



**Faculté des sciences**

# **Effets de la phosphorylation de la sérine 392 de p53 sur l'induction de la sénescence**

Auteur : Van Dessel Geoffroy

Promoteur : Dumont Patrick

Lecteurs : Ghislain Michel, Rezsö René

Année académique 2019-2020

Master en Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire à finalité approfondie



En premier lieu, je tiens à remercier mon promoteur, le professeur Patrick Dumont, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir suivi durant toute la durée de mon mémoire. Ses enseignements avisés, toujours amenés avec pédagogie, m'ont permis de mener ce mémoire à son terme et de me familiariser avec le travail d'un scientifique.

Ma gratitude va également à Laure Bridoux, Maryse Hermant et Marine Delsaute pour leurs conseils et de m'avoir patiemment montré comment réaliser certaines manipulations parfois longues et délicates, ainsi qu'aux techniciens du laboratoire, Marie-Thérèse Ahn et André Clippe, pour leurs indications et recommandations techniques. Merci à Mme Catherine Rasse du service de Support en Méthodologie et Calcul Statistique (SMCS) de l'UCL de m'avoir aidé à réaliser les tests statistiques de ce mémoire.

Un grand merci pareillement à mes co-mémorantes, Céline, Claudia, Lise, Alice et Nathalie, pour leur sympathie et la bonne ambiance qui régnait dans notre bureau.

Je tiens également à remercier les lecteurs qui s'intéresseront à ce mémoire, ainsi que les membres de mon jury, pour l'intérêt porté au fruit de mon travail.

Merci à l'ensemble du personnel du LIBST, et plus particulièrement de l'AMCB, pour leur convivialité, leur bonne humeur et toutes les discussions enrichissantes que nous avons pu échanger.

Merci à Hanane de m'avoir soutenu sans relâche durant toute la durée de ce mémoire.

Enfin, je remercie (et je ne remercierai jamais assez) ma famille de m'avoir toujours encouragé à poursuivre les études qui me passionnent, et de m'avoir aidé tout au long du chemin à les mener à leur terme.



# Table des matières

Résumé.....	1
Abstract .....	3
I. Introduction .....	5
1. Généralités à propos du cancer.....	7
2. Le suppresseur de tumeur p53.....	9
2.1. Structure de p53 .....	13
2.2. Régulation de l'activité de p53 .....	15
2.3. Le gène <i>TP53</i> .....	17
2.4. Mécanisme fonctionnel de p53 .....	19
3. Sénescence .....	23
4. Apoptose.....	29
4.1. Les protéines de la famille de BCL-2 .....	31
4.2. Voie indirecte (dépendante de la transcription).....	33
4.3. Voie directe mitochondriale (indépendante de la transcription).....	35
5. Circonstances de l'induction par p53 de l'apoptose ou la sénescence .....	37
II. Objectifs .....	45
III. Résultats .....	51
1. Essais de formation de colonie.....	55
2. Tests SA- $\beta$ -gal pour le marquage des cellules sénescents.....	57
3. Analyses de cytométrie en flux : croissance cellulaire et viabilité .....	61
4. RT-qPCR.....	67
IV. Discussion .....	71
1. Discussion des résultats.....	73
2. Conclusion et perspectives .....	79

V. Matériel et méthodes .....	81
1. Culture cellulaire .....	83
1.1. Lignée cellulaire.....	83
1.2. Préparation du milieu de culture cellulaire .....	85
1.3. Décongélation des cellules et mise en culture .....	85
1.4. Congélation des cellules .....	89
1.5. Passage des cellules .....	91
1.6. Changement du milieu de culture .....	93
1.7. Induction à la doxycycline .....	95
2. Essai de formation de colonie (CFA).....	97
3. Tests SA- $\beta$ -gal pour le marquage des cellules sénescents.....	99
4. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux, marquage à l'iodure de propidium 101	
5. Test de viabilité cellulaire par cytométrie en flux.....	103
6. RT-qPCR.....	105
6.1. Préparation des échantillons de RT-qPCR.....	105
6.2. Extraction et purification de l'ARN.....	107
6.3. Transcription inverse .....	109
6.4. qPCR.....	111
VI. Bibliographie.....	115

## Résumé

Le suppresseur de tumeur p53 est une protéine centrale dans la régulation de nombreux voies cellulaires, en particulier celles qui concernent l'arrêt du cycle cellulaire et la mort cellulaire programmée par apoptose. En tant que facteur de transcription, une fois activé, p53 régule l'expression de divers gènes impliqués dans ces processus. De plus, suite à un stimulus apoptotique, p53 peut interagir directement avec certains membres de la famille de BCL-2, notamment BAX et BAK, afin d'induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, un événement considéré comme un point de non-retour dans le déroulement de l'apoptose. Dans environ 50 % des cancers humains, une mutation est détectée dans le gène codant pour p53, *TP53*. Les modifications post-traductionnelles (PTMs) jouent un rôle prépondérant dans la régulation de la stabilité et de l'activité de p53. Les recherches récentes du laboratoire ont investigué la fonction de la phosphorylation de la sérine 392 de p53 : un mutant de p53 non phosphorylable en sérine 392 présente une localisation mitochondriale déficiente et une capacité réduite d'induire l'apoptose. Nous montrons de plus dans ce mémoire que l'état phosphorylé ou non de la sérine 392 influe aussi sur la capacité du suppresseur de tumeur d'induire l'arrêt de la croissance et la sénescence. Nos travaux se basent sur l'utilisation de lignées exprimant de manière inductible (système Tet-On) p53 wt, p53 S392A (mutant non phosphorylable) et p53 S392E (mutant phospho-mimétique). Spécifiquement, l'absence de phosphorylation de la sérine 392 (p53 S392A) semble augmenter la capacité de p53 d'induire l'arrêt de la croissance (mesures de densité cellulaire par cytométrie en flux, essais de formation de colonie) ainsi que l'entrée en sénescence (analyses de la morphologie des cellules et de l'activité SA- $\beta$ -galactosidase spécifique de l'état de sénescence). Dans un second temps, afin d'avoir une idée des mécanismes sous-jacents, nous avons réalisé une analyse par RT-qPCR de différents gènes cibles de p53 impliqués dans l'induction de l'arrêt de la croissance et la sénescence. Ces analyses suggèrent une meilleure induction de l'expression de *p21*, un inhibiteur de complexes cycline-CDK, par la version de p53 déphosphorylée en sérine 392 (p53 S392A). Ces analyses devront être poursuivies afin de pouvoir aboutir à des conclusions définitives quant à l'impact de la phosphorylation de la sérine 392 sur l'expressions des différents gènes.

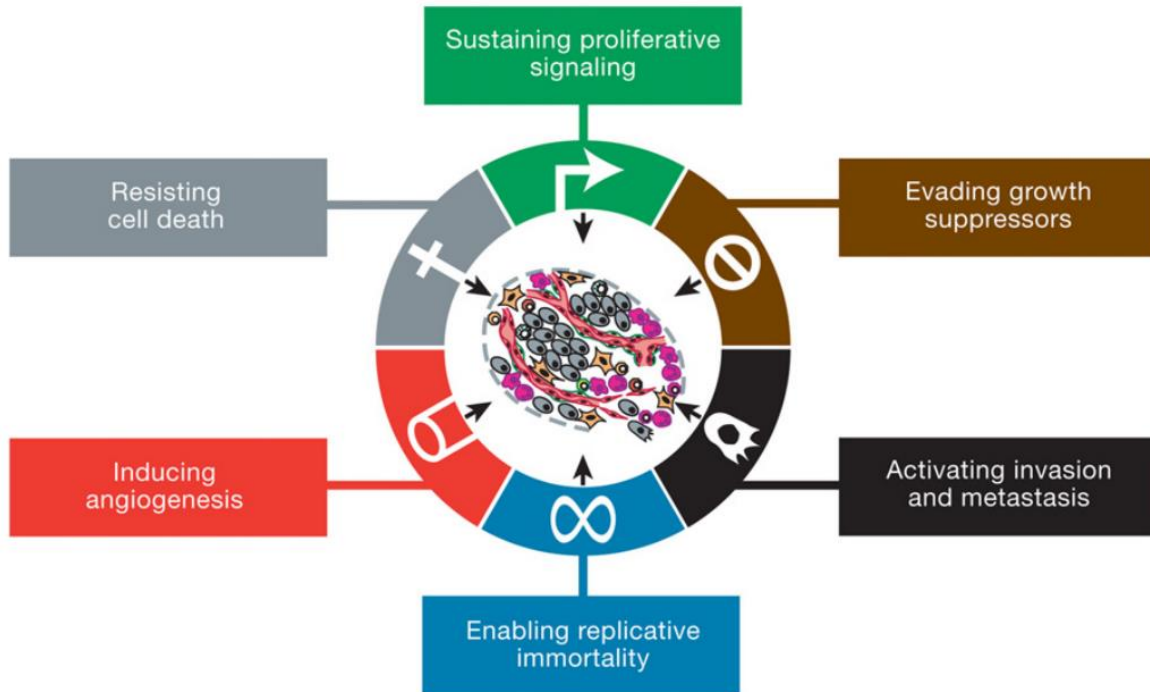


## Abstract

The tumour suppressor p53 is a protein central to the regulation of many cellular pathways, particularly those involving cell cycle arrest and apoptosis-programmed cell death. As a transcription factor, when activated, p53 regulates the expression of various genes involved in these processes. In addition, following an apoptotic stimulus, p53 can interact directly with certain members of the BCL-2 family, notably BAX and BAK, to induce permeabilization of the outer mitochondrial membrane, an event considered to be a point of no return in the apoptosis process. In approximately 50% of human cancers, a mutation is detected in the gene coding for p53, *TP53*. Post-translational modifications (PTMs) play a major role in regulating the stability and activity of p53. Recent research in the laboratory has investigated the function of phosphorylation of serine 392 from p53: a non-phosphorylatable p53 mutant in serine 392 has a deficient mitochondrial localization and a reduced ability to induce apoptosis. In addition, we show in this work that the phosphorylated or non-phosphorylated state of serine 392 also affects the ability of the tumor suppressor to induce growth arrest and senescence. Our work is based on the use of lines expressing in an inducible manner (Tet-On system) p53 wt, p53 S392A (non-phosphoryl mutant) and p53 S392E (phospho-mimetic mutant). Specifically, the absence of phosphorylation of serine 392 (p53 S392A) appears to increase the ability of p53 to induce growth arrest (cell density measurements by flow cytometry, colony formation assays) as well as senescence (analyses of cell morphology and senescence-specific SA- $\beta$ -galactosidase activity). In a second step, in order to get an idea of the underlying mechanisms, we performed an RT-qPCR analysis of different p53 target genes involved in the induction of growth arrest and senescence. These analyses suggest a better induction of the expression of *p21*, an inhibitor of cyclin-CDK complexes, by the dephosphorylated version of p53 in serine 392 (p53 S392A). These analyses will have to be continued in order to reach definitive conclusions on the impact of serine 392 phosphorylation on the expression of the different genes.



# I. Introduction



*Figure 1: Les six propriétés biologiques principales de la cancérisation des cellules : une autosuffisance en signaux de croissance, une capacité à induire l'angiogénèse, une sensibilité altérée aux signaux d'inhibition de la croissance, la résistance à l'apoptose, un potentiel répliatif illimité et la capacité d'invasion des tissus adjacents et distants. (Hanahan et Weinberg, 2011)*

## 1. Généralités à propos du cancer

Durant la période 2006-2016, dans les pays développés, le cancer a dépassé les maladies cardiovasculaires en tant que première cause de décès<sup>1</sup>. Il semble dès lors d'une importance croissante de comprendre les mécanismes moléculaires à l'œuvre dans le développement de ces pathologies, ce qui permettra de les combattre plus efficacement.

Le cancer peut être défini par l'acquisition de six propriétés biologiques principales<sup>2</sup> : une autosuffisance en signaux de croissance, la capacité d'induire l'angiogenèse, une sensibilité altérée aux signaux d'inhibition de la croissance, la résistance à l'apoptose, un potentiel réplicatif illimité et la capacité d'invasion de tissus adjacents et distants, menant à la formation de métastases (Figure 1). L'acquisition de ces propriétés est liée au dysfonctionnement des systèmes régulateurs de la cellule et est associée à des altérations du matériel génétique cellulaire<sup>2</sup>.

Les altérations du génome peuvent conduire à l'augmentation de l'expression ou à la mutation de certains gènes dont le produit promeut la prolifération cellulaire, favorisant la survenue ou la progression du cancer. Ces gènes sont dénommés proto-oncogènes. Un exemple commun de proto-oncogène est le gène *c-myc*<sup>3,4</sup>. Le facteur de transcription myc, dont l'expression est particulièrement forte durant les phases de développement embryonnaire de l'organisme humain (le gène *c-myc* étant activé par des protéines bien connues pour leurs rôles durant le développement embryonnaire comme Wnt et les Shh<sup>5</sup>) promeut en effet l'expression de nombreux gènes eux-mêmes impliqués dans la prolifération cellulaire<sup>6</sup>. BCL-2 (B-cell lymphoma 2), membre fondateur de la famille de protéines qui porte son nom, en raison de son caractère anti-apoptotique, fait également partie de cette catégorie de gènes lorsque son expression est dérégulée dans le cancer<sup>7</sup>. D'autres gènes, quant à eux, sont dénommés suppresseurs de tumeur<sup>8</sup>. Les produits de ces gènes ont un rôle d'inhibiteur de la prolifération cellulaire et/ou d'inducteur de la mort cellulaire. Ils préviennent le développement de cancer et sont essentiels pour empêcher la prolifération de cellules dont l'intégrité est compromise.

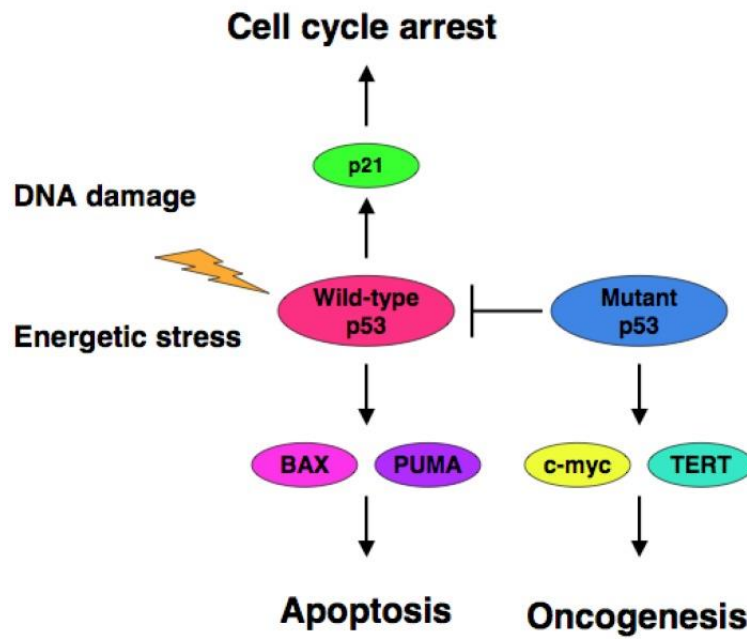


Figure 2: Activités de p53 wild type (wt) et mutant. Les fonctions de suppresseur de tumeur (induction de l'arrêt du cycle cellulaire ou de l'apoptose) de p53 wt peuvent être significativement inhibées par certains de ses mutants. Ces mutants peuvent de plus induire l'expression de certains oncogènes tels que c-myc et TERT. (Ozaki et Nakagarawa, 2011).

## 2. Le suppresseur de tumeur p53

Parmi les très nombreuses protéines connues pour être impliquées dans le cancer, le suppresseur de tumeur p53 est intensivement étudié, en raison de son rôle de régulateur de diverses fonctions cellulaires (contrôle du cycle cellulaire, sensibilité aux signaux de régulation de la croissance, réponse aux signaux proapoptotiques, réparation de l'ADN, métabolisme énergétique, ...)⁸. La régulation de l'activité de p53 est de plus très complexe. Elle implique notamment de nombreuses et diverses modifications post-traductionnelles, ainsi que des interactions avec de multiples partenaires protéiques⁸. Cette complexité est la raison pour laquelle de nombreux détails concernant la régulation de l'activité de p53 sont encore peu compris de nos jours, ouvrant la voie à une exploration plus approfondie de ses fonctions.

La protéine p53, dont le nom réfère à un poids moléculaire apparent de 53 kilodaltons en électrophorèse SDS-PAGE, fut découverte simultanément en 1979 par plusieurs équipes de recherche différentes⁹-¹¹. Son gène, *TP53*, fut identifié chez l'humain en 1984 et localisé sur le bras court du chromosome 17¹². Il fut classé dans un premier temps parmi les oncogènes, ses propriétés ayant été étudiées dans des lignées cellulaires cancéreuses¹³. Entre autres, l'abondance de p53 dans beaucoup de lignées cellulaires cancéreuses était très supérieure à celle observée chez les cellules normales, ce qui laissa supposer que cette protéine devait être impliquée dans la survenue ou la progression du cancer. Les lignées cancéreuses étudiées exprimaient en réalité une forme de p53 mutée et inactive en tant que suppresseur de tumeur.

Ce n'est qu'en 1989 que l'on découvrit que *TP53* était inactivé par mutation durant le développement de très nombreux cancers¹⁴,¹⁵. Le rôle de suppresseur de tumeur de p53 Wild Type (wt) fut dès lors rapidement mis en évidence. On se rendit également compte que la version mutée de p53 pouvait se comporter comme un oncogène et promouvoir le développement du cancer¹⁶ (Figure 2).

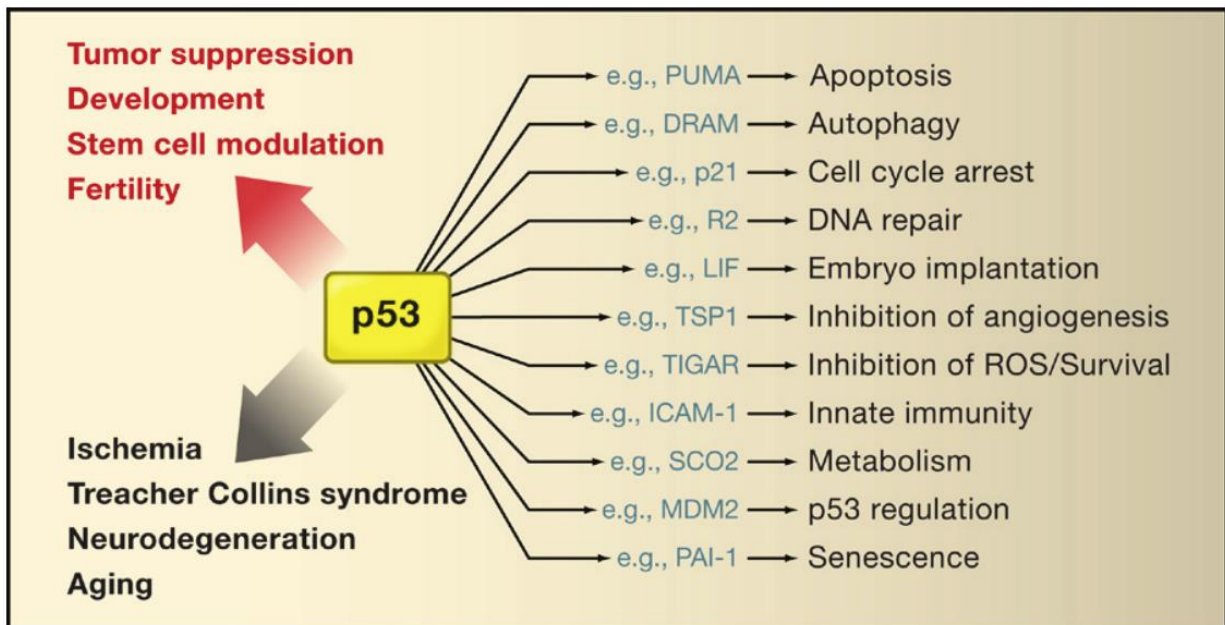


Figure 3: Contribution du facteur de transcription p53 à différents processus cellulaires. Ces processus peuvent être positifs pour la survie et la pérennité de l'organisme (flèche rouge) ou au contraire néfastes à son bon fonctionnement (flèche noire). À noter que, pour chaque processus cellulaire, une seule cible transcriptionnelle de p53 est citée sur cette figure, mais très souvent de nombreuses autres cibles ont été identifiées. (Vousden et Prives, 2009)

Depuis lors, de nombreuses recherches ont confirmé l'importance de p53 dans la protection contre le cancer par sa régulation de l'apoptose<sup>17</sup>, de la sénescence<sup>18</sup>, de l'autophagie<sup>19</sup>, de l'arrêt du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN<sup>20</sup>, ainsi que dans de nombreux autres processus vitaux pour la cellule et l'organisme<sup>8</sup> (Figure 3). On lui a notamment trouvé un rôle dans le processus de reproduction<sup>21</sup>, dans l'inhibition de la production de ROS (Reactive Oxygen Species)<sup>22,23</sup> ainsi que dans l'immunité<sup>24</sup> et dans plusieurs voies métaboliques<sup>25</sup>. Le rôle de p53 ne se limite donc pas à la protection de l'organisme contre le cancer : il s'agit d'un centre intégrateur de nombreuses voies de signalisation cellulaires, d'un effecteur de l'apoptose et d'un facteur de transcription régulant l'expression de nombreux gènes<sup>8</sup>.

