des réactifs oxygénés et des ions Ca^{2+} dans le cytosol. De plus, on a rapporté que les pro-caspases 2, 3 et 9 présentes dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie étaient transloquées dans le cytoplasme par la même processus (66, 67). L'assemblage du PTP est sous le contrôle des membres de la famille Bcl-2, qui sera décrite dans la section suivante. Il est à noter que la libération du cytochrome c peut être observée en l'absence de TP et de dissipation du $\Delta\psi$ (68), ce qui signale l'existence d'une autre voie de translocation.

1.1.7.1 La famille Bcl-2

Le gène *Bcl-2* est un proto-oncogène qui a été identifié initialement au site de la translocation chromosomique t(14;18) typique de cas de lymphomes folliculaires de cellules B (69). Ce fut le premier oncogène découvert dont la fonction n'était pas d'activer la prolifération cellulaire mais plutôt de bloquer la mort cellulaire suite à de nombreux stimuli physiologiques et pathologiques, et correspondait à l'homologue mammifère de CED-9 (70). Des souris transgéniques exprimant constitutivement l'oncogène *Bcl-2-Ig* ont fourni une foule d'informations sur sa fonction biologique et sur la régulation de l'apoptose en général. Ces souris accumulent les cellules B, non pas à cause d'une prolifération accrue, mais plutôt dû à un taux de survie anormal, et finissent par développer des lymphomes monoclonaux résistants à l'apoptose (71). Ce fut une surprise de constater que la protéine Bcl-2 se localisait aux mitochondries (72), et cette constatation ouvrit tout un volet de la recherche sur la mort cellulaire programmée.

Nous savons maintenant qu'il existe une famille entière de protéines analogues à Bcl-2, qui compte chez les mammifères jusqu'à 30 membres ou parents et comprend à la fois des membres pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. Ceux-ci contiennent au moins l'un des quatre motifs " BH " (pour *Bcl-2 homology*), présents dans la protéine Bcl-2, et ainsi nommés BH1 à BH4 (73). Les principaux membres sont illustrés dans la figure 6.

Le premier sous-groupe de cette famille est composé de membres anti-apoptotiques tels que Bcl-2, Bcl-XL, A1, Mcl-2 et Bcl-w. Ceux-ci contiennent les quatre domaines BH ainsi qu'un domaine d'ancrage à la membrane. Le deuxième groupe comprend les membres pro-apoptotiques à domaines multiples: Bax, Bak et Bok. Ils ont également la capacité de s'arrimer à la membrane

et comportent les domaines BH1, BH2 et BH3. Finalement, la dernière sous-classe contient les membres pro-apoptotiques ne possédant que le domaine BH3: Bik, Bid, Bad, Bim, PUMA, NOXA, Hrk, etc. À moitié d'entre eux n'ont pas de domaines transmembranaires et s'associent directement avec les membres des groupes 1 ou 2, pour les activer ou les inhiber (74). Le gène *EGL-1* de *C. elegans* est le prototype des BH3-uniques retrouvés chez les mammifères (75).

La figure 6A illustre certaines des interactions entre les différents membres de la famille Bcl-2, ainsi que les différentes voies qui les affectent. La théorie veut que lors de leur activation, les membres du groupe 2, principalement Bax et Bak, forment des pores à la surface de la mitochondrie permettant la libération de cytochrome c. Ces pores seraient le résultat d'une oligomérisation de Bax et Bak (76), ou encore de l'assemblage du PTP (77). En effet, plusieurs membres de la famille Bcl-2 présentent des similitudes avec le temps des toxines bactériennes formant des pores (78), et il fut démontré que Bax et Bid étaient capable de former des canaux et de perméabiliser des vésicules membranaires artificielles riches en cardiolipine, un lipide propre aux mitochondries (79). Ceci expliquerait la libération de cytochrome c observée avant la rupture de la mitochondrie (80).

Bax et Bak sont reconnus comme étant les principaux inducteurs de la libération des facteurs apoptogènes mitochondriaux. Ils remplissent des fonctions fondamentales mais redondantes. Ainsi, des souris déficientes soit en *Bax* ou en *Bak* sont encore sensibles à l'apoptose, mais des souris déficientes pour les deux gènes sont résistantes à une panoplie de stimuli pro-apoptotiques (76). Dans des cellules saines, Bax et Bak sont présents dans le cytosol ou dans le noyau. Suite à un stimulus pro-apoptotique, ils subissent un changement de conformation qui leur permet de s'ancrer solidement dans la membrane mitochondriale externe (81). L'expression de Bax peut être régulée à la hausse par l'activité transcriptionnelle de p53. Tout récemment, on a observé que cette même protéine pouvait directement activer Bax à la mitochondrie et favoriser son oligomérisation et ainsi la libération de cytochrome c (82). Cette action est analogue au rôle rempli par la majorité des nombreuses protéines pro-apoptotique " BH3-seul ".

Les membres de cette sous-famille n'ont qu'un ou deux petits motifs BH3, un domaine d'interaction qui est à la fois nécessaire est suffisant à l'action pro-apoptotique (83). Ces protéines agissent directement ou indirectement sur Bax ou Bak pour promouvoir leur activité. Certaines

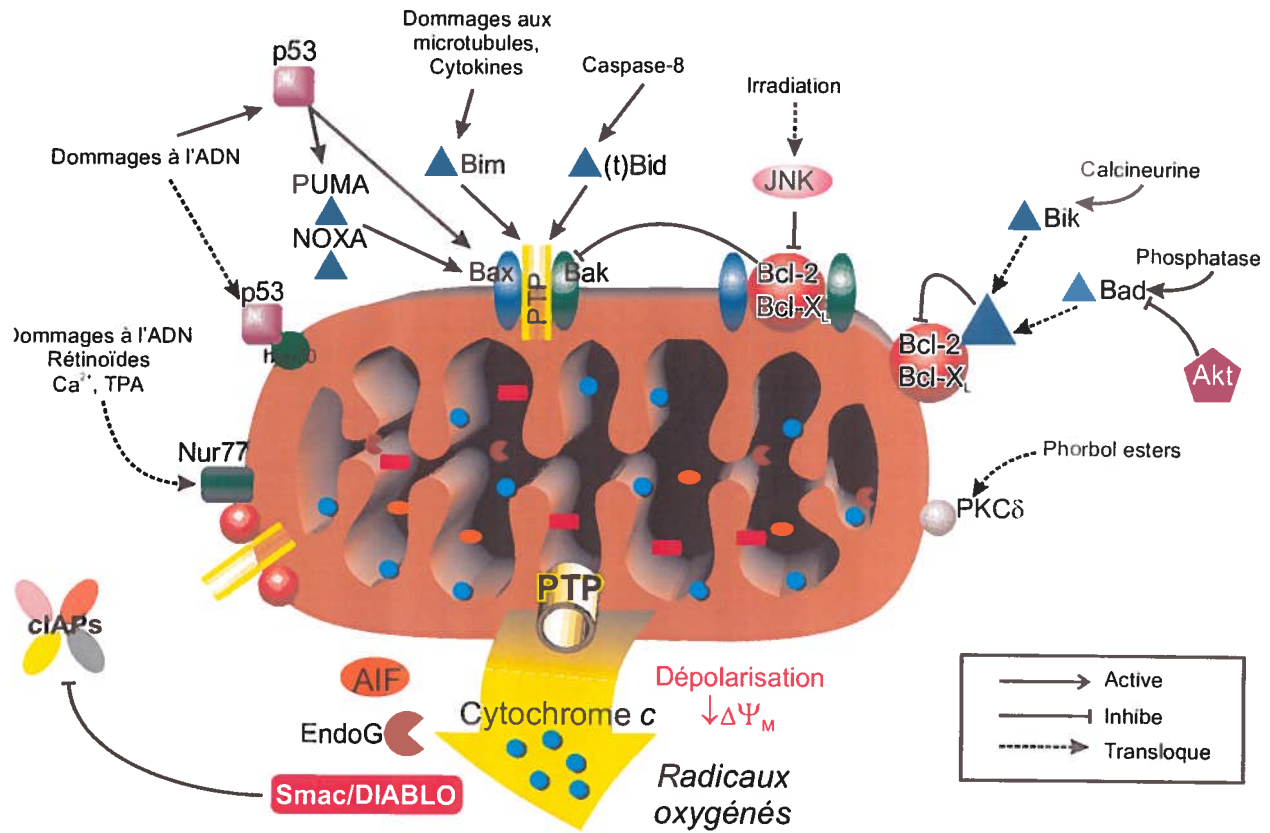
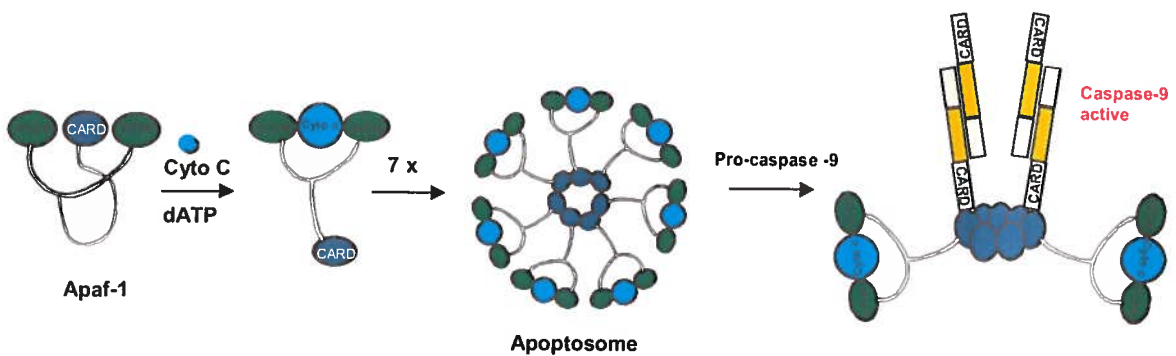
A**B**

Figure 6: Voie intrinsèque. A Molécules régulatrices et effectrices de l'apoptose mitochondriale. B Formation de l'apoptosome (voir texte).

d'entre elles, dont Bid et Bim, facilitent directement l'oligomérisation de Bax/Bak. Comme mentionné précédemment, Bid connecte les récepteurs de mort à la voie intrinsèque. Sa forme inactive de 22 kDa est clivée par la caspase-8. Le fragment tronqué de 15 kDa (tBid) est par la suite myristoylé et transloqué à la mitochondrie (84). Bim est lié au cytosquelette et est activé en réponse à divers stimuli (85). Bad et Bik, quant à eux, se lient à Bcl-2/Bcl-XL et empêchent leur action inhibitrice, notamment en compétitionnant pour leur site de liaison aux membres pro-apoptotiques (86). Bad est une phosphoprotéine inactivée par la kinase Akt en réponse à des signaux de croissance ou de survie (87). Bik est régulé au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel par la voie du calcium (88). Les protéines “ BH3-seul ” NOXA et PUMA sont sous le contrôle transcriptionnel de p53 et sont produits en réponse aux dommages à l'ADN (89, 90).

Ces nombreux facteurs favorisant la mort cellulaire nous amènent à Bcl-2 et à son comparse Bcl-XL, dont le rôle majeur est de contrebalancer tout cet arsenal. En gros, ces deux protéines remplissent leur fonction anti-apoptotique en séquestrant les membres pro-apoptotiques par la liaison de leur domaine BH3 (91). Ceci prévient en bout de ligne l'oligomérisation de Bax ou de Bak et tous les événements qui s'ensuivent: libération de cytochrome c, chute du $\Delta\psi$, transition de la perméabilité, etc. On soupçonne toutefois un second rôle à Bcl-2 dans l'inhibition de l'apoptose, en se basant sur l'action de CED-9, son homologue chez *C. elegans*. CED-9 se lie à CED-4, un homologue de APAF-1, et inhibe ainsi directement l'activation des caspases exécutrices. Chez les mammifères, Bcl-2 ne se lie pas à APAF-1 (92). Toutefois, Bcl-XL (93) ainsi que des nouveaux membres de la sous-classe anti-apoptotique, tels que Boo (94) et Bcl-xES (95), semblent pouvoir lier et inhiber à la fois Bax/Bak et APAF-1.

L'action des protéines de la famille Bcl-2 ne se limite pas à la mitochondrie. On retrouve également certains de ses membres à la surface du réticulum endoplasmique (RE).

1.1.7.2 Autres molécules affectant la mitochondrie

Outre les protéines de la famille Bcl-2, d'autres facteurs peuvent se localiser à la mitochondrie et moduler la libération du cytochrome c. SAPK/JNK, une kinase de la famille des MAPK, est activé en réponse à une panoplie de stress. Lors de dommages à l'ADN, on a observé sa translocation vers la mitochondrie. À cet endroit, il peut interagir avec Bcl-XL et le

phosphoryler. On ignore pour l'instant si ce phénomène est en partie responsable de la libération du cytochrome c, ou plutôt de l'action anti-apoptotiques de Bcl-XL, qui séquestrerait ainsi JNK (96).

Le récepteur nucléaire orphelin Nur77/TR3 est un autre facteur dont on a démontré la translocation mitochondriale et la libération subséquente de cytochrome c, cette fois en réponse au TPA, à l'étoposide, aux rétinoïdes synthétiques et à l'ionophore de calcium A23187 (97). Récemment, la même équipe a démontré que Nur77 interagissait avec Bcl-2 et provoquait un changement conformationnel de ce dernier, le convertissant en une forme pro-apoptotique (98).

La protéine kinase C delta (PKC δ) est une kinase pro-apoptotique. Suite à son activation par le TPA, elle peut se localiser à la mitochondrie et perturber le potentiel membranaire (99). Comme mentionné précédemment, p53 peut lui aussi se transloquer vers la mitochondrie en réponse à des bris d'ADN ou à l'hypoxie (100, 101). Il remplit à cet endroit une fonction semblable aux protéines BH3 et active Bax (82). De manière analogue, l'histone H1.2 est exporté du noyau suite à des coupures des deux brins d'ADN et provoque l'oligomérisation de Bak (102).

1.1.7.3 L'apoptosome

La libération du cytochrome c dans le cytosol est un phénomène répandu dans l'apoptose. En dehors de la mitochondrie, son action est d'induire l'assemblage de l'apoptosome. La figure 6B illustre les étapes menant à la formation et à l'activation de l'apoptosome. Ce complexe multi-moléculaire met en jeu la protéine adaptatrice APAF-1, qui est l'homologue mammifère de CED-4. La structure tridimensionnelle de dernière met en évidence deux domaines WD40 entre lesquels est intercalé un domaine CARD. Lorsque le cytochrome c est présent dans le cytosol, il se lie aux domaines WD40, déplace le domaine CARD et induit un changement de conformation ATP-dépendant. Ceci déclenche l'assemblage de l'apoptosome en une structure heptamérique en forme de roue. La pro-caspase-9 s'associe par la suite au centre de ce complexe par l'intermédiaire de ses propres domaines CARD et subit à son tour un changement de conformation et une dimérisation qui active sa fonction enzymatique (103). La caspases-9 mature va par la suite cliver et activer les caspases exécutrices.

1.1.7.4 Les réticulum endoplasmique et l'apoptose

En plus des voies intrinsèques et extrinsèques, une autre voie parallèle de l'activation de l'apoptose existe au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Nous en savons moins sur ses mécanismes d'activation et de régulation, mais elle est présentement sous étude intensive. Cette voie apoptotique est déclenchée par le stress du RE. Cet organite est responsable de la production de protéines sécrétées et membranaires. Lorsque sa fonction est perturbée, par exemple par un choc thermique ou une production de protéines aberrantes, on assiste à l'activation d'une voie de réponse au stress nommé “ réponse des protéines dépliées ” ou “ UPR ” (pour *Unfolded Protein Response*), qui permet de rétablir l'homéostasie entre autres grâce à la production de chaperones (104). Si cette réponse est incapable de rétablir l'équilibre et que le stress persiste, on assiste au déclenchement de l'apoptose par une voie distincte des autres voies décrites précédemment, bien que partageant certains points communs avec elles. L'accumulation de protéines mal repliées dans des cellules et l'apoptose qui s'ensuit serait l'agent causal de plusieurs maladies neurodégénératives, comme les maladies de Huntington, de Alzheimer, et de Parkinson (105).

Plusieurs agents pharmacologiques sont capables d'induire le stress du RE. L'inhibition de la N-glycosylation par la tunicamycine, du transport au Golgi par la Brefeldine A, et de la pompe ATPase Ca²⁺ du RE par thapsigargine, provoquent un stress de RE et ces agents sont utilisés couramment pour induire l'apoptose. L'initiation de celle-ci au niveau du RE semble dépendre de l'activité de la caspases-12. Cette enzyme se localise à la face cytosolique du RE et son activation par protéolyse est spécifique à cet organite (106). Des souris et des cellules *caspase-12* nulles sont partiellement résistantes à l'apoptose induite spécifiquement par les stress du RE (107). L'activation de la pro-caspase-12 semble passer par les calpaïnes (107), ou par la caspase-7 (108). Ire1, une chaperone du RE, jouerait également un rôle dans l'activation de la caspase-12 en favorisant son oligomérisation via le recrutement de TRAF2 (109). Le pro-domaine de la caspase-12 contient un motif CARD qui pourrait recruter et activer la caspase-9 de manière analogue à APAF-1. En effet, certains ont constaté que l'apoptose par le stress du RE était dépendante de l'activité de la caspase-9 mais indépendante de APAF-1 (110).

L'importance de la caspase-12 est obscurci par le fait que le gène humain est non fonctionnel. Des indices suggèrent qu'il existe une protéine homologue chez l'humain, mais les

preuves se font attendre. L'activation des caspases au niveau du RE pourrait également être accomplie par l'intermédiaire de la caspase-8, possiblement via NRADD/PLAIDD, une protéine transmembranaire du RE semblable aux récepteurs de mort et capable d'activer cette caspase en réponse au stress du RE (111, 112).

L'apoptose par le stress du RE pourrait également être véhiculée indirectement par la mitochondrie, par l'activation calcium-dépendante de Bad, Bax et Bak. Il est important de mentionner que des membres de la famille Bcl-2 ont été observés à la surface du RE. La formation d'un canal par Bax/Bak dans la membrane du RE permettrait la libération de calcium dans le cytosol (113). Le stress du RE peut éventuellement mener à la libération de cytochrome c de la mitochondrie (114). La tyrosine kinase c-Abl joue un rôle-clé dans ce phénomène. Suite à un traitement à la thapsigargine, c-Abl est activé et passe du RE à la mitochondrie. Son mécanisme d'action à cet endroit est encore inconnu (115). Le facteur de transcription NF- κ B est activé suite à la réponse à une surcharge du RE (116). La MAP kinase de stress JNK est également activée au niveau du RE via son association avec TRAF2/Ire1 (117). Ces trois derniers facteurs (JNK, NF- κ B, c-Abl) ont été associés à l'apoptose dans plusieurs systèmes (118).

Comme la mitochondrie, le réticulum endoplasmique semble être un site d'intégration et d'amplification des signaux apoptotiques intrinsèques ou extrinsèques. Par exemple, un nouvel isoforme de la procaspase-8, procaspase-8L, est associé à la face cytosolique du RE. Cette protéine s'associe au complexe BAP31 du RE, et son activation est régulée par Bcl-2 (119). Le clivage de BAP31 par la caspase-8 le convertit d'un inhibiteur à un activateur de l'apoptose, ce qui entraîne la libération de calcium du RE et de cytochrome c de la mitochondrie (114). La libération de calcium à partir des réserves du RE va entraîner l'activation des calpaïnes, qui sont des protéases à cystéine dépendantes du calcium capables de cliver des caspases et certains de leurs substrats (120). Par le biais de la calcineurine, le calcium active également BAD et le facteur de transcription MEF2. Ce dernier affecte positivement la transcription de Nur77, impliqué dans l'apoptose des cellules T (121). Par ailleurs, la présence de calcium dans le cytoplasme favorise directement la formation du PTP mitochondrial (113).

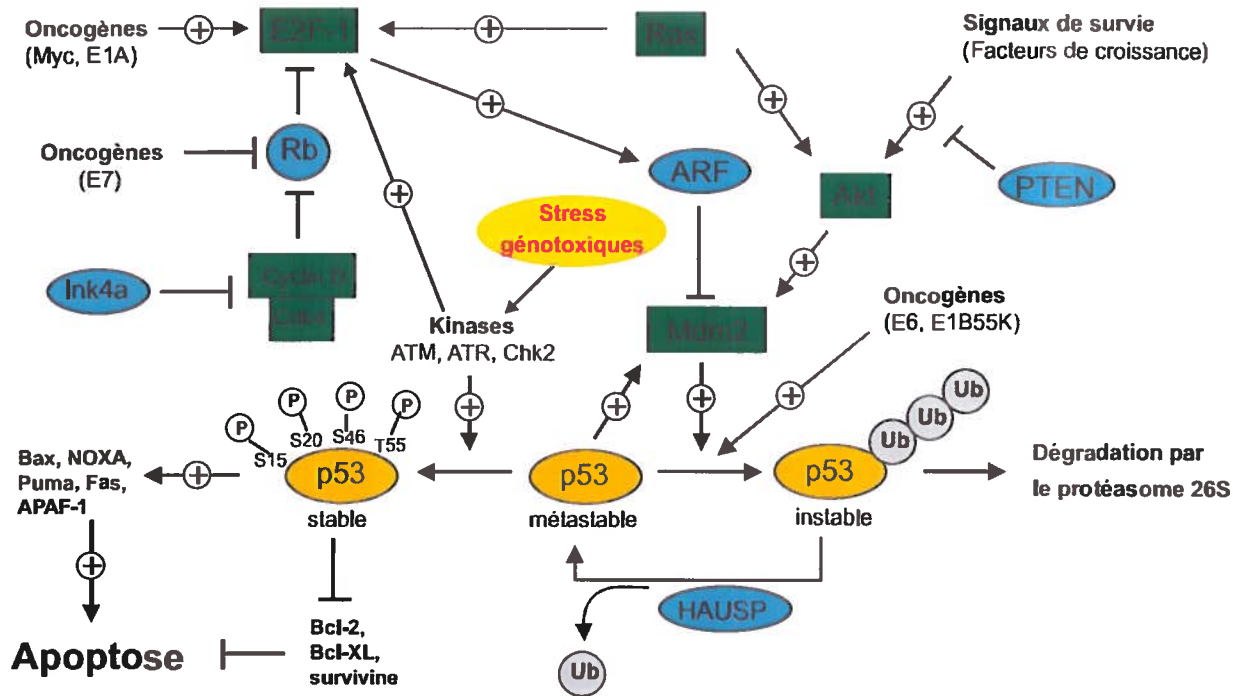


Figure 7: Voies de régulation de p53. Les suppresseurs de tumeurs (ovales bleus) favorisent la modification d'une protéine p53 de plus haute stabilité. Les oncogènes (rectangles verts) activent le cycle cellulaire ou inhibent les suppresseurs de tumeurs et déstabilisent p53. Le p53 instable est conjugué à l'ubiquitine et dégradé par le protéasome. La forme stable de p53 est phosphorylée par des kinases sensibles aux dommages à l'ADN et peut transactiver des gènes pro-apoptotiques et inhiber l'expression de gènes anti-apoptotiques.

1.1.8 La réponse au stress et l'apoptose

1.1.8.1 La voie p53 et les dommages à l'ADN

Il existe un grand nombre de voies de régulation de l'apoptose, à la fois positives et négatives, qui sont activés dans des circonstances précises. Néanmoins, peu d'entre elles ont été caractérisé de façon aussi exhaustive que la voie de p53, impliquée dans la surveillance de l'intégrité du génome. *p53* est le gène suppresseur de tumeur le mieux connu et le mieux caractérisé. Il a été démontré qu'il était inactivé dans plus de 50 % des cancers humains (122). p53 joue un rôle de gardien de l'intégrité du matériel génétique cellulaire. Il est activé en réponse à des oncogènes, à l'hypoxie, aux dommages aux microtubules et principalement aux dommages à l'ADN. Son rôle premier est d'arrêter la croissance cellulaire (points de contrôle) en augmentant par sa fonction transcriptionnelle des gènes tels que *p21^(WAF1/CIP1)*, et de favoriser la réparation des dommages notamment en régulant à la hausse les facteurs Ku70, DDB2 et XPC (123). p53 peut également modifier la structure de la chromatine pour permettre l'accès à la machinerie de réparation (124), et même directement reconnaître les lésions et recruter des facteurs de réparation (125). Toutefois, si des dommages sont trop importants, p53 cesse son activité de réparation et stimule plutôt l'expression de plusieurs gènes pro-apoptotiques: *Bax*, *Puma*, *Noxa*, *APAF-1*, *Fas*, et *DR5* (126). Il peut également inhiber l'expression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-XL ou survivine (127). p53 augmente également l'expression d'une protéine adaptatrice, PIDD, constituant principal du PIDDosome, un complexe cytoplasmique multi-protéique contenant la caspase-2 et capable de provoquer l'apoptose en réponse aux stresss génotoxiques (128). Tel que mentionné précédemment, p53 est de surcroît capable d'induire l'apoptose indépendamment de son activité transcriptionnelle en se localisant à la mitochondrie.

Bien que le gène suppresseur de tumeurs *p53* puisse être activé au niveau transcriptionnel par des stress génotoxiques, sa régulation s'effectue principalement au niveau post-traductionnel. L'oncogène MDM2 est le principal facteur qui limite l'activité de p53. MDM2 est une ubiquitine-ligase qu'il se lie spécifiquement à p53, inhibe sa liaison à l'ADN, et induit sa dégradation par la protéasome. Son expression dans la cellule permet de conserver des niveaux bas de p53. L'ubiquitination et la dégradation de p53 sont également facilités par des oncogènes viraux tels que E6 du papillomavirus humain et E1B^{55K} de l'adénovirus. Inversement, la protéine HAUSP peut enlever les groupements ubiquitine et ainsi stabiliser p53 (129). En réponse aux stress

généotoxiques, plusieurs kinases sensibles aux dommages à l'ADN sont activées: ATR, ATM, Chk1/2, DNA-PK, etc. En plus de jouer un rôle dans la coordination de la réparation de l'ADN, certaines d'entre elles (ATR, ATM, Chk2) vont directement phosphoryler p53 à plusieurs sites, ce qui empêche son interaction avec MDM2, le stabilise et lui permet ainsi d'accomplir ses fonctions (130). Dans une boucle de régulation négative, p53 peut activer la transcription du gène de MDM2. Chk2 peut phosphoryler et activer l'oncogène et facteur de transcription E2F-1 (131).

E2F-1 joue un rôle clé dans l'activation du cycle cellulaire, mais démontre également une activité pro-apoptotique en augmentant l'expression des gènes de pro-caspases, de APAF-1, ATM (132), p73 (une protéine apparentée à p53) et de ARF (133). De plus, on a récemment démontré que E2F-1 activait directement la transcription de membres de la famille BH3-uniques tels que Bim, Noxa et Puma (134). Le répresseur de tumeurs Rb se lie à E2F-1 et l'inactive (135), ce qui entraîne une inhibition de la prolifération, mais également de sa fonction pro-apoptotique. Rb est toutefois rapidement déphosphorylé puis dégradé par des caspases lors de l'apoptose (136). Il a été démontré que le répresseur de tumeurs ARF pouvait bloquer l'activité de MDM2 et stabiliser ainsi p53 (137). Toutefois, ARF est également capable d'inhiber E2F-1 et n'est pas requis pour l'activité apoptotique de ce dernier (138). Outre E2F-1, ARF est également activé par l'oncogène et facteur de transcription c-Myc (139). La cellule possède donc des mécanismes de sûreté pour induire l'apoptose suite à une activation non planifiée de facteurs induisant la prolifération cellulaire, qui est souvent l'oeuvre de virus oncogènes.

La kinase Akt/PKB est activée par des signaux de croissance et de survie par la voie PI3K. Cette kinase est reconnue pour phosphoryler et inactiver une panoplie de facteurs pro-apoptotique comme Bad, caspases-9, Nur77 et Forkhead; et activer des facteurs anti-apoptotiques comme NF- κ B et MDM2 (140). Akt est donc un régulateur négatif de p53 et de l'apoptose en général, d'où son implication dans plusieurs tumeurs. Outre la phosphorylation, l'ubiquitination et les interactions protéine-protéine, la protéine p53 est également modifiée par acétylation, ce qui favorise sa stabilisation (141), de même que par sumoylation, ce qui module sa localisation intranucléaire (142). La figure 7 résume les différents mécanismes de régulation de la protéine p53.

1.1.8.2 La voie des SAPK dans la réponse aux stress

Parmi les voies véhiculant le signal apoptotique en réponse aux dommages à l'ADN et à d'autres stress, on retrouve la voie des MAPK, plus spécifiquement des kinases activées par le stress (SAPK) p38 et JNK. Les protéines kinases JNK (pour c-Jun N-terminal kinase) et p38 sont activées principalement par des stimuli de stress, mais aussi par certains signaux de prolifération. Le facteur de transcription c-Jun est régulé positivement par JNK et est une composante du complexe transcriptionnel AP-1. Selon le contexte de la stimulation et du type cellulaire, ce dernier peut activer des gènes pro-apoptotiques comme FasL, Bim et TNF (143). Cependant, c-Jun et AP-1 sont la plupart du temps associés à la survie cellulaire, ce qui indique que JNK exercerait également son activité pro-apoptotique en phosphorylant d'autres substrats. Les protéines mitochondriales anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL sont inactivées par JNK, alors que les facteurs pro-apoptotiques p53, Bax, Bak et c-Myc sont activés (143). Dans les cellules T Jurkat, l'apoptose induite par l'activation de JNK requiert également FADD, mais non FasL (144). On a démontré chez plusieurs types cellulaires que la libération de cytochrome c et l'apoptose suite à des stress génotoxiques était dépendante de JNK (145, 146). L'importance de JNK dans l'apoptose est de plus soulignée par des études chez des souris déficientes pour les gènes *Jnk1* et *Jnk2*. Ces souris meurent au stade embryonnaire et démontrent des défauts dans l'apoptose lors du développement neuronal (147).

La kinase JNK peut être activée par une foule de stimuli provenant de l'extérieur ou de l'intérieur de la cellule, et qui empruntent des chemins différents. JNK est activé en réponse aux rayons ultraviolets, aux radiations ionisantes et à des agents pharmacologiques qui endommagent l'ADN (118). La génération de céramides, des messagers intracellulaires lipidiques, par la céramide-synthase ou les sphingomyélinases membranaires peut également être déclenchée par des stress génotoxiques ainsi que par d'autres stimuli pro-apoptotiques et mener ultimement à l'activation des SAPK (148, 149). L'activation de JNK passe par la cascade des MAPK, plus spécifiquement par les MAP3K ASK1 et MEKK1, puis par MKK4/SEK1 et MKK7, qui vont finalement phosphoryler et activer JNK.

1.1.8.3 La voie NF- κ B

NF- κ B représente une famille de facteurs de transcription pléiotropiques impliqués dans l'induction de plus de 150 gènes associés à la croissance, la différenciation, le développement, l'adaptation aux stress et l'apoptose. Les protéines NF- κ B (ou Rel) sont composées de sous-unités homologue donc il existe cinq espèces chez l'humain: RelA(p65), RelB, c-Rel, p105–p50 (NF- κ B1) et p100–p52 (NF- κ B2). Les sous-unités p105 et p100 sont clivées par le protéasome pour former respectivement p50 et p52, qui ont pour rôle de se lier à l'ADN. Elles s'associent sous forme d'hétérodimères avec les sous-unités transactivatrices RelA, RelB et c-Rel pour former des complexes transcriptionnels actifs sur l'ADN. Les multiples combinaisons de protéines NF- κ B peuvent transactiver de façon préférentielle différentes séries de gènes (150).

NF- κ B est activé en réponse à une foule de signaux exogènes par le truchement de cascades de signalisation. Il existe deux voies principales de l'activation de NF- κ B: la voie “ classique ” ou “ canonique ” et la voie “ auxiliaire ” ou “ alternative ”. La voie classique mène à l'activation du complexe IKK (le signalosome) dans le cytoplasme. Celui-ci renferme les kinases IKK α et IKK β ainsi que la sous-unité régulatrice IKK γ (NEMO). Ces kinases phosphorylent les inhibiteurs I κ B(α,β,ϵ) qui seront par la suite ubiquitinés et dégradés par le protéasome. En l'absence de I κ B, les protéines p50 et RelA sont libérées du complexe et peuvent se transloquer au noyau et activer la transcription. (150). La voie auxiliaire, qui n'a été caractérisée que depuis trois ans, passe par un complexe non-classique formé uniquement de IKK α et activé par la kinase NIK. La phosphorylation de la sous-unité p100 par IKK1 induit la dégradation partielle de celle-ci pour former la protéine p52 mature, qui se transloque par la suite au noyau en association avec RelB. La voie classique présente une cinétique beaucoup plus rapide que la voie auxiliaire. On assiste donc à une activation biphasique de l'activité NF- κ B, qui peut activer différentes séries de gènes et varier d'un type cellulaire à l'autre (150). Il a été démontré que IKK ainsi que d'autres kinases pouvaient phosphoryler directement certaines sous-unités de NF- κ B et moduler leur activité, fournissant un niveau additionnel de régulation.

NF- κ B est bien connu en immunologie en tant que facteur de transcription sensible aux cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α et l'IL-1 β . Il est fréquemment associé à la survie cellulaire, protégeant par exemple de l'apoptose en réponse au TNF et à divers agents

chimiothérapeutiques (45, 151). Une activité anormalement élevée de NF- κ B dans diverses tumeurs a été abondamment rapportée dans la littérature. Plus spécifiquement, des altérations dans la structure et l'expression du gène *nfkb2*, qui entraînent une surproduction de la sous-unité p52, ont été associées avec le cancer et la transformation virale (150). Ceci serait attribuable non seulement à son activité anti-apoptotique, par l'activation de gènes tels que *XIAP*, *cIAP1*, *cIAP2*, *FLIP*, *Bcl-2* et *Bcl-XL*, mais également à la stimulation de gènes de facteurs favorisant l'oncogénèse, comme *Myc*, *MMP-9*, *VEGF*, *COX-2*, *uPA*, *CXCR4*, *ICAM-1* et *VCAM-1* (152, 153).

Par opposition à son activité favorisant la survie, NF- κ B a également été associé au stress et l'activation de la mort cellulaire. NF- κ B est activé en réponse à de nombreux stress, comme des infections virales, l'oxydation, les rayons ultraviolets, le manque de sérum, l'étoposide et les radiations ionisantes (153). Son activité transcriptionnelle dans de tels cas était requise pour l'induction de l'apoptose. Fait intéressant, il a été démontré que la réponse de NF- κ B aux stress génotoxiques était fonctionnellement distincte de celle en réponse au TNF, et qu'elle mettait en jeu la suppression de la transcription de gènes anti-apoptotiques par l'intermédiaire de la sous-unité RelA (154). En revanche, d'autres auteurs ont plutôt montré que RelA activait des gènes anti-apoptotiques, alors que c-Rel activait des gènes pro-apoptotiques (155). Le rôle de NF- κ B dépendrait par conséquent du contexte et du type cellulaire, qui détermineraient l'équilibre entre les différentes sous-unités et donc la composition du facteur de transcription. En réponse aux stress, NF- κ B active des gènes codant des membres de la voie des récepteurs de mort, dont DR4, DR5, FasL et Fas, ainsi que p53 (118, 156). RIP, une protéine associée aux récepteurs du TNF et à Fas, serait requis dans la signalisation menant à l'activation de NF- κ B en réponse aux dommages à l'ADN (157). Il a été démontré que l'augmentation de l'expression de récepteurs de TRAIL par NF- κ B en réponse aux stress génotoxiques était à la fois essentielle à l'apoptose induite par l'étoposide de même qu'à la synergie entre TRAIL et les agents chimiothérapeutiques dans certain type cellulaire (157, 159). La forte expression de NF- κ B dans diverses tumeurs pourrait ainsi les rendre davantage susceptibles à l'action cytotoxique de TRAIL en combinaison avec des agents génotoxiques.

1.1.9 L'exécution de l'apoptose

Quelles que soient les voies d'activation, l'apoptose est exécutée selon une suite d'événements hautement coordonnés. On peut noter des changements apoptotiques à trois niveaux: i) la perte de la symétrie membranaire, qui est importante pour la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques par l'organisme; ii) la destruction du cytosquelette, responsable de la morphologie arrondie et de la formation des corps apoptotiques; iii) l'apoptose nucléaire, incluant la condensation et la fragmentation du noyau ainsi que la dégradation de l'ADN chromosomique. Ces événements sont la plupart du temps assurés par le clivage sélectif de substrats par les caspases exécutrices. Il existe également un certain nombre de molécules pouvant induire l'apoptose indépendamment des caspases..

1.1.9.1 Les substrats apoptotiques

Il existe un nombre grandissant de protéines dégradées par les caspases. Dans de nombreux cas, le rôle de leur clivage dans la progression de l'apoptose est encore inconnu. Parmi ces substrats, on compte des protéines du cytosquelette: vimentine, gelsoline, actine, lamine, fodrine. Leur dégradation se traduit par une perte de la morphologie cellulaire et de l'adhérence, puis un rétrécissement et une contraction, et finalement le bourgeonnement des corps apoptotiques. On a récemment identifié la kinase ROCK-1 (*Rho-associated kinase 1*) comme un nouveau substrat de caspases dont l'activation par celles-ci est essentielle au bourgeonnement de la membrane et à la formation des corps apoptotiques (160, 161), une fonction partagée avec PAK2 (162).

Outre les caspases elles-mêmes, on dénombre plusieurs molécules de signalisation qui peuvent être soit activées, soit inactivée par un clivage. La PKC δ est clivée et activée par la caspase-3. Bcl-2 est également une cible de la caspase-3, qui le convertit en une forme pro-apoptotique à la manière de Bax. Les protéines régulatrices MEKK1, MKK6b et les SREBPs (*sterol-regulatory element-binding proteins*) sont également activées, alors que DNA-PK, Mdm2, Akt et I κ B α sont inactivés par les caspases lors de l'apoptose. (22).

Au niveau du noyau, une cascade protéolytique amorcée par les caspases exécutrices se solde par la démolition coordonnée de la structure nucléaire et de l'ADN chromosomique. La

caspase-3 clive des protéines nucléaires structurales comme NuMA (protéine de la matrice nucléaire) et Lamin A et C (enveloppe nucléaire), ce qui entraîne la fragmentation nucléaire (163). La condensation de la chromatine s'effectue suite au clivage de Acinus par la caspase-3 (164). Celle-ci clive également PARP-1 (*poly-ADP ribose polymerase 1*), une enzyme de réparation de l'ADN, en deux fragments de 24 et 89 kDa (165). Un événement important dans l'apoptose nucléaire est le clivage de ICAD/DFF45, qui est l'inhibiteur de la nucléase CAD/DFF40. La libération de la nucléase du complexe ICAD/CAD provoque le clivage de l'ADN inter-nucléosomal et génère des fragments d'environ 200 pb, qui peuvent être visualisés sur gel d'agarose sous la forme d'une échelle d'ADN (166). Bien que la dégradation de l'ADN ne soit pas nécessaire à l'apoptose, tel qu'observé chez des cellules énuclées, cet événement sert à sceller le destin de la cellule vers une mort irrémédiable (167).

1.1.9.2 Les inhibiteur de caspases

Les IAP (*Inhibitor of Apoptosis*) forment une famille de protéines anti-apoptotiques fortement conservées entre les espèces, dont le rôle est l'inhibition spécifique de l'activation des caspases. Leur présence dans la cellule agit comme un tampon afin d'empêcher l'activation accidentelle de caspases, et détermine ainsi l'intensité du signal requis pour induire l'apoptose. Les IAP mammifères (survivin, XAIP, NAIP, L-IAP, ILP-2, cIAP1 et cIAP2) se lient aux caspases 3, 7 et 9 à travers leurs domaines BIR (*Baculovirus IAP Repeat*) et les inactivent (168). De plus, XIAP, cIAP1 et cIAP2 renferment un domaine RING dans leur région C-terminale et recèlent une activité ubiquitine-ligase E3. Elles peuvent induire l'ubiquitination de leur caspases cibles et leur dégradation par le protéasome (169), et catalysent aussi leur propre dégradation (170). Récemment, des chercheurs ont découvert une nouvelle famille d'inhibiteurs apparentés au IAP, les CARP (*Caspases-8- and -10-Associated RING Proteins*) capables de supprimer les caspases contenant des DED (caspases-8 et 10) (171).

