Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale 394

Inserm UMR_938, Centre de Recherche Saint-Antoine

Equipe « Biologie et Traitement des Tumeurs Hépatobiliaires »

Rôle de la kinase MK2 dans la résistance au stress oxydatif des tumeurs hépatobiliaires

Par

Thanh Huong NGUYEN HO-BOULDOIRES

Thèse de Doctorat de « Physiologie et Physiopathologie »

Dirigée par Laura FOUASSIER

Présentée et soutenue publiquement le 30 septembre 2014

Devant un jury composé de :

- Isabelle PETROPOULOS — Président de jury
- Frédéric BATTEUX — Rapporteur
- Pascal PINEAU — Rapporteur
- Chantal DESDOUETS — Examinateur
- Valérie PARADIS — Examinateur
- Laura FOUASSIER — Directeur de thèse

Je dédis cette thèse à toi, père. J'aurais tant voulu que tu sois là à mes côtés à ces moments. Tu me dirais et me montrerais au combien tu serais fier de ta petite fille, qui a tellement grandi…

A ma maman qui m'a fait ce que je suis aujourd'hui. Je ne connais aucune femme avec autant de ténacité, de persévérance, de profondeur et bien d'autres qualités comme toi que j'aurais du mal à toutes les énumérer ici. Merci pour ton soutien sans faille, ton amour sans borne. Je suis fière de t'avoir comme maman et j'espère que tu pourras être fière de moi à ton tour ! Con cu me gioi khong ?!

A Denis, mon père adoptif. Merci de m'avoir toujours soutenu dans tous mes choix, d'être à mon écoute. Merci d'avoir toujours cru en moi.

A toute ma famille restée au Vietnam, à mes grands-parents, mes tantes et oncles, sans oublier mes petites cousines à qui j'espère montrer la voie.

Pour toi Diego mon amour sans qui je n'aurais peut être pas connu cette aventure qu'est la thèse. Merci beaucoup de m'avoir encouragé d'emprunter cette voie. Je ne le regrette nullement aujourd'hui. Merci de m'avoir portée toutes ces années, pour ton soutien indéfini, ton incroyable confiance en moi qui ont contribué à mon épanouissement émotionnel et intellectuel. Merci de tes mots qui ont toujours su me rassurer. Longue vie à nous !

Passionnément vôtre !

REMERCIEMENTS

Enfin le moment où je redoute le plus. Le moment où je dois trouver les mots justes pour vous remercier.
Remercier vous, qui, à un instant t, à une période d, m'avez aidée, supportée et guidée. Je n'ai jamais été très douée pour les remerciements et j'espère ne pas oublier quiconque.
Je n'y connaissais rien au foie, j'ai alors découvert et appris à aimer cet organe si complexe et si intéressant. Vous avez tous, de loin ou de près, participer à cette aventure, à mon devenir et à ma découverte de ce monde passionnant, la Recherche sur le foie.
Nul mot ne suffira à décrire toute ma reconnaissance à vos égards…

J'aimerais tout d'abord exprimer ma reconnaissance envers les membres du jury,
la présidente la Pr. Isabelle Petropoulos de m'avoir fait l'honneur de présider ma thèse de doctorat et d'accorder du temps à ce travail ;
les rapporteurs le Pr. Frédéric Batteux et le Dr. Pascal Pineau qui m'ont consacré du temps, à la relecture et à l'évaluation de cette thèse ; et pour leur gentillesse de m'avoir si bien accueilli lors de nos rencontres ;
les examinatrices la Dr. Chantal Desdouets et la Pr. Valérie Paradis qui était également ma tutrice de thèse, pour leur expertise sur le sujet et pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Toute ma gratitude va naturellement à ma directrice de thèse, la Dr. Laura Fouassier.
Dès notre première rencontre, j'ai été frappée par votre enthousiasme, votre passion du métier. Toute cette aventure a commencé grâce à vous, dès l'instant où vous m'avez donné votre confiance pour ma candidature de mobilité. Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir donné cette chance, l'opportunité de prouver que je peux réussir. Ma première impression ne m'a pas trompée. Vous avez toujours trouvé les mots justes pour me motiver, m'encourager. Vous êtes dotée d'une intelligence émotionnelle rare. Il est très agréable de travailler à vos côtés, de par votre bonne humeur, vos éclats de rire. Peut-être, sans vous rendre compte, vous m'avez communiqué votre énergie, votre dynamisme et la positive attitude. Vous avez été très présente et toujours disponible à mes moindres questions. J'ai énormément apprécié la liberté et l'indépendance que vous m'avez accordé dans mes expériences tout en me recadrant quand il était nécessaire. Merci pour votre franc parler, vos remarques pertinentes, vos qualités humaines. Je n'aurais pas pu mieux tomber sur une chef telle que vous. Je regrette déjà de devoir vous quitter... Votre petite fourmi !

Je remercie la Dr. Audrey Clapéron pour m'avoir aidé dès le début de cette aventure.
Merci de m'avoir délégué ce magnifique projet sur MK2. J'ai beaucoup appris grâce à toi, grâce à tes remarques toujours pertinentes. Merci de m'avoir toujours aidé dans toutes les démarches, de m'avoir montré comment être percutante dans les présentations écrites et orales. Focus, aller à l'essentiel tout en prenant soin du choix des mots, simples, pour expliquer des concepts complexes. Toujours prête à m'aider, à me donner des conseils et des petites astuces. Grâce à toi, je suis devenue la pro des Western blots ! Cela a été un grand plaisir pour moi d'avoir travaillé avec toi. Outre tes qualités professionnelles, tu nous as fait rêver grâce à tes voyages et tes belles photos. J'espère qu'à l'heure où j'écris ces remerciements, tu en profites de ton voyage et nous en raconteras prochainement.

A Martine Mergey, mon ingénieure préférée.
Au moment de l'entretien, j'ai été impressionnée par votre sérieux et votre professionnalisme. J'ai appris à vous connaître. Sous votre air un peu strict, se cachent un grand cœur, une grande sensibilité et une telle gentillesse. J'ai rarement vu une personne autant impliquée dans son travail que vous, toujours prête à aider les autres. Aux moindres soucis, aux moindres problèmes, vous étiez là à nous aider à les résoudre. Je vous remercie de m'avoir autant aidé, encouragé, corrigé mes fautes de français pendant ces années. J'adorais discuter avec vous, apprendre de vous « l'encyclopédie vivante », nos éternels débats à ne plus en finir. Merci de nous avoir autant gâté avec vos petits chocolats. Vous m'avez transmis le syndrome « Chocolats » ! Que je ne regrette point de l'avoir attrapé !

A la Dr. Christèle Desbois-Mouthon qui m'a permis d'élargir mon projet au carcinome hépatocellulaire. Sans votre aide et votre participation à ce projet, il ne sera pas tel qu'il est aujourd'hui. Je vous remercie pour votre écoute, vos suggestions et vos explications des statistiques. Votre regard objectif et vos critiques constructives m'ont permis d'aller plus loin dans mes analyses. Votre énergie m'impressionne, je me demande parfois comment vous arrivez à mener à bien autant de choses à la fois. Me donnerez-vous un jour votre secret ?! Sinon, il faut peut-être que vous arrêtiez de nous faire partager les spécialités régionales à vos retours de voyage. Il faut qu'on fasse attention à notre ligne, même si c'est déjà raté je pense !

Je tiens à remercier la Pr. Chantal Housset de m'avoir accueillie dans un premier temps dans son équipe. Merci pour votre soutien, votre implication dans ce projet. Je n'oublierai jamais les premiers moments où vous m'avez aidée dans la préparation de mon concours. Vos conseils

résonnent encore dans ma tête à chaque fois que je prépare une présentation. J'ai beaucoup appris grâce à vous, de votre sens du détail. Chaque mot compte, rien ne doit laisser au hasard. Chaque discussion scientifique avec vous est un plaisir.

Je souhaite remercier la Dr. Françoise Praz qui nous a rejoint depuis plus d'un an maintenant, à la direction de notre équipe émergeante. Grâce à vous, il règne une belle ambiance et entente dans toute l'équipe qu'on ne peut que l'apprécier. Malgré la distance qui nous sépare, vous vous êtes montrée toujours accessible et disponible à mon égard. Merci pour votre aide et vos commentaires sur ce travail. J'espère que vous allez mener avec cette équipe une belle aventure.

A tous mes collaborateurs qui ont participé à ce projet. Je vous remercie de votre implication personnelle, de loin ou de près à la concrétisation de mon travail de thèse.
A la Pr. Dominique Wendum qui m'a montré, expliqué et aidée pour les analyses des marquages immunohistochimiques faits par Fatiha Merabtene, sans qui ces magnifiques marquages n'auront pas lieu.
Je remercie le Pr. Matthias Gaestel de l'Institut de la Chimie physiologique de l'école de médecine d'Hanovre en Allemagne, notre expert de MK2. Bien que ces remerciements ne vous seront sans doute jamais parvenus, je tiens tout de même à vous remercier pour tous vos conseils et la relecture de l'article. J'espère avoir l'occasion de vous le dire en direct.
Merci à la Dr. Laetitia Fartoux et au Pr. Olivier Scatton de votre contribution et votre enthousiasme pour ce projet.
A toi Hamza Chettouh ou devrais-je dire plutôt dire au Dr. Hamza Chettouh ! J'ai beaucoup apprécié nos discussions à propos de la Science, de nos débats sur la spiritualité. Malgré nos points de vue divergents sur certains domaines, il était très agréable de pouvoir les partager avec toi. Je te souhaite réussir et mener à bien tes projets. Peut-être que j'aurai prochainement l'occasion de te rendre visite à Cambridge !

Je remercie Yves Chrétien pour toutes les fois où vous m'avez consacré du temps malgré votre emploi du temps chargé, à m'expliquer avec pédagogie, m'aider à mieux maitriser les outils informatiques, les logiciels. Merci pour votre patience ! Vous avez réussi à me transmettre le virus du Macintosh !

J'aimerais remercier également le Pr. Olivier Rosmorduc pour vos remarques et encouragements.

A la Pr. Joëlle Sobczak-Thépot pour votre aide en analyses du cycle cellulaire et de ces beaux graphes. J'espère retenir un peu de vos enseignements sur ce domaine complexe. Merci de nous communiquer votre joie de vivre à chaque fois qu'on se voie.

Je remercie la Dr. Florence Bourguin-Guglielmetti… malgré le peu d'occasions qu'on a eu à se parler, je vous remercie pour votre gentillesse. Bonne chance à vous, à San Francisco !

Bien sûr, à la grande et pétillante Claire ! Reste telle que tu es, toujours bonne humeur, sourire aux lèvres. Merci pour tes délicieux macarons ! Il faut que tu me donnes la recette avant que je parte !!!!

Comme promis, Corina Buta, je tiens à ne pas te remercier de tes délicieux cookies, de tes petites intentions à mon égard, de ta gentillesse, à ton humour qui fait peur, de nos riches échanges d'idées. Je n'aimerais pas me trouver plus tard avec une technicienne comme toi qui aimes ce qu'elle fait, qui cherche à comprendre et à perfectionner les choses. Méchante comme je suis, je te souhaite tout le mal que tu donneras pour ne pas réussir... Bon, il ne faut pas me lire à la lettre mais enlever la négation ok !!!

A ma petite Sylvana Tarouhi (qui est physiquement plus grande que moi), la toute dernière à rejoindre notre équipe depuis bientôt quatre mois maintenant. Continue sur ta lancée ! Je te remercie de ces derniers temps pour ton aide, des fous rires à en avoir mal au ventre. Tes petites « râleries » sont tellement mignonnes qu'on te passera tout. Attention, il ne faut pas non plus trop en abuser. Râler nuit gravement à la santé !

Je remercie le Dr. Javier Vaquero, actuellement postdoc de Laura Fouassier et peut-être son futur porte bonheur ! Grâce à toi, j'ai pu mettre en pratique un peu mon anglais. J'espère que nos prochaines discussions seront plus fluides car j'en suis sûre que tu as pleins de choses à nous faire partager. Je te souhaite beaucoup de succès avec Laura. Prends soin d'elle pour moi!

A la petite Eva Benabou qui était en stage chez nous ces six derniers mois. Merci pour tes petites anecdotes, tu as su mettre de l'ambiance ici durant cette période. Aie confiance en toi! Zen attitude ok! Ne pas baisser les bras et j'en suis sûre que tu vas réussir ! Quand on veut on peut! Toi seule a la clé de ta réussite !

Ohlala, mes remerciements sont trop longs, je devrais peut être penser à m'arrêter là. Mais non Dr. Lynda Aoudjehane, tu y aurais cru hein! C'est juste que je ne sache plus qu'écrire à ton propos. Je t'ai déjà tellement dit... Dans toute cette aventure, j'ai énormément gagné! Et surtout je suis sincèrement très heureuse d'avoir fait ta connaissance. On n'est pas que de simples collègues, voisines d'étage mais bien plus que cela. J'ai gagné une vraie amitié. Je ne pourrai jamais oublier nos discussions animées et interminables, sautant de coq à l'âne mais tellement enrichissantes. J'admire ta dévotion à ton travail, ton courage et ton gros cœur trop lourd à porter pour ta petite taille. Je te remercie pour tout, de nos petits et grands moments de partage. Tu resteras la première Lynda et l'unique Lynda exceptionnelle que j'ai la chance de connaître. J'arrête de t'envoyer des fleurs de peur que tes pieds enflent de trop ! Je te souhaite tout de même toutes les merveilles du monde. Dommage, je ne pourrai plus t'embêter le soir maintenant ^^.

A Grégoire Bische, l'insondable mysterious man ! Sous ton air de grand timide, se cache un mec drôle qui m'a surpris plus d'une fois. Je te remercie pour ton écoute, ta gentillesse, ton calme qui est plus qu'appréciable. Il est toujours très agréable de discuter avec toi, de films, de séries, de tout et de rien. Prends soin de Lynda pour moi en mon absence ! Vous pouvez accomplir de belles choses ensemble, je vous le souhaite ! Et arrête de faire tes petites cachotteries... et non, ce n'est pas moi pour la serrure !

Au Dr. Clément Barjon qui a suggéré de ne pas le remercier. C'est raté ! Corina Buta a une longueur d'avance sur toi ! Néanmoins, je tacherai d'être concise ! C'est ce qu'il y a de meilleur, n'est-ce pas ? J'ai bien aimé tes arbitrages en ma faveur dans mes débats avec Lynda ! Merci d'écouter mes monologues et mes plainteries, histoire de râler un bon petit coup à la franchouillard ! Tu n'es pas si mauvais pour les encouragements, je dois l'admettre ! Ce qui est bien aussi, c'est que tu n'auras plus la petite souris qui vient le soir grignoter tes petits gâteaux. Bon, trêve de balivernes ! Toi aussi, tu vas réussir à fond, ne te déprime pas, l'avenir réserve souvent de bonnes surprises !

A toute l'équipe de la Pr. Chantal Housset qui m'ont très bien accueilli et aidé pour tout problème technique. Merci à la Dr. Delphine Firrincieli pour nous avoir si bien nourri pendant si longtemps ! de m'avoir dépannée du feu, des cigarettes, des réactifs... Bonne chance à toi dans ta nouvelle fonction à l'ARC ! à toi Khaldoun Ghazal, futur Docteur, pour ta sympathie, dommage qu'on passe la thèse en même temps ! A la Dr. Axelle Cadoret pour vos commandes d'eau pour nous panser nos soifs et bien sûr de vos encouragements ! Au Dr. Nicolas Chignard pour vos

remarques pertinentes et j'espère qu'on aura plus d'occasion d'échanger nos idées. Merci à Colette Rey pour ces expériences sur les souris que je ne risque pas d'oublier ; à la Dr. Sara Lemoinne, à qui je rends service avec plaisir, tu n'as pas besoin de me gâter de friandises à chaque fois après mais je ne dirais pas non à une dernière fois^^ ; à la Dr. Véronique Barbu pour votre sympathie.
Merci au groupe de la Dr. Michèle Maurice ; à Jean-Louis Delaunay pour ta bonne humeur et tous tes conseils techniques ; à la Dr. Tounsia Ait Slimane ; au Dr. Thomas Falguières, vous rendez le repas de midi très agréable avec bien de rires et de débats animés ! A ta sympathie et ta bonne humeur à chaque fois qu'on se voit, Anne-Marie Schneider ; à Danièle Delautier pour vos rappels de règles de sécurité !

Je remercie mes copines doctorantes qui accéderont au grade de Docteur bientôt.
A Carine Beaupère, je te souhaite beaucoup de succès ! Merci pour tous ces déconnades, ces folies, ces soirées, ton humour, ta vivacité et ton enthousiasme ! On y arrive comme tu dis toujours. Il n'y a pas de raison, il faut être des fonceurs ! Je n'ai pas connu de fonceur aussi sympathique que toi ! Reste la même, je t'adore ! Peut-être organiserons-nous autre chose plus tard que ces journées de l'école doctorale, qu'en pense-tu ? On n'est pas si mauvaise hein ! Meilleure somme réunie de tous les temps, même en temps de crise... Ce sera géniale si on trouve une post-doc dans la même ville, je croise les doigts !
A Quitterie de Vuipillières, merci pour nos midis de piscine, on devrait peut être nous y remettre ! Attention à toi à ne pas trop t'exposer quand même... Reste toujours aussi pétillante que tu es. J'espère que tu auras ta bourse de 4ème année pour mener à bien ton projet ! Tu le mérites ! Peut-être rendez-vous à Singapour, on ne sait jamais ! Un repas bientôt entre nous, avec Vu Lan Trang et Claudia Umana ? Toujours très plaisants ces repas !

A toutes les personnes du 7ème étage avec qui nous partageons les appareils. Merci pour tes cigarettes Marie Garcia, toi qui n'en veux pas les miennes... Aux post-doc Dr. Nolwenn Brian et Dr. Anne-Claire Guenantin pour vos folies, je vous souhaite bon courage et bonne réussite ! Aux Dr. Claire Lagathu-Lafon et Dr. Véronique Béréziat pour ces moments riches d'échanges ! A la Dr. Camille Vatier pour les primeurs ! A Betty Jacquin pour votre efficacité et votre gentillesse !

Je ne peux oublier le 6ème étage avec Anne-Marie Faussat pour m'avoir montré la cytométrie en flux et Romain Morichon pour le microscope confocal.

Merci à tous les stagiaires de passage chez nous. Une spéciale pensée à toi, Mouskeba Konta, ma première stagiaire, adorable et avec qui j'ai appris ce qu'est réellement « encadrer ». A Alexandra Frazao, Thomas Braescu, Hélène Regnault, Alkaky Gassama, Vanessa Cohignac et Anne-So et bien d'autres encore... qui ont permis de nous rajeunir et mis de l'ambiance !

Merci à vous, Dr. Claude Simon qui m'a guidé au Claf. Vous m'avez beaucoup appris et soutenu dans ces moments difficiles que sont les recherches d'emploi. Merci pour vos conseils, vos astuces ! Et je suis très contente que vous veniez à ma soutenance !

A Véronique Réfalo et Christophe Jourdain de m'avoir fait confiance, de m'avoir confier vos adorables filles. Je vous suis éternellement reconnaissante pour ce que vous avez fait pour moi.

A tous mes copains, à Valentine pour ces moments de folies, la râleuse de service ! Ah non, peut-être, il n'y a pas que toi comme râleuses, il y a aussi Vanessa, Marine, Leïla sauf Flore! Je dois vous citer tous là ? Oh non, j'en ai marre là... Bon ok, merci à vous, le Manu fou, Jérémy, Sébastien, Vincent, Etienne, Julien, Benjamin, Samy, Saad, Karim... il y a d'autres que j'oublie certainement. Merci à tous pour vos soutiens, vos encouragements et votre bon-vivant !

J'aimerais remercie les amis de la famille, Pauline et André, Bernard, Louis, Michel Hoang et Michel Lebrun de m'avoir accueilli, encouragé, soutenu depuis mon arrivée en France.

Je vous remercie sincèrement, du fond du cœur, pour cette expérience incroyable que je n'aurai pas la chance de revivre une seconde fois !
Merci, merci, et mille merci !!!!!!

RESUME

Le stress oxydatif exerce des effets cellulaires qui peuvent conduire à la sénescence, à l'apoptose et à la mutagenèse. Les cellules cancéreuses peuvent développer un avantage prolifératif sur les cellules normales dans un environnement de stress oxydatif, qui de ce fait, participe à la progression tumorale. Nous émettons l'hypothèse que MAPKAPK2 (Mitogen-Activated Protein Kinase-Proteine Kinase), une cible directe de la p38 MAPK, pourrait conférer aux cellules de cancer du foie une résistance au stress oxydatif. En effet, MK2 est exprimée dans le foie, et les souris invalidées pour MK2 présentent une diminution significative de contenu anti-oxydant dans le foie. Dans quatre lignées cellulaires de carcinome hépatocellulaire et de cholangiocarcinome, l'inhibition pharmacologique de MK2, MK2i, augmente la mort cellulaire induite par le stress oxydatif par une diminution de l'activité de Hsp27 et une augmentation du niveau du suppresseur de tumeur p53. MK2 favorise la survie cellulaire *via* l'activation de la réponse anti-oxydante Nrf2 et de la voie d'EGFR. L'expression de l'agoniste d'EGFR, HB-EGF, est augmentée en réponse au stress oxydatif. À son tour, HB-EGF induit la phosphorylation de Hsp27 qui est inhibée par MK2i dans les cellules tumorales hépatobiliaires, ce qui indique que l'axe HB-EGF/EGFR est un activateur de la voie MK2. MK2 est également responsable de l'augmentation de l'expression de l'Il-8 induite par le stress oxydatif. Cette augmentation semble dépendre de Hsp27. De plus, nous avons identifié la protéine d'échafaudage EBP50 comme une nouvelle protéine de liaison de MK2. Dans les cellules cancéreuses hépatobiliaires, EBP50 contribue à la régulation de la voie MK2/Hsp27. La déplétion d'EBP50 par ARN interférents provoque une diminution de la phosphorylation de Hsp27, de la survie cellulaire ainsi qu'une baisse des taux d'ARNm de HB-EGF et d'IL-8. Dans les échantillons de tissus humains, l'expression de MK2, de Hsp27 et d'EBP50 est augmentée dans le carcinome hépatocellulaire par rapport au tissu hépatique non tumoral. En résumé, ces données fournissent la preuve d'un rôle prépondérant de l'axe MK2/EBP50/Hsp27 dans la progression du cancer du foie en conférant aux cellules tumorales hépatobiliaires une résistance au stress oxydatif.

ABSTRACT

Oxidative stress exerts cellular effects that can lead to senescence, apoptosis and mutagenesis. Cancer cells can develop a proliferative advantage over normal cells in an environment of oxidative stress, which thereby, participates in tumor progression. We hypothesized that MAPKAPK2 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2), a direct target of p38 MAPK, could mediate the resistance of liver cancer cells to oxidative stress. Indeed, MK2 is expressed in the liver, and MK2 KO mice display a dramatic depletion of liver anti-oxidant content. In four hepatocellular and biliary cancer cell lines, pharmacological inhibition of MK2 by MK2i enhanced oxidative stress-induced cell death through a decrease in Akt and Hsp27 activity and an increase in tumor suppressor p53 level. MK2 promoted cell survival via activation of the anti-oxidant Nrf2 response and the EGFR pathway. The expression of the EGFR agonist, Hb-EGF, increased in response to oxidative stress. In turn, Hb-EGF induced Hsp27 phosphorylation that was down-regulated by MK2i in liver cancer cells, indicating that EGFR activation by Hb-EGF is a potent activator of MK2. MK2 also increased oxidative stress-induced IL-8 production that depends on Hsp27. Furthermore, we found that MK2 was a binding partner of the scaffolding protein EBP50. In liver cancer cells, EBP50 contributed to up-regulate the MK2/Akt/Hsp27 pathway. Silencing of EBP50 by siRNA in these cells caused a decrease in the phosphorylation of Akt/Hsp27 and in the mRNA levels of Hb-EGF and IL-8. In human tissue samples, MK2, Hsp27 and EBP50 expressions were found to be increased in hepatocellular carcinoma compared with the matched non-tumor liver tissue. Overall, these data provide evidence for a preponderant role of MK2/EBP50/Akt/Hsp27 axis in liver cancer progression by mediating oxidative stress resistance in liver tumor cells.