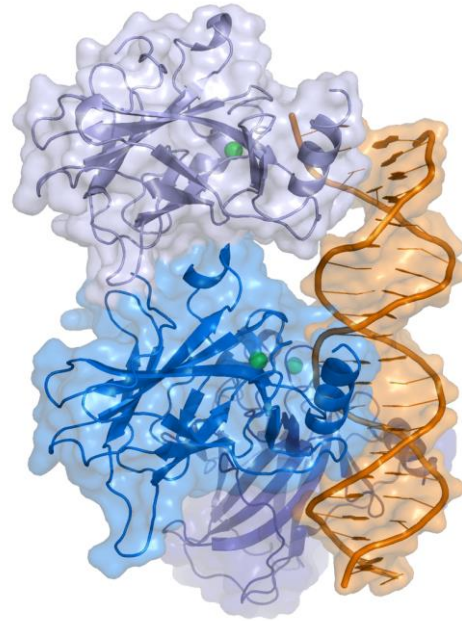


Figure 4: Structure cristallographique d'un tétramère de p53 lié à une molécule d'ADN. (Cho et al., 1994)

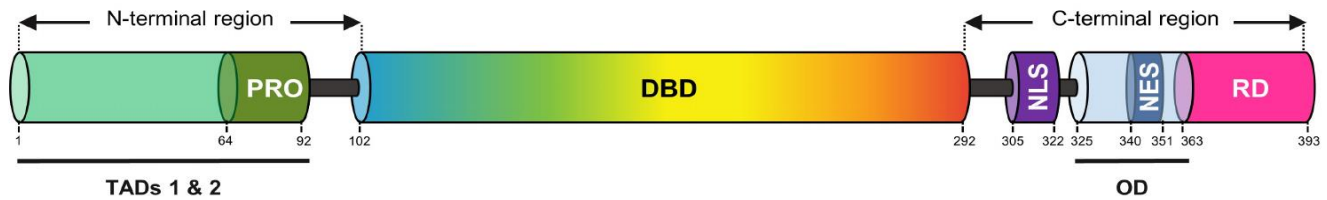


Figure 5: Représentation schématique des différents domaines de p53. TAD: Trans-Activation Domain. PRO: Proline-Rich Domain. DBD: DNA-Binding Domain. NLS: Nuclear Localisation Signal. OD: Oligomerization Domain. NES: Nuclear Export Signal. RD : Regulatory Domain. (Castrogiovanni, 2017)

## 2.1. Structure de p53

Le suppresseur de tumeur p53, en tant que facteur de transcription, interagit avec le promoteur de ses gènes cibles sous la forme d'un tétramère composé de quatre sous-unités identiques<sup>26</sup> (Figure 4).

Chacune de ces sous-unités est constituée de différents domaines, définis en fonction du rôle qu'ils jouent dans la fonction de la protéine<sup>27</sup> (Figure 5). Ainsi, en partant du côté N-terminal de la protéine, on peut citer tout d'abord les TADs 1 et 2 (domaines d'activation de la transcription 1 et 2) qui sont requis pour l'activité transcriptionnelle de p53. C'est aussi via le TAD 1 que l'ubiquitine E3 ligase MDM2 interagit avec le suppresseur de tumeur<sup>28</sup>. MDM2 est le régulateur principal de l'activité de p53. Les TADs sont suivis par un domaine riche en prolines dont la présence est responsable du poids moléculaire apparent en SDS-PAGE de 53 kilodaltons alors que le poids moléculaire réel de la protéine est de 43,7 kDa<sup>29</sup>. Le centre de la séquence protéique est occupé par un DBD (domaine de liaison à l'ADN) long de 190 acides aminés. Après le DBD, différents éléments sont rencontrés : un signal de localisation nucléaire (NLS) reconnu par les importines (importin  $\alpha/\beta$  complex) et permettant la relocalisation de p53 dans le noyau<sup>30</sup>, ainsi qu'une séquence signal pour son export nucléaire (NES). Celle-ci est comprise dans le domaine d'oligomérisation (OD). Enfin, on trouve une région C-terminale appelée domaine régulateur (RD). Elle est la cible, comme la partie N-terminale de la protéine, de diverses modifications post-traductionnelles<sup>8</sup>.

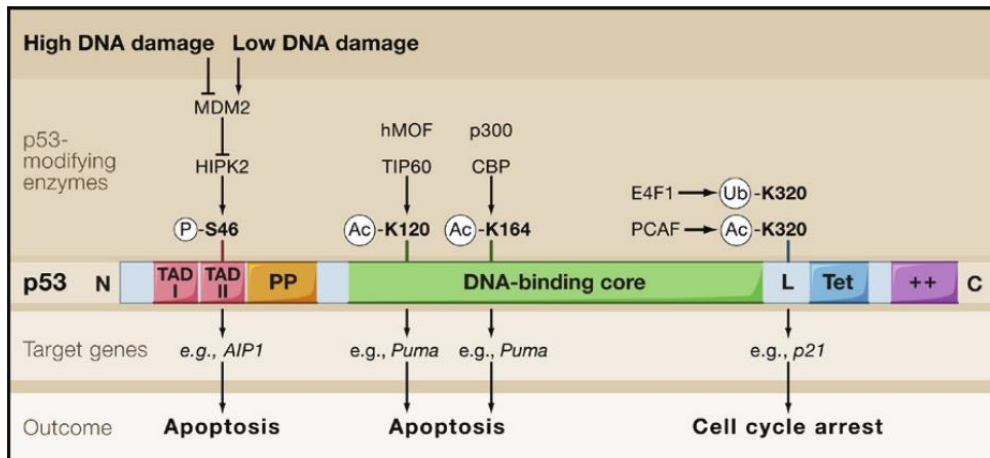


Figure 6: Impact de quelques modifications post-traductionnelles (PTMs) de p53 (P : phosphorylation, Ac : acétylation, Ub : ubiquitination). Les PTMs illustrées sur ce schéma ont une influence sur la réponse orchestrée par p53 suite à un stress. On peut par exemple noter que la phosphorylation de la sérine 46 oriente la cellule vers l'apoptose. Notons que la réponse cellulaire dépendante de p53 dépend également de la quantité de dommages subit par la cellule (Vousden et Prives, 2009).

## 2.2. Régulation de l'activité de p53

Les modifications post-traductionnelles (phosphorylations, acétylations, ubiquitinations, ...) de p53 sont très nombreuses et ont un impact majeur sur son activité<sup>8</sup> (Figure 6). Par exemple, la sérine 46 du TAD 2 peut se faire phosphoryler par HIPK2 (Homeodomain-interacting protein kinase 2), une kinase dont la stabilité est dépendante de l'activité de MDM2 (qui induit en temps normal sa dégradation)<sup>31</sup>. La phosphorylation de la sérine 46 promeut l'activité proapoptotique de p53<sup>8</sup>. De même, l'acétylation des lysines 120 et 164, localisées dans le DBD, sont connues pour promouvoir l'apoptose<sup>8</sup>. L'acétylation de la lysine 120 est catalysée par deux histone acétyltransférases, hMOF<sup>32</sup> et Tip60<sup>33</sup>. Les cellules exprimant une protéine p53 avec une lysine 120 mutée en arginine présentent une capacité altérée d'induire l'apoptose<sup>8</sup>. La lysine 164 quant à elle est acétylée par les coactivateurs transcriptionnels p300 et CBP (CREB-binding protein)<sup>34</sup>. Il semblerait que cette acétylation soit importante pour l'induction de l'expression de nombreux gènes régulés par p53. Du côté C-terminal, la lysine 320, une fois ubiquitinylée par E4F1 ou acétylée par PCAF (P300/CBP-associated factor), promeut l'arrêt du cycle cellulaire<sup>8</sup>.

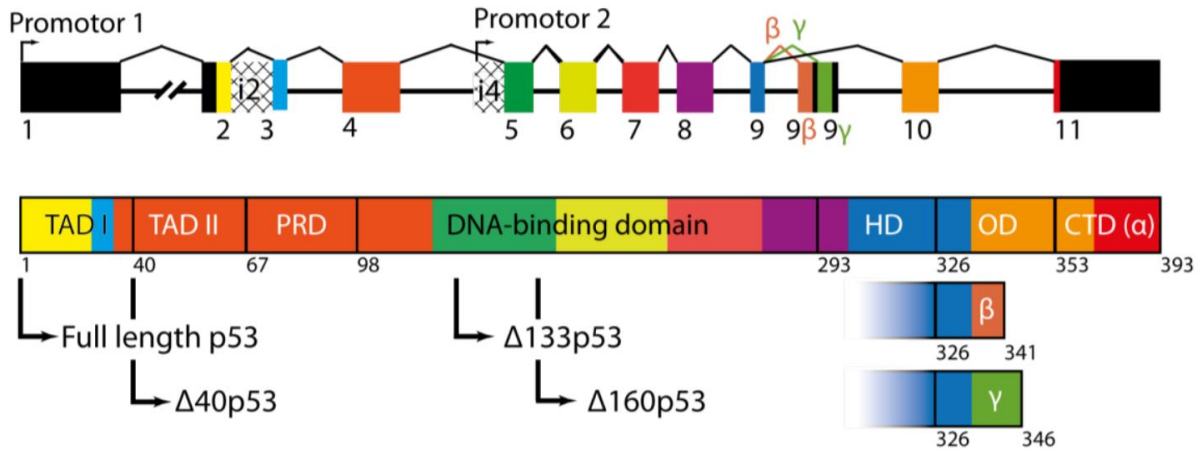


Figure 7 : **(Dessus)** Structure du gène TP53. Les exons sont représentés par des boîtes remplies, chacune d'une couleur propre à un seul exon. Le promoteur 1 permet de produire la protéine p53 « full-length » ainsi que l'isoforme  $\Delta 40p53$ . Le promoteur 2 produit les transcrits codant pour les isoformes  $\Delta 133p53$  et  $\Delta 160p53$ , qui débutent respectivement aux codons 133 et 160. Les isoformes C-terminaux de p53 sont contrôlés par l'épissage alternatif de l'exon 9. **(Dessous)** Protéine p53. Les différentes couleurs employées permettent de reconnaître à quelle(s) région(s) de la protéine correspondent chaque exon. TAD I et II, Transactivation Domain 1 et 2 ; PRD, Proline Rich Domain ; HD, Hinge Domain ; OD, Oligomerization Domain ; CTD, C-Terminal Domain. Les flèches indiquent le point de départ des différents isoformes. En bas à droite : représentation des différentes variations possibles au niveau de la région C-terminale. (Vieler et Sanyal, 2018)

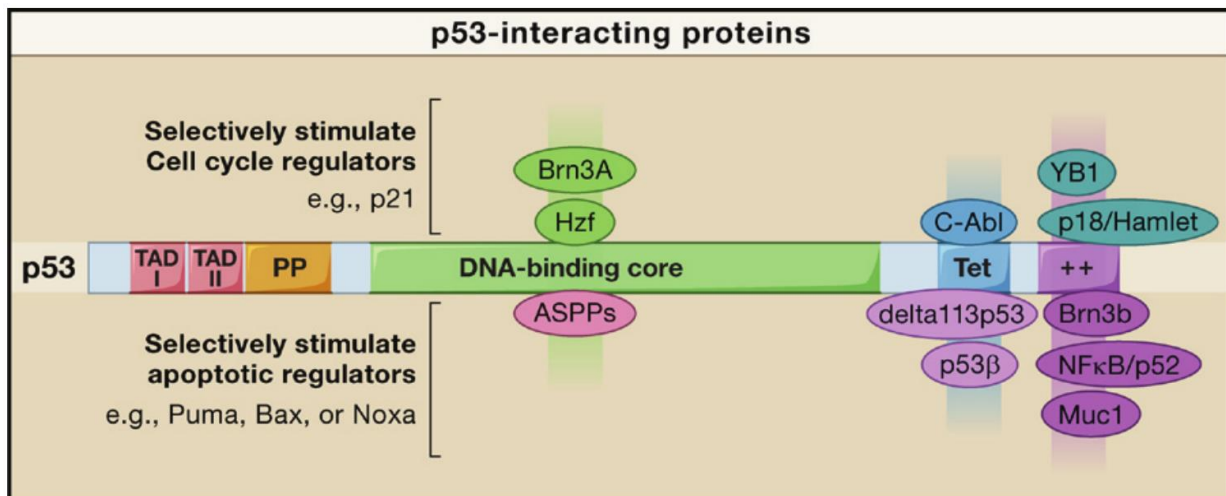


Figure 8 : Quelques protéines interagissant physiquement avec p53. Elles sont classées suivant leurs effets sur l'activité du suppresseur de tumeur. Sur le schéma, les protéines situées au-dessus de p53 stimulent l'arrêt du cycle cellulaire (expression de p21) tandis que celles en-dessous favorisent l'expression de protéines proapoptotiques comme BAX, NOXA, PUMA. (Vousden et Prives, 2009)

### 2.3. Le gène *TP53*

Il existe de nombreux isoformes de p53 grâce à l'épissage alternatif du gène *TP53*<sup>35</sup> (Figure 7). L'épissage alternatif de l'intron neuf, en particulier, est à l'origine de plusieurs variantes de p53 (dénommés  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ )<sup>36</sup>. La présence de deux codons START différents au sein de la séquence du gène permet également d'augmenter la diversité des isoformes obtenues<sup>37</sup>. On dénombre de nos jours une douzaine d'isoformes différentes de p53 dont l'expression varie en fonction des tissus<sup>36,37</sup>.

Dans plus de 50% des cancers humains, une mutation est retrouvée au niveau du gène *TP53*<sup>38</sup>. Des mutations sont plus susceptibles de se produire dans certaines régions, et quatre sites préférentiels ont été découverts<sup>26</sup>. Ils sont tous situés dans le DBD<sup>38</sup>, qui comprend par ailleurs 95% de toutes les mutations retrouvées dans les cellules cancéreuses<sup>39</sup>. Les régions du DBD les plus fréquemment mutées sont également des régions très conservées de la protéine<sup>40</sup>. p53 étant un facteur de transcription, il doit pouvoir se lier à l'ADN pour moduler l'expression des gènes qu'il régule. Une mutation située dans le domaine de liaison à l'ADN a donc pour risque de perturber la capacité de liaison de p53 à l'ADN et de le rendre inactif en tant que facteur de transcription. De plus, p53 contacte directement d'autres protéines impliquées dans l'apoptose via les acides aminés situés dans le DBD<sup>8</sup> (Figure 8).

Il existe des cas de mutations de *TP53* héréditaires. Le syndrome de Li-Fraumeni est une maladie génétique dans laquelle des mutations de *TP53* sont présentes au niveau des cellules de la lignée germinale et dès lors transmises à la descendance<sup>41</sup>. En raison de la présence d'un seul allèle fonctionnel de *TP53* chez les personnes atteintes, le risque de développer des cancers (suite à l'inactivation du second allèle) à un âge jeune et à de multiples reprises au cours de la vie est très élevé<sup>41</sup>. Notons qu'aucune naissance présentant une double mutation inactivante de *TP53* n'a été rapportée, ce qui peut suggérer qu'il s'agit d'une mutation létale pour l'embryon humain<sup>42</sup>.

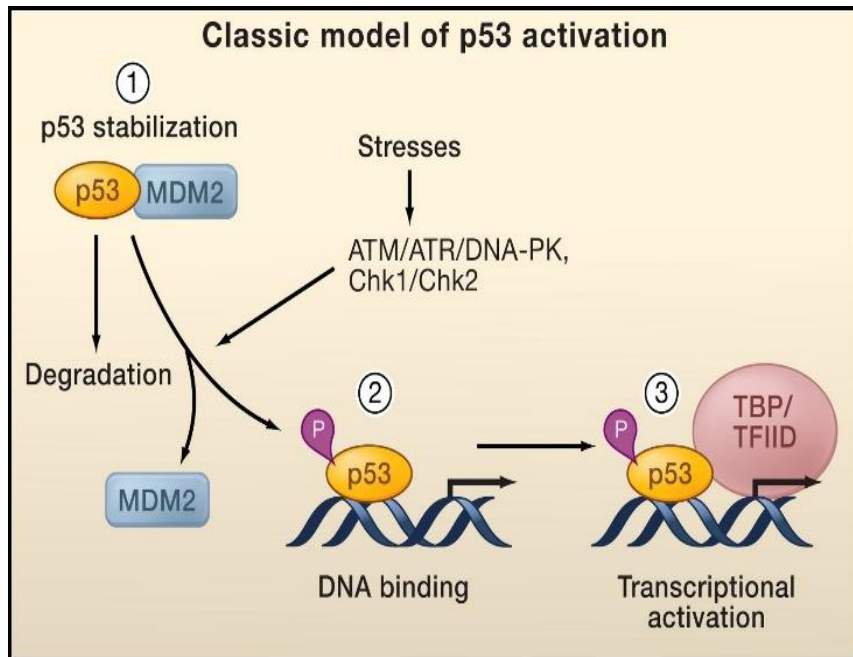


Figure 7: Modèle classique de l'activation de p53. En l'absence de stress, p53 est dégradé suite à son ubiquitination par MDM2. L'occurrence d'un stress induit une chaîne d'événements. 1 : Stabilisation de p53 suite à la phosphorylation de différents résidus (situés dans le TAD1) par les kinases ATM/ATR/DNA-PK/Chk1/Chk2. (P : phosphorylation). 2 : Liaison de p53 à l'ADN. 3 : Démarrage de la transcription des gènes régulés par p53 par recrutement des protéines initiateuses de la transcription. (Kruse et Gu, 2009)

#### 2.4. Mécanisme fonctionnel de p53

La protéine p53 est principalement localisée dans le cytoplasme dans une cellule normale qui ne subit pas de stress<sup>43</sup>. Bien que synthétisée de façon continue, elle n'est présente qu'en quantité très faible. Cela est le résultat de son interaction avec MDM2 (Mouse Double Minute 2). Cette ubiquitine E3 ligase se lie à la protéine p53 au niveau du TAD 1 N-terminal et la marque avec des ubiquitines, induisant sa dégradation par le complexe du protéasome 26S<sup>28,44,45</sup> (Figure 9). Cette dégradation continue empêche l'accumulation de p53 dans le cytoplasme de la cellule en l'absence de stress. La stabilisation de p53 et son activation font suite à l'impossibilité de MDM2 de se lier à p53 en raison de la phosphorylation de différents résidus du TAD1. Ces phosphorylations, qui empêchent les deux protéines d'interagir l'une avec l'autre, sont réalisées par différentes protéines kinases impliquées dans la détection d'un stress cellulaire et plus particulièrement dans la réponse aux dommages à l'ADN. Il s'agit principalement des kinases ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), ATR (Ataxia Telangiectasia Related), DNA-PK (DNA-Protein Kinase), CHK1 (Checkpoint Kinase 1) et Chk2 (Checkpoint Kinase 2)<sup>43</sup>. Une fois stabilisée, l'abondance de p53 augmente drastiquement au sein de la cellule. Diverses modifications post-traductionnelles supplémentaires permettront une modulation fine de l'activité du suppresseur de tumeur<sup>8</sup>.



D'une part, en tant que facteur de transcription, la protéine p53 est capable, une fois activée, de rentrer dans le noyau, de s'assembler pour former un complexe tétramérique et de se fixer à certaines régions régulatrices de l'ADN afin de promouvoir la transcription de divers gènes dont les produits sont impliqués notamment dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou la sénescence<sup>8</sup>. Plus d'une centaine de gènes (environ 120) ont été découverts jusqu'à nos jours comme étant directement régulés par p53. On peut citer parmi ceux-ci les gènes codant pour p21, PUMA, NOXA, GADD45, ainsi que le gène codant pour MDM2, le principal régulateur de l'activité de p53<sup>8</sup>. Les changements physiologiques au sein de la cellule sont donc le fait de variations d'abondance de certaines protéines dont l'expression est directement régulée par p53.

D'autre part, et spécifiquement dans le contexte de l'apoptose, la protéine p53 peut interagir directement avec plusieurs protéines membres de la famille Bcl-2, afin d'induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et la libération du cytochrome C dans le cytosol, une étape essentielle à l'induction de l'apoptose<sup>46</sup>.

Ces deux modes d'action de p53, que nous verrons plus en détail dans le chapitre consacré à l'apoptose, sont respectivement nommés comme étant la voie indirecte (ou dépendante de la transcription) et la voie directe mitochondriale (ou indépendante de la transcription).



### 3. Sénescence

Lorsqu'une cellule perd sa capacité de réaliser une mitose et reste indéfiniment bloquée en phase G1 du cycle cellulaire, elle est dite sénescence. En 1961, L. Hayflick fut, conjointement avec son collaborateur P. S. Moorhead, le premier à mettre en évidence le potentiel de division limité des cellules somatiques normales<sup>47</sup>. Leurs observations, réalisées à partir de cultures de fibroblastes humains, leur permirent de conclure que les cellules cessaient définitivement de proliférer après un nombre défini de divisions<sup>47</sup>.