Les IAP représentent un frein biologique à l'apoptose. Pour surmonter ce blocage lors de l'initiation de l'apoptose intrinsèque, les protéines pro-apoptotiques Smac/DIABLO et HtrA2/Omi sont libérées de la mitochondrie et agissent comme régulateurs négatifs des IAP (65, 172). Ces protéines servent donc à relâcher les freins et à amplifier la cascade protéolytique des caspases.

1.1.9.3 Exécution de l'apoptose indépendante des caspases

Il ne fait aucun doute que les caspases jouent un rôle fondamental dans la phase d'exécution de l'apoptose. L'inactivation de caspases initiatrices ou effectrices bloque complètement la voie extrinsèque des récepteurs de mort. Toutefois, l'apoptose résultant de dommages internes activant la voie intrinsèque n'est que partiellement inhibée lorsque APAF-1 ou caspase-9 sont délétés. L'inhibition est beaucoup plus efficace si la mitochondrie est protégée, soit en inhibant Bax/Bak ou en surexprimant Bcl-2 (173). Il existe donc forcément d'autres molécules et d'autres mécanismes effecteurs pouvant exécuter l'apoptose indépendamment des caspases exécutrices, ou alors qui peuvent emprunter des voies alternatives pour les activer.

Deux protéines mitochondriales, AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) et l'endonucléase G, sont libérées de l'espace intermembranaire et se transloquent au noyau lors de l'apoptose. Toutes deux sont des protéines conservées dans l'évolution et contribuent à l'apoptose nucléaire indépendamment des caspases. AIF est un flavoprotéine mitochondriales possédant une activité oxydoréductase. La modification de AIF par PARP-1 induit sa translocation au noyau (174). À cet endroit, ce facteur provoque la condensation nucléaire et la fragmentation de l'ADN en de longs fragments d'environ 50 kb (175). Il a été démontré que AIF était essentiel à l'apoptose lors de la morphogénèse de l'embryon (176). Le mécanisme par lequel il induit l'apoptose est toutefois nébuleux, bien qu'il semble agir en collaboration avec l'endonucléase G. Cette nucléase mitochondriale est également transloquée vers le noyau lors de l'apoptose, où elle dégrade l'ADN chromosomique indépendamment de CAD/DFF (63).

Les cellule T et NK utilisent un système d'exocytose de granules afin d'éliminer les cellules infectées par des virus. Les diverses protéines contenues dans ces granules véhiculent un signal de mort directement à l'intérieur de cellule cible. La perforine forme un pore à la membrane afin d'injecter les granzymes dans le cytoplasme. La Granzyme B est une cystéine protéase semblable aux caspases, capable de cliver la caspase-3 et certains de ses substrats, tel que Bid et ICAD (177, 178). La Granzyme A active le complexe cytoplasmique SET qui mène à la libération d'une DNase générant des coupures simple-brin dans le noyau, sans nécessiter d'activité caspase. La Granzyme C induit une autre voie indépendante des caspases qui se solde par une dysfonction des mitochondries (179).

Tel que mentionné précédemment, les calpaïnes (I et II) sont des cystéine protéases dépendantes du calcium qui peuvent agir en collaboration avec les caspases pour cliver divers substrats apoptotiques, notamment des protéines structurales, suite à un stress augmentant la concentration intracellulaire de calcium dans la cellule (180). Le stress du RE et les voies apoptotiques intrinsèques et extrinsèques peuvent entraîner dans certains cas la mobilisation du calcium et l'activation rapide des calpaïnes.

1.2 Les récepteurs nucléaires et Nur77

Les récepteurs d'hormones nucléaires constituent un vaste regroupement de régulateurs transcriptionnels aux multiples fonctions dont on retrouve des membres apparentés chez tous les métazoaires. Il s'agit d'une superfamille contenant plus de 150 membres dans plusieurs espèces, de la mouche drosophile à l'humain. Les récepteurs nucléaires jouent des rôles variés dans la régulation de divers processus dans l'organisme: reproduction, métabolisme, morphogénèse, homéostasie, différenciation et apoptose. Dans la plupart des cas, l'activité transcriptionnelle de ces protéines est modulée par l'action d'une petite molécule lipophile – le ligand – qui a la faculté de pénétrer directement dans la cellule et d'aller se lier au facteur nucléaire, d'où le nom “récepteur nucléaire”. Ceux-ci fournissent donc à l'organisme un moyen de moduler directement la transcription des gènes via des signaux intercellulaires sans passer par des récepteurs membranaires.

1.2.1 Classification des récepteurs nucléaires

Face à l'abondance et à la diversité des récepteurs nucléaires, les biologistes se sont attelés à la tâche de les classer, afin de mieux comprendre leurs origines, leur évolution et les liens qui les unissent. Les chercheurs ont comparé les séquences de plusieurs ADNc et identifié plusieurs nouveaux récepteurs potentiels par homologie, n'ayant pas de ligand connu et ont été baptisés “récepteurs orphelins”(181). En 1997, V. Laudet a effectué une analyse de phylogénie moléculaire approfondie afin de comparer et regrouper les divers récepteurs nucléaires au niveau de leur séquence en acides aminés (182). Cette analyse a permis de regrouper les récepteurs en six sous-familles distinctes. Les principaux membres humains de ces familles sont énumérés dans le tableau II, de même que leurs ligands respectifs et leur mode d'interaction avec leurs éléments de réponse sur l'ADN. La sous-famille I est composée de nombreux membres tels que TR, RAR, CAR, RZR, PPAR, Rev-erb, VDR, FXR, LXR et ROR, qui ont des fonctions et des ligands variés. La sous-famille II contient RXR, le récepteur de l'acide 9-*cis* rétinoïque qui a la faculté de s'associer avec de nombreux récepteurs nucléaires de la sous-famille I, de même que les récepteurs orphelins COUP-TF, HNF4, TR2, TR4 et TLX. La troisième sous-famille, présente seulement chez les mammifères, est composée des récepteurs d'hormones stéroïdes: ER, GR, MR, PR et AR, ainsi que du récepteur orphelin ERR. La sous-famille IV est celle des récepteurs

	Récepteur	Ligand	Liaison à l'ADN (HRE)
I	TR (α, β)	T3	
	RAR (α, β, γ)	Acide <i>all-trans</i> rétinolique Acide <i>9-cis</i> rétinolique	
	PPAR (α, β, γ)	Acides gras PGJ2, LTB4	
	Rev-Erb (α, β)		
	ROR (α, β, γ)		
	CAR	Androstanol	
	VDR	Vitamine D	
	PXR	Pregnanes	
	FXR	Farnésolides	
LXR (α, β)	Oxystérols		
II	RXR (α, β, γ)	Acide <i>9-cis</i> rétinolique	
	HNF4 (α, β, γ)	Acides gras CoA thioesters ?	
	COUP-TF (α, β, γ)		
	TLX		
	TR2		
	TR4		
III	ER	Oestrogènes	
	GR	Glucocorticoïdes	
	MR	Minéralocorticoïdes	
	PR	Progestérone	
	AR	Androgènes	
	ERR (α, β, γ)		
IV	NGFI-B/Nur77		
	Nurr1		
	NOR-1		
V	SF1/FTZ1	Oxystérol ?	
	LRH1		
VI	GCNF1		
0 (Atypiques)	DAX-1		
	SHP-1		

Tableau II: Classification des récepteurs nucléaires humains. Les membres de cette superfamille sont classés en six sous-famille (I à VI) selon leur homologie de séquence en acides aminés (182). Des récepteurs nucléaires atypiques sont classés dans la sous-famille 0. Les ligands connus de chacun des récepteurs sont spécifiés dans la troisième colonne. La quatrième colonne indique le mode d'interaction des récepteurs nucléaires avec les éléments de réponse sur l'ADN. Un carré vide marqué d'un X représente le partenaire de dimérisation RXR.

orphelins NGFI-B, soit Nur77, Nurr1 et NOR-1. La sous-famille V ne contient que deux récepteurs orphelins: SF1/FTZ1 et LRH1, alors que la sous-famille VI n'est constituée que d'un seul membre, GCNF1. Une multitude d'autres récepteurs retrouvés chez des organismes non-mammifères comme la drosophile, *C. elegans* et *Xenopus* ont pu être classifiés dans ces mêmes sous-familles. Finalement, certains récepteurs orphelins à la topologie atypique, dont les produits des gènes humains *SHP-1* et *DAX-1*, sont classés dans une catégorie à part (182). Il ressort de cette analyse que des récepteurs à la fonction et au ligand semblables, comme RAR et RXR, peuvent avoir une origine évolutive très différente, alors que des récepteurs orphelins encore peu caractérisés sont souvent très proches de récepteurs bien connus, comme dans les cas de HNF4 et RXR ou de ERR et ER.

1.2.2 Anatomie des récepteurs nucléaires

La figure 8A illustre la structure linéaire typique des récepteurs d'hormones nucléaires. Celle-ci se présente sous la forme de modules ayant des fonctions propres. La taille, la fonction ou même la présence de certains domaines peut varier d'une espèce de récepteurs nucléaires à l'autre.

Le domaine N-terminal A/B, aussi appelé modulateur, est la région la plus variable en taille et en séquence chez les récepteurs nucléaires. Elle est pratiquement inexistante chez CAR et SF-1, alors qu'elle constitue pas loin de la moitié de la protéine chez TR et Nur77. Cette région est également celle qui varie le plus fréquemment entre les isotopes d'une même espèce de récepteur ainsi qu'entre les isoformes générés par épissage alternatif. C'est le cas avec les différents récepteurs RAR, qui ont plus ou moins que les mêmes domaines de liaison à l'ADN et au ligand mais se distinguent par leur domaine N-terminal. Celui-ci leur confère ainsi une spécificité et une activité biologique distinctes. Des sérines et des thréonines du domaine A/B sont fréquemment la cible de kinases activées par diverses voies de signalisation, ce qui affecte l'activité transcriptionnelle du facteur. En effet, le domaine A/B renferme le domaine de transactivation AF-1 dont l'activité est indépendante de la présence du ligand. Ce domaine peut recruter directement des co-activateurs comme les SRC (*Steroid Receptor Coactivators*) afin de favoriser la formation de complexes transcriptionnels. Le domaine A/B des récepteurs RAR, ER, NGFI-B, PPAR et RXR est phosphorylé par des MAPK, ce qui altère l'activité transcriptionnelle de ces

derniers, soit en modulant leur liaison aux co-activateurs, soit en affectant la conformation d'autres domaines par le biais de communications intra-moléculaires. (183).

La région C correspond au domaine de liaison à l'ADN (DBD – *DNA-binding domain*). Celui-ci est le plus fortement conservé entre tous les récepteurs nucléaires. Il permet à ceux-ci de reconnaître des séquences d'ADN spécifiques et s'y lier. Dans une région de 60-70 acides aminés, on retrouve six cystéines permettant la coordination de deux atomes de zinc pour former deux doigts de zinc dont le rôle est de s'intercaler dans l'ADN. La figure 8B illustre la conformation d'un DBD et des doigts de zinc. Ce domaine est divisé en trois parties fonctionnelles. La boîte P (P-Box) situé à la base du premier doigt de zinc est responsable de la reconnaissance spécifique des motifs d'ADN de l'élément de réponse hormonal (HRE - *hormone response element*). La boîte D est importante pour la dimérisation de différents partenaires au niveau de l'ADN. Finalement, la région CTE (*Carboxy-Terminal Extension*) est particulièrement importante lorsque le récepteur se lie à l'ADN sous forme de monomère car il permet de reconnaître des nucléotides spécifiques en amont de l'élément de réponse central.

La région D joue un rôle de charnière flexible entre les régions C et E, permettant une rotation de celles-ci. La charnière autorise les récepteurs à adopter diverses orientations sur l'ADN selon leurs associations. Cette région contient également un ou plusieurs signaux de localisation nucléaire (NLS).

La région E est complexe tant au niveau structural que fonctionnel. Cette région correspond au domaine de liaison au ligand (LBD – *Ligand-binding domain*). Elle est également responsable de l'homo- ou hétérodimérisation des récepteurs, de la liaison avec des co-activateurs/répresseurs et des protéines de choc thermique (HSP), ainsi que de l'activité de transactivation ligand-dépendante AF-2. Bien que la séquence en acides aminés et la structure du LBD varient d'un récepteur à l'autre, ce domaine est la plupart du temps formé de 12 hélices alpha et contient deux régions caractéristiques: un motif "signature" de 20 acides aminés au coeur du LBD et le motif AF-2 dans la partie C-terminale (184). La structure du LBD des récepteurs nucléaires est schématisée dans la figure 9. Elle consiste en un arrangement d'hélices en trois couches concentriques. La couche médiane hydrophobe contient une cavité, la poche de liaison au ligand, qui se retrouve dans une conformation ouverte ("apo") en l'absence de ce dernier. Les

données de cristallographie aux rayons X ont révélé qu'en présence du ligand, le LBD subit un changement allostérique et se replie sur lui-même pour adopter une conformation fermée et compacte (“ holo ”), à la manière d'un piège à souris (185). Sous cette forme, la région AF-2 s'associe avec d'autres hélices pour former une nouvelle surface d'interaction capable d'accomplir la fonction de transactivation (186). Les récepteurs nucléaires stéroïdes sont pour leur part séquestrés dans le cytoplasme sous leur forme inactive en association avec la protéine hsp90, par l'intermédiaire de leur domaine de liaison au ligand. La liaison de l'hormone au LBD permet la dissociation de ce complexe et la translocation du récepteur compétent dans le noyau (187).

Finalement, la région F située en C-terminal ne participe pas à la liaison aux ligand et n'est pas présente chez tous les récepteurs nucléaires. Sa fonction est encore peu connue mais semble être régulatrice.

1.2.3 Liaison aux éléments de réponse sur l'ADN

Comme tout facteur de transcription, les récepteurs nucléaires se lient à l'ADN à travers des éléments de réponse dont la séquence est relativement constante. Une analyse d'un grand nombre d'éléments de réponse naturels et synthétiques a montré que les récepteurs nucléaires se liaient à des motifs de reconnaissance centraux de 6 pb. Les récepteurs stéroïdes de la sous-famille III se lient à la séquence canonique AGAACA, sauf ER qui se lie à la séquence AGGTCA. Sur l'ADN, ces éléments sont présents en paires sous forme de palindromes et accueillent des dimères de récepteurs. Les autres récepteurs reconnaissent la séquence centrale AGG/TTCA. Ceux qui se lient à l'ADN sous forme de monomère reconnaissent préférentiellement la séquence centrale précédée d'une région riche en A/T. D'autres se lient sous forme d'homo- ou d'hétérodimère à des répétitions directes (DR) de deux demi-sites AGG/TTCA séparés par un nombre variable des nucléotides (DR1-DR5), ou encore à des palindromes directs (tête-à-tête) ou inversés (queue-à-queue) de demi-sites. Il est toutefois rare que l'on retrouve dans les promoteurs une correspondance parfaite aux séquences consensus.

De nombreux récepteurs nucléaires non-stéroïdaux se lient aux répétitions directes sur l'ADN en association avec le récepteur X rétinolide, RXR. Bien que la plupart de ses récepteurs peuvent se lier à leur éléments de réponse sous forme d'homodimères, la présence de RXR

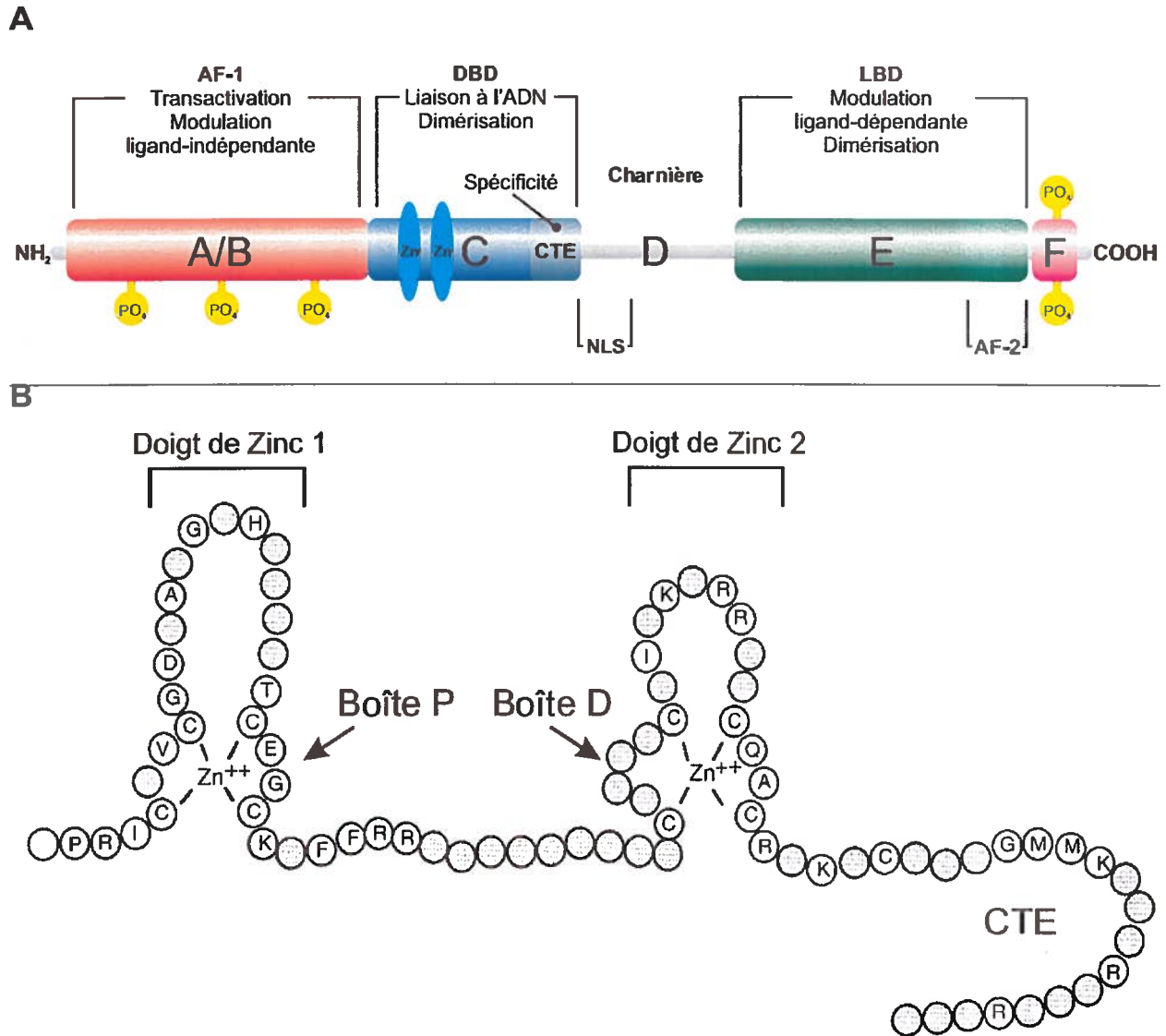


Figure 8: Structure des récepteurs nucléaires. **A** Le schéma représente les différents domaines et régions fonctionnelles des récepteurs nucléaires. Le domaine A/B consiste en une région modulatrice souvent phosphorylée et apte à transactiver des gènes indépendamment du ligand. La portion C représente le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et contient deux doigts de zinc fortement conservés. La région D joue un rôle de charnière flexible. La région E/F représente le domaine de liaison au ligand (LBD) et contient des surfaces d'interaction essentielles à la dimérisation et à la transactivation. L'importance de chacun des domaines dans la fonction des différents récepteurs nucléaires est variable. **B** Structure générale du domaine de liaison à l'ADN des récepteurs nucléaires. On y retrouve les deux doigts de zinc renfermant chacun quatre résidus cystéine coordonnant un atome de zinc. La boîte P est importante pour la reconnaissance de la séquence cible sur l'ADN alors que la boîte B participe à l'interaction avec le partenaire de dimérisation. La portion CTE joue un rôle dans la reconnaissance de nucléotides en amont de l'élément principal. Les résidus lettrés sont conservés et sont impliqués dans des interactions intramoléculaires. Adapté de (183).

favorise grandement leur liaison à l'ADN et leur activité transcriptionnelle (188). Dans ce cas, le nombre de nucléotides séparant les deux demi-sites détermine la spécificité des hétérodimères. Ainsi, RAR s'associe à RXR sur des éléments DR1, DR2 et DR5. TR se lie à des DR4, PPAR à DR1, VDR à DR3, Nur77 à DR5, ainsi de suite, en conjonction avec RXR. RXR peut aussi former des homodimères sur des éléments DR1. Sur des éléments DR2-DR5, on retrouve RXR en position 5' et le récepteur partenaire en position 3'. Sur des éléments DR1, la polarité est inversée et RXR se retrouve sur le deuxième demi-site en position 3'. La position occupée par le récepteur sur une répétition directe peut influencer sa capacité à se lier à son ligand, puisqu'un dimère RAR/RXR est insensible à l'acide rétinoïque *all-trans* (189).

Dans la plupart des cas, RXR joue le rôle d'un partenaire silencieux dans le contexte d'hétérodimères liés aux répétitions directes, c'est-à-dire qu'il ne peut à lui seul activer la transcription du gène en présence de son ligand. On parle alors d'un hétérodimères non-permissif. Seul le ligand du partenaire peut activer la transcription, bien que la présence des deux ligands ait un effet amplificateur. Toutefois, dans les cas où RXR est associé à PPAR, Nur77, LXR ou FXR, l'hétérodimère est permissif; le complexe peut ainsi être activé seulement par l'acide 9-*cis* rétinoïque (183).

1.2.4 Régulation de la transcription par les récepteurs nucléaires

Une fois liés à l'ADN au sein d'un promoteur, les récepteurs nucléaires peuvent moduler la transcription de gènes. L'influence de ces facteurs de transcription sur l'activité du promoteur est indirecte et met en jeu des “ co-régulateurs ” qui se lient aux récepteurs et agissent comme des intermédiaires entre ces derniers et la machinerie de transcription. En l'absence du ligand, plusieurs récepteurs nucléaires suppriment l'expression des gènes. Cette action est assurée par leur association constitutive avec des co-répresseurs. Les récepteurs TR et RAR non ligandés s'associent avec les co-répresseurs nucléaires NCoR et SMRT à travers leur région AF-2 (190, 191). Ces protéines recrutent des histone désacétylases (HDAC) qui ont pour effet de modifier la chromatine pour la rendre silencieuse, c'est-à-dire inaccessible aux facteurs de transcription et à l'ARN polymérase. Lorsque le ligand est présent, le LBD subit un changement de conformation qui libère les co-répresseurs et favorise plutôt l'association avec des co-activateurs. On dénombre plusieurs espèces de co-activateurs de récepteurs nucléaires: les membres de la famille p160

incluant pCIP et SRC-1/2, le co-activateur de PPAR γ (PGC-1), PCAF et CPB/p300. Ces facteurs possèdent une activité histone acétyltransférase (HAT) et servent donc à désassembler les nucléosomes afin de rendre le promoteur accessible aux facteurs de transcription (183). La région AF-1 de certains récepteurs nucléaires est également apte à recruter des co-activateurs indépendamment de la présence d'un ligand, soit constitutivement ou encore suite à une phosphorylation (192). Un schéma représentant le recrutement des co-régulateurs et les modifications structurales qui s'ensuivent est présenté dans la figure 10. Le recrutement actif de co-activateurs/intégrateurs tels que CBP/p300 et SRC-1 par les récepteurs nucléaires peut indirectement influencer l'activité de membres d'autres familles de facteurs de transcription qui interagissent eux aussi avec ces mêmes protéines, comme API et NF- κ B (193, 194). Une partie de l'activité biologique de certains récepteurs nucléaires, notamment GR, serait ainsi attribuable à la modulation d'autres voies transcriptionnelles par la compétition pour des co-activateurs communs (195).

1.2.5 La famille de récepteurs orphelins NGFI-B/Nur77

Nur77, aussi connu sous les noms de NGFI-B, NR4A1, TR3, NAK1, N10, TIS1 et ST59, fut découvert indépendamment par deux équipes en 1988. Milbrandt a montré que ce gène était rapidement activé chez les cellules de phœochromocytome de rat PC12 en réponse au NGF (196). Hazel *et al.* ont pour leur part identifié le même gène (clone d'ADNc #77), cette fois rapidement exprimé chez des fibroblastes de souris exposés à du sérum (197). Par conséquent, NGFI-B/Nur77 était au début considéré par les chercheurs comme un gène de réponse immédiate/précoce. J'utiliserai la dénomination Nur77 pour le reste de cette thèse car il s'agit du terme le plus souvent employé dans l'étude de ce facteur en relation avec l'apoptose.

Deux autres gènes fortement apparentés à Nur77 ont été découverts dans les années suivantes. Nurr1 (*Nur-related receptor 1*), aussi connu sous les noms NR4A2, TINUR, NOT et RNR-1, a été identifié en 1992 dans une banque d'ADNc de cerveau de souris naissantes (198). Le dernier membre, NOR-1 (*Neuron-derived orphan receptor*), alias NR4A3, MINOR, TEC, CHN, a été cloné en 1994 à partir d'une culture primaire de cellules neurales fœtales de rat (199). À eux trois, Nur77, Nurr1 et NOR-1 forment une sous-famille distincte de récepteurs orphelins dans la grande famille des récepteurs nucléaires. Leurs gènes sont situés respectivement sur le

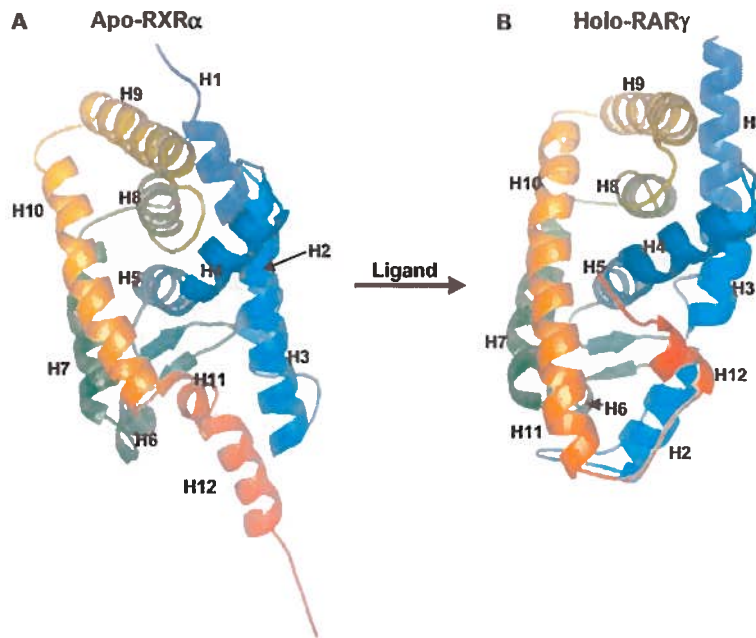


Figure 9: Structure du LBD des récepteurs nucléaires. A La forme non ligandée (apo) de RXRα adopte une conformation ouverte comme en témoigne l'hélice H12, qui est dépliée. B La présence du ligand induit un changement de conformation dans RARγ (holo), qui se manifeste par le repliement de l'hélice H12 en une configuration plus compacte. Tiré de (291).

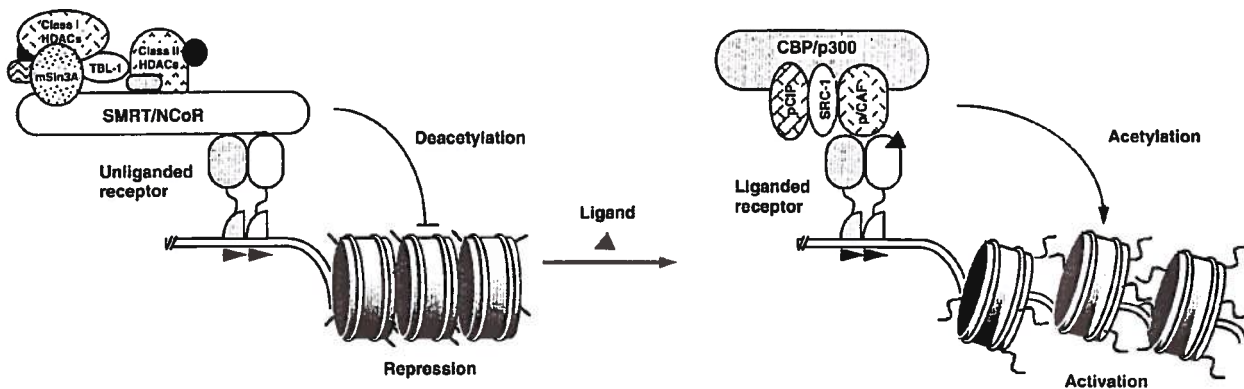


Figure 10: Régulation de la transcription par les récepteurs nucléaires par les co-activateur/co-répresseurs. En l'absence du ligand, les récepteurs associés à leurs éléments de réponse respectifs recrutent des histone désacétylases par le biais de leur association avec les co-répresseurs NCoR et SMRT. Ceci favorise l'association des histones avec la chromatine et empêche la transcription. En présence du ligand, les récepteurs nucléaires interagissent plutôt avec des facteurs favorisant l'acétylation des histones et ainsi l'ouverture de la chromatine et l'activation des gènes. Tiré de (183).

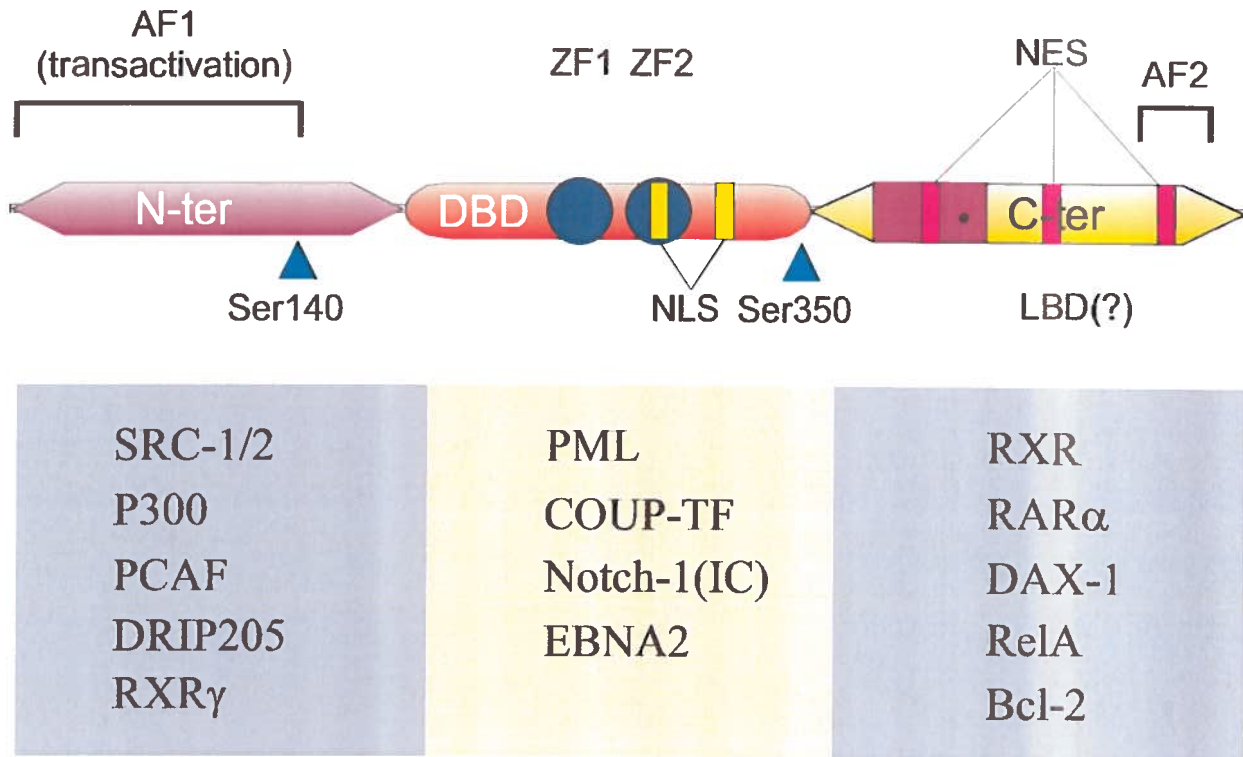


Figure 11: Domaines de Nur77 et partenaires d'interactions. Le domaine amino-terminal (N-ter) est important pour la transactivation (fonction d'activation AF1) et la modulation de l'activité. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) contient deux doigts de zinc (ZF1, ZF2) et deux signaux de localisation nucléaire (NLS). Le domaine carboxy-terminal (C-ter) contient une région apparentée au LBD des récepteurs d'hormones nucléaires, trois signaux d'exportations nucléaires (NES) ainsi qu'une deuxième région de transactivation (AF2). Les partenaires protéiques se liant à Nur77 sont alignés à leur domaine d'interaction respectif (voir texte).

chromosome 12q13.1, 2q22-q23 et 9q22. L'arrangement génomique de ces trois gènes est fort semblable, ce qui suggère une évolution d'un gène ancestral commun (200). Pour appuyer cette thèse, les récepteurs orphelins DHR38 et BHR38 retrouvés respectivement chez la Drosophile et le Bombyx sont homologues à Nur77 et peuvent être classés dans la famille NGFI-B/Nur77 (201).

1.2.6 Structure de Nur77

Nur77 est une phosphoprotéine migrant normalement entre 65 et 75 kDa. Comme tous membres de la famille des récepteurs nucléaires, Nur77 est formé d'un domaine régulateur en N-terminal, d'un domaine de liaison à l'ADN (DBD) renfermant deux doigts de zinc et d'un domaine LBD en C-terminal. Le DBD est le domaine le plus conservé entre les membres la famille avec 90 % d'homologie au niveau des acides aminés. Le domaine C-terminal est davantage variable avec environ 60% d'homologie alors que le domaine N-terminal est divergeant avec moins de 20% d'homologie, bien que certains motifs soient conservés. La figure 11 illustre des différents domaines fonctionnels de Nur77.

La partie N-terminale de Nur77 est d'une longueur de 265 acides aminés, est riche en sérines et fortement phosphorylée. Sur gel, la protéine apparaît comme une bande diffuse. La délétion de la partie terminale ou un traitement avec de la phosphatase permet d'obtenir une bande nette (202). Cette région contient également une séquence “ PEST ” (pour proline-acide glutamique-sérine-thréonine) qui est susceptible de conférer une courte demi-vie à la protéine, ce qui a été observé chez d'autres récepteurs nucléaires (203). Des analyses de délétion ont montré que la fonction AF-1 de ce domaine était absolument nécessaire à l'activité transcriptionnelle de Nur77 (204).

Le domaine de liaison à l'ADN contient environ 85 acides aminés. Il est conforme à la structure canonique des récepteurs nucléaires et contient deux doigts de zinc de même qu'un CTE (figure 12A). On retrouve dans ce dernier une boîte A essentiel à la reconnaissance efficace de l'élément de réponse sur l'ADN (205). De plus, le DBD contient dans sa région C-terminale deux signaux de localisation nucléaire (NLS) (206).

Bien qu'étant homologue à celui d'autres récepteurs, le LBD de Nur77 (~240 a.a.) ne semble pas se lier à aucun ligand exogène (204). De plus, la structure cristalline des LBD de

DHR38 et de Nurr1 a été résolue, et aucune poche de liaison au ligand n'a été décelée (figure 12B). La conformation du LBD de Nurr1 ressemble en fait à celle de récepteurs nucléaires déjà liés à leur ligand et transcriptionnellement actifs. L'étude de la structure a également révélé l'absence d'un site classique de liaison à des co-activateurs dans la région AF-2 (207). Un mutant entièrement dépourvu de ce domaine démontre une activité transcriptionnelle comparable à celle de la protéine sauvage (204, 208). Toutefois, des délétions de plus petites portions C-terminales entraînent une inhibition de la transcription, ce qui suggère qu'une portion de ce domaine pourrait inhiber la fonction AF-1 par communication intra-moléculaire (204). On n'a pas décelé de phosphorylation dans ce domaine, ce qui exclut un rôle modulateur par l'intermédiaire de kinases (202). Katagiri *et al.* ont identifié trois signaux d'exportation nucléaires (NES) dans le LBD qui seraient importants pour la localisation cytoplasmique de Nur77 (206). Malgré les similitudes, le LBD de la famille NGFI-B/Nur77 semble par conséquent remplir un rôle biologique autre que celui des récepteurs d'hormones, probablement en tant que domaine d'interaction avec d'autres protéines (204).

1.2.7 Interactions de Nur77

1.2.7.1 Interaction avec l'ADN

Nur77 est le premier récepteur nucléaire qui fut observé en association avec l'ADN sous forme de monomère. Les membres de la famille NGFI-B/Nur77 se lient à une séquence octamérique, le NBRE (5'-AAAGGTCA-3'), qui a été identifiée par sélection génétique chez la levure (209). Cette séquence renferme un demi-site de l'élément de réponse principal des récepteurs stéroïdes/thyroïde/rétinoïde, AGGTCA. La reconnaissance des deux adénines en amont de ce motif est assurée par la boîte A du DBD (205). Nur77 et Nurr1, mais non NOR-1, peuvent également former des hétérodimères avec RXR sur des éléments DR5 (210). Contrairement au complexe RXR-RAR, les complexes RXR-Nur77/Nurr1 sont permissifs. Ils constituent par conséquent une nouvelle voie de réponse aux rétinoïdes.

L'élément NBRE couplé à un gène rapporteur ne semblait pas être activé de façon significative suite à des stimuli physiologiques activant la transcription de gènes reconnus comme étant dépendants de Nur77. La recherche de nouvelles cibles naturelles de Nur77 sur l'ADN a mené à la découverte de l'élément de réponse Nur (NurRE). Un tel élément a été identifié dans le

promoteur de la pro-opiomélanocortine (POMC) (211). Le NurRE consensus correspond à deux éléments NBRE arrangés en palindrome inversé et séparés par six nucléotides. Au niveau transcriptionnel, le NurRE est au moins 40 fois plus efficace que le NBRE en réponse à une surexpression de Nur77 et est sensible à divers stimuli physiologiques comme l'activation du RcT chez les cellule T et l'activation par le CRH chez les cellules corticotrophiques (211). Le NurRE peut être activé par les trois membres de la famille NGFI-B/Nur77 et peut également accommoder des hétérodimères de Nur77 et Nurr1. Des divergences dans la composition des NurRE naturels déterminent la spécificité à l'un ou l'autre les membres de la famille, comme dans le cas du NurRE du promoteur de la POMC qui est davantage sélectif pour Nur77 (212).

1.2.7.2 Interactions protéine-protéine et régulation de Nur77

Outre l'ADN et les partenaires d'hétérodimérisation, Nur77 interagit avec un nombre sans cesse grandissant de protéines. La figure 11 énumère ces différents facteurs, juxtaposés au domaine de Nur77 auquel ils sont associés. Tel que décrit précédemment, le domaine N-terminal est essentiel à la transactivation par le biais du recrutement de co-activateurs. La région comprise entre les acides aminés 1 et 160 constitue un domaine AF-1 singulièrement actif pour un récepteur nucléaire. Cette région est capable de s'associer avec les co-activateurs PCAF, SRC-1, SRC-2, DRIP205 et p300/CBP (213). Elle peut également se lier au LBD de RXR γ de même que participer à une interaction intra/inter-moléculaire avec celui de Nur77 (213).

PML (pour *Promyelocytic Leukemia*) est un suppresseur de tumeur localisé dans des corps nucléaires du même nom. Cette protéine remplit des rôles multiples dans la régulation de l'apoptose, le contrôle de l'expression des gènes et la réponse antivirale (214). On a récemment déterminé que PML pourrait inhiber l'activité transcriptionnelle de Nur77 lorsque surexprimé dans des cellules. Cette surexpression induit une relocalisation de Nur77 dans les corps nucléaire. PML interagit *in vitro* et *in vivo* directement avec le DBD de Nur77, et inhibe sa liaison à l'ADN (215).