SOMMAIRE

Abréviations 1

Introduction 5

Chapitre I : Rôle du stress oxydatif dans le foie 9

1-Généralité sur le stress oxydatif 10

1-1-Définition des espèces réactives de l'oxygène 10

1-2-Sources des espèces réactives de l'oxygène 12

1-3-Détoxification cellulaire des espèces réactives de l'oxygène 15

2- le stress oxydatif dans les cancers du foie 17

2-1-Effets mutagènes des espèces réactives de l'oxygène 18

2-2-Effets épigénétiques des espèces réactives de l'oxygène 19

Chapitre II : Implication de MK2 dans la réponse au stress oxydatif 24

1-Généralité sur MK2 25

1-1-Découverte de la kinase MK2 25

1-2-Expression génique et protéique de MK2 au niveau tissulaire 25

1-3-Structure et localisation subcellulaire de MK2 26

1-4-Mécanismes d'activation et d'inhibition de MK2 28

2-Substrats et fonctions biologiques de MK2 30

2-1-Rôle de MK2 dans l'organisation du cytosquelette et dans la migration cellulaire 31

2-2-Rôle de MK2 dans la production de médiateurs inflammatoires 33

2-3-Rôle de MK2 dans la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire et de la survie cellulaire 38

3-Rôle de MK2 dans la mitose et la croissance cellulaire 47

Chapitre III : Régulation de la protéine de stress Hsp27 par MK2 52

1-Implication de MK2/Hsp27 dans la dynamique du cytosquelette d'actine 53

2- Implication de MK2/Hsp27 dans la survie cellulaire 54

3- Implication de MK2/Hsp27 dans l'expression des médiateurs inflammatoires 58

3-1-Régulation transcriptionnelle des médiateurs inflammatoires par Hsp27 58

3-2-Régulation post-transcriptionnelle des médiateurs inflammatoires par Hsp27 60

Chapitre IV : Rôle de MK2 dans la physiopathologie 62

1-Rôle de MK2 dans les maladies inflammatoires 62

2-Rôle de MK2 dans le cancer 63

Problématique 66

Résultats 67
Discussion 105
Conclusion générale et perspectives 112
Bibliographie 114

ABREVIATIONS

- AATF..... Apoptose Antagonizing Transcription Factor
- ADN ..... Acide Désoxyribonucléique
- ADP ..... Adenosine Diphosphate
- ARE ..... Adenylate-Uridylate-Riche Element
- ARE-BP..... ARE-Binding Protein
- ARNm ..... Acide Ribonucléique messager
- Arp ..... Actin-related protein
- ARPC5..... Actin-Related Protein 2/3 Complexe subunit 5
- ATF..... Activating Transcription Factor
- ATM..... Ataxia-Telangiectasia Mutated
- ATP ..... Adenosine Triphosphate
- ATR..... Ataxia-Telangiectasia and RAD3-related
- AUF ..... ARE-poly(U)-binding degradation Factor
- BAK..... Bcl-2 homologous Antagonist Killer
- BAX ..... Bcl-2-Associated X Protein
- BRF ..... Butyrate Response Factor
- CAF..... CCR4-Associated Factor
- CAMK ..... Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase
- CapZ ..... Capping protein Z
- CapZIP ..... CapZ-Interacting Protein
- CCA ..... Cholangiocarcinome
- CDK ..... Cyclin-Dependent Kinase
- CHC..... Carcinome hépatocellulaire
- D..... Docking
- DDR ..... DNA Dommage Response
- DMBA/TPA ..... 7,12-dimethylbenz[a]anthracène/ 12-O-tetradecanoylphorbol-13- acétate
- EBP50..... Ezrin-radixin-moesin Binding Protein 50
- EGF ..... Epidermal Growth Factor
- EGFR ..... Epidermal Growth Factor Receptor
- eIF4G..... eukaryotic translation Initiation Factor 4 Gamma

- ERK ..... Extracellular signal-Regulated Kinase
- fMLP ..... formyl-Met-Leu-Phe
- FRET ..... Fluorescence Resonance Energy Transfert
- GADD ..... Growth Arrest and DNA Damage
- GPx ..... Glutathion peroxydase
- Grx ..... Glutarédoxine
- GSH ..... Glutathion
- GSSG ..... Glutathion oxydé
- GST ..... Glutathion-S-Transférase
- HB-EGF ..... Heparin Binding-EGF-like growth factor
- HDM ..... Human Double Minute
- HEK ..... Human Embryonic Kidney
- hnRNP ..... heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein
- HO ..... Heme Oxygenase
- HSE ..... Heat Shock Element
- HSF ..... Heat Shock Factor
- Hsp ..... Heat shock protein
- HuR ..... Human Antigen R
- HUVEC ..... Human Umbilical Vein Endothelial Cell
- Keap ..... Kelch-like ECH-associated protein
- IEG ..... Immediate Early Gene
- IKK ..... IκB Kinase
- IL ..... Interleukine
- JAK/STAT ..... Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription
- JNK ..... c-Jun N-terminal Kinase
- LIMK ..... LIM Kinase
- LPS ..... Lipopolysaccharide
- LSP ..... Leukocyte-Specific Protein
- MAPK ..... Mitogen-Activated Protein Kinase
- MAPKAPK ..... MAPK-Activated Protein Kinase
- MIP ..... Macrophage Inflammatory Protein
- Mpb ..... Méga-paires de bases

- MDM ..... Mouse Double Minute
- MEF ..... Mouse Embryonic Fibroblasts
- MRLC3 ..... Myosin-Regulatory Light Chain-3
- mTOR ..... mammalian Target of Rapamycin
- NASH ..... Non-alcoholic Steatohepatitis
- NES ..... Nuclear Export Signal
- NF-kB ..... Nuclear Factor-kappa B
- NGF ..... Nerve Growth Factor
- NLS ..... Nuclear Localization Sequence
- NOX ..... NADPH Oxydase
- Nrf2 ..... Nuclear Factor Erythroid-derived-2-Like 2
- NGF ..... Nerve Growth Factor
- NLS ..... Nuclear Localization Sequence
- PABP ..... Poly(A)-Binding Protein
- PAK ..... p21-Activated Kinase
- PARN ..... Poly-A Ribonuclease
- PDZ PSD-95/DlgA/ZO-1-like
- PFKFB 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase
- PI-3K Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
- PK ..... Protein Kinase
- Plk ..... Polo-like kinase
- PP2A ..... Protein Phosphatase 2A
- Prx ..... Peroxyrédoxine
- PTP ..... Phosphotyrosine Phosphatase
- PUMA ..... p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
- SH3 ..... Src Homology 3
- SRF ..... Serum Response Factor
- SOD ..... Superoxyde Dismutase
- SUMO ..... Small Ubiquitin-like Modifier
- TAK ..... TGF β-Activated Kinase
- TERT ..... Telomerase Reverse Transcriptase
- TGF ..... Transforming Growth Factor

- TNF ..... Tumor Necrosis Factor
- TrCP ..... Transducin repeat-Containing Protein
- TSC ..... Tuberous Sclerosis Complex
- TTP ..... Tristetraprolin
- UTR ..... Untranslated Region
- VEGF ..... Vascular Endothelial Growth Factor
- Wnt..... Wingless Integration site

INTRODUCTION

L'Organisation mondiale de la Santé estime qu'en 2012, le cancer primitif du foie représentait près de 800 000 décès dans le monde. Il est le 6ème type de cancer le plus fréquent et la 2ème cause de décès par cancer dans le monde (World Cancer Report 2014). Le cancer primitif du foie est constitué de plusieurs tumeurs malignes histologiquement différentes. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) et le cholangiocarcinome (CCA) sont les deux types majoritaires de cancer primitif du foie. La carcinogénèse hépatobiliaire est un processus complexe et multifactoriel. L'extrême hétérogénéité génétique entre les patients et l'évolution génétique même de la tumeur rend difficile la mise au point des thérapies ciblées efficaces.

Des recherches de signatures moléculaires tendent à classifier les tumeurs afin de proposer des traitements adaptés. Les travaux de Zucman-Rossi ont permis d'établir sept principales voies de signalisation qui sont dérégulées dans le carcinome hépatocellulaire. Les mutations somatiques dans le promoteur du gène de la sous-unité « transcriptase réverse » (*TERT*) de la télomérase sont les plus fréquentes. La dérégulation de la voie Wnt/β-caténine se situe en 2nde position, vient en 3ème position les mutations dans les gènes des régulateurs du cycle cellulaire tels que p53 et ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated). Les régulateurs épigénétiques qui participent à la dynamique de la chromatine constituent également l'une des voies des plus fréquemment dérégulées. La dérégulation des voies Akt/mTOR (mammalian Target of Rapamycin), des voies Ras/Raf, de la voie de réponse au stress oxydatif Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid-derived-2-Like 2)/Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) et de la voie JAK/STAT (Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) est plus mineure *(Nault et al. 2014)*. De manière similaire au carcinome hépatocellulaire, la dérégulation des voies de la Wnt/β-caténine, de p53, d'EGFR et ses cibles en aval telles que B-Raf/K-Ras et PI-3K (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase)/PTEN/Akt, JAK/STAT ainsi que des modulateurs épigénétiques a été rapportée dans le cholangiocarcinome. Tandis que les mutations du promoteur de *TERT* n'y ont pas été décrites *(Andersen et al. 2012, Sia et al. 2013)*. Ces études ont mis en évidence différentes classes de signatures impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire et la prolifération, dans la différenciation, la migration et la survie cellulaire ainsi que dans la réponse inflammatoire et angiogénique *(Shen et al. 2013)*. Cependant, la valeur pronostique de ces classifications reste à valider.

Le carcinome hépatocellulaire se développe aux dépens des hépatocytes qui composent majoritairement le foie (80% des cellules du foie). Il est de loin le cancer primitif du foie le plus commun car il représente 70-80% des cas. L'incidence du carcinome hépatocellulaire est très hétérogène selon les régions géographiques. La majorité de carcinomes hépatocellulaires surviennent dans les pays en développement, en Asie et en Afrique. Cette répartition suit celle des hépatites virales B et C, qui constituent la principale cause de carcinome hépatocellulaire, avec un taux plus élevé de carcinome hépatocellulaire dans ces régions où ces infections sont endémiques (http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/et http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/hepatitis/data-and-statistics/hepatitis-c). Le carcinome hépatocellulaire touche préférentiellement les hommes dont la plus forte prévalence serait liée aux facteurs de risque (les hépatites, l'alcool...) (World Cancer Report 2014). L'incidence du carcinome hépatocellulaire dans les pays d'Asie telle que la Chine et la Corée connaît une diminution grâce à la mise en place de mesures de santé publique avec une vaccination massive contre l'hépatite B et une prévention contre l'Aflatoxine *(Kao et al. 2005, Chang et al. 2009)*. A l'opposé, l'incidence tend à augmenter dans les pays développés (Europe, Amérique du Nord, Australie et Japon). Cette augmentation est attribuable à une hausse de prévalence de l'infection par le virus de l'hépatite C *(Yoshizawa 2002, Maillard 2011)*. Outre les infections hépatiques, les facteurs de risque tels que l'obésité, le diabète et la stéatose hépatique non alcoolique (NASH) et l'ingestion chronique de l'alcool contribuent au développement du carcinome hépatocellulaire *(Severi et al. 2010)*.

Le cholangiocarcinome résulte d'une prolifération anormale des cellules biliaires intra- et extra-hépatiques qui arborent les canaux biliaires. Il est le deuxième cancer primitif du foie derrière le carcinome hépatocellulaire. L'incidence du cholangiocarcinome est deux fois plus élevée en Asie du Sud-Est et aux Etats-Unis que dans le reste du monde. Comme pour le carcinome hépatocellulaire, le développement du cholangiocarcinome suit la répartition géographique des hépatites B et C *(Palmer et al. 2012)*. Les origines du développement du cholangiocarcinome sont très variées. La rectocolite hémorragique et la cholangite sclérosante primitive représentent les facteurs de risque essentiels en Occident. Les patients atteints de rectocolite hémorragique ont un risque relatif de cholangiocarcinome estimé à 31 fois plus élevé par rapport à la population générale. Environ 10 à 15 % des patients ayant une cholangite sclérosante primitive développeront un cholangiocarcinome. D'autres facteurs de risque ont été décrits comme la lithiase biliaire intra-hépatique, les malformations biliaires congénitales (la maladie de Caroli ou le kyste du cholédoque) et les infections parasitaires du foie (*Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*). La lithiase hépatique et les infections parasitaires biliaires sont principalement retrouvées en Asie.

Comme pour le carcinome hépatocellulaire, le développement de cholangiocarcinome a également été associé à d'autres facteurs de risque comme l'alcool, la stéatose hépatique, le diabète et l'obésité *(Rizvi et al. 2013, Razumilava et al. 2014)*.

Bien que l'incidence du cancer du foie dans les zones endémiques pour les infections virales ait commencé à diminuer, son augmentation dans les pays développés est un important problème de santé public. Le cancer primitif du foie est passé de la 3ème cause de mortalité liée au cancer à la 2ème cause entre 2008 et 2012. L'augmentation de la prévalence de l'obésité, du diabète et de la stéatose hépatique dans le monde laisse prédire une hausse de l'incidence du cancer primitif du foie pour les années à venir *(Baffy et al. 2012, Michelotti et al. 2013)*. A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement thérapeutique efficace contre le cancer primitif du foie en dehors de la résection chirurgicale et la transplantation hépatique. Un très faible nombre de patients peuvent prétendre à ces solutions qui sont basées sur des critères de sélection stricts sans compter les risques élevés de récurrence, même après la transplantation. Pour les stades très avancés du carcinome hépatocellulaire et du cholangiocarcinome, des soins palliatifs permettent un prolongement de la survie des patients de quelques mois *(Bruix et al. 2014, Razumilava et al. 2014)*.

Le carcinome hépatocellulaire et le cholangiocarcinome ne se développent pas à partir des mêmes types cellulaires. Cependant, ces deux cancers résultent principalement des maladies hépatobiliaires dans lesquelles l'inflammation joue un rôle majeur dans le développement des cancers du foie.

L'inflammation est initiée par les cellules inflammatoires résidentes ou infiltrantes qui sont activées par des molécules d'alerte ou des interleukines telles que l'IL-8 sécrétée par les cellules de parenchyme lésées. La réponse inflammatoire permet d'éliminer les débris des cellules mortes et la régénération tissulaire. Elle permet ainsi de maintenir l'intégrité tissulaire et fonctionnelle du foie. Une dérégulation de cette réponse par des facteurs internes tels que les acides biliaires ou externes comme les microorganismes pathogènes entraine peu à peu la formation d'un tissu cicatriciel appelée « fibrose ». La fibrose peut évoluer à long-terme vers une restructuration hépatique en nodules cirrhotiques. La cirrhose est le stade ultime dans lequel les fonctions du foie sont altérées provoquant une insuffisance hépatique *(Jiao et al. 2009)*. Ce processus est présente dans toutes les étiologies, qu'elles soient virale, alcoolique, stéatosique ou cholestatique.

En effet, la rétention de ces acides biliaires au cours de la cholestase augmente la perméabilité des mitochondries aux protons provoquant la génération d'espèces réactives de l'oxygène *(Rolo et al. 2000, Sokol et al. 2005)*. Ce phénomène constitue un événement précoce à l'altération du parenchyme *via* l'induction de l'apoptose et de la nécrose des cellules *(Lemasters et al. 1998)*. La

libération des acides biliaires hydrophobes comme les acides désoxycholiques résultante de la mort des cellules du parenchyme entraine l'activation des cellules de Kupffer, des macrophages résidentiels du foie. Par ailleurs, les acides biliaires agissent comme des seconds messagers, activent des voies de signalisation et induisent une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines activent et recrutent des neutrophiles au siège de la lésion hépatique *(Lazaridis et al. 2004, Allen et al. 2011)*. Les cellules inflammatoires activées produisent des espèces réactives de l'oxygène qui oxydent les membranes lipidiques des cellules du parenchyme et contribuent ainsi aux dommages hépatiques *(Ljubuncic et al. 1996)*.

De manière similaire à la rétention des acides biliaires, l'accumulation des acides gras saturés dans les hépatocytes induit l'apoptose de ceux-ci. Les acides gras saturés peuvent activer la protéine pro-apoptotique Bax, provoquent une perméabilisation mitochondriale et l'activation de la cascade des caspases *(Epand et al. 2004, Malhi et al. 2006)*. Les espèces réactives de l'oxygène libérées lors des dysfonctionnements des mitochondries, des peroxysomes et des microsomes font le lien entre la stéatose hépatique et l'inflammation. L'inflammation agit comme un second « hit » et amplifie la génération d'espèces réactives de l'oxygène qui maintiennent en retour l'inflammation *(Takaki et al. 2013)*.

Dans les infections virales comme l'hépatite C, les particules virales NS3, NS4, NS5 activent les cellules de Kupffer qui produisent alors davantage de cytokines pro-inflammatoires *(Hosomura et al. 2011)*. L'hyperproduction de ces cytokines entretient la réponse inflammatoire qui altère le tissu hépatique *via* la production d'espèces réactives de l'oxygène. De plus, certaines particules virales telle que la protéine core du virus de l'hépatite C augmente la teneur intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène conduisant aux altérations hépatocytaires *(Okuda et al. 2002)*.

Ainsi, la relation entre l'inflammation et les espèces réactives de l'oxygène dans le foie est étroitement liée. L'inflammation *via* les cellules inflammatoires est responsable de la production et de la libération des espèces réactives de l'oxygène qui induisent des dommages cellulaires. Par ailleurs, des activités métaboliques excessives dans les cellules hépatobiliaires génèrent également des espèces réactives de l'oxygène qui sont capables de stimuler les cellules inflammatoires. L'accumulation de ces évènements conduit à des modifications tissulaires irréversibles qui peuvent être impliquées dans la carcinogenèse hépatique.

CHAPITRE I :
ROLE DU STRESS OXYDATIF DANS LE FOIE

Le foie est l'organe interne le plus imposant et le premier régulateur du métabolisme systémique. Il assure le métabolisme des glucides et le stockage du glycogène et de diverses substances telles que des vitamines liposolubles (A, D, K, E) et des métaux (le fer et le cuivre). Il est le principal acteur du métabolisme des lipides. Avec les hépatocytes, le foie élabore les acides biliaires composant la bile. Outre le métabolisme des glucides et des lipides, le foie est un organe de détoxification. Il permet le métabolisme des xénobiotiques (médicaments, alcool, polluants chimiques...) et constitue une première barrière contre les micro-organismes. Le foie possède un arsenal impressionnant d'enzymes de détoxification tels que les cytochromes P450, les glutathion-S-transférases et des transporteurs responsables de l'élimination des substances étrangères hors de la cellule. Quant à la surveillance immunitaire, elle est assurée par les cellules de Kupffer qui sont les macrophages résidentiels du foie. Ces cellules ont pour rôle de phagocyter les antigènes qui arrivent de l'intestin et d'empêcher qu'ils ne gagnent la circulation générale *via* la vascularisation hépatique.

Les activités de métabolisme et de détoxification du foie sont sources d'espèces réactives de l'oxygène. Ces derniers oxydent les composantes cellulaires et peuvent affecter le bon fonctionnement cellulaire. En physiologie normale, les espèces réactives de l'oxygène sont éliminées par les différents systèmes antioxydants cellulaires garants d'un milieu réducteur. Cependant, l'équilibre entre les espèces oxydantes et les antioxydants peut être rompu dans les cellules hépatobiliaires par un excès de xénobiotiques et par une sur-activation/chronicité de la réponse inflammatoire. L'accumulation des espèces réactives de l'oxygène conduit au stress oxydatif qui cause des mutations génétiques, des modifications épigénétiques, l'expression d'oncogènes et/ou l'inhibition de suppresseurs de tumeur. Les espèces réactives de l'oxygène semblent ainsi jouer un rôle crucial dans la pathogenèse et la progression des cancers primitifs du foie indépendamment de l'étiologie. Les modifications génétiques observées au cours de l'évolution des tumeurs du foie peuvent être liées aux effets mutagènes des espèces réactives de l'oxygène et à leur augmentation dans les cellules cancéreuses *(Wang et al. 2002, Severi et al. 2010, Stauffer et al. 2012).*

1-GENERALITE SUR LE STRESS OXYDATIF

Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre de la balance oxydants/antioxydants en faveur des espèces réactives de l'oxygène dans la cellule. Cette dernière peut tolérer jusqu'à une certaine teneur en espèces réactives de l'oxygène grâce à ses systèmes de défense anti-oxydante et de réparation qui reconnaissent et éliminent les molécules endommagées par oxydation. La perturbation de l'équilibre oxydant/antioxydant peut être provoquée soit par un déficit d'antioxydants au niveau de leur production et/ou de leur distribution soit par une surabondance des espèces réactives de l'oxygène. Les espèces réactives de l'oxygène, de par leur nature réactive, peuvent oxyder tous les composants cellulaires induisant ainsi des effets délétères. Paradoxalement, les espèces réactives de l'oxygène agissent comme des seconds messagers qui activent des voies de signalisation cellulaire et modulent l'expression des gènes, le métabolisme, le cycle et la mort cellulaire *(Valko et al. 2006)*.

1-1-Définition des espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène atmosphérique (O_2) est une molécule inerte à moins qu'elle absorbe l'énergie suffisante pour être convertie en espèces chimiques plus actives. Les espèces réactives de l'oxygène sont des métabolites partiellement réduits des molécules d'oxygène *via* des réactions d'oxydoréduction catalysées par des enzymes.

Les espèces réactives de l'oxygène incluent les radicaux libres et les réactifs non radicalaires. Les radicaux libres sont définis par la présence d'un ou plusieurs électrons de valence non appariés, ce qui les rend extrêmement réactifs, instables avec une durée de vie très courte. La tendance naturelle de ces électrons libres est d'interagir de manière non spécifique avec les électrons des atomes avoisinants afin d'établir une liaison covalente stable. Les molécules non réactives ayant perdu un électron peuvent devenir réactives à leur tour ; s'enclenche alors une réaction en chaine jusqu'à la formation de molécules non réactives. Les radicaux libres peuvent interagir entre eux et former des dérivés oxygénés non radicalaires moins réactifs et plus stables.

Les espèces réactives de l'oxygène sont produites par la perte d'un électron qui correspond à une réaction d'oxydation ou par le gain d'un électron *via* une réaction de réduction. Ainsi, la réduction de O_2 catalysée par une oxydase en y ajoutant un électron donne naissance à un anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$). La transformation des anions superoxydes est effectuée spontanément par la superoxyde dismutase (SOD) en une espèce intermédiaire « peroxyde ». Cette dernière est convertie

immédiatement par la catalase en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$), puis en eau (H_2O) (Figure 1).

La durée de vie des radicaux hydroxyles est de l'ordre de la nanoseconde. Ces radicaux réagissent et disparaissent sur le lieu même de leur formation. Les autres espèces radicalaires tels que le radical alkyle ($RO^{\bullet}$) et le monoxyde d'azote ($NO^{\bullet}$) peuvent avoir une demi-vie de l'ordre de quelques microsecondes à quelques secondes. Parmi les dérivés oxygénés non radicalaires, H_2O_2 peut rester stable durant des minutes *(Thannickal et al. 2000)*.