Les travaux portant sur cet état des cellules qui composent notre organisme font état de deux types distincts de sénescence, différenciées par leur cause. D'une part, la sénescence répllicative est consécutive à un raccourcissement critique des télomères protégeant l'extrémité de chaque chromosome<sup>18</sup>. D'autre part, la sénescence induite par les stress est déclenchée suite à l'exposition de cellules à des stress divers (stress oxydatifs, facteurs métaboliques, agents génotoxiques, activation d'oncogènes)<sup>18</sup>. Cet arrêt de la prolifération cellulaire est le plus souvent lié à l'activation de la voie dépendante de p53, ce qui peut être surprenant au premier abord pour une protéine dont l'un des rôles les plus étudiés est de permettre l'élimination par apoptose des cellules dont l'intégrité est compromise. De nombreuses recherches mettent cependant en évidence que l'arrêt de la croissance induit par p53 est également primordial pour ses fonctions de suppresseur de tumeur<sup>8</sup>.

La sénescence est notamment caractérisée par des changements biochimiques et morphologiques au niveau de la cellule. On peut évoquer entre autres la surexpression de l'enzyme lysosomiale  $\beta$ -galactosidase<sup>48</sup>. L'augmentation de son activité est utilisée en laboratoire pour détecter les cellules sénescences au sein d'une culture cellulaire adhérente. La morphologie de la cellule sénescence, telle qu'elle apparaît en culture cellulaire adhérente, est également typique, avec une forme « d'œuf sur le plat »<sup>27</sup>.

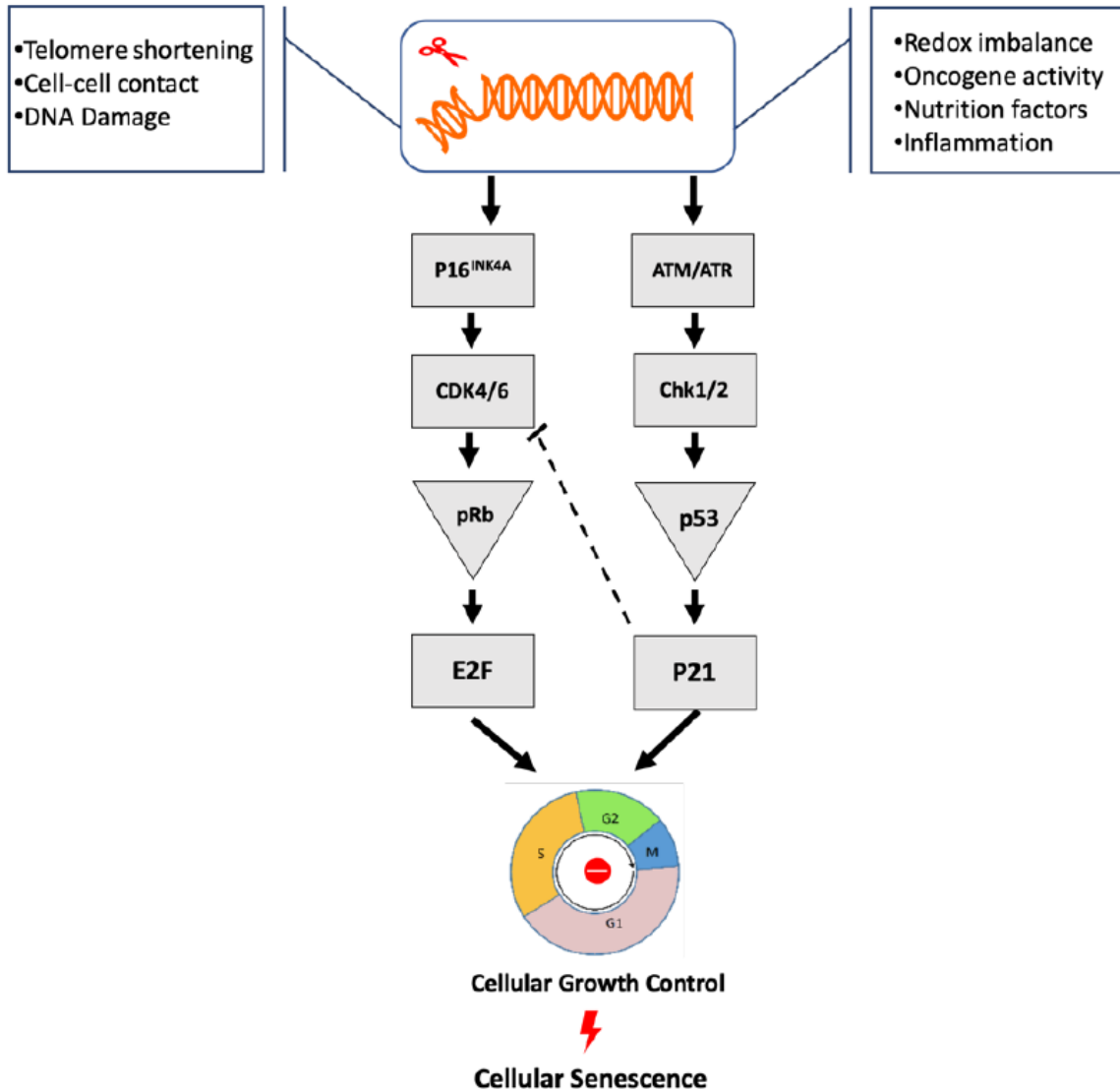


Figure 8: Initiation de la sénescence par les voies de régulation  $p53/p21$  et  $p16^{INK4A}/pRb$ . Différents stress déclenchent dans un premier temps une réponse de dommage à l'ADN (DDR, DNA Damage Response) qui active les voies dépendantes de  $p53/p21$  et  $p16^{INK4A}/pRb$ .  $P16^{INK4A}$  inactive les CDK4/6 (CDK, cyclin-dependent kinase), ce qui entraîne l'accumulation de pRb déphosphorylé. Cela a pour conséquences l'inhibition des facteurs de transcription E2Fs et l'arrêt du cycle cellulaire. D'autres senseurs de DDR sont également activés par les stress, à savoir les voies ATM/Chk2 (Ataxia Telangiectasia Mutated/Checkpoint kinase 2) et ATR/Chk1 (Ataxia Telangiectasia Related/Checkpoint kinase 1). Ces voies vont activer la protéine p53 (par phosphorylation de différents acides aminés). Ce dernier peut dès lors induire l'expression de p21, un inhibiteur de complexes cycline/CDK. L'induction prolongée de ces différentes voies conduit à la sénescence. (Mijit et al., 2020)

Il a été démontré que la sénescence pouvait être induite par p53 via la protéine p21, une protéine également dénommée CDKN1 (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1, inhibiteur de cycline dépendante de kinase 1), qui comme son nom l'indique inhibe les CDKs (Cyclin Dependent Kinases, kinases dépendantes des cyclines) nécessaires pour le déroulement du cycle cellulaire<sup>49</sup>. En l'absence de CDK active, il y a un arrêt du cycle cellulaire, entre autres au point de contrôle G1/S, ce qui empêche la réalisation d'une phase S et donc bloque la prolifération de cellules comportant des dommages à l'ADN. Notons que p21 peut inhiber de multiples complexes cycline-CDK et provoquer un arrêt du cycle à différentes phases<sup>49</sup>.

L'axe p53/p21 n'est pas le seul impliqué : les protéines p16<sup>INK4A</sup> et pRb (Retinoblastoma protein) sont également inductrices de la sénescence (Figure 10). p16<sup>INK4A</sup> est, tout comme p21, un inhibiteur de CDK. Elle freine la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à S<sup>50,51</sup> en inactivant CDK4/6, ce qui induit l'accumulation de pRb déphosphorylée<sup>52</sup>. La concentration en p16<sup>INK4A</sup> est élevée *in vitro* dans les cellules sénescents. *In vivo*, dans les tissus âgés, on peut également observer une augmentation de son expression. Cela en fait un biomarqueur de choix, tout comme la  $\beta$ -galactosidase, pour détecter la sénescence<sup>53</sup>. pRb promeut l'arrêt du cycle et la sénescence, tout particulièrement en empêchant l'entrée en phase S et donc la réplication de l'ADN<sup>52,54</sup>. Pour ce faire, elle inhibe l'activité des facteurs de transcription E2Fs dont certains gènes cibles sont critiques pour la réalisation de la phase S. Elle participe également à la formation des SAHFs (Senescence Associated Heterochromatic Foci), des régions de l'ADN compactées en hétérochromatine, qui sont des marqueurs de la sénescence<sup>54</sup>.

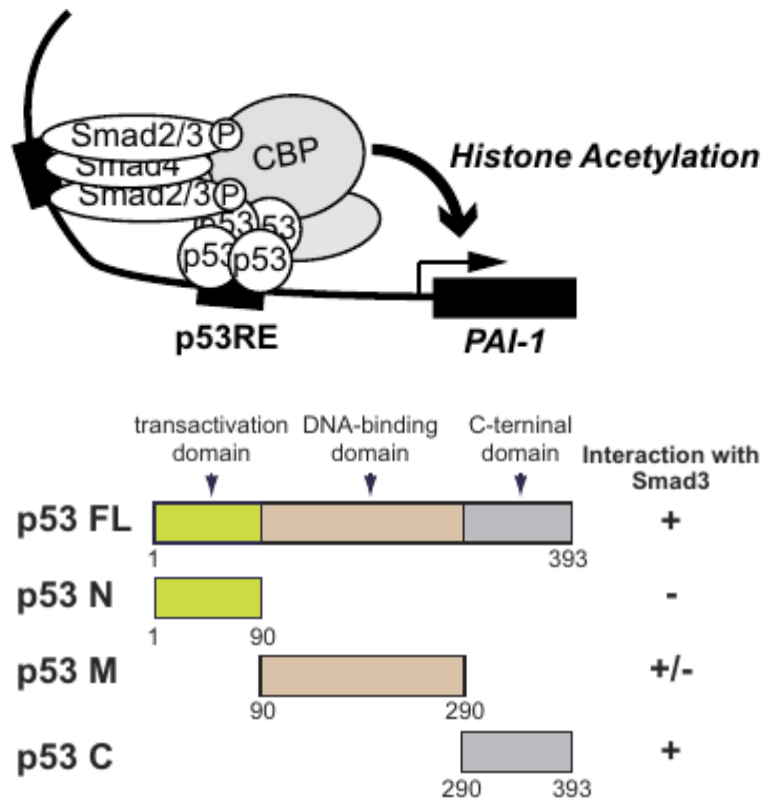


Figure 9: (**Dessus**) Mécanisme proposé de l'activation de la transcription de PAI-1. Les Smads2/3, qui transloquent dans le noyau suite à une induction de la voie du TGF- $\beta$ , se lient au promoteur de PAI-1. L'activation de la transcription de PAI-1 implique également la liaison de p53 au promoteur et le recrutement de l'histone acétyltransférase CBP. (**Dessous**) La partie C-terminale de p53 (acides aminés 290 à 393) interagit avec Smad3 (Adapté de Kawarada et al., 2016).

Enfin, la sénescence est également promue par la voie de signalisation du TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ), qui induit l'arrêt du cycle cellulaire aux stades précoces de la cancérisation<sup>55</sup>. En revanche, cette voie facilite le développement tumoral aux stades avancés par un basculement dont le mécanisme reste à élucider. Il se pourrait que la régulation de la transcription de PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1), protéine impliquée dans l'effet cytostatique de la voie TGF- $\beta$  et dont la transcription est activée par l'association à son promoteur de p53 avec les protéines Smad2 et Smad3 (des protéines transductrices du signal de la voie TGF- $\beta$ ), soit la clef de voute de ce basculement<sup>55</sup>. En effet, la protéine p53 augmentant l'effet cytostatique de la voie TGF- $\beta$ , une mutation de p53 proscrivant son interaction avec Smad2/3 au promoteur de PAI-1 (ou son inactivation aux stades de cancérisations avancés) pourrait expliquer cet effet. A noter que c'est la partie C-terminale de p53, région contenant la partie régulatrice de la protéine, qui semble interagir avec les Smads (Figure 11).



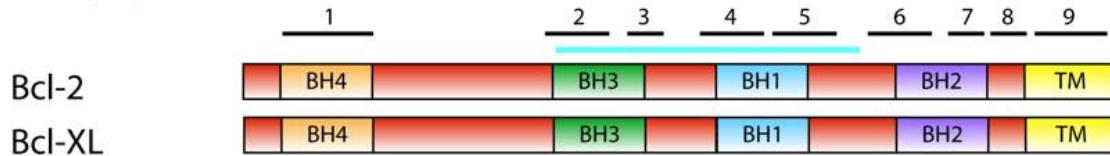
## 4. Apoptose

L'apoptose, processus de mort cellulaire programmée caractérisé par des critères morphologiques définis par Kerr *et al.*<sup>56</sup>, est décrite comme un suicide cellulaire lié à l'activation des caspases effectrices, des protéases cytosoliques qui une fois activées, coupent les liens peptidiques au niveau de sites consensus spécifiques<sup>57</sup>. Au stade ultime de ce processus, la cellule se désintègre en corps apoptotiques facilement phagocytés par les macrophages du système immunitaire<sup>58</sup>. L'activation des caspases peut avoir comme cause beaucoup de facteurs différents, comme par exemple la présence de dommages à l'ADN ou un déficit en facteurs de croissance<sup>57</sup>. L'apoptose n'est pas toujours une réponse à une situation pathologique et est même nécessaire pour le bon déroulement de certains processus lors de l'embryogenèse animale et humaine<sup>59</sup>, tels que la séparation des doigts de la main<sup>60</sup>. Contrairement à la nécrose, qui n'est pas une forme de mort cellulaire programmée, les cellules apoptotiques conservent une membrane plasmique intègre jusqu'aux étapes finales du processus où la cellule se fragmente en de petits compartiments, les corps apoptotiques, contenant des organites par ailleurs toujours fonctionnels<sup>58</sup>. L'apoptose n'entraîne pas de processus inflammatoire<sup>58</sup>. Elle s'accompagne d'une externalisation de résidus phosphatidylsérines de la membrane plasmique, ce qui favorise la reconnaissance des corps apoptotiques par les cellules capables de phagocytose<sup>61</sup>. La protéine p53 dispose de deux modes différents d'induction de l'apoptose<sup>27</sup>. Ces deux modes d'induction sont respectivement nommés dans la littérature comme étant la voie indirecte (dépendante de la transcription, point 4.2) et la voie directe mitochondriale (indépendante de la transcription, point 4.3).

Un événement critique durant le processus apoptotique est la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MME)<sup>62</sup>. La perméabilisation de la MME, événement souvent surnommé dans la littérature « point de non-retour », conduit à la libération dans le cytosol des différents effecteurs mitochondriaux de l'apoptose. Parmi ceux-ci, le cytochrome C qui permettra la formation du complexe de l'apoptosome, une plate-forme pour le recrutement et l'activation de la procaspase-9 initiateur (dont nous reparlerons au point 4.3).

### Multidomain

#### Antiapoptotic



#### Proapoptotic



### "BH3 only"



Figure 10 : Les membres de la famille de Bcl-2. La famille comporte des protéines multi-domaines qui peuvent être pro- ou antiapoptotiques. Le troisième groupe est constitué de l'ensemble des petites protéines dites « BH3-Only » qui ne conservent qu'un seul domaine d'homologie à BCL-2. Les domaines BH (Bcl-2 Homology) qui caractérisent les membres de cette famille de protéines sont indiqués en couleur (BH1, 2, 3, 4). Le domaine transmembranaire (TM) que certains membres de la famille comportent est représenté en jaune sur le schéma. Notons que la liste des membres de la famille de BCL-2 n'est pas complète sur le schéma présenté (Polčic et al., 2015).

#### 4.1. Les protéines de la famille de BCL-2

Le principal régulateur de la perméabilisation de la MME est une famille de protéines, les membres de la famille de BCL-2<sup>62</sup>. Tous les membres de cette famille régulent le processus apoptotique et sont caractérisés par la présence de domaines BH (BCL-2 Homology). Les membres de cette famille de protéines peuvent être divisés en trois groupes (Figure 12).

D'une part, les protéines proapoptotiques effectrices multi-domaines (BAX, BAK et BOK) contiennent trois domaines BH (BH1, BH2, BH3) ainsi qu'un domaine transmembranaire TM)<sup>62</sup>. Une fois activées, ces protéines sont capables de s'oligomériser au sein de la MME et de créer des pores qui permettent la libération des effecteurs mitochondriaux de l'apoptose.

Le second groupe comporte les membres antiapoptotiques de la famille (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, ...) (Figure 12). Ils ont pour fonction de lier et d'inhiber les membres proapoptotiques de la famille en l'absence d'un stimulus adéquat<sup>62</sup>. Les membres de ce groupe disposent des quatre domaines BH ainsi que d'un domaine TM.

Le troisième groupe comporte les petites protéines dites « BH3-Only »<sup>62</sup>. Comme leur nom l'indique, elles ne conservent qu'un seul des quatre domaines BH. Elles disposent ou non d'un domaine transmembranaire et ont toutes une fonction proapoptotique. Ces protéines peuvent agir de deux manières différentes. Premièrement, elles peuvent lier et inhiber les membres anti-apoptotiques de la famille. Deuxièmement, certaines protéines de type « BH3-Only » sont capables, une fois activées, d'interagir directement avec BAX ou BAK (protéines multi-domaines effectrices) induisant un changement de conformation, leur oligomérisation au sein de la MME ainsi que la perméabilisation de cette dernière.



#### 4.2.Voie indirecte (dépendante de la transcription)

Le facteur de transcription p53 induit, une fois activé, l'expression de plusieurs gènes codant pour des protéines proapoptotiques<sup>8</sup>. Parmi celles-ci, on trouve différents membres de la famille de BCL-2 dont PUMA (p53 Upregulated Modulator of Apoptosis) et NOXA (du latin *Noxa* : tort, préjudice, dommage). Ces protéines, PUMA et NOXA, ont une importance critique dans le processus d'apoptose, bien que leur présence ne soit néanmoins pas requise<sup>8</sup>.

PUMA se lie aux membres antiapoptotiques de la famille BCL-2 par leur sillon hydrophobe, proscrivant à ces protéines d'interagir et de réprimer l'action des membres proapoptotiques tels que BAX et BAK<sup>63</sup>. NOXA agit également en réprimant les membres antiapoptotiques de la famille BCL-2 en association avec BAD, mais ne se lie qu'à deux membres précis, à savoir Mcl-1 et Bfl1/A1<sup>64</sup>. Mcl-1 semble être marqué pour la dégradation protéasomale à la suite de son interaction avec NOXA<sup>64</sup>. De plus, il semblerait que NOXA puisse former des complexes avec BAK et BAX au niveau de la mitochondrie, via son domaine BH3, ce qui est suivi par la mort cellulaire programmée de la cellule<sup>65</sup>.

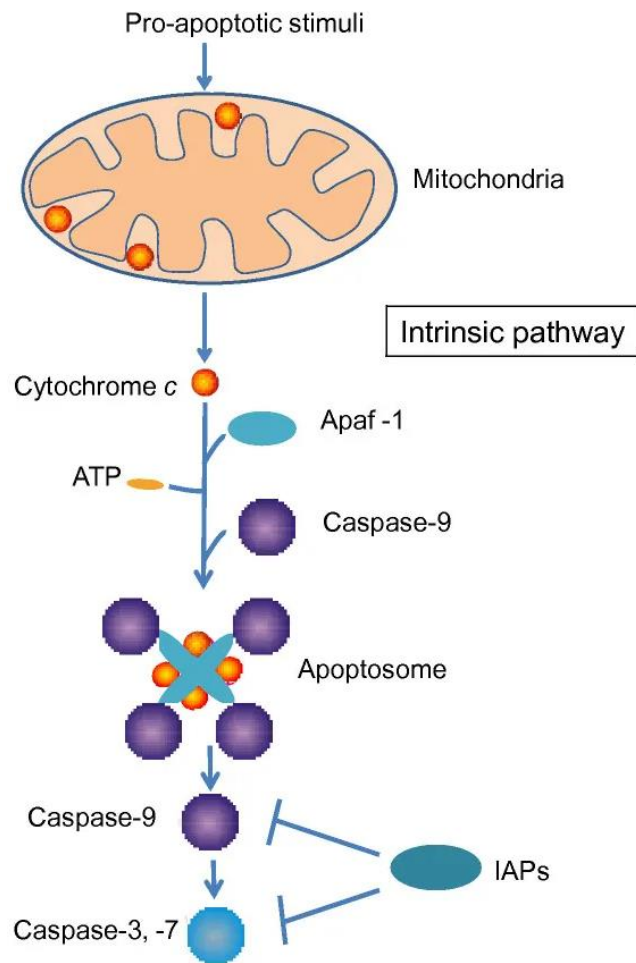


Figure 11: Représentation schématique de la voie intrinsèque de l'apoptose. La perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, suite à un stimulus proapoptotique, conduit à la libération dans le cytosol des effecteurs mitochondriaux de l'apoptose, dont le cytochrome C. La présence de cytochrome C dans le cytosol induit la formation du complexe de l'apoptosome. Ce complexe permet le recrutement de la procaspase-9, une caspase initiateur, et son activation. Une fois activée, la caspase-9 peut elle-même interagir avec et activer les caspases-3 et -7 effectrices. Notons qu'une famille de protéines, les IAPs (Inhibitors of Apoptosis Proteins), peut exercer une activité inhibitrice sur cette voie en se liant aux caspases actives (Adapté de Li et Sheng, 2012).