Notch-1 est une autre protéine qui se lie à Nur77 et inhibe son activité. Notch-1 est un récepteur membranaire impliqué dans la différenciation cellulaire lors du développement embryonnaire. La portion intracellulaire de cette protéine est clivée lorsque le récepteur est engagé et se transloque au noyau, où elle peut interagir avec le domaine de liaison à l'ADN de

Nur77 (216). De ce fait, Notch-1 est capable d'inhiber l'apoptose des cellules T suite à un engagement du RcT. La protéine virale EBNA2 reproduit l'effet de Notch-1 et peut elle aussi interagir avec Nur77 et inhiber son activité apoptotique (217).

Nur77 interagit avec un autre récepteur nucléaire orphelin, COUP-TF, via son DBD. Cette interaction ne semble pas entraîner une activation transcriptionnelle, mais a plutôt pour conséquence de séquestrer COUP-TF des éléments de réponse à l'acide rétinoïque sur l'ADN. COUP-TF peut en effet faciliter l'association de RAR à ses éléments respectifs et donc favoriser la réponse cellulaire à l'acide rétinoïque. Une expression anormalement élevée de Nur77 est ainsi associée à une résistance à l'acide rétinoïque chez certaines tumeurs (218).

Un nombre croissant d'observations indique que la partie C-terminale de Nur77 est également impliquée dans diverses interactions avec d'autres protéines. Dans un autre cas de réponse croisée entre récepteurs nucléaires, il a été démontré que RAR α pouvait se lier à la partie C-terminale de Nur77 à la manière de RXR et inhiber son activité transcriptionnelle. De même, l'ajout d'acide rétinoïque à des cellules T humaines inhibe l'activité de Nur77 et l'apoptose induite par l'activation (219, 220).

Le récepteur orphelin atypique DAX-1 interagit lui aussi avec le domaine C-terminal de Nur77 par l'intermédiaire de son propre LBD. DAX-1 inhibe l'activité d'un ensemble de récepteurs nucléaires (ER, PR, SF-1, AR) à travers des interactions protéine-protéine qui mettent en jeu le recrutement de co-répresseurs. L'interaction de DAX-1 avec Nur77 empêche également le recrutement du co-activateur SRC-1. Celle-ci se solde par une inhibition de l'activation de gènes dépendants de Nur77, notamment ceux impliqués dans la stéroïdogénèse chez les cellules testiculaires de Leydig (221).

Les cytokines pro-inflammatoires affectent elles aussi l'expression d'enzymes impliquées dans la synthèse des stéroïdes. On a récemment montré que le TNF inhibait l'action de Nur77 au niveau des promoteurs d'enzymes stéroïdogènes. Ce phénomène était accompagné de la régulation à la hausse de la sous-unité p65/RelA de NF- κ B et de son interaction avec le domaine C-terminal de Nur77. Cette interaction n'affectait pas la liaison de Nur77 à l'ADN. Cependant, NF- κ B était capable d'inhiber la transactivation de Nur77 en empêchant la liaison de SRC-1 avec

le domaine N-terminal du récepteur orphelin. NF- κ B accomplissait ceci soit en interférant avec la fonction accessoire du domaine C-terminal ou en compétitionnant pour le co-activateur. Une observation intéressante qui a découlé de cette étude était que Nur77 possédait la capacité de recruter NF- κ B au promoteur, ce qui entraînait la dissociation de SRC-1 (222).

Des chercheurs ont démontré que Nur77 avait la faculté d'induire l'apoptose en se localisant aux mitochondries et en provoquant la libération du cytochrome c (97). La même équipe a découvert tout récemment que Nur77 a la capacité de se lier à Bcl-2 lors d'un tel événement et d'induire un changement de conformation chez ce dernier qui expose son domaine BH3 et le rend apte à induire l'apoptose. L'interaction met en jeu la boucle N-terminale de Bcl-2 et le domaine C-terminal de Nur77 (98).

1.2.8 Régulation transcriptionnelle de Nur77

1.2.8.1 Expression tissulaire

L'expression de l'ARN messager de Nur77 est normalement proportionnelle à la synthèse de sa protéine, ce qui en fait un point de régulation important (223). Les taux d'ARNm des différents membres de la famille Nur77/NGFI-B varient selon le tissu et le stade développemental. L'expression de chacun des membres est à la fois unique et chevauchant. L'ARNm de Nur77 est faiblement exprimé dans le fœtus et le nouveau-né, mais est abondant dans la plupart des tissus chez l'adulte. On le retrouve principalement au niveau de la glande pituitaire, des muscles, dans le thymus, la glande surrénale et la prostate. Le récepteur orphelin est également exprimé abondamment dans plusieurs tumeurs (218, 224, 225). L'ARNm de Nurrl est fortement exprimé chez le jeune fœtus. Chez l'adulte, on note une basse expression dans la plupart des tissus et une plus forte expression dans le cerveau et la glande pituitaire. Le message de NOR-1 atteint un pic au jour 18 du développement du fœtus murin. On le retrouve également chez l'adulte dans les organes périphériques comme le thymus et la glande surrénale, bien qu'il soit proportionnellement moins abondant que Nur77 (200).

1.2.8.2 Induction de la transcription du gène de Nur77

Comme il fut mentionné précédemment, *Nur77* est un gène de catégorie immédiate-précoce. Son expression est induite rapidement et de façon transitoire par une variété de stimuli

dans divers types cellulaires. Cette induction est indépendante de la néosynthèse de protéines (196). Nur77 fait donc partie de la première ligne de réponse génique à des signaux externes.

La littérature mentionne que l'ARN messager de Nur77 est rapidement régulé à la hausse par un nombre sans cesse croissant de stimuli externes. Une liste non exhaustive compterait jusqu'à maintenant: le NGF (196), des facteurs de croissance que l'on retrouve dans le sérum, tel que le EGF et le FGF (197), les androgènes (208), les esters de phorbol comme le PMA/TPA (226), la forskoline (227), l'étoposide (225), des rétinoïdes synthétiques comme le AHPN et le CD437 (97), les acides gras (228), l'influx de calcium par des ionophores ou la thapsigargine (229, 230), la dépolarisation membranaire (231), le CRH (*corticotropin-releasing hormone*) et l'ACTH (*adrenocorticotrophic hormone*) dans les cellules surrénale (211, 232), le LH chez les cellules testiculaires de Leydig (233), le TNF (234), l'oncogène Tax (235), l'ischémie-hypoxie du cerveau ou une crise convulsive chez le rat (236), le stress émotionnel (237), l'agitation mécanique des cellules en suspension (238), l'activation des macrophages par le récepteur TLR4 (239) et l'activation des récepteurs d'antigènes des cellules T (RcT) et des cellules B (RcB) (240, 241).

Pour la plupart de ces traitements, les étapes précises menant à l'induction de Nur77 dans le noyau sont encore inconnues. Les hormones peptidiques comme les facteurs de croissance, le NGF et le CRH, de même que l'oncogène Tax de HTLV-1, empruntent la voie de l'AMPc et de la PKA qui mène en bout de ligne à la transactivation du promoteur de Nur77 à travers des éléments de réponse CREB (242, 243). Le promoteur contient également des éléments de réponse à AP-1 qui permettent une transcription plus tardive et prolongée de Nur77 (243, 244). Cependant, parmi tous ces stimuli, c'est la voie du calcium participant à la transduction des signaux à partir des récepteurs d'antigènes qui est la mieux décrite. La figure 13 illustre les différentes étapes menant à l'activation du gène de Nur77 chez la cellule T. Dans ces cellules, la transcription de Nur77 peut être inhibée par la cyclosporine A, un inhibiteur pharmacologique de la voie du calcium. L'activation du RcT provoque la libération de calcium dans le cytoplasme. Celui-ci active la calcineurine qui déphosphoryle le facteur la transcription NFAT, menant à sa translocation dans le noyau. Par la calmoduline, le calcium active également le facteur de transcription MEF2 en le débarrassant de ses inhibiteurs, MITR, Cabin1 et HDAC4/5. Le RcT active également la cascade

MEKK2/MEK5 qui provoque la phosphorylation de la kinase ERK5. NFAT, ERK5 et MEF2 forment un complexe sur le promoteur de Nur77 qui active la transcription du gène (245).

1.2.8.3 Phosphorylation de Nur77

En plus des interactions protéine-protéine et de la transcription, Nur77 est également régulé au niveau post-transcriptionnel par phosphorylation. Nur77 est une protéine fortement phosphorylée à plusieurs sites, comme en fait foi l'hétérogénéité de sa masse moléculaire sur gel (70-90 kDa), qui est éliminée par des phosphatases (202). Plusieurs stimuli induisent la phosphorylation de Nur77. Hazel *et al.* ont démontré que chez les cellules de rat PC12, le récepteur orphelin était modifié différemment par les facteurs de croissance (EGF et NGF) par rapport à la dépolarisation membranaire par le KCl. La migration électrophorétique de même que la cartographie des phosphopeptides ont révélé des patrons de phosphorylation distincts (202). Des expériences subséquentes ont montré que le traitement de ces mêmes cellules avec du NGF induisait la phosphorylation de Nur77 à la sérine 350 (352 chez l'humain), dans le DBD, ce qui inhibait sa liaison à l'ADN et son activité transcriptionnelle (246). La même équipe a plus tard démontré que la phosphorylation de la sérine 105 (140 chez l'humain) était essentielle à la localisation cytoplasmique de Nur77 suite au traitement par le NGF (206). À ce jour, aucune kinase responsable de ces phosphorylations n'a été formellement identifiée, bien qu'on soupçonne la voie pp90^{rk} pour la Ser³⁵⁰ et la voie Trk/Ras/ERK pour la Ser¹⁰⁵. La kinase ERK2 peut phosphoryler Nur77 à la thréonine 142 dans des expériences *in vitro* (247), alors que pp90^{rk} phosphoryle la Ser³⁵⁰ de Nur77 *in vitro* et *in vivo* (248) Un traitement de cellules adénocorticales avec du ACTH induit la synthèse d'une forme Nur77 fortement active qui n'est pas phosphorylée à la sérine 350, alors que la petite quantité de protéine présente constitutivement dans ces cellules est phosphorylée à ce site (249).

Chez des cellules T, il a été démontré que le PMA et l'ionomycine de même que l'activation du RcT induisaient la synthèse d'une forme hyperphosphorylée de Nur77. Toutefois, une telle phosphorylation n'a pas affecté l'activité transcriptionnelle de Nur77 dans des cellules 293 surexprimant celui-ci (223). En 2001, des chercheurs ont étudié la relation entre Nur77 et la kinase anti-apoptotique Akt/PKB. Ils ont démontré que cette kinase avait la capacité d'interagir avec Nur77 et de phosphoryler la Ser³⁵⁰, ce qui entraînait une inhibition de son activité

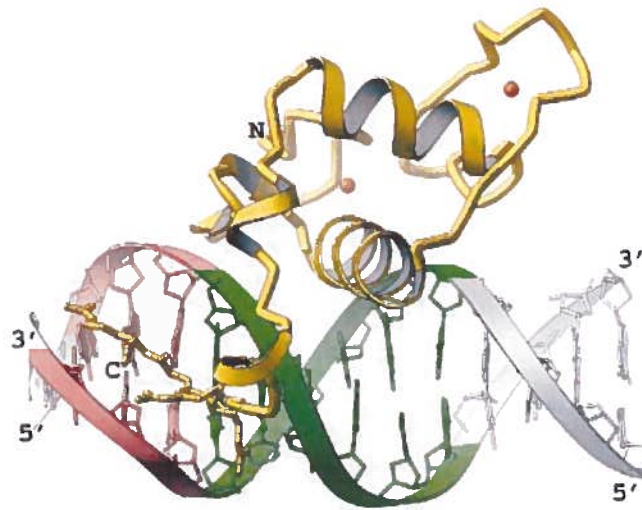
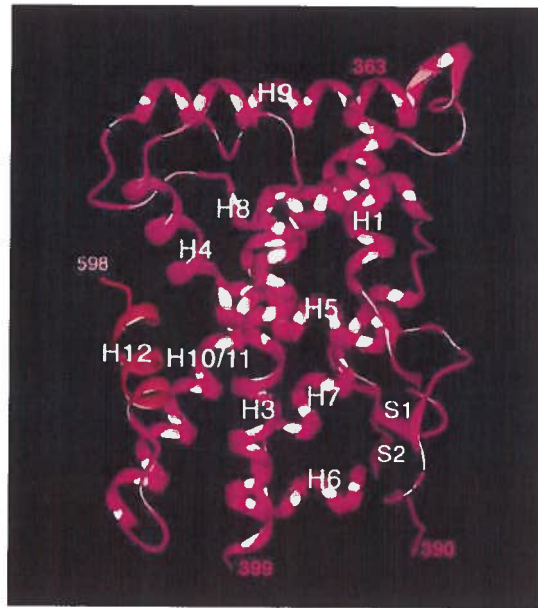
A**B**

Figure 12: Structure de Nur77 **A** Liaison de Nur77 à l'ADN. La structure cristalline du DBD de Nur77 est illustrée, en association avec un élément NBRE sur l'ADN. Les deux doigts de zinc forment des hélices perpendiculaires s'associant avec le motif principal, alors que la queue du CTE interagit spécifiquement avec les adénines en amont du motif (Tiré de (286)). **B** Structure du LBD de Nur77. Ce domaine est fortement apparenté à celui de Nur77. On y dénombre 12 hélices alpha (H1-H12) et un feuillet bêta formé de deux brins (S1-S2). Sa structure générale s'apparente aux formes holo (avec ligand) des récepteurs rétinoïdes/stéroïdes (207).

transcriptionnelle (250). Akt a ainsi la capacité de protéger les cellules T contre la mort cellulaire induite par l'activation, qui est dépendante de Nur77 (251). Finalement, des études sur le rôle de Nur77 dans la prolifération des cellules du cancer du poumon ont montré que la MAPK JNK, activée par la voie MEKK1, phosphorylait Nur77 dans son domaine N-terminal et inhibait son activité transcriptionnelle de même que sa liaison à l'ADN (252). Le résidu modifié par JNK n'a toutefois pas été identifié.

1.2.8.4 Localisation cellulaire de Nur77

Le dernier niveau de régulation de Nur77 passe par sa localisation dans la cellule. Les chercheurs ont eu tôt fait de constater qu'une fraction du récepteur nucléaire Nur77 se retrouvait également dans le cytoplasme. La localisation cytoplasmique était favorisée par des traitements qui est induisaient sa phosphorylation (202, 229). En fait, la forme hyperphosphorylée de Nur77 était présente autant dans le noyau que dans le cytosol et avait une demie-vie plus courte, entre 30-40 minutes (202, 229). Katagiri *et al.* ont par la suite démontré que la translocation cytoplasmique de Nur77 par le NGF passait par la phosphorylation de la Ser¹⁰⁵. Ils ont également révélé la présence de trois NES (*nuclear export signal*) dans le domaine C-terminal qui sont essentiels à la localisation cytoplasmique. La leptomycine B, un inhibiteur de l'exportation active de protéines nucléaires, a bloqué l'exportation de Nur77 par le NGF. De plus, ces chercheurs ont démontré que RXR accompagnait son partenaire Nur77 dans le cytoplasme suite à ce même stimulus. Cette relocalisation de RXR s'accompagnait d'une inhibition de sa fonction transcriptionnelle (206).

La même année, l'équipe du Dr Xiao-kun Zhang a fait la description d'un nouveau comportement de Nur77. Dans des cellules du cancer de la prostate LNCaP, une construction chimérique GFP-Nur77 se localisait aux mitochondries suite à divers traitements apoptotiques: le TPA, un ionophore de calcium, des rétinoïdes synthétiques analogues à l'AHPN, et l'étoposide. Ce phénomène se produisait rapidement – à l'intérieur de 60 minutes – et était indépendant de l'activité transcriptionnelle de Nur77 (voir figure 14). Un mutant dépourvu du DBD (Nur77/ Δ DBD) se localisait spontanément aux mitochondries et pouvait induire l'apoptose. L'exportation nucléaire de Nur77 était dépendante de ses domaines N-terminal et C-terminal et pouvait aussi être bloquée par la leptomycine B. Des expériences *in vitro* ont par la suite montré

que du Nur77 recombinant pouvait à lui seul provoquer la libération de cytochrome c de mitochondries isolées (97). La même équipe ainsi que d'autres équipes de chercheurs ont par la suite observé ce phénomène dans d'autres contextes. Le virus de Sindbis entraîne la mort cellulaire par le ciblage mitochondrial de Nur77, qui peut être inhibé par EBNA2 (217). Dans des cellules du cancer de l'estomac, Nur77 est relocalisé à la mitochondrie suite au traitement par le VP-16, le TPA et par des dérivés de l'acide chénodéoxycholique (253, 254). En revanche, dans des cellules de cancer du colon, Nur77 s'est localisé dans des structures cytoplasmiques qui ne correspondaient pas aux mitochondries en réponse au TPA, au butyrate et au 5-fluoruracile. Cette translocation était suivie du recrutement de Bax à la mitochondrie (255).

Finalement, on a montré que Nur77 se localisait à des corps nucléaires PML lorsque ce dernier était surexprimé. L'interaction de Nur77 avec PML inhibe sa transactivation. Ces deux molécules ont agi en synergie dans les cellules LNCaP pour induire l'apoptose en réponse au TPA (215). Toutefois, personne n'a jamais observé de Nur77 localisé dans des corps PML dans les conditions d'expression endogène, ce qui met en doute l'importance de ce compartiment nucléaire dans le rôle biologique de Nur77.

1.2.9 Rôles biologiques de Nur77

Le récepteur nucléaire NGFI-B/Nur77 remplit des fonctions biologiques multiples et parfois contradictoires. Son véritable rôle dans l'organisme est encore nébuleux, puisque des souris déficientes en Nur77 ne présentent pas de phénotype évident (256). Ceci pourrait être le reflet de la redondance fonctionnelle des membres de la famille NGFI-B/Nur77. Des souris knock-out pour *Nurr1* ont un défaut dans le développement de neurones dopaminergiques (257). Des mutations dans le gène *Nurr1* sont de plus associées avec la forme familiale de la maladie de Parkinson, qui est justement caractérisée par un manque de dopamine (258). Le cas de NOR-1 est plus problématique. Certains ont démontré que des souris dépourvues de NOR-1 ne présentaient qu'un phénotype bénin avec un défaut dans la formation de l'oreille interne (259). Plus récemment, une autre équipe a signalé une létalité embryonnaire chez les souris NOR-1^{-/-}, due à un défaut dans l'embryogénèse (260).

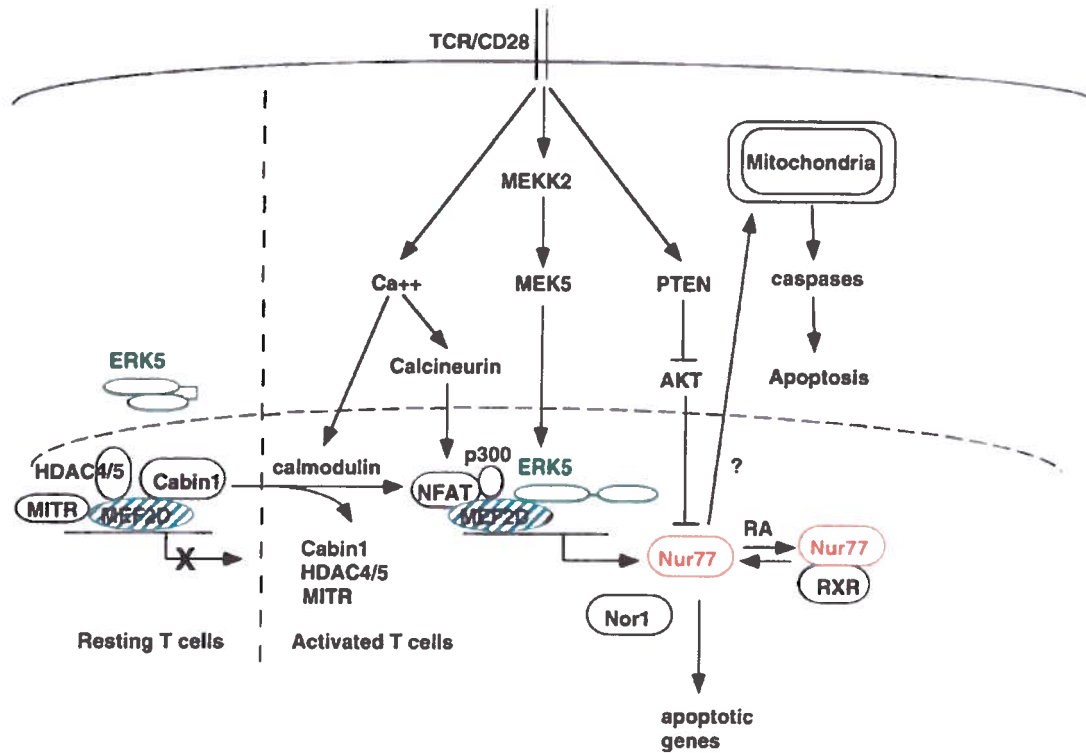


Figure 13: Signalisation menant à l'activation de Nur77 chez les cellules T (voir texte). Tiré de (245).

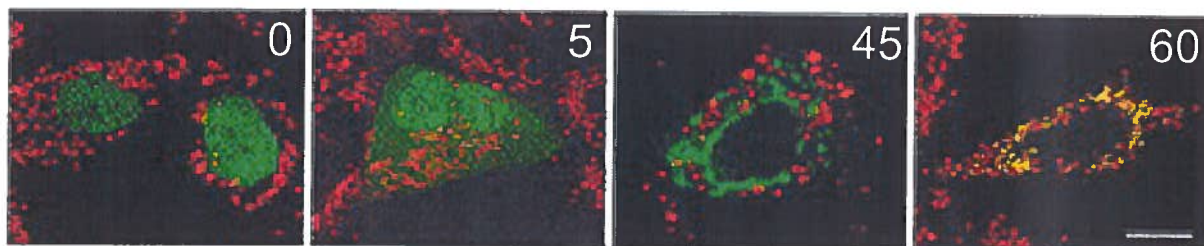


Figure 14: Exportation nucléaire et association mitochondriale de Nur77. Une fusion GFP-Nur77 fut transfectée dans des cellules LNCaP (cancer de la prostate). Suite à un traitement au TPA (100 ng/mL), Nur77 (vert) est graduellement exporté du noyau et se localise aux mitochondries. Celles-ci sont révélées par immunofluorescence dirigée contre Hsp60 et sont colorées en rouge. L'image montre la progression de 0 à 60 minutes. Tiré de (97).

1.2.9.1 Fonctions pro-apoptotiques dépendantes de la transcription

Les premiers indices suggérant une fonction de Nur77 dans la régulation de l'apoptose furent issus d'études sur le développement des thymocytes en cellules T matures. Dans le thymus, des thymocytes immatures exprimant des récepteurs à antigène de cellules T (RcT) qui reconnaissent le soi sont éliminés du répertoire. Ce processus de sélection négative passe par des signaux apoptotiques véhiculés à travers des RcT ayant une trop forte affinité pour le complexe peptide/CMH. En 1994, deux équipes ont simultanément démontré que Nur77 était essentiel à l'apoptose d'hybridomes de cellules T activés par le RcT (241, 261). L'utilisation d'une forme dominante-négative ou d'un message antisens de Nur77 sous le contrôle du promoteur proximal de *lck* (spécifique aux cellules T) a permis de démontrer que la sélection négative des thymocytes était déficiente chez les souris transgéniques exprimant ces constructions (262, 263). À l'inverse, la surexpression du gène de Nur77 chez les thymocytes mène à une apoptose massive et à une diminution du nombre de lymphocytes T périphériques (262, 263). Des résultats analogues ont été obtenus avec des souris transgéniques *lck/NOR-1*, mais non avec *Nurr1* (264). La redondance fonctionnelle entre Nur77 et NOR-1 expliquerait l'absence de phénotype chez les souris Nur77 knock-out, par opposition aux souris exprimant le dominant-négatif.

Les chercheurs ont ensuite entrepris d'identifier la voie apoptotique activée par Nur77 chez les thymocytes. Une première équipe a démontré que des thymocytes de souris surexprimant *lck/Nur77* exprimaient également des taux élevés de FasL (265). Des souris issues d'un croisement de la lignée *Nur77* avec la lignée *gld*, qui exprime un FasL non fonctionnel, avaient un nombre normal de thymocytes (265). Par contre, une autre équipe menée par le Dr Astar Winoto a démontré que tout le contraire. Ils n'ont pas détecté d'augmentation significative de l'expression de FasL chez leurs thymocytes surexprimant Nur77 ou NOR-1. De plus, l'expression de Nur77 chez des souris *gld/gld* a empêché l'apparition d'une population anormale de cellules T périphériques auto-immunes, caractéristique de la mutation *gld* (264). L'initiation d'une apoptose indépendante de Fas/FasL par Nur77 expliquerait ce phénotype. L'expression de Nur77 chez ces souris n'a toutefois pas empêché le syndrome lymphoprolifératif de cellules B, ce qui indique que le rôle de Nur77 serait restreint au thymus (266). Bien que la sélection négative des thymocytes immatures requiert Nur77 et non FasL, il n'est pas impossible que Nur77 agisse au niveau de la mort cellulaire induite par l'activation chez les cellules T périphériques (AICD) par le biais de

FasL, comme en font foi certains travaux (267, 268). Dans les thymocytes, l'activité transcriptionnelle de Nur77, qui pouvait être manipulée par certaines mutations ou délétions dans la protéine, corrélait toujours avec le degré d'apoptose (269).

À l'aide de la technologie des puces à ADN, l'équipe du Dr Winoto a récemment publié une liste de gènes exprimés à de plus forts niveaux chez des thymocytes surexprimant Nur77. Parmi ceux-ci, on retrouve FasL, TRAIL. Toutefois, deux nouveaux gènes fortement induits par Nur77 (NDG1 et NGD2) ont attiré leur attention. Ces deux gènes sont induits par l'activation du RcT, à la suite de l'expression de Nur77. Des souris transgéniques *NDG1* présentaient des phénotypes semblables aux souris *Nur77*. L'apoptose par NDG1 n'a pu être complètement empêchée par Bcl-2 ou FADD-DN, mais pouvait être inhibé par CrmA, un inhibiteur viral de la caspase-8 (270).

Au même moment, une autre équipe a démontré que Nur77 augmentait l'expression du facteur de transcription pro-apoptotique E2F-1 dans les cellules du cancer de la prostate LNCaP. Ils ont de plus révélé la liaison spécifique de Nur77 au promoteur de ce gène. Ceci est un fait unique puisque Nur77 n'avait jamais été décelé auparavant au niveau du promoteur de gènes pro-apoptotique comme FasL. L'association était spécifique à E2F-1 et n'était pas retrouvée chez les autres membres de la famille E2F. L'expression de E2F-1 et de Nur77 chez les LNCaP était essentielle à l'apoptose en réponse au TPA (271). Un examen des données de puces à ADN de l'équipe de Winoto révèle également une augmentation de l'expression de E2F-1 chez les thymocytes Nur77. Fait intéressant, l'expression de E2F-1 est essentielle à la sélection négative des thymocytes (272).

1.2.9.2 Fonctions pro-apoptotiques indépendantes de la transcription

Un rôle pro-apoptotique de Nur77 indépendant de sa transactivation mais dépendante de sa localisation intracellulaire a été abordé dans la section précédente. L'équipe du Dr Xiao-kun Zhang a montré à plusieurs reprises que Nur77 était activé suite à des stimuli pro-apoptotiques dans des lignées cancéreuses, bien que son activité transcriptionnelle n'était pas affectée (273). L'expression d'un message Nur77 antisens chez des cellules LNCaP a protégé celles-ci contre l'apoptose induite par des rétinoïde synthétiques, le TPA, le A23187 (un ionophore de calcium) et l'étoposide, mais non le TNF. Contrairement au EGF, ces stimuli n'activaient pas la fonction

transcriptionnelle de Nur77. L'apoptose était plutôt associée à une translocation de Nur77 vers la mitochondrie, ce qui provoquait la libération de cytochrome c (voir figure 14). L'activité pro-apoptotique de Nur77 pouvait être bloquée par la surexpression de Bcl-2 (97). Des résultats similaires ont été obtenus chez des cellules Jurkat, ZR-75-1, MDA-MB23, et des lignées du cancer de l'estomac (97, 253, 254). L'expression de Nur77 et sa localisation mitochondriale sont également essentielles à l'apoptose par le virus de Sindbis chez les cellules NIH 3T3 (217).

L'équipe du Dr Zhang a renchéri en 2004 avec la démonstration que Nur77 interagissait avec Bcl-2 au niveau de la mitochondrie et le convertissait en protéine tueuse. Dans leurs expériences, Nur77 provoquait un changement de conformation chez Bcl-2 qui exposait son domaine BH3 et leur rendait apte à induire l'apoptose mitochondriale. Le silençage ou des mutations inactivant Bcl-2 ont empêché l'apoptose par Nur77. Ces chercheurs ont également montré une localisation mitochondriale de Nur77 dans des lymphocytes primaires stimulés au TPA/ionomycine, induisant une apoptose qui pouvait être empêchée par des mutants de Bcl-2 (98). Ceci expliquerait pourquoi l'apoptose des lymphocytes T par Nur77 ne peut être bloquée par une surexpression de Bcl-2. Toutefois, ces résultats sont en contradiction avec ceux du premier article où l'on démontrait que la libération de cytochrome c induite par Nur77 était bloquée par Bcl-2. De plus, d'autres équipes n'ont pu détecter de Nur77 au niveau des mitochondries chez des hybridomes de cellules T et chez des fibroblastes (251, 270).

Récemment, on a fait état d'une fonction de Nur77 dans l'induction d'une mort cellulaire indépendante des caspases. Des macrophages issus de souris Nur77^{-/-} se sont avérés partiellement résistants à un traitement combiné de zVAD (un inhibiteur pan-caspases) et de LPS, qui provoque normalement la mort de ces cellules. Dans ce cas, Nur77 était modulé à la hausse via l'activation du récepteur TLR4 et du facteur de transcription MEF2 (239). Une autre voie de mort indépendante des caspases, celles de la Substance P/NK₁R (récepteur de la neurokinine) implique également l'activation de Nur77, cette fois par l'intermédiaire de la kinase ERK2 (274). L'importance de l'activité transcriptionnelle de Nur77 dans ces deux situations est inconnue pour le moment, mais sa localisation mitochondriale ne semble pas être impliquée puisqu'un mutant Nur77/ Δ DBD protégeait les cellules contre la mort par NK₁R aussi bien qu'un mutant dominant-négatif dépourvu du domaine N-terminal.

1.2.9.3 Fonctions anti-apoptotiques de Nur77

Nur77 peut être activé autant par des signaux de croissance que de mort. Il est bien connu que des facteurs mitogènes comme le EGF et le FGF induisent une expression rapide de Nur77 (244). Ces facteurs sont associés avec la survie cellulaire et l'inhibition de l'apoptose. Par exemple, la voie du récepteur du EGF est souvent suractivée chez des cellules cancéreuses et mène à l'activation de Akt et de NF- κ B, ce qui favorise la prolifération cellulaire et bloque l'apoptose. Malgré cela, Nur77 est beaucoup mieux connu pour son rôle dans l'activation de l'apoptose.

Il semble toutefois exister plusieurs liens entre l'expression de Nur77 et la survie cellulaire, voire l'oncogénèse. Une activité anormalement élevée de Nur77 a été observée dans diverses lignées cancéreuses. Ainsi, de forts niveaux de Nur77 ont été détectés dans des lignées de cancer du poumon (224), de la prostate (225) et du sein (218). L'expression de Nur77 est plus élevée dans des tissus cancéreux de la prostate que dans les tissus hypertrophiques bénins adjacents (225). Des cellules B leucémiques résistantes à la radiothérapie expriment de plus forts niveaux de Nur77 comparativement aux cellules sensibles (275). NOR-1 est également surexprimé dans des lymphomes diffus de cellules B (276). L'expression élevée de NOR-1 et de Nur77 est associée à des variantes métastatiques de lignées de carcinomes pulmonaires à grandes cellules (277). L'oncogène Tax de HTLV-1 active non seulement la voie NF- κ B mais stimule également l'expression de Nur77 (235). Dans des lignées de cancer du poumon, on a démontré que l'expression de Nur77 favorisait la progression du cycle cellulaire et donc la prolifération. Sa liaison à l'ADN et son activité transcriptionnelle étaient requises pour son effet mitogène. La suppression de Nur77 par interférence de l'ARN a diminué la prolifération des cellules en réponse au EGF ou au sérum (252).

Une translocation chromosomique t(9;22)(q22;q12) est associée avec les chondrosarcomes myxoïdes extrasquelettiques, des tumeurs osseuses malignes. Cet événement entraîne une fusion entre le gène *EWS* (*Ewing Sarcoma*) du chromosome 22 avec *NOR-1* (alias *TEC*) du chromosome 9 (278). Le transcrit chimérique qui en résulte aurait un potentiel oncogène *in vitro*. La protéine de fusion EWS/NOR-1 est fortement exprimée dans la cellule et transactive 270 fois mieux un promoteur NBRE que le récepteur nucléaire natif (279).

Certains travaux ont également montré une inhibition de l'apoptose en tant que telle par Nur77. La surexpression du récepteur orphelin dans une lignée de cellules B protège celles-ci contre l'apoptose induite par la céramide. Dans ce cas, la mort cellulaire était indépendante de l'activation des caspases et de la voie Fas/FasL (280). On a récemment identifié Nur77 comme étant un facteur de survie au TNF chez des fibroblastes embryonnaires murins. Sa surexpression dans des lignées *TRAF2^{-/-}* et *RelA^{-/-}*, ainsi dépourvues de la voie de survie classique NF-κB, réduit leur mortalité en réponse au TNF. Dans ces cellules, Nur77 inhibait l'apoptose au niveau de l'activation de la caspase-8 (234). Un article très récent montre que la diminution de l'expression de Nur77 et de Nurr1 chez des cellules HeLa (cancer du col de l'utérus) diminue leur degré de transformation *in vitro* et augmente leur niveau d'apoptose spontanée (281). Il est par conséquent clair que Nur77 peut participer à la fois à des voies de survie et de mort cellulaire.

1.2.9.4 Rôle de Nur77 dans la régulation neuroendocrine

La fonction de Nur77 en tant que facteur de transcription a principalement été étudiée non pas dans un contexte d'apoptose mais plutôt dans celui de la régulation de gènes participant à la synthèse d'hormones endocrines. Les gènes Nur77 et Nurr1 sont fortement exprimés dans l'hypothalamus et la glande pituitaire et surrénale (282). Ces organes contrôlent l'axe endocrinien hypothalamo-pituitaire-surrénale de réponse aux stress dans l'organisme. Des stress physiques et émotionnels augmentent davantage l'expression des gènes de la famille NGFI-B (232, 236, 237). Dans le cortex surrénal, le gène de Nur77 est induit par les hormones pituitaires ACTH et CRH, ce qui mène à la synthèse d'une protéine hypophosphorylée en position 354 apte à se lier à l'ADN (211, 232). Nur77 active la transcription du gène codant la stéroïde 21-hydroxylase (CYP21) qui est l'enzyme limitante dans la synthèse des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes (283). Nur77 et Nurr1 se lient également aux promoteurs du CRF (*corticotropin releasing factor*) et de la POMC (pro-opiomélanocortine), un précurseur de plusieurs hormones peptidiques (211, 284). Le rôle de ces récepteurs nucléaires semble redondant, puisque des souris Nur77^{-/-} ne présentent pas de défaut dans la stéroïdogénèse. L'expression de Nurr1 est toutefois augmentée chez ces animaux, ce qui suggère l'existence d'un mécanisme de compensation (256).

Des résultats récents suggèrent que Nur77 jouerait un rôle dans une autre voie endocrinienne, celle du système reproducteur. L'expression des membres de la famille NGFI-

B/Nur77 est induite en réponse au LH (hormone lutéinisante ou gonadotropine) dans les follicules ovariens de rat et dans des cellules testiculaires de Leydig (233, 285). L'inhibition de Nur77 par son dominant-négatif a diminué la biosynthèse de la progestérone en réponse au LH (233).

1.3 Le noyau: structure et composantes

1.3.1 Survol

On décrit souvent le noyau comme étant un organite au même titre que les mitochondries, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Pourtant, le noyau est un compartiment cellulaire extrêmement complexe qui contient bien plus que de l'ARN, de l'ADN, et des facteurs de transcription. Des études récentes démontrent que la fonction de plusieurs protéines, de gènes et d'autres facteurs peut être modulée par leur localisation intranucléaire. La plupart des processus cellulaires, comme la croissance, la différenciation, la réponse au stress et l'apoptose, passe par l'activation de gènes par le biais de facteurs nucléaires dont la régulation est dynamique. Puisque cette thèse s'intéresse au rôle du récepteur nucléaire Nur77 dans l'apoptose, une brève revue du noyau et de ses compartiments s'impose.

On retrouve au niveau du noyau des compartiments qui ont leur fonction propre. L'enveloppe nucléaire isole le noyau et contient les complexes des pores nucléaires. Ceux-ci contrôlent le trafic des protéines et de l'ARN par la reconnaissance de signaux de localisation ou d'exportation nucléaire. Le nucléoplasme contient des facteurs protéiques et nucléiques solubles ainsi que la chromatine, un complexe d'ADN enroulé et de protéines. Le nucléole est une région dense dépourvue d'ADN où s'effectue la synthèse et l'assemblage des ribosomes. En dehors de ces régions bien connues, il existe toutefois des " corps nucléaires " de différentes catégories aux fonctions bien particulières. Ces structures sont liées à la matrice nucléaire, une charpente protéique apparentée au cytosquelette qui sert à la fois de maintien structurel et de plate-forme pour l'assemblage et la régulation spatiale de complexes protéiques et nucléiques.

1.3.2 Les taches nucléaires et l'épissage

L'épissage des ARN messagers ne s'opère pas aux sites actifs de transcription, mais plutôt dans des régions précises du noyau. Les facteurs d'épissage forment des complexes nommés "épissosomes" qui se retrouvent dans des "taches" nucléaires, au nombre de 25-50 par cellule (286). Au sein de ces structures, on retrouve le facteur d'épissage SC35, qui est souvent utilisé pour l'identification et le suivi des taches nucléaires. Les sites de transcription recrutent les facteurs d'épissage de façon dynamique, notamment par des cycles de phosphorylation. L'actinomycine D,

une inhibiteur de la synthèse d'ARN, provoque l'apparition d'un plus grand nombre de taches de petites tailles, ce qui suggère que l'intégrité de ces sites dépend de la transcription active (286).

1.3.3 Les corps de Cajal

Outre les nucléoles, on peut détecter par microscopie électronique des corps nucléaires denses au nombre de 4-6 par cellules. Ces structures ont été nommées corps de Cajal ou corps enroulés. Elles contiennent des ribonucléoprotéines, de la fibrillarine et la coiline, un marqueur spécifique. Leur rôle n'est encore par bien défini. On estime que les corps de Cajal sont des sites de biosynthèse et de stockage des petites ribonucléoprotéines (snRNP), qui sont des composantes de l'épissosome. Des structures satellites de corps de Cajal, les corps Gemini, servent à modifier les snRNP (286). Ces deux types de structures contiennent la protéine SMN (*survival of motor neurons*), le produit d'un gène déterminant le développement de l'atrophie spino-musculaire, une maladie neuro-dégénérative. Certaines protéines oncogènes peuvent également se localiser aux corps de Cajal, dont les membres de la famille EWS, qui sont impliquées dans le métabolisme de l'ARN. Les corps de Cajal sont des structures très dynamiques, elles interagissent continuellement avec les nucléoles et peuvent assembler des complexes transcriptionnels pour leur utilisation par les ARN polymérase (286).