En comparaison aux autres espèces réactives de l'oxygène, H_2O_2 est l'une des molécules réactives des plus stables avec les hydroperoxydes organiques RO_2H. Mais à l'inverse des radicaux libres, H_2O_2 réagit peu avec des molécules biologiques. Les résidus cystéine et méthionine des protéines contiennent des groupements thiols qui font partie des quelques cibles de H_2O_2. Les métaux de transition comme le fer ou le cuivre clivent la liaison O—O de H_2O_2 générant des radicaux hydroxyles et des complexes métalliques activés (réaction de Fenton et de Haber-Weiss). Ces espèces sont plus réactives et moins discriminantes que H_2O_2. Elles sont initiatrices des réactions radicalaires et responsables de l'oxydation de nombreuses molécules biologiques *(Imlay 2008)*.

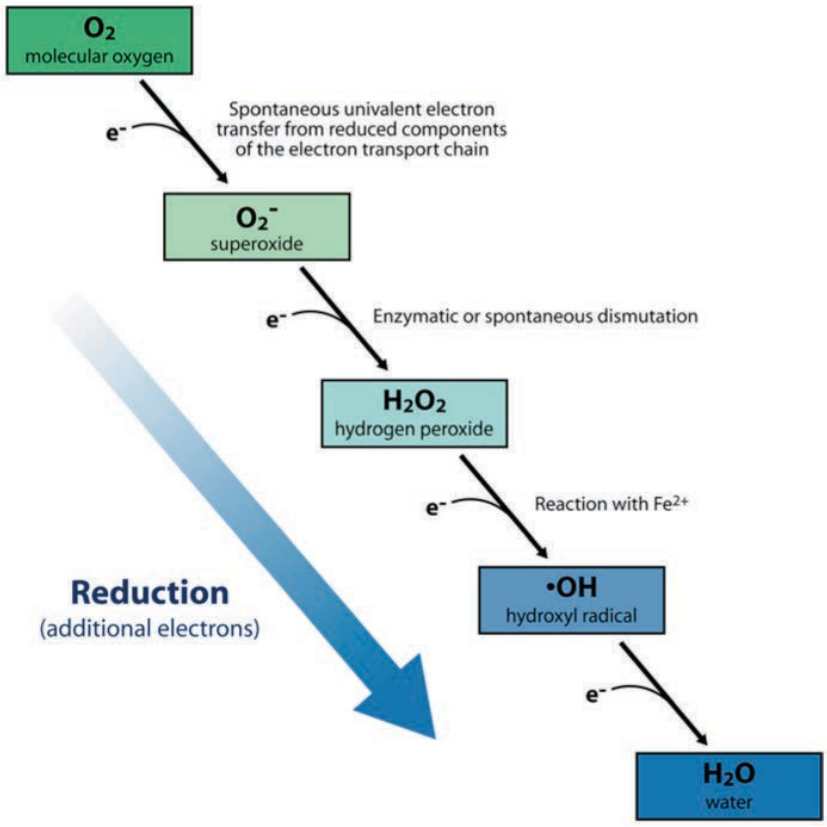


Figure 1 : Formation des espèces réactives de l'oxygène (Kiley et al. 2004).

1-2-Sources des espèces réactives de l'oxygène

Le métabolisme aérobie conduit les cellules eucaryotes à produire en continue des espèces réactives de l'oxygène. Celles-ci proviennent essentiellement des réactions enzymatiques, de la chaine respiratoire mitochondriale et de l'activation des cellules inflammatoires.

La mitochondrie est la centrale énergétique de la cellule, responsable de la production d'énergie sous forme d'ATP indispensable aux fonctions cellulaires. La production d'ATP se fait à partir du catabolisme des nutriments *via* le cycle de Krebs. Ce dernier permet la synthèse du $NADH,H^+$ et du $FADH_2$ qui sont des donneurs d'électrons. Ainsi $NADH,H^+$ et $FADH_2$ cèdent respectivement leurs électrons aux complexes I et II de la chaine respiratoire mitochondriale. Les électrons sont ensuite transférés aux complexes III et IV par le biais des réactions d'oxydoréduction jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène. Ce processus crée un gradient de protons qui permet à l'ATP synthase de convertir l'ADP en ATP. Au cours de la respiration mitochondriale, des électrons peuvent être relâchés des complexes I et III. En réagissant avec l'oxygène, ces électrons libérés sont responsables de la formation des anions superoxydes. La fuite des électrons au niveau mitochondriale constitue ainsi la principale source d'espèces réactives de l'oxygène endogène *(Nohl et al. 2005)* (Figure 2).

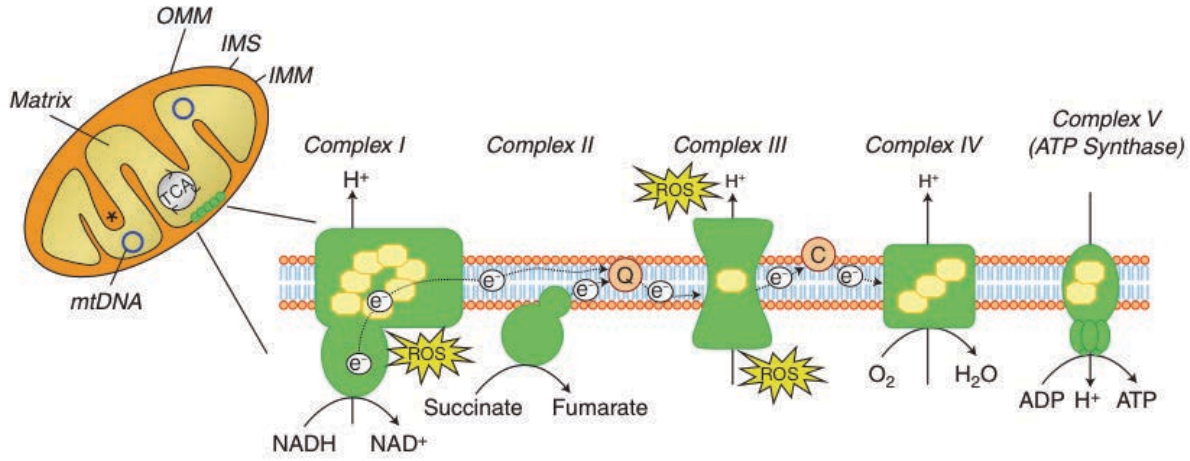


Figure 2 : Production d'espèces réactives de l'oxygène le long de la chaine respiratoire mitochondriale (Perier et al. 2012).

Le $NADH,H^+$ peut être également utilisé par les enzymes NOX (NADPH oxydases). Ces enzymes sont ubiquitaires et catalysent la réduction mono-électronique de l'oxygène à l'aide du $NADPH,H^+$ ou du $NADH,H^+$ qui produit deux anions superoxydes (Figure 3). Les anions

superoxydes sont immédiatement dismutés en H_2O_2 par les SOD. Les NOX forment une famille de sept membres (NOX 1 à 5 et DUOX 1 et 2) dont la structure diffère selon les types cellulaires, phagocytaires ou non phagocytaires.

Le rôle des NOX est très étudié dans les neutrophiles et les macrophages, où ces enzymes sont présentes à la membrane cellulaire, sous forme inactive dans les phagocytes quiescents. L'exposition des phagocytes à des micro-organismes ou à des médiateurs inflammatoires entraîne l'activation des NOX aboutissant à une production massive des anions superoxydes. Des anions superoxydes forment avec le monoxyde d'azote (NO) le peroxynitrite. Le peroxynitrite est à la fois un agent oxydant et nitrant et extrêmement réactif. Ce phénomène appelé « flambée respiratoire » ou « burst oxydatif » joue un rôle primordial dans la défense contre les organismes pathogènes. Après l'intégration de l'agent pathogène par la membrane et la formation du phagosome, des granules phagocytaires contenant des SOD et la myéloperoxydase se fusionnent et contribuent à la formation de l'acide hypochloreux et du radical hydroxyl hautement toxique. Ces dernières molécules permettent l'élimination des pathogènes *(Karlsson et al. 2002, Lambeth 2004)*. Cependant, une partie de H_2O_2 formée par les SOD dans le phagosome diffuse du phagosome dans le compartiment extracellulaire *(Test et al. 1984)*. Cette fuite peut endommager localement les tissus et contribuer à leur inflammation. A l'inverse des isoformes NOX des cellules phagocytaires, les isoformes de NOX dans les cellules non phagocytaires qui possèdent une activité basale, produisent beaucoup moins d'espèces réactives de l'oxygène. Les NOX constituent ainsi la deuxième source endogène d'espèces réactives de l'oxygène après les mitochondries *(Jiang et al. 2011)*.

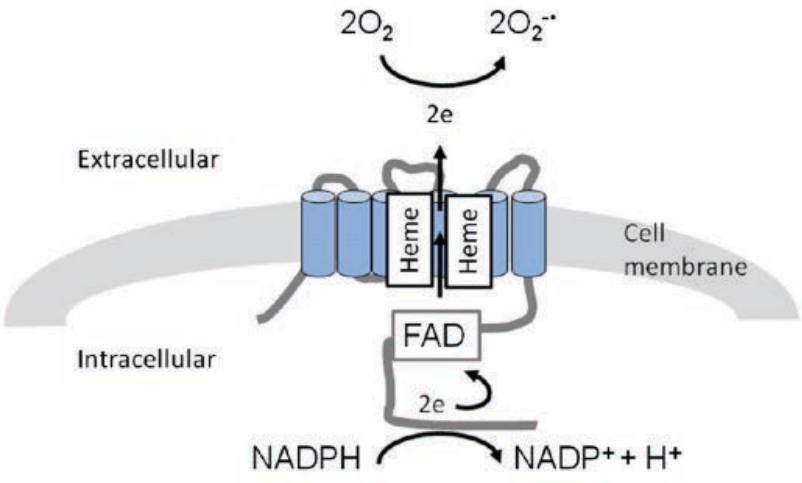


Figure 3 : Réduction de l'oxygène par les NOX (Maghzal et al. 2012).

D'autres sources endogènes d'espèces réactives de l'oxygène sont liées à l'activité normale des enzymes telles que la xanthine oxydase qui intervient dans la dégradation des bases puriques, les enzymes de la voie de l'acide arachidonique (lipoxygénases, cyclo-oxydagénases). Les cytochromes P450 exprimés principalement au niveau du foie et impliqués dans le métabolisme de diverses molécules dont les xénobiotiques, sont aussi des producteurs d'espèces réactives de l'oxygène *(Neve et al. 2000)*.

De par ses diverses fonctions de synthèse et de stockage très énergivores, le foie assure également la détoxification et le métabolisme de nombreuses substances exogènes (alcool, médicaments, toxines, polluants...) et endogènes (acides gras et stéroïdes) *via* les cytochromes P450 *(Feng et al. 2013, Wang et al. 2013)* (Figure 4). Le foie possède ainsi un métabolisme mitochondrial important qui implique des systèmes enzymatiques redox de manière continue. De plus, des acides biliaires hydrophobes (acides désoxycholiques, acides taurocholiques) dont le foie assure la production et l'acheminement sont capables d'induire indirectement la génération d'espèces de l'oxygène en perturbant le fonctionnement des mitochondries. Le dysfonctionnement mitochondrial est due à une diminution de l'activité des complexes I et III de la chaine respiratoire mitochondriale *(Krahenbuhl et al. 1994)* et à une augmentation de la perméabilité mitochondriale aux protons *(Sokol et al. 2005)*. Ainsi la production d'espèces réactives de l'oxygène est plus élevée dans le foie en comparaison à la plupart des autres organes *(Roma et al. 2008)*.

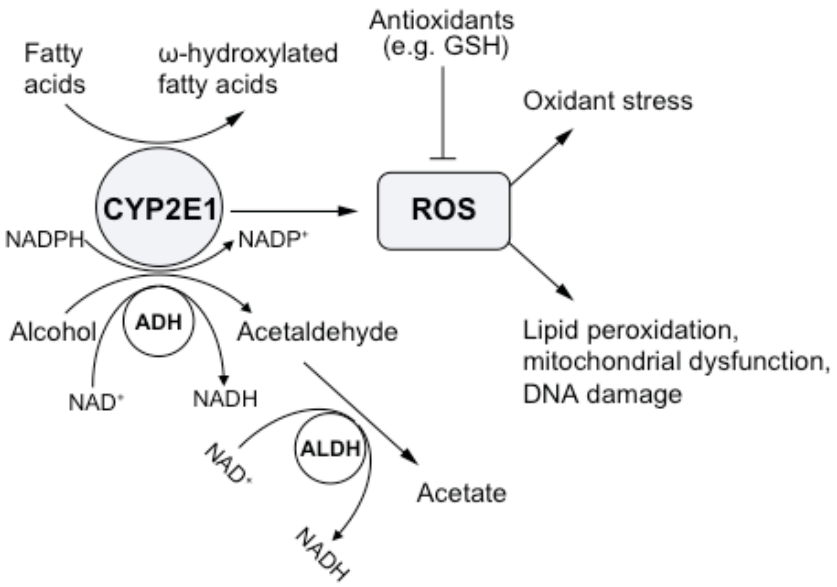


Figure 4 : Dégradation de l'alcool et des acides gras par l'un des membres de la famille des cytochromes P450, CYP2E1 (Leung et al. 2013).

1-3-Détoxification cellulaire des espèces réactives de l'oxygène

En condition physiologique, les espèces réactives de l'oxygène sont rapidement prises en charge par les systèmes antioxydants afin d'éviter des dommages cellulaires et afin de maintenir l'homéostasie redox intracellulaire. La détoxification des espèces réactives de l'oxygène peut s'effectuer à l'aide des molécules non-enzymatiques et des enzymes anti-oxydantes.

Les superoxyde dismutases (SOD) sont des métallo-enzymes qui catalysent la dismutation des $O_2^{\bullet -}$ en H_2O_2 et en O_2. Les SOD se distinguent par le co-facteur métallique qu'elles utilisent, le cuivre (Cu^{2+}), le zinc (Zn^{2+}), le manganèse (Mn^{2+}) ou le fer (Fe^{2+}), et par leur distribution cellulaire ou tissulaire. Les SOD1 (Cu,Zn-SOD) sont localisées dans les compartiments cytosoliques, et sont responsables de 90% de l'activité totale des SOD. Les SOD2 (Mn-SOD) se trouvent au niveau des mitochondries et les SOD3 (Cu,Zn-SOD) sont présentes dans le milieu extracellulaire et dans les espaces interstitiels. Elles forment ainsi la première et la plus importante défense anti-oxydante enzymatique contre les espèces réactives de l'oxygène *(Zelko et al. 2002)*. La décomposition de H_2O_2 en H_2O est ensuite assurée par la catalase, le système peroxyrédoxine/thiorédoxine et le système glutathion.

La catalase est exprimée dans toutes les cellules et est particulièrement concentrée dans le foie. Au niveau subcellulaire, la catalase est localisée principalement dans les peroxysomes *(Litwin et al. 1987)*.

Les peroxyrédoxines sont des thiorédoxine peroxydases qui catalysent la réduction de H_2O_2 mais aussi d'autres hydro-peroxydes organiques et du peroxynitrite. Les peroxyrédoxines constituent une famille de six membres (Prx 1-6). Elles sont présentes dans le cytosol, dans la mitochondrie, dans le réticulum endoplasmique et dans l'espace extracellulaire. La réduction de H_2O_2 par les peroxyrédoxine est majeure puisqu'elles prennent en charge 90% de l'H_2O_2 généré par les mitochondries *(Cox et al. 2010)*. Ceci explique son expression ubiquitaire et son abondance dans les cellules *(Rhee et al. 2001)*. La thiorédoxine comme la peroxyrédoxine est ubiquitaire. Elle permet de réduire les ponts disulfures des protéines et est elle-même oxydée au cours de cette réaction d'oxydo-réduction. La thiorédoxine oxydée est réduite par la thiorédoxine réductase qui utilise le $NADPH,H^+$ comme donneur d'électron *(Nishiyama et al. 2001)*.

Le glutathion (GSH) est un puissant antioxydant. Il protège les cellules du stress oxydatif en interagissant directement avec les espèces réactives de l'oxygène. Le glutathion catalyse la décomposition de H_2O_2 en H_2O et permet la réduction des ponts disulfures des protéines cytoplasmiques et des hydro-peroxydes d'origine lipidique. Le glutathion est également un

chélateur des ions cuivreux ce qui limite les réactions de type Fenton *(Hanna et al. 1992)*. Ces réactions sont possibles à l'aide des enzymes qui utilisent le glutathion comme co-facteur, les glutathion peroxydases (GPx), les glutarédoxines (Grx) et les glutathion-S-transférases (GST). Il existe huit isoformes de GPx (1-8) identifiées chez l'homme, qui se différencient de par leur distribution cellulaire et leur spécificité de substrats. GPx1 est l'isoforme majoritaire, distribuée dans plusieurs compartiments cellulaires, y compris les mitochondries. Dans le foie, GPx1 représente environ un tiers de l'activité totale des GPx *(Chance et al. 1979)*. Les GST sont impliquées dans la détoxification des électrophiles générés lors du métabolisme des composés endogènes et des xénobiotiques par leur conjugaison au GSH. Celles-ci sont divisées en trois familles selon leur localisation cellulaire cytosolique, mitochondriale ou microsomale *(Hayes et al. 2005)*.

Lors du stress oxydatif, les protéines peuvent subir la glutathionylation qui correspond à la formation de ponts disulfures entre le GSH et les protéines. Les glutarédoxines (Grx), famille d'oxydoréductases, permettent de réduire l'hyper-glutathionylation des protéines. Chez l'homme, la famille Grx comprend trois membres : Grx1 présent dans le cytosol et le noyau, Grx2 et Grx5 présents dans les mitochondries. Leur rôle de protection semble essentiel dans plusieurs systèmes tels que l'épithélium des voies aériennes, les systèmes cardiovasculaire et nerveux ou dans le système reproducteur. Durant les réactions catalysées par ces enzymes, le glutathion est oxydé en disulfure de glutathion (GSSG). Les Grx permettent le recyclage de GSSG en GSH en présence du $NADPH,H^+$, ce qui maintient un niveau de GSH élevé dans la cellule *(Lillig et al. 2008)* (Figure 5).

Les molécules anti-oxydantes non-enzymatiques comprennent des molécules de petits poids moléculaires intracellulaires comme la cystéine, la vitamine C (acide ascorbique), et la vitamine E (α-tocophérol). Leur régénération se fait à l'aide de l'oxydation du glutathion par les GPx *(Masella et al. 2005)*.

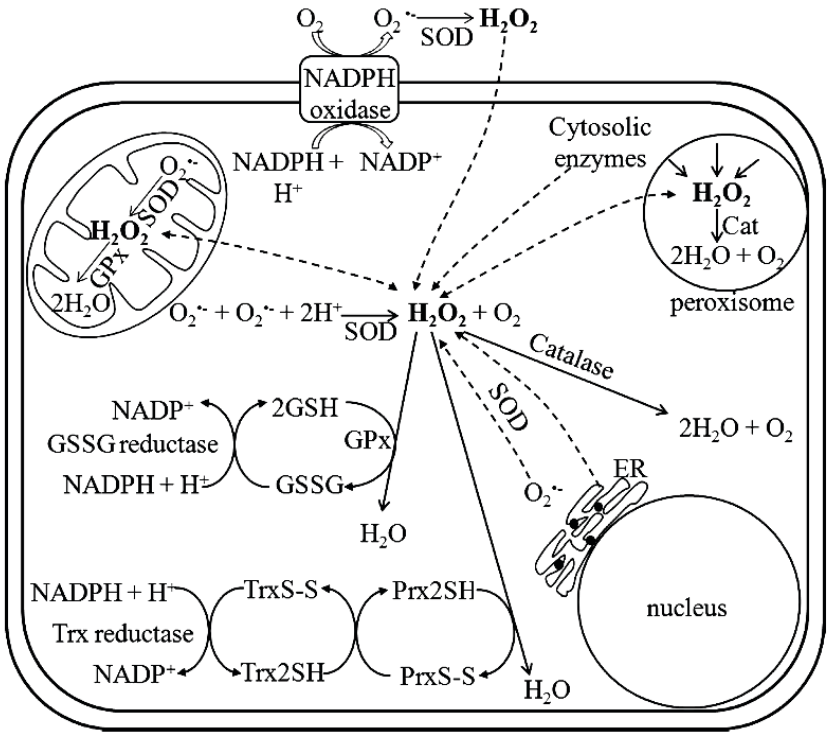


Figure 5 : Elimination du H_2O_2 par les enzymes anti-oxydantes (Oliveira-Marques et al. 2009).

2- LE STRESS OXYDATIF DANS LES CANCERS DU FOIE

L'homéostasie redox intracellulaire est finement régulée par les systèmes antioxydants en adéquation avec les activités métaboliques cellulaires. Tout changement dans ces systèmes antioxydants et/ou métaboliques par des agents externes et/ou par l'inflammation chronique pourrait perturber l'équilibre redox et provoquer un stress oxydatif par excès des espèces réactives de l'oxygène. Cet excès peut avoir des conséquences néfastes telles que la mutagenèse qui peut conduire à la transformation de cellules normales en cellules tumorales. Les espèces réactives de l'oxygène contribueraient à la prolifération des cellules tumorales et à l'acquisition d'un phénotype plus invasif et agressif *via* l'activation des voies de signalisation et de transcription de gènes. Le stress oxydatif participe ainsi à tous les stades de la carcinogénèse, de l'initiation à la progression tumorale. Grâce à la technique de résonnance paramagnétique électronique, Vagimigli et ses collaborateurs ont mesuré la concentration des espèces réactives de l'oxygène dans des biopsies de foie sain et de foie de patients. Le foie sain contient significativement moins d'espèces réactives de l'oxygène que le foie infecté par les virus de l'hépatite B ou C ainsi que d'autres altérations hépatiques (hépatites auto-immunes, cirrhose biliaire primitive et cholangite sclérosante primitive) *(Valgimigli et al. 2000)*. Tandis que le stress oxydatif est significativement

augmenté dans le foie de carcinome hépatocellulaire que le foie des autres étiologies telles que la NASH et l'hépatite C *(Chuma et al. 2008, Tanaka et al. 2013)*.

2-1-Effets mutagènes des espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène, fortes de leur potentiel oxydant, peuvent altérer tous les composants cellulaires : protéines, lipides et nucléotides. Un nombre élevé de lésions de l'ADN peuvent entrainer des modifications permanentes du patrimoine génétique. Les espèces réactives de l'oxygène oxydent les bases créant des sites abasiques, des cassures simples ou doubles brins de l'ADN, des pontages ADN-protéines ou ADN-ADN et des adduits intra-caténaires *(Devasagayam et al. 1991, Ward 1994, Krokan et al. 1997, Cooke et al. 2003)*.

Le radical hydroxyle est considéré comme la principale espèce réactive de l'oxygène qui interagit avec les bases de l'ADN, le désoxyribose et les nucléotides libres *(Lu et al. 2001)*. Le radical hydroxyle est très réactif mais a une demi-vie courte. Sa diffusion dans la cellule est ainsi limitée, toutefois le radical hydroxyle réagit rapidement avec les composants cellulaires à proximité immédiate. H_2O_2, précurseur du radical hydroxyle, diffuse plus facilement et par conséquent, est plus susceptible d'être impliqué dans la formation des bases oxydées. Le peroxynitrite qui peut également diffuser entre les cellules, modifie les bases de l'ADN au cours de l'inflammation *(Marnett 2000)*.

Le nombre de lésions de l'ADN dues à l'oxydation serait comprises entre 0,1 et 100 lésions par méga-paires de bases (Mpb) dans les cellules et les tissus *(Nakamura et al. 1999, De Bont et al. 2004)*. Parmi les lésions oxydatives, la lésion 8-oxo-dG (8-oxo-2'-désoxyguanosine) est la plus commune. La fréquence des lésions 8-oxo-dG est estimée à un nombre de 5 par Mpb. Cette modification est ainsi utilisée comme un marqueur de lésions de l'ADN induites par le stress oxydatif *(Poulsen 2005)*. 8-oxo-dG provoque le mésappariement avec l'alanine lors de la réplication *(Cheng et al. 1992)*. De plus, la forme oxydée des dGTP libres, le 8-oxo-dGTP, lors de la synthèse d'ADN, peut s'apparier avec une cytosine ou une adénine provoquant des transversions A : T en C : G et G : C en T : A *(Sekiguchi et al. 2002)*.