### 4.3.Voie directe mitochondriale (indépendante de la transcription)

p53 induit aussi l'apoptose de façon directe, via des interactions protéine-protéine, avec des membres de la famille Bcl-2<sup>46</sup>. Le mécanisme n'a pas encore été élucidé dans son entièreté et de nouvelles découvertes sont encore réalisées régulièrement. Dans l'état actuel des connaissances, la protéine p53 interagirait physiquement, au niveau de la membrane mitochondriale externe, avec Bcl2 et Bcl-XL afin d'inhiber ces protéines antiapoptotiques. D'autre part, p53 va activer les membres proapoptotiques BAX et BAK<sup>57</sup>. Ces deux protéines vont dès lors s'homooligomériser et se loger dans la MME, formant des pores aboutissant à sa perméabilisation et à la libération dans le cytosol de divers effecteurs de l'apoptose dont le cytochrome C<sup>57</sup>. Le cytochrome C peut ensuite former, en s'assemblant avec la protéine APAF-1 (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1) de l'ATP et la procaspase-9, un complexe connu sous le nom d'apoptosome<sup>66</sup> (Figure 13). Les caspases sont des protéases à cystéine clivant les chaînes polypeptidiques au niveau de séquences consensus, et les procaspases sont leurs précurseurs inactivés<sup>66</sup>. La formation du complexe de l'apoptosome va donc entraîner la formation de caspases-9 actives par un processus d'autoactivation induite par proximité<sup>66</sup>. Les principales cibles de la caspase-9 initiatrice sont les procaspases-3 et -7. Leur clivage par la caspase-9 entraîne leur activation<sup>66</sup>. Ces caspases-3 et -7, des caspases effectrices, vont exercer leur activité de protéase sur de très nombreuses protéines cellulaires, permettant le déroulement du programme apoptotique<sup>66</sup>. Cette voie d'apoptose est également dénommée voie intrinsèque de l'apoptose (Figure 13).



## 5. Circonstances de l'induction par p53 de l'apoptose ou la sénescence

Le suppresseur de tumeur p53, en tant que centre intégrateur de nombreuses voies de signalisation, se retrouve comme nous l'avons vu précédemment au croisement de nombreux processus cellulaires dont l'issue est parfois opposée. Dans le cas qui nous intéresse, il y a une opposition apparente entre les phénomènes d'apoptose et de sénescence : l'un promeut la mort cellulaire tandis que l'autre promeut la survie de la cellule, bien que dans un état irréversible d'incapacité de se diviser. Cela suggère l'existence de mécanismes de régulation qui doivent intervenir pour permettre une « prise de décision » adaptée à chaque situation<sup>8</sup>.

La question la plus évidente qui vient à l'esprit est celle-ci : « Pourquoi la cellule s'embarrasse-t-elle d'un processus distinct de l'apoptose, alors que ce programme de mort cellulaire permet l'élimination définitive des cellules dont l'intégrité est compromise ? » Cette question invite à penser en termes d'évolution : il doit exister des situations pour lesquelles l'élimination pure et simple de toute cellule présentant des dommages irréversibles ne doit pas être favorable à la survie de l'organisme<sup>8</sup>. La sénescence permet de préserver la cellule compromise, tout en empêchant la propagation de lésions pouvant mener au développement de pathologies comme le cancer<sup>8</sup>.



Compte tenu des réponses très diverses orchestrées par le suppresseur de tumeur p53, il est envisageable que certains mécanismes de régulation soient à l'œuvre pour permettre l'induction différentielle de telle ou telle réponse. Outre les nombreuses interactions possibles entre p53 et d'autres protéines régulatrices et la localisation différentielle de p53 dans différents compartiments cellulaires, le mécanisme fondamental à la base de cette régulation fine de l'activité de la protéine est le jeu de modifications post-traductionnelles possibles suite à un stress. De très nombreux résidus, présents majoritairement dans les parties N- et C-terminales de la protéine, peuvent être la cible de plusieurs enzymes, dont des kinases rajoutant un groupement phosphate. Il a été démontré que certains résidus de p53, une fois acétylés, phosphorylés ou ubiquitinés, aiguillent la cellule vers l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire<sup>8</sup> (Figure 6).

De précédentes recherches effectuées au laboratoire avaient pour but d'approfondir les connaissances concernant les conséquences des modifications post traductionnelles de p53 sur la voie directe mitochondriale qu'il orchestre<sup>27,67</sup>. L'impact des PTMs (modifications post traductionnelles) sur l'activité mitochondriale de p53 (induction de la perméabilisation de la MME) reste peu connu par comparaison à nos connaissances sur la voie transcriptionnelle dépendante du suppresseur de tumeur.

a

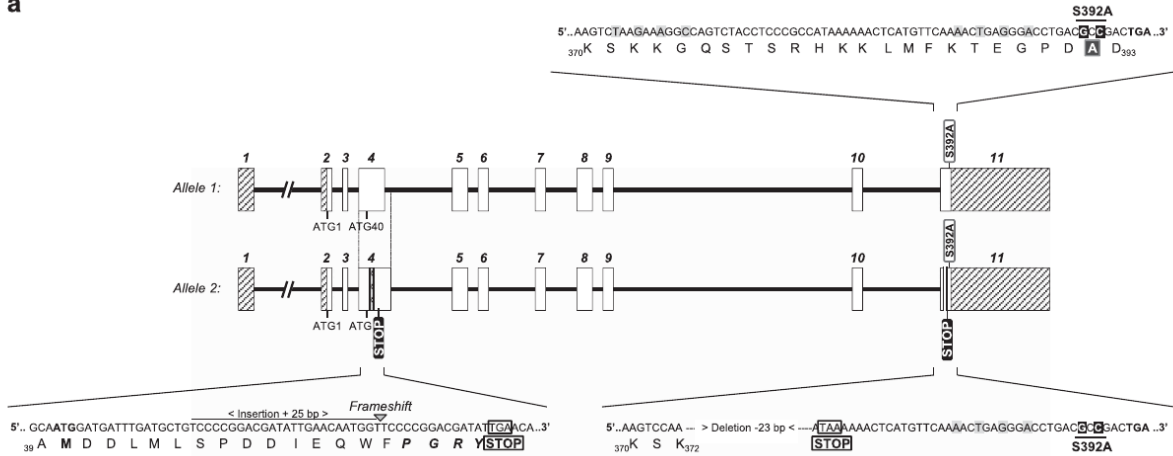


Figure 12: Génération de la lignée HCT-116 p53 S392A par CRISPR/Cas9. Représentation schématique des deux allèles de TP53 et des modifications introduites. La sérine 392 est localisée sur le dernier des 11 exons du gène TP53. L'allèle 1 a intégré le « template » de réparation, comme attendu, et permet l'expression de p53 S392A. L'allèle 2 a subi une insertion partielle du « template » de réparation et une délétion de 23 pb (paires de base) dans l'exon 11. Cette mutation génère un codon stop à la position 373. Suite à cela (et l'incapacité d'obtenir la mutation S392A de manière homozygote), il a été décidé de rendre cet allèle non fonctionnel (KO) en ciblant la région de l'exon 4 proche du second ATG (ATG40). Les bases grisées représentent les mutations silencieuses introduites afin de prévenir des réactions non voulues avec l'enzyme Cas9n utilisée pour la manipulation. (Castrogiovanni et al., 2018)

Dans ce but, la sérine 392 (S392) fut mutée en alanine, un résidu non phosphorylable, grâce à la technique CRISPR/Cas9n, dans la lignée cellulaire HCT-116 (Figure 14)<sup>67</sup>. Notons que seul un allèle a pu être muté correctement, le second allèle étant knock-out. Malgré un seul allèle fonctionnel, l'induction et l'abondance de p53 lors d'un stress sont similaires dans les lignées p53<sup>S392A/KO</sup> et p53<sup>wt/wt</sup>. Des expériences furent également réalisées dans une seconde lignée cellulaire, la lignée H1299 (isolée d'une métastase d'un cancer du poumon), qui n'exprime pas p53 (« p53-null »). Dans cette lignée, différentes versions de p53 furent réintroduites sous le contrôle d'un promoteur inductible (système Tet-On) : p53 WT, le mutant S392A (non phosphorylable) ainsi que le mutant S392E (mutation phosphomimétique).

Pour ce faire, dans un premier temps, un screening de 12 PTMs majeures de p53, renseignées dans la littérature, fut réalisé<sup>67</sup>. Ce screening eut lieu dans les lignées de cellules humaines HCT-116 (cancer du côlon), PA-1 (cancer de l'ovaire) et MCF7 (cancer du sein) en présence de différentes sources de dommages à l'ADN, à savoir la doxorubicine (agent intercalant de l'ADN et inhibiteur de la topoisomérase de type II), la camptothécine (poison de la topoisomérase de type I) et une irradiation au moyen d'UV-B, ceci afin d'exclure les observations liées à une lignée cellulaire ou à un stress spécifique. Parmi les PTMs analysées, trois furent détectées exclusivement (absentes de la fraction nucléaire) dans la fraction mitochondriale des cellules stressées, à savoir les phosphorylations de la thréonine 55, de la sérine 315 et de la sérine 392<sup>67</sup>. Les résultats de ces expériences préliminaires, conjointement avec le fait que les sites de phosphorylation du côté C-terminal de la protéine sont moins étudiés que ceux du côté N-terminal et que la sérine 392 est un résidu de p53 très conservé chez les vertébrés<sup>67</sup>, ont focalisé les travaux ultérieurs sur l'étude de ce résidu en particulier.

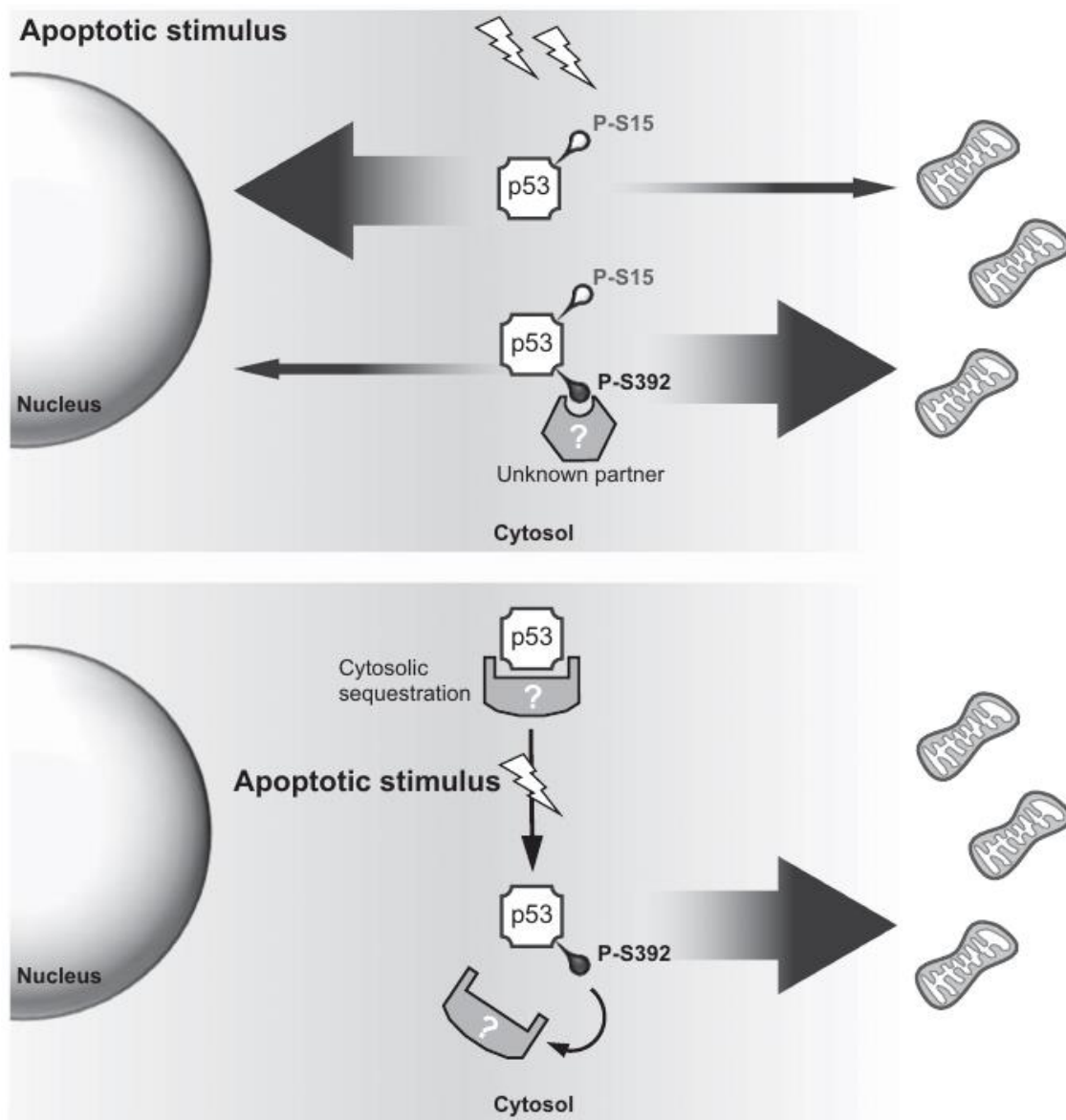


Figure 13: modèles hypothétiques proposés pour le rôle de la sérine 392 dans le mécanisme d'induction de l'apoptose par p53 par la voie directe mitochondriale. (Dessus) p53 interagit avec une protéine cytosolique encore inconnue pour être transporté à la mitochondrie et induire la perméabilisation de la MME. Cette interaction serait facilitée par la phosphorylation de la sérine 392, suite à un stimulus apoptotique. (Dessous) En l'absence de stimulus apoptotique, la translocation à la mitochondrie de p53 est empêchée suite à son interaction avec une ou plusieurs protéines capables de le séquestrer. Ce complexe inhibiteur serait dans l'impossibilité de se former suite à la phosphorylation de la sérine 392 lors d'un stimulus apoptotique. (Castrogiovanni et al., 2018)

Les modèles cellulaires développés permirent de mettre en évidence l'impact de la phosphorylation de la sérine 392 sur l'activité de p53 en tant que suppresseur de tumeur, et plus particulièrement sur son activité proapoptotique mitochondriale. Un mutant de p53 qui ne peut pas être phosphorylé en sérine 392 (mutant S392A) présente une localisation mitochondriale déficiente lors d'un stress<sup>67</sup>. Un tel mutant a également une capacité réduite, de manière marquée, d'induire l'apoptose par comparaison à p53 WT ou p53 S392E.

Suite à ces études, deux modèles hypothétiques, basés sur les données obtenues, ont pu être proposés (Figure 15). Ces modèles postulent que l'activité proapoptotique de p53 est altérée en l'absence de la phosphorylation de la sérine 392. Celle-ci apparaît en effet cruciale, en présence d'un stimulus apoptotique, pour la localisation de p53 à la MME et la perméabilisation de cette dernière.

En outre, les mêmes études suggèrent, via l'analyse de l'expression de certains gènes régulés par p53, que le statut de phosphorylation de la sérine 392 n'a pas un effet marqué sur sa capacité de fonctionner en tant que facteur de transcription. Notons cependant qu'un nombre limité de gènes a été analysé. En raison de cette limitation, il semble intéressant de vérifier plus en profondeur, par des expériences complémentaires, si la mutation de la sérine 392 en alanine (mutant non phosphorylable) ou en acide glutamique (mutant phosphomimétique) a des répercussions sur l'activité transcriptionnelle du suppresseur de tumeur. Cette analyse pourrait se focaliser, en particulier, sur des gènes qui régulent d'une part l'induction de la sénescence et d'autre part l'apoptose.



## II. Objectifs



Ce mémoire s'inscrivant dans la continuité de la thèse de C. Castrogiovanni, nos objectifs principaux seront d'explorer certaines hypothèses soulevées par les résultats précédemment obtenus au laboratoire<sup>27,67</sup>. Ces résultats montrent que la phosphorylation de la sérine 392 de p53, dans des cultures de cellules humaines cancéreuses HCT-116 et H1299, module la translocation de p53 à la mitochondrie et la voie de l'apoptose indépendante de la transcription. Spécifiquement, lorsque les cellules sont exposées à un stimulus apoptotique, un mutant de p53 non phosphorylable à cette position (p53 S392A) présente une localisation mitochondriale déficiente et une faible capacité d'induire l'apoptose, par comparaison avec p53 wt. En outre, l'état phosphorylé ou non de cette sérine 392 semble sans influence sur l'activité transcriptionnelle de p53<sup>67</sup>. Toutefois, des résultats supplémentaires obtenus lors de cette étude, notamment un phénotype de sénescence observé dans certaines lignées mutantes, ainsi que les résultats d'autres groupes de recherche sur un effecteur de la sénescence régulé par p53, PAI-1, laissent envisager de potentiels autres rôles de cette sérine 392 (et de sa phosphorylation) notamment dans la régulation de la sénescence dépendante de p53.

L'hypothèse fut émise que l'entrée en sénescence dépendante du facteur de transcription p53 serait en partie dépendante du statut, phosphorylé ou non, de la sérine 392. Une seconde hypothèse, sous-jacente, implique que la phosphorylation de la sérine 392 modulerait tout de même l'activité transcriptionnelle de p53, en particulier pour certains gènes dont les produits régulent l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'entrée en sénescence. Plus particulièrement, PAI-1 semble important pour l'entrée en sénescence régulée par le suppresseur de tumeur. Une étude récente suggère que l'expression de PAI-1 est favorisée par l'interaction, au niveau du promoteur, entre p53 et des protéines Smads<sup>55</sup>. De plus, cette interaction implique le domaine C-terminal de p53, où est située la sérine 392. Il semble donc pertinent d'envisager qu'une modification post-traductionnelle de la sérine 392 de p53 puisse jouer un rôle dans l'association de p53 avec les Smads et plus globalement dans la régulation de la sénescence via l'induction de l'expression de PAI-1.



L'approfondissement du champ de recherche sur l'induction de l'apoptose et de la sénescence dépendante de p53 se poursuit dans ce mémoire à travers deux buts distincts : 1) déterminer si la phosphorylation de la sérine 392 régule la sénescence dépendante de p53 ; 2) déterminer si la phosphorylation de la sérine 392 module l'expression de gènes cibles de p53 connus pour réguler l'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence, dont PAI-1.

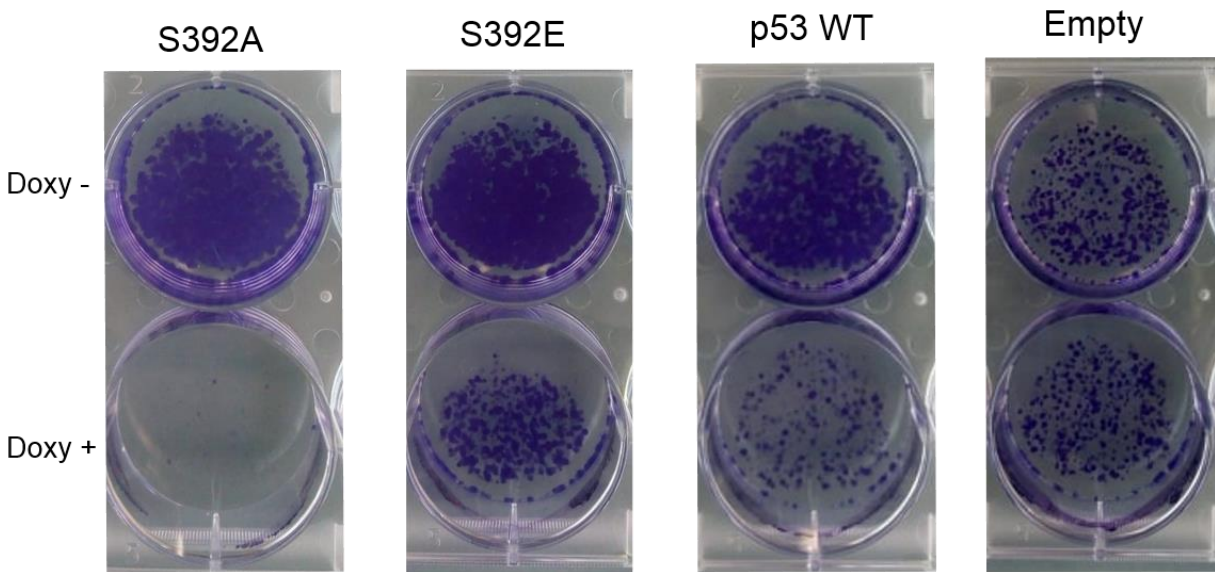


# III. Résultats



Durant nos expériences, nous avons employé un modèle cellulaire développé au laboratoire précédemment. Il se base sur l'utilisation de la lignée H1299 (p53<sup>-/-</sup>). Cette lignée cancéreuse humaine a été dérivée, au moyen de transfections stables, pour générer différentes nouvelles lignées : une lignée permettant l'expression de p53 wild type (dénommée ci-après WT), une autre exprimant une protéine p53 dont la sérine 392 a été remplacée par une alanine, (p53 S392A, non phosphorylable en cette position) et une autre exprimant le mutant phospho-mimétique S392E. Dans ces lignées, p53 est placé sous le contrôle d'un système Tet-on afin de pouvoir induire son expression au moment voulu, en ajoutant de la doxycycline dans le milieu de culture. Suite à l'induction au moyen de doxycycline, les trois lignées présentent des niveaux similaires d'expression de p53<sup>67</sup>. Une quatrième lignée a été transfectée avec le plasmide vide (« Empty », utilisée comme contrôle négatif) et n'exprime donc pas p53.