1.3.4 Les corps PML

Les corps PML (pour *promyelocytic leukemia*) ou POD (pour *PML-oncogenic domains*) sont probablement les structures nucléaires les plus étudiées. Ces domaines ne contiennent pas de chromatine ou d'ARN. Ils sont plutôt formés d'un nombre élevé et variable de protéines dont la plus importante, PML, est essentielle à leur intégrité. On a découvert le gène *PML* dans des cellules de patients souffrant de leucémie promyélocytaire aigüe, fusionné au gène *RAR α* pour former la protéine oncogène PML-RAR. Cette protéine chimérique empêche la formation normale des corps PML, ce qui lui permet d'immortaliser la cellule en empêchant l'apoptose (287). L'acide rétinoïque et l'As₂O₃ induisent la dégradation de PML-RAR et entraînent la rémission de la maladie. PML est donc considéré comme un suppresseur de tumeur. En plus de l'apoptose, les corps nucléaires PML sont impliqués dans une foule d'autres fonctions cellulaires comme la dégradation protéique, la réponse antivirale, la régulation de la transcription la

croissance cellulaire et la réparation de l'ADN. Le modèle actuel propose que les corps PML sont une sorte de dépôt nucléaire dont les composantes seraient dynamiquement recrutées et modifiées pour faire face à divers stimuli.

PML joue un rôle primordial dans la régulation de l'apoptose. Les cellules des souris *pml*^{-/-} sont résistantes à de multiples stimuli comme les radiations ionisantes, l'interféron, le céramide, Fas et TNF (288). Cette protéine semble être essentielle au bon fonctionnement de p53. Les deux protéines interagissent et co-localisent dans les corps nucléaires. PML agit entre autres comme co-activateur de p53, probablement en recrutant des acétyl-transférases telles que CBP et p300. Des modifications post-traductionnelles de p53 seraient également effectuées dans les corps PML (288). PML interagit également avec DAXX. La capacité de DAXX à inhiber la transcription de gènes pro-apoptotiques est réprimée dans les corps PML (287). Ce facteur pourrait également devenir pro-apoptotique lorsque PML est surexprimé (287).

Les stress génotoxiques provoquent le déplacement des corps PML vers les lésions sur l'ADN et induisent également une réorganisation de ceux-ci. Cette mobilisation serait dépendante de la kinase Chk2 (288). Plusieurs facteurs importants dans la stabilité génomique et la réparation de l'ADN se localisent aux corps nucléaires, tel que la protéine BLM, un produit du gène déterminant le Syndrome de Bloom. Les souris *pml*^{-/-} présentent d'ailleurs un plus haut taux d'aberration chromosomiques (288).

1.3.5 Autres corps nucléaires

D'autres structures distinctes existent dans le noyau. Leur présence peut varier selon le type cellulaire et le stimulus. On a détecté des "usines de réparation" localisées sur la matrice nucléaire, dont le rôle est le recrutement d'ADN brisé et de facteurs de réparation de la voie NER (*Nucleotide Excision Repair*) (280). Le NER regroupe près de 30 protéines différentes dans des méga-complexes nucléaires. Il existe également les corps para-nucléolaires de type Sam68/SLM, les clastosomes et les corps Polycomb, dont la fonction est inconnue.

**CHAPITRE 2 : NUR77 FORMS NOVEL NUCLEAR
STRUCTURES FOLLOWING DNA DAMAGE AND
TRANSCRIPTIONAL ARREST**

2.1 Mise en contexte de l'article I

Ce manuscrit présente les travaux sur la localisation cellulaire de Nur77. Au moment du début du projet, Li *et al.* avaient démontré une relocalisation de Nur77 au niveau des mitochondries lors de l'apoptose (97). Le but premier du projet était donc de déterminer si le même phénomène se produisait lorsque des cellules étaient soumises à des stimuli pro-apoptotique de type génotoxique, tels qu'utilisés en chimiothérapie. Le cas échéant, l'identification des sites de phosphorylation ainsi que de partenaires interactions aurait été accomplie. L'utilisation d'une protéine de fusion GFP-Nur77 nous a plutôt permis d'identifier un nouveau phénomène, celui de la formation de corps nucléaires. Nous nous sommes donc penchés sur ces structures afin de connaître le mécanisme de leur formation et leur importance dans la fonction de Nur77 et dans la physiologie de la cellule.

Les objectifs spécifiques de cet article étaient:

- Démonstration du phénomène dans d'autres cellules et avec la protéine native
- Identification des voie de signalisation impliquées dans la formation des corps nucléaire.
- Identification des domaines de Nur77 requis pour cet interaction.
- Description des interactions avec d'autres compartiments nucléaires.

Contributions à l'article: Louis de Léséleuc a effectué toutes les manipulations. La variante GFP5 de la protéine verte fluorescente a été générée par F. Denis. La rédaction de l'article a été accomplie par L. de Léséleuc et revue par F. Denis.

ARTICLE I

NUR77 FORMS NOVEL NUCLEAR STRUCTURES FOLLOWING DNA DAMAGE AND TRANSCRIPTIONAL ARREST

Louis de Léséleuc, François Denis

INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada

Le récepteur nucléaire orphelin Nur77 a été relié à la stimulation de la croissance ainsi qu'à l'apoptose et ses activités et fonctions peuvent être modulées par une redistribution cellulaire. Dans cette étude, nous employons une construction Nur77 fusionné à la GFP afin de suivre sa localisation intracellulaire lors de la réponse à des stress génotoxiques. Certains agents endommageant l'ADN ou inhibant la transcription ont provoqué un changement rapide dans la distribution intranucléaire de Nur77, avec l'apparition de structure nucléaires distinctes de corps nucléaires connus. Ces nouveaux corps nucléaires étaient de nature transitoire et ont significativement inhibé l'activité transcriptionnelle de Nur77. Ceux-ci étaient fortement liés à la matrice nucléaire et leur formation ne dépendait pas de voies d'activation majeures mettant en jeu des sérine/thréonine kinases. Les corps nucléaires Nur77 pourraient jouer un rôle important dans la régulation de l'apoptose en réponse au dommage à l'ADN en séquestrant le facteur de transcription.

Title: Nur77 forms novel nuclear structures upon DNA damage and transcriptional arrest

Running head: Nur77 nuclear trafficking

Authors: Louis de Léséleuc, François Denis

Keywords: DNA damage; transcriptional arrest; nuclear bodies; apoptosis

Institution: INRS-Institut Armand-Frappier,
531 Boulevard des Prairies,
Laval (QC), Canada,
H7V 1B7

Correspondence to: François Denis

E-mail: francois.denis@iaf.inrs.ca

Telephone: (450) 686-5613

Fax: (450) 686-5301

Summary

The orphan nuclear receptor Nur77 has been implicated in both growth promotion and apoptosis, and its function and activity can be modulated by cellular redistribution. GFP-tagged Nur77 was used to evaluate the contribution of Nur77 intracellular redistribution to genotoxic stress response. Specific DNA damaging agents and transcriptional arrest lead to the rapid redistribution of Nur77 into nuclear structures distinct from known nuclear bodies. These nuclear bodies were transient in nature and caused Nur77 transcriptional inhibition. These structures were tightly bound to the nuclear matrix and formed without the apparent involvement of major serine/threonine kinase signaling pathways. Nur77 nuclear bodies might modulate apoptosis in response to DNA damage through sequestration of this transcription factor.

Introduction

Nur77 is an immediate-early gene induced by serum growth factors or nerve growth factor (NGF) that belongs to the retinoid/steroid superfamily of nuclear receptors (1, 2). Nur77 is the first member of the Nerve Growth Factor Inducible-B (NGFI-B) family that includes Nurr1 and NOR-1. NGFI-B family members have a structure composed of a N-terminal transactivation domain, a Zinc-finger DNA binding domain (DBD) and a C-terminal segment containing the ligand-binding domain (LBD) typical of nuclear hormone receptors (3). However, no ligands for these receptors have been identified and the LBD appears non-functional (4). Nur77 levels can be induced by phorbol esters, membrane depolarization, cAMP or calcium ionophores (5, 6) and are sharply up-regulated upon T cell receptor engagement in thymocytes and T cell hybridomas contributing to T cell apoptosis (7, 8). Nur77 transcriptional activity can be modulated by phosphorylation of the N-terminal or DBD domains through the ERK pathway (9-11), while AKT can phosphorylate the DBD, preventing DNA binding and T cell apoptosis (12).

Nur77 activity can also be modulated by intracellular trafficking with NGF leading to Nur77 cytoplasmic translocation and RXR co-export leads to down-regulation of retinoid signaling (6,

13). Nur77 nuclear export upon pro-apoptotic agent exposure can result in mitochondrial association and cytochrome c release triggers apoptosis in a transcription-independent manner (14). Sub-nuclear localization represents a means of regulating the function and activity of transcriptional regulators, as exemplified by PML nuclear bodies (PML-NB). These nuclear structures act as a macromolecular scaffold that recruit or sequester a variety of proteins that play roles in apoptosis and other cellular processes (15). In promyelocytic leukemia, the chromosomal translocation of PML to the retinoic acid receptor alpha (RAR α) gene forms the PML-RAR oncogenic fusion product which prevents PML function by disrupting PML-NB architecture (16). PML-NB interact with transcriptional regulators such as p53, DAXX, CBP, pRb and the RAR and RXR nuclear receptors (16) and can also interact with DNA repair factors such as BLM, TopBP1 and the Mre11 complex in a stimulus-dependent manner (17, 18). Nur77 has been shown to interact with PML, leading to Nur77 transcription inhibition (19).

To evaluate the contribution of Nur77 localization in chemotherapeutic agent response, a GFP-tagged form of Nur77 was used. In cells undergoing transcriptional arrest, Nur77 rapidly formed nuclear bodies distinct from other known nuclear sub-structures. These structures formed transiently and were associated with Nur77 transcriptional inhibition. The possible role of these nuclear bodies in sensing transcriptional stress or modulating apoptosis is discussed.

Results and Discussion

Nur77 forms nuclear dots following genotoxic stress

Since the intracellular localization of Nur77 contributes to its activity, the effect of chemotherapeutic agents on Nur77 relocalization was evaluated using GFP-tagged Nur77. Transiently transfected HeLa cells were exposed to various genotoxic agents and imaged by confocal microscopy. Nur77 remained nuclear under all conditions and only treatment with 250 nM phorbol myristate acetate (PMA) caused cytoplasmic export (data not shown) as reported by others (6, 13). Nur77 formed bright nuclear dots in response to camptothecin, cisplatin or doxorubicin exposure (Figure 1), which appeared as early as 30 minutes post-treatment with

numbers peaking at around 4 hours. These nuclear bodies were variable in size and number, and reached larger sizes at increasing genotoxin doses. However, no dots formed upon etoposide or ionizing radiation exposure (Figure 2). UV-C radiation leads to the formation of cyclobutane pyrimidine dimers (20), camptothecin blocks topoisomerase I in an open conformation on DNA (21), cisplatin creates DNA adducts (22) and hydrogen peroxide generates oxidized bases such as 8-oxoguanine (23), lesions that impede RNA polymerase progress. In contrast, γ -irradiation and the topoisomerase II poison etoposide induce double-stranded DNA breaks at low frequency and have little impact on general transcription (24, 25). Since agents that strongly block transcription lead to Nur77 nuclear body formation, the effect of RNA synthesis inhibition was evaluated. DRB, actinomycin D and α -amanitin all mimicked the effect of UV-C light, hydrogen peroxide, cisplatin or camptothecin, causing the appearance of Nur77 nuclear dots (Figure 2). Hence, RNA polymerase obstruction rather than DNA damage appears to be involved in Nur77 dot formation.

Nur77 forms nuclear dots in different cell types

To rule out the possibility that structures arise because of the GFP, wild-type Nur77 was over-expressed in HeLa cells. Exposure to camptothecin lead to the formation of nuclear bodies in cells expressing wild-type Nur77 (Figure 3A) and all dots formed by the GFP-Nur77 fusion protein were detected with the Nur77 antibody (Figure 3A). Interestingly, only the polyclonal antibody directed against the C-terminus detected nuclear bodies, while the polyclonal antibody directed against the N-terminus could not, while still being able to recognize the diffuse nuclear form of Nur77 (data not shown), arguing that the N-terminal epitope is masked within bodies. Since Nur77 nuclear dot formation might be a peculiarity of HeLa cells, different cell lines were exposed to camptothecin. Nur77 dots were observed in LNCaP prostate carcinoma cells, H4 glioma cells and H1299 small cell lung carcinoma cells (Figure 3B), as well as in HEK293 embryonic kidney cells and MCF-7 breast carcinoma cells (data not shown). However, the number of cells displaying nuclear bodies was 5 to 10-fold lower in H4, MCF-7 and LNCaP cells

compared to HeLa, HEK293 and H1299 cells. The former group of cells express a functional p53, whereas the others are p53 deficient, and p53 is known to be important for transcription recovery after DNA damage (26, 27). It is possible that enhanced Nur77 nuclear dot formation in p53 deficient cells is associated to prolonged transcription inhibition, with DNA repair and transcription resumption being more rapid in cells having a functional p53.

Nur77 phosphorylation is not involved in nuclear body formation

Nur77 transcriptional activity can be modulated by post-translational modifications such as phosphorylation by AKT (12), ERK2 (28) and JNK (29), while its intracellular localization can be altered by PKC activators (10). To evaluate if post-translational modifications contribute to nuclear body formation, different pharmacological inhibitors were used at concentrations two-fold above their IC⁵⁰. The inhibitors were AKT inhibitor (AKT; 20 μ M), U0126 (ERK1/2; 10 μ M), SP600125 (JNK; 20 μ M), SB203580 (p38MAPK; 10 μ M), LY294008 (PI3K; 50 μ M), cyclosporin A (calcineurin; 1 μ M), rottlerin (PKC δ ; 5 μ M), Gö6976 (PKC α ; 0.5 μ M), caffeine (ATM/ATR; 5 mM) and okadaic acid (PP2A phosphatases; 50 nM). HeLa cells transfected with GFP-Nur77 were pre-treated 2 hours with the inhibitors and exposed 4 hours to 10 μ M camptothecin. None of the inhibitors affected Nur77 nuclear body formation (data not shown), indicating that phosphorylation does not play a role in Nur77 recruitment to nuclear structures.

The Nur77 N-terminal domain is required for nuclear body formation

Since the polyclonal antibody directed against Nur77 N-terminal region failed to stain nuclear bodies while recognizing the diffuse nuclear form of Nur77, this suggested that this region was buried within the structures. Two Nur77 deletion mutants were constructed and fused to GFP to determine the domains required for nuclear body formation. Mutants lacking the N-terminal domain (amino acids 1 to 170) or the C-terminal domain (amino acids 465 to 598) were transiently transfected in HeLa cells and upon camptothecin exposure, cells expressing the mutant lacking the N-terminal domain displayed diffuse nuclear fluorescence, whereas cells transfected

with the C-terminal truncation formed nuclear bodies identical to the full-length protein (Figure 4). Hence, the N-terminal domain required for transcriptional transactivation is involved in nuclear body formation and is likely sequestered within these structures.

Nuclear body formation reduces Nur77 transcriptional activity

Nur77 associates to specific DNA sequences, that include the Nur77-binding response element (NBRE), the Nur response element (NurRE) and the DR5 element, the latter requiring association with RXR (3). To assess whether the presence of nuclear bodies alter Nur77 activity, HeLa cells were transfected with GFP-Nur77 along with a NurRE luciferase reporter and β -galactosidase. Cells transfected with GFP-Nur77 transactivated the NurRE reporter as strongly as cells transfected with wild-type Nur77, confirming that the GFP fusion does not affect Nur77 activity (data not shown). Cells treated with UV-C or camptothecin showed a significant decrease in NurRE activity compared to untreated cells in five independent experiments (Figure 4A). While Nur77 activity was not completely abrogated, these cells overexpress Nur77 that was not entirely confined within nuclear bodies (Figures 1 and 2). The effect of different genotoxins on endogenous Nur77 activity was therefore evaluated. Since HeLa cells have very low endogenous Nur77 levels compared to MCF-7 cells (data not shown), MCF-7 cells were transiently transfected with the NurRE luciferase and β -galactosidase reporters and treated with different agents. As expected, PMA increased endogenous Nur77 transcriptional activity, while the nuclear dot-inducing factors camptothecin, actinomycin D or UV-C strongly inhibited reporter activity (Figure 3B). In contrast, etoposide, which does not induce Nur77 nuclear body formation, had no effect on reporter activity (Figure 3B). Under conditions when abundant Nur77 nuclear dots formed such as camptothecin or UV-C treatment, NurRE transcription was significantly inhibited (Figure 3A) and this effect was not associated to global transcription inhibition since activity was normalized on constitutive β -galactosidase activity. This argues Nur77 remains sequestered in these nuclear structures, preventing its transcriptional activity.

Nur77 nuclear bodies are dynamic structures associated with the nuclear matrix

Since Nur77 nuclear bodies form very rapidly in response to genotoxins, their persistence upon stress removal was evaluated. HeLa cells transiently transfected with GFP-Nur77 were treated one hour with camptothecin, washed and allowed to recover 16 hours. No significant mortality occurred and nuclear bodies disappeared, while in cells exposed 16 hours to camptothecin, nuclear bodies persisted and mortality became apparent (data not shown). The nuclear matrix contributes to repair factor recruitment at sites of DNA damage (30, 31) and can associate with sub-nuclear compartments such as PML bodies (32). To determine whether Nur77 associates with the nuclear matrix, cells were treated with cytoskeleton buffer containing DNase and detergent to remove all chromatin-associated proteins, leaving the nuclear matrix and associated proteins intact (19). This procedure removed soluble and DNA-bound Nur77, but left a significant amount of Nur77 associated to the nuclear matrix (Figure 5, left). Nuclear bodies formed after camptothecin treatment remained tightly bound to the nuclear matrix (Figure 5, right), arguing that DNA is not essential for Nur77 nuclear body persistence.

Nur77 does not localize with other nuclear bodies

Several sub-nuclear domains form dot-like structures of different shape, size and function. The PML protein has growth-suppressive properties and localizes to PML nuclear bodies. PML-NB have been implicated in regulating transcription, apoptosis, tumor suppression and anti-viral responses and, following DNA damage several factors transit through PML-NB in a temporal manner (33). The SC35 protein belongs to the SR splicing factor family essential for pre-messenger RNA splicing and SC35 is associated with nuclear speckles, dynamic structures in terms of protein content, which can cycle between speckles and other nuclear locations (34). The Survival of Motor Neurons (SMN) protein is a constituent of nuclear dots called gems or Cajal bodies that contribute to spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins assembly (35). To determine whether Nur77 localizes with such structures, indirect immunofluorescence was performed on cells transfected with GFP-Nur77 and exposed to camptothecin. Figure 6 shows

that GFP-Nur77 does not co-localize with PML, SC35 or SMN. These results demonstrate that Nur77 forms novel sub-nuclear structures distinct from other known nuclear domains.

Nur77 contributes to apoptosis through transcription-dependent or -independent mechanisms (14, 36). Nur77 nuclear body formation might be anti-apoptotic, since mitochondrial redistribution was not observed following exposure to genotoxic agents. Nur77 sequestration in nuclear bodies tightly bound to the nuclear matrix would be expected to prevent nuclear export to mitochondria and subsequent apoptosome activation. The inhibition of Nur77 transcriptional activity observed upon nuclear body formation would also be expected to reduce transcription-dependent apoptosis. Since nuclear bodies disappeared upon genotoxic stress removal, these nuclear structures do not appear essential for apoptotic commitment. The transient formation of Nur77 nuclear dots might allow cells to sequester this pro-apoptotic factor to allow DNA damage recovery prior to programmed cell death commitment. Given that these structures overlap with no other known sub-nuclear domains, the identification of Nur77 interaction partners within these nuclear bodies will provide additional clues to their nature and function.

Materials and methods

Plasmids

The human Nur77 cDNA in pUC19 (a gift from Dr. Jacques Drouin, IRCM, Montreal, Canada) was digested with *EcoRI/FspI* and ligated into the *EcoRI/EcoRV* sites of pcDNA3.1(zeo) (Invitrogen, Burlington, Canada). GFP5 was generated by PCR mutagenesis to create the S65T-GFP5 variant previously described (37) and cloned in pRSETc (Invitrogen). Nur77 was amplified by PCR using primers 5' NurBamHI (5'-GGCAGGGGCAGCGGATCCCG-3') and M13 universal (5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'), digested with *BamHI* and *FspI*, and ligated into the *BamHI/SmaI* sites of pRSET-GFP5. The N-terminal deletion mutant (amino acids 170 to 598) was obtained by *EagI/StuI* digestion, extremity fill-in and intra-molecular ligation. The C-terminal Nur77 truncation mutant was generated by PCR by introducing a termination codon at the position corresponding to amino acid 465 with primer Nur1-465 (5'-CGGGATCCAGTGTAGCACCAGGCCTTAGCAGAAGATG-3'). The sequence of constructs were verified on a CEQ 2000XL (Beckman Coulter, Fullerton, CA) automated sequencer.

Full-length Nur77 and truncation mutants were cloned in-frame downstream of GFP in pRSET-GFP5, then the GFP-Nur77 fusions were subcloned into pcDNA3.1(zco).

Cell culture, reagents and transfections

HEK293 (CRL-1573), HeLa (CCL-2), H1299 (CRL-5803), H4 (HTB-148), LNCaP (CRL-1740) and MCF-7 (HTB-22) cell lines were from ATCC (Manassas, VA). Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) and 100 U/ml penicillin/streptomycin (InVitrogen), except for LNCaP cells that were maintained in RPMI-1640 (InVitrogen) supplemented with 10 % FBS and 100 U/ml penicillin/streptomycin. Cells were grown at 37°C in a humidity-saturated incubator in a 5 % CO₂ atmosphere. For UV irradiation, cells were washed with Phosphate Buffered Saline (PBS) and exposed to a germicidal lamp emitting at 254 nm at an intensity of 30 J/m² as measured with a UV short-wave meter (UVP Inc., Upland, CA). Exposure to gamma radiation was performed in a GammaCell irradiator (MDS-Nordion, Ottawa, Canada). Transient transfections were performed on semi-confluent cells seeded in 6-well plates with FuGene 6 (Roche Diagnostics, Laval, Canada). Gene reporter assays were performed by transient transfection of a NurRE luciferase reporter plasmid (provided by Dr. J. Drouin) and pCMVβ (Promega, Madison, WI) using a 10 to 1 DNA ratio. Assays for luciferase and β-galactosidase were performed following manufacturer's instructions (Promega). Actinomycin D, Akt inhibitor, α-amanitin, caffeine, camptothecin, cisplatin, cyclosporin A, 5,6-dichloro-1-βD-ribofuranosylbenzimidazole (DRB), doxorubicin, etoposide, Gö6976, okadaic acid, LY294008, phorbol myristate acetate, roscovitin, rottlerin, SB203580, SP600125 and U0126 were from Calbiochem (La Jolla, CA).

Immunofluorescence

Cells were grown overnight on glass coverslips prior to treatment. Cells were fixed with 4 % paraformaldehyde in PBS for 10 minutes at 25°C, permeabilized in absolute methanol (or 1:1 methanol/acetone for Nur77 staining) for 5 minutes at -20°C, blocked in immunofluorescence (IF) buffer (3 % bovine serum albumin, 0.2 % Tween-20, 0.2 % Teleost gelatin, 0.1 % sodium azide in PBS) for 1 hour at 25°C. Cells were stained overnight at 4°C with primary antibodies in IF buffer, washed twice and stained with secondary antibodies in IF buffer for 1 hour at 25°C. The C-19 and M-210 polyclonal antibodies directed against Nur77 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) were used at 1 μg/ml. Rabbit polyclonal anti-PML (Chemicon, Temecula, CA) was

used at 1:500, mouse monoclonal anti-SC35 (clone α SC35, BD-Biosciences, Nepean, Canada) was used at 1 μ g/ml and mouse monoclonal anti-SMN (clone SMN, BD-Biosciences) was used at 1 μ g/ml. Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibodies were donkey anti-goat IgG, goat anti-rabbit IgG and goat anti-mouse IgG (Molecular Probes, Eugene, OR) and were used at 1:1000. Nuclei were counter-stained with 1 μ M TOPRO-3 (Molecular Probes) containing 50 μ g/ml RNase A for 30 minutes at 25°C. When specified, cells were treated 30 minutes at 37°C with cytoskeleton buffer (150 mM NaCl, 10 mM PIPES, 1 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 300 mM sucrose, pH 6.8) supplemented with 0.5 % Triton X-100 and 1 mg/ml DNase I prior to fixation. Coverslips were mounted on slides with Geltol mounting medium (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA) and 2.5 % DABCO anti-fading reagent (Sigma, St-Louis, MO) and imaged on a Radiance 2000 confocal microscope (Bio-Rad, Hercules, CA).

Acknowledgments

We thank Dr. Jacques Drouin (Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Canada) for providing the Nur77 cDNA and NurRE luciferase reporter constructs. This work was supported by a start-up grant from INRS-Institut Armand-Frappier to François Denis.

References

1. Hazel TG, Nathans D, Lau LF. A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(22):8444-8448.
2. Milbrandt J. Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* 1988;1(3):183-188.
3. Maruyama K, Tsukada T, Ohkura N, Bandoh S, Hosono T, Yamaguchi K. The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily (review). *Int J Oncol* 1998;12(6):1237-1243.
4. Wang Z, Benoit G, Liu J, Prasad S, Aarnisalo P, Liu X, Xu H, Walker NP, Perlmann T. Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* 2003;423(6939):555-560.
5. Kovalovsky D, Refojo D, Liberman AC, Hochbaum D, Pereda MP, Coso OA, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E. Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol Endocrinol* 2002;16(7):1638-1651.

6. Hazel TG, Misra R, Davis IJ, Greenberg ME, Lau LF. Nur77 is differentially modified in PC12 cells upon membrane depolarization and growth factor treatment. *Mol Cell Biol* 1991;11(6):3239-3246.
7. Liu ZG, Smith SW, McLaughlin KA, Schwartz LM, Osborne BA. Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77. *Nature* 1994;367(6460):281-284.
8. Woronicz JD, Calnan B, Ngo V, Winoto A. Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T- cell hybridomas. *Nature* 1994;367(6460):277-281.
9. Paulsen RE, Weaver CA, Fahrner TJ, Milbrandt J. Domains regulating transcriptional activity of the inducible orphan receptor NGFI-B. *J Biol Chem* 1992;267(23):16491-16496.
10. Woronicz JD, Lina A, Calnan BJ, Szychowski S, Cheng L, Winoto A. Regulation of the Nur77 orphan steroid receptor in activation-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1995;15(11):6364-6376.
11. Katagiri Y, Hirata Y, Milbrandt J, Guroff G. Differential regulation of the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NGFI-B by membrane depolarization and nerve growth factor. *J Biol Chem* 1997;272(50):31278-31284.
12. Pekarsky Y, Hallas C, Palamarchuk A, Koval A, Bullrich F, Hirata Y, Bichi R, Letofsky J, Croce CM. Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nur77. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(7):3690-3694.
13. Katagiri Y, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Ozato K, Guroff G. Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B. *Nat Cell Biol* 2000;2(7):435-440.
14. Li H, Kolluri SK, Gu J, Dawson MI, Cao X, Hobbs PD, Lin B, Chen G, Lu J, Lin F, Xie Z, Fontana JA, Reed JC, Zhang X. Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science* 2000;289(5482):1159-1164.
15. Hofmann TG, Will H. Body language: the function of PML nuclear bodies in apoptosis regulation. *Cell Death Differ* 2003;10(12):1290-1299.
16. Bernardi R, Pandolfi PP. Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. *Oncogene* 2003;22(56):9048-9057.
17. Xu ZX, Timanova-Atanasova A, Zhao RX, Chang KS. PML colocalizes with and stabilizes the DNA damage response protein TopBP1. *Mol Cell Biol* 2003;23(12):4247-4256.

18. Carbone R, Pearson M, Minucci S, Pelicci PG. PML NBs associate with the hMre11 complex and p53 at sites of irradiation induced DNA damage. *Oncogene* 2002;21(11):1633-1640.
19. Wu WS, Xu ZX, Ran R, Meng F, Chang KS. Promyelocytic leukemia protein PML inhibits Nur77-mediated transcription through specific functional interactions. *Oncogene* 2002;21(24):3925-3933.
20. Donahue BA, Yin S, Taylor JS, Reines D, Hanawalt PC. Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(18):8502-8506.
21. Chen AY, Liu LF. DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1994;34:191-218.
22. Corda Y, Job C, Anin MF, Leng M, Job D. Spectrum of DNA--platinum adduct recognition by prokaryotic and eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases. *Biochemistry* 1993;32(33):8582-8588.
23. Le Page F, Kwoh EE, Avrutskaya A, Gentil A, Leadon SA, Sarasin A, Cooper PK. Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. *Cell* 2000;101(2):159-171.
24. D'Arpa P, Beardmore C, Liu LF. Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons. *Cancer Res* 1990;50(21):6919-6924.
25. Ljungman M, Zhang F, Chen F, Rainbow AJ, McKay BC. Inhibition of RNA polymerase II as a trigger for the p53 response. *Oncogene* 1999;18(3):583-592.
26. McKay BC, Ljungman M. Role for p53 in the recovery of transcription and protection against apoptosis induced by ultraviolet light. *Neoplasia* 1999;1(3):276-284.
27. McKay BC, Becerril C, Ljungman M. P53 plays a protective role against UV- and cisplatin-induced apoptosis in transcription-coupled repair proficient fibroblasts. *Oncogene* 2001;20(46):6805-6808.
28. Slagsvold HH, Ostvold AC, Fallgren AB, Paulsen RE. Nuclear receptor and apoptosis initiator NGFI-B is a substrate for kinase ERK2. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291(5):1146-1150.
29. Kolluri SK, Bruey-Sedano N, Cao X, Lin B, Lin F, Han YH, Dawson MI, Zhang XK. Mitogenic effect of orphan receptor TR3 and its regulation by MEKK1 in lung cancer cells. *Mol*

Cell Biol 2003;23(23):8651-8667.

30. Kochler DR, Hanawalt PC. Recruitment of damaged DNA to the nuclear matrix in hamster cells following ultraviolet irradiation. *Nucleic Acids Res* 1996;24(15):2877-2884.
31. Bischof O, Kim SH, Irving J, Beresten S, Ellis NA, Campisi J. Regulation and localization of the Bloom syndrome protein in response to DNA damage. *J Cell Biol* 2001;153(2):367-380.
32. Chang KS, Fan YH, Andreeff M, Liu J, Mu ZM. The PML gene encodes a phosphoprotein associated with the nuclear matrix. *Blood* 1995;85(12):3646-3653.
33. Dellaire G, Bazett-Jones DP. PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays* 2004;26(9):963-977.
34. Lamond AI, Spector DL. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(8):605-612.
35. Gubitz AK, Feng W, Dreyfuss G. The SMN complex. *Exp Cell Res* 2004;296(1):51-56.
36. Kuang AA, Cado D, Winoto A. Nur77 transcription activity correlates with its apoptotic function in vivo. *Eur J Immunol* 1999;29(11):3722-3728.
37. Siemering KR, Golbik R, Sever R, Haseloff J. Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr Biol* 1996;6(12):1653-1663.

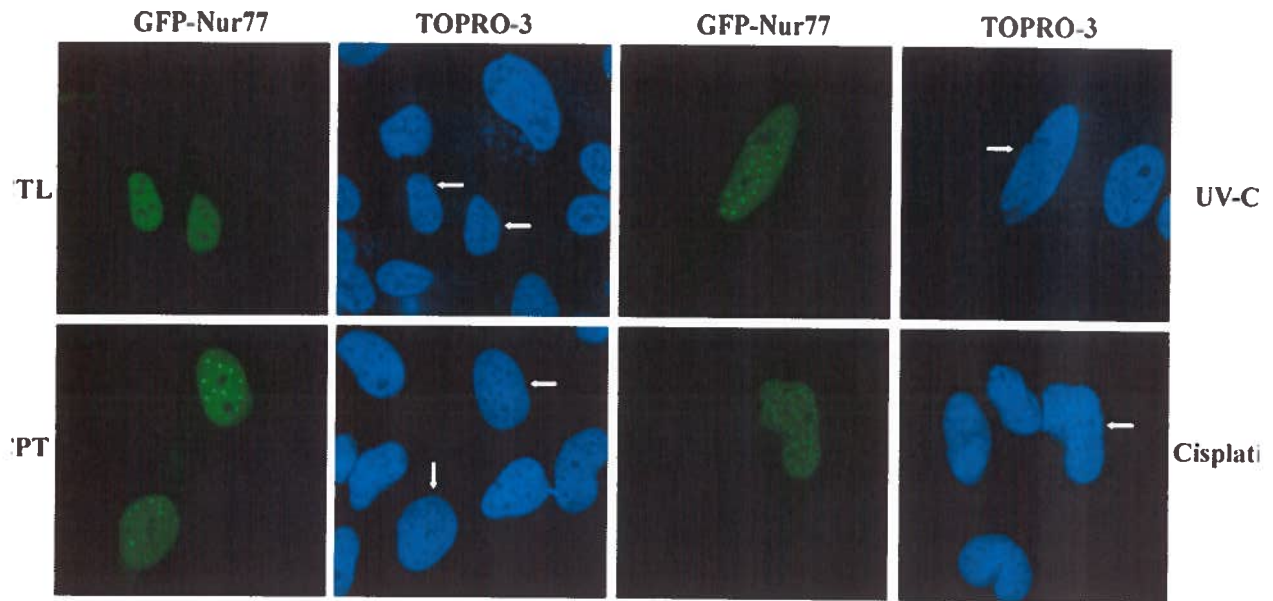


Figure 1. DNA damaging agents induce the formation of Nur77 nuclear dots. HeLa cells transiently transfected with GFP-Nur77 were left untreated (CTL), or treated 1 hour with 10 μ M camptothecin (CPT), 30 J/m² UV-C or 50 μ M cisplatin, then visualized by confocal microscopy. Green: GFP fluorescence, blue: TOPRO-3 iodide DNA staining.

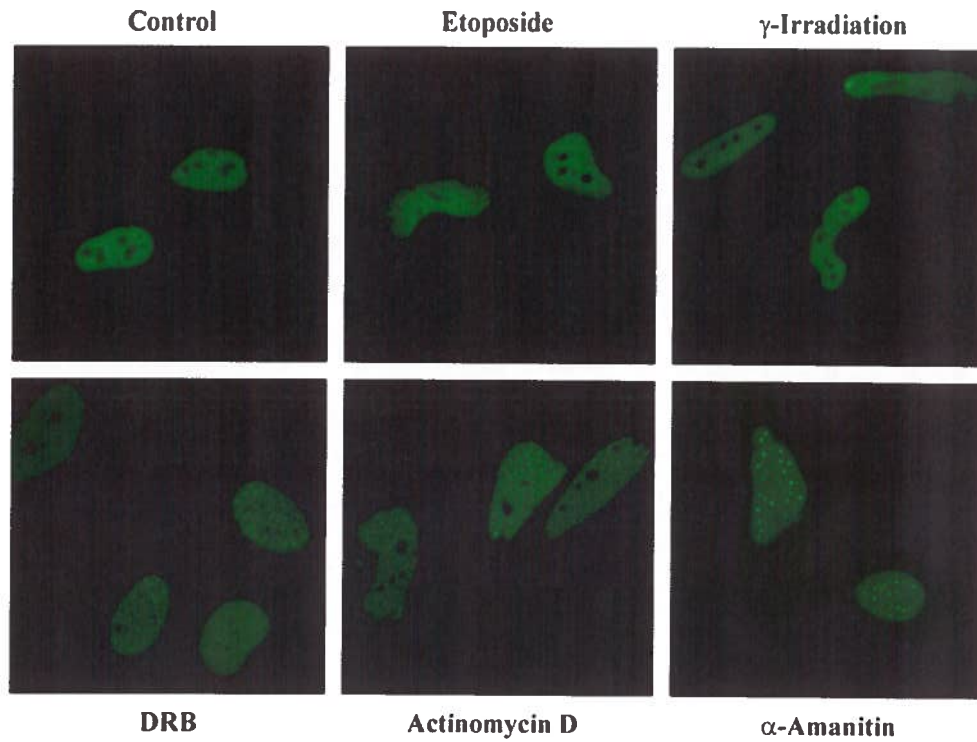


Figure 2. Transcription inhibition contributes to Nur77 nuclear dot formation. HeLa cells transiently transfected with GFP-Nur77 were treated 16 hours with 100 μ M etoposide, exposed to 5 Gy γ -irradiation and incubated 16 hours, or treated 4 hours with 100 μ M DRB, 200 nM actinomycin D or 1 μ g/ml α -amanitin and visualized by confocal microscopy.

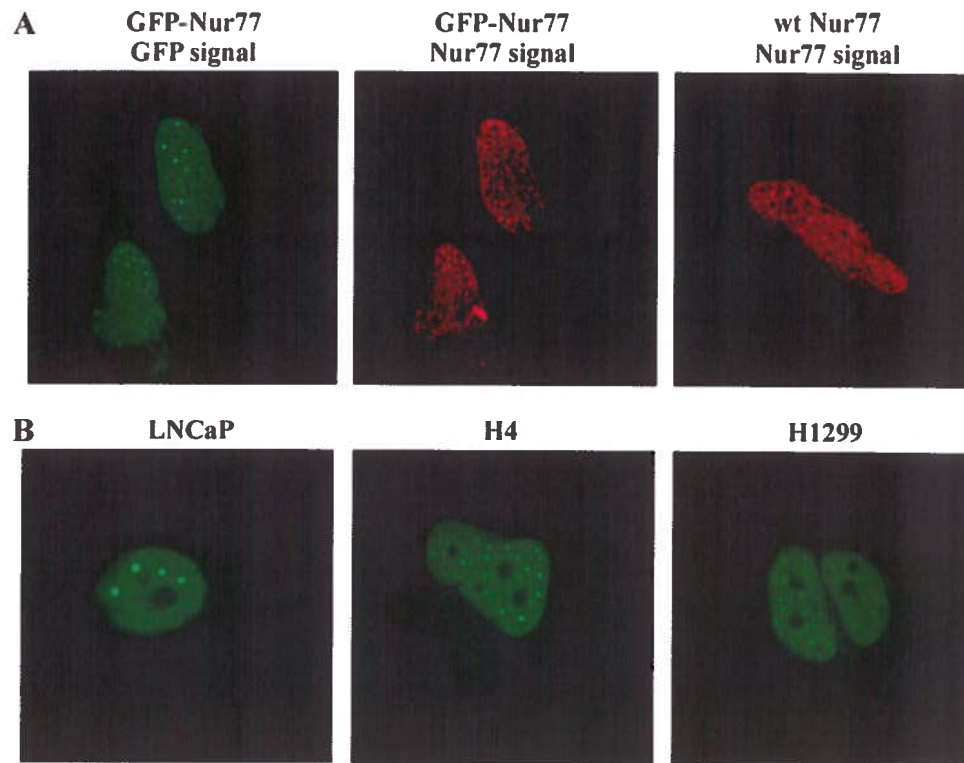


Figure 3. Nur77 forms nuclear dots in different cell types. (A) HcLa cells transiently transfected with GFP-Nur77 (left and center) or wild-type Nur77 (right) were treated 1 hour with 10 μ M camptothecin and stained with the C-19 anti-Nur77 goat polyclonal antibody and Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibody (red) and visualized by confocal microscopy. (B) LNCaP, H4 or H1299 cells transiently transfected with GFP-Nur77 were treated 1 hour with 10 μ M camptothecin and visualized by confocal microscopy.

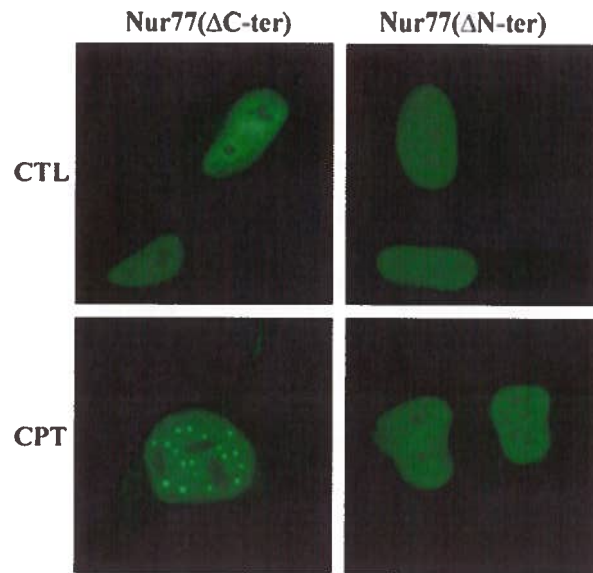


Figure 4. The N-terminal domain of Nur77 is required for nuclear body formation. Nur77 deletion mutants lacking the C-terminal domain (left) or the N-terminal domain (right) fused to GFP were transiently transfected into HeLa cells. Cells were treated 1 hour with 10 μ M camptothecin (bottom) or left untreated (top) and visualized by confocal microscopy.