Plus le stress oxydatif est important, plus la fréquence des dommages à l'ADN est élevée. Lorsque deux ou plusieurs lésions oxydatives de l'ADN se retrouvent à l'intervalle de 10 paires de bases l'une de l'autre, ces lésions constituent un cluster appelé « OCDL » (Oxidative Clustered DNA Lesion). Contrairement aux lésions simples de l'ADN qui sont réparées efficacement, la réparation de ces clusters est plus difficile *(Nowsheen et al. 2009)*. Ces clusters constituent ainsi une source majeure de mutations au cours de la tumorigenèse *(Radford et al. 2008)*.

Si la réponse aux dommages à l'ADN n'aboutit pas à une réparation complète des lésions de l'ADN lorsque ces lésions sont trop sévères, les cellules subissent un arrêt du cycle cellulaire permanent (la sénescence) ou la mort cellulaire (apoptose/nécrose) *(De Zio et al. 2013)*. Cependant, certaines lésions peuvent conduire à l'activation d'oncogènes et/ou à la mutation de gènes suppresseurs de tumeurs conférant aux cellules endommagées une résistance à l'apoptose et une immortalité. Les mutations du suppresseur de tumeur p53 et de l'oncogène Ras ont été associées aux lésions oxydatives de l'ADN dans la carcinogenèse hépatique *(Shen et al. 1996)* et dans la carcinogénèse de la peau *(Nishigori et al. 2004)*. La résistance à l'apoptose par la mutation de p53 procure ainsi un avantage sélectif à des cellules dites « initiées ». La mutation de Ras permet aux cellules d'échapper à la sénescence, ce qui favorise l'acquisition de l'immortalité. De plus, cette mutation permet également la prolifération nécessaire au développement tumoral *(Sarkisian et al. 2007)*.

Des preuves expérimentales *in vivo* indiquent ainsi que le stress oxydatif est responsable de la transformation maligne des cellules hépatiques. En absence de l'enzyme de détoxification SOD1, des souris *SOD1*$^{-/-}$ développent spontanément des tumeurs du foie. L'espérance de vie de ces souris est nettement réduite, passant de 36 mois à 25 mois en comparaison aux souris sauvages. Cette réduction est corrélée à une augmentation accrue de l'incidence des tumeurs du foie chez les souris *SOD1*$^{-/-}$ vers l'âge de 20 mois. Quelques mois plutôt, diverses lésions hépatiques ont été observées chez ces souris. Des transversions G : C en T : A et des transitions G : C en A : T ont été relevées, signes du stress oxydatif dans le foie *(Busuttil et al. 2005)*. Le niveau de 8-oxo-DG reste inchangé dans le cerveau des souris SOD1$^{-/-}$ en comparaison à celui des souris sauvages. De même, aucune modification du taux de 8-oxo-G et de 8-oxo-dG dans l'urine qui reflète le stress oxydatif dans l'organisme n'a été relevée. Même si le taux de 8-oxo-dG est élevé dans le rein des souris déficientes en SOD1 en comparaison à celui des souris sauvages, il est nettement supérieur dans le foie des souris déficientes en SOD1 *(Siomek et al. 2010)*. Ces données suggèrent que le foie est particulièrement susceptible au stress oxydatif et à la tumorigenèse qui en résulte.

2-2-Effets épigénétiques des espèces réactives de l'oxygène

La prolifération des cellules tumorales conduit à une augmentation du métabolisme. Cette augmentation a pour conséquence une élévation de la production d'espèces réactives de l'oxygène. Ainsi, il a été observé que la teneur d'espèces réactives de l'oxygène est plus élevée dans les cellules tumorales que dans les cellules normales *(Toyokuni et al. 1995, Nowsheen et al. 2009)*. Cette concentration d'espèces réactives de l'oxygène ne peut qu'augmenter les lésions

d'ADN, maintenir l'instabilité génétique et contribuer à la progression tumorale *via* une sélection des clones les plus résistantes *(Loeb 2011)*. Cette sélection passe par des effets épigénétiques induits par le stress oxydatif qui déclenche très précocement une réponse adaptative commune aux cellules de mammifères. Il s'agit d'une augmentation d'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress. Beaucoup d'entre eux codent des protéines de défense anti-oxydante, d'autres des facteurs de survie, de croissance, ou des médiateurs de l'inflammation. Les espèces réactives de l'oxygène participent ainsi de façon directe ou indirecte à la régulation des voies de signalisation qui participent à la progression tumorale *(Klaunig et al. 2010)*. Dans les chapitres suivants (ci-dessous), il sera abordé la principale voie anti-oxydante, Nrf2 et la voie oncogénique EGFR. Le prochain chapitre sera consacré à la kinase MK2.

2-2-1-La voie anti-oxydante Nrf2

Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid-derived-2-Like 2) est un facteur de transcription de type leucine zipper ou « fermeture éclair à leucine (bZIP). En condition basale, Nrf2 se lie à la protéine Keap1 (Kelch ECH associating protein 1) qui retient Nrf2 dans le cytoplasme et favorise la dégradation de Nrf2 par le protéasome *(Cullinan et al. 2004)*. Lors d'un stress oxydatif, l'interaction entre Nrf2 et son répresseur Keap1 est rompue, Nrf2 est transloqué dans le noyau *(Tong et al. 2006)*. Dans ce compartiment, Nrf2 s'hétérodimérise avec des petites protéines Maf (Masculoaponeurotic fibrosarcoma) qui facilite la liaison de Nrf2 à l'ADN sur des éléments de réponse anti-oxydante (ARE, Antioxidant Response Element) *(Itoh et al. 1997, Nguyen et al. 2003)*(Figure 6).

Les gènes induits par Nrf2 sont impliqués dans l'homéostasie redox cellulaire. Ceux-ci comprennent des enzymes de catabolisme des anions superoxyde et peroxydes : SOD, Prx, GPx ; des molécules impliquées dans la régénération des protéines et cofacteurs oxydés : TrxR1, Srx1 ; des enzymes nécessaires à la synthèse des facteurs de réduction : GCLC (Glutamate-Cysteine Ligase catalytic) et GCLM (Glutamate-Cysteine Ligase regulatory) pour la synthèse du glutathion, G6PDH (Glucose-6-Phsophate Dehydrogenase), 6PGD (Phosphogluconate Dehydrogenase) ; ou encore la protéine de réponse au stress HO-1 (Heme Oxygenase 1) connue aussi sous le nom de Hsp32 (Heat shock protein 32)... *(Gong et al. 2002, Kensler et al. 2007, Reichard et al. 2007)*.

Bien qu'un faible niveau de Nrf2 ou une perte d'activité Nrf2 augmente la production des espèces réactives de l'oxygène et les dommages à l'ADN et prédispose les cellules à la tumorigenèse, l'activité élevée de Nrf2 peut également jouer un rôle dans l'évolution du cancer *(Hayes et al. 2006)*. La sous-expression de Keap1 qui rend Nrf2 constitutivement actif stimule la croissance des cellules cancéreuses du poumon en condition basale. De même pour les

fibroblastes embryonnaires de souris déficientes en Keap1 *(Ohta et al. 2008)*. Cependant, chez les souris invalidées pour Keap1, aucune augmentation de l'incidence des cancers n'a été observée. Cela suggère que Nrf2 ne jouerait pas un rôle dans l'initiation tumorale mais plutôt dans la sélection clonale durant le développement tumoral *(Ma et al. 2012)*.

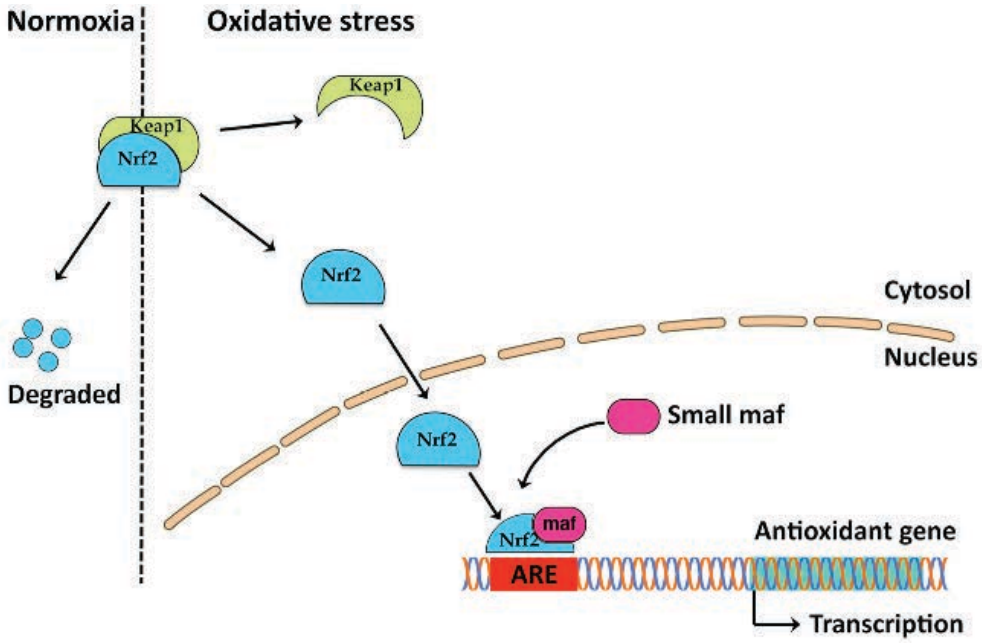


Figure 6 : Transcription des gènes antioxydants activée par Nrf2 en réponse au stress oxydatif ("Carcinogenesis", livre édité par Kathryn Tonissen, 2013).

2-2-2-La voie oncogénique EGFR

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), également appelée ErbB-1 ou HER1, est un membre de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase ErbB/HER. Son domaine C-terminale cytosolique possède un domaine kinase et de multiples sites de phosphorylation. EGFR lie différents ligands dont EGF (Epidermal Growth Factor) et TGF-α (Transforming Growth Factor-α) qui sont ses deux ligands majeurs, et également l'amphiréguline, l'épiréguline, la β-celluline, l'épigène, la neuréguline-2 et HB-EGF (Heparin Binding-EGF-like growth factor). La fixation des ligands sur le récepteur permet la dimérisation des récepteurs de l'EGFR entre eux ou avec d'autres membres de sa famille. Ce phénomène conduit à l'activation du domaine tyrosine kinase d'EGFR qui en s'autophosphorylant crée des points d'ancrage pour des complexes protéiques. Ces protéines prennent le relais et permettent la transduction du signal *(Schlessinger 2002)*.

A l'inverse de l'activation dépendante du ligand, plusieurs études ont démontré que les espèces réactives de l'oxygène, en particulier H_2O_2 sont capables d'activer le récepteur EGFR. L'activation d'EGFR par les rayons ultra-violets dans les fibroblastes NIH 3T3 et dans les cellules mammaires HC11 murins est abrogée en présence de l'antioxydant suramine *(Huang et al. 1996)*. De même, la surexpression de la catalase, qui réduit H_2O_2 en eau, dans les kératinocytes humains inhibe fortement l'activation d'EGFR induite par les rayons ultra-violets *(Peus et al. 1999)*. Ces résultats suggèrent que les rayons ultra-violets activent EGFR par l'intermédiaire de H_2O_2 qui jouerait alors un rôle de second messager. Un récepteur activé par son ligand peut transactiver un autre récepteur *via* la génération de H_2O_2. L'activation du récepteur EGFR est possible par ce mécanisme *(DeYulia et al. 2005)*. Le récepteur EGFR est ainsi transactivé par la fixation de l'angiotensine II sur son récepteur AT1 *(Mifune et al. 2005)*.

Par ailleurs, Goldkorn et ses collègues ont observé que H_2O_2 induit la phosphorylation d'EGFR de manière dose-dépendante dans les cellules cancéreuses du poumon A549. Cette phosphorylation se fait préférentiellement sur les résidus tyrosines et faiblement sur les sérines et sur les thréonines d'EGFR *(Gamou et al. 1995, Goldkorn et al. 1998)*. Il a été proposé que l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase par les ROS serait due à la désactivation des PTPs (Phosphotyrosine Phosphatase) via l'oxydation des résidus cystéine situés dans leur poche catalytique *(Knebel et al. 1996)*. Tandis que Miyazaki et ses collègues ont démontré que le stress oxydatif augmente le niveau des ARNm de HB-EGF et d'amphiréguline dans les cellules épithéliales gastriques de rat RGM1. Cette augmentation ne dépend pas de l'activité de la PKC (Protein Kinase C) puisque sa déplétion ne modifie pas le niveau des ARNm de HB-EGF et d'amphiréguline *(Miyazaki et al. 1996)*. Une autre étude rapporte que l'activation d'EGFR par le stress oxydatif est possible via l'activation de plusieurs métalloprotéases ADAM 9, 10 et 17. Ces dernières clivent pro-HB-EGF en HB-EGF à la surface membranaire. HB-EGF libéré peut alors se lier à son récepteur EGFR et l'activer *(Fischer et al. 2004)*.

En condition basale, l'activation d'EGFR par les ligands entraine l'internalisation et la dégradation du récepteur et permet une prolifération modérée. Le stress oxydatif induit par H_2O_2 favorise une activation et une phosphorylation aberrante d'EGFR aussi bien à la surface cellulaire qu'au niveau péri-nucléaire *(De Wit et al. 2001, Khan et al. 2006, Filosto et al. 2011)*. La transformation des cellules épithéliales hépatiques non-néo-plasiques de rat T51B par H_2O_2 se fait *via* l'activation d'EGFR *(Huang et al. 2001)*. En stimulant EGFR en absence de ses ligands, H_2O_2 induit des réponses cellulaires régulées par EGFR : survie cellulaire, prolifération, angiogenèse, migration et invasion. Ces réponses sont impliquées dans la progression tumorale (Figure 7).

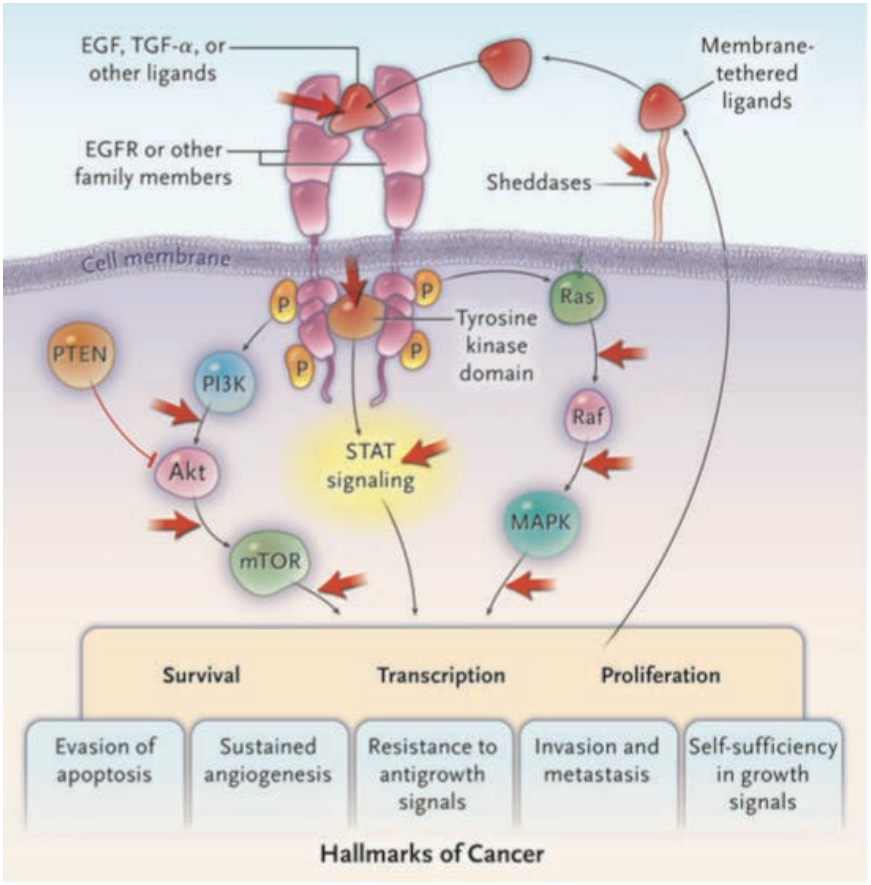


Figure 7 : Implication d'EGFR dans la progression tumorale (Gazdar 2009).

Une des plus grandes familles des voies de signalisation activée par les espèces réactives de l'oxygène est celle des MAPKs *(Runchel et al. 2011)*. Parmi les voies de signalisation MAPKs, la voie de MK2 est souvent associée au stress oxydatif et à l'inflammation. Les fonctions de MK2 seront détaillées dans le chapitre suivant.

CHAPITRE II : IMPLICATION DE MK2 DANS LA REPONSE AU STRESS OXYDATIF

Les MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) appartiennent à la superfamille des Ser/Thr Kinases. Elles sont activées par des enzymes en amont – les activateurs, les MAPKKKs (MAPK Kinase Kinase), les MAPKKs (MAPK Kinase) et les MAPKs – en réponse à différents stimuli externes.

Les MAPKs se répartissent en trois groupes majeurs : ERKs (Extracellular signal-Regulated Kinase), JNKs (c-Jun N-terminal kinase) et les MAPKs p38. Les voies JNKs et MAPKs p38 sont plus souvent associées à la signalisation des stimuli de stress. A leur tour, elles phosphorylent des protéines cibles qui assurent ainsi la transduction du signal en diverses réponses cellulaires : le métabolisme, l'expression génique, la mitose, la différenciation, la mobilité, la survie et l'apoptose *(Cargnello et al. 2011)* (Figure 8). Les cibles des MAPKs peuvent être également des kinases que l'on nomme des MAPKAPK (MAPK-Activated Protein Kinase) *(Gaestel 2008)*.

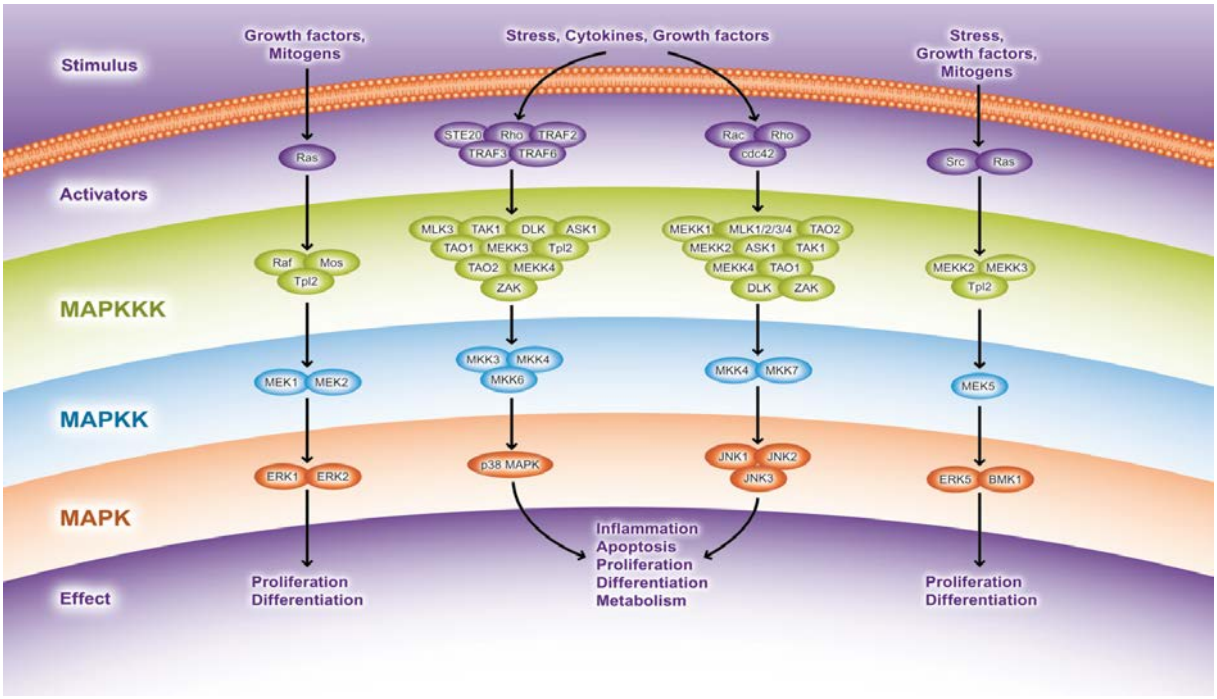


Figure 8 : Cascade de signalisation impliquant des MAPKs en réponse à divers stimuli (adapté d'abcamBiochemicals).

1-GENERALITE SUR MK2

1-1-Découverte de la kinase MK2

MAPKAPK2 (MAPK-Acitvated Protein Kinase 2) ou MK2 fait partie de la sous-famille des CAMKs (Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase) de par leur homologie dans le domaine Kinase *(Engel et al. 1993)* (Figure 9).

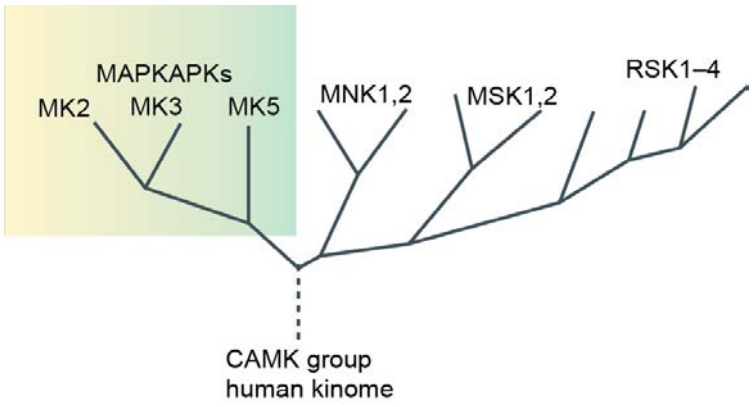


Figure 9 : Famille des CAMKs chez l'homme (adapté de (Gaestel 2006)).

Initialement identifiée *in vitro* comme une cible de la kinase ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2), MK2 est capable de phosphoryler la protéine chaperonne Hsp27 (Heat shock protein 27), que l'on appelle également HSPB1 chez l'homme, ou Hsp25 pour son homologue murin *(Stokoe et al. 1992)*. Cependant, des travaux menés par deux équipes différentes ont démontré que MK2 était activée en présence de l'arsénite, d'un choc de température, d'un stress osmotique ou par l'IL-1 (Interleukine-1) et non en réponse aux agonistes d'ERK1/2 – NGF (Nerve Growth Factor) ou EGF (Epidermal Growth Factor). Une nouvelle protéine a ainsi été identifiée, RK (Reactivating Kinase) *(Rouse et al. 1994)* ou p40 *(Freshney et al. 1994)*, plus connue aujourd'hui sous le nom de MAPK p38 *(Han et al. 1994)* comme étant un activateur spécifique de MK2.

1-2-Expression génique et protéique de MK2 au niveau tissulaire

Le gène codant MK2, *MAPKAKP2*, est situé au niveau du 1er chromosome, locus 1q32 chez l'homme et compte 11 exons. La synthèse des ARNm de MK2 peut être induite dans les

ostéoblastes traités par l'OGP-(10-14) (un agent mitogénique des cellules osseuses) *via* l'activation de la kinase Erk1/2 *(Miguel et al. 2005)*. Tandis que la dégradation des ARNm de MK2 s'effectue *via* la liaison de miR-483-3p sur deux sites dans leur partie non-traduite 3' UTR (Untranslated Region) *(Bertero et al. 2011)*.