Nous avons tout d'abord réalisé des essais de formation de colonies afin de mesurer l'inhibition de la croissance en présence de p53 wt ou de ses mutants. Ensuite, nous avons voulu quantifier la proportion de cellules sénescents suite à une induction prolongée de p53. Pour cela, nous avons évalué au sein des cultures traitées ou non l'activité SA-β-gal (Senescence-Associated β-galactosidase), un marqueur de la sénescence. De plus, nous avons utilisé la cytométrie en flux afin de mesurer de potentiels changements au niveau du cycle cellulaire ainsi que de la viabilité au sein des cultures où l'expression de p53 (ou de ses mutants) a été induite au moyen de doxycycline. Enfin, nous avons réalisé des RT-qPCR (Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction) pour évaluer si la phosphorylation de la sérine 392 a un impact sur la régulation de gènes cibles de p53 impliqués dans la régulation du cycle cellulaire ou l'entrée sénescence (*p21*, *Cycline B1*, *PAI-1*, *GADD45*).



*Figure 16 : Essai de formation de colonies sur les différentes lignées. Les cellules ont été traitées (Doxy +) ou non (Doxy -) pendant 10 jours au moyen de 2  $\mu\text{g/ml}$  de doxycycline, avant fixation et coloration. De visu, on peut constater une abondance de colonies bien moindre dans les lignées S392A, WT et S392E traitées à la doxycycline 2  $\mu\text{g/ml}$  par rapport à leur contrôle respectif sans ajout de doxycycline. La lignée contrôle Empty (transfectée avec le plasmide vide) ne semble pas affectée par le traitement. Représentatif de trois expériences indépendantes.*

## 1. Essais de formation de colonie

Afin de caractériser la capacité d'inhibition de la croissance des différentes versions de p53 (wt, S392A, S392E) introduites dans la lignée H1299 (p53<sup>-/-</sup>), les premiers tests réalisés furent des essais de formation de colonie, aussi appelés essais clonogéniques<sup>68</sup>. Ce test permet d'évaluer la capacité de croissance de cellules individuelles suite à un traitement donné, et plus spécifiquement leur capacité de former une colonie. Ce test ne fait pas la distinction entre d'une part la mort cellulaire et d'autre part la capacité de division. Il fut originellement créé pour mesurer les effets de traitement au moyen de radiations ionisantes<sup>69</sup>. Il fut adapté ensuite à de multiples situations expérimentales. Dans le cas présent, il s'agit de la capacité d'inhibition de la croissance de p53 WT et de ses mutants pour la sérine 392.

Les lignées H1299 transfectées de manière stable avec p53 wt, p53 S392A, p53 S392E, sous le contrôle d'un promoteur inductible (système Tet-On), ainsi qu'une lignée contrôle transfectée avec le plasmide vide ont été déposées à une densité de 5000 cellules par cm<sup>2</sup> dans des plaques de culture de six puits. L'expression de p53 fut ensuite induite au moyen de doxycycline 24 heures plus tard. Au bout de 10 jours de traitement, la capacité de formation de colonie fut analysée. La figure 16 montre un exemple de résultat obtenu.

Conformément à ce qui est attendu, l'induction de p53 au moyen de doxycycline provoque une inhibition importante de la croissance par comparaison avec la lignée contrôle transfectée avec le plasmide vide (Figure 16). De plus, la lignée exprimant le mutant de p53 non phosphorylable en S392 (p53 S392A) se distingue des deux autres constructions introduites (p53 WT et S392E) par une inhibition de la croissance très prononcée. Notons également que la lignée Empty (exprimant le plasmide) n'est pas affectée, comme attendu, par l'ajout de doxycycline à la culture. Néanmoins, cette lignée présente une croissance plus lente que les autres. Les résultats présentés sont représentatifs de ce qui a pu être observé sur des triplicats biologiques.

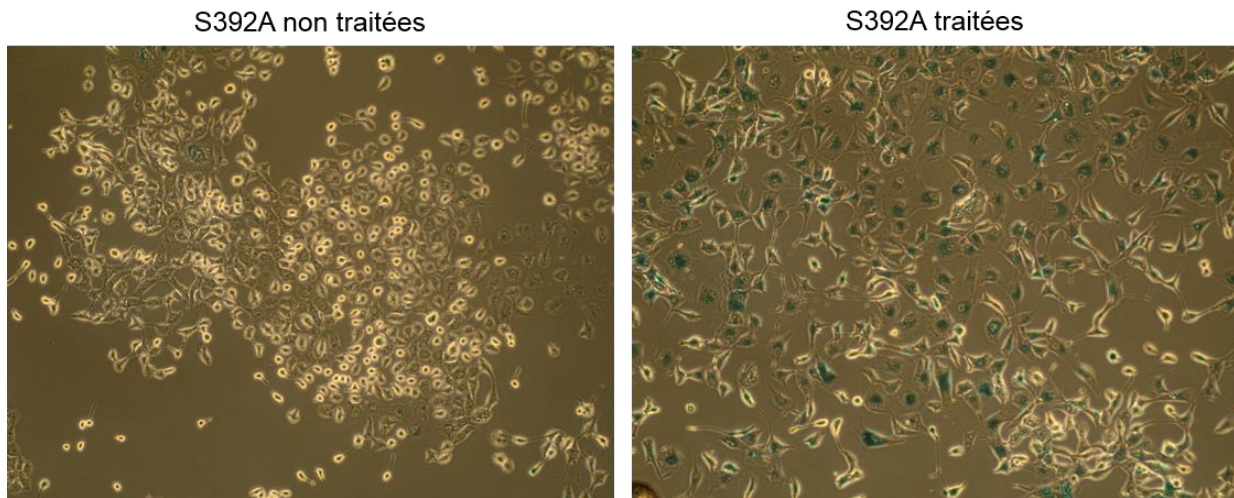


Figure 17 : Photographies de la lignée exprimant p53 S392A traitées ou non pendant 10 jours avec 2  $\mu\text{g/ml}$  de doxycycline. On peut observer, après traitement, le développement d'une morphologie typique de la sénescence, ainsi qu'une augmentation très marquée de la proportion de cellules pour la SA- $\beta$ -gal (coloration bleue des cellules). Grossissement : 400X.

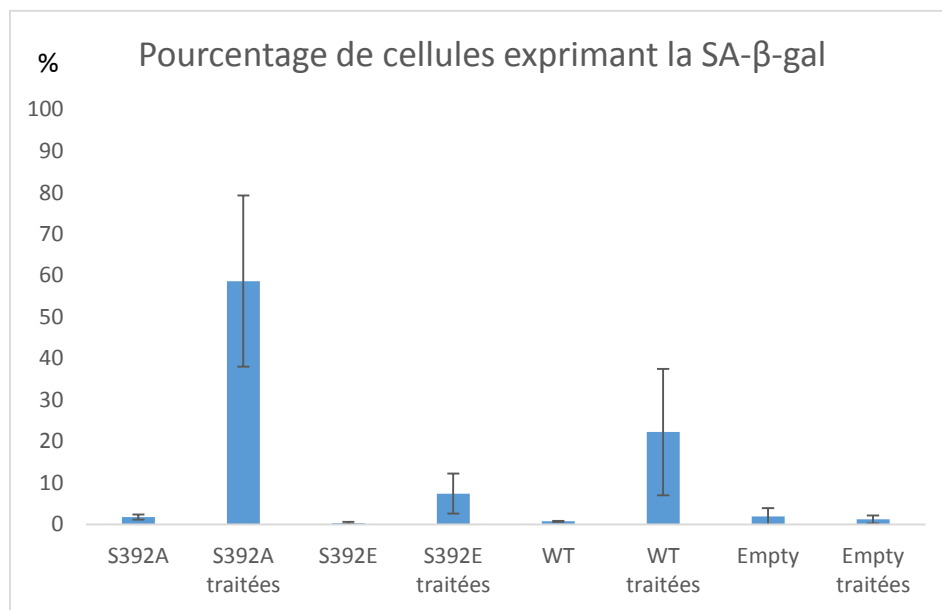


Figure 18 : Pourcentage du nombre de cellules, pour chaque lignée, positives pour la SA- $\beta$ -gal. Les différentes lignées ont été incubées ou non pendant 10 jours avec 2  $\mu\text{g/ml}$  de doxycycline (induction de l'expression de p53). Les écarts type sont pour  $N=3$ . Les variances n'étant pas homogènes entre échantillons, nous ne pouvions que réaliser un test non paramétrique (de Wilcoxon) sur ces données, qui n'ont montré aucune différence significative entre échantillons, probablement en raison du faible nombre de répétition pour un test non paramétrique. Cependant, les expériences n'ont été répétées que 3 fois, ce qui n'est pas suffisant pour tirer des conclusions définitives avec ce genre de test. Ces manipulations devront être à l'avenir refaites en diminuant le nombre de lignées à analyser et en augmentant le nombre de répétitions afin d'accroître la puissance du test.

## 2. Tests SA- $\beta$ -gal pour le marquage des cellules sénescences.

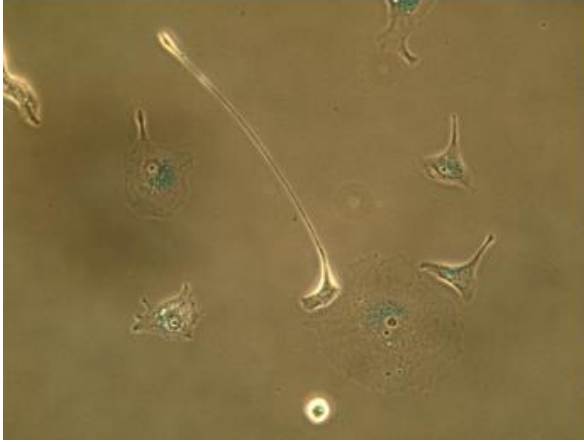
La cellule sénescence présente différentes caractéristiques morphologiques, biochimiques ou moléculaires, comme discuté précédemment. Certaines de ces caractéristiques sont couramment utilisées pour quantifier la proportion de cellules sénescences au sein d'une culture. Le test de marquage pour la SA- $\beta$ -gal (Senescence Associated- $\beta$ -galactosidase) fut développé en 1995 par Dimri *et al.*<sup>48</sup>. Il se base sur l'activité très importante, chez la cellule sénescence *in vitro* et *in vivo*, d'une beta-galactosidase lysosomale. L'augmentation de cette activité enzymatique est spécifique de la cellule sénescence, qu'il s'agisse de sénescence répllicative ou de sénescence induite par les stress.

Les différentes lignées furent déposées à une densité de 2500 ou 5000 cellules/cm<sup>2</sup>, respectivement pour les cultures qui ne seront pas traitées et les cultures à traiter avec la doxycycline<sup>1</sup>, dans des plaques six puits. L'expression de p53 fut induite ou non au moyen de doxycycline 2  $\mu$ g/ml 24 heures plus tard. Au terme de 10 jours de traitement, le marquage pour la SA- $\beta$ -gal fut réalisé. La figure 17 montre un exemple des résultats obtenus pour la lignée exprimant le mutant p53 S392A. En l'absence de doxycycline, la proportion de cellules positives pour la SA- $\beta$ -gal est très faible pour les différentes lignées. Suite à l'induction de p53 au moyen de doxycycline, on observe une augmentation significative de la proportion de cellules positives pour la SA- $\beta$ -gal dans les différentes lignées à l'exception de la lignée transfectée avec le plasmide vide (Figure 18). Enfin, la proportion de cellules positives pour la SA- $\beta$ -gal est très élevée dans la lignée qui exprime le mutant non phosphorylable p53 S392A : il y a, après traitement, 2,5 fois plus de cellules positives à la SA- $\beta$ -gal dans les cultures traitées avec la doxycycline par rapport à la lignée WT traitée). En revanche, seules quelques cellules éparses de la lignée S392E traitée à la doxycycline sont positives pour la SA- $\beta$ -gal, ce qui suggère que relativement peu de cellules sont entrées en sénescence. Les tests statistiques (Wilcoxon) ont été réalisés à partir d'un triplicat biologique.

---

<sup>1</sup> Cette différence de densité cellulaire de départ permet aux cultures de présenter vers la fin du traitement une abondance en cellules compatible avec les analyses à réaliser. En effet, les cultures doivent toutes être sous confluentes pour les tests à la SA- $\beta$ -gal afin d'éviter un faux positif, et comme l'indiquent les essais de formation de colonie (Figure 16), les cultures non traitées de certaines lignées ont tendance à croître bien plus rapidement que les cultures traitées.

S392A traitées



S392E traitées

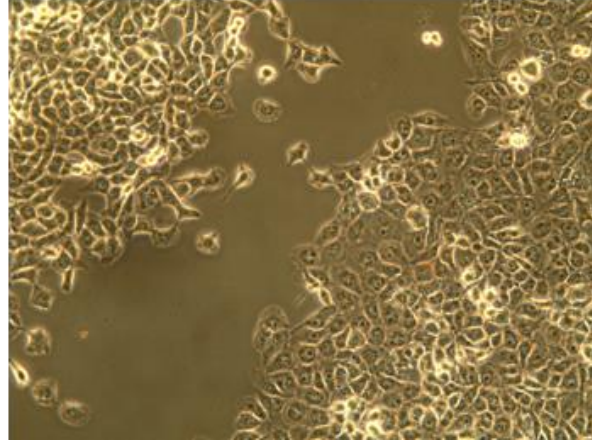


Figure 19 : **(Gauche)** photographie montrant les modifications morphologiques qui se développent dans la lignée p53 S392A suite à une induction prolongée du suppresseur de tumeur. Comparaison avec la morphologie des cellules de la lignée p53 S392E **(droite)**. Les cellules qui présentent une morphologie typique de la sénescence sont en général positives pour la SA-β-gal (coloration bleue des cellules). Les cellules ont été incubées pendant 10 jours avec 2 µg/ml de doxycycline. Grossissement : 400X.

D'un point de vue morphologique, on peut aussi observer que les cellules positives pour la SA- $\beta$ -gal de la lignée S392A présente une morphologie dite « spiculée » (c'est-à-dire formant des pointes très étalées) ou en « œuf sur le plat » (Figure 19). Ces morphologies sont décrites comme typique de la sénescence<sup>27</sup>.

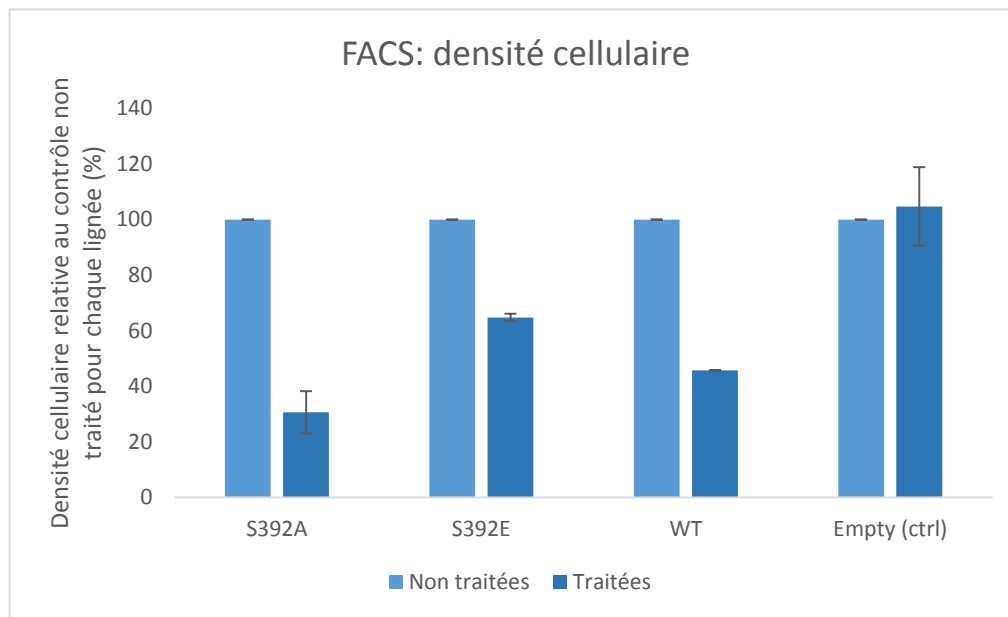


Figure 20 : Analyse de cytométrie en flux (test ViaCount™) de la densité cellulaire relative des différentes lignées avec ou sans traitement au moyen de doxycycline. Les différentes lignées ont été incubées (Traitées) ou non (Non traitées) pendant 7 jours en présence de doxycycline 2 µg/ml. Les résultats, pour chaque lignée, sont exprimé en % du contrôle non traité. (écarts type pour N=2).

### 3. Analyses de cytométrie en flux : croissance cellulaire et viabilité

Nous avons tout d'abord utilisé une méthode (Test ViaCount™) basée sur une combinaison de deux agents qui interagissent avec l'ADN, l'iodure de propidium (IP) et le LDS-751. Ce dernier, au contraire de l'IP, pénètre librement à l'intérieur d'une cellule vivante dont la membrane est intègre. Le LDS-751 marque donc toute cellule nucléée et permet une quantification de la densité cellulaire au sein d'un échantillon. L'IP, quant à lui, donne des informations sur la viabilité cellulaire. Les quatre lignées H1299 transfectées avec le plasmide vide ou exprimant différentes versions de p53 ont été incubées ou non en présence doxycycline 2 µg/ml (système Tet-On) pendant 7 jours, 24 heures après avoir été déposées dans des boîtes 6 puits à une concentration de 5000 cellules/cm<sup>2</sup>. Au terme de cette incubation, les cellules ont été analysées en cytométrie de flux au moyen du test ViaCount™.

L'analyse de la densité cellulaire des cultures montre une diminution marquée dans les échantillons traités au moyen de doxycycline 2µg/ml (induction de p53) par comparaison aux échantillons non traités. Cela n'est pas observé pour la lignée exprimant le plasmide vide, comme attendu (Figure 20). La diminution de densité cellulaire est la plus importante pour la lignée exprimant p53 S392A (-75%). En ce qui concerne les lignées exprimant p53 WT et S392E, une diminution de respectivement -57% et -38% est observée (Figure 20). Cela confirme les résultats obtenus précédemment lors des essais de formation de colonie (Figure 16). Ces données ont été obtenues à partir d'un duplicat biologique et n'ont pas fait l'objet d'une analyse statistique.

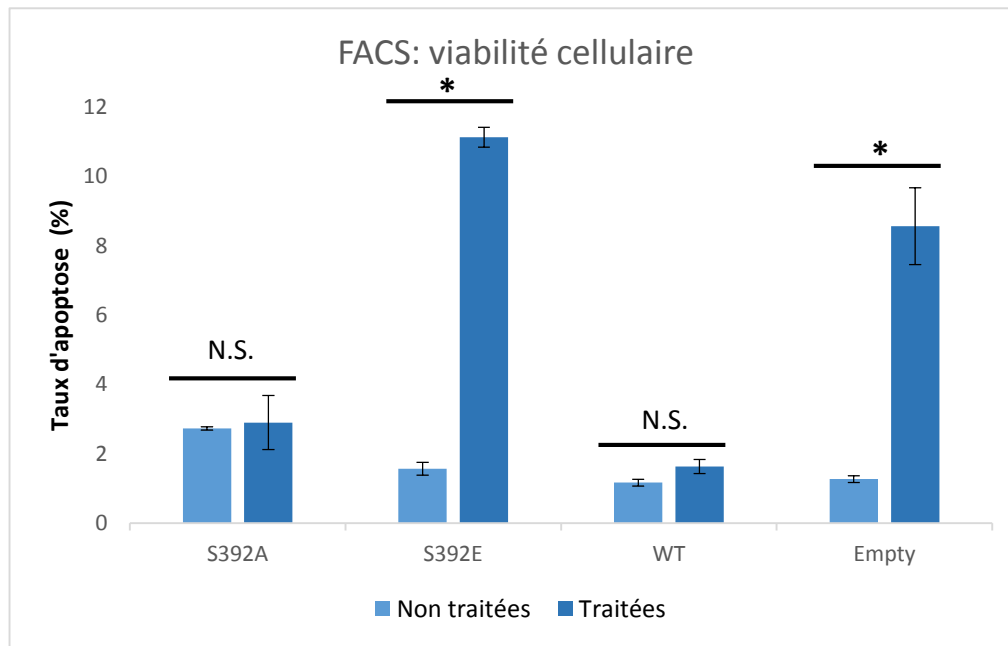


Figure 21 : analyse de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux (test ViaCount™). Les différentes lignées ont été incubées (Traitées) ou non (Non traitées) pendant 7 jours en présence de doxycycline 2 µg/ml. (\* : significativement différent de la condition indiquée avec  $\alpha=0,001$ ,  $P_{val}<0,0001$ . N.S. : Non Significatif. Tests statistiques : ANOVA 1 et test post hoc REGWQ, écarts type pour  $N=3$ ).