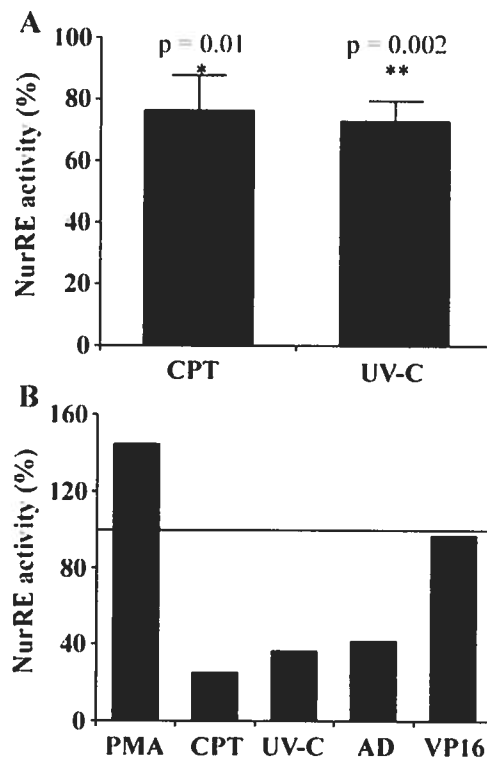


Figure 5. Agents that induce nuclear body formation inhibit Nur77 transcriptional activity.

(A) HeLa cells transiently transfected with GFP-Nur77, NurRE luciferase and β -galactosidase reporters were treated 4 hours with 10 μ M camptothecin (CPT), 30 J/m² UV-C or left untreated. Luciferase activity was normalized against β -galactosidase activity and data shown are the mean percentage of activity compared to untreated controls \pm standard deviation of five independent experiments. Student unpaired T test analysis revealed significant statistical differences between control and treated cells (CPT, p=0.01; UV-C, p=0.002). (B) MCF-7 cells transiently transfected with the NurRE luciferase and β -galactosidase reporters were treated 4 hours with 100 nM phorbol myristate acetate (PMA), 10 μ M camptothecin (CPT), 30 J/m² UV-C, 100 μ M etoposide (VP16) or 200 nM actinomycin D (AD). Representative data from one of three independent experiments is shown and reporter activity is expressed as percentage activity relative to untreated cells.

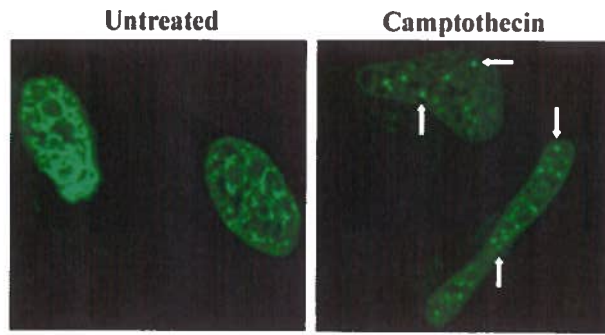


Figure 6. Nur77 bodies are associated with the nuclear matrix. HeLa cells transiently transfected with GFP-Nur77 were cultured 1 hour in the absence (left) or presence of 10 μ M camptothecin (right). Nuclear DNA was extracted with cytoskeleton buffer/DNase I/Triton X-100 for 30 minutes, cells were fixed and visualized by confocal microscopy. Arrows show matrix-bound nuclear bodies.

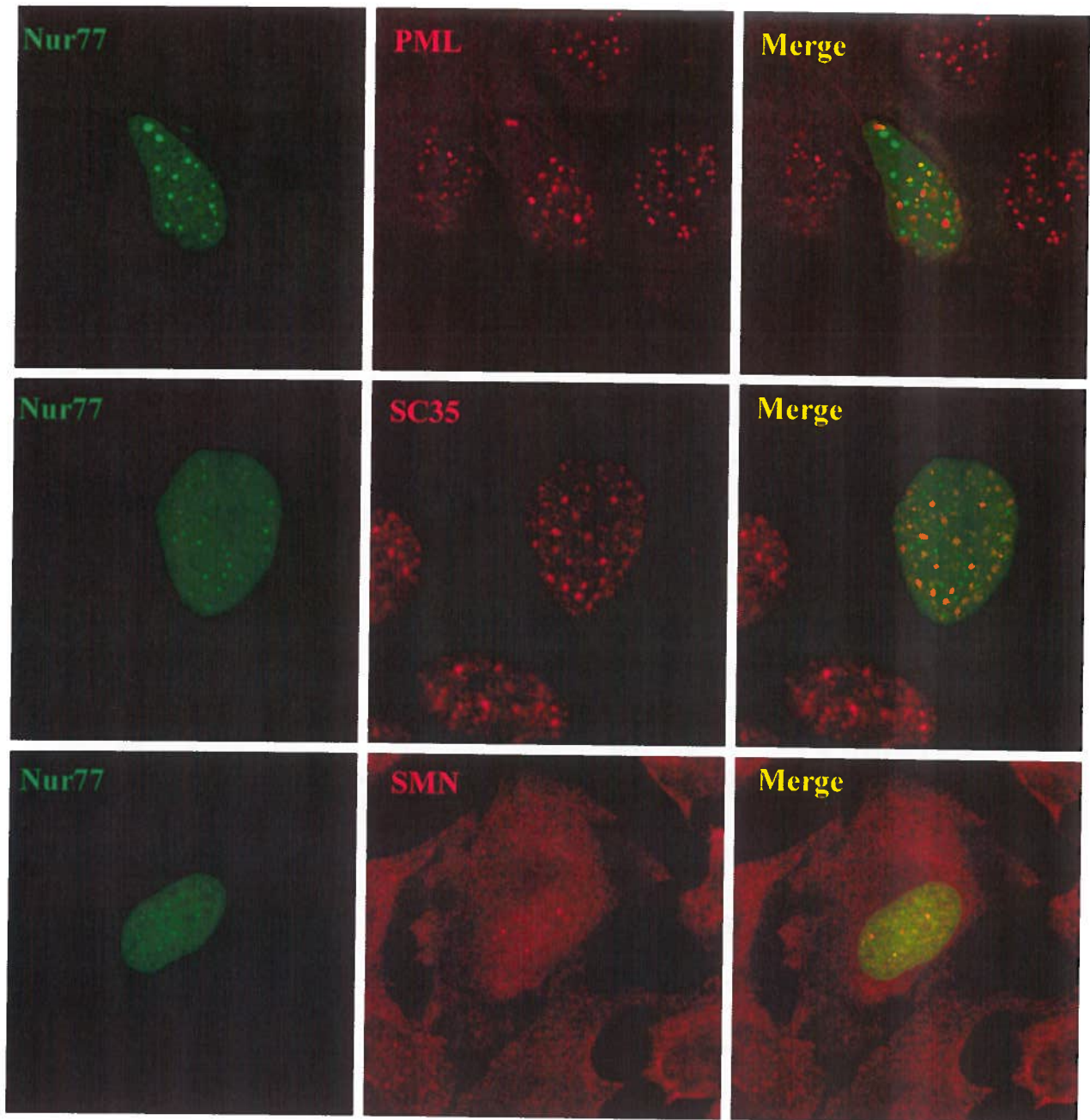


Figure 7. Nur77 does not co-localize with known nuclear structures. HeLa cells transfected with GFP-Nur77 were treated 1 hour with 10 μ M camptothecin, fixed and stained with antibodies directed against PML (top), SC35 (middle) or SMN (bottom), followed by Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibody staining and visualized by confocal microscopy. Left: GFP fluorescence (green), center: specific immunofluorescence (red), right: merged images.

**CHAPITRE 3 : INHIBITION OF APOPTOSIS BY NUR77
THROUGH NF- κ B MODULATION**

3.1 Mise en contexte de l'article II

Ce manuscrit présente les travaux sur le rôle apoptotique de Nur77. Peu de données sont disponibles sur le rôle apoptotique de Nur77 dans des cellules de type épithélial, et encore moins sur l'impact de sa surexpression, qui est pourtant observée dans plusieurs cancers. Des chercheurs avaient identifié un rôle pro-apoptotique de Nur77 dans les cellules du cancer de la prostate LNCaP (97, 225). Ces résultats ont été obtenus à l'aide d'une construction antisens inhibant l'expression de Nur77 dans ces cellules. En revanche, des expériences de surexpression de Nur77 ont révélé une fonction anti-apoptotique (234, 280). Nous avons donc généré des lignées stables de cellules humaines embryonnaires de rein exprimant diverses formes de Nur77, afin de faire la lumière sur le rôle de Nur77 dans diverses voies apoptotiques.

Les objectifs spécifiques de cet article étaient:

- Identifier l'impact de la surexpression de Nur77 sur l'apoptose par la voie Fas/FasL, les dommages à l'ADN et le stress du RE.
- Utilisation d'un mutant Nur77 dominant négatif afin d'évaluer le rôle apoptotique de Nur77 au niveau endogène.
- Décrire le ou les mécanismes en cause.

Contributions à l'article: Louis de Léséleuc a effectué toutes les manipulations. La rédaction de l'article a été accomplie par L. de Léséleuc et F. Denis.

ARTICLE II

INHIBITION OF APOPTOSIS BY NUR77 THROUGH NF-KB MODULATION

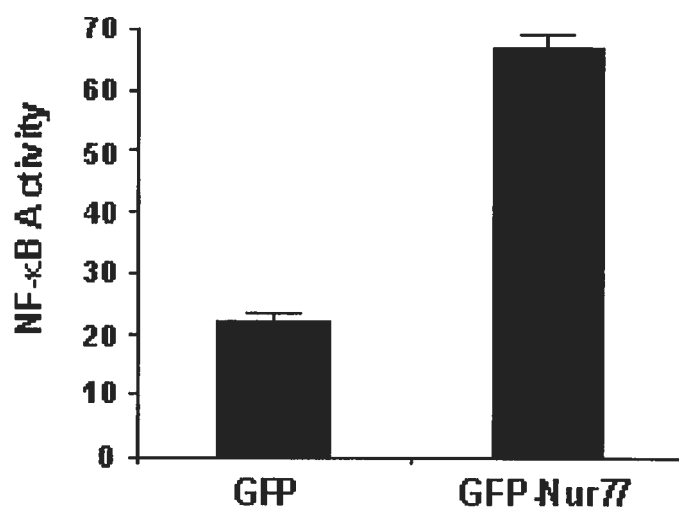
Louis de Lésélcuc, François Denis

INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, H7V 187, Canada

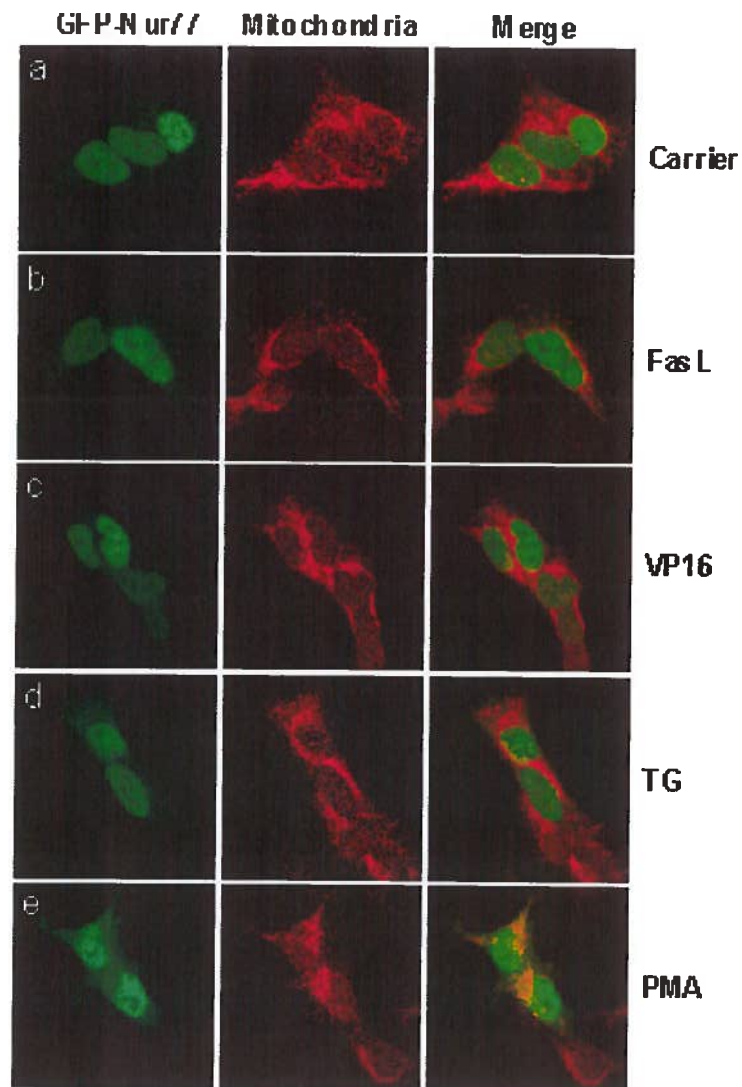
Le récepteur orphelin Nur77 a été principalement décrit comme un médiateur de l'apoptose. Le but de cette étude fut de déterminer l'impact de Nur77 sur l'apoptose en réponse à divers stimuli. La surexpression de Nur77 dans la lignée fibroblastique HEK293 a mené à la résistance à la mort cellulaire programmée induite par un engagement de récepteurs de mort, des agents endommageant l'ADN et au stress du réticulum endoplasmique. La surexpression de Nur77 a augmenté l'activité de NF-KB et l'emploi d'inhibiteurs spécifiques de liaison à l'ADN a confirmé que celle-ci était responsable de l'action anti-apoptotique observée. La surexpression de Nur77 entraîne une induction du gène anti-apoptotique *cIAP1* dépendante de NF-KB. Paradoxalement, un mutant dominant-négatif de Nur77 a sensibilisé les cellules au FasL mais a également protégé celles-ci contre l'apoptose induite par le stress du RE de manière analogue au Nur77 sauvage. Ces résultats indiquent que des communications intracellulaires entre Nur77 et d'autres facteurs pourraient conditionner le sort de la cellule en réponse à des agents provoquant l'apoptose.

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

de Lésélcuc L, Denis F. Inhibition of apoptosis by Nur77 through NF-kappaB activity modulation. *Cell Death Differ.* 2006 Feb;13(2):293-300.
doi:10.1038/sj.cdd.4401737



Transient Nur77 expression modulates NF- κ B activity. HEK293 cells seeded in 6-well plates (5×10^6 cells/well) were transiently transfected with pcDNA-GFP or pcDNA-GFP-Nur77 together with pGL2-NF- κ B and pCMV β using a 1:1:0.1 ratio of DNA. Cells were lysed 18 hours later and the luciferase activity measured was normalized against β -galactosidase activity. Results shown represent the mean activity of well triplicates \pm SD.



Nur77 does not localize to mitochondria in HEK293 cells. HEK293 cells plated on coverslips were transiently transfected with GFP-tagged Nur77. Cells were treated for 4 h with (a) DM SO, (b) 50 ng/mL FasL, (c) 100 μ M VP16, (d) 1 μ M TG or (e) 100 nM PMA. Mitochondria were stained with 100 nM Mitotracker Red 30 min prior to fixation. Left panel: GFP-Nur77. Middle panel: Mitotracker Red. Right panel: Merge.

CHAPITRE 4 : RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

4.1 Avant-propos

Les résultats présentés dans cette section complètent ceux exposés dans les deux précédents articles. Ils fournissent des données utiles à une meilleure compréhension du sujet à l'étude afin de mieux alimenter la discussion. Chaque sous-section est composée d'une courte mise en situation suivie d'un texte décrivant les résultats. Les figures sont regroupées à la fin de la section.

4.2 Localisation de Nur77 Δ DBD

Nur77 a été observé au niveau des mitochondries dans un bon nombre de situations où l'apoptose était déclenchée. Toutefois, les résultats du chapitre II et III n'ont pas pu mettre en évidence une quelconque localisation de Nur77 aux mitochondries à l'aide d'une fusion GFP. L'équipe de *Li et al.* a conçu un mutant de Nur77 se localisant spontanément aux mitochondries. Ce mutant était dépourvu du domaine de liaison à l'ADN (Nur77 Δ DBD), correspondant aux acides aminés 171 à 469 (97). Nous avons reproduit le même mutant fusionné à la GFP en position N-terminale. Celui-ci a été transfecté dans des cellules HeLa. Leurs mitochondries ont été colorées au Mitotracker Red (Molecular Probes) et les cellules ont été fixées et observées au microscope confocal. Alternativement, le réticulum endoplasmique a été révélé par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps dirigé contre la calnexine (fourni par le Dr J. Thibodeau, Université de Montréal).

La figure 15A montre la localisation de GFP-Nur77 Δ DBD. On observe une concentration de ce mutant hors du noyau dans des domaines cytoplasmiques globulaires ou réticulés. Les patrons de localisation variaient d'une cellule à l'autre, de diffus à tacheté. La coloration Mitotracker Red n'a pu mettre en évidence de co-localisation entre Nur77 Δ DBD et les mitochondries. Un autre organelle qui adopte un patron réticulé est le RE. La coloration de ce compartiment par un anti-calnexine suivi d'un anticorps secondaire fluorescent n'a pas révélé un quelconque chevauchement entre les deux molécules (figure 15B). Par conséquent, GFP-Nur77 Δ DBD adopte chez les cellules HeLa une localisation qui ne coïncide pas avec des compartiments classiques. Il est à noter qu'aucun signe d'apoptose n'a été décelé chez les cellules transfectées suite à l'examen de leur morphologie nucléaire au DAPI.

4.3 Apoptose de lignées stables de cellules MCF-7

La surexpression de Nur77 chez les cellules HEK293 a eu un effet profond sur leur sensibilité à l'apoptose. Afin de vérifier si ce phénomène était également observé dans d'autres types cellulaires, nous avons généré une lignée stable de cellules d'adénocarcinome mammaire MCF-7 surexprimant Nur77, ainsi qu'une lignée témoin transfectée avec le vecteur seul. Leur sensibilité à l'apoptose induite par FasL, FasL+CHX, étoposide (VP16) et thapsigargine (TG) a été évaluée au cytomètre après 72 heures d'incubation (voir la section Matériels et Méthodes de l'article 2).

La figure 16 présente les résultats obtenus avec les cellules MCF-7. Les taux d'apoptose en présence de CHX ou FasL (10 ng/mL) seuls ne sont pas affichés car ils ne sont pas significativement positifs. On constate que Nur77 augmente la sensibilité à l'apoptose par FasL, avec ou sans cycloheximide, ainsi que par l'étoposide. En revanche, ces cellules sont partiellement résistantes à la thapsigargine, tout comme les cellules 293Nur77. Il semble donc que Nur77 puisse moduler différemment l'apoptose selon le type cellulaire, possiblement en affectant des voies distinctes.

4.4 Dépendance de la voie FADD dans l'apoptose des cellules HEK293

La molécule adaptatrice FADD est essentielle à la signalisation des récepteurs de mort. De plus, certains types cellulaires utilisent cette molécule pour véhiculer des signaux apoptotiques suite à des stress comme les dommages à l'ADN (28, 159) ou la surcharge du RE (111). Puisque Nur77 agit sur toutes ces voies, il fut intéressant de déterminer la participation de FADD dans l'apoptose chez les cellules HEK293. Pour ce faire, un mutant dominant-négatif de FADD dépourvu du domaine de mort (acides aminés 80-208) a été transfecté de façon transitoire dans les cellules HEK293 en compagnie d'une quantité restreinte (1/10) d'un vecteur d'expression de la hrGFP (Stratagene). Les cellules ont été traitées avec du FasL, de l'étoposide, de la camptothécine et de la thapsigargine et l'apoptose des cellules fluorescentes a été déterminée après 48 heures par cytométrie.

Comme en fait foi la figure 17, l'expression du dominant-négatif de FADD chez les cellules 293 inhibe l'apoptose induite par tous les traitements. FADD est donc un dénominateur commun de l'apoptose chez ces cellules. Nur77 serait susceptible d'agir en amont ou en aval de cette molécule.

4.5 Modulation par Nur77 de rapporteurs NF- κ B

Dans l'article 2, nous avons utilisé pour mesurer l'activité NF- κ B un rapporteur luciférase reconnu pour être modulé spécifiquement par ce facteur de transcription. Ce rapporteur consiste en la région -220 à +1 du promoteur de *ICAM1* couplée à la luciférase et contient dans sa région distale un site de liaison à NF- κ B caractérisé (293). Ce rapporteur a été validé dans nos expériences puisqu'il est sensible au PMA et à l'étoposide et peut être affecté par différents inhibiteurs pharmacologiques de NF- κ B. Toutefois, il est possible que Nur77 ait un impact différent sur la transcription selon la nature du promoteur, comme il a été démontré par d'autres (294). Nous avons donc comparé l'effet de Nur77 sur le rapporteur mentionné ci-haut (pGL2-NF κ B) à un autre rapporteur luciférase composé de trois sites synthétiques correspondant à l'élément consensus du promoteur de la chaîne Ig- κ fusionné au promoteur minimal de la conalbumine (κ B-CONA-Luc) (295).

Les résultats de cette expérience révèlent une divergence dans l'effet de Nur77 sur ces deux promoteurs. Bien qu'il influence positivement le rapporteur basé sur le promoteur *ICAM1*, Nur77 inhibe significativement l'activité transcriptionnelle du promoteur synthétique. Ceci confirme que Nur77 n'a pas un effet généralisé sur la voie NF- κ B mais serait plutôt sélectif, pouvant autant favoriser que diminuer l'activité de ce facteur de transcription, probablement selon le contexte nucléotidique immédiat.

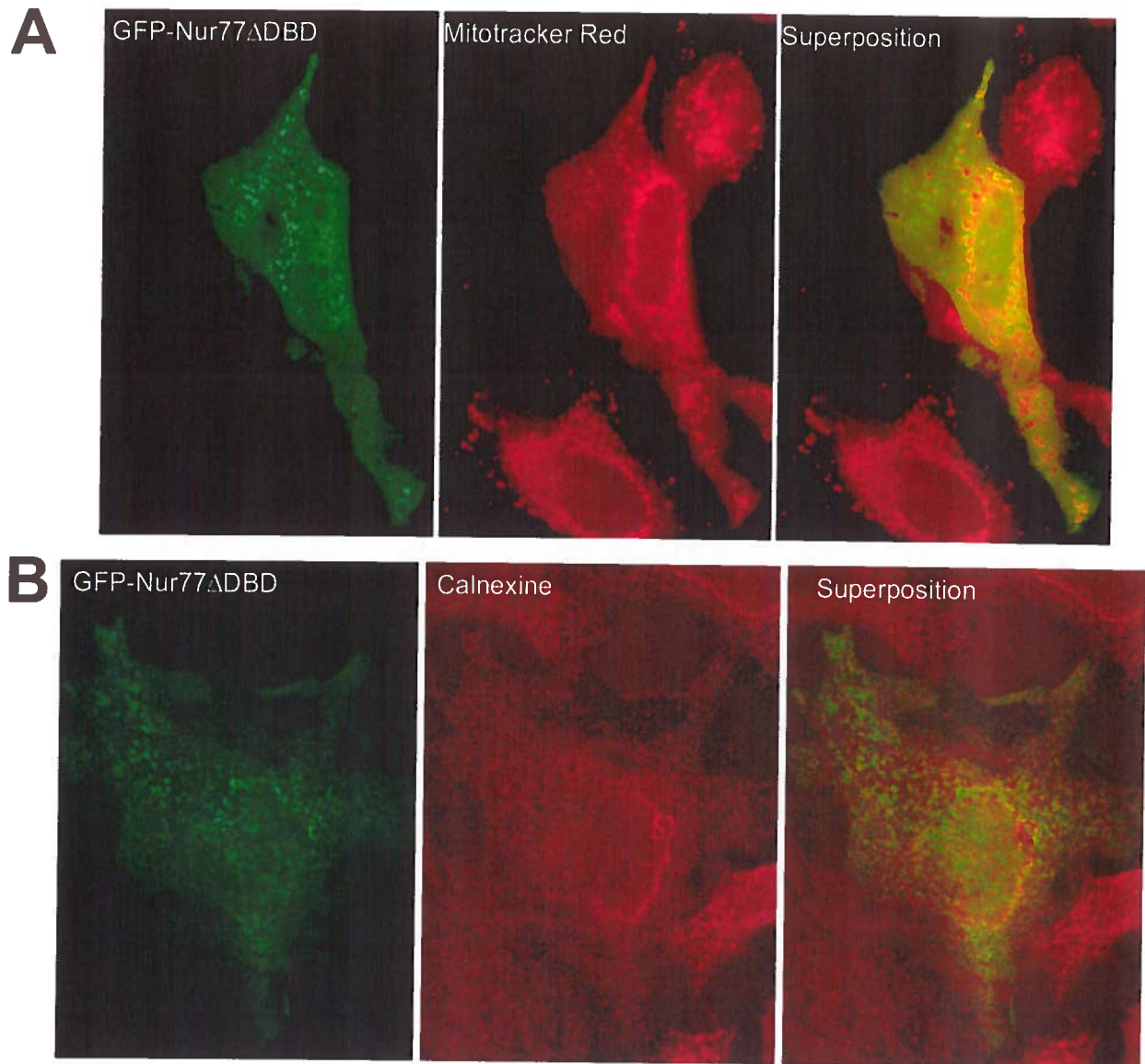


Figure 15: Localisation de Nur77 Δ DBD. Des cellules HeLa cultivées sur des lamelles de verre ont été transfectées en transitoire avec GFP-Nur77 Δ DBD. **A** Les mitochondries ont été coloré avec 100 nM de Mitotracker Red pendant 30 minutes, puis les cellules ont été fixées. Panneau de gauche: GFP-Nur77 Δ DBD; panneau du centre: mitochondries; panneau de droite: superposition. **B** La calnexine, une protéine du réticulum endoplasmique, a été révélée par immunofluorescence indirecte sur les cellules fixées et perméabilisées en utilisant un anti-souris couplé à Alexa 594 (Molecular Probes) comme réactif secondaire. Panneau de gauche: GFP-Nur77 Δ DBD; panneau du centre: calnexine; panneau de droite: superposition. Les lames ont été photographiées au microscope confocal (Radiance 2000, BioRad).

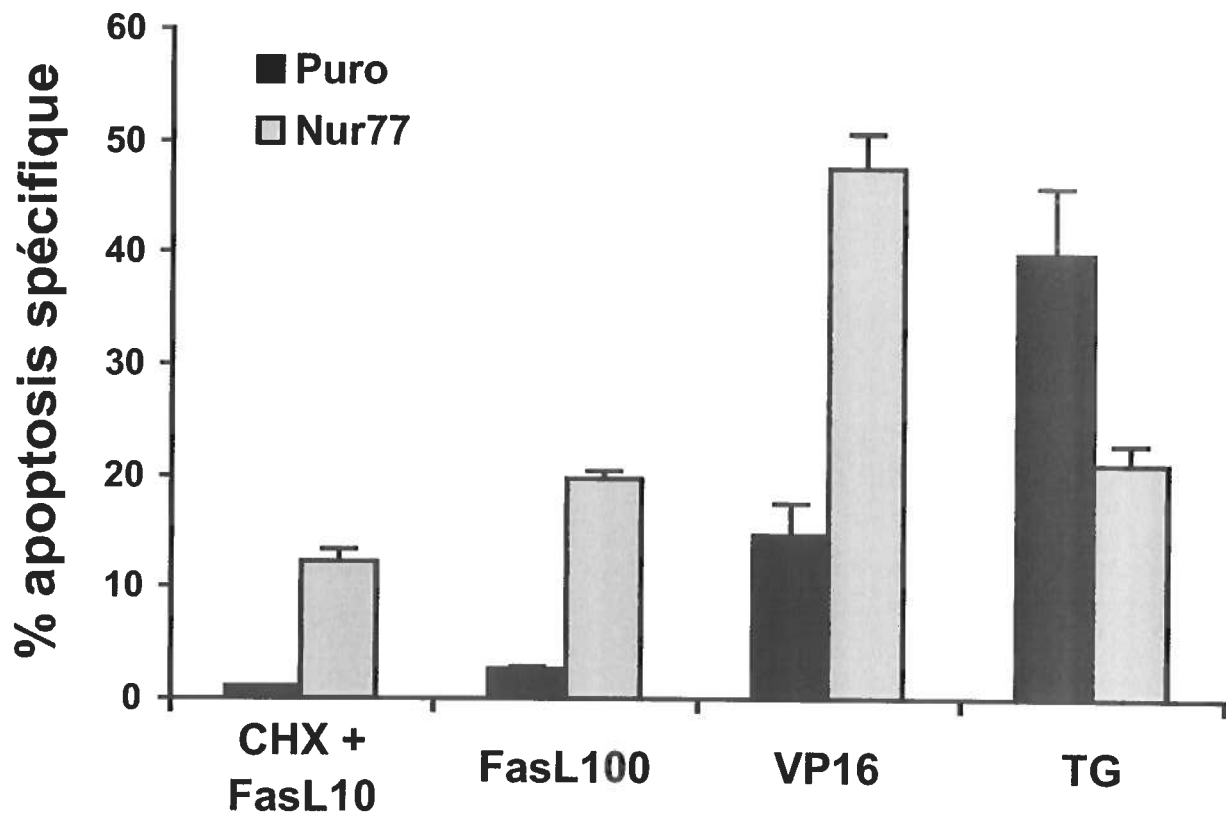


Figure 16: Apoptose de lignées stables de cellules MCF-7. Des lignées de cellules MCF-7 (Nur77 et vecteur vide) sélectionnées à la puromycine ont été utilisées. 10^5 cellules ont été ensemencées par puits. Les cellules ont été incubées pendant 72 h en présence de (i) 10 ng/mL FasL + 0,5 μ g/mL CHX; (ii) 100 ng/mL FasL + 0,5 μ g/mL CHX; (iii) 100 μ M VP-16; (iv) 1 μ M TG. L'apoptose spécifique fut déterminée par cytométrie telle que décrit dans l'article 2, et les valeurs représentent la moyenne des triplicatas \pm écart-type.

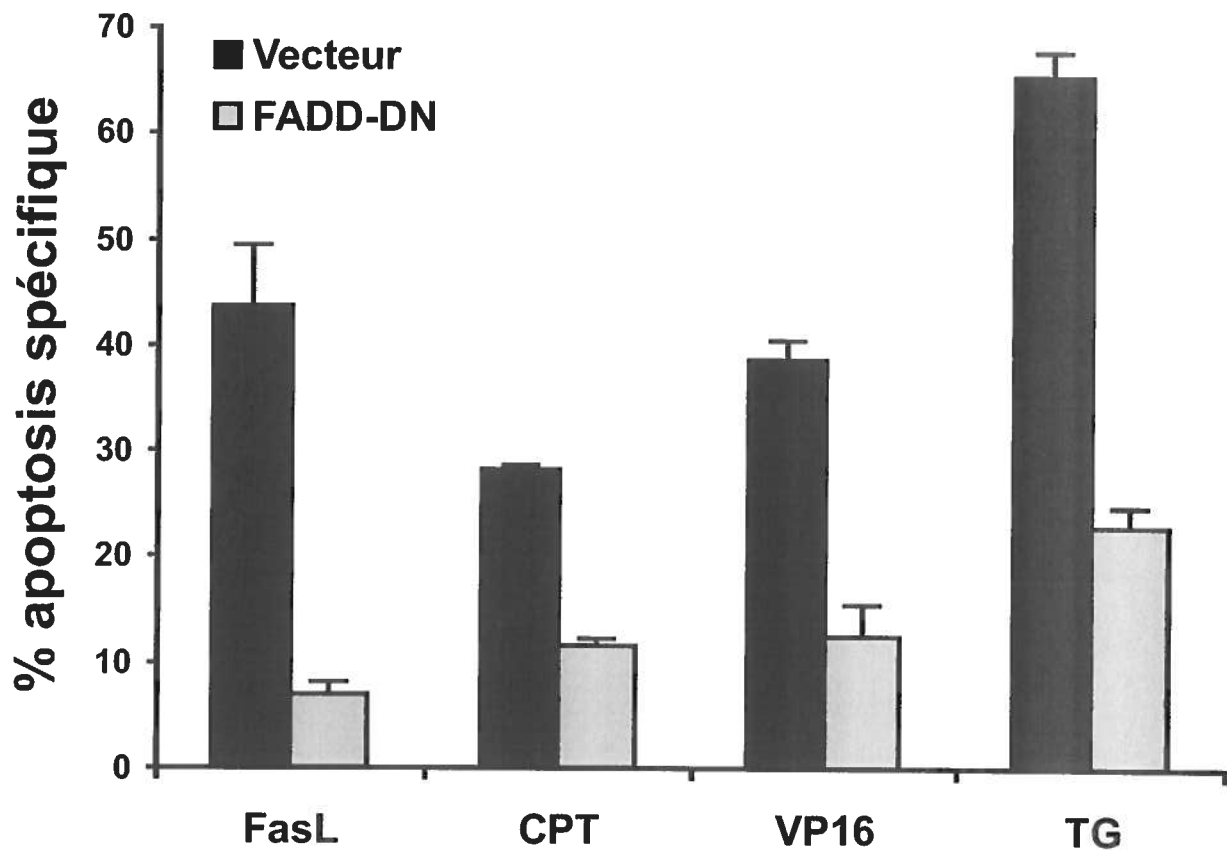


Figure 17: Dépendance de FADD dans l'apoptose des cellules HEK293. Les cellules ensemencées en 24-puits (10^5) ont été transfectées avec soit le vecteur vide (pCDNAzeo3.1), soit le mutant FADD-DN, en combinaison avec hrGFP (10:1). Après une incubation de 18 heures, les deux groupes ont été traités avec (i) 100 ng/mL FasL; (ii) 10 μ M CPT; (iii) 100 μ M VP16; (iv) 1 μ M TG. Après 48 heures, l'apoptose spécifique a été mesurée par cytométrie en ne considérant que les cellules fluorescentes vertes. Les résultats représentent la moyenne de l'apoptose spécifique des puits en triplicatas \pm écart-type.

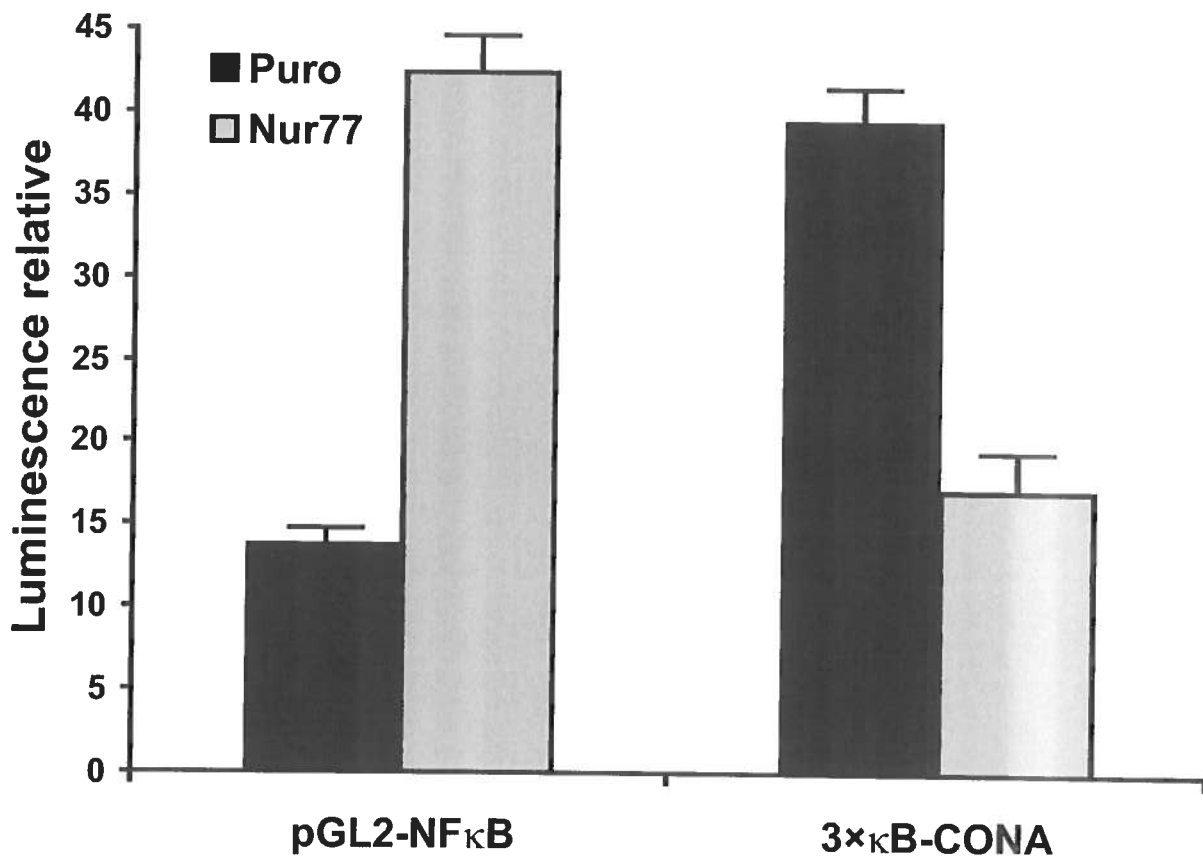


Figure 18: Modulation par Nur77 de l'activité de deux rapporteurs NF- κ B. Des cellules 293puro et 293Nur77 ont été ensemencées en plateau de 6-puits (5×10^5 par puits). Elles ont ensuite été transfectées avec 2 μ g de rapporteur luciférase (pGL2-NF κ B ou 3 \times κ B-CONA-luc) et 0,2 μ g de pCMV β . Les cellules ont été lysées 18 heures plus tard et les activités luciférase et β -galactosidase ont été mesurées. Les valeurs représentent la moyenne de l'activité luciférase normalisée de puits en triplicata \pm écart-type.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION

5.1 Localisation de Nur77

Les travaux pionniers de l'équipe du Dr X. Zhang en lien avec la localisation mitochondriale de Nur77 ont ouvert un tout nouveau chapitre sur la régulation et la fonction de ce récepteur orphelin. Auparavant, la fonction pro-apoptotique de Nur77 était liée à son activité transcriptionnelle. Notre équipe de recherche s'est donc lancée sur la piste de nouvelles interactions mettant en jeu Nur77 et d'autres facteurs pouvant affecter sa localisation cellulaire. À l'aide d'un modèle de fusion GFP permettant de suivre *in situ* de la protéine, nous avons fait la découverte d'un nouveau phénomène: la formation de corps nucléaires. Un tel comportement n'ayant jamais été rapporté par le passé, nous nous y sommes donc intéressés dans le but de mieux le caractériser.

5.1.1 Les corps nucléaires

L'une des premières constatations de nos analyses fut que ces corps nucléaires n'apparaissent que suite à des traitements avec certains agents génotoxiques, mais non en présence d'autres traitements pro-apoptotiques. Les résultats présentés dans le chapitre II démontrent que ce changement de localisation serait associé à l'arrêt de la transcription. En effet, seuls les stress génotoxiques entraînant des lésions qui entravent la transcription, comme la camptothécine, les rayons UV-C, le peroxyde d'hydrogène et la cisplatine, sont aptes à provoquer l'apparition de corps nucléaires. L'étoposide et les rayons gamma sont beaucoup moins efficaces car leur mode d'action n'engendre pas de stress transcriptionnel. La notion de réponse au stress transcriptionnel est renforcée par les résultats démontrant que des agents non génotoxiques comme l'actinomycine D et l'alpha-amanitine peuvent provoquer l'apparition des corps nucléaires, alors qu'une panoplie d'autres inhibiteurs ou agents pharmacologiques n'ont aucun effet sur la localisation de Nur77.