Il existe deux transcrits de *MAPKAKP2*, variant 1 (NCBI Reference Sequences: NM_004759.4) et variant 2 (NM_032960.3). Ces deux transcrits résulteraient de l'épissage alternatif du dernier exon en extrémité 5' du pré-ARNm de *MAPKAKP2*. L'expression des ARNm des variants de *MAPKAKP2* est ubiquitaire. On notera une forte expression des deux transcrits dans le tissu cardiaque et le muscle. A l'inverse, ils sont à peine détectables dans le placenta et faiblement exprimés dans le foie et les poumons. Les deux transcrits de *MAPKAKP2* sont en quantité équivalente, excepté dans le cerveau où le variant 1 est prédominant et dans le pancréas où le variant 2 est plus abondant *(Zu et al. 1997)*. Les variants 1 et 2 sont ainsi traduits en protéines, respectivement en l'isoforme 1 ou MK2b (NP_004750.1) et en l'isoforme 2 ou MK2a (NP_116584.2).

Chez la souris, le gène *Mapkapk2* est localisé également sur le 1er chromosome en position 1 E4; 1, et compte 10 exons. Contrairement à l'homme, un seul transcrit de 3,5 kilobases a été identifié. La quantification de ce transcrit par northern blot indique qu'il est plus fortement exprimé dans le cœur et dans le muscle comme chez l'homme. Dans les poumons, le taux du transcrit de *Mapkapk2* est élevé à l'inverse de ses homologues humains alors que son niveau dans le foie murin reste faible comme chez l'homme *(Engel et al. 1993)*.

Les deux isoformes de MK2 sont observées chez la plupart des espèces et dans différents types cellulaires. L'existence de ces deux isoformes a été également mise en évidence chez la souris et serait due à des modifications post-transcriptionnelles *(Chevalier et al. 2000)*. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour élucider les mécanismes sous-jacents.

1-3-Structure et localisation subcellulaire de MK2

La protéine MK2 existe sous deux isoformes MK2a et MK2b qui se distinguent par leur région C-terminale. MK2a possède une séquence protéique de 400 acides aminés alors que MK2b n'est composée que de 370 acides aminés (Figure 10).

L'extrémité N-terminale est identique pour les deux isoformes de MK2 et n'est présente que chez les vertébrés *(Gaestel 2006)*. Cette extrémité composée de 35 acides aminés est une région riche en proline capable d'interagir *in vitro* avec des domaines SH3 (Src homology 3) de c-Abl *(Engel et al.*

1993, Stokoe et al. 1993, Plath et al. 1994, Zu et al. 1994). Elle est requise pour l'activation *in vivo* de MK2 par la MAPK p38 *(Ben-Levy et al. 1995)*.

La région riche en proline est suivie du domaine catalytique central de la kinase et l'extrémité C-terminale de MK2 qui sont tous deux conservés au cours de l'évolution *(Gaestel 2006)*.

MK2a possède plusieurs domaines à sa région C-terminale. La région C-terminale de MK2a est composée ainsi d'une séquence de localisation nucléaire NLS (Nuclear Localization Sequence) – Lys-Lys-Xaa10-Lys-Arg-Arg-Lys-Lys – qui la situe dans le noyau *(Stokoe et al. 1993)*. A l'intérieur de cette séquence, un domaine « Docking » (ou site D ou domaine δ ou domaine DEJL) – Leu-Leu-Lys-Arg-Arg-Lys-Lys – permet la liaison de MK2 avec les isoformes α et β de la MAPK p38 et non avec les isoformes δ et γ *(Smith et al. 2000, Meng et al. 2002)*. La région NLS/domaine Docking est précédée d'une séquence d'export nucléaire NES (Nuclear Export Signal) – Met-Thr-Ser-Ala-Leu-Ala-Thr-Met-Arg-Val – permettant l'export de MK2α du noyau vers le cytoplasme. Dans les cellules quiescentes, la séquence NES de MK2a est masquée par une boucle auto-inhibitrice formée par un motif Hélice α amphiphile, empêchant ainsi l'export nucléaire de MK2a. MK2a reste alors majoritairement dans le noyau *(Engel et al. 1995)*. La phosphorylation sur la thréonine 334 de MK2a par la kinase p38 démasque la séquence NES de MK2a, ce qui permet ainsi l'export de MK2a du noyau vers le cytoplasme *(Ben-Levy et al. 1998, Engel et al. 1998)* (Figure 11a).

Contrairement à MK2a, MK2b ne possède pas de séquence NES ni de domaine NLS/D dans sa région C-terminale. Par conséquence, MK2b ne peut interagir avec p38 et resterait majoritairement dans le cytoplasme *(Zu et al. 1994)*. Malgré une région C-terminale plus courte, l'activité de MK2b est également régulée par une boucle auto-inhibitrice comme décrit ci-dessus *(Zu et al. 1995)* (Figure 11b).

MK2a et MK2b phosphorylent de manière similaire Hsp27 *(Chevalier et al. 2000)*, les différences fonctionnelles entre ces deux isoformes n'ont pas été abordées à ce jour.

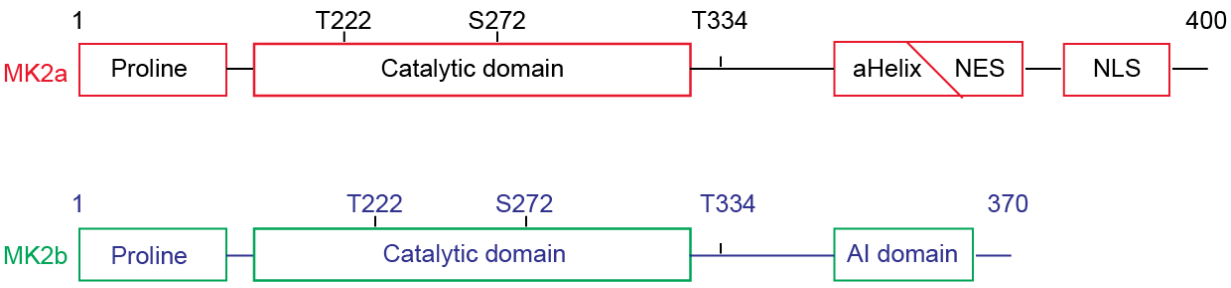


Figure 10 : Structure des isoformes MK2a et MK2b.

1-4-Mécanismes d'activation et d'inhibition de MK2

Bien qu'ERK1/2 soit capable de phosphoryler MK2 *in vitro* sur plusieurs sites *(Stokoe et al. 1992)*, aucune étude ne montre que cette phosphorylation est possible *in vivo*. Contrairement à ERK1/2, p38 est capable de phosphoryler et ainsi d'activer les deux isoformes de MK2 *in vitro* et *in vivo (Freshney et al. 1994, Ben-Levy et al. 1995)*.

Il existe trois sites de phosphorylation de MK2 par p38 : la thréonine 222 et la sérine 272 situées à l'intérieur du domaine catalytique de MK2 tandis que la thréonine 334 est-elle située à l'extrémité C-terminale de MK2. Cette dernière est activée lorsqu'elle est phosphorylée par p38 sur au moins deux de ses trois sites de phosphorylation *(Ben-Levy et al. 1995)* (Figure 10).

La phosphorylation de la thréonine 334 est particulièrement importante. Celle-ci permet à MK2a de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme *(Meng et al. 2002)*. Zu et ses collègues ont observé que l'activité kinase de MK2 est diminuée de 30% lorsque la séquence d'acides aminés 327-338 de MK2b qui contient la thréonine 334 est manquante *(Zu et al. 1995)*.

Par ailleurs, la région C-terminale de MK2 joue un rôle primordial dans la régulation de l'activité de MK2. En condition normale, cette région forme une boucle auto-inhibitrice empêchant l'activité kinase de MK2. Au contraire, cette activité est remarquablement augmentée lorsque la région C-terminale de MK2 est déplétée. L'activité catalytique de MK2 semble ainsi dépendante de la fermeture/ouverture de la boucle auto-inhibitrice *(Ben-Levy et al. 1995)*. Des études cristallographiques et des analyses par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) révèlent que l'ouverture de la boucle auto-inhibitrice de MK2 est régulée par la phosphorylation sur la thréonine 334 de MK2. Ces résultats suggèrent que la thréonine 334 joue un rôle critique à la fois dans la régulation de la localisation et de l'activité de MK2 *(Neininger et al. 2001)* (Figure 11).

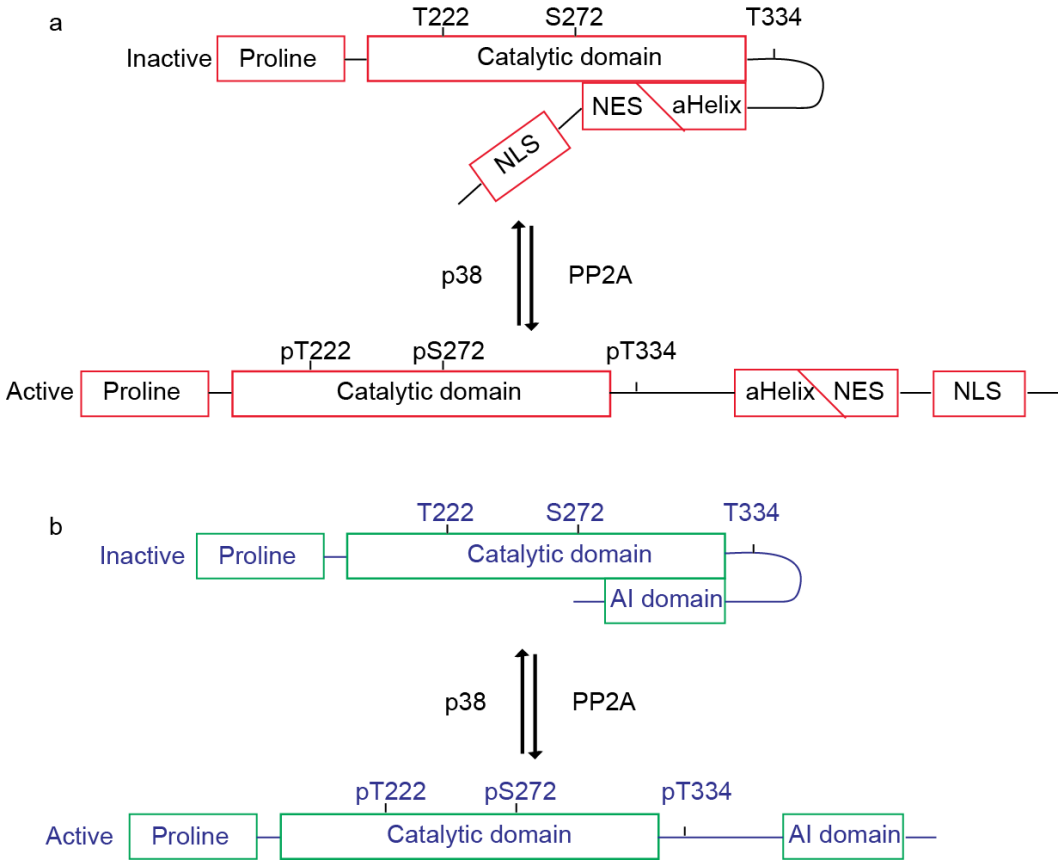


Figure 11 : Régulation de l'activation de MK2 par la boucle auto-inhibitrice. Le changement conformationnel induit par la phosphorylation sur la thréonine 334 de MK2 par p38 permet la libération de la boucle auto-inhibitrice du domaine catalytique, rendant ainsi MK2 active (a et b) (adapté de (Zu et al. 1995, Engel et al. 1998)).

L'inactivation de MK2 est régulée par la phosphatase PP2A (Protein Phosphatase 2A) *(Stokoe et al. 1992, Freshney et al. 1994)*. Outre l'inactivation par déphosphorylation, l'activité de MK2 peut être limitée par la SUMOylation. La SUMOyation est une modification post-traductionnelle qui ajoute de petites protéines appelées SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) semblables à l'ubiquitine sur les résidus lysines des protéines. Il s'agit d'un mécanisme réversible qui affecte les protéines cibles dans plusieurs processus tels que leur localisation subcellulaire, leur dégradation, leur liaison à leurs partenaires ou à l'ADN. Chang et ses collègues ont démontré que MK2 est SUMOylée sur la lysine 339 dans les cellules humaines endothéliales aortiques et artérielles pulmonaires ainsi que dans les cellules HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) traitées au TNF-α. La mutation de cette lysine en arginine rend impossible la SUMOylation de MK2. Par conséquent, cette mutation accroit l'activité de MK2, ce qui se traduit par une augmentation de la phosphorylation de Hsp27 *in vitro (Chang et al. 2011)*.

Quant à l'inhibition de l'expression de MK2, une étude révèle qu'elle peut être régulée par le micro-ARN miR-483-3p. En effet, la partie 3' UTR (Unstranslated Region) des ARNm de MK2 comportent deux sites cibles du miR-483-3p. Lorsque différentes lignées de kératinocytes NHK, HaCat et MK sont transfectées avec des plasmides codant le pré-miR-483-3p, l'expression protéique de MK2 est fortement inhibée. A l'inverse, l'expression de MK2 est maintenue dans les cellules COS-7 lorsqu'elles sont transfectées avec des plasmides codant MK2 muté dans la région 3' UTR. miR-483-3p est ainsi capable d'inhiber l'expression de MK2 *(Bertero et al. 2011)*.

2-SUBSTRATS ET FONCTIONS BIOLOGIQUES DE MK2

Les fonctions biologiques de MK2 incluent la production de cytokines, le remodelage du cytosquelette, le contrôle du cycle cellulaire et l'expression génique. Ces fonctions sont relayées par les substrats que MK2 phosphoryle. Ces substrats sont divers et comprennent des enzymes *(Sutherland et al. 1993, Thomas et al. 1997, Werz et al. 2000)*, des protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette *(Cheng et al. 1998, Kato et al. 1998)*, des protéines qui lient les ARNm *(Rousseau et al. 2002, Bollig et al. 2003, Chrestensen et al. 2004, Stoecklin et al. 2004)*, des facteurs de transcriptions *(Heidenreich et al. 1999, Neufeld et al. 2000, Janknecht 2001)* et des régulateurs du cycle cellulaire et de l'apoptose *(Ueda et al. 2004, Manke et al. 2005, Weber et al. 2005)*.

La glycogène synthase (GS) est le 1er substrat de MK2 identifié. MK2 est capable de la phosphoryler GS *in vitro* sur la sérine 7 *(Stokoe et al. 1992)*. Très rapidement, Hsp27 a été identifiée comme un autre substrat de MK2. En effet, Hsp27 possède des sites de phosphorylation dont la séquence (Lys-Ser-Arg-Gln-Lys-Ser-Ser-Gly) est similaire à celle qui entoure la sérine 7 de la GS *(Stokoe et al. 1992)*. La phosphorylation de Hsp27 par MK2 et la fonctionnalité de cette phosphorylation feront l'objet d'un chapitre à part ci-après.

Plusieurs études montrent ainsi que MK2 phosphoryle efficacement les peptides ayant pour séquence (Leu/Phe/Ile)-Xaa-Arg-(Gln/Ser/Thr)-Leu-pSer/pThr-Hyd où Hyd est un résidu hydrophobe *(Stokoe et al. 1993, Clifton et al. 1996, Manke et al. 2005, Gaestel 2006)*. La recherche des cibles de MK2 n'a alors pas cessé depuis son identification. Toutefois, la relevance physiologique de ces substrats ainsi que le rôle même de MK2 restent à déterminer *in vivo*.

Une des fonctions majeures et très largement étudiée de MK2 est la régulation de la migration cellulaire.

2-1-Rôle de MK2 dans l'organisation du cytosquelette et dans la migration cellulaire

La dynamique et l'organisation du cytosquelette cellulaire dépendent des processus de phosphorylation et de déphosphorylation des composantes des filaments intermédiaires, des microtubules et des microfilaments d'actine. Plusieurs études ont ainsi montré l'implication de MK2 dans la réorganisation du cytosquelette et dans la migration cellulaire.
MK2 est capable de phosphoryler *in vitro* la vimentine (Ser38, 50, 55 et 82), une protéine majeure des filaments intermédiaires de type III exprimée dans les cellules endothéliales et mésenchymateuses. Cependant, cette phosphorylation n'a pas d'impact sur l'assemblage de la vimentine *(Cheng et al. 2003)*. Alors que la phosphorylation de la vimentine par d'autres kinases telles que PKA (Protein Kinase A), Rho-kinase, CDK-1 (Cyclin-Dependent Kinase 1) et PAK-1 (p21-Activated Kinase 1) affecte l'organisation de la vimentine *(Hyder et al. 2008)*. La relation entre MK2 et la vimentine n'a toujours pas été élucidée à ce jour.

Le remodelage du cytosquelette d'actine est impliqué dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques dont l'angiogenèse. Un des facteurs responsables de l'angiogenèse est le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Ce dernier induit la formation des fibres de stress, la migration des cellules endothéliales et leur formation en tubes vasculaires qui sont des mécanismes de l'angiogenèse. Plusieurs études ont montré que MK2 est phosphorylée en présence de VEGF dans les cellules endothéliales. MK2 semble ainsi réguler l'angiogenèse à travers une de ces cibles, LIMK1 (LIM Kinase 1) *(Zhang et al. 2003, Kobayashi et al. 2006, Jagielska et al. 2012)*.
La cofiline est une protéine qui déstabilise les filaments d'actine. Elle permet la dépolymérisation de ces filaments en s'y fixant. L'activité de la cofiline est régulée par phosphorylation. La kinase LIMK1 phosphoryle la cofiline et l'inactive. La cofiline phosphorylée par LIMK1 se dissocie des filaments d'actine et se lie à la protéine adaptatrice 14-3-3. Les filaments d'actine sont alors stabilisés et se polymérisent. Il a été montré que le régulateur négatif de la cofiline, LIMK1, est phosphorylée sur la sérine 323 et activée par MK2 dans les cellules endothéliales soumises au VEGF-A. La suppression de cette phosphorylation par le remplacement d'un mutant non-phosphorylable sur la sérine 323 de LIMK1 inhibe la formation des fibres de stress et la migration des cellules endothéliales, tout comme la suppression de MK2 par les ARN interférents. La phosphorylation de LIMK1 par MK2 est ainsi essentielle à la formation des fibres de stress et des tubes vasculaires, ainsi que la migration des cellules endothéliales *(Kobayashi et al. 2006)* (Figure 12).

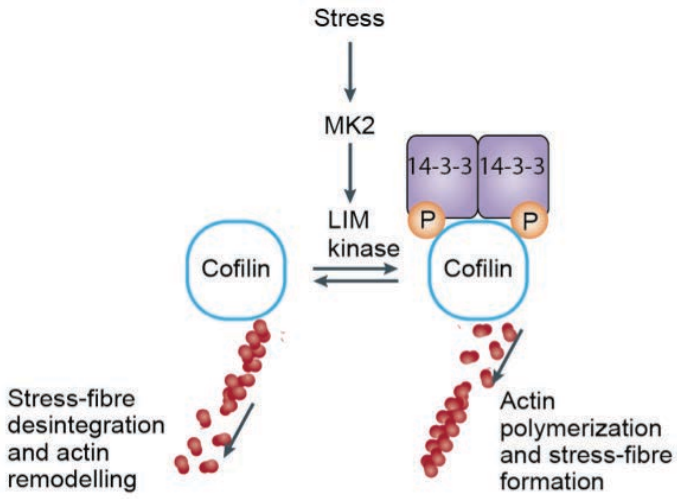


Figure 12 : Régulation de la polymérisation d'actine par MK2 (adapté de (Gaestel 2006)).

Plusieurs autres substrats de MK2 sont des protéines interagissant avec le cytosquelette d'actine. De nombreuses études ont été menées dans les cellules immunitaires. La protéine LSP-1 (Leukocyte-Specific Protein 1) est une protéine du cytosquelette d'actine, exprimée spécifiquement par les cellules myéloides. LSP-1 est une cible majeure de MK2 dans les neutrophiles. MK2 phosphoryle LSP-1 sur les sérines 204 et 252 présentes dans le domaine de liaison aux filaments d'actine *(Huang et al. 1997)*. Dans les neutrophiles murins, la phosphorylation de LSP-1 par MK2 en réponse à un gradient de fMLP (N-formyl-Met-Leu-Phe) permet de localiser LSP-1 dans les lamellipodes qui sont des structures enrichies en filaments d'actine *(Wu et al. 2007)*. De manière intéressante, les neutrophiles provenant des souris déficientes en MK2 montrent une perte partielle de directionnalité alors que la migration des cellules est plus rapide dans les chambres de Zigmond contenant un gradient de fMLP *(Hannigan et al. 2001)*. Plus récemment, Kahle et ses collègues ont confirmé l'importance de la phosphorylation de LSP-1 par MK2 dans la migration des neutrophiles *(Kahle et al. 2013)*. Ces études suggèrent que MK2 permet de stabiliser la polarisation des filaments d'actine durant le chimiotactisme des neutrophiles via la phosphorylation de LSP-1.

Une autre cible de MK2, ARPC5 (Actin-Related Protein 2/3 Complexe subunit 5) aussi appelée p16-Arc, appartient au complexe protéique Arp2/3 (Actin-related protein 2/3). Ce complexe est impliqué à la fois dans le chimiotactisme des neutrophiles et dans la phagocytose *(Mullins et al. 1998, Weiner et al. 1999, May et al. 2000)*. Arp2/3 est un nucléateur qui permet la formation des noyaux d'actine et ainsi la polymérisation de l'actine *(Ma et al. 1998)*. Il existe deux isoformes d'ARPC5, A et B. De manière intéressante, seule l'isoforme A est phosphorylée par MK2 *(Singh et*

al. 2003). MK2 pourrait ainsi réguler la polarisation des neutrophiles via la phosphorylation d'ARPC5 A et de LSP-1.

Contrairement à Arp2/3, CapZ (Capping protein Z) constitue une coiffe à l'extrémité plus des filaments d'actine et empêche ainsi son élongation *(Cooper et al. 2000)*. CapZIP (CapZ-Interacting Protein) a été identifiée comme une cible de MK2. MK2 phosphoryle CapZIP *in vitro* sur deux sérines 179 et 244. Mais seule la sérine 179 est phosphorylée dans les lymphocytes T Jurkat en réponse à un stress oxydatif induit par l'anisomycine *(Eyers et al. 2005)*. Bien que MK2 ne soit pas la seule kinase qui phosphoryle CapZIP, la stimulation des cellules Jurkat par l'anisomycine provoquerait la dissociation de CapZIP de CapZ dans ces cellules suggérant un rôle de cette phosphorylation dans le remodelage des filaments d'actine.

2-2-Rôle de MK2 dans la production de médiateurs inflammatoires

Non seulement MK2 est essentielle pour le chimiotactisme des cellules immunitaires, elle l'est tout autant pour la production des médiateurs inflammatoires. En effet, les souris déficientes en MK2 survivent mieux à l'injection péritonéale de LPS (Lipolysaccharide)/galactosamine du fait d'une réduction des taux sériques de TNF-α et de NO (monoxyde d'azote). Les cellules isolées à partir de la rate de ces souris sécrètent nettement moins de TNF-α et d'IFN-γ et à un degré moindre d'IL-1ß et d'IL-6. La sécrétion d'IL-10 anti-inflammatoire se fait plus tardivement *(Kotlyarov et al. 1999)*. Cependant, les souris déficientes en MK2 présentent une plus forte susceptibilité aux infections bactériennes. La charge bactérienne est augmentée de façon significative dans différents organes de ces souris. De plus, la phagocytose par les macrophages est diminuée *(Lehner et al. 2002)*. Cela suggère que MK2 joue un rôle majeur dans la réponse inflammatoire. MK2 peut réguler cette dernière par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels.