L'analyse de la viabilité cellulaire (Figure 21) par cytométrie en flux avec le réactif ViaCount™ met en évidence une augmentation significative de la proportion de cellules mortes dans deux lignées, celle exprimant p53 S392E et celle transfectée avec le plasmide vide, suite à une incubation de 7 jours au moyen de doxycycline 2 µg/ml. Les différences entre conditions traitées et non traitées sont non significatives pour les deux autres lignées (p53 S392A et p53 WT). Ces résultats suggèrent que la voie de l'apoptose dépendante de p53 n'est pas activée dans les cellules des lignées S392A et WT au contraire de la lignée p53 S392E où une mort cellulaire massive est observée. Toutefois, les résultats de ces expériences doivent être interprétés avec prudence étant donné que le contrôle négatif se comporte de manière totalement inattendue : la lignée transfectée avec le vecteur vide n'exprime pas p53 et de ne devrait pas être sensible au traitement au moyen de doxycycline. Néanmoins, une mort cellulaire supérieure à celle des lignées exprimant p53 wt et le mutant S392A est observée. Les tests statistiques ont été réalisés à partir d'un triplicat biologique.

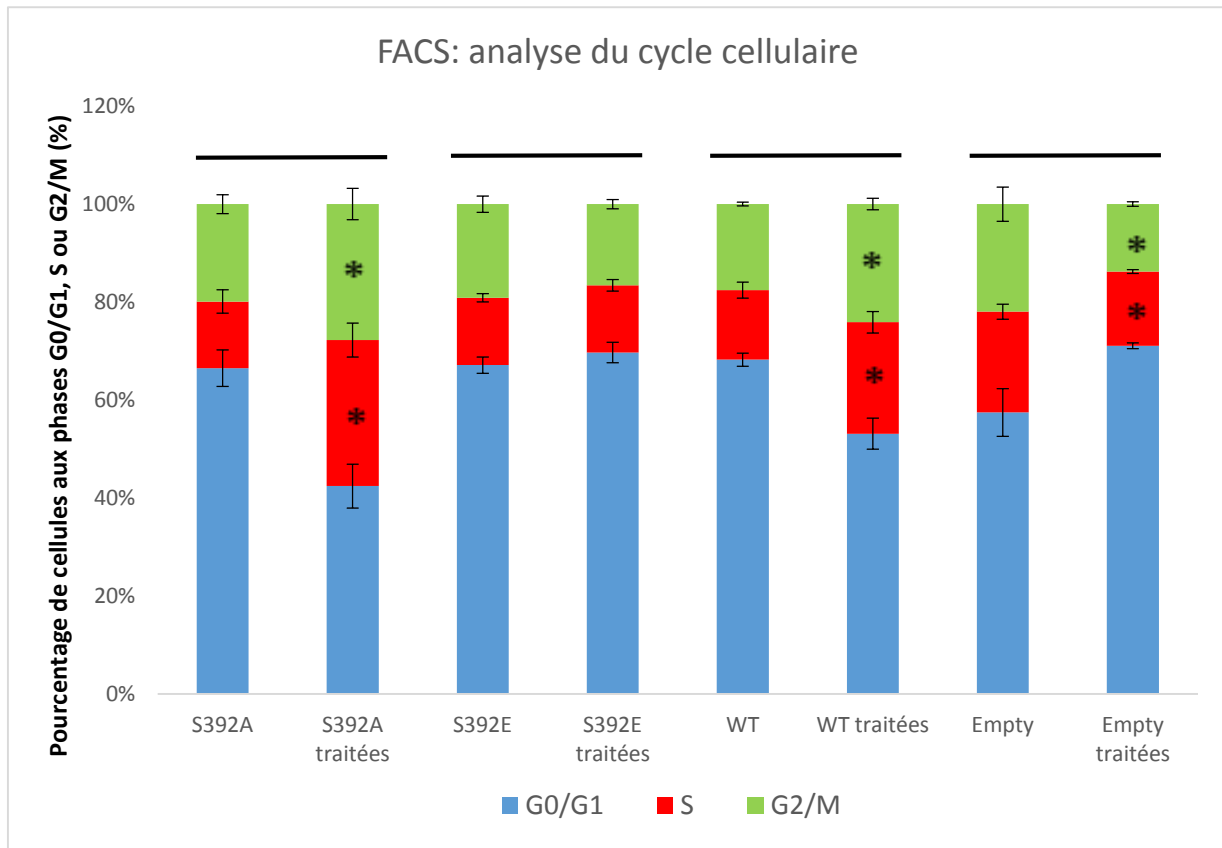


Figure 22 : Analyse du cycle cellulaire (cytométrie en flux) après marquage des cellules à l'iodure de propidium. Les cellules ont été traitées ou non pendant 7 jours avec de la doxycycline 2  $\mu\text{g/ml}$ . (\* : significativement différent de la condition de la même lignée non traitées avec  $\alpha=0,05$ ,  $P_{\text{val}} < 0,0001$ . Tests statistiques : ANOVA 1 et test post hoc REGWQ, écarts type pour  $N=3$ ).

L'analyse du cycle cellulaire au moyen d'un agent intercalant, l'iodure de propidium (IP) (Figure 22), met en évidence une différence notable entre les cellules p53 S392A non induites et induites au moyen de doxycycline 2 µg/ml avec chez ces dernières notablement plus de cellules en phase S et G2/M du cycle cellulaire que les S392A non traitées, dont beaucoup plus de cellules se trouvent à la phase G1. Le cycle cellulaire des cultures S392E ne semble pas subir de changement majeur dû à l'induction de p53. La lignée WT est significativement affectée dans le même sens que la lignée S392A (bien que plus faiblement) : on observe plus de cellules en phase S et G2/M dans les cultures traitées à la doxycycline 2 µg/ml (induction de l'expression de p53). De nouveau, la lignée contrôle transfectée avec le vecteur vide semble affectée par le traitement, avec une diminution significative du pourcentage de cellules en phase G2/M et S en présence de doxycycline 2 µg/ml. Les tests statistiques ont été réalisés à partir d'un triplicat biologique.

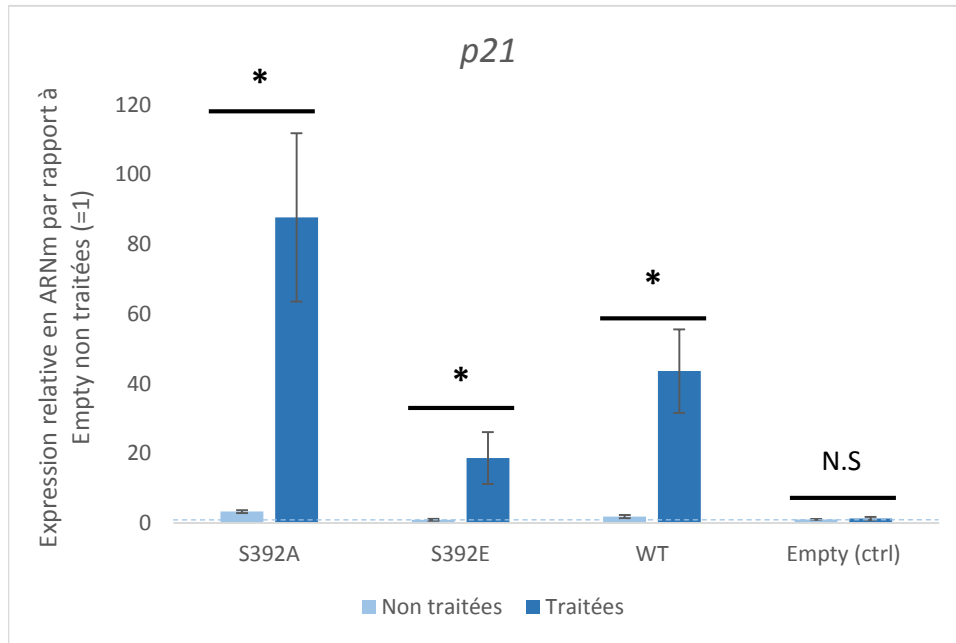


Figure 23 : Analyse par RT-qPCR de l'expression de p21 dans les différentes lignées traitées ou non avec 2  $\mu\text{g/ml}$  de doxycycline durant 24 heures (induction de p53). (\* : significativement différent de la condition indiquée avec  $\alpha=0,001$ ,  $P_{\text{val}} < 0,0001$ . N.S. : Non Significatif. La ligne bleue en traits interrompus permet la comparaison avec la condition Empty non traitées (contrôle). Tests statistiques : ANOVA 1 et test post hoc REGWQ, écarts type pour  $N=3$ ).

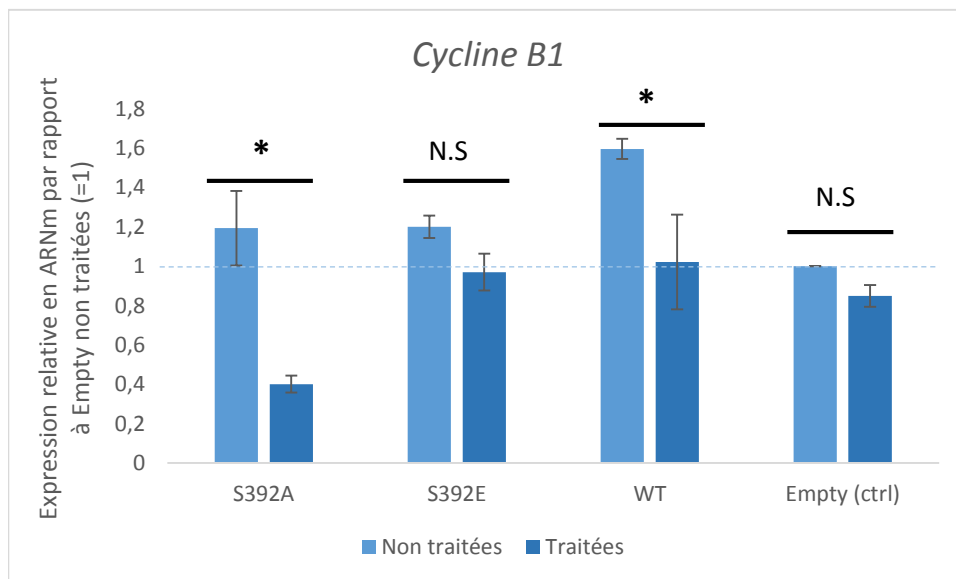


Figure 24 : Analyse par RT-qPCR de l'expression de la cycline B1 dans les différentes lignées traitées ou non avec 2  $\mu\text{g/ml}$  de doxycycline durant 24 heures (induction de p53). (\* : significativement différent de la condition indiquée avec  $\alpha=0,05$ ,  $P_{\text{val}} < 0,0001$ . N.S. : Non Significatif. La ligne bleue en traits interrompus permet la comparaison avec la condition Empty non traitées (contrôle). Tests statistiques : ANOVA 1 et test post hoc REGWQ, écarts type pour  $N=3$ ).

#### 4. RT-qPCR

Les RT-qPCR furent réalisées pour analyser la transcription de différents gènes régulés par p53 et connus pour avoir un rôle dans la sénescence régulée par p53<sup>8,18,55</sup>. Nous avons en ce sens choisi d'analyser les transcrits de *p21*, la cycline *B1*, *PAI-1* et *GADD45*. Le gène de référence *GAPDH*, dont la stabilité de l'expression fut précédemment validée au laboratoire dans les lignées H1299 cultivées, fut utilisé pour la comparaison de l'expression entre les différents échantillons<sup>67</sup>. Les cultures cellulaires ont étéensemencées à très haute concentration (115000 cellules/cm<sup>2</sup>) dans des boîtes individuelles de 145 mm x 20 mm et furent incubées, 24 heures plus tard, 24 heures avec 2 µg/ml de doxycycline. Les tests statistiques ont été réalisés à partir d'un triplicat biologique pour chaque gène étudié.

Les RT-qPCR pour *p21* (Figure 23) mettent en évidence une différence statistiquement significative de l'expression de *p21* entre les échantillons traités à la doxycycline 2 µg/ml et les échantillons non traités d'une même lignée, pour la lignée transfectée avec le plasmide vide. Les différences les plus marquées concernent les lignées exprimant p53 S392A et WT, avec une augmentation moyenne respective de 90X et de 40X par rapport au contrôle (cellules transfectées avec le plasmide vide) non traité. Il existe également une différence significative de l'expression de *p21* entre les conditions traitées et non traitées de la lignée S392E. On observe une augmentation moyenne de l'expression de *p21* de l'ordre de 20X, par rapport aux S392E non traitées. Cette augmentation de l'expression est significative mais nettement plus faible que ce qui est observé pour les lignées exprimant p53 S392A et WT.

Les RT-qPCR pour la cycline *B1* (Figure 24) font apparaître une différence significative de l'expression de ce gène entre les cellules p53 S392A non traitées et traitées au moyen de doxycycline 2 µg/ml, avec une baisse d'expression de l'ordre de deux tiers. La lignée WT traitées semble également affectée dans le même sens, avec une baisse de l'expression de la cycline *B1* d'environ un tiers. Les autres lignées et conditions ne font apparaître que des différences minimales et non significatives entre elles.

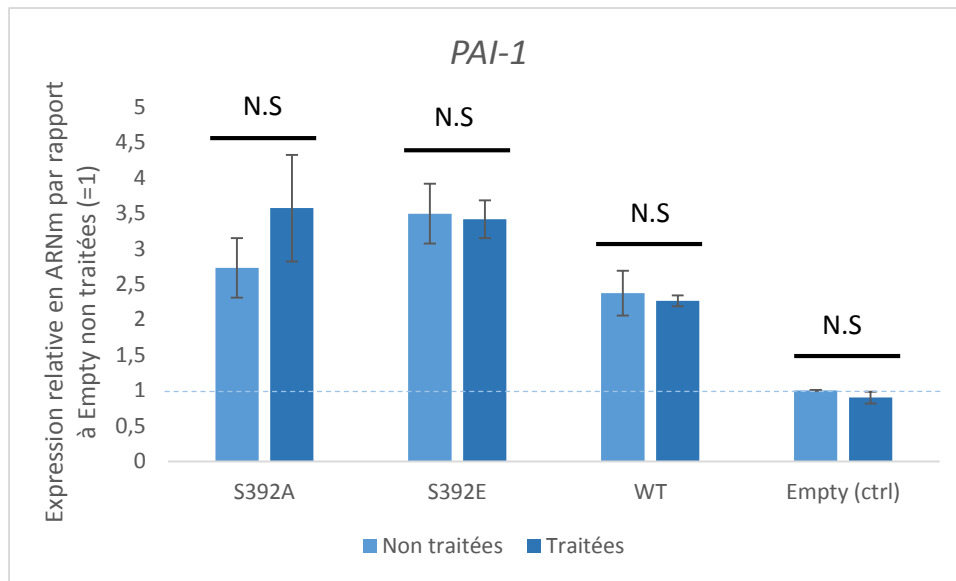


Figure 25 : Analyse par RT-qPCR de l'expression de PAI-1 dans les différentes lignées traitées ou non avec 2µg/ml de doxycycline durant 24 heures (induction de p53). (\* : significativement différent de la condition indiquée avec  $\alpha=0,001$ ,  $Pval<0,0001$ . N.S. : Non Significatif. La ligne bleue en traits interrompus permet la comparaison avec la condition Empty non traitées (contrôle). Tests statistiques : ANOVA 1 et test post hoc REGWQ, écarts type pour  $N=3$ ).

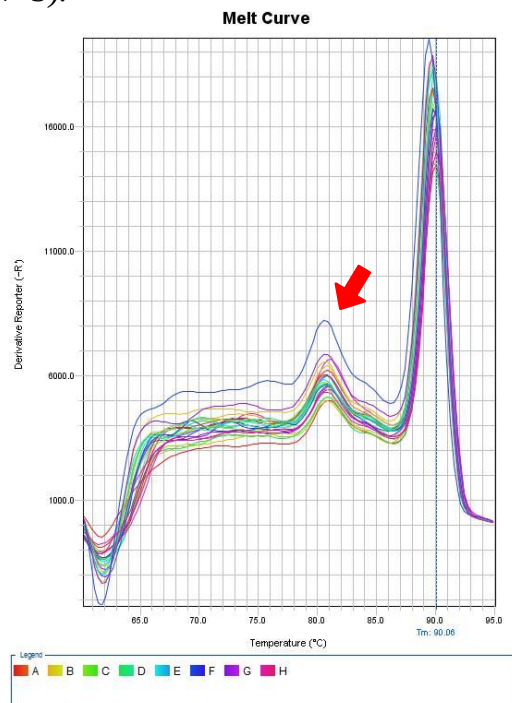


Figure 26 : « Melting curves » de la RT-qPCR de GADD45 dans les différentes conditions expérimentales et lignées. La présence d'un second pic, indiqué par la flèche rouge, trahit une amplification parasite lors de l'expérience.

Les RT-qPCR pour *PAI-1* (Figure 25) mettent en lumière une situation complexe à interpréter. En effet, si nos résultats montrent une augmentation (statistiquement non significative) de la transcription de *PAI-1* dans les S392A traitées à la doxycycline par rapport aux S392A non traitées, ce gène semble être exprimé différemment entre les lignées. La lignée Empty semble avoir une plus faible expression relative en ARNm codant pour *PAI-1*, suivi en ordre croissant par les lignées WT, S392A puis S392E. Toutes les autres cultures sont statistiquement différentes des contrôles Empty, mais aucun impact du traitement sur les lignées ne peut être statistiquement mis en évidence.

Les résultats de nos RT-qPCR pour *GADD45* n'ont pu être interprétés en raison de la présence d'un deuxième produit d'amplification (pic supplémentaire observé lors de l'analyse de la « melting curve ») (figure 26). Nos résultats concernant ce gène sont donc ininterprétables et ne seront pas discutés et interprétés ici. L'expérience devrait, dans le futur, être recommencée avec d'autres amorces.



## IV. Discussion



## 1. Discussion des résultats

Lors d'un stimulus apoptotique, une fraction du « pool » intracellulaire de p53 se relocalise au niveau des mitochondries, et plus précisément à la membrane mitochondriale externe (MME)<sup>67</sup>. Une fois à la MME, p53 interagit avec certains membres de la famille de BCL-2, en particulier BAK. Cette interaction entre p53 et BAK provoque l'oligomérisation de BAK au niveau de la MME et la génération de pores qui permettent la libération des effecteurs mitochondriaux de l'apoptose dont le cytochrome C, un évènement considéré comme majeur dans le déroulement du processus d'apoptose<sup>70</sup>. Une étude récente du laboratoire a investigué l'impact de la phosphorylation de la sérine 392 de p53 sur son activité pro-apoptotique mitochondriale<sup>67</sup>. Des analyses par Western blot indiquent que la forme de p53 phosphorylée en sérine 392 est principalement mitochondriale. De plus, un mutant non phosphorylable, où la sérine 392 a été remplacée par une alanine, montre une localisation mitochondriale très réduite lors d'un stress, par rapport à p53 wt. Cette faible localisation mitochondriale se traduit par une capacité diminuée d'induire l'apoptose<sup>67</sup>. Des résultats préliminaires du laboratoire montraient de plus, suite à un stress, le développement d'une morphologie typique de la sénescence chez des cellules exprimant le mutant non phosphorylable S392A. Ces dernières observations servent de base à ce travail.

Notre travail avait deux buts principaux : 1) déterminer si la phosphorylation de la sérine 392 régule l'entrée en sénescence dépendante de p53 ; 2) déterminer si la phosphorylation de la sérine 392 module l'expression de gènes cibles de p53 connus pour réguler l'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence, dont PAI-1.

Nos expériences se basent sur un modèle cellulaire préalablement développé au laboratoire : la lignée H1299 (p53<sup>-/-</sup>) a été transfectée de manière stable afin de générer des lignées exprimant de manière inductible (système Tet-On) p53 wt, p53 S392A ainsi que p53 S392E. Le modèle développé comprend de plus une lignée « contrôle » transfectée avec le plasmide vide.