Ce modèle pourrait être étendu aux différences observées entre les lignées cellulaires. Les cellules HeLa, HEK293 et H1299 transfectées avec GFP-Nur77 affichaient une proportion élevée de noyaux comportant des corps nucléaires suite à des traitements comme la camptothécine. Cette proportion était beaucoup plus basse (environ cinq fois) chez les cellules LNCaP, MCF-7 et H4. Toutes ces lignées cellulaires humaines proviennent de tissus différents. On constate que les deux

groupes n'ont en commun que leur statut de p53. Le premier groupe est dépourvu de p53 fonctionnel soit par délétion génétique ou par la présence d'oncogènes viraux, alors que le deuxième groupe comporte une voie p53 efficace. Puisque p53 est un facteur permettant de contrecarrer les stress transcriptionnels (296), nous pouvons spéculer que sa présence diminue l'intensité et la durée de l'arrêt de la transcription causé par les lésions sur l'ADN, ce qui en bout de ligne rendrait les corps nucléaires Nur77 plus rares et donc plus difficiles à détecter. En revanche, dans des cellules déficientes en p53, l'arrêt de la transcription serait plus intense et persistant, d'où les corps nucléaires plus nombreux. Des expériences de complémentation ou d'inhibition de p53 permettraient de vérifier cette hypothèse.

Des difficultés techniques nous ont empêché de déterminer avec certitude si ces structures étaient bel et bien présentes au niveau endogène dans la cellule. Le faible niveau d'expression de cette protéine combinée à l'absence de disponibilité d'anticorps suffisamment sensibles et spécifiques nous empêche d'étudier la présence et le comportement de corps nucléaires Nur77 dans des cellules non-transfectées. Des données présentées en annexe de la thèse présentent des photos dans lesquelles la localisation endogène de Nur77 est révélée par une exposition prolongée au microscope confocal. Ces résultats signalent l'existence de structures analogues au niveau endogène. Sans y adhérer, il serait néanmoins juste d'avancer que ces complexes pourraient être le reflet d'une surabondance de protéines qui formeraient des structures aberrantes lorsque l'une des fonctions principales du noyau, la transcription, serait perturbée.

Aucun résultat ne peut suggérer de rôle formel de ces structures dans la physiologie de la cellule. Leur présence ne corrèle pas avec l'apoptose. En effet, les corps nucléaires sont transitoires alors que le suicide cellulaire est irréversible. Des expériences présentées dans le chapitre III montrent que les cellules HEK293 surexprimant Nur77 sont protégées contre l'apoptose induite par la camptothécine, mais également par d'autres agents qui n'induisent pas la formation de corps nucléaires. De plus, des cellules exprimant le mutant dominant-négatif de Nur77 dépourvu du domaine N-terminal (donc incapable de se localiser aux corps nucléaires) ne démontrent pas un degré d'apoptose significativement différent des cellules témoins. Toutefois, nous n'avons pas démontré que ce mutant agirait véritablement comme un dominant-négatif dans cette situation, c'est-à-dire en empêchant la relocalisation de la forme sauvage. Quoi qu'il en soit,

la région N-terminale est vraisemblablement impliquée dans des interactions protéines-protéines essentielles au maintien des corps nucléaires. Non seulement un mutant dépourvu de ce domaine ne se localise plus à ces sites mais de plus des anticorps dirigés contre cette région sont incapables de révéler les corps nucléaires par immunofluorescence indirecte (voir Annexes). Ceci suggère que ce segment de la protéine est fortement ancré dans des structures denses, alors que le domaine C-terminal demeure libre.

Les images présentées dans le chapitre II montrent que suite à un stress génotoxique, une proportion variable mais importante de la protéine fluorescente se retrouve dans les corps nucléaires, en marge de la chromatine. De plus, le domaine de transactivation de Nur77 n'y est pas accessible. Il est donc logique que l'activité transcriptionnelle de Nur77 soit affectée négativement par les traitements en question, que ce soit sous forme surexprimée dans les cellules HeLa ou endogène dans les MCF-7. Par extension, les diverses fonctions biologiques connues de Nur77 pourraient être parallèlement affectées par les stress génotoxiques. On sait que Nur77 favorise la prolifération cellulaire chez des cellules de cancer du poumon et que cette activité dépendrait de son activité transcriptionnelle (252). La séquestration temporaire de Nur77 à l'intérieur de structures denses lors de stress génotoxiques pourrait empêcher la prolifération et serait accessoire à l'arrêt du cycle cellulaire permettant à la cellule de réparer son ADN. La fonction anti-apoptotique de Nur77 qui transparaît dans les résultats du chapitre III et dans les travaux de plusieurs autres équipes pourrait également être inhibée par ces corps nucléaires. Dans le chapitre III, nous montrons que l'activité transcriptionnelle de Nur77 est reliée à l'inhibition de l'apoptose. Le blocage de cette activité par une séquestration dans des complexes nucléaires suite à un stress pourrait empêcher l'action pro-survie du récepteur orphelin et favoriser la mort cellulaire. À l'inverse, les corps nucléaires pourraient constituer un frein à l'activité pro-apoptotique de Nur77 soit en empêchant son exportation aux mitochondries et la libération subséquente de cytochrome c, soit en inhibant la transcription de gènes pro-apoptotiques dépendants de Nur77. Ceci empêcherait le déclenchement immédiat de la mort cellulaire programmée et fournirait à la cellule un répit afin de réparer les dommages.

Nur77 pourrait également acquérir une nouvelle fonction dans ces structures. Plusieurs protéines impliquées dans la réparation de l'ADN sont sensibles à l'arrêt de la transcription. Des

facteurs comme CSA/CSB et XPC font partie de la voie de réparation couplée à la transcription (RCT). Cette voie détecte rapidement l'ARN polymérase bloquée sur l'ADN; elle induit sa dégradation et recrute les facteurs de réparation à ce site (297). Des chercheurs ont détecté la formation de corpuscules nucléaires au niveau de la matrice contenant des facteurs du RCT en association avec de l'ADN endommagé. Toutefois, l'existence de ces structures est encore controversée (288). Bien que les corps nucléaires Nur77 soient indépendants des dommages à l'ADN, leur formation pourrait favoriser le pré-assemblage des facteurs de réparation au niveau de la matrice. Nur77 pourrait également jouer un rôle de facteur d'accessibilité aux dommages, en favorisant le remodelage de la chromatine, comme il a été démontré pour p53 et RAR (124, 298). Nur77 est un facteur de transcription particulièrement actif qui s'associe constitutivement à des histone acétyltransférases, lesquelles jouent un rôle dans l'ouverture de la chromatine lors de la réparation de l'ADN.

Plusieurs expériences seront requises afin de vérifier si ces hypothèses sont véridiques. Entre autres, des expériences analysant la réparation de l'ADN en présence ou absence de Nur77 ainsi que la co-localisation avec des facteurs de réparation pourraient être envisagées. De manière plus générale, il serait utile de purifier les complexes renfermant Nur77 qui seraient formés suite à des stress génotoxiques, pour ensuite identifier les différents partenaires d'interaction. Cette étape demandera une mise au point délicate puisque ces complexes semblent résistants aux détergents, donc réfractaires à la solubilisation.

5.1.2 Localisation cytoplasmique de Nur77

Les résultats de microscopie des chapitres I et II montrent sans contredit qu'aucun des stimuli pro-apoptotiques appliqués aux cellules ne provoque de localisation mitochondriale de Nur77. Seul le PMA provoque une exportation partielle de la protéine, ce qui a été observé par d'autres (216), sans pour autant acquérir un patron se superposant aux mitochondries. Le mutant Nur77 Δ DBD s'est localisé dans le cytoplasme des cellules HeLa, mais s'est concentré dans des structures non-identifiées. Des structures analogues ont été observées chez des cellules de cancer du côlon (255). Plusieurs équipes ont montré que Nur77 Δ DBD était spontanément pro-apoptotique (97, 255). Bien que nous n'ayons pas fait de mesures quantitatives de l'apoptose, la morphologie des cellules transfectées avec GFP-Nur77 Δ DBD était normale. Notons qu'il n'est pas

surprenant que ce mutant se localise à l'extérieur du noyau puisqu'il est incapable de se lier à l'ADN et est dépourvu de signaux de localisation nucléaire. Le comportement de ce mutant pourrait donc très bien ne pas représenter celui de la protéine sauvage.

De telles différences dans la localisation et le rôle de Nur77 portent à réflexion. L'une des distinctions notables entre nos méthodes et celles d'autres chercheurs se retrouve au niveau de la nature de la construction GFP. Les équipes travaillant sur la localisation de Nur77 en lien avec l'apoptose ont utilisé presque exclusivement la construction introduite par Li *et al.*, qui consiste en une fusion de la GFP originale de *Aequorea victoria* (AvGFP) en position C-terminale de Nur77 (97). La seule équipe qui a utilisé une autre construction, c'est-à-dire la variante EGFP fusionnée en position N-terminale, n'a pas observé de localisation mitochondriale (206). Nous avons pour notre part utilisé la variante GFP5 S65T publiée par Siemering *et al.* en fusion N-terminale. La GFP5 est censée être plus stable et se replie plus rapidement que la AvGFP, minimisant l'interférence avec son partenaire de fusion (299). Il est donc possible que Nur77 adopte un comportement aberrant sous forme de protéine de fusion, selon la position et la nature de la GFP. De manière analogue, des chercheurs ont constaté que Bcl-2 devenait pro-apoptotique lorsque ciblé à la mitochondrie en fusion avec la GFP (300). La prudence est donc de mise dans l'interprétation des résultats s'appuyant uniquement sur des fusions avec des protéines fluorescentes. Nos résultats sur GFP-Nur77 et les corps nucléaires ont pu être reproduits avec la protéine native, ce qui valide notre approche dans ce cas précis.

L'équipe du Dr Zhang a récemment démontré que la localisation mitochondriale de Nur77 était dépendante de la présence de Bcl-2. Incidemment, ils ont noté que les cellules HEK293T, qui n'expriment pas de Bcl-2, ne présentaient pas de GFP-Nur77 Δ DBD au niveau des mitochondries. L'ajout de Bcl-2 a rétabli la localisation mitochondriale de ce mutant (98). Ceci pourrait expliquer l'absence de GFP-Nur77 mitochondrial chez les cellules HEK293 et les cellules HeLa, deux lignées n'exprimant pas de niveaux détectables de Bcl-2 (301).

5.2 Utilisations des lignées stables

Des lignées cellulaires de cellules embryonnaires rénales humaines (HEK293) surexprimant soit Nur77, soit sa forme dominante négative, ont été générées. Les applications

potentielles de ces lignées sont multiples et ne se limitent pas seulement aux expériences présentées dans cette thèse. Elles peuvent en effet être utilisées pour i) la purification à grande échelle de Nur77 (His-Tag) présent ou non dans les corps nucléaires; ii) l'étude des fonctions physiologiques affectées par la surexpression de Nur77; iii) l'étude des fonctions dépendantes de Nur77, révélées par l'interférence de l'endogène due à la présence d'un mutant dominant-négatif surexprimé; iv) la détermination du potentiel tumorigène et métastatique des différentes lignées *in vivo* dans un modèle animal. Nous avons exploité ces lignées afin d'étudier le rôle de Nur77 dans l'apoptose.

5.3 Nur77 et l'apoptose

Une expression élevée de Nur77 a été rapportée dans plusieurs types cellulaires d'origine tumorale. Sa surexpression a été de plus associée à la résistance à l'apoptose par le céramide (280), le TNF (234), de même qu'à l'augmentation de la prolifération cellulaire (252). Toutefois, le ou les mécanismes en jeu n'ont pas été élucidés. Nous avons fait la démonstration dans le chapitre III que l'expression ectopique de Nur77 menait une résistance accrue à divers stimuli pro-apoptotiques. L'expression stable protégeait contre de faibles doses de FasL, contre les génotoxines étoposide et camptothécine, et contre la toxine du RE thapsigargine. Le tableau III résume l'action de Nur77 ou de son dominant-négatif sur l'apoptose par ces différentes voies. *A priori*, ces traitements activent des voies apoptotiques qui n'ont en commun que l'activation des caspases. Toutefois, dans certains types cellulaires, elles peuvent partager un ou plusieurs médiateurs, notamment l'adaptateur FADD et la caspase-8. Il a été démontré que les cellules HEK293 meurent suite au traitement à l'étoposide en activant la voie de signalisation TRAIL, qui dépend de FADD (159). L'apoptose de cellules embryonnaires soumises à des stress du RE passe elle aussi par FADD et la caspase-8 (111). Nos résultats du chapitre IV (figure 17) montrent clairement que les cellules HEK293 dépendent de FADD pour les trois voies d'apoptose analysées. Il est donc possible que Nur77 agisse en amont ou en aval de cette protéine afin d'inhiber l'apoptose.

Parmi les inhibiteurs de l'activation de la caspase-8, on retrouve les membres de la famille des IAP (dont cIAP1, cIAP2 et survivine) ainsi que cFLIP. Ces gènes sont sous le contrôle de la famille des facteurs de transcription NF- κ B, en conjonction avec d'autres molécules anti-

	Nur77 surexprimé	Nur77 endogène
FasL (élevé)	+	-
FasL (bas) + CHX	-	-
Dommmages à l'ADN (ETOP, CPT)	-	+/-
Stress du RE (thapsigargine)	-	+

Tableau II: Récapitulation de la modulation de l'apoptose par Nur77. Le rôle proposé de Nur77 lorsque surexprimé ou au niveau endogène (obtenu des données des 293Nur77 et 293DN-Nur77, respectivement) est spécifié selon le traitement apoptotique. + : Active/favorise l'apoptose. +/- : Pas de rôle évident. - : Inhibe/bloque l'apoptose.

apoptotiques comme Bcl-XL. Nur77 étant un facteur essentiellement nucléaire dont des interactions avec NF- κ B avaient préalablement été démontrée (222), nous nous sommes intéressés au rôle de cette voie dans la protection de l'apoptose par Nur77. Nos résultats tendent à démontrer que le récepteur orphelin amplifie la voie NF- κ B et que cette suractivation est responsable de l'activité anti-apoptotique de Nur77.

5.3.1 Modulation de la voie NF- κ B par Nur77

Des résultats des chapitres III et IV révèlent pour la première fois une influence positive de Nur77 sur l'activité des facteurs de transcription NF- κ B. Une telle influence fut également observée chez des cellules surexprimant Nur77 de façon transitoire, éliminant du coup toute interrogation sur la nature clonale des lignées stables. Selon la littérature, l'induction de la voie NF- κ B passe principalement par la dégradation cytoplasmique de l'inhibiteur I κ B ou du précurseur p100 (NF- κ B2) par le protéasome, qui permet dans le premier cas la translocation nucléaire de la sous-unité p65, et dans le deuxième cas la maturation de la sous-unité p52 (150). Cependant, l'usage de l'inhibiteur du protéasome ALLN n'a pas affecté l'augmentation de l'activité NF- κ B chez les cellules 293Nur77, alors qu'il empêchait son induction par le PMA. Ceci indique que le récepteur orphelin ne provoque pas l'induction de l'une ou l'autre des voies par protéolyse. Les inhibiteurs CAPE et KBK affectent la voie NF- κ B non pas en empêchant son induction dans le cytoplasme mais plutôt en inhibant la liaison des complexes à l'ADN. On soupçonne que cette action se fait par modification covalente des protéines (302, 303). Ces deux composés ont pu diminuer l'activité NF- κ B chez les cellules 293Nur77. L'inhibition n'était pas totale, ce qui pourrait s'expliquer par (i) un temps d'incubation trop court; (ii) une plus forte liaison des complexes à l'ADN en présence de Nur77; (iii) un changement dans la composition ou la conformation des complexes, qui renfermeraient alors des protéines moins sensibles à l'action des inhibiteurs. Quoi qu'il en soit, le CAPE et la KBK ont tous deux pu neutraliser l'action anti-apoptotique de Nur77, alors que le super-répresseur de la voie classique, I κ B α -M, en fut incapable. Ceci indique qu'une action de Nur77 sur NF- κ B au niveau de l'ADN est responsable de la protection contre la mort cellulaire programmée.

Un article tout récent par Harant et Lindley (294) a rapporté que Nur77 réprimait l'activité du promoteur de l'interleukine-2 chez les cellules Jurkat. Cette action passait par l'inhibition des

éléments NF- κ B et CD28RE situés sur ce promoteur. Cependant, Nur77 n'avait aucune influence sur un rapporteur contenant des éléments NF- κ B issus du LTR du VIH. Il est donc possible que Nur77 ait des effets différents et parfois opposés selon la nature des éléments au niveau du promoteur. Le rapporteur que nous avons utilisé pour mesurer l'activité NF- κ B était issu d'un segment du promoteur de *ICAM-1* (293). Un autre rapporteur composé d'éléments synthétiques issus du promoteur de la chaîne Ig- κ a été pour sa part négativement modulé par Nur77. De plus, le gène *clAP-1*, mais non le gène *Fas*, fut positivement affecté par Nur77. Les séquences des promoteurs, la présence de facteurs auxiliaires et le type cellulaire pourraient ainsi être à l'origine des variations observées. Des analyses de différents promoteurs, dans plus d'un type cellulaire, seront nécessaires à la discrimination des effets sélectifs de Nur77 sur NF- κ B.

Un modèle d'action de Nur77 est proposé dans la figure 20. Tel que démontré par Hong *et al.*, NF- κ B peut empêcher l'action transcriptionnelle de Nur77 en se liant au promoteur et en séquestrant SRC-1. Dans cette situation, Nur77 recrute physiquement le complexe NF- κ B à l'ADN (222). Nous proposons que dans une situation inverse, sur un promoteur dépendant de NF- κ B, Nur77 pourrait avoir un rôle de partenaire silencieux (transcriptionnellement inactif) capable de recruter les complexes NF- κ B par l'intermédiaire de co-activateurs tels que SRC-1. Cette interaction serait indépendante de l'activité du protéasome et pourrait être sélective selon le promoteur. D'autres expériences sont requises afin de prouver ce modèle. Par exemple, il serait approprié d'effectuer une immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) en utilisant un anticorps dirigé contre Nur77 afin d'identifier les promoteurs et gènes associés à ce récepteur orphelin, puis de recouper le tout avec les données de ChIP spécifiques à NF- κ B. Des expériences d'interactions croisées entre diverses variantes de Nur77, SRC-1 et des sous-unités de NF- κ B seraient également souhaitables.

5.3.2 Nur77 et la voie Fas/FasL

Les résultats du chapitre III révèlent une certaine dualité dans la modulation de l'apoptose Fas/FasL par Nur77. À des concentrations élevées (= 50 ng/mL) de FasL, les cellules 293Nur77 sont plus sensibles à l'apoptose que les cellules 293puro. Ce phénomène apparaît également dans les données de Brás *et al.* (280) qui ont travaillé avec des cellules B A20 surexprimant Nur77. Nos résultats préliminaires ont révélé que les cellules HEK293 étaient relativement résistantes à

ce traitement mais que leur sensibilité était décuplée d'un facteur de dix en présence de cycloheximide (CHX), un inhibiteur de la synthèse protéique. Lorsque de la cycloheximide était ajoutée à une concentration n'induisant pas l'apoptose (qui en théorie n'inhibait pas 100 % de la traduction et affectait principalement les protéines labiles), les cellules 293Nur77 se révélaient résistantes à l'apoptose par de faibles doses de FasL.

Nous n'avons pas déterminé la cause de l'augmentation de l'apoptose par Nur77 en présence de doses élevées de FasL. Il se pourrait qu'à ces concentrations la formation des DISC et les signaux qui s'ensuivent sont d'une telle force que l'action des molécules anti-apoptotiques est futile. Dans ce cas, la fonction anti-apoptotique de Nur77 serait submergée alors que sa fonction pro-apoptotique, qui transparaît dans nos résultats, se manifesterait. En présence de cycloheximide et d'une petite quantité de ligand, les signaux seraient initialement moins intenses et plus sensibles à l'action de facteurs labiles tels que cFLIP et les IAP.

Le fait que Nur77 intensifie l'activité de NF- κ B et de *cIAP1* explique bien l'inhibition de l'apoptose par FasL+CHX. Les inhibiteurs de NF- κ B ont pu neutraliser l'effet de Nur77 sur l'apoptose Fas/FasL. Les cellules 293DN-Nur77 sont jusqu'à quatre fois plus sensibles à FasL que les cellules témoins, ce qui appuie le modèle proposé. En effet, les inhibiteurs de NF- κ B ont un effet amplificateur sur l'apoptose par FasL, au même titre que le DN-Nur77. Il est toutefois difficile d'étendre ce modèle aux autres récepteurs de mort. L'apoptose induite par le TNF est elle aussi inhibée par la surexpression de Nur77, en présence de cycloheximide. Cependant, cette inhibition n'est manifeste qu'en l'absence d'une voie NF- κ B fonctionnelle (cellules TRAF^{-/-} ou RelA^{-/-}) (234), en opposition apparente avec nos résultats. Il est néanmoins possible que l'absence de la voie classique, impliquant la sous-unité RelA, autoriserait l'action d'une voie NF- κ B auxiliaire. D'autres sous-unités comme c-Rel ou RelB pourraient alors prendre la relève. L'activation de NF- κ B par Nur77 est indépendante du protéasome, donc potentiellement non-classique. Les travaux sur le TNF ont montré que l'inhibition du déclenchement de l'apoptose par Nur77 pouvait être placée en amont de l'activation de la caspases-8. Des protéines anti-apoptotique dépendante de NF- κ B comme cFLIP et les IAP agissent précisément à ce niveau.

5.3.3 Nur77 et l'apoptose par les dommages à l'ADN

L'utilisation de l'étoposide (un inhibiteur de la topoisomérase II) et de la camptothécine (un inhibiteur de la topoisomérase I) nous ont permis d'étudier l'effet de Nur77 sur l'apoptose en réponse à divers types de dommages à l'ADN. Le récepteur orphelin protège partiellement contre la mort cellulaire induite par ces deux agents. Le dominant-négatif ne semble toutefois pas avoir d'effet significatif sur l'apoptose dans cette situation. L'action de Nur77 est encore une fois dépendante de NF- κ B. Cependant, il faut ajouter un bémol à cette affirmation. L'action pro-apoptotique de l'étoposide (et possiblement d'autres génotoxines) est partiellement dépendante de l'activation de NF- κ B chez les cellules HEK293 (159). Nos expériences avec trois différents inhibiteurs de NF- κ B ont confirmé ce fait. Notons que l'apoptose en réponse à l'étoposide n'était pas totalement bloquée par l'inhibition nucléaire de NF- κ B et que dans un tel cas le niveau d'apoptose résiduelle chez les cellules témoins ou surexprimant Nur77 était équivalente. Puisque Nur77 augmente l'activité de NF- κ B, nous devrions logiquement assister à une amplification de l'apoptose. Il se peut donc que nous soyons en présence d'un mélange de signaux conflictuels dont le résultat net dépendrait de la stimulation préférentielle de facteurs anti- versus pro-apoptotiques. En effet, Nur77 augmente l'expression de *cIAP1* sans pour autant augmenter celle de *Fas*, deux gènes sous le contrôle de NF- κ B. Cette dualité, en conjonction avec l'activité pro-apoptotique latente de Nur77, pourrait expliquer l'inhibition incomplète de l'apoptose induite par les génotoxines ainsi que l'absence d'impact du dominant-négatif. Ce dernier inhiberait à la fois les influences positives et négatives de Nur77, avec un résultat nul.

Une équipe de chercheurs a effectué une étude exhaustive de l'expression de gènes associés à la résistance aux radiations chez des leucémies de cellules B. Parmi les gènes régulés à la hausse, *Nur77* est apparu comme l'un des plus statistiquement significatifs (275). Il semble donc que l'expression de ce récepteur orphelin conférerait un avantage face à la radiothérapie, possiblement en inhibant l'apoptose suite aux dommages à l'ADN.

5.3.4 Nur77 et le stress du réticulum endoplasmique

L'effet le plus spectaculaire de Nur77 présenté dans ces travaux est celui de l'inhibition complète de l'apoptose induite par la thapsigargine. On observe que les cellules 293Nur77 résistent à l'effet de cette drogue. Cette action est de nouveau totalement dépendante de NF- κ B.

Pourquoi l'inhibition est-elle totale dans ce cas alors qu'elle fut partielle dans les cas précédents ? Pour comprendre cela, il faut envisager que la voie NF- κ B joue un rôle essentiel à la survie suite au stress du RE à deux niveaux complémentaires. Tout d'abord, NF- κ B est activé rapidement suite au stress du RE et va par son activité transcriptionnelle favoriser l'expression de gènes dont le rôle sera de faire face aux perturbations. Des chaperones, des protéines de choc thermique et des ubiquitine ligases sont synthétisées suites à un stress du RE et permettent à la cellule de résister à la toxicité des protéines surproduites ou mal repliées (118). De surcroît, NF- κ B peut inhiber la phase effectrice de l'apoptose par les moyens mentionnés précédemment. Ces deux facettes pourraient agir en synergie et protéger complètement la cellule, surtout si tous les éléments sont déjà en place avant même que le stress n'apparaisse.

Le stress du RE joue un rôle important dans les maladies neurodégénératives. La production de protéines aberrantes est particulièrement toxique aux neurones, qui sont incapables de se régénérer. Une telle production et l'apoptose chronique qui s'ensuit ont été associées avec la maladie d'Alzheimer, de Parkinson et de Huntington (105). Fait intéressant, une variante de *Nurr1* a été liée à la forme héréditaire de la maladie de Parkinson (258). À la lumière des résultats présentés ici, il serait tentant de tracer un lien entre les membres de la famille Nur77/NGFI-B et la résistance au stress du RE, qui protégerait contre des maladies neurologiques débilitantes.

Une autre particularité qui ressort de nos analyses est que le dominant-négatif de Nur77 protège partiellement contre l'apoptose. Il semblerait donc que Nur77 revêt un rôle pro-apoptotique dans ce système lorsqu'il est exprimé à des niveaux basaux. Cette notion est appuyée par le fait que l'inhibition de NF- κ B chez les cellules 293Nur77 favorise légèrement l'apoptose en présence de thapsigargine comparativement aux cellules témoin. Ceci n'est pas surprenant puisque il a été démontré que Nur77 était impliqué dans l'apoptose par la thapsigargine (230) et l'ionophore de calcium A23187, un autre inducteur du stress du RE (97). Nur77 est un facteur activé par la voie du calcium et pourrait y jouer un rôle d'intermédiaire pour induire l'apoptose. Sa seule expression n'est toutefois probablement pas suffisante à l'apoptose, puisque les cellules 293Nur77 sont tout à fait viables. Un autre signal agissant sur Nur77 ou sur ses molécules-cibles serait nécessaire pour permettre l'apoptose. Il pourrait prendre la forme d'une voie de signalisation

complémentaire ou d'une modification post-traductionnelle. De plus amples travaux seront nécessaires afin d'éclaircir cette question.

5.3.5 Nur77 chez les cellules MCF-7

La grande majorité des résultats obtenus dans nos travaux sur l'apoptose se sont basés sur un type cellulaire unique: les cellules HEK293. La variété des paramètres à étudier nous ont en effet obligé à nous concentrer davantage sur un modèle en particulier. Il est toutefois important de vérifier si les phénomènes peuvent être observés chez des cellules d'autres provenances. Des cellules MCF-7 issues d'un adénocarcinome mammaire humain ont été utilisées pour générer une lignée surexprimant Nur77. L'étude de cette lignée a permis de souligner l'existence de points communs et divergents dans le rôle de cette protéine. Suite à divers traitements, on constate que Nur77 est principalement pro-apoptotique dans cette lignée, à l'exception de la thapsigargine. Il est donc possible que la fonction pro-apoptotique de Nur77 soit beaucoup moins latente dans ces cellules. Il a été suggéré que Nur77 modulait l'apoptose en augmentant l'expression du facteur de transcription E2F-1 (271). Ce facteur est bien connu pour entrer en synergie avec p53 dans l'apoptose (126). Contrairement aux cellules HEK293, les cellules MCF-7 comportent une voie p53 fonctionnelle. Ce dernier est impliqué dans l'expression de *Fas* (voie extrinsèque de l'apoptose) et de *Bax* et *PUMA* (voie intrinsèque). Les cellules MCF-7 sont reconnues pour exprimer de faible niveau de *Fas* (304) et leur apoptose en réponse aux dommages à l'ADN ne passe pas par NF- κ B et FADD mais plutôt par la voie intrinsèque (158). Nous pouvons donc spéculer que l'augmentation de l'activité de E2F-1 et de p53 chez les cellules MCF-7(Nur77) serait susceptible d'accroître leur sensibilité à FasL et aux dommages à l'ADN. En revanche, aucun lien n'a jusqu'à maintenant été établi entre ces facteurs et le stress du RE. Ces résultats sont toutefois de nature préliminaire et demandent à être complétés avec des données sur l'activité de p53 et de NF- κ B, de même que sur l'effet du dominant-négatif de Nur77. Il en ressort tout de même que la nature multifonctionnelle de Nur77 nous empêche d'étendre son rôle à tous les types cellulaires.

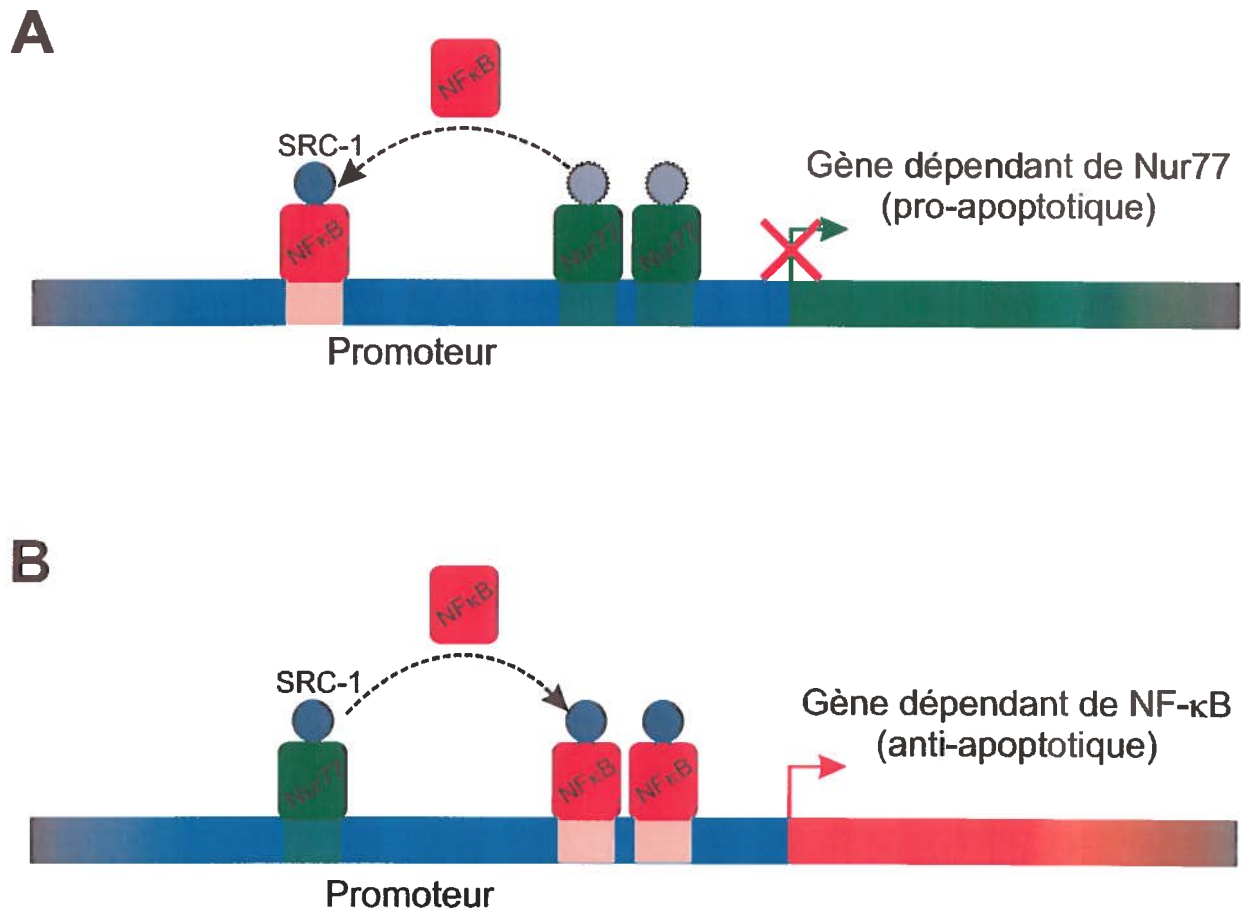


Figure 19: Modèle d'interaction de Nur77 avec NF-κB. **A** NF-κB réprime l'activité de Nur77 en se liant à un promoteur dépendant de Nur77 (p. ex. *POMC*) et en empêchant sa liaison avec SRC-1. Nur77 recrute physiquement NF-κB au promoteur (216). **B** Sur un promoteur dépendant de NF-κB, Nur77 pourrait se lier à un site spécifique et faciliter le recrutement subséquent de NF-κB et la transcription des gènes anti-apoptotiques (p.ex. *CIAP1*). Cette interaction passerait par l'intermédiaire de SRC-1 ou d'autres co-régulateurs. Selon la nature et la position des sites, NF-κB pourrait également être inhibé.

CHAPITRE 6 : CONCLUSION

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis de définir de nouveaux comportements et de nouvelles fonctions du récepteur nucléaire orphelin Nur77. Tout d'abord, nous avons fait la description de nouvelles structures nucléaires formées par Nur77 en réponse aux stress génotoxiques. Une bonne partie des questions soulevées par ce nouveau phénomène ont obtenu des réponses négatives: pas d'identité connue, pas de fonction évidente, pas de voie de signalisation impliquée. Ces questions devront être analysées plus en profondeur à l'aide de différents outils moléculaires. Les analyses de localisation nous ont également permis d'affirmer que la localisation de Nur77 aux mitochondries n'est pas un phénomène universel. Notre construction formée de Nur77 en fusion avec la protéine fluorescente verte n'a en aucune circonstance adopté le patron de localisation pourtant décrit par d'autres. Ce phénomène propre à Nur77 est encore controversé puisqu'une seule équipe l'a véritablement étudié en détails. Il serait important de valider (ou invalider) indépendamment les résultats obtenus par d'autres équipes avant de s'aventurer plus loin. Par exemple, il serait essentiel de déterminer si les gènes cibles de Nur77 sont véritablement indispensables à son activité apoptotique, ou si seule sa localisation est importante.

Le mode d'induction de l'apoptose par Nur77 est un sujet chaud qui risque d'alimenter les débats pour encore quelques années. La situation est complexifiée par le fait que Nur77 peut efficacement inhiber l'apoptose dans certaines situations, principalement lorsqu'il est surexprimé. Nos travaux démontrent que c'est effectivement le cas chez les cellules HEK293, et que cette action passe par la potentialisation de la voie NF- κ B. Nos résultats soulèvent évidemment de nombreuses questions quant au fonctionnement et au rôle véritable de Nur77 dans la cellule.

L'action anti-apoptotique de Nur77 est-elle universelle ?

Des résultats obtenus avec les cellules HEK293 et MCF-7 indiquent que le type cellulaire peut influencer l'action de Nur77. Il se pourrait donc que différents médiateurs de l'apoptose soient différenciellement affectés par ce récepteur orphelin, soit pour activer ou pour inhiber l'apoptose. Comme bien d'autres protéines, Nur77 semble être multifonctionnel. La contribution d'autres facteurs à l'équilibre entre les deux fonctions apoptotiques de Nur77, sans oublier ses fonctions non-apoptotiques, devra être analysée. L'utilisation de lignées stables issues de types

cellulaires bien caractérisés représenterait un bon point de départ. La fonction de Nur77 pourrait également dépendre de son niveau d'expression. Il serait donc intéressant d'obtenir des lignées renfermant une construction inductible permettant d'obtenir un niveau contrôlé de cette protéine, afin de jauger les niveaux d'expression requis pour ses diverses activités.

Comment Nur77 influence-t-il NF- κ B?

Nur77 semble interagir intimement avec la voie NF- κ B. Nos analyses se sont toutefois limitées à évaluer l'activité d'un rapporteur dépendant de NF- κ B dans les diverses lignées. Des études plus poussées devront être entreprises. Il serait par exemple intéressant de vérifier le niveau d'expression des différentes sous-unités de NF- κ B dans le noyau, ainsi que la capacité des complexes à se lier à l'ADN. Des tests de retardement sur gel et de "super-retardement" pourraient être accomplis. Les interactions entre les deux facteurs de transcription et des protéines accessoires devront également être étudiées. Ces interactions pourraient déterminer la spécificité et la conséquence de la relation entre Nur77 et le NF- κ B au niveau de l'expression des gènes. Encore une fois, il serait intéressant de déterminer s'il est possible de dissocier l'activité transcriptionnelle de Nur77 de son activité anti-apoptotique.

Nur77 peut-il influencer d'autres voies dépendantes de NF- κ B ?

La biologie de NF- κ B ne se limite pas à l'apoptose. Ce facteur de transcription est bien connu pour son rôle répandu dans la régulation de l'immunité. Des molécules comme l'IL-8, RANTES et ICAM-1, impliqués dans l'inflammation et la migration des leucocytes, sont sous le contrôle partiel de NF- κ B. Celui-ci est également impliqué dans le développement des organes lymphoïdes périphériques et dans l'ontogénie des lymphocytes B (143) Il serait donc fort intéressant de déterminer le rôle de Nur77 dans ces conditions. Les facteurs NF- κ B sont impliqués dans une foule d'autres voies physiologiques partout dans l'organisme. Affirmer que tous les inducteurs de cette famille mènent à l'activation des mêmes gènes dans toutes les cellules serait une grossière simplification. Il est évident qu'il existe un niveau de régulation très précise déterminant les gènes à exprimer, selon le contexte et le type cellulaire. Nur77 représente un cofacteur candidat dont le rôle serait d'amplifier ou de réduire l'activité transcriptionnelle de NF- κ B, selon le gène et le stimulus.

Nur77 peut-il influencer d'autres facteurs de transcription ?

Il est possible que le rôle accessoire de Nur77 ne se limite pas seulement à NF- κ B. Par exemple, un site composite NurRE-STAT a été identifié par le promoteur de la POMC (297). Celui-ci permet la coopération entre Nur77 et CREB. Les promoteurs sont le lieu d'interactions multiples entre divers facteurs de transcription, dont certains n'auraient pour rôle que de moduler l'activité de leurs voisins. La caractérisation des réactions croisées entre ces facteurs est une tâche colossale mais qui réserve bien des surprises. On doit donc s'attendre à ce que Nur77 influence l'activité de plusieurs autres facteurs de transcription d'origines diverses, et inversement. L'étude de ces interactions devra se faire dans un contexte naturel, c'est-à-dire avec des séquences d'ADN provenant de véritables promoteurs, et non à partir d'éléments "consensus" synthétiques dont l'arrangement pourrait ne pas se prêter à la géométrie complexe qui a été dictée par l'évolution des promoteurs naturels.

Le rôle anti-apoptotique de Nur77 est-il significatif *in vivo* ?

Nos expériences se sont essentiellement limitées à un modèle cellulaire *in vitro*. Qu'en est-il du rôle de Nur77 dans l'organisme, en ce qui a trait à la mort cellulaire ? Bien entendu, nous savons que Nur77 est important dans la sélection négative des thymocytes. À l'inverse, nous savons depuis belle lurette qu'il s'agit également d'un gène activé par des facteurs de survie et de croissance chez une variété de cellules, autant normales que tumorales. Pourtant, son rôle dans la survie cellulaire n'a jusqu'à maintenant jamais été élucidé. Le modèle d'inhibition de l'apoptose que nous proposons devra donc être validé *in vivo*. Pour y parvenir, il serait possible d'utiliser des souris transgéniques ou knock-out. Les souris Nur77 knock-out ne présentent pas de phénotype évident, ce qui suggère une redondance entre récepteurs orphelins de la même famille. À date, aucune souris déficiente pour la famille complète NGFI-B/Nur77 n'a été générée, soit par triple knock-out ou par expression généralisée d'un antisens ou d'un dominant-négatif. Il est possible que ces manipulations génétiques soient létales. Il serait tout de même intéressant d'observer le développement de l'embryon. De plus, des constructions inductibles ou exprimées spécifiquement dans certains tissus permettraient d'assurer la viabilité. Dans de tels cas, nous devrions nous attendre à observer une apoptose massive accompagnée de problèmes développementaux, ou du moins à obtenir des cellules davantage sensibles à certains stress. Ces souris pourraient aussi

démontrer d'autres phénotypes intéressants qui nous renseigneraient davantage sur la biologie de la famille des récepteurs orphelins NGFI-B/Nur77, encore bien mystérieuse.