2-2-1-Régulation transcriptionnelle des médiateurs inflammatoires par HSF1

HSF1 (Heat Shock Factor 1) est un facteur de transcription qui se fixe aux séquences *HSE*s (*Heat Shock Element*) du promoteur des Hsps (Heat shock protein) en réponse aux chocs thermiques. De nombreux gènes codant des cytokines et des chimiokines présentent des *HSEs* dans leur promoteur capable de fixer HSF1. Cependant, contrairement aux protéines Hsps, HSF1 réprime

l'expression des cytokines et des chimiokines. Ainsi, il inhibe l'expression de TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α), et indirectement celle d'IL-6 en induisant l'expression de son régulateur négatif ATF-3 (Activating Transcription Factor-3) *(Takii et al. 2010, Ambade et al. 2012)*.

En condition normale, HSF1 se lie à Hsp90 qui le séquestre dans le cytoplasme et inhibe ainsi l'activité transcriptionnelle de HSF1. MK2 inactive HSF1 en le phosphorylant sur la sérine 121. En effet, cette phosphorylation entraine une augmentation de l'interaction entre HSF1 et Hsp90 et réduit par conséquent la capacité de HSF1 à se fixer sur le promoteur de *Hsp70b*. Cependant, lorsque les cellules cancéreuses du col de l'utérus HeLa sont exposées à un choc thermique, HSF1 se dissocie de Hsp90. HSF1 libérée, migre dans le noyau où il active le promoteur des gènes de Hsps et réprime ceux des cytokines. Pourtant, MK2 est fortement activée dans ces mêmes conditions *(Wang et al. 2006)*.

Contrairement au choc thermique, le LPS, activateur connu de MK2, induit une forte production de cytokines pro-inflammatoires TNF-α et IL-6 dans le foie des souris. L'inhibition de Hsp90 par l'injection intrapéritoniale de 17-DMAG (17-Dimethylamino-ethylamino-17-demethoxygeldanamycin) chez les souris traitées au LPS réduit significativement la production de ces cytokines. L'inhibition de Hsp90 permet la libération de HSF1 qui abroge alors l'expression des cytokines. La répression de l'expression de HSF1 par des ARN interférents réverse l'effet de l'inhibition de Hsp90 et restore ainsi l'expression des cytokines *(Ambade et al. 2012)* (Figure 13). L'activité inhibitrice de HSF1 sur l'expression des cytokines dépendrait ainsi du stimulus. D'autres études sont nécessaires pour déterminer la fonction exacte de la phosphorylation de HSF1 par MK2.

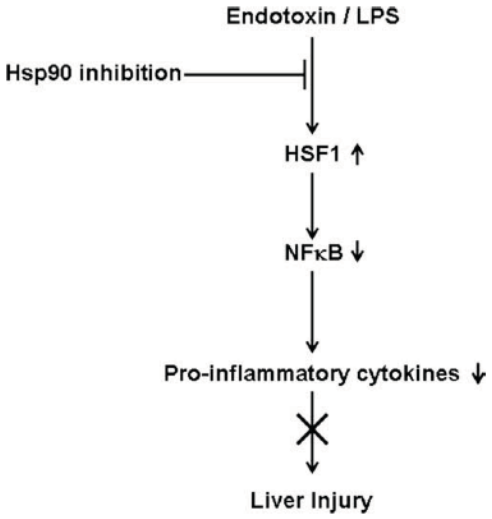


Figure 13 : Régulation transciptionnelle des médiateurs inflammatoires par MK2 (Ambade et al. 2012).

2-2-2-Régulation post-transcriptionnelle des médiateurs inflammatoires par les protéines de liaison aux séquences d'ARNm riches en éléments AU

L'aspect le plus connu de la fonction régulatrice de la réponse inflammatoire par MK2 est son implication dans la stabilisation des ARNm des médiateurs inflammatoires. Ces derniers possèdent, pour une majorité d'entre eux, des séquences AREs (Adenylate Uridylate-Rich Elements) dans la région non traduite 3'UTR (3' Untranslated Region). En se liant à ces séquences, les ARE-BPs (ARE Binding Protein) stabilisent les ARNm et permettent l'initiation de la traduction, ou au contraire les entrainent vers la voie de dégradation (Figure 14). Ce processus permet une régulation fine et rapide de la production des médiateurs inflammatoires en réponse aux stimuli externes (Tableau 1).

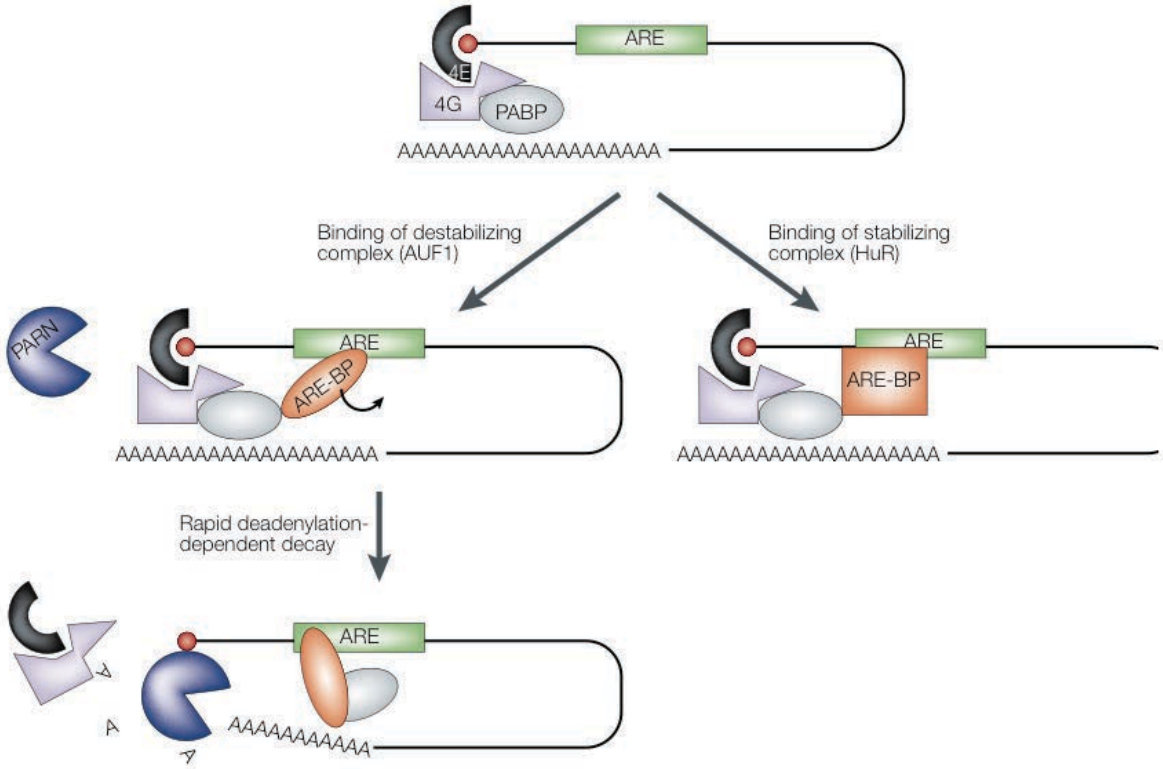


Figure 14 : Modèle de stabilisation/dégradation des ARNm par les différentes liaisons entre les AREs et les ARE-BPs. Les facteurs déstabilisants tels que AUF1, TTP, KSRP ou BRF1/2 entrainent une désadénylation rapide en réduisant l'affinité de PABP (Poly(A)-Binding Protein) pour la queue poly(A). Inversement, les facteurs stabilisants tels que HuR ou PAIP2 bloquent la désadénylation (adapté de (Wilusz et al. 2001)).

	TTP family	*Hu family*	*AUF1*	*KSRP*	*PAIP2*
VEGF	Ciais and others (2004); Essafi-Benkhadir and others (2007)	Levy and others (1998)	Xin and others (2012)		Onesto and others (2004)
TNF-α	Carballo and others (1997, 1998); Lai and others (1999); Johnson and others (2000); Mahtani and others (2001); Phillips and others (2004); Chen and others (2006); Hitti and others (2006); Deleault and others (2008)	Ford and others (1999); Nabors and others (2001); Di Marco and others (2001); Chen and others (2006); Tiedje and others (2012)	Lu and others (2006)		
GM-CSF	Carballo and others (2000); Carrick and others (2004); King and others (2009)	Atasoy and others (1998); Raineri and others (2004); Winzen and others (2007)	Raineri and others (2004)		
TGF-β		Bai and others (2012); Nabors and others (2001)			
CXCL1	Datta and others (2008, 2010)	Fan and others (2011)			
IL-1	Chen and others (2006); King and others (2009)			Dhamija and others (2011)	
IL-6	Zhao and others (2011)	Hutin and others (2013)	Hutin and others (2013)	Dhamija and others (2011)	
IL-8	Suswam and others (2008); Balakathiresan and others (2009); King and others (2009); Galbiati and others (2012)	Dixon and others (2001); Nabors and others (2001); Balakathiresan and others (2009); Galbiati and others (2012)		Suswam and others (2005); Winzen and others (2007)	

Tableau 1 : Les ARE-BPs et leurs cytokines cibles (Griseri et al. 2014).

TTP (Tristetraprolin) est l'une des cibles les plus connues de MK2 et a été largement étudiée dans la régulation des ARE-ARNm (ARNm contenant des séquences AREs). Une analyse par la technique d'immunoprécipitation protéine-ARNs (RIP-Chip) à partir de lysat de macrophages murins RAW264.7 traités par le LPS a révélé que TTP est capable de réguler une centaine d'ARNm *(Stoecklin et al. 2008)*. TTP se lie directement aux séquences AREs des ARNm, les déstabilise en recrutant les désadénylases CAF1 (CCR4-Associated Factor 1).

La phosphorylation de TTP par MK2 sur les sérines 52 et 178 réduit la liaison de TTP à CAF1 d'une part *(Marchese et al. 2010)* et entraine la séquestration de TTP par la protéine adaptatrice 14-3-3 dans le cytoplasme d'autre part *(Chrestensen et al. 2004, Stoecklin et al. 2004, Brook et al. 2006)*. Ainsi, l'affinité de TTP pour les séquences AREs est diminuée, ce qui permet à HuR (Human antigen R) de s'y fixer et de stabiliser les ARNm cibles *(Tiedje et al. 2012)* (Figure 15). La voie MK2/TTP a été impliquée ainsi dans la stabilité des ARNm qui s'accompagne d'une augmentation de la production des médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNF-α, l'IL-6, l'IL-8 et l'ICAM-1 *(Hitti et al. 2006, Zhao et al. 2011, Shi et al. 2012)*.

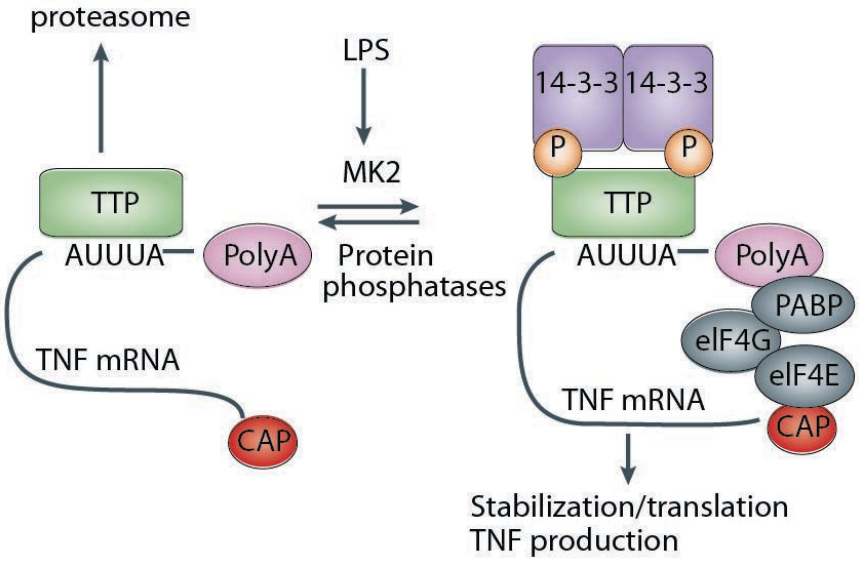


Figure 15 : Modulation de l'activité de TTP par MK2 (Gaestel 2006).

Dans les macrophages, l'activation de MK2 par le LPS contribue au recrutement des neutrophiles *via* la stabilisation des ARNm de MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein-2). MK2 phosphoryle *in vitro* hnRNP A0 (heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein A0) sur la sérine 84. Cette phosphorylation de hnRNP A0 par MK2 est retrouvée dans les cellules RAW264 traitées au LPS et est fortement diminuée dans les macrophages dérivés de la moelle osseuse des souris déficientes en MK2. Elle augmente ainsi l'affinité de hnRNP A0 pour les ARNm de MIP-2 mais également pour les ARNm de COX-2 et de TNF-α, ce qui permet de les stabiliser *(Rousseau et al. 2002)*.

Semblable à TTP, BRF1 (Butyrate Response Factor 1, une des trois sous-unités du complexe de facteurs de transcription de l'ARN polymérase III) s'associe aux AREs et aux enzymes de dégradation des ARNm. La phosphorylation de BRF1 par MK2 sur les sérines 54, 92 et 203 augmente la stabilité des ARE-ARNm. Cependant, elle n'altère pas la capacité de liaison aux AREs de BRF1 ni ses interactions avec les désadénylases *(Maitra et al. 2008)*. Le mécanisme par lequel cette phosphorylation stabilise des ARE-ARNm reste à élucider.

En recherchant les cibles de MK2 capables de réguler les taux des ARNm, Bollig et ses collègues ont identifié PABP1 (Poly(A)-Binding Protein 1) *(Bollig et al. 2003)*. Cette protéine se lie à la queue poly(A) des ARNm et recrute eIF4G (eukaryotic translation Initiation Factor 4 Gamma), un facteur d'initiation de traduction des ARNm. Le rôle de PABP1 dans la régulation post-transcriptionnelle des ARNm reste à ce jour controversé. PABP1 interagit avec TTP, la stabilise et augmente la liaison de TTP aux ARNm de TNF-α. Alors que TTP déstabilise les ARE-ARNm

en recrutant la désadénylase CAF1, l'interaction PABP1-TTP bloque le recrutement de CAF1 sur les queues poly(A) des ARE-ARNm, ce qui permet leur stabilisation *(Rowlett et al. 2008)*. Au contraire, PABP1 pourrait favoriser la désadénylation des ARE-ARNm en se liant à AUF1 (ARE poly(U)-binding degradation factor 1) nommé également hnRNP D. En effet, son interaction avec AUF-1 empêche sa liaison avec eIF4G et entraine ainsi la désadénylation des ARE-ARNm *(Brook et al. 2012)*. La phosphorylation de PABP1 par MK2 pourrait réguler les interactions entre PABP1 et ses différents partenaires tels que TTP, AUF1 et eIF4G. D'autres études sont nécessaires pour déterminer le rôle de la phosphorylation de PABP1 par MK2.

2-3-Rôle de MK2 dans la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire et de la survie cellulaire

2-3-1-Points de contrôle *via* les phosphatases Cdc25

Le stress oxydatif, les irradiations ionisantes ou les rayons ultra-violets induisent des dommages à l'ADN. Assurer le maintien de l'intégrité génomique des cellules nécessite une réponse aux dommages à l'ADN, connue sous le nom de DDR (DNA Dommage Response). Cette réponse est constituée de plusieurs points de contrôle (checkpoints) présents aux différentes phases du cycle cellulaire dont les principales sont : G1/S checkpoint ; intra-S checkpoint et G2/M checkpoint. La DDR est coordonnée par deux voies majeures ATM (Ataxia-Telangiextasia Mutated) et ATR (Ataxia-Telangiectasia and RAD3-related) selon les types de dommages à l'ADN. La voie ATM répond aux cassures double-brin de l'ADN tandis que celle d'ATR aux cassures simple-brin. Les voies ATR/ATM activent respectivement les kinases Chk1 (Checkpoint kinase 1) et Chk2 (Checkpoint kinase 2). Ces kinases phosphorylent et inactivent ensuite des phosphatases Cdc25A, B et C. Une fois phosphorylées, les phosphatases Cdc25B/C sont exportées hors du noyau et sont retenues dans le cytoplasme par la protéine adaptatrice 14-3-3. Quant à Cdc25A, sa phosphorylation conduit à sa dégradation. Les phosphatases Cdc25 régulent positivement des complexes Cycline/Cdk qui permettent la progression du cycle cellulaire. L'inhibition de ces phosphatases entraine un ralentissement de la progression du cycle cellulaire nécessaire à la réparation des dommages. Lorsque les dommages à l'ADN excèdent la capacité de réparation de la cellule, la voie apoptotique est déclenchée *via* l'activation de p53 *(Caputo et al. 2012)*.

Il a été montré que la voie p38 est indispensable à une activation complète de la DDR *(Bulavin et al. 2001, Raman et al. 2007)*. En particulier, MK2 est capable de phosphoryler les phosphatases Cdc25B et C respectivement sur les sérines 323 et 216 en réponse au rayonnement ultra-violet, permettant leur liaison à 14-3-3. Bien que Cdc25A possède des motifs phosphorylables par MK2, une phosphorylation directe de Cdc25A par MK2 n'a pas pu être mise en évidence. En revanche, lorsque des cellules humaines d'ostéosarcome U2OS sont déplétées en MK2, une perte de checkpoints G1 et S, qui fait suite à des dommages à l'ADN, est observée. L'absence de MK2 rend ces cellules plus sensibles à la mort induite par les rayons ultra-violets (Figure 16) *(Manke et al. 2005)*.

En 2007, Reinhardt et ses collaborateurs démontrent que les stress génotoxiques induits par la cisplatine, la camptothécine et la doxorubicine activent la voie p38/MK2 dans les MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts), dans les cellules humaines, HeLa et de glioblastome, U87MG. L'activation de la voie p38/MK2 nécessite l'activation des voies ATR/ATM dans les cellules U2OS traitées par la cisplatine ou la doxorubicine. A l'inverse, les rayons ultra-violets activent la voie p38/MK2 indépendamment de ces deux voies. Par ailleurs, la fonction de MK2 dans les checkpoints semble essentielle dans les cellules déficientes en p53. L'inhibition de MK2 provoque l'apoptose de ces cellules. En effet, lorsque l'expression de MK2 est réprimée par des ARN interférents, les MEFs $p53^{+/+}$ survivent mieux aux traitements génotoxiques que les MEFs $p53^{-/-}$. En absence de MK2 et de p53, les MEFs soumis à la cisplatine ou à la doxorubicine entrent en mitose malgré la présence de cassures de l'ADN. Ceci constitue l'une des caractéristiques de la catastrophe mitotique. La présence de cassures de l'ADN déclenche le checkpoint en G2/M qui, en cas d'échec, peut aboutir à l'activation de l'apoptose. Ces résultats *in vitro* sont traduits *in vivo* par une diminution drastique de la taille et du diamètre des tumeurs induites par injection des MEFs $p53^{-/-}$ transformés H-Ras-V12 et déplétés en MK2 dans des souris nude immunodéprimées traitées à la cisplatine ou à la doxorubicine, en comparaison aux tumeurs contrôles établies à partir des MEFs $p53^{-/-}$ transformés H-Ras-V12 non-déplétés en MK2. Des analyses du cycle cellulaire par FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) montrent qu'en absence de MK2, les MEFs $p53^{-/-}$ traités à la doxorubicine ne sont pas capables d'établir un checkpoint fonctionnel en G2/M alors que la kinase Chk1 est activée. En effet, l'inactivation de Cdc25B est déficiente dans ces cellules lorsque MK2 est déplétée par des ARN interférents. De plus, MK2 est nécessaire au checkpoint en S dans les MEFs $p53^{-/-}$ soumis à la cisplatine. Lorsque MK2 est déplétée dans ces cellules, la dégradation/inactivation de Cdc25A y est plus faible *(Reinhardt et al. 2007)*. L'activation de MK2 semble ainsi indispensable aux différents checkpoints du cycle cellulaire dans les cellules déficientes en p53 soumises aux stress génotoxiques.

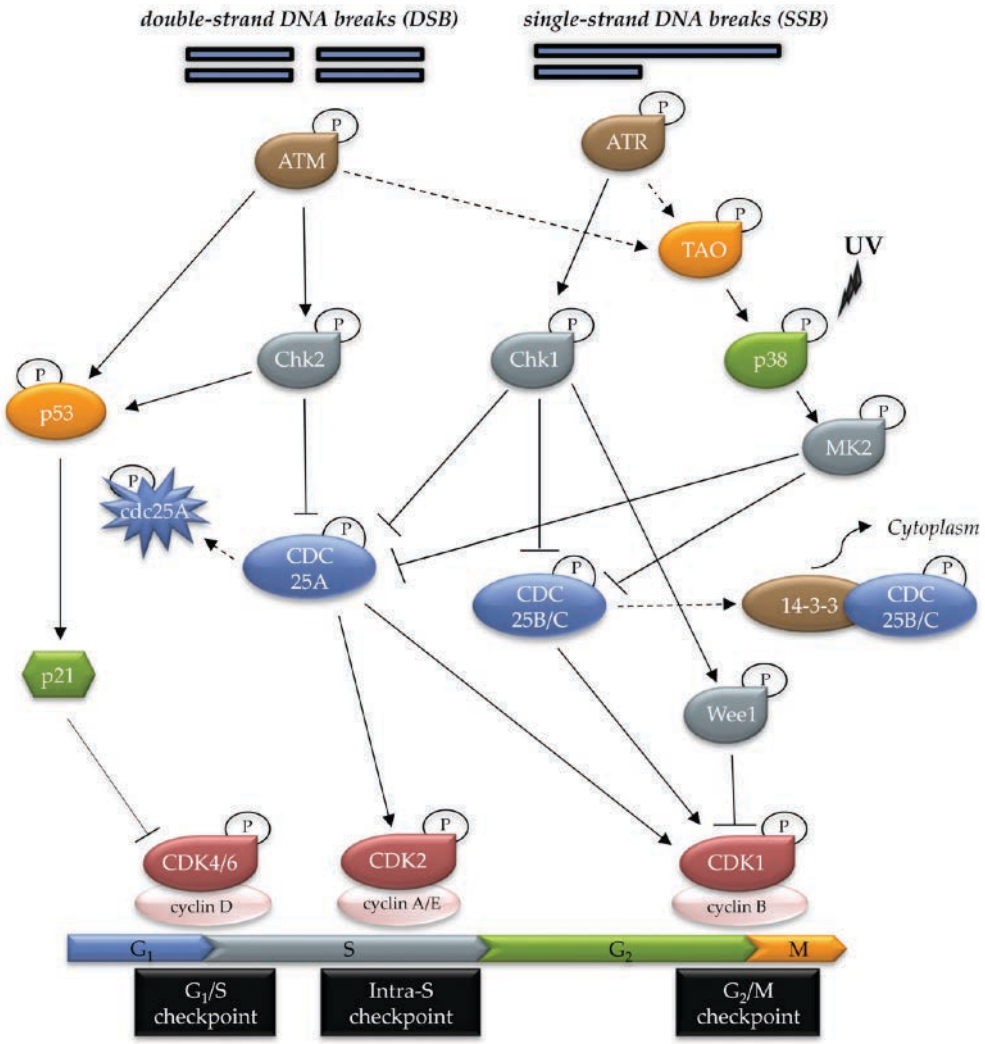


Figure 16 : Les voies kinases de checkpoints liées aux dommages à l'ADN. La voie ATM/Chk2 est initiée par les cassures double-brins de l'ADN, alors que la voie ATR/Chk1 est activée par le blocage des fourches de réplication et des cassures simples brins de l'ADN. La phosphatase Cdc25A est responsable de la transition G1/S. Tandis que les phosphatases Cdc25B et C permettent l'entrée des cellules des phases G2 en mitose. La phosphorylation de ces phosphatases par Chk1, Chk2 et MK2 entrainent leur liaison à 14-3-3 et à ß-TRCP pour Cdc25A, et ainsi un arrêt du cycle cellulaire nécessaire à la réparation de l'ADN (Gurgis et al. 2014).