Nos premières expériences visaient à analyser dans ces différentes lignées, suite à l'induction de p53, l'arrêt de la croissance et l'entrée en sénescence des cellules traitées. Nos données indiquent que le mutant p53 S392A semble être un puissant inducteur de l'arrêt de la croissance et de la sénescence, par rapport à p53 wt et S392E. Cela est soutenu par les tests de mesure de l'activité



SA- $\beta$ -galactosidase, la morphologie observée des cellules, les essais de formation de colonies, ainsi que les analyses de la densité cellulaire (cytométrie flux). Les résultats obtenus lors de l'analyse du cycle cellulaire (marquage à l'iodure de propidium) sont plus ambigus dans le sens où, après induction de p53, la lignée exprimant p53S392A présente une augmentation de la proportion de cellules en phase S et G2/M (et une réduction de la phase G0/G1). A priori, lors d'une entrée en sénescence « classique », on pourrait attendre une accumulation de cellules en phase G1 du cycle. Néanmoins, nous travaillons ici avec une lignée cancéreuse issue d'une métastase d'un cancer du poumon. Il est possible que, dans cette lignée, les mécanismes permettant un arrêt de cycle en G1 soient altérés, et que dès lors un arrêt de la croissance dans une autre phase du cycle cellulaire soit privilégié. Ces expériences d'analyses du cycle cellulaire devraient clairement être refaites en utilisant un modèle cellulaire plus adéquat.

Dans un second temps, nous avons voulu caractériser la capacité des différentes versions de p53 (p53 WT, S392A, S392E) d'induire l'expression de différents gènes cibles du suppresseur de tumeur connus dans la littérature pour réguler l'arrêt de la croissance et la sénescence induite par p53<sup>8</sup>. Nos résultats suggèrent que *p21*, un inhibiteur de complexes cycline-CDK et un effecteur majeur de l'arrêt de la croissance orchestré par p53<sup>49</sup>, serait induit plus fortement dans les cellules exprimant p53 S392A.

D'autre part, nous observons une baisse marquée de l'expression de la cycline *B1* dans la lignée p53 S392A (par rapport aux lignées exprimant p53 WT et S392E). La cycline *B1* (associée à CDK1) est connue pour réguler la phase M du cycle cellulaire et son abondance dans la cellule augmente déjà pendant la phase G2<sup>71</sup>. Ce résultat est intrigant par rapport aux analyses du cycle cellulaire réalisées montrant une proportion plus importante de cellules en phase G2/M pour la lignée p53 S392A, après induction du suppresseur de tumeur.



Concernant *PAI-1*, il semblerait que le mutant p53 S392A transcrive plus fortement *PAI-1* suite au traitement (par rapport à p53 WT et S392E). Les données ne sont pas statistiquement significatives. Néanmoins, ces premiers résultats sont encourageants. Il se pourrait que la phosphorylation de la sérine 392 de p53 joue un rôle dans la régulation de la transcription de ce gène, possiblement via l'interaction au promoteur de *PAI-1* entre le domaine C-terminal du suppresseur de tumeur et les protéines Smad2/3<sup>55</sup>. Il s'agit donc d'une piste à conserver et à explorer plus en avant.

Notons que la lignée « contrôle » transfectée avec le plasmide s'est comportée de façon inattendue lors de plusieurs expériences, notamment lors des tests de mesure de la viabilité cellulaire réalisés (Figure 21). Ainsi, une mortalité cellulaire élevée est observée en présence de doxycycline (induction du suppresseur de tumeur) alors que cette lignée n'exprime pas p53. Nos résultats laissent donc entrevoir plusieurs possibilités quant au mécanisme de régulation de la sénescence par p53. Ils doivent cependant être confirmés par des expériences ultérieures avec de nouveaux clones mutants dans la lignée H1299 ainsi que d'autres modèles cellulaires. L'ensemble de ces résultats semble, d'une part, confirmer notre première hypothèse. En effet, les cellules H1299 S392A paraissent généralement de meilleures inductrices de sénescence, comme l'indiquent le test à la  $\beta$ -galactosidase, tant d'un point de vue quantitatif que morphologique, les analyses de viabilité et du cycle cellulaire par FACS ainsi que les RT-qPCR analysant l'abondance de transcrits de gènes impliqués dans la sénescence.



## 2. Conclusion et perspectives

Pour conclure, l'ensemble des expériences semble indiquer que le mutant non phosphorylable p53 S392A est un meilleur inducteur de la sénescence que p53 wt ou le mutant phosphomimétique p53 S392E. L'arrêt de la croissance (essais de formation de colonies, mesure de la densité cellulaire par cytométrie en flux) induit par p53 S392A est très marqué. De plus, une proportion élevée de cellules exprimant p53 S392A développent, suite à l'induction de p53 (système Tet-On), un marqueur typique de la sénescence, l'activité SA- $\beta$ -gal.

Une limitation majeure de nos résultats provient du fait que le contrôle négatif se comporte de manière aberrante lors de certaines expériences. Les résultats doivent donc être interprétés avec beaucoup de réserves, car des conclusions définitives ne pourront être établies qu'après avoir recommencé les expériences avec d'autres lignées cellulaires comprenant un contrôle fonctionnel, c'est à dire non affecté par le traitement. Il faudra également à l'avenir une analyse approfondie par Western Blot pour évaluer l'abondance de p53 et de protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire, étant donné que la régulation de l'expression d'un gène peut se réaliser en aval de la transcription.

De plus, l'utilisation d'autres lignées cellulaires permettrait de confirmer l'importance de la phosphorylation de la sérine 392 pour d'autres types cellulaires dans l'organisme humain voire l'ensemble des cellules humaines, et non pour spécifiquement la lignée utilisée dans nos expérimentations (lignée H1299). La régulation de la transcription de PAI-1 devra également faire l'objet de plus d'études afin de pouvoir mettre en lumière un potentiel rôle de la sérine 392.

Toutefois, malgré les limitations de nos expériences, nos résultats semblent cohérents entre eux, ainsi qu'envers les résultats précédemment obtenus, et confirment que la phosphorylation de la sérine 392 doit faire l'objet de plus d'études pour la compréhension de son rôle dans la cellule humaine, ainsi que plus généralement, les mécanismes sous-jacent à l'induction de la sénescence dans les cellules cancéreuses, particulièrement en raison du fait qu'il s'agit de mécanismes potentiellement exploitables dans le traitement du cancer.



# V. Matériel et méthodes



## 1. Culture cellulaire

L'ensemble des manipulations de ce sous-chapitre ont été réalisées en milieu stérile, c'est à dire sous hotte à flux laminaire vertical (Nuair, modèle NO NU 440-400<sup>E</sup>, Serie nr 82865031303, Class II EN 12469-2000) et avec du matériel de laboratoire stérile, afin d'éviter toute contamination des cultures. Le manipulateur doit également être équipé de gants et d'un tablier de laboratoire propre.

### 1.1. Lignée cellulaire

La lignée cellulaire qui fut utilisée pour ces expériences est dénommée H1299. Cette lignée de cellules humaines cancéreuses fut établie à partir d'une métastase logée dans un ganglion lymphatique, secondaire à un cancer du poumon, chez un patient masculin âgé de 43 ans et de type caucasien<sup>72</sup>. Cette lignée possède une délétion partielle homozygote du gène codant pour p53 et n'exprime pas du tout la protéine. Durant sa thèse<sup>27</sup>, C. Castrogiovanni a établi 4 nouvelles lignées, au moyen de transfections stables, de H1299 : une lignée permettant l'expression de p53 wild type (dénommée ci-après WT), une autre exprimant une protéine p53 dont la sérine 392 a été remplacée par une alanine, (p53 S392A, non phosphorylable en cette position) et une autre exprimant le mutant phospho-mimétique S392E. Dans ces lignées, p53 est placé sous le contrôle d'un système Tet-On afin de pouvoir induire son expression au moment voulu, en ajoutant de la doxycycline dans le milieu de culture. Suite à l'induction au moyen de doxycycline, les trois lignées présentent des niveaux similaires d'expression de p53<sup>67</sup>.



## 1.2. Préparation du milieu de culture cellulaire

### Matériel :

- Boîte de milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle Medium 500 ml (DMEM) (Gibco, ThermoFisher Scientific, cat. N° 42430-025)
- 50 ml de sérum bovin fœtal (FBS) décomplémenté durant 1 heure à 60 °C (Gibco, ThermoFisher Scientific, cat. N° 10270-106)
- 5 ml du mélange d'antibiotiques Streptomycine/pénicilline (P/S) (Pénicilline 10 000 µg/ml, Streptomycine 10 000 µg/ml, Gibco, Thermofisher Scientific, cat. N° 15140-122)
- 4,4 ml de G418 (100 mg/ml, InVivoGen, cat. N° ant-gn-5)
- 55,5 µl de puromycine (10mg/ml, InVivoGen, cat. N° ant-pr)

### Mode opératoire :

Ajout du FBS décomplémenté, du mélange P/S et des antibiotiques à la bouteille de DMEM. L'entièreté des falcon de FBS et de P/S peut être transféré car il s'agit d'alicots dont le volume et la concentration ont été préalablement conçus pour les bouteilles de 500 ml de DMEM. Les autres antibiotiques doivent être ajoutés à partir de solutions stock, à des volumes inférieurs (4,4 ml de G418 et 55,5 µl de puromycine).

## 1.3. Décongélation des cellules et mise en culture

### Matériel :

- Cryule contenant les cellules à mettre en culture (conservées dans une cuve à azote liquide ou dans un congélateur à -80 °C)
- Milieu de culture cellulaire préalablement chauffé à 37°C
- 1 tube de 15 ml (CELLSTAR® TUBES, Tubes, 15 ml, PP, graduated, conical bottom, blue screw cap, sterile, Greiner Bio-One, cat. N° 188271) par cryule à décongeler
- 1 flasque de 75 cm<sup>2</sup> (T75) (CELLSTAR® Cell Culture Flasks, Greiner Bio-One, cat. N° 658 175) par cryule à décongeler
- Centrifugeuse Eppendorf Centrifuge 5810 R
- Incubateur Panasonic MCO 20 A/C



Mode opératoire :

- Sortir la cryule du congélateur ou de la cuve à azote liquide
- Placer la cryule dans un récipient rempli d'eau à une température de 42 °C
- Une fois que le contenu de la cryule est dégelé, le prélever et le mettre dans un tube de 15 ml contenant 9 ml de milieu de culture
- Centrifuger le tube de 15 ml à 500xG à température ambiante, durant 10 minutes
- Éliminer le surnageant
- Resuspendre le culot de cellules avec 13 ml de milieu de culture et transférer dans une flasque T75
- Mettre la flasque à l'incubateur à 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>
- Renouveler le milieu de culture le jour suivant la décongélation



## 1.4. Congélation des cellules

### Matériel :

- PBS stérile (préparé par dissolution d'un cachet de PBS (PBS tablets, Gibco, ThermoFisher Scientific, cat. N° 18912-014) dans de l'eau milliQ)
- Trypsine EDTA
- Milieu de culture cellulaire (conservé à 4°C)
- FBS stérile
- DMSO stérile (Dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich, cat. N° 472301-1L)
- Tube de 15 ml (CELLSTAR® TUBES, Tubes, 15 ml, PP, graduated, conical bottom, blue screw cap, sterile, Greiner Bio-One, cat. N° 188271)
- Cryules (CryoTube™ Vials, Nunc, Thermo Scientific, cat. N° 377224)
- Congélateur Thermo Scientific Revco value series
- Cuve à azote liquide RS series

### Mode opératoire :

- Préparer le milieu de congélation (90 % sérum, 10 % DMSO)
- Aspirer le milieu de cultures
- Laver avec 8 ml de PBS
- Décoller les cultures avec 3 ml de trypsine, mettre les cultures à l'incubateur durant environ 10 minutes (le temps que les cellules soient décrochées du fond de la boîte)
- Inhiber la trypsine avec 7 ml de milieu de culture
- Homogénéiser en réalisant des up & down
- Transférer la totalité des suspensions cellulaires dans des tubes Falcon de 15 ml préalablement annotés
- Centrifuger les tubes à 500g durant 10 minutes (à température ambiante)
- Aspirer le surnageant
- Resuspendre les culots de cellules dans le milieu de congélation (10 ml de milieu par tube)



## 1.5. Passage des cellules

### Matériel :

- PBS stérile
- Trypsine-EDTA stérile
- Milieu de culture cellulaire stérile
- Pompe à vide
- Tube de 50 ml (CELLSTAR® TUBES, Greiner Bio-One, cat. N° 227261)
- Solution de Bleu de Trypan 0,4 % (Sigma, cat. N° T8154)
- Logos Biosystems LUNA-II™ Automated Cell Counter
- Microscope inversé Olympus CKX41
- Flasque 75 cm<sup>2</sup> (T75) (CELLSTAR® Cell Culture Flasks, Greiner Bio-One, cat. N° 658 175)
- Boite 6 puits (Multiwell 6 Well, Falcon®, Corning, cat. N° 353046)
- Boite de 145 mm/20 mm (CELLSTAR® Cell Culture Dishes, PS, 145/20 mm, vents, TC, sterile, Greiner Bio-One, cat. N° 639160)

### Mode opératoire :

- Préchauffer le PBS, la trypsine et le milieu de culture à 37°C
- Aspirer le milieu de culture à l'aide d'une pompe à vide
- Laver avec 8 ml de PBS
- Décoller les cellules avec 3 ml de trypsine, mettre les cultures à l'incubateur durant environ 10 minutes (le temps que les cellules soient décrochées du fond de la boite)
- Inhiber la trypsine avec 7 ml de milieu de culture
- Homogénéiser en réalisant des up & down

### Pour une flasque 75cm<sup>2</sup>

- Transférer 1 ml de suspension cellulaire dans une nouvelle flasque annotée
- Ajuster à un volume total de 13 ml avec le milieu de culture pour une flasque 75 cm<sup>2</sup>



#### Pour une boîte 6 puits ou une boîte de 145 mm x 20 mm

- Déterminer préalablement la densité cellulaire souhaitée par puits
- Transférer 100 µl de chaque suspension cellulaire dans un eppendorf
- Rajouter 100 µl de solution de Bleu de Trypan 0,4 %, mélanger en faisant des up & down
- Transférer 10 µl de la solution obtenue sur une plaque de lecture pour LUNA-II™
- Compter les cellules vivantes et la viabilité grâce au LUNA-II™
- Déterminer par calcul les volumes nécessaires de suspension cellulaire et de milieu de culture pour chaque condition voulue, en tenant compte du fait que le volume total doit être ajusté à 2,5 ml par puits de plaque 6 puits et 20 ml par boîte 145 mm x 20 mm

#### 1.6.Changement du milieu de culture

##### Matériel :

- PBS stérile
- Milieu de culture cellulaire

##### Mode opératoire :

Pour une flasque de 75 cm<sup>2</sup> (volumes adaptés en fonction de la culture) :

- Préchauffer le PBS et le milieu de culture au bain marie à 37°C
- Aspirer le milieu de culture
- Laver avec 8 ml de PBS
- Disposer le milieu de culture frais à raison de 13 ml par flasque 75 cm<sup>2</sup>



## 1.7. Induction à la doxycycline

### Matériel :

- Doxycycline hyclate (Sigma-Aldrich, cat. N° D9891-1G)
- Eau Milli-Q (filtrée par Advantage A10, Milli-Q, Millipore)
- PBS stérile
- Milieu de culture cellulaire
- filtre stérile 0,22 µm (Merck Millipore MILLEX® GP Filter Unit, cat. N° SLGP033RB)
- Seringue stérile 5 ml (BD Plastipak™, Becton Dickinson, cat. N° 302187)

### Mode opératoire :

#### Préparer la solution de doxycycline 5mg/ml :

- Dissoudre 5 mg de doxycycline par ml d'eau Milli-Q dans un eppendorf, bien homogénéiser la solution par renversement
- Pipetter la solution obtenue dans le corps d'une seringue munie d'un filtre stérile 0,22 µm
- Faire passer la solution à travers le filtre et récolter dans un nouvel eppendorf
- Stocker la solution à -20 °C l'abri de la lumière, durant 1 mois maximum

#### Remplacer le milieu de culture des échantillons à traiter avec la doxycycline (pour une boîte 6 puits) :

- Préchauffer le PBS, la solution de doxycycline et le milieu de culture au bain marie à 37°C
- Préparer un tube avec la quantité nécessaire de milieu de culture additionné de doxycycline. Pour obtenir la concentration voulue de 2 µg/ml, il faut ajouter 4 µl de solution de doxycycline 5mg/ml par 10 ml de milieu de culture
- Aspirer le milieu de culture
- Laver chaque puits avec 2 ml de PBS
- Disposer le milieu de culture additionné de doxycycline



## 2. Essai de formation de colonie (CFA)

### Matériel :

- Crystal Violet 0,5 % (dilué dans de l'éthanol ou du méthanol)
- PBS
- Eau Milli-Q (filtrée par Advantage A10, Milli-Q, Millipore)
- Méthanol froid (conservé à -20 °C)

### Mode opératoire :

- Placer les boîtes 6 puits contenant les échantillons sur glace
- Laver chaque puits 2 fois avec du PBS froid (4°C ou sur glace) (2 ml par puits et par lavage)
- Fixer les cellules avec du méthanol froid (conservé à -20 °C) durant 10 minutes sur glace (1 ml par puits)
- Aspirer le méthanol des puits et travailler hors glace, à température ambiante pour la suite de la manipulation
- ajouter 500 µl de solution de Crystal Violet par puits, laisser incuber durant 15 °C à température ambiante
- Aspirer le Crystal Violet et le disposer dans une bouteille pour le réutiliser
- Rincer les cultures avec de l'eau Milli-Q jusqu'à ce que les cultures ne déteignent plus (environ 3 à 4 fois)
- Laisser les boîtes sécher à température ambiante durant une heure ou deux



### 3. Tests SA- $\beta$ -gal pour le marquage des cellules sènescentes

#### Principe :

L'entrée en sénescence s'accompagne de bouleversements morphologiques et histochimiques. Les cellules sènescentes ont entre autre une SA- $\beta$ -gal bien plus active que les cellules qui suivent le cycle cellulaire. Cette SA- $\beta$ -gal est capable de dégrader un substrat, le Xgal, dont le produit, d'une couleur bleue vif, permet l'identification aisée des cellules sènescentes en colorant leur cytoplasme. Ce marquage peut se réaliser pour une grande variété de types cellulaires.

#### Matériel :

- Kit Senescence Cells Histochemical Staining Kit (Merck Sigma-Aldrich, cat. N° CS0030)
- PBS
- Tube de 15 ml (CELLSTAR® TUBES, Tubes, 15 ml, PP, graduated, conical bottom, blue screw cap, sterile, Greiner Bio-One, cat. N° 188271)
- Incubateur Binder (Binder, cat. N° 15-14467)

#### Mode opératoire :

Le test est réalisé sur des cultures cellulaires en plaques 6 puits.

Avant le lancement de la coloration, il faut préparer les solutions requises. Le Xgal doit être chauffé au bain-marie à 37 °C durant une heure minimum, afin d'éviter l'apparition d'agrégats qui rendraient la visualisation des cellules sènescentes plus ardue.

- Les composants stockés
- Le milieu de culture est aspiré et jeté
- Laver les cultures cellulaires 2 fois avec le PBS (à raison de 1ml de PBS 1X par puit)
- Fixer les cultures par ajout de 1,5 ml de fixation buffer fourni avec le kit
- Laisser incuber 6 minutes à température ambiante
- Rincer les cellules 3 fois par des lavages successifs au PBS 1X



#### 4. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux, marquage à l'iodure de propidium

##### Principe :

L'iodure de propidium est un agent d'intercalation des acides nucléiques, dont la fluorescence augmente 20 à 30 fois lorsqu'il s'y lie. La solution stock que nous utilisons contient également des RNAses qui permettent de dégrader l'ARN contenu dans les cellules et donc de pouvoir comparer les cultures cellulaires en fonction du stade du cycle cellulaire majoritaire, lui-même déterminé en fonction de leur abondance en ADN et leurs paramètres physiologiques analysés par cytométrie de flux (SSC, Side-Scattered Light, FSC, Forward-Scattered Light).

##### Matériel :

- Cytomètre de flux (Flow Cytometry Device, Guava EasyCyte™ 6, Millipore®)
- Iodure de propidium en solution stock, avec RNAses

##### Mode opératoire :

- Aspirer et conserver le milieu de culture dans un falcon de 15 ml par puit
- Laver les cultures avec du PBS 1x
- Traiter les cultures avec 500 µl de trypsine par puit, mettre environ 10 minutes à l'incubateur pour détacher les cellules de leur support
- Bloquer la trypsine en déversant le contenu de chaque falcon dans le puit correspondant



## 5. Test de viabilité cellulaire par cytométrie en flux

### Principe :

Ce test repose sur la différence de perméabilité des cellules à deux agents d'intercalation des acides nucléiques : le LDS-751 et l'iodure de propidium. Ce dernier est incapable de franchir la membrane plasmique cellulaire tant que celle-ci est intègre, et donc que les cellules sont vivantes. Il est donc un marqueur spécifique des cellules non viables. Le LDS-751 marque les acides nucléiques des cellules vivantes et mortes. La différence de fluorescence émise qui résulte de l'intercalation des acides nucléique par le LDS-751 seul (cellules viables) ou en association avec l'iodure de propidium (cellules non viables) permet, via la cytométrie de flux, la quantification des cellules et la détermination de leur viabilité.