REMERCIEMENTS

Je n'aurais pu passer à travers ces quatre années bien remplies sans l'apport de plusieurs personnes autant dévouées que généreuses. Mes plus sincères remerciements à François Denis qui m'a accueilli dans sa jeune équipe et m'a fait confiance tout au long de ces années. Grâce à toi, j'ai acquis une méthode de travail qui a fait ses preuves et qui est maintenant réputée partout dans l'Institut et sûrement ailleurs. Ton ardeur au travail, ta curiosité et ta créativité seront pour moi une référence dans ma carrière future.

Merci aux collègues de laboratoire que j'ai eu le plaisir de côtoyer pendant ces années. Un merci spécial à Martin, avec qui j'ai évolué au doctorat. Martin, tu es un roc, une balise, tu as été l'âme du laboratoire depuis le tout début. Je te souhaite le plus grand succès dans ta carrière et plein de bonheur pour toi et ta petite famille. Merci aux filles qui ont fait leur maîtrise dans le labo: Sylvie, Geneviève et Véronique. Vous êtes charmantes, tenaces et brillantes. J'ai eu beaucoup de plaisir à collaborer avec vous; votre sourire a mis de la lumière dans le labo. J'aimerais également exprimer ma gratitude envers d'autres collègues au doctorat qui ont été pour moi autant des collaborateurs précieux que des amis fidèles: Étienne, Jean-Guy, Laurent et Marc. J'ai énormément apprécié nos rencontres et nos discussions. Je crois que le secret du succès en sciences est d'aller chercher le meilleur que chacun peut offrir. Il est donc important de créer des liens basés sur le respect et la bonne entente. J'espère bien avoir l'occasion de travailler avec vous dans le futur. Beaucoup d'autres collègues ont eu un apport à mon doctorat autant au niveau scientifique que social. À eux, un gros merci, je ne vous oublierai pas. L'Institut Armand-Frappier est unique par son site enchanteur et sa vie étudiante dynamique. En six ans, j'ai vu bien des étudiants passer, participé à bien des événements, et fut témoin de bien des changements. Tant de sorties, de colloques, de séminaires, de 5 à 7 et de *party*. Des réunions de labo *chips et bière*, des soirées *Diablo II*, des tournois *Killer* enlevants, et bien d'autres. Je quitte la tête pleine de souvenirs et j'espère que la communauté étudiante et scientifique de l'Institut conservera sa joie de vivre pour encore de longues années.

Merci aux organismes subventionnaires qui m'ont soutenu au niveau financier pendant mon doctorat, c'est-à-dire la Fondation Armand-Frappier et le Fonds de Recherche en Santé du

Québec. Merci aussi à l'INRS dont le programme d'aide financière aux études est un modèle à suivre.

Je termine en soulignant l'importance de mes proches: ma famille et ma conjointe, Manon. Vous m'avez soutenus pendant ces quatre années difficiles et avez partagé avec moi de multiples sacrifices. Je vous en serez éternellement reconnaissants. Si j'y parviens un jour, ma contribution à la société sera la vôtre, mon oeuvre sera votre oeuvre.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Lockshin, R. A. et Z. Zakeri. 2001. «Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory». Nat Rev Mol Cell Biol, vol. 2, no. 7, p. 545-550.
2. Kerr, J. F., A. H. Wyllie et A. R. Currie. 1972. «Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics». Br J Cancer, vol. 26, no. 4, p. 239-257.
3. Saraste, A. et K. Pulkki. 2000. «Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis». Cardiovasc Res, vol. 45, no. 3, p. 528-537.
4. Edinger, A. L. et C. B. Thompson. 2004. «Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy». Curr Opin Cell Biol, vol. 16, no. 6, p. 663-669.
5. Meier, P., A. Finch et G. Evan. 2000. «Apoptosis in development». Nature, vol. 407, no. 6805, p. 796-801.
6. Rathmell, J. C. et C. B. Thompson. 2002. «Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease». Cell, vol. 109 Suppl, p. S97-107.
7. Petak, I. et J. A. Houghton. 2001. «Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy». Pathol Oncol Res, vol. 7, no. 2, p. 95-106.
8. Fadcel, B., S. Orrenius et B. Zhivotovsky. 1999. «Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony?». Biochem Biophys Res Commun, vol. 266, no. 3, p. 699-717.
9. Yuan, J., S. Shaham, S. Ledoux, H. M. Ellis et H. R. Horvitz. 1993. «The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme». Cell, vol. 75, no. 4, p. 641-652.
10. Hengartner, M. O. et H. R. Horvitz. 1994. «C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2». Cell, vol. 76, no. 4, p. 665-676.
11. Fernandes-Alnemri, T., G. Litwack et E. S. Alnemri. 1994. «CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme». J Biol Chem, vol. 269, no. 49, p. 30761-30764.
12. Kumar, S., M. Kinoshita, M. Noda, N. G. Copeland et N. A. Jenkins. 1994. «Induction of apoptosis by the mouse Nedd2 gene, which encodes a protein similar to the product of the Caenorhabditis elegans cell death gene ced-3 and the mammalian IL-1 beta-converting enzyme». Genes Dev, vol. 8, no. 14, p. 1613-1626.
13. Denault, J. B. et G. S. Salvesen. 2002. «Caspases: keys in the ignition of cell death». Chem Rev, vol. 102, no. 12, p. 4489-4500.
14. Wang, S., M. Miura, Y. K. Jung, H. Zhu, E. Li et J. Yuan. 1998. «Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE». Cell, vol. 92, no. 4, p. 501-509.

15. Li, P., H. Allen, S. Banerjee, S. Franklin, L. Herzog, C. Johnston, J. McDowell, M. Paskind, L. Rodman, J. Salfeld et al. 1995. «Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock». Cell, vol. 80, no. 3, p. 401-411.
16. Kuida, K., T. S. Zheng, S. Na, C. Kuan, D. Yang, H. Karasuyama, P. Rakic et R. A. Flavell. 1996. «Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice». Nature, vol. 384, no. 6607, p. 368-372.
17. Kuida, K., T. F. Haydar, C. Y. Kuan, Y. Gu, C. Taya, H. Karasuyama, M. S. Su, P. Rakic et R. A. Flavell. 1998. «Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9». Cell, vol. 94, no. 3, p. 325-337.
18. Varfolomeev, E. E., M. Schuchmann, V. Luria, N. Chiannikulchai, J. S. Beckmann, I. L. Mett, D. Rebrikov, V. M. Brodianski, O. C. Kemper, O. Kollet, T. Lapidot, D. Soffer, T. Sobe, K. B. Avraham, T. Goncharov, H. Holtmann, P. Lonai et D. Wallach. 1998. «Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally». Immunity, vol. 9, no. 2, p. 267-276.
19. Hu, S., S. J. Snipas, C. Vincenz, G. Salvesen et V. M. Dixit. 1998. «Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease». J Biol Chem, vol. 273, no. 45, p. 29648-29653.
20. Humke, E. W., J. Ni et V. M. Dixit. 1998. «ERICE, a novel FLICE-activatable caspase». J Biol Chem, vol. 273, no. 25, p. 15702-15707.
21. Chandler, J. M., G. M. Cohen et M. MacFarlane. 1998. «Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver». J Biol Chem, vol. 273, no. 18, p. 10815-10818.
22. Denis, F., E. Rheaume, S. M. Aouad, A. Alam, R. P. Sekaly et L. Y. Cohen. 1998. «The role of caspases in T cell development and the control of immune responses». Cell Mol Life Sci, vol. 54, no. 9, p. 1005-1019.
23. Smith, C. A., T. Farrar et R. G. Goodwin. 1994. «The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death». Cell, vol. 76, no. 6, p. 959-962.
24. Ashkenazi, A. et V. M. Dixit. 1998. «Death receptors: signaling and modulation». Science, vol. 281, no. 5381, p. 1305-1308.
25. Nagata, S. et P. Golstein. 1995. «The Fas death factor». Science, vol. 267, no. 5203, p. 1449-1456.
26. Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, F. C. Kischkel, K. O'Rourke, A. Shevchenko, J. Ni, C. Scaffidi, J. D. Bretz, M. Zhang, R. Gentz, M. Mann, P. H. Krammer, M. E. Peter et V. M. Dixit. 1996. «FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex». Cell, vol. 85, no. 6, p. 817-827.

27. Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, M. Tewari et V. M. Dixit. 1995. «FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis». Cell, vol. 81, no. 4, p. 505-512.
28. Micheau, O., E. Solary, A. Hammann et M. T. Dimanche-Boitrel. 1999. «Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs». J Biol Chem, vol. 274, no. 12, p. 7987-7992.
29. Tang, D., J. M. Lahti, J. Grenet et V. J. Kidd. 1999. «Cycloheximide-induced T-cell death is mediated by a Fas-associated death domain-dependent mechanism». J Biol Chem, vol. 274, no. 11, p. 7245-7252.
30. Shimada, K., M. Nakamura, E. Ishida, M. Kishi, S. Yonehara et N. Konishi. 2002. «Phosphorylation of Fas-associated death domain contributes to enhancement of etoposide-induced apoptosis in prostate cancer cells». Jpn J Cancer Res, vol. 93, no. 10, p. 1164-1174.
31. Kabra, N. H., C. Kang, L. C. Hsing, J. Zhang et A. Winoto. 2001. «T cell-specific FADD-deficient mice: FADD is required for early T cell development». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 98, no. 11, p. 6307-6312.
32. Hu, S., C. Vincenz, M. Buller et V. M. Dixit. 1997. «A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis». J Biol Chem, vol. 272, no. 15, p. 9621-9624.
33. Scaffidi, C., I. Schmitz, P. H. Krammer et M. E. Peter. 1999. «The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis». J Biol Chem, vol. 274, no. 3, p. 1541-1548.
34. Chang, D. W., Z. Xing, Y. Pan, A. Algeciras-Schimmich, B. C. Barnhart, S. Yaish-Ohad, M. E. Peter et X. Yang. 2002. «c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis». Embo J, vol. 21, no. 14, p. 3704-3714.
35. Tanaka, T., M. Yoshimi, T. Maeyama, N. Hagimoto, K. Kuwano et N. Hara. 2002. «Resistance to Fas-mediated apoptosis in human lung fibroblast». Eur Respir J, vol. 20, no. 2, p. 359-368.
36. Lee, S. H., H. S. Kim, S. Y. Kim, Y. S. Lee, W. S. Park, S. H. Kim, J. Y. Lee et N. J. Yoo. 2003. «Increased expression of FLIP, an inhibitor of Fas-mediated apoptosis, in stomach cancer». Apmis, vol. 111, no. 2, p. 309-314.
37. Yeh, W. C., A. Itie, A. J. Elia, M. Ng, H. B. Shu, A. Wakeham, C. Mirtsos, N. Suzuki, M. Bonnard, D. V. Goeddel et T. W. Mak. 2000. «Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development». Immunity, vol. 12, no. 6, p. 633-642.
38. Chang, H. Y., X. Yang et D. Baltimore. 1999. «Dissecting Fas signaling with an altered-specificity death-domain mutant: requirement of FADD binding for apoptosis but not Jun N-terminal kinase activation». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 96, no. 4, p. 1252-1256.

39. Yang, X., R. Khosravi-Far, H. Y. Chang et D. Baltimore. 1997. «Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis». Cell, vol. 89, no. 7, p. 1067-1076.
40. Torii, S., D. A. Egan, R. A. Evans et J. C. Reed. 1999. «Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs)». Embo J, vol. 18, no. 21, p. 6037-6049.
41. Holler, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J. L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed et J. Tschopp. 2000. «Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule». Nat Immunol, vol. 1, no. 6, p. 489-495.
42. Tartaglia, L. A. et D. V. Goeddel. 1992. «Two TNF receptors». Immunol Today, vol. 13, no. 5, p. 151-153.
43. Duan, H. et V. M. Dixit. 1997. «RAIDD is a new 'death' adaptor molecule». Nature, vol. 385, no. 6611, p. 86-89.
44. Kelliher, M. A., S. Grimm, Y. Ishida, F. Kuo, B. Z. Stanger et P. Leder. 1998. «The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal». Immunity, vol. 8, no. 3, p. 297-303.
45. Liu, Z. G., H. Hsu, D. V. Goeddel et M. Karin. 1996. «Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death». Cell, vol. 87, no. 3, p. 565-576.
46. Micheau, O. et J. Tschopp. 2003. «Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes». Cell, vol. 114, no. 2, p. 181-190.
47. Muppidi, J. R., J. Tschopp et R. M. Siegel. 2004. «Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction». Immunity, vol. 21, no. 4, p. 461-465.
48. Wiley, S. R., K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C. P. Huang, J. K. Nicholl, G. R. Sutherland, T. D. Smith, C. Rauch, C. A. Smith et et al. 1995. «Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis». Immunity, vol. 3, no. 6, p. 673-682.
49. Griffith, T. S. et D. H. Lynch. 1998. «TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms». Curr Opin Immunol, vol. 10, no. 5, p. 559-563.
50. Jeremias, I., I. Herr, T. Boehler et K. M. Debatin. 1998. «TRAIL/Apo-2-ligand-induced apoptosis in human T cells». Eur J Immunol, vol. 28, no. 1, p. 143-152.
51. Chaudhary, P. M., M. Eby, A. Jasmin, A. Bookwalter, J. Murray et L. Hood. 1997. «Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway». Immunity, vol. 7, no. 6, p. 821-830.

52. Walczak, H., M. A. Degli-Esposti, R. S. Johnson, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, N. Boiani, M. S. Timour, M. J. Gerhart, K. A. Schooley, C. A. Smith, R. G. Goodwin et C. T. Rauch. 1997. «TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL». Embo J, vol. 16, no. 17, p. 5386-5397.
53. Nagane, M., G. Pan, J. J. Weddle, V. M. Dixit, W. K. Cavenee et H. J. Huang. 2000. «Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo». Cancer Res, vol. 60, no. 4, p. 847-853.
54. Nagane, M., H. J. Huang et W. K. Cavenee. 2001. «The potential of TRAIL for cancer chemotherapy». Apoptosis, vol. 6, no. 3, p. 191-197.
55. Marsters, S. A., J. P. Sheridan, R. M. Pitti, J. Brush, A. Goddard et A. Ashkenazi. 1998. «Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3». Curr Biol, vol. 8, no. 9, p. 525-528.
56. Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Krammer et M. E. Peter. 1998. «Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways». Embo J, vol. 17, no. 6, p. 1675-1687.
57. Yin, X. M., K. Wang, A. Gross, Y. Zhao, S. Zinkel, B. Klocke, K. A. Roth et S. J. Korsmeyer. 1999. «Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis». Nature, vol. 400, no. 6747, p. 886-891.
58. Lacronique, V., A. Mignon, M. Fabre, B. Viollet, N. Rouquet, T. Molina, A. Porteu, A. Henrion, D. Bouscary, P. Varlet, V. Joulin et A. Kahn. 1996. «Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced by an anti-Fas antibody in mice». Nat Med, vol. 2, no. 1, p. 80-86.
59. Bernardi, P., L. Scorrano, R. Colonna, V. Petronilli et F. Di Lisa. 1999. «Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues». Eur J Biochem, vol. 264, no. 3, p. 687-701.
60. Liu, X., C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson et X. Wang. 1996. «Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c». Cell, vol. 86, no. 1, p. 147-157.
61. Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri et X. Wang. 1997. «Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade». Cell, vol. 91, no. 4, p. 479-489.
62. Susin, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D. R. Goodlett, R. Aebersold, D. P. Siderovski, J. M. Penninger et G. Kroemer. 1999. «Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor». Nature, vol. 397, no. 6718, p. 441-446.
63. Li, L. Y., X. Luo et X. Wang. 2001. «Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria». Nature, vol. 412, no. 6842, p. 95-99.

64. Verhagen, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson et D. L. Vaux. 2000. «Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins». Cell, vol. 102, no. 1, p. 43-53.
65. Verhagen, A. M., J. Silke, P. G. Ekert, M. Pakusch, H. Kaufmann, L. M. Connolly, C. L. Day, A. Tikoo, R. Burke, C. Wrobel, R. L. Moritz, R. J. Simpson et D. L. Vaux. 2002. «HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins». J Biol Chem, vol. 277, no. 1, p. 445-454.
66. Mancini, M., D. W. Nicholson, S. Roy, N. A. Thornberry, E. P. Peterson, L. A. Casciola-Rosen et A. Rosen. 1998. «The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling». J Cell Biol, vol. 140, no. 6, p. 1485-1495.
67. Samali, A., J. Cai, B. Zhivotovsky, D. P. Jones et S. Orrenius. 1999. «Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells». Embo J, vol. 18, no. 8, p. 2040-2048.
68. Loeffler, M. et G. Kroemer. 2000. «The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita». Exp Cell Res, vol. 256, no. 1, p. 19-26.
69. Tsujimoto, Y., J. Cossman, E. Jaffe et C. M. Croce. 1985. «Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma». Science, vol. 228, no. 4706, p. 1440-1443.
70. Vaux, D. L., S. Cory et J. M. Adams. 1988. «Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells». Nature, vol. 335, no. 6189, p. 440-442.
71. McDonnell, T. J., N. Deane, F. M. Platt, G. Nunez, U. Jaeger, J. P. McKearn et S. J. Korsmeyer. 1989. «bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation». Cell, vol. 57, no. 1, p. 79-88.
72. Hockenbery, D., G. Nunez, C. Milliman, R. D. Schreiber et S. J. Korsmeyer. 1990. «Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death». Nature, vol. 348, no. 6299, p. 334-336.
73. Borner, C. 2003. «The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions». Mol Immunol, vol. 39, no. 11, p. 615-647.
74. Danial, N. N. et S. J. Korsmeyer. 2004. «Cell death: critical control points». Cell, vol. 116, no. 2, p. 205-219.
75. Rathmell, J. C. et C. B. Thompson. 1999. «The central effectors of cell death in the immune system». Annu Rev Immunol, vol. 17, p. 781-828.
76. Degenhardt, K., R. Sundararajan, T. Lindsten, C. Thompson et E. White. 2002. «Bax and Bak independently promote cytochrome C release from mitochondria». J Biol Chem, vol. 277, no. 16, p. 14127-14134.

77. Shimizu, S., T. Ido, T. Yanagida et Y. Tsujimoto. 2000. «Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c». J Biol Chem, vol. 275, no. 16, p. 12321-12325.
78. Muchmore, S. W., M. Sattler, H. Liang, R. P. Meadows, J. E. Harlan, H. S. Yoon, D. Nettlesheim, B. S. Chang, C. B. Thompson, S. L. Wong, S. L. Ng et S. W. Fesik. 1996. «X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death». Nature, vol. 381, no. 6580, p. 335-341.
79. Kuwana, T., M. R. Mackey, G. Perkins, M. H. Ellisman, M. Latterich, R. Schneider, D. R. Green et D. D. Newmeyer. 2002. «Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane». Cell, vol. 111, no. 3, p. 331-342.
80. Kluck, R. M., M. D. Esposito, G. Perkins, C. Renken, T. Kuwana, E. Bossy-Wetzler, M. Goldberg, T. Allen, M. J. Barber, D. R. Green et D. D. Newmeyer. 1999. «The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol». J Cell Biol, vol. 147, no. 4, p. 809-822.
81. Suzuki, M., R. J. Youle et N. Tjandra. 2000. «Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization». Cell, vol. 103, no. 4, p. 645-654.
82. Chipuk, J. E., T. Kuwana, L. Bouchier-Hayes, N. M. Droin, D. D. Newmeyer, M. Schuler et D. R. Green. 2004. «Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis». Science, vol. 303, no. 5660, p. 1010-1014.
83. Vieira, H. L., P. Boya, I. Cohen, C. El Hamel, D. Haouzi, S. Druillenc, A. S. Belzacq, C. Brenner, B. Roques et G. Kroemer. 2002. «Cell permeable BH3-peptides overcome the cytoprotective effect of Bcl-2 and Bcl-X(L)». Oncogene, vol. 21, no. 13, p. 1963-1977.
84. Scorrano, L., M. Ashiya, K. Buttle, S. Weiler, S. A. Oakes, C. A. Mannella et S. J. Korsmeyer. 2002. «A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis». Dev Cell, vol. 2, no. 1, p. 55-67.
85. Puthalakath, H., D. C. Huang, L. A. O'Reilly, S. M. King et A. Strasser. 1999. «The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex». Mol Cell, vol. 3, no. 3, p. 287-296.
86. Letai, A., M. C. Bassik, L. D. Walensky, M. D. Sorcinelli, S. Weiler et S. J. Korsmeyer. 2002. «Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics». Cancer Cell, vol. 2, no. 3, p. 183-192.
87. Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh et M. E. Greenberg. 1997. «Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery». Cell, vol. 91, no. 2, p. 231-241.
88. Jiang, A. et E. A. Clark. 2001. «Involvement of Bik, a proapoptotic member of the Bcl-2 family, in surface IgM-mediated B cell apoptosis». J Immunol, vol. 166, no. 10, p. 6025-6033.

89. Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi et N. Tanaka. 2000. «Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis». Science, vol. 288, no. 5468, p. 1053-1058.
90. Nakano, K. et K. H. Vousden. 2001. «PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53». Mol Cell, vol. 7, no. 3, p. 683-694.
91. Cheng, E. H., M. C. Wei, S. Weiler, R. A. Flavell, T. W. Mak, T. Lindsten et S. J. Korsmeyer. 2001. «BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis». Mol Cell, vol. 8, no. 3, p. 705-711.
92. Hausmann, G., L. A. O'Reilly, R. van Driel, J. G. Beaumont, A. Strasser, J. M. Adams et D. C. Huang. 2000. «Pro-apoptotic apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-x(L)». J Cell Biol, vol. 149, no. 3, p. 623-634.
93. Hu, Y., M. A. Benedict, D. Wu, N. Inohara et G. Nunez. 1998. «Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 95, no. 8, p. 4386-4391.
94. Song, Q., Y. Kuang, V. M. Dixit et C. Vincenz. 1999. «Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1». Embo J, vol. 18, no. 1, p. 167-178.
95. Schmitt, E., C. Paquet, M. Beauchemin et R. Bertrand. 2004. «Bcl-xES, a BH4- and BH2-containing antiapoptotic protein, delays Bax oligomer formation and binds Apaf-1, blocking procaspase-9 activation». Oncogene, vol. 23, no. 22, p. 3915-3931.
96. Kharbanda, S., S. Saxena, K. Yoshida, P. Pandey, M. Kaneki, Q. Wang, K. Cheng, Y. N. Chen, A. Campbell, T. Sudha, Z. M. Yuan, J. Narula, R. Weichselbaum, C. Nalin et D. Kufe. 2000. «Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage». J Biol Chem, vol. 275, no. 1, p. 322-327.
97. Li, H., S. K. Kolluri, J. Gu, M. I. Dawson, X. Cao, P. D. Hobbs, B. Lin, G. Chen, J. Lu, F. Lin, Z. Xie, J. A. Fontana, J. C. Reed et X. Zhang. 2000. «Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3». Science, vol. 289, no. 5482, p. 1159-1164.
98. Lin, B., S. K. Kolluri, F. Lin, W. Liu, Y. H. Han, X. Cao, M. I. Dawson, J. C. Reed et X. K. Zhang. 2004. «Conversion of Bcl-2 from Protector to Killer by Interaction with Nuclear Orphan Receptor Nur77/TR3». Cell, vol. 116, no. 4, p. 527-540.
99. Li, L., P. S. Lorenzo, K. Bogi, P. M. Blumberg et S. H. Yuspa. 1999. «Protein kinase Cdelta targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by an adenoviral vector». Mol Cell Biol, vol. 19, no. 12, p. 8547-8558.
100. Mihara, M., S. Erster, A. Zaika, O. Petrenko, T. Chittenden, P. Pancoska et U. M. Moll. 2003. «p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria». Mol Cell, vol. 11, no. 3, p. 577-590.

101. Sansome, C., A. Zaika, N. D. Marchenko et U. M. Moll. 2001. «Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells». FEBS Lett, vol. 488, no. 3, p. 110-115.
102. Konishi, A., S. Shimizu, J. Hirota, T. Takao, Y. Fan, Y. Matsuoka, L. Zhang, Y. Yoneda, Y. Fujii, A. I. Skoultchi et Y. Tsujimoto. 2003. «Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks». Cell, vol. 114, no. 6, p. 673-688.
103. Acehan, D., X. Jiang, D. G. Morgan, J. E. Heuser, X. Wang et C. W. Akey. 2002. «Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation». Mol Cell, vol. 9, no. 2, p. 423-432.
104. Kaufman, R. J. 1999. «Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls». Genes Dev, vol. 13, no. 10, p. 1211-1233.
105. Mattson, M. P. 2000. «Apoptosis in neurodegenerative disorders». Nat Rev Mol Cell Biol, vol. 1, no. 2, p. 120-129.
106. Nakagawa, T. et J. Yuan. 2000. «Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis». J Cell Biol, vol. 150, no. 4, p. 887-894.
107. Nakagawa, T., H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B. A. Yankner et J. Yuan. 2000. «Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta». Nature, vol. 403, no. 6765, p. 98-103.
108. Rao, R. V., E. Hermel, S. Castro-Obregon, G. del Rio, L. M. Ellerby, H. M. Ellerby et D. E. Bredesen. 2001. «Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation». J Biol Chem, vol. 276, no. 36, p. 33869-33874.
109. Yoneda, T., K. Imaizumi, K. Oono, D. Yui, F. Gomi, T. Katayama et M. Tohyama. 2001. «Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress». J Biol Chem, vol. 276, no. 17, p. 13935-13940.
110. Rao, R. V., S. Castro-Obregon, H. Frankowski, M. Schuler, V. Stoka, G. del Rio, D. E. Bredesen et H. M. Ellerby. 2002. «Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway». J Biol Chem, vol. 277, no. 24, p. 21836-21842.
111. Jimbo, A., E. Fujita, Y. Kouroku, J. Ohnishi, N. Inohara, K. Kuida, K. Sakamaki, S. Yonehara et T. Momoi. 2003. «ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation». Exp Cell Res, vol. 283, no. 2, p. 156-166.
112. Wang, X., Z. Shao, F. S. Zetoune, M. G. Zeidler, K. Gowrishankar et C. Vincenz. 2003. «NRADD, a novel membrane protein with a death domain involved in mediating apoptosis in response to ER stress». Cell Death Differ, vol. 10, no. 5, p. 580-591.

113. Nutt, L. K., A. Pataer, J. Pahler, B. Fang, J. Roth, D. J. McConkey et S. G. Swisher. 2002. «Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca²⁺ stores». J Biol Chem, vol. 277, no. 11, p. 9219-9225.
114. Breckenridge, D. G., M. Germain, J. P. Mathai, M. Nguyen et G. C. Shore. 2003. «Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways». Oncogene, vol. 22, no. 53, p. 8608-8618.
115. Ito, Y., P. Pandey, N. Mishra, S. Kumar, N. Narula, S. Kharbanda, S. Saxena et D. Kufe. 2001. «Targeting of the c-Abl tyrosine kinase to mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis». Mol Cell Biol, vol. 21, no. 18, p. 6233-6242.
116. Szczesna-Skorupa, E., C. D. Chen, H. Liu et B. Kemper. 2004. «Gene expression changes associated with the endoplasmic reticulum stress response induced by microsomal cytochrome p450 overproduction». J Biol Chem, vol. 279, no. 14, p. 13953-13961.
117. Urano, F., X. Wang, A. Bertolotti, Y. Zhang, P. Chung, H. P. Harding et D. Ron. 2000. «Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1». Science, vol. 287, no. 5453, p. 664-666.
118. Herr, I. et K. M. Debatin. 2001. «Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy». Blood, vol. 98, no. 9, p. 2603-2614.
119. Breckenridge, D. G., M. Nguyen, S. Kuppig, M. Reth et G. C. Shore. 2002. «The procaspase-8 isoform, procaspase-8L, recruited to the BAP31 complex at the endoplasmic reticulum». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 99, no. 7, p. 4331-4336.
120. Wang, K. K. 2000. «Calpain and caspase: can you tell the difference?». Trends Neurosci, vol. 23, no. 1, p. 20-26.
121. Youn, H. D., L. Sun, R. Prywes et J. O. Liu. 1999. «Apoptosis of T cells mediated by Ca²⁺-induced release of the transcription factor MEF2». Science, vol. 286, no. 5440, p. 790-793.
122. Hainaut, P. et M. Hollstein. 2000. «p53 and human cancer: the first ten thousand mutations». Adv Cancer Res, vol. 77, p. 81-137.
123. Adimoolam, S. et J. M. Ford. 2003. «p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair». DNA Repair (Amst), vol. 2, no. 9, p. 947-954.
124. Rubbi, C. P. et J. Milner. 2003. «p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage». Embo J, vol. 22, no. 4, p. 975-986.
125. Wang, Q. E., Q. Zhu, M. A. Wani, G. Wani, J. Chen et A. A. Wani. 2003. «Tumor suppressor p53 dependent recruitment of nucleotide excision repair factors XPC and TFIIH to DNA damage». DNA Repair (Amst), vol. 2, no. 5, p. 483-499.
126. Vousden, K. H. et X. Lu. 2002. «Live or let die: the cell's response to p53». Nat Rev Cancer, vol. 2, no. 8, p. 594-604.

127. Hoffman, W. H., S. Biade, J. T. Zilfou, J. Chen et M. Murphy. 2002. «Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53». J Biol Chem, vol. 277, no. 5, p. 3247-3257.
128. Tinel, A. et J. Tschopp. 2004. «The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress». Science, vol. 304, no. 5672, p. 843-846.
129. Li, M., D. Chen, A. Shiloh, J. Luo, A. Y. Nikolaev, J. Qin et W. Gu. 2002. «Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization». Nature, vol. 416, no. 6881, p. 648-653.
130. Caspari, T. 2000. «How to activate p53». Curr Biol, vol. 10, no. 8, p. R315-317.
131. Stevens, C., L. Smith et N. B. La Thangue. 2003. «Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage». Nat Cell Biol, vol. 5, no. 5, p. 401-409.
132. Berkovich, E. et D. Ginsberg. 2003. «ATM is a target for positive regulation by E2F-1». Oncogene, vol. 22, no. 2, p. 161-167.
133. Pediconi, N., A. Ianari, A. Costanzo, L. Belloni, R. Gallo, L. Cimino, A. Porcellini, I. Screpanti, C. Balsano, E. Alesse, A. Gulino et M. Levrero. 2003. «Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage». Nat Cell Biol, vol. 5, no. 6, p. 552-558.
134. Hershko, T. et D. Ginsberg. 2004. «Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis». J Biol Chem, vol. 279, no. 10, p. 8627-8634.
135. Hiebert, S. W., S. P. Chellappan, J. M. Horowitz et J. R. Nevins. 1992. «The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F». Genes Dev, vol. 6, no. 2, p. 177-185.
136. An, B. et Q. P. Dou. 1996. «Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: an interleukin 1 beta-converting enzyme-like protease as candidate». Cancer Res, vol. 56, no. 3, p. 438-442.
137. Zhang, Y., Y. Xiong et W. G. Yarbrough. 1998. «ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways». Cell, vol. 92, no. 6, p. 725-734.
138. Russell, J. L., J. T. Powers, R. J. Rounbehler, P. M. Rogers, C. J. Conti et D. G. Johnson. 2002. «ARF differentially modulates apoptosis induced by E2F1 and Myc». Mol Cell Biol, vol. 22, no. 5, p. 1360-1368.
139. Zindy, F., C. M. Eischen, D. H. Randle, T. Kamijo, J. L. Cleveland, C. J. Sherr et M. F. Roussel. 1998. «Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization». Genes Dev, vol. 12, no. 15, p. 2424-2433.

140. Mitsiades, C. S., N. Mitsiades et M. Koutsilieris. 2004. «The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development». Curr Cancer Drug Targets, vol. 4, no. 3, p. 235-256.
141. Ito, A., C. H. Lai, X. Zhao, S. Saito, M. H. Hamilton, E. Appella et T. P. Yao. 2001. «p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2». Embo J, vol. 20, no. 6, p. 1331-1340.
142. Kwak, S. S., J. Derry, A. L. Tyner, Z. Shen et A. V. Gudkov. 2001. «Functional analysis and intracellular localization of p53 modified by SUMO-1». Oncogene, vol. 20, no. 20, p. 2587-2599.
143. Vasilevskaya, I. et P. J. O'Dwyer. 2003. «Role of Jun and Jun kinase in resistance of cancer cells to therapy». Drug Resist Updat, vol. 6, no. 3, p. 147-156.
144. Chen, Y. et M. Z. Lai. 2001. «c-Jun NH2-terminal kinase activation leads to a FADD-dependent but Fas ligand-independent cell death in Jurkat T cells». J Biol Chem, vol. 276, no. 11, p. 8350-8357.
145. Chen, Y. R., X. Wang, D. Templeton, R. J. Davis et T. H. Tan. 1996. «The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation». J Biol Chem, vol. 271, no. 50, p. 31929-31936.
146. Tournier, C., P. Hess, D. D. Yang, J. Xu, T. K. Turner, A. Nimnual, D. Bar-Sagi, S. N. Jones, R. A. Flavell et R. J. Davis. 2000. «Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway». Science, vol. 288, no. 5467, p. 870-874.
147. Kuan, C. Y., D. D. Yang, D. R. Samanta Roy, R. J. Davis, P. Rakic et R. A. Flavell. 1999. «The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development». Neuron, vol. 22, no. 4, p. 667-676.
148. Basu, S. et R. Kolesnick. 1998. «Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase». Oncogene, vol. 17, no. 25, p. 3277-3285.
149. Hannun, Y. A. 1996. «Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress». Science, vol. 274, no. 5294, p. 1855-1859.
150. Beinke, S. et S. C. Ley. 2004. «Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology». Biochem J, vol. 382, no. Pt 2, p. 393-409.
151. Wang, C. Y., M. W. Mayo et A. S. Baldwin, Jr. 1996. «TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB». Science, vol. 274, no. 5288, p. 784-787.
152. Perkins, N. D. 2004. «NF-kappaB: tumor promoter or suppressor?». Trends Cell Biol, vol. 14, no. 2, p. 64-69.
153. Foo, S. Y. et G. P. Nolan. 1999. «NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation». Trends Genet, vol. 15, no. 6, p. 229-235.

154. Campbell, K. J., S. Rocha et N. D. Perkins. 2004. «Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA(p65) NF-kappa B». Mol Cell, vol. 13, no. 6, p. 853-865.
155. Chen, X., K. Kandasamy et R. K. Srivastava. 2003. «Differential roles of RelA (p65) and c-Rel subunits of nuclear factor kappa B in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling». Cancer Res, vol. 63, no. 5, p. 1059-1066.
156. Datta, K., P. Babbar, T. Srivastava, S. Sinha et P. Chattopadhyay. 2002. «p53 dependent apoptosis in glioma cell lines in response to hydrogen peroxide induced oxidative stress». Int J Biochem Cell Biol, vol. 34, no. 2, p. 148-157.
157. Hur, G. M., J. Lewis, Q. Yang, Y. Lin, H. Nakano, S. Nedospasov et Z. G. Liu. 2003. «The death domain kinase RIP has an essential role in DNA damage-induced NF-kappa B activation». Genes Dev, vol. 17, no. 7, p. 873-882.
158. Shetty, S., J. B. Gladden, E. S. Henson, X. Hu, J. Villanueva, N. Hancy et S. B. Gibson. 2002. «Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) up-regulates death receptor 5 (DR5) mediated by NFkappaB activation in epithelial derived cell lines». Apoptosis, vol. 7, no. 5, p. 413-420.
159. Gibson, S. B., R. Oyer, A. C. Spalding, S. M. Anderson et G. L. Johnson. 2000. «Increased expression of death receptors 4 and 5 synergizes the apoptosis response to combined treatment with etoposide and TRAIL». Mol Cell Biol, vol. 20, no. 1, p. 205-212.
160. Sebbagh, M., C. Renvoize, J. Hamelin, N. Riche, J. Bertoglio et J. Breard. 2001. «Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing». Nat Cell Biol, vol. 3, no. 4, p. 346-352.
161. Coleman, M. L., E. A. Sahai, M. Yeo, M. Bosch, A. Dewar et M. F. Olson. 2001. «Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I». Nat Cell Biol, vol. 3, no. 4, p. 339-345.
162. Rudel, T. et G. M. Bokoch. 1997. «Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2». Science, vol. 276, no. 5318, p. 1571-1574.
163. Bohm, I. et H. Schild. 2003. «Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death». Mol Imaging Biol, vol. 5, no. 1, p. 2-14.
164. Sahara, S., M. Aoto, Y. Eguchi, N. Imamoto, Y. Yoneda et Y. Tsujimoto. 1999. «Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation». Nature, vol. 401, no. 6749, p. 168-173.
165. Soldani, C. et A. I. Scovassi. 2002. «Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update». Apoptosis, vol. 7, no. 4, p. 321-328.

166. Liu, X., H. Zou, C. Slaughter et X. Wang. 1997. «DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis». Cell, vol. 89, no. 2, p. 175-184.
167. Schulze-Osthoff, K., H. Walczak, W. Droge et P. H. Kramer. 1994. «Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis». J Cell Biol, vol. 127, no. 1, p. 15-20.
168. Takahashi, R., Q. Devcreaux, I. Tamm, K. Welsh, N. Assa-Munt, G. S. Salvesen et J. C. Reed. 1998. «A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases». J Biol Chem, vol. 273, no. 14, p. 7787-7790.
169. Huang, H., C. A. Joazeiro, E. Bonfoco, S. Kamada, J. D. Levenson et T. Hunter. 2000. «The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7». J Biol Chem, vol. 275, no. 35, p. 26661-26664.
170. Yang, Y., S. Fang, J. P. Jensen, A. M. Weissman et J. D. Ashwell. 2000. «Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli». Science, vol. 288, no. 5467, p. 874-877.
171. McDonald, E. R., 3rd et W. S. El-Deiry. 2004. «Suppression of caspase-8- and -10-associated RING proteins results in sensitization to death ligands and inhibition of tumor cell growth». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 101, no. 16, p. 6170-6175.
172. Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li et X. Wang. 2000. «Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition». Cell, vol. 102, no. 1, p. 33-42.
173. Marsden, V. S., L. O'Connor, L. A. O'Reilly, J. Silke, D. Metcalf, P. G. Ekert, D. C. Huang, F. Cecconi, K. Kuida, K. J. Tomaselli, S. Roy, D. W. Nicholson, D. L. Vaux, P. Bouillet, J. M. Adams et A. Strasser. 2002. «Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome». Nature, vol. 419, no. 6907, p. 634-637.
174. Yu, S. W., H. Wang, M. F. Poitras, C. Coombs, W. J. Bowers, H. J. Federoff, G. G. Poirier, T. M. Dawson et V. L. Dawson. 2002. «Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor». Science, vol. 297, no. 5579, p. 259-263.
175. Susin, S. A., E. Daugas, L. Ravagnan, K. Samejima, N. Zamzami, M. Loeffler, P. Costantini, K. F. Ferri, T. Irinopoulou, M. C. Prevost, G. Brothers, T. W. Mak, J. Penninger, W. C. Earnshaw et G. Kroemer. 2000. «Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis». J Exp Med, vol. 192, no. 4, p. 571-580.
176. Joza, N., S. A. Susin, E. Daugas, W. L. Stanford, S. K. Cho, C. Y. Li, T. Sasaki, A. J. Elia, H. Y. Cheng, L. Ravagnan, K. F. Ferri, N. Zamzami, A. Wakeham, R. Hakem, H. Yoshida, Y. Y. Kong, T. W. Mak, J. C. Zuniga-Pflucker, G. Kroemer et J. M. Penninger. 2001. «Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death». Nature, vol. 410, no. 6828, p. 549-554.