2-3-2-Points de contrôle *via* la protéine GADD45α

Bien que les effets cellulaires provoqués par la déplétion de MK2 ressemblent à ceux liés à la perte de Chk1 lors des dommages à l'ADN *(Xiao et al. 2003)*, les deux voies MK2 et Chk1 sont essentielles à l'arrêt du cycle cellulaire en absence de réponse coordonnée par p53. Le checkpoint de la transition G2/M en cas de dommages à l'ADN dans des cellules HeLa mutées pour p53,

nécessite dans un premier temps l'activation nucléaire de Chk1 puis l'activité cytoplasmique de MK2. Cette dernière, activée en réponse à la doxorubicine, phosphoryle dans le cytosol PARN (Poly-A Ribonuclease) sur la sérine 557 d'une part et hnRNP A0 sur la sérine 84 d'autre part. Cela conduit à la stabilisation des ARE-ARNm de GADD45α (Growth Arrest and DNA Damage-inductible protein). GADD45α est un régulateur du cycle cellulaire dont l'expression est induite par des dommages à l'ADN. La déplétion de GADD45α dans les cellules HeLa traitées à la doxorubicine entraine un échec des checkpoints en S et G2/M, phénotype également observé en cas de perte de la fonction de MK2 dans les cellules soumises aux stress génotoxiques. La stabilisation des ARNm de GADD45α permet ainsi l'augmentation de son niveau protéique. En retour, la protéine GADD45α est capable de réguler positivement MK2 qui maintient alors les cellules endommagées en arrêt en inactivant les phosphatases Cdc25B/C (Figure 17) *(Reinhardt et al. 2010)*.

Alors que l'expression de GADD45α est réprimée au niveau transcriptionnel par le facteur de transcription c-Myc *(Barsyte-Lovejoy et al. 2004)*, MK2 amplifie la transcription de GADD45α *via* la biogenèse des micro-ARNs qui ciblent c-Myc. miR-34c et miR-145 font partie de ces micro-ARNs *(Cannell et al. 2010, Hong et al. 2013)*. En effet, l'augmentation de l'expression de miR-34c est inversement associée à la diminution de c-Myc dans les cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) traitées par l'etoposide qui provoque des dommages à l'ADN. Cette augmentation est également corrélée à l'activation de MK2. De ce fait, la diminution de l'expression de MK2 par des ARNs interférents réduit fortement à la fois le taux de pri-miR-34c et de miR-34c dans les cellules HEK293 et dans les MEFs $p53^{-/-}$, ce qui suggère que MK2 régule l'expression de miR-34c au niveau transcriptionnel. Ainsi, l'inhibition de miR-34c par un anti-miR-34c dans les cellules HEK293 soumises à l'etoposide montre également un échec du checkpoint en S comme lors de l'inhibition de MK2 dans la réponse aux dommages à l'ADN. Cependant, l'intermédiaire entre MK2 et miR-34c reste à identifier *(Cannell et al. 2010)*.

Une étude plus récente démontre l'importance de MK2 dans la régulation de l'expression des micro-ARNs. Parmi 345 micro-ARNs analysés dans les MEFs déficients en MK2, le niveau de 83 micro-ARNs est au moins deux fois moins élevé contre celui de 13 autres micro-ARNs qui augmente plus de deux fois, en comparaison à ceux mesurés dans les MEFs sauvages. La régulation de l'expression de ces micro-ARNs par MK2 est relayée par p68, appelé également DDX5. p68 est un composant du complexe Drosha qui permet le clivage des pri-micro-ARNs en pré-micro-ARNs. MK2 phosphoryle p68 sur la sérine 197 et permet la translocation de p68 du cytoplasme au noyau dans les MEFs. D'une part, la phosphorylation de p68 par MK2 est requise pour l'incorporation de p68 dans le complexe Drosha. D'autre part, elle permet la diminution de

l'expression de c-Myc *via* la maturation de miR-145 qui cible ainsi c-Myc dans les MEFs et dans les cellules cancéreuses du sein MCF7 *(Hong et al. 2013)*. L'induction de miR-34c et miR-145 par MK2 contribuerait ainsi à l'augmentation des ARNm de GADD45α qui seront ensuite stabilisés par les cibles de MK2, PARN et hnRNP A0. Ces processus permettent d'entretenir l'activation de MK2 et ainsi de maintenir l'arrêt du cycle jusqu'à la réparation complète des dommages à l'ADN (Figure 17).

La régulation des micro-ARNs par MK2 peut être également relayée par Ago-2 (Argonaute-2). Il s'agit du premier membre identifié du complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex). La protéine Ago-2 est indispensable à l'expression et à la maturation des micro-ARNs. Elle est phosphorylée sur la sérine 387 dans les cellules HEK293T traitées à l'arsénite de sodium ou à l'anisomycine. Il a été ainsi démontré que MK2 est capable de phosphoryler *in vitro* Ago-2 sur la sérine 387. Cette phosphorylation est nécessaire au recrutement d'Ago-2 dans des granules de stress. Ces granules de stress peuvent séquestrer certaines protéines pro-apoptotiques et constituent également un réservoir d'ARNm de protéines de survie. La localisation d'Ago-2 dans ces granules pourrait ainsi contribuer au rôle de survie de MK2 en condition de stress cellulaire *(Zeng et al. 2008)*.

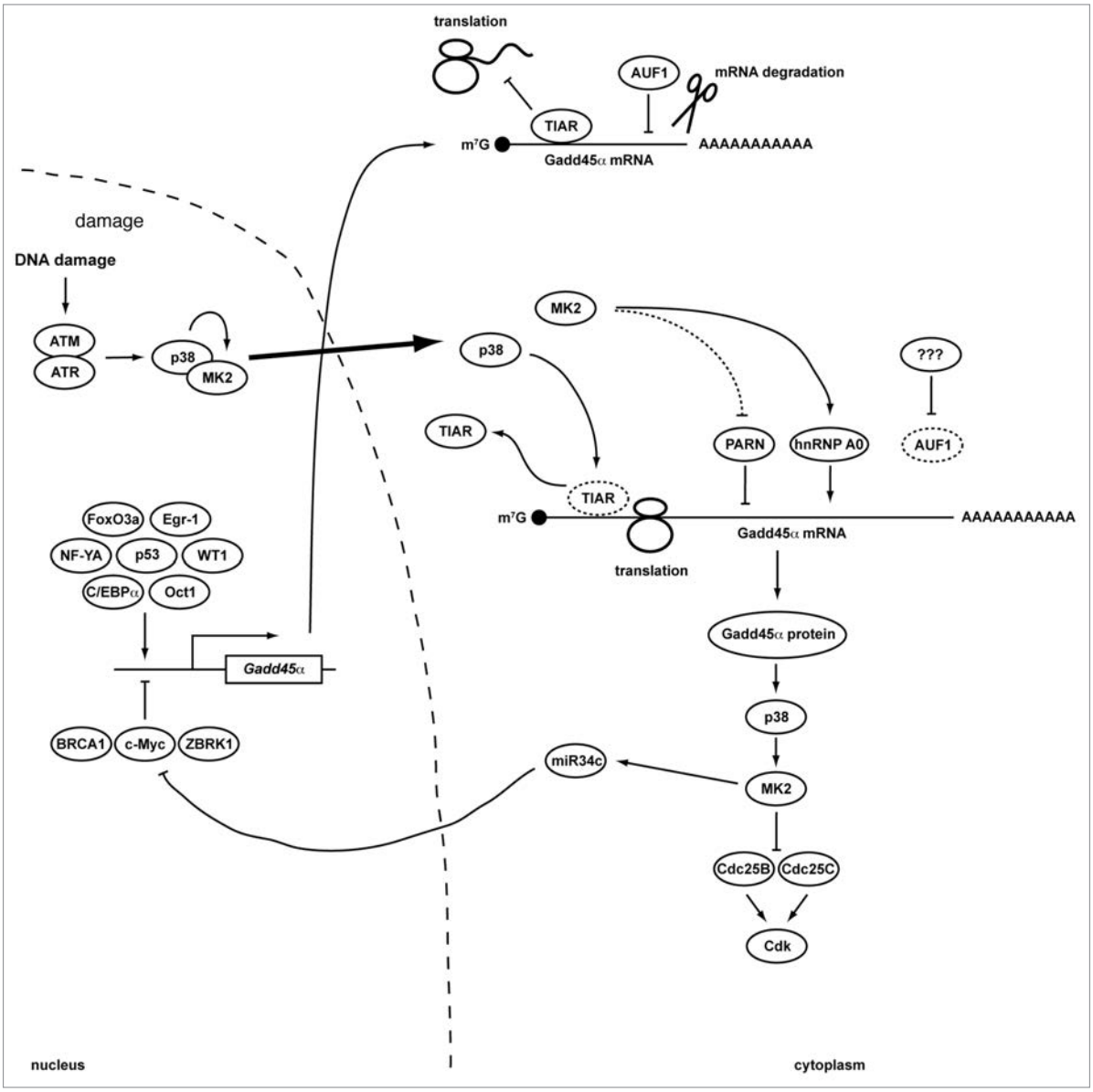


Figure 17 : L'expression de GADD45α est amplifiée par MK2 via la stabilisation des ARNm de GADD45α et l'induction des micro-ARNs régulateurs négatifs de c-Myc (Reinhardt et al. 2011).

2-3-3-Régulation de la voie Akt

Plusieurs cibles de MK2 ont été décrites dans la fonction anti-apoptotique. Celle-ci peut être assurée par la kinase de survie Akt. En effet, Akt a été impliquée dans la survie cellulaire en réponse à différents stimuli de stress. La diminution de son expression par des ARNs interférents réduit l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et augmente celle de la protéine pro-apoptotique Bax dans les cellules cancéreuses du sein MCF-7 soumises aux rayons ultra-violets. Dans ces mêmes conditions, la diminution d'Akt provoque une baisse de la viabilité cellulaire

avec une forte induction des protéines régulatrices du cycle cellulaire p21 et p53, et de l'entrée des cellules en apoptose *(Kanagasabai et al. 2010)*. L'activation d'Akt est nécessaire à cette survie. Shie et ses collègues ont démontré ainsi que l'inhibition d'Akt par la triciribine induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses pulmonaires PC6 traitées soient par l'etoposide ou le TNF-α ou H_2O_2 *(Shi et al. 2011)*.

Akt est activée par phosphorylation sur la thréonine 308 et la sérine 437 par la PI 3-K (Phosphatidylinositol 3-Kinase). L'équipe d'Alessi a été la première à montrer que MK2 est capable de phosphoryler *in vitro* Akt sur la sérine 437 et non sur la thréonine 308. Alors que ces deux phosphorylations d'Akt sont requises pour l'activation complète d'Akt *(Alessi et al. 1996)*. De plus, cette étude indique que la phosphorylation d'Akt en réponse aux différents stimuli de stress qui activent fortement MK2 dans les fibroblastes embryonnaires murins 3T3 et dans les cellules HEK293, est inhibée uniquement en présence des inhibiteurs de PI 3-K. Alessi et ses collaborateurs ont suggéré ainsi que la phosphorylation d'Akt est indépendante de l'activation de MK2 *(Shaw et al. 1998)*.

Des recherches plus récentes contredisent les résultats de l'équipe d'Alessi. La phosphorylation sur la sérine 437 d'Akt est inhibée d'une part, par un inhibiteur peptidique de MK2 dans les neutrophiles humains stimulés par le fMLP *(Rane et al. 2001)* et dans les cellules VSMCs (Vascular Smooth Muscle Cells) traitées avec de l'angiotensine II *(Taniyama et al. 2004)* et d'autre part, par des ARNs interférents dirigés contre MK2 dans les cellules Caco-2 *(Hu et al. 2006)*. Szyniarowski et ses collègues démontrent que la suppression de l'expression de MK2 par des ARNs interférents dans les cellules cancéreuses du sein MCF-7 diminue fortement la phosphorylation d'Akt, à la fois celle de la sérine 437 et celle de la thréonine 308 *(Szyniarowski et al. 2011)*.

Pour être activée, Akt doit être recrutée à la membrane plasmique *via* son domaine PH (Pleckstrin Homology) par PIP_3 (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate). Il a été observé que la production de PIP_3 dans les macrophages murins Raw264.7 soumis au LPS est bloquée par un inhibiteur de MK2, PF3644022 *(McGuire et al. 2013)*. L'activation de MK2 semble donc indispensable à la phosphorylation et à l'activation d'Akt.

2-3-4-Régulation de la voie MDM2/p53

MK2 peut favoriser la survie en modulant de manière indirecte l'activité de p53 par le biais de la phosphorylation de son régulateur négatif HDM2 (Human Double Minute 2), plus connu sous le nom de MDM2 (Mouse Double Minute 2), son homologue murin. En condition normale, le

facteur de transcription p53 a une durée de vie relativement faible. Selon le type de stress ou par l'influence du microenvironnement, p53 peut être stabilisé et ainsi activé. Une fois activé, p53 permet l'expression de nombreux gènes qui sont impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, dans la réparation de l'ADN, dans l'apoptose ou encore dans différentes réponses adaptatives. p53 induit également l'expression de son principal régulateur négatif MDM2 contrôlant ainsi sa propre régulation. MDM2 est une E3 ubiquitine ligase qui se lie à p53. Elle peut ajouter des groupements ubiquitines sur p53, ce qui entraine la dégradation de p53 dans le noyau même. Elle peut également faciliter l'export de p53 mono-ubiquitiné du noyau vers le cytoplasme. A l'aide d'un co-facteur telle que l'ubiquitine ligase E4 dans le cytoplasme, MDM2 catalyse la poly-ubitiquinylation de p53 et induit la dégradation de p53 par le protéasome. MDM2 est hautement régulée par phosphorylation en réponse aux dommages à l'ADN mais aussi aux facteurs de croissance (Figure 18) *(Shi et al. 2012)*.

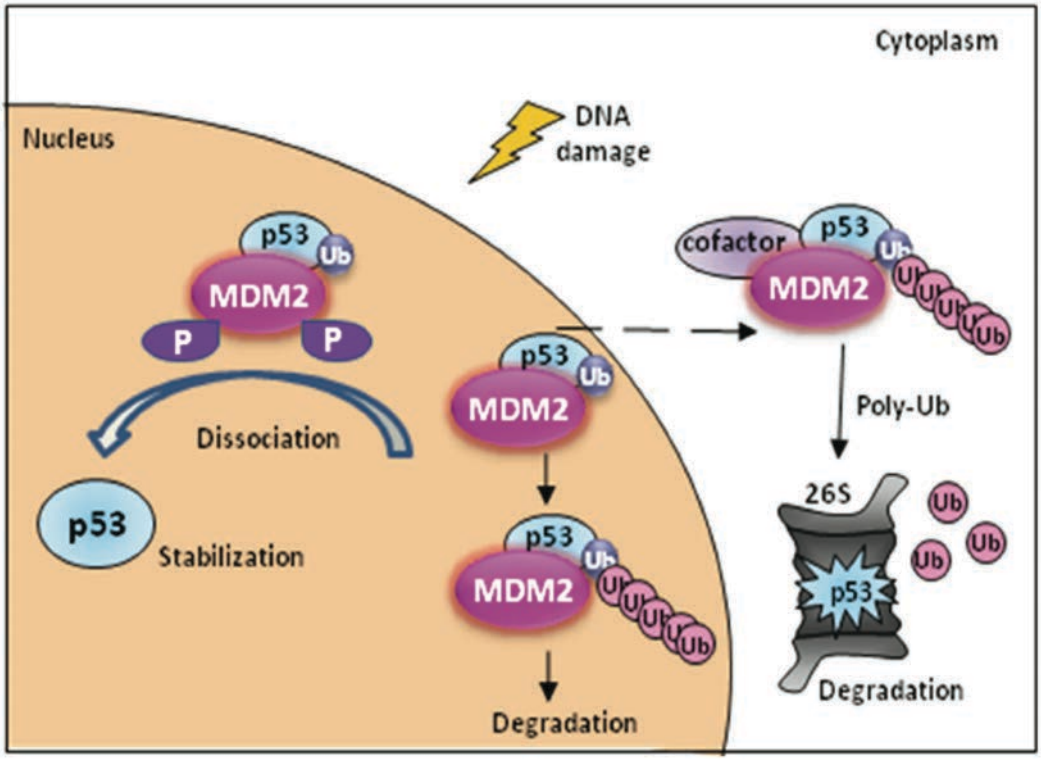


Figure 18 : Modulation de l'ubitiquinylation de p53 par MDM2 (Shi et al. 2012).

Weber et ses collaborateurs ont montré que MK2 était capable de phosphoryler *in vitro* MDM2 sur les sérines 157 et 166. Les formes phospho-mimétiques des sérines 157 et 166 de MDM2 rendent MDM2 plus active dans la dégradation de p53 dans les cellules U2OS. Lorsque les cellules U2OS cultivées en présence ou non de sérum, sont soumises à l'anisomycine, MDM2 est

fortement phosphorylée sur la sérine 166. Ceci suggère que MK2 peut être responsable de la phosphorylation de MDM2 en réponse à l'anisomycine. L'importance de MK2 dans cette phosphorylation est confirmée dans les fibroblastes 3T3 dérivés des souris déficientes en MK2. La phosphorylation sur la sérine 166 de MDM2 est inhibée dans ces fibroblastes contrairement aux fibroblastes murins sauvages. L'absence de MK2 dans les MEFs soumis aux rayons ultra-violets entraine une stabilisation de p53 qui résulte d'une diminution de la phosphorylation de MDM2. Ainsi le nombre de cellules entrant en apoptose en réponse aux rayons ultra-violets est multiplié par quatre dans les MEFs déficients en MK2 en comparaison aux MEFs sauvages *(Weber et al. 2005)*.

De même, l'implication de la voie MK2/MDM2 dans la réponse anti-apoptotique a été démontrée dans un modèle de carcinogenèse de la peau. Des doses de DMBA/TPA (7,12-dimethylbenz[a]anthracène/12-O-tetradecanoylphorbol-13-acétate) ont été appliquées sur la peau des souris sauvages ou déficientes en MK2. Des biopsies de peau de ces souris ont été ensuite effectuées. Des extraits nucléaires de biopsies de peau des souris déficientes en MK2 traitées au DMBA/TPA présentent un niveau nettement plus élevé de p53 qui est corrélé à une diminution de la phosphorylation/activation de MDM2 par rapport aux extraits provenant des souris sauvages. L'augmentation du nombre de cellules mortes dues au traitement DMBA/TPA observée dans la peau des souris invalidées pour MK2 en comparaison au nombre de cellules mortes dans la peau des souris sauvages est le résultat de la stabilisation de p53 *(Johansen et al. 2009)*.

MK2 régule négativement la voie p53 à travers la phosphorylation d'une autre protéine, le facteur de transcription AATF (Apoptose Antagonizing Transcription Factor), en réponse aux stress génotoxiques. En condition basale, AATF est séquestré dans le cytoplasme par sa liaison à MRLC3 (Myosin-Regulatory Light Chain-3). A la suite de différents stimuli de stress tels que les rayons ultra-violets, la doxorubicine ou l'augmentation de la pression osmotique, AATF se détache de MRLC3 et transloque dans le noyau. MK2 phosphoryle *in vitro* AATF sur la thréonine 366. Cette phosphorylation provoque la dissociation entre AATF et MRLC3. Des résultats d'expériences sur les MEFs déficients en MK2 soumis aux rayons ultra-violets indiquent une accumulation d'AATF dans le cytoplasme contrairement à la localisation nucléaire d'AATF dans les MEFs sauvages. MK2 est ainsi responsable de la translocation d'AATF dans les cellules stressées.

Dans le noyau, AATF se lie aux régions promotrices de gènes codant des protéines pro-apoptotiques telles que BAX (Bcl-2-Associated X protein), BAK (Bcl-2 homologous Antagonist

Killer) et de PUMA (p53 Upregulated Modulator of Apoptosis). AATF, en se fixant sur ces gènes, empêche leur transcription par p53. A l'inverse, l'AATF nucléaire ne régule pas l'expression de gènes codant des protéines d'arrêt du cycle cellulaire. Cela entraine alors l'expression de ceux-ci induite par p53 comme *CDKN1A* qui code la protéine p21, *GADD45α*, et *RPRM* (TP53 dependent G2 arrest mediator candidate) *(Hopker et al. 2012)*. En retour, GADD45α maintient l'activation de la voie p38/MK2 *(Reinhardt et al. 2010)*. La voie MK2/AATF temporise ainsi les fonctions pro-apoptotiques de p53 tout en favorisant ses fonctions de checkpoints, laissant le temps aux réparations des dommages à l'ADN d'être effectuées (Figure 19).

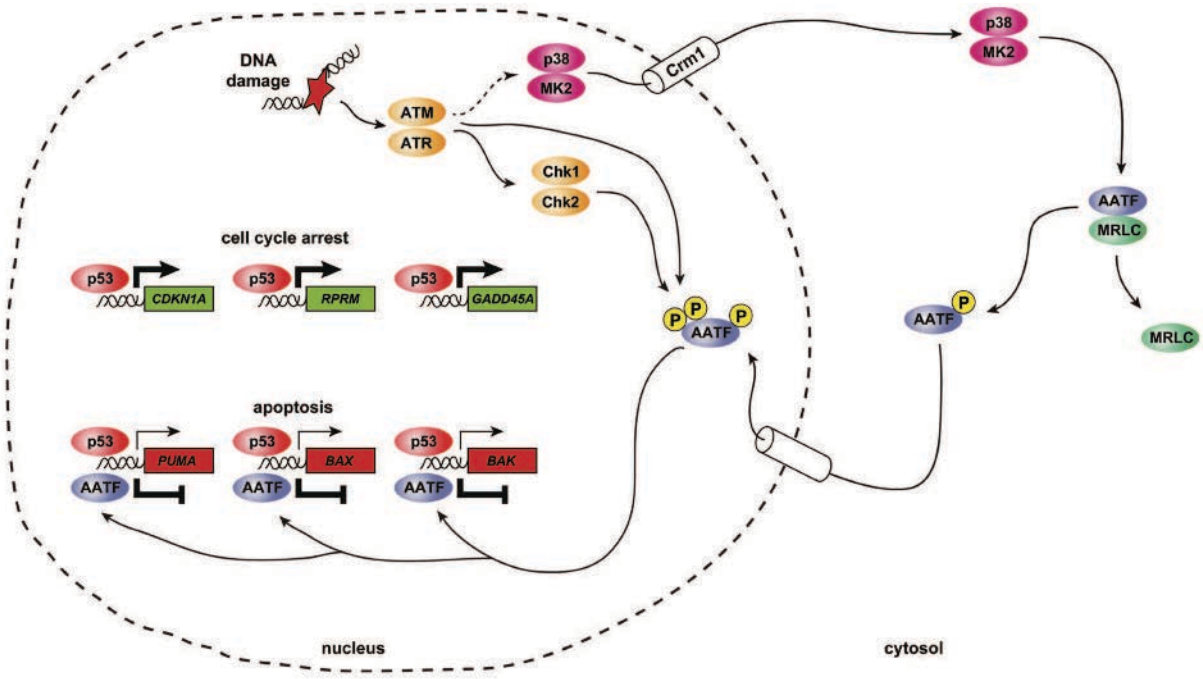


Figure 19 : Régulation positive d'AATF par la voie p38/MK2 (Hopker et al. 2012).