### Matériel :

- Cytomètre de flux (Flow Cytometry Device, Guava EasyCyte™ 6, Millipore®)
- Réactif Guava ViaCount® (Merck Millipore cat. N° 4000-0040)
- Trypsine EDTA
- PBS
- 1 Tube de 15ml (CELLSTAR® TUBES, Tubes, 15 ml, PP, graduated, conical bottom, blue screw cap, sterile, Greiner Bio-One, cat. N° 188271) par puits

### Mode opératoire :

- Aspirer et conserver le milieu de culture dans un tube de 15 ml par puits
- Laver les cultures avec du PBS 1x
- Traiter les cultures avec 500 µl de trypsine par puits, mettre environ 10 minutes à l'incubateur pour détacher les cellules de leur support
- Bloquer la trypsine en déversant le contenu de chaque tube dans le puits correspondant



## 6. [RT-qPCR](#)

### Principe :

Inventée lors d'un trajet nocturne en voiture par Kary Mullis en avril 1983, la PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique moderne qui permet l'amplification rapide, et de façon automatisée, d'un segment d'ADN dont la séquence est encadrée par deux primers. De nombreux raffinements permirent cependant d'augmenter l'éventail de possibilités d'utilisation offert par cette technique. Entre autre, la RT-qPCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), permet une analyse semi-quantitative de l'abondance en ARNm d'un gène dont on veut étudier l'expression, grâce à une étape préliminaire de transcription inverse de l'ARNm (extrait et purifié des échantillons à analyser) en ADNc. L'expression du gène étudié est comparée à un gène HKG (House Keeping Gene) dont l'expression est stable dans les différentes lignées cellulaires et les différents traitements utilisés.

### [6.1. Préparation des échantillons de RT-qPCR](#)

#### Matériel :

- Tubes de 50 ml (CELLSTAR® TUBES, Tubes, 50 ml, PP, graduated, conical bottom, blue screw cap, sterile, Greiner Bio-One, cat. N° 227261)
- Boîtes de cultures 145/20 mm à analyser (CELLSTAR® Cell Culture Dishes, PS, 145/20 mm, vents, TC, sterile, Greiner Bio-One, cat. N° 639160)
- Écouvillons (CELL SCRAPER M, TPP®, cat. N° 99003)

#### Mode opératoire :

- Gratter vigoureusement le fond de la boîte avec l'écouvillon, de haut en bas et en passant sur la totalité de la surface du fond de la boîte, de façon à décrocher les cellules. Tourner la boîte d'environ 60° et recommencer. Répéter cette opération une troisième fois
- Aspirer le milieu de culture contenant les cellules en suspension et laver le fond de la boîte avec celle-ci, afin de récolter le maximum de cellules possible
- Transférer la suspension cellulaire en tubes de 50 ml et Centrifuger les tubes à 500 g durant 10 minutes (à température ambiante)
- Aspirer et jeter le surnageant
- Disposer 10 ml de PBS dans les tubes et resuspendre le culot de cellules, afin de laver les cellules



- Centrifuger les tubes à 500 g durant 10 minutes (à température ambiante)
- Aspirer et jeter le surnageant
- Mettre les tubes au congélateur à -80 °C

## 6.2.Extraction et purification de l'ARN

### Matériel :

- Kit Qiagen RNeasy plus mini kit (Qiagen, cat. N° 74134)
- $\beta$ -mercaptoéthanol (Fluka Biochemika, cat. N° 63690)
- Spectrophotomètre Isogen Life Science NanoDrop™ Spectrophotometer ND-1000
- Microcentrifugeuse Thermo Scientific Heraeus Pico 21 Centrifuge
- Éthanol absolu (non dénaturé)
- Solution d'éthanol 70 % (préparée avec de l'éthanol non dénaturé dilué avec de l'eau Milli-Q)

### Mode opératoire :

#### Préparation des réactifs du kit :

- Buffer RTL Plus : ajouter 10  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoéthanol par ml de buffer
- Buffer RPE : Ajouter 4 volumes d'éthanol absolu à la solution stock de buffer (volume précis indiqué sur la bouteille du Buffer RPE. Pour celui de notre kit : 44 ml)

#### Extraction et purification de l'ARN :

- Décongeler les cultures à traiter et lyser les cellules en ajoutant 600  $\mu$ l de Buffer RTL Plus par tube.
- Homogénéiser en pipetant 5-6 fois le contenu de chaque tube, afin d'éliminer tout agrégat qui nuirait à l'efficacité de la lyse
- Transférer les lysats homogénéisés sur une colonne gDNA eliminator spin column placée dans un tube de collecte de 2 ml, centrifuger 30 secondes à 8000 g
- Jeter la colonne et conserver le flow-through (qui constitue l'échantillon)
- Ajouter 600  $\mu$ l d'éthanol 70 % à l'échantillon, mélanger par pipetage
- Transférer jusqu'à 700  $\mu$ l de l'échantillon sur une colonne RNeasy spin column placée dans un tube de collecte de 2 ml, centrifuger 15 secondes à 8000 g
- Jeter le flow-through et réutiliser le tube de collecte pour la suite des opérations
- Ajouter 700  $\mu$ l de Buffer RW1 à la colonne RNeasy, centrifuger 15 secondes à 8000 g
- Jeter le flow-through et réutiliser le tube de collecte pour la suite des opérations



- Ajouter 500 µl de Buffer RPE à la colonne RNeasy, centrifuger 15 secondes à 8000 g
- Jeter le flow-through et réutiliser le tube de collecte pour la suite des opérations
- Ajouter 500 µl de Buffer RPE à la colonne RNeasy, centrifuger 2 minutes à 8000 g afin de laver la membrane de la colonne, jeter le tube de collecte de 2 ml avec le flow-through qu'il contient
- Placer la colonne RNeasy dans un nouveau tube collecteur de 2 ml et centrifuger 1 minute à vitesse 16000 g afin d'éliminer toute trace résiduelle d'éthanol qui pourrait nuire à l'élution de l'ARN (étape suivante)
- Placer la colonne RNeasy dans un nouveau tube collecteur de 1,5 ml. Pipeter 40 µl d'eau RNase free directement sur la membrane de la colonne et centrifuger 1 minute à 8000 g
- Mettre les échantillons sur glace et les doser avec le NanoDrop™ afin de déterminer le contenu en ARN des échantillons et de vérifier l'absence de contamination par ADN génomique (le ratio 280/260 doit être de 2 environ) ainsi que la présence éventuelle d'autres contaminants (le ratio à 260/230 doit se situer entre 2 et 2,20)
- Stocker les échantillons d'ARN au congélateur à -80 °C dans une boîte annotée

### 6.3. Transcription inverse

#### Matériel :

- Kit Promega GoScript™ Reverse Transcription system (Promega, cat. N° A5000)
- Bain marie sec Eppendorf Thermomixer Comfort
- Microcentrifugeuse Thermo Scientific Heraeus Pico 21 Centrifuge
- ARN extrait et purifié (obtenu durant l'étape précédente)

#### Mode opératoire :

- Mélanger et centrifuger brièvement chaque réactif du kit avant utilisation
- Combiner dans un eppendorf les différents constituants de l'échantillon : l'ARN guide (à une concentration de 1,5 µg/20µl), les primers Oligo(dT)<sub>15</sub> (à une concentration de 0,5 µg/20µl) et de l'eau sans RNAses. Les volumes sont à adapter en fonction de chaque réaction, afin d'obtenir les concentrations indiquées précédemment
- Chauffer les échantillons dans un bloc chauffant à 70°C durant 5 minutes
- Refroidir immédiatement dans la glace durant au minimum 5 minutes
- Centrifuger 10 secondes dans une microcentrifuge



- Mettre les échantillons sur glace et réaliser le mix de la réaction de transcription inverse ; pour ce faire, combiner sur glace et dans l'ordre : 4 µl de GoScript™ Reaction Buffer, 3 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µl de PCR Nucleotide Mix, 1 µl de GoScript™ Reverse Transcriptase et 6 µl d'eau sans RNAses. Le volume final par réaction de solution mix est de 15 µl, les quantités de réactifs doivent être adaptées aux nombres d'échantillons à traiter.
- Combiner les échantillons avec 15 µl de mix pour transcription inverse
- Incuber dans un bloc chauffant à 25°C durant 5 minutes
- Réaliser l'élongation en mettant les échantillons dans un bloc chauffant à 42°C durant 45 à 50 minutes
- Stopper la réaction et conserver les échantillons d'ADNc à -80 °C

#### 6.4. qPCR

##### Matériel :

- Thermocycleur Applied Biosystems StepOnePlus™
- Kit Qiagen Quantitect® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Cat. N° 204143/204163)
- Eau Milli-Q RNase-free
- Échantillons d'ADNc (obtenus durant l'étape précédente)
- Plaque qPCR (MicroAmp®, Applied Biosystems, cat. N° 4346906) et film de protection ((MicroAmp®, Applied Biosystems) Optical Adhesive Film, cat. N° 4311971) (MicroAmp® Fast Optical 96 Well Reaction Plate, Life Technologies, Cat. N° 4346906)
- Amorces (concentration de 100µM, Kaneka Eurogentec) :
  - 7009425 P21-F 7734,1 g/mol – 65,7 nmol ACAGCAGAGGAAGACCATGTGGACC
  - 7009426 P21-R 7609,0 g/mol – 64,0 nmol CGTTTTTCGACGCTGAGAGTCTCCAG
  - 7009427 GAPDH-F 6149,0 g/mol – 56,9 nmol CTGCCAACGTGTCAGTGGTG
  - 7009428 GAPDH-R 6118,0 g/mol – 61,4 nmol TCAGTGTAGCCCAGGATGCC
  - 7009429 B1-F 6417,3 g/mol – 58,4 nmol AACAACTGCAGGCGAAAATGC
  - 7009430 B1-R 6238,1 g/mol – 68,2 nmol CATTGGGCTTGAGAGGCAG
  - 7009431 GADD45-F 6133,0 g/mol – 69,7 nmol CGTTTTGCTGCGAGAACGAC
  - 7009432 GADD45-R 6992,6 g/mol – 62,5 nmol AACCCATTGATCCATGTAGCGAC
  - 7009433 PAI-1-F 6080,0 g/mol – 65,3 nmol ACCCAGCAGCAGATTCAAGC
  - 7009434 PAI-1-R 6489,3 g/mol – 63,6 nmol CCGGAACAGCCTGAAGAAGTG



### Mode opératoire :

- Décongeler sur glace les échantillons d'ADNc et le SYBR® Green
- Chauffer les échantillons dans un bloc chauffant à 70 °C durant 10 minutes, afin d'inactiver la transcriptase inverse du GoScript™ Reverse Transcription system
- Diluer les échantillons d'ADNc 50x
- Diluer les amorces sens et antisens 5x, afin d'obtenir une concentration finale de 20 µM pour chacune d'elles (20 µl de solution stock à 100 µM et 80 µl d'eau stérile MilliQ)
- Pour chaque gène (à multiplier par le nombre de puits par gène + 10 % par sécurité), élaborer la solution mix : 6 µl de SYBR® Green, 0,2 µl d'amorce sens, 0,2 µl d'amorce antisens et 2,6 µl d'eau
- Charger la plaque qPCR avec 9µl de solution mix et, au choix, 3 µl d'ADNc dilué 50x de l'échantillon désiré dans les puits réservés à l'analyse des gènes d'intérêt, 3 µl d'eau Milli-Q dans les puits réservés aux blancs (1 ou 2 par solution mix différente), ou 3 µl d'échantillon ARN pour réaliser les contrôles négatifs
- Recouvrir la plaque avec un film plastique
- Centrifuger la plaque 1 minute à 2000 rpm
- Mettre la plaque en place dans le tiroir du thermocycleur, rentrer les paramètres de l'expérience dans le programme informatique et démarrer l'expérience



# VI. Bibliographie



1. Dagenais, G. R. *et al.* Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *The Lancet* (2019) doi:10.1016/S0140-6736(19)32007-0.
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
3. Vafa, O. *et al.* c-Myc Can Induce DNA Damage, Increase Reactive Oxygen Species, and Mitigate p53 Function: A Mechanism for Oncogene-Induced Genetic Instability. *Molecular Cell* **14**.
4. Zindy, F. *et al.* Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes & Development* **12**, 2424–2433 (1998).
5. Campisi, J., Gray, H. E., Pardee, A. B., Dean, M. & Sonenshein, G. E. Cell-cycle control of c-myc but not c-ras expression is lost following chemical transformation. *Cell* **36**, 241–247 (1984).
6. Gearhart, J., Pashos, E. E. & Prasad, M. K. Pluripotency Redux — Advances in Stem-Cell Research. *New England Journal of Medicine* **357**, 1469–1472 (2007).
7. Youle, R. J. & Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 47–59 (2008).
8. Vousden, K. H. & Prives, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* **137**, 413–431 (2009).
9. Lane, D. P. & Crawford, L. V. T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. *Nature* **278**, 261–263 (1979).
10. DeLeo, A. B. *et al.* Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**, 2420–2424 (1979).

11. Linzer, D. I. & Levine, A. J. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**, 43–52 (1979).
12. Isobe, M., Emanuel, B. S., Givol, D., Oren, M. & Croce, C. M. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* **320**, 84–85 (1986).
13. Crawford, L. V., Pim, D. C., Gurney, E. G., Goodfellow, P. & Taylor-Papadimitriou, J. Detection of a common feature in several human tumor cell lines--a 53,000-dalton protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 41–45 (1981).
14. Baker, S. J. *et al.* Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* **244**, 217–221 (1989).
15. Finlay, C. A., Hinds, P. W. & Levine, A. J. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* **57**, 1083–1093 (1989).
16. Ozaki, T. & Nakagawara, A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel)* **3**, 994–1013 (2011).
17. Yonish-Rouach, E. *et al.* Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* **352**, 345–347 (1991).
18. Rufini, A., Tucci, P., Celardo, I. & Melino, G. Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene* **32**, 5129–5143 (2013).
19. Tasdemir, E. *et al.* Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* **10**, 676–687 (2008).
20. Gatz, S. A. & Wiesmüller, L. p53 in recombination and repair. *Cell Death Differ* **13**, 1003–1016 (2006).
21. Hu, W., Feng, Z., Teresky, A. K. & Levine, A. J. p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature* **450**, 721–724 (2007).

22. Budanov, A. V. & Karin, M. p53 Target Genes Sestrin1 and Sestrin2 Connect Genotoxic Stress and mTOR Signaling. *Cell* **134**, 451–460 (2008).
23. Bensaad, K. *et al.* TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. *Cell* **126**, 107–120 (2006).
24. Blagih, J. *et al.* Cancer-Specific Loss of p53 Leads to a Modulation of Myeloid and T Cell Responses. *Cell Rep* **30**, 481-496.e6 (2020).
25. Gottlieb, E. & Vousden, K. H. p53 Regulation of Metabolic Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, (2010).
26. Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D. & Pavletich, N. P. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* **265**, 346–355 (1994).
27. Castrogiovanni, C. Impact of post-translational modifications of p53 on its mitochondrial localization. (UCL - Université Catholique de Louvain, 2017).
28. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. & Oren, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296–299 (1997).
29. Ziemer, M. A., Mason, A. & Carlson, D. M. Cell-free translations of proline-rich protein mRNAs. *J. Biol. Chem.* **257**, 11176–11180 (1982).
30. Fabbro, M. & Henderson, B. R. Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. *Exp. Cell Res.* **282**, 59–69 (2003).
31. Rinaldo, C. *et al.* MDM2-Regulated Degradation of HIPK2 Prevents p53Ser46 Phosphorylation and DNA Damage-Induced Apoptosis. *Molecular Cell* **25**, 739–750 (2007).
32. Sykes, S. M. *et al.* Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol. Cell* **24**, 841–851 (2006).

33. Tang, Y., Luo, J., Zhang, W. & Gu, W. Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol. Cell* **24**, 827–839 (2006).
34. Tang, Y., Zhao, W., Chen, Y., Zhao, Y. & Gu, W. Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell* **133**, 612–626 (2008).
35. Jorruiz, S. M. & Bourdon, J.-C. p53 Isoforms: Key Regulators of the Cell Fate Decision. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**, (2016).
36. Vieler, M. & Sanyal, S. p53 Isoforms and Their Implications in Cancer. *Cancers (Basel)* **10**, (2018).
37. Khoury, M. P. & Bourdon, J.-C. The Isoforms of the p53 Protein. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, (2010).
38. Nigro, J. M. *et al.* Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* **342**, 705–708 (1989).
39. Olivier, M., Hollstein, M. & Hainaut, P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001008 (2010).
40. Soussi, T., Caron de Fromentel, C., Méchali, M., May, P. & Kress, M. Cloning and characterization of a cDNA from *Xenopus laevis* coding for a protein homologous to human and murine p53. *Oncogene* **1**, 71–78 (1987).
41. Chompret, A. The Li–Fraumeni syndrome. *Biochimie* **84**, 75–82 (2002).
42. Olivier, M. *et al.* Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res.* **63**, 6643–6650 (2003).
43. Kruse, J.-P. & Gu, W. Modes of p53 Regulation. *Cell* **137**, 609–622 (2009).
44. Honda, R., Tanaka, H. & Yasuda, H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* **420**, 25–27 (1997).

45. Kubbutat, M. H., Jones, S. N. & Vousden, K. H. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299–303 (1997).
46. Marchenko, N. D. & Moll, U. M. Mitochondrial death functions of p53. *Mol Cell Oncol* **1**, (2014).
47. Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* **25**, 585–621 (1961).
48. Dimri, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 9363–9367 (1995).
49. Karimian, A., Ahmadi, Y. & Yousefi, B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst.)* **42**, 63–71 (2016).
50. Stone, S. *et al.* Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res.* **55**, 2988–2994 (1995).
51. Nobori, T. *et al.* Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* **368**, 753–756 (1994).
52. Mijit, M., Caracciolo, V., Melillo, A., Amicarelli, F. & Giordano, A. Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. *Biomolecules* **10**, 420 (2020).
53. Hall, B. M. *et al.* Aging of mice is associated with p16(Ink4a)- and  $\beta$ -galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells. *Aging* **8**, 1294–1315 (2016).
54. Narita, M. *et al.* Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**, 703–716 (2003).
55. Kawarada, Y. *et al.* TGF- $\beta$  induces p53/Smads complex formation in the PAI-1 promoter to activate transcription. *Scientific Reports* **6**, 35483 (2016).

56. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239–257 (1972).
57. Green, D. R. Apoptotic Pathways: Ten Minutes to Dead. *Cell* **121**, 671–674 (2005).
58. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* **35**, 495–516 (2007).
59. Brill, A., Torchinsky, A., Carp, H. & Toder, V. The Role of Apoptosis in Normal and Abnormal Embryonic Development. *J Assist Reprod Genet* **16**, 512–519 (1999).
60. Mori, C. *et al.* Programmed cell death in the interdigital tissue of the fetal mouse limb is apoptosis with DNA fragmentation. *Anat. Rec.* **242**, 103–110 (1995).
61. Segawa, K. & Nagata, S. An Apoptotic ‘Eat Me’ Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends Cell Biol.* **25**, 639–650 (2015).
62. Polcic, P., Mentel, M. & Jaká, P. Yeast as a tool for studying proteins of the Bcl-2 family. *MIC* **2**, 74–87 (2015).
63. Chao, D. T. & Korsmeyer, S. J. BCL-2 FAMILY: Regulators of Cell Death. *Annual Review of Immunology* **16**, 395–419 (1998).
64. Chen, L. *et al.* Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell* **17**, 393–403 (2005).
65. Vela, L., Gonzalo, O., Naval, J. & Marzo, I. Direct interaction of Bax and Bak proteins with Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins in living cells revealed by fluorescence complementation. *J. Biol. Chem.* **288**, 4935–4946 (2013).
66. Li, Z. & Sheng, M. Caspases in synaptic plasticity. *Molecular Brain* **5**, 15 (2012).
67. Castrogiovanni, C., Waterschoot, B., De Backer, O. & Dumont, P. Serine 392 phosphorylation modulates p53 mitochondrial translocation and transcription-independent apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **25**, 190–203 (2018).

68. Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. & van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols* **1**, 2315–2319 (2006).
69. Rafehi, H. *et al.* Clonogenic Assay: Adherent Cells. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* e2573 (2011) doi:10.3791/2573.
70. Leu, J. I.-J., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M. E. & George, D. L. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak–Mcl1 complex. *Nature Cell Biology* **6**, 443–450 (2004).
71. Kishimoto, T. & Okumura, E. In vivo regulation of the entry into M-phase: initial activation and nuclear translocation of cyclin B/Cdc2. in *Progress in Cell Cycle Research* (eds. Meijer, L., Guidet, S. & Philippe, M.) 241–249 (Springer US, 1997). doi:10.1007/978-1-4615-5371-7\_19.
72. NCI-H1299 ATCC® CRL-5803™. ATCC® <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-5803.aspx#generalinformation> (2019).





UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN  
Faculté des sciences

Place des sciences, 2 bte L6.06.01, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgique | [www.uclouvain.be/sc](http://www.uclouvain.be/sc)