177. Heusel, J. W., R. L. Wesselschmidt, S. Shresta, J. H. Russell et T. J. Ley. 1994. «Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells». Cell, vol. 76, no. 6, p. 977-987.
178. Alimonti, J. B., L. Shi, P. K. Baijal et A. H. Greenberg. 2001. «Granzyme B induces BID-mediated cytochrome c release and mitochondrial permeability transition». J Biol Chem, vol. 276, no. 10, p. 6974-6982.
179. Lieberman, J. 2003. «The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal». Nat Rev Immunol, vol. 3, no. 5, p. 361-370.
180. Gil-Parrado, S., A. Fernandez-Montalvan, I. Assfalg-Machleidt, O. Popp, F. Bestvater, A. Holloschi, T. A. Knoch, E. A. Auerswald, K. Welsh, J. C. Reed, H. Fritz, P. Fuentes-Prior, E. Spiess, G. S. Salvesen et W. Machleidt. 2002. «Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members». J Biol Chem, vol. 277, no. 30, p. 27217-27226.
181. Willson, T. M. et J. T. Moore. 2002. «Genomics versus orphan nuclear receptors--a half-time report». Mol Endocrinol, vol. 16, no. 6, p. 1135-1144.
182. Laudet, V. 1997. «Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor». J Mol Endocrinol, vol. 19, no. 3, p. 207-226.
183. Aranda, A. et A. Pascual. 2001. «Nuclear hormone receptors and gene expression». Physiol Rev, vol. 81, no. 3, p. 1269-1304.
184. Wurtz, J. M., W. Bourguet, J. P. Renaud, V. Vivat, P. Chambon, D. Moras et H. Gronemeyer. 1996. «A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors». Nat Struct Biol, vol. 3, no. 1, p. 87-94.
185. Renaud, J. P., N. Rochel, M. Ruff, V. Vivat, P. Chambon, H. Gronemeyer et D. Moras. 1995. «Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid». Nature, vol. 378, no. 6558, p. 681-689.
186. Feng, W., R. C. Ribeiro, R. L. Wagner, H. Nguyen, J. W. Apriletti, R. J. Fletterick, J. D. Baxter, P. J. Kushner et B. L. West. 1998. «Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors». Science, vol. 280, no. 5370, p. 1747-1749.
187. Pratt, W. B. et D. O. Toft. 1997. «Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones». Endocr Rev, vol. 18, no. 3, p. 306-360.
188. Chambon, P. 1996. «A decade of molecular biology of retinoic acid receptors». Faseb J, vol. 10, no. 9, p. 940-954.
189. Kurokawa, R., J. DiRenzo, M. Boehm, J. Sugarman, B. Gloss, M. G. Rosenfeld, R. A. Heyman et C. K. Glass. 1994. «Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding». Nature, vol. 371, no. 6497, p. 528-531.

190. Horlein, A. J., A. M. Naar, T. Heinzl, J. Torchia, B. Gloss, R. Kurokawa, A. Ryan, Y. Kamei, M. Soderstrom, C. K. Glass et al. 1995. «Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor». Nature, vol. 377, no. 6548, p. 397-404.
191. Chen, J. D. et R. M. Evans. 1995. «A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors». Nature, vol. 377, no. 6548, p. 454-457.
192. Tremblay, A., G. B. Tremblay, F. Labrie et V. Giguere. 1999. «Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1». Mol Cell, vol. 3, no. 4, p. 513-519.
193. Sheppard, K. A., K. M. Phelps, A. J. Williams, D. Thanos, C. K. Glass, M. G. Rosenfeld, M. E. Gerritsen et T. Collins. 1998. «Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1». J Biol Chem, vol. 273, no. 45, p. 29291-29294.
194. Kamei, Y., L. Xu, T. Heinzl, J. Torchia, R. Kurokawa, B. Gloss, S. C. Lin, R. A. Heyman, D. W. Rose, C. K. Glass et M. G. Rosenfeld. 1996. «A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors». Cell, vol. 85, no. 3, p. 403-414.
195. Reichardt, H. M., K. H. Kaestner, J. Tuckermann, O. Kretz, O. Wessely, R. Bock, P. Gass, W. Schmid, P. Herrlich, P. Angel et G. Schutz. 1998. «DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival». Cell, vol. 93, no. 4, p. 531-541.
196. Milbrandt, J. 1988. «Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene». Neuron, vol. 1, no. 3, p. 183-188.
197. Hazel, T. G., D. Nathans et L. F. Lau. 1988. «A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 85, no. 22, p. 8444-8448.
198. Law, S. W., O. M. Conneely, F. J. DeMayo et B. W. O'Malley. 1992. «Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1». Mol Endocrinol, vol. 6, no. 12, p. 2129-2135.
199. Ohkura, N., M. Hijikuro, A. Yamamoto et K. Miki. 1994. «Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells». Biochem Biophys Res Commun, vol. 205, no. 3, p. 1959-1965.
200. Maruyama, K., T. Tsukada, N. Ohkura, S. Bandoh, T. Hosono et K. Yamaguchi. 1998. «The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily (review)». Int J Oncol, vol. 12, no. 6, p. 1237-1243.
201. Sutherland, J. D., T. Kozlova, G. Tzertzinis et F. C. Kafatos. 1995. «Drosophila hormone receptor 38: a second partner for Drosophila USP suggests an unexpected role for nuclear receptors of the nerve growth factor-induced protein B type». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 92, no. 17, p. 7966-7970.

202. Hazel, T. G., R. Misra, I. J. Davis, M. E. Greenberg et L. F. Lau. 1991. «Nur77 is differentially modified in PC12 cells upon membrane depolarization and growth factor treatment». Mol Cell Biol, vol. 11, no. 6, p. 3239-3246.
203. Rogers, S., R. Wells et M. Rechsteiner. 1986. «Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis». Science, vol. 234, no. 4774, p. 364-368.
204. Paulsen, R. E., C. A. Weaver, T. J. Fahrner et J. Milbrandt. 1992. «Domains regulating transcriptional activity of the inducible orphan receptor NGFI-B». J Biol Chem, vol. 267, no. 23, p. 16491-16496.
205. Wilson, T. E., R. E. Paulsen, K. A. Padgett et J. Milbrandt. 1992. «Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors». Science, vol. 256, no. 5053, p. 107-110.
206. Katagiri, Y., K. Takeda, Z. X. Yu, V. J. Ferrans, K. Ozato et G. Guroff. 2000. «Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B». Nat Cell Biol, vol. 2, no. 7, p. 435-440.
207. Wang, Z., G. Benoit, J. Liu, S. Prasad, P. Aarnisalo, X. Liu, H. Xu, N. P. Walker et T. Perlmann. 2003. «Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors». Nature, vol. 423, no. 6939, p. 555-560.
208. Kokontis, J., S. Liao et C. Chang. 1991. «Transcriptional activation by TR3 receptor, a member of the steroid receptor superfamily». Receptor, vol. 1, no. 4, p. 261-270.
209. Wilson, T. E., T. J. Fahrner, M. Johnston et J. Milbrandt. 1991. «Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast». Science, vol. 252, no. 5010, p. 1296-1300.
210. Perlmann, T. et L. Jansson. 1995. «A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1». Genes Dev, vol. 9, no. 7, p. 769-782.
211. Philips, A., S. Lesage, R. Gingras, M. H. Maira, Y. Gauthier, P. Hugo et J. Drouin. 1997. «Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells». Mol Cell Biol, vol. 17, no. 10, p. 5946-5951.
212. Maira, M., C. Martens, A. Philips et J. Drouin. 1999. «Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation». Mol Cell Biol, vol. 19, no. 11, p. 7549-7557.
213. Wansa, K. D., J. M. Harris et G. E. Muscat. 2002. «The activation function-1 domain of Nur77/NR4A1 mediates trans- activation, cell specificity, and coactivator recruitment». J Biol Chem, vol. 277, no. 36, p. 33001-33011.
214. Salomoni, P. et P. P. Pandolfi. 2002. «The role of PML in tumor suppression». Cell, vol. 108, no. 2, p. 165-170.

215. Wu, W. S., Z. X. Xu, R. Ran, F. Meng et K. S. Chang. 2002. «Promyelocytic leukemia protein PML inhibits Nur77-mediated transcription through specific functional interactions». Oncogene, vol. 21, no. 24, p. 3925-3933.
216. Jehn, B. M., W. Bielke, W. S. Pear et B. A. Osborne. 1999. «Cutting edge: protective effects of notch-1 on TCR-induced apoptosis». J Immunol, vol. 162, no. 2, p. 635-638.
217. Lee, J. M., K. H. Lee, M. Weidner, B. A. Osborne et S. D. Hayward. 2002. «Epstein-Barr virus EBNA2 blocks Nur77-mediated apoptosis». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 99, no. 18, p. 11878-11883.
218. Wu, Q., Y. Li, R. Liu, A. Agadir, M. O. Lee, Y. Liu et X. Zhang. 1997. «Modulation of retinoic acid sensitivity in lung cancer cells through dynamic balance of orphan receptors nur77 and COUP-TF and their heterodimerization». Embo J, vol. 16, no. 7, p. 1656-1669.
219. Toth, R., E. Szegezdi, U. Reichert, J. M. Bernardon, S. Michel, P. Ancian, K. Kis-Toth, Z. Macsari, L. Fesus et Z. Szondy. 2001. «Activation-induced apoptosis and cell surface expression of Fas (CD95) ligand are reciprocally regulated by retinoic acid receptor alpha and gamma and involve nur77 in T cells». Eur J Immunol, vol. 31, no. 5, p. 1382-1391.
220. Kang, H. J., M. R. Song, S. K. Lee, E. C. Shin, Y. H. Choi, S. J. Kim, J. W. Lee et M. O. Lee. 2000. «Retinoic acid and its receptors repress the expression and transactivation functions of Nur77: a possible mechanism for the inhibition of apoptosis by retinoic acid». Exp Cell Res, vol. 256, no. 2, p. 545-554.
221. Song, K. H., Y. Y. Park, K. C. Park, C. Y. Hong, J. H. Park, M. Shong, K. Lee et H. S. Choi. 2004. «The atypical orphan nuclear receptor DAX-1 interacts with orphan nuclear receptor Nur77 and represses its transactivation». Mol Endocrinol.
222. Hong, C. Y., J. H. Park, R. S. Ahn, S. Y. Im, H. S. Choi, J. Soh, S. H. Mellon et K. Lee. 2004. «Molecular mechanism of suppression of testicular steroidogenesis by proinflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha». Mol Cell Biol, vol. 24, no. 7, p. 2593-2604.
223. Woronicz, J. D., A. Lina, B. J. Calnan, S. Szychowski, L. Cheng et A. Winoto. 1995. «Regulation of the Nur77 orphan steroid receptor in activation-induced apoptosis». Mol Cell Biol, vol. 15, no. 11, p. 6364-6376.
224. Ueda, Y., S. Bando, J. Fujita, M. Sato, Y. Yamaji et J. Takahara. 1999. «Expression of nerve growth factor-induced clone B subfamily and pro-opiomelanocortin gene in lung cancer cell lines». Am J Respir Cell Mol Biol, vol. 20, no. 6, p. 1319-1325.
225. Uemura, H. et C. Chang. 1998. «Antisense TR3 orphan receptor can increase prostate cancer cell viability with etoposide treatment». Endocrinology, vol. 139, no. 5, p. 2329-2334.
226. Arenander, A. T., R. W. Lim, B. C. Varnum, R. Cole, J. de Vellis et H. R. Herschman. 1989. «TIS gene expression in cultured rat astrocytes: multiple pathways of induction by mitogens». J Neurosci Res, vol. 23, no. 3, p. 257-265.

227. Bondy, G. P. 1991. «Phorbol ester, forskolin, and serum induction of a human colon nuclear hormone receptor gene related to the NUR 77/NGFI-B genes». Cell Growth Differ, vol. 2, no. 4, p. 203-208.
228. Roche, E., J. Buteau, I. Aniento, J. A. Reig, B. Soria et M. Prentki. 1999. «Palmitate and oleate induce the immediate-early response genes c-fos and nur-77 in the pancreatic beta-cell line INS-1». Diabetes, vol. 48, no. 10, p. 2007-2014.
229. Fahrner, T. J., S. L. Carroll et J. Milbrandt. 1990. «The NGFI-B protein, an inducible member of the thyroid/steroid receptor family, is rapidly modified posttranslationally». Mol Cell Biol, vol. 10, no. 12, p. 6454-6459.
230. Liu, W., H. D. Youn et J. O. Liu. 2001. «Thapsigargin-induced apoptosis involves Cabin1-MEF2-mediated induction of Nur77». Eur J Immunol, vol. 31, no. 6, p. 1757-1764.
231. Bartel, D. P., M. Sheng, L. F. Lau et M. E. Greenberg. 1989. «Growth factors and membrane depolarization activate distinct programs of early response gene expression: dissociation of fos and jun induction». Genes Dev, vol. 3, no. 3, p. 304-313.
232. Davis, I. J. et L. F. Lau. 1994. «Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nurr-1 in the adrenal glands». Mol Cell Biol, vol. 14, no. 5, p. 3469-3483.
233. Song, K. H., J. I. Park, M. O. Lee, J. Soh, K. Lee et H. S. Choi. 2001. «LH induces orphan nuclear receptor Nur77 gene expression in testicular Leydig cells». Endocrinology, vol. 142, no. 12, p. 5116-5123.
234. Suzuki, S., N. Suzuki, C. Mirtsos, T. Horacek, E. Lye, S. K. Noh, A. Ho, D. Bouchard, T. W. Mak et W. C. Yeh. 2003. «Nur77 as a survival factor in tumor necrosis factor signaling». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 100, no. 14, p. 8276-8280.
235. Chen, X., V. Zachar, C. Chang, P. Ebbesen et X. Liu. 1998. «Differential expression of Nur77 family members in human T-lymphotropic virus type 1-infected cells: transactivation of the TR3/nur77 gene by Tax protein». J Virol, vol. 72, no. 8, p. 6902-6906.
236. Watson, M. A. et J. Milbrandt. 1989. «The NGFI-B gene, a transcriptionally inducible member of the steroid receptor gene superfamily: genomic structure and expression in rat brain after seizure induction». Mol Cell Biol, vol. 9, no. 10, p. 4213-4219.
237. Imaki, T., T. Shibasaki, N. Chikada, S. Harada, M. Naruse et H. Demura. 1996. «Different expression of immediate-early genes in the rat paraventricular nucleus induced by stress: relation to corticotropin-releasing factor gene transcription». Endocr J, vol. 43, no. 6, p. 629-638.
238. Bandoh, S., T. Tsukada, K. Maruyama, N. Ohkura et K. Yamaguchi. 1997. «Mechanical agitation induces gene expression of NOR-1 and its closely related orphan nuclear receptors in leukemic cell lines». Leukemia, vol. 11, no. 9, p. 1453-1458.

239. Kim, S. O., K. Ono, P. S. Tobias et J. Han. 2003. «Orphan nuclear receptor Nur77 is involved in caspase-independent macrophage cell death». J Exp Med, vol. 197, no. 11, p. 1441-1452.
240. Kondo, E., A. Harashima, T. Takabatake, H. Takahashi, Y. Matsuo, T. Yoshino, K. Orita et T. Akagi. 2003. «NF-ATc2 induces apoptosis in Burkitt's lymphoma cells through signaling via the B cell antigen receptor». Eur J Immunol, vol. 33, no. 1, p. 1-11.
241. Liu, Z. G., S. W. Smith, K. A. McLaughlin, L. M. Schwartz et B. A. Osborne. 1994. «Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77». Nature, vol. 367, no. 6460, p. 281-284.
242. Uemura, H., A. Mizokami et C. Chang. 1995. «Identification of a new enhancer in the promoter region of human TR3 orphan receptor gene. A member of steroid receptor superfamily». J Biol Chem, vol. 270, no. 10, p. 5427-5433.
243. Liu, X., X. Chen, V. Zachar, C. Chang et P. Ebbesen. 1999. «Transcriptional activation of human TR3/nur77 gene expression by human T-lymphotropic virus type I Tax protein through two AP-1-like elements». J Gen Virol, vol. 80 (Pt 12), p. 3073-3081.
244. Williams, G. T. et L. F. Lau. 1993. «Activation of the inducible orphan receptor gene nur77 by serum growth factors: dissociation of immediate-early and delayed-early responses». Mol Cell Biol, vol. 13, no. 10, p. 6124-6136.
245. Winoto, A. et D. R. Littman. 2002. «Nuclear hormone receptors in T lymphocytes». Cell, vol. 109 Suppl, p. S57-66.
246. Katagiri, Y., Y. Hirata, J. Milbrandt et G. Guroff. 1997. «Differential regulation of the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NGFI-B by membrane depolarization and nerve growth factor». J Biol Chem, vol. 272, no. 50, p. 31278-31284.
247. Slagsvold, H. H., A. C. Ostvold, A. B. Fallgren et R. E. Paulsen. 2002. «Nuclear receptor and apoptosis initiator NGFI-B is a substrate for kinase ERK2». Biochem Biophys Res Commun, vol. 291, no. 5, p. 1146-1150.
248. Davis, I. J., T. G. Hazel, R. H. Chen, J. Blenis et L. F. Lau. 1993. «Functional domains and phosphorylation of the orphan receptor Nur77». Mol Endocrinol, vol. 7, no. 8, p. 953-964.
249. Li, Y. et L. F. Lau. 1997. «Adrenocorticotrophic hormone regulates the activities of the orphan nuclear receptor Nur77 through modulation of phosphorylation». Endocrinology, vol. 138, no. 10, p. 4138-4146.
250. Pekarsky, Y., C. Hallas, A. Palamarchuk, A. Koval, F. Bullrich, Y. Hirata, R. Bichi, J. Letofsky et C. M. Croce. 2001. «Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nur77». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 98, no. 7, p. 3690-3694.
251. Masuyama, N., K. Oishi, Y. Mori, T. Ueno, Y. Takahama et Y. Gotoh. 2001. «Akt inhibits the orphan nuclear receptor Nur77 and T-cell apoptosis». J Biol Chem, vol. 276, no. 35, p. 32799-32805.

252. Kolluri, S. K., N. Brucy-Sedano, X. Cao, B. Lin, F. Lin, Y. H. Han, M. I. Dawson et X. K. Zhang. 2003. «Mitogenic effect of orphan receptor TR3 and its regulation by MEKK1 in lung cancer cells». Mol Cell Biol, vol. 23, no. 23, p. 8651-8667.
253. Wu, Q., S. Liu, X. F. Ye, Z. W. Huang et W. J. Su. 2002. «Dual roles of Nur77 in selective regulation of apoptosis and cell cycle by TPA and ATRA in gastric cancer cells». Carcinogenesis, vol. 23, no. 10, p. 1583-1592.
254. Liu, S., Q. Wu, X. F. Ye, J. H. Cai, Z. W. Huang et W. J. Su. 2002. «Induction of apoptosis by TPA and VP-16 is through translocation of TR3». World J Gastroenterol, vol. 8, no. 3, p. 446-450.
255. Wilson, A. J., D. Arango, J. M. Mariadason, B. G. Heerdt et L. H. Augenlicht. 2003. «TR3/Nur77 in colon cancer cell apoptosis». Cancer Res, vol. 63, no. 17, p. 5401-5407.
256. Crawford, P. A., Y. Sadovsky, K. Woodson, S. L. Lee et J. Milbrandt. 1995. «Adrenocortical function and regulation of the steroid 21-hydroxylase gene in NGFI-B-deficient mice». Mol Cell Biol, vol. 15, no. 8, p. 4331-4316.
257. Le, W., O. M. Conneely, L. Zou, Y. He, O. Saucedo-Cardenas, J. Jankovic, D. R. Mosier et S. H. Appel. 1999. «Selective agenesis of mesencephalic dopaminergic neurons in Nurr1-deficient mice». Exp Neurol, vol. 159, no. 2, p. 451-458.
258. Le, W. D., P. Xu, J. Jankovic, H. Jiang, S. H. Appel, R. G. Smith et D. K. Vassilatis. 2003. «Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease». Nat Genet, vol. 33, no. 1, p. 85-89.
259. Ponnio, T., Q. Burton, F. A. Pereira, D. K. Wu et O. M. Conneely. 2002. «The nuclear receptor Nor-1 is essential for proliferation of the semicircular canals of the mouse inner ear». Mol Cell Biol, vol. 22, no. 3, p. 935-945.
260. DeYoung, R. A., J. C. Baker, D. Cado et A. Winoto. 2003. «The orphan steroid receptor Nur77 family member Nor-1 is essential for early mouse embryogenesis». J Biol Chem, vol. 278, no. 47, p. 47104-47109.
261. Woronicz, J. D., B. Calnan, V. Ngo et A. Winoto. 1994. «Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas». Nature, vol. 367, no. 6460, p. 277-281.
262. Zhou, T., J. Cheng, P. Yang, Z. Wang, C. Liu, X. Su, H. Bluethmann et J. D. Mountz. 1996. «Inhibition of Nur77/Nurr1 leads to inefficient clonal deletion of self-reactive T cells». J Exp Med, vol. 183, no. 4, p. 1879-1892.
263. Calnan, B. J., S. Szychowski, F. K. Chan, D. Cado et A. Winoto. 1995. «A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection». Immunity, vol. 3, no. 3, p. 273-282.
264. Cheng, L. E., F. K. Chan, D. Cado et A. Winoto. 1997. «Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis». Embo J, vol. 16, no. 8, p. 1865-1875.

265. Weih, F., R. P. Ryseck, L. Chen et R. Bravo. 1996. «Apoptosis of nur77/N10-transgenic thymocytes involves the Fas/Fas ligand pathway». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 93, no. 11, p. 5533-5538.
266. Chan, F. K., A. Chen et A. Winoto. 1998. «Thymic expression of the transcription factor Nur77 rescues the T cell but not the B cell abnormality of gld/gld mice». J Immunol, vol. 161, no. 8, p. 4252-4256.
267. Morgan, G., S. Smith, J. Pak, A. Marshak-Rothstein, R. Fissore et B. Osborne. 1999. «Characterization of a mutant T-cell hybridoma line with defects in the TCR-mediated apoptotic pathway». Cell Death Differ, vol. 6, no. 1, p. 36-47.
268. van den Brink, M. R., R. Kapeller, J. C. Pratt, J. H. Chang et S. J. Burakoff. 1999. «The extracellular signal-regulated kinase pathway is required for activation-induced cell death of T cells». J Biol Chem, vol. 274, no. 16, p. 11178-11185.
269. Kuang, A. A., D. Cado et A. Winoto. 1999. «Nur77 transcription activity correlates with its apoptotic function in vivo». Eur J Immunol, vol. 29, no. 11, p. 3722-3728.
270. Rajpal, A., Y. A. Cho, B. Yelent, P. H. Koza-Taylor, D. Li, E. Chen, M. Whang, C. Kang, T. G. Turi et A. Winoto. 2003. «Transcriptional activation of known and novel apoptotic pathways by Nur77 orphan steroid receptor». Embo J, vol. 22, no. 24, p. 6526-6536.
271. Mu, X. et C. Chang. 2003. «TR3 orphan nuclear receptor mediates apoptosis through up-regulating E2F1 in human prostate cancer LNCaP cells». J Biol Chem, vol. 278, no. 44, p. 42840-42845.
272. Garcia, I., M. Murga, A. Vicario, S. J. Field et A. M. Zubiaga. 2000. «A role for E2F1 in the induction of apoptosis during thymic negative selection». Cell Growth Differ, vol. 11, no. 2, p. 91-98.
273. Zhang, X. K. 2002. «Vitamin A and apoptosis in prostate cancer». Endocr Relat Cancer, vol. 9, no. 2, p. 87-102.
274. Castro-Obregon, S., R. V. Rao, G. del Rio, S. F. Chen, K. S. Poksay, S. Rabizadeh, S. Vesce, X. K. Zhang, R. A. Swanson et D. E. Bredesen. 2004. «Alternative, nonapoptotic programmed cell death: mediation by arrestin 2, ERK2, and Nur77». J Biol Chem, vol. 279, no. 17, p. 17543-17553.
275. Vallat, L., H. Magdelenat, H. Merle-Beral, P. Masdehors, G. Potocki de Montalk, F. Davi, M. Kruhoffer, L. Sabatier, T. F. Orntoft et J. Delic. 2003. «The resistance of B-CLL cells to DNA damage-induced apoptosis defined by DNA microarrays». Blood, vol. 101, no. 11, p. 4598-4606.

276. Shipp, M. A., K. N. Ross, P. Tamayo, A. P. Weng, J. L. Kutok, R. C. Aguiar, M. Gaasenbeek, M. Angelo, M. Reich, G. S. Pinkus, T. S. Ray, M. A. Koval, K. W. Last, A. Norton, T. A. Lister, J. Mesirov, D. S. Neuberg, E. S. Lander, J. C. Aster et T. R. Golub. 2002. «Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning». Nat Med, vol. 8, no. 1, p. 68-74.
277. de Lange, R., N. Dimoudis et U. H. Weidle. 2003. «Identification of genes associated with enhanced metastasis of a large cell lung carcinoma cell line». Anticancer Res, vol. 23, no. 1A, p. 187-194.
278. Labelle, Y., J. Zucman, G. Stenman, L. G. Kindblom, J. Knight, C. Turc-Carel, B. Dockhorn-Dworniczak, N. Mandahl, C. Desmaze, M. Peter et et al. 1995. «Oncogenic conversion of a novel orphan nuclear receptor by chromosome translocation». Hum Mol Genet, vol. 4, no. 12, p. 2219-2226.
279. Labelle, Y., J. Bussieres, F. Courjal et M. B. Goldring. 1999. «The EWS/TEC fusion protein encoded by the t(9;22) chromosomal translocation in human chondrosarcomas is a highly potent transcriptional activator». Oncogene, vol. 18, no. 21, p. 3303-3308.
280. Bras, A., J. P. Albar, E. Leonardo, G. G. de Buitrago et A. C. Martinez. 2000. «Ceramide-induced cell death is independent of the Fas/Fas ligand pathway and is prevented by Nur77 overexpression in A20 B cells». Cell Death Differ, vol. 7, no. 3, p. 262-271.
281. Ke, N., G. Claassen, D. H. Yu, A. Albers, W. Fan, P. Tan, M. Grifman, X. Hu, K. Defife, V. Nguy, B. Meyhack, A. Brachet, F. Wong-Staal et Q. X. Li. 2004. «Nuclear Hormone Receptor NR4A2 Is Involved in Cell Transformation and Apoptosis». Cancer Res, vol. 64, no. 22, p. 8208-8212.
282. Bando, S., T. Tsukada, K. Maruyama, N. Ohkura et K. Yamaguchi. 1997. «Differential expression of NGFI-B and RNR-1 genes in various tissues and developing brain of the rat: comparative study by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction». J Neuroendocrinol, vol. 9, no. 1, p. 3-8.
283. Wilson, T. E., A. R. Mouw, C. A. Weaver, J. Milbrandt et K. L. Parker. 1993. «The orphan nuclear receptor NGFI-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase». Mol Cell Biol, vol. 13, no. 2, p. 861-868.
284. Murphy, E. P. et O. M. Conneely. 1997. «Neuroendocrine regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis by the nurr1/nur77 subfamily of nuclear receptors». Mol Endocrinol, vol. 11, no. 1, p. 39-47.
285. Park, J. I., H. J. Park, H. S. Choi, K. Lee, W. K. Lee et S. Y. Chun. 2001. «Gonadotropin regulation of NGFI-B messenger ribonucleic acid expression during ovarian follicle development in the rat». Endocrinology, vol. 142, no. 7, p. 3051-3059.

286. Zimber, A., Q. D. Nguyen et C. Gespach. 2004. «Nuclear bodies and compartments: functional roles and cellular signalling in health and disease». Cell Signal, vol. 16, no. 10, p. 1085-1104.
287. Hofmann, T. G. et H. Will. 2003. «Body language: the function of PML nuclear bodies in apoptosis regulation». Cell Death Differ, vol. 10, no. 12, p. 1290-1299.
288. Bernardi, R. et P. P. Pandolfi. 2003. «Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death». Oncogene, vol. 22, no. 56, p. 9048-9057.
289. Van Cruchten, S. et W. Van Den Broeck. 2002. «Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis». Anat Histol Embryol, vol. 31, no. 4, p. 214-223.
290. Peter, M. E. et P. H. Krammer. 2003. «The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond». Cell Death Differ, vol. 10, no. 1, p. 26-35.
291. Bastien, J. et C. Rochette-Egly. 2004. «Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes». Gene, vol. 328, p. 1-16.
292. Meinke, G. et P. B. Sigler. 1999. «DNA-binding mechanism of the monomeric orphan nuclear receptor NGFI-B». Nat Struct Biol, vol. 6, no. 5, p. 471-477.
293. Chini, B. A., M. A. Fiedler, L. Milligan, T. Hopkins et J. M. Stark. 1998. «Essential roles of NF-kappaB and C/EBP in the regulation of intercellular adhesion molecule-1 after respiratory syncytial virus infection of human respiratory epithelial cell cultures». J Virol, vol. 72, no. 2, p. 1623-1626.
294. Harant, H. et I. J. Lindley. 2004. «Negative cross-talk between the human orphan nuclear receptor Nur77/NAK-1/TR3 and nuclear factor-kappaB». Nucleic Acids Res, vol. 32, no. 17, p. 5280-5290.
295. Arenzana-Seisdedos, F., B. Fernandez, I. Dominguez, J. M. Jacque, D. Thomas, M. T. Diaz-Meco, J. Moscat et J. L. Virelizier. 1993. «Phosphatidylcholine hydrolysis activates NF-kappa B and increases human immunodeficiency virus replication in human monocytes and T lymphocytes». J Virol, vol. 67, no. 11, p. 6596-6604.
296. McKay, B. C. et M. Ljungman. 1999. «Role for p53 in the recovery of transcription and protection against apoptosis induced by ultraviolet light». Neoplasia, vol. 1, no. 3, p. 276-284.
297. van Hoffen, A., A. S. Balajee, A. A. van Zeeland et L. H. Mullenders. 2003. «Nucleotide excision repair and its interplay with transcription». Toxicology, vol. 193, no. 1-2, p. 79-90.
298. Frit, P., K. Kwon, F. Coin, J. Auriol, S. Dubaele, B. Salles et J. M. Egly. 2002. «Transcriptional activators stimulate DNA repair». Mol Cell, vol. 10, no. 6, p. 1391-1401.
299. Siemering, K. R., R. Golbik, R. Sever et J. Haseloff. 1996. «Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein». Curr Biol, vol. 6, no. 12, p. 1653-1663.

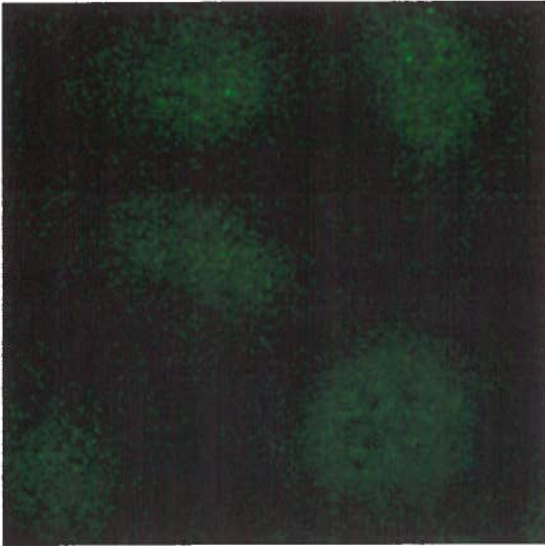
300. Wang, N. S., M. T. Unkila, E. Z. Reincks et C. W. Distelhorst. 2001. «Transient expression of wild-type or mitochondrially targeted Bcl-2 induces apoptosis, whereas transient expression of endoplasmic reticulum-targeted Bcl-2 is protective against Bax-induced cell death». J Biol Chem, vol. 276, no. 47, p. 44117-44128.
301. Massaad, C. A., B. P. Portier et G. Taglialatela. 2004. «Inhibition of transcription factor activity by nuclear compartment-associated Bcl-2». J Biol Chem.
302. Lee, J. H., T. H. Koo, B. Y. Hwang et J. J. Lee. 2002. «Kaurane diterpene, kamebakaurin, inhibits NF-kappa B by directly targeting the DNA-binding activity of p50 and blocks the expression of antiapoptotic NF-kappa B target genes». J Biol Chem, vol. 277, no. 21, p. 18411-18420.
303. Natarajan, K., S. Singh, T. R. Burke, Jr., D. Grunberger et B. B. Aggarwal. 1996. «Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 93, no. 17, p. 9090-9095.
304. Chatterjee, M. et S. Wu. 2001. «Involvement of Fas receptor and not tumor necrosis factor-alpha receptor in ultraviolet-induced activation of acid sphingomyelinase». Mol Carcinog, vol. 30, no. 1, p. 47-55.

ANNEXE I

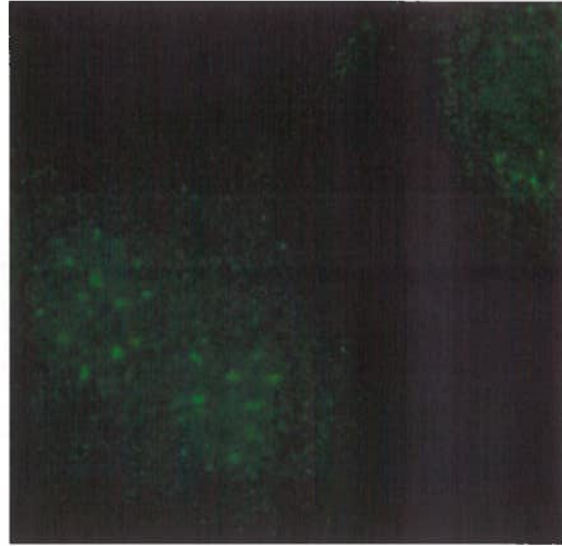
Avant-propos

Cette annexe de la présente thèse contient des résultats complétant le chapitre I. Ils appuient les conclusions de l'article mais ce ne sont pas nécessaires à sa compréhension. La première figure montre la localisation endogène de Nur77 dans des cellules HeLa et sa concentration dans des domaines distincts suite à un traitement à la camptothécine. La deuxième figure montre la capacité différentielle de deux anticorps polyclonaux dirigés contre Nur77 à révéler la présence de corps nucléaires. Seul l'anticorps dirigé contre la partie C-terminale est apte à colorer les corps nucléaires GFP-Nur77 alors que l'anticorps dirigé contre la partie N-terminale colore le Nur77 nucléaire et cytoplasmique mais est incapable de révéler des corps nucléaires. .

Signal Nur77

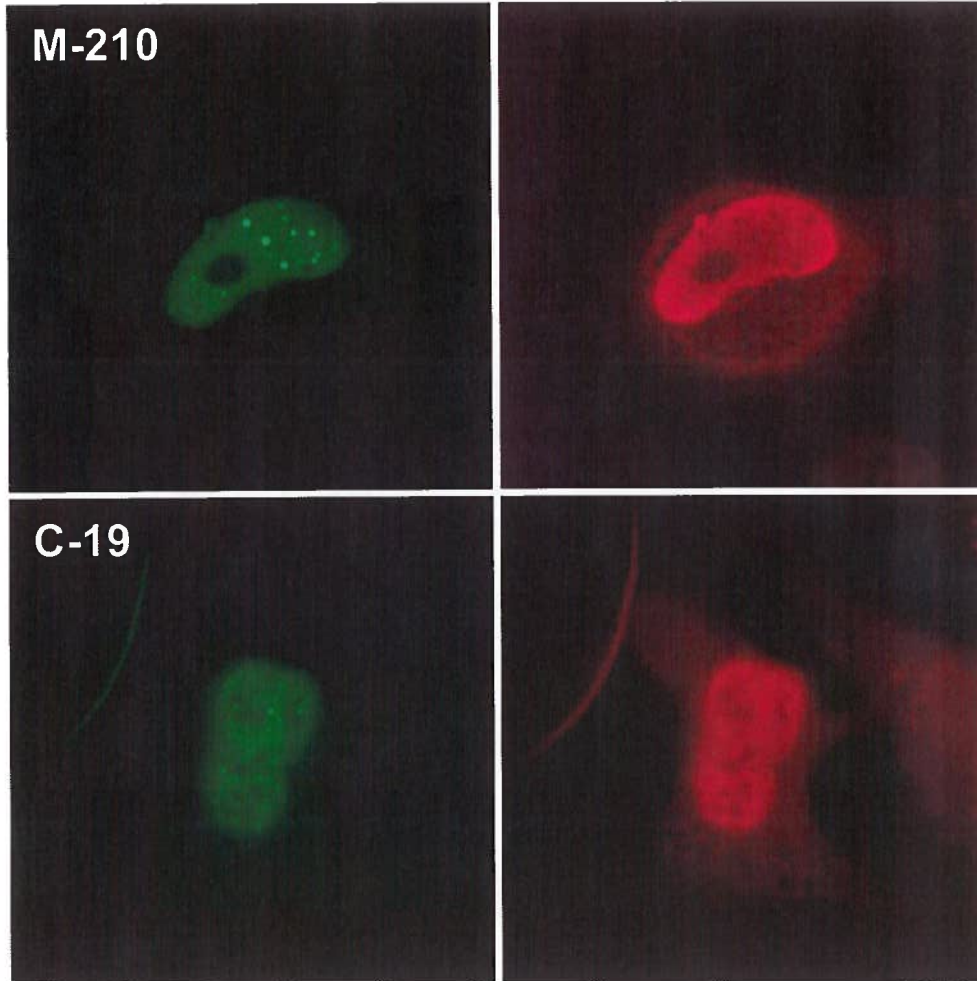


+ CPT



Complément #1 au chapitre 2

Révélation de la localisation nucléaire de Nur77 endogène. Des cellules HeLa Nur77 furent traités ou non avec 10 μ M de camptothécine pendant une heure et ensuite fixées au méthanol. Nur77 fut détecté par immunofluorescence à l'aide de l'anticorps polyclonal de chèvre C-19 et d'un anticorps anti-chèvre couplé à Alexa Fluor 488. Les images furent capturées après 25 secondes d'intégration de la fluorescence. On remarque que le signal de Nur77 est faiblement détecté chez les cellules HeLa et qu'il se retrouve à l'état diffus ou légèrement granulaire au niveau du noyau. Nur77 apparaît davantage concentré dans des taches nucléaires suite au traitement à la camptothécine (CPT).



Complément #2 au chapitre 2

Révélation de la localisation nucléaire de Nur77 par deux anticorps polyclonaux. Des cellules HeLa GFP-Nur77 furent traités avec 10 μ M de camptothécine pendant une heure puis fixées au méthanol. Nur77 fut détecté par immunofluorescence à l'aide de l'anticorps polyclonal de lapin M-210 spécifique à la région N-terminale (a.a. 59-269) de Nur77 et de l'anticorps polyclonal de chèvre C-19 spécifique à la région C-terminale de Nur77, tous deux obtenus de Santa Cruz Biotech. La coloration verte représente la fluorescence intrinsèque de la GFP-Nur77 et la coloration rouge représente l'anticorps secondaire couplé à Alexa Fluor 594. On remarque que seul l'anticorps dirigé contre la région C-terminale est capable de révéler les corps nucléaires visibles avec la fusion GFP, alors que l'anticorps M-210 révèle davantage le Nur77 cytoplasmique et nucléaire.

ANNEXE II

Avant-propos

Cette annexe de la présente thèse contient un manuscrit intitulé *Restriction analysis of recombinant plasmids from colonies under 30 minutes* publié par dans le journal *Analytical Biochemistry*. Cet article fait la description d'une technique simple et rapide d'analyse de restriction de plasmides chez des bactéries recombinantes. Cette méthode offre des avantages significatifs par rapport aux méthodes de criblage conventionnelles aux niveaux du temps de manipulation et des coûts des réactifs. Les expériences décrites dans le texte ont été effectuées en parallèle avec mes travaux de doctorat mais n'ont pas de lien direct avec les résultats et les conclusions de celui-ci. La rédaction du manuscrit a été réalisée conjointement par les deux auteurs (L. de Léséleuc et F. Denis).

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

de Léséleuc L, Denis F. Restriction analysis of recombinant plasmids from colonies in less than 30 min. *Anal Biochem.* 2005 May 1;340(1):178-80.
doi:10.1016/j.ab.2004.12.018