3-Rôle de MK2 dans la mitose et la croissance cellulaire

Il existe également d'autres cibles de MK2 moins connues dont la phosphorylation par MK2 est peu étudiée. Parmi lesquelles, on peut retenir la kinase Plk1 (Polo-like kinase 1). Cette dernière joue un rôle majeur dans la régulation du cycle cellulaire. Son expression est faible durant l'interphase mais est augmentée pendant la phase G2 pour atteindre un niveau d'expression maximal en mitose. MK2 interagit avec Plk1 et la phosphoryle sur la sérine 326 dans les cellules HeLa, durant leurs deux premières phases de la mitose, prophase et métaphase. Cette

phosphorylation est augmentée lorsque les cellules sur-expriment MK2 et est diminuée en absence de MK2. Plk1 phosphorylée sur la sérine 326 permettrait, en recrutant la γ-tubuline aux centrosomes, la formation des fuseaux mitotiques nécessaire à la progression de la mitose. La mutation inhibitrice de cette phosphorylation retarde la sortie des cellules de mitose. Les cellules déplétées en MK2 présentent ainsi des défauts mitotiques dus à une défaillance dans la phosphorylation de Plk1 *(Tang et al. 2008)*.

MK2 participe également à la croissance cellulaire en régulant négativement TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2). TSC2 appelé également tuberin, forme un complexe avec TSC1. TSC1 et TSC2 sont deux suppresseurs de tumeur. La délétion hétérozygote de TSC2 ou de TSC1 chez la souris entraine un développement de carcinomes rénaux de 100%. Les cancers sporadiques tels que ceux de la prostate, du poumon, du colon, de l'endomètre ou du sein sont associés à des mutations dans le gène des TSCs *(Mak et al. 2004)*. Le complexe TSC1/TSC2 régule négativement la croissance cellulaire à travers l'inhibition de la traduction des ARNm en protéines. Le complexe réduit la phosphorylation de la kinase S6K (ribosomal protein S6 Kinase) activatrice de la traduction d'une part et active le régulateur négatif de la traduction, 4E-BP1 (initiation factor 4E-Binding Protein 1) d'autre part.
MK2 phosphoryle TSC2 sur la sérine 1210 en réponse au sérum ou à l'anisomycine dans les cellules HEK293. Cette phosphorylation entraine la liaison de TSC2 à la protéine adaptatrice 14-3-3, qui est alors retenu dans le cytoplasme et ne peut plus exercer sa fonction inhibitrice de la traduction. Seul un dominant négatif de MK2 empêche la liaison entre TSC2 et 14-3-3 induite par le sérum ou l'anisomycine. L'utilisation d'inhibiteurs de voies MEK ou de PI 3-K n'a aucun effet sur cette liaison *(Li et al. 2003)*. Il est possible qu'en phosphorylant TSC2, MK2 empêche l'action inhibitrice de TSC2 sur la synthèse protéique favorisant ainsi la croissance cellulaire (Figure 20).

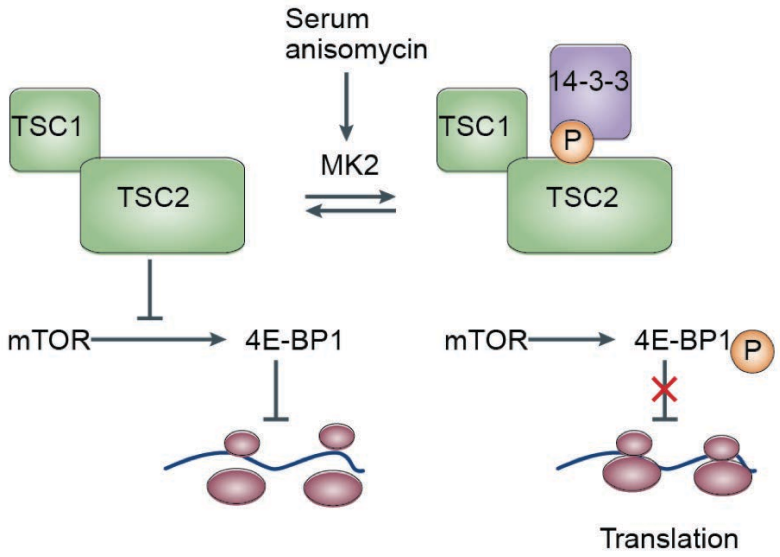


Figure 20 : Régulation de la traduction par MK2 via TSC2 (Gaestel 2006).

Une autre cible intéressante de MK2 est SRF (Serum Response Factor). Il s'agit d'un facteur de transcription majeur pour les gènes possédant un élément de réponse au sérum SRE (Serum Response Element). Ces gènes font partie d'un ensemble de gènes connus sous le nom d'IEGs (Immediate Early Gene). Ils codent un grand nombre de protéines de survie et de croissance. Heindenreich et ses collaborateurs ont été les premiers à démontrer que MK2 est capable de phosphoryler SRF sur la sérine 103 dans les cellules HeLa et NIH3T3 en réponse à divers stimuli de stress (anisomycine, arsénite, fluorure de sodium..). Cette phosphorylation est aussi efficace *in vitro* que celle de Hsp27 par MK2. Lorsque les fibroblastes isolés des souris sauvages sont traités à l'arsénite, SRF est phosphorylé sur la sérine 103. Cette phosphorylation est absente dans les fibroblastes isolés des souris déficientes pour MK2. Cela signifie que MK2 est une kinase majeure de SRF *in vivo (Heidenreich et al. 1999)*. L'expression des IEGs tels que *egr1*, *c-fos*, et *nur77* dans les fibroblastes murins $MK2^{-/-}$ est sévèrement diminuée en comparaison à celle présente dans les fibroblastes sauvages soumis à l'anisomycine. Cette diminution pourrait être liée à l'instabilité de p38 dans les souris invalidées pour MK2, la voie p38/MSK1/CREB (C-AMP Response Element-Binding protein) étant affectée dans les fibroblastes de ces souris. Cependant, l'expression d'un mutant stable de p38 dans les fibroblastes ne rétablit que partiellement l'expression des IEGs induite par l'anisomycine. L'augmentation des ARNm des IEGs est ainsi due à l'activité transcriptionnelle de SRF activé par MK2.

L'expression d'un mutant actif de MK2 dans les MEFs déficients en MK2 permet la transcription des IEGs en présence d'anisomycine. Tandis que l'ajout de l'actinomycine D, qui inhibe la transcription, ne modifie pas significativement l'augmentation du taux des ARNm des IEGs

induite par l'anisomycine dans les MEFs $MK2^{-/-}$ où l'expression de MK2 est restaurée. Cela signifie que la stabilisation des ARNm des IEGs est indépendante de MK2 *(Ronkina et al. 2011)*.

L'activation de la voie MK2/SRF permettrait également aux cellules d'adapter leur métabolisme en situation de stress. Une étude récente a identifié le gène *PFKFB3* (6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase 3) comme une cible de SRF.

PFKFB3 catalyse la synthèse et la dégradation de F26BP (Fructose-2,6-bisphosphate). Le gène *PFKFB3* possède une séquence SRE permettant la fixation de SRF. L'exposition des cellules HeLa ou des cellules humaines de glioblastome multiple, T98G, aux divers stresses tels que H_2O_2, anisomycine ou les rayons ultra-violets induit rapidement la transcription de *PFKFB3*. Dans ces mêmes cellules, lorsque l'activité de MK2 est inhibée à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique PF3644022, le taux d'ARNm de *PFKFB3* reste similaire à celui des cellules non traitées. De même, le taux de transcrits de *PFKFB3* n'est pas affecté dans les MEFs $MK2^{-/-}$ soumis à l'anisomycine ou au sérum. Seule la surexpression d'un mutant constitutivement actif de MK2 dans ces cellules restaure l'expression des ARNm de *PFKFB3*.

MK2 permet non seulement la transcription de PFKFB3 mais aussi l'activation de cette enzyme. En effet, la production de F26BP induite par l'anisomycine dans les cellules HeLa est diminuée lorsque l'activité de MK2 est inhibée. MK2 phosphoryle PFKFB3 sur la sérine 461 *in vitro*. Cette phosphorylation entraine l'activation de PFKFB3. La surexpression de la forme mimant la phosphorylation de la sérine 461 de PFKFB3 conduit à une nette augmentation de la production de F26BP par rapport à celle de PFKFB3 sauvage dans les cellules HeLa, T98G et MCF7. La phosphorylation/activation de PFKFB3 par MK2 est confirmée *in vivo*. Elle est absente dans les MEFs déficients en MK2 traités à l'anisomycine, ce qui correspond à une non-élévation de F26BP (Figure 21) *(Novellasdemunt et al. 2013)*.

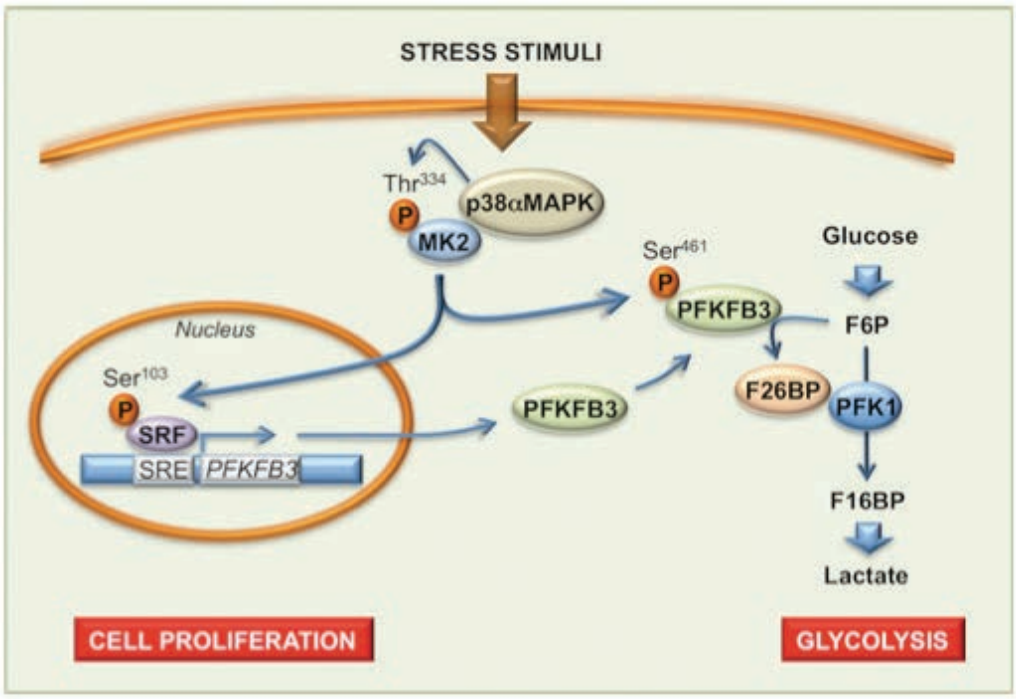


Figure 21 : Implication de MK2 dans le métabolisme cellulaire en condition de stress (Bolanos 2013).

CHAPITRE III : REGULATION DE LA PROTEINE DE STRESS HSP27 PAR MK2

Bien que Hsp27 (Hsp25 chez la souris) puisse être phosphorylée *in vitro* par plusieurs kinases telles que PKC, PKD, MK5..., *in vivo*, MK2 est la kinase qui phosphoryle de manière préférentiellement Hsp27 *(Kostenko et al. 2009)*. Le stress oxydatif induit l'activation des trois voies MAPKs (ERK, JNK et p38) mais seule l'inhibition de la voie p38 abroge la phosphorylation de Hsp27 *(Gaitanaki et al. 2003)*. MK2 phosphoryle Hsp27 sur trois sérines 15, 78 et 82, avec une préférence pour la sérine 82 *(Stokoe et al. 1992)* (Figure 22). Dans la séquence protéique de Hsp25 (homologue murin de Hsp27), la sérine 78 est manquante et la sérine 82 correspond à la sérine 86 *(Gaestel et al. 1991)*. Des expériences de transfection de dominants négatifs constitutivement actif ou inactif de MK2 dans plusieurs types cellulaires démontrent que la phosphorylation de Hsp27 est fortement dépendante de MK2 *(Xu et al. 2006)*. *In vivo*, la phosphorylation de HSP27 est réduite dans le tissu cardiaque des souris déficientes en MK2 soumises au LPS *(Kotlyarov et al. 1999)* et dans les MEFs traités à l'arsenite provenant de ces souris *(Vertii et al. 2006)*.

Hsp27 est une protéine chaperonne ATP-indépendante *(Jakob et al. 1993)*. Elle existe sous plusieurs formes homo-oligomères ou hétéro-oligomères, monomères, dimères, tétramères et peut former dans la cellule des agrégats d'oligomère supérieurs à 800 kDa. La partie N-terminale de Hsp27 possède un domaine WDPF (tryptophane, acide aspartique, proline et phénylalanine) essentiel à l'oligomérisation, suivi d'une séquence partiellement conservée dont la fonction est inconnue. Hsp27 comme toutes les Hsps contient un domaine « a-crystalline » conservé, nécessaire également à l'oligomérisation. Son extrémité C-terminale est une région flexible qui participerait aux interactions avec des protéines partenaires, à l'oligomérisation et serait particulièrement importante pour la solubilité de Hsp27 (Figure 22). Parallèlement à sa fonction de protéine chaperonne, Hsp27 est impliquée dans plusieurs réponses physiologiques telles que la stabilité et la polymérisation des filaments d'actine, la migration cellulaire, la stabilité des ARNm, l'apoptose... *(Kostenko et al. 2009)*. Son rôle dans ces réponses est fortement régulé par la phosphorylation.

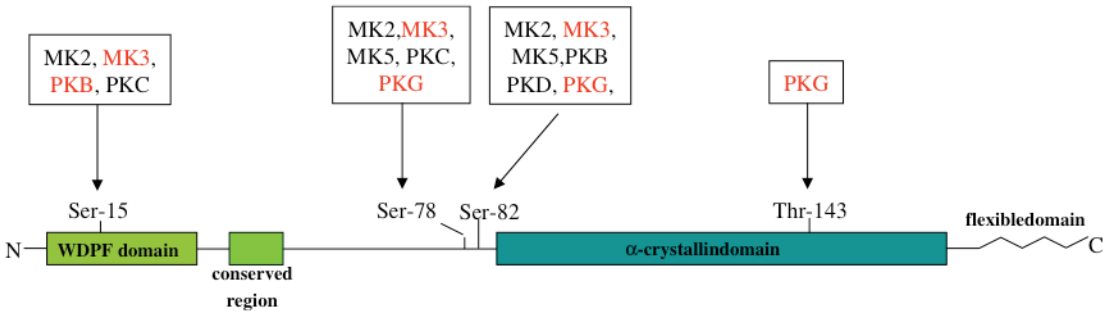


Figure 22 : Structure primaire de Hsp27 et sites de phosphorylation (Kostenko et al. 2009).

1-Implication de MK2/Hsp27 dans la dynamique du cytosquelette d'actine

Hsp27 est une protéine de coiffe des filaments d'actine. Sous sa forme non-phosphorylée, Hsp27 inhibe la polymérisation d'actine. Lors d'un stress, la phosphorylation de Hsp27 induit des changements conformationnels réduisant la taille multimérique de Hsp27 et les interactions avec ses partenaires, sans affecter ses propriétés de chaperonne *(Knauf et al. 1994, Lavoie et al. 1995)*. Phospho-Hsp27 stabilise alors les filaments d'actine en les empêchant de former des agrégats *(Guay et al. 1997, Clerk et al. 1998)*. En se dissociant des extrémités des filaments d'actine, Hsp27 permet leur élongation *(Benndorf et al. 1994, Piotrowicz et al. 1998)* (Figure 23).

Butt et ses collaborateurs ont été les premiers à démontrer que la triple phosphorylation de Hsp27 par MK2 augmente la polymérisation de l'actine dans les plaquettes humaines *(Butt et al. 2001)*. L'implication de la voie MK2/Hsp27 dans le remodelage du cytosquelette d'actine et dans la migration cellulaire a été ensuite décrite dans plusieurs types cellulaires et en réponse à divers stimuli. La surexpression de la forme active de MK2 ou de la forme tri-phosphorylée de Hsp27 par la substitution des sérines en acides aspartiques (Hsp27-Ser15/78/82Asp) entraine la formation des fibres de stress dans les cellules endothéliales pulmonaires de rat RPMEC *(Kayyali et al. 2002)*. En revanche, la surexpression de la forme non-phosphorylable de Hsp27 (Hsp27-Ser15/78/82Ala) dans les myoblastes murins C2C12 inhibe leur migration induite par BPM-2 (Bone Morphogenetic Protein-2) *(Gamell et al. 2011)*. La migration des cellules HeLa induite par la chimiokine CXCL12 est abolie par la réduction de l'expression de MK2 ou de Hsp27 par des ARNs interférents dans ces cellules *(Rousseau et al. 2006)*.

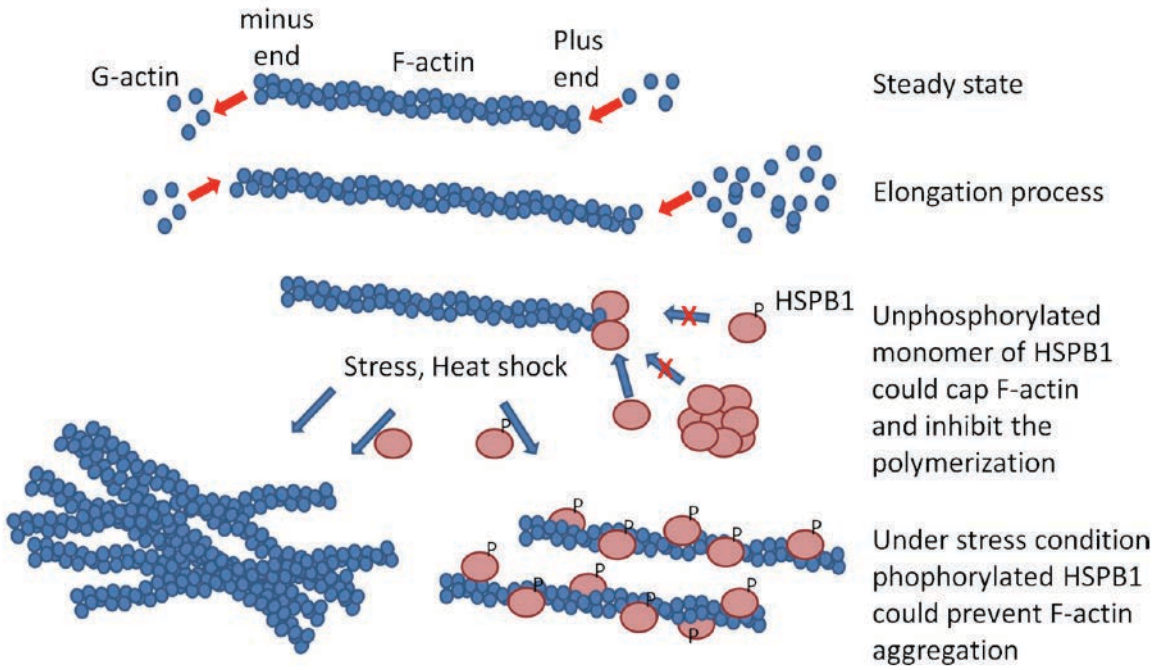


Figure 23 : Régulation de la dynamique des filaments d'actine par Hsp27 (Wettstein et al. 2012).

2- IMPLICATION DE MK2/HSP27 DANS LA SURVIE CELLULAIRE

L'implication de Hsp27 dans la survie cellulaire en condition de stress est bien connue. L'augmentation d'expression de Hsp27 lors d'un choc thermique est accompagnée d'une stabilité croissante des fibres de stress. L'inhibition de l'induction de Hsp27 en réponse à l'hyperthermie est associée à une activité croissante des caspases et ainsi à l'augmentation du nombre de cellules entrant en apoptose *(Gorman et al. 1999)*. Hsp27 permet non seulement une thermo-tolérance mais réduit également la mortalité cellulaire provoquée par des agents cytotoxiques *(Lavoie et al. 1993, Garrido et al. 1997)*. Hsp27 empêche l'apoptose des cellules provoquée par d'autres types de stress telles qu'une stimulation du récepteur Fas/APO-1 (Apoptosis antigen 1) ou la staurosporine, un agent anti-cancéreux *(Mehlen et al. 1996)*.

Hsp27 inhibe l'apoptose en inactivant la cascade des caspases. L'élévation du cytochrome c cytoplasmique après un choc thermique est accélérée dans la lignée HeLa-ASHsp27-1 qui exprime peu Hsp27 contrairement à la lignée HeLa-neo15 qui sur-exprime Hsp27. Ceci explique pourquoi les cellules HeLa-neo15 survivent mieux aux doses croissantes de staurosporine que les cellules HeLa-Ahsp27-1 *(Paul et al. 2002)*. De plus, en se liant à la pro-caspase-3, Hsp27 l'inactive *(Pandey et al. 2000)* (Figure 24). De nombreuses études indiquent ainsi que la surexpression de Hsp27 dans les cellules confère une résistance à l'apoptose. Lorsque les cellules sont stimulées,

une partie des Hsp27 est phosphorylée mais non dans sa totalité. Afin de déterminer l'influence de la phosphorylation de Hsp27 dans la résistance aux stress, plusieurs études ont utilisé les formes phosphorylées et non-phosphorylées de Hsp27 par la substitution des sérines.

Les cellules pancréatiques cancéreuses Panc1 qui expriment la forme tri-phosphorylée de Hsp27 (Hsp27-Ser15/78/82Asp) présentent une vitesse de prolifération inférieure à celle des cellules exprimant la forme non-phosphorylable de Hsp27 (Hsp27-Ser115/78/82Ala) en condition basale *(Nakashima et al. 2011)*. Ceci suggère que la phosphorylation de Hsp27 réduit la prolifération. Cependant, plusieurs études concluent le contraire et ce, dans d'autres types cellulaires. En présence de cytochalasine D, un inhibiteur de la polymérisation d'actine, les cellules de hamster CCL39 exprimant Hsp27 non-phopshorylable s'arrêtent de proliférer et meurent. A l'inverse, les cellules contenant Hsp27 sauvage survivent et continuent de proliférer *(Lavoie et al. 1995)*. De plus, la surexpression de Hsp27 sauvage confère une résistance au stress oxydatif généré par H_2O_2 contrairement à celle de Hsp27 non-phosphorylable dans les cellules de hamster *(Huot et al. 1995)*. Ainsi, Hsp27 non-phosphorylable ne serait pas capable de protéger les cellules contre le stress oxydatif (Figure 24).

Rogalla et ses collaborateurs ont démontré que seules la forme sauvage, les formes mono et bi-phosphorylée de Hsp27 (respectivement Hsp27-Ser15Asp et Hsp27-Ser78/82Asp) permettent aux cellules fibroblastiques murines L929 de survivre au stress oxydatif induit par H_2O_2. Ce n'est pas le cas de la forme tri-phosphorylée Hsp27-Ser15/78/82Asp *(Rogalla et al. 1999)*. Tandis que les cellules humaines de muscle lisse bronchique BSMC sont capables de résister à H_2O_2 lorsqu'elles expriment Hsp27 tri-phosphorylée. En effet, la surexpression de Hsp27 sauvage ou de Hsp27-Ser15/78/82Asp permet une synthèse de glutathion, un puissant antioxydant, dans ces cellules. En diminuant le stress oxydatif, Hsp27 sauvage ou tri-phosphorylée réduit la mort cellulaire *(Salinthone et al. 2007, Jackson et al. 2008)*. Cependant, le contenu en glutathion dans les poumons des souris invalidées pour MK2 reste inchangé. On notera que le contenu en glutathion dans le foie des souris invalidées pour MK2 est diminué de 21% et que l'expression de Hsp27 est augmentée dans les deux organes. Aucune phosphorylation de Hsp27 n'est détectée dans ces tissus *(Jackson et al. 2010)*. La participation de MK2/Hsp27 dans la synthèse de glutathion pourrait être organe-dépendant, ce qui reste à déterminer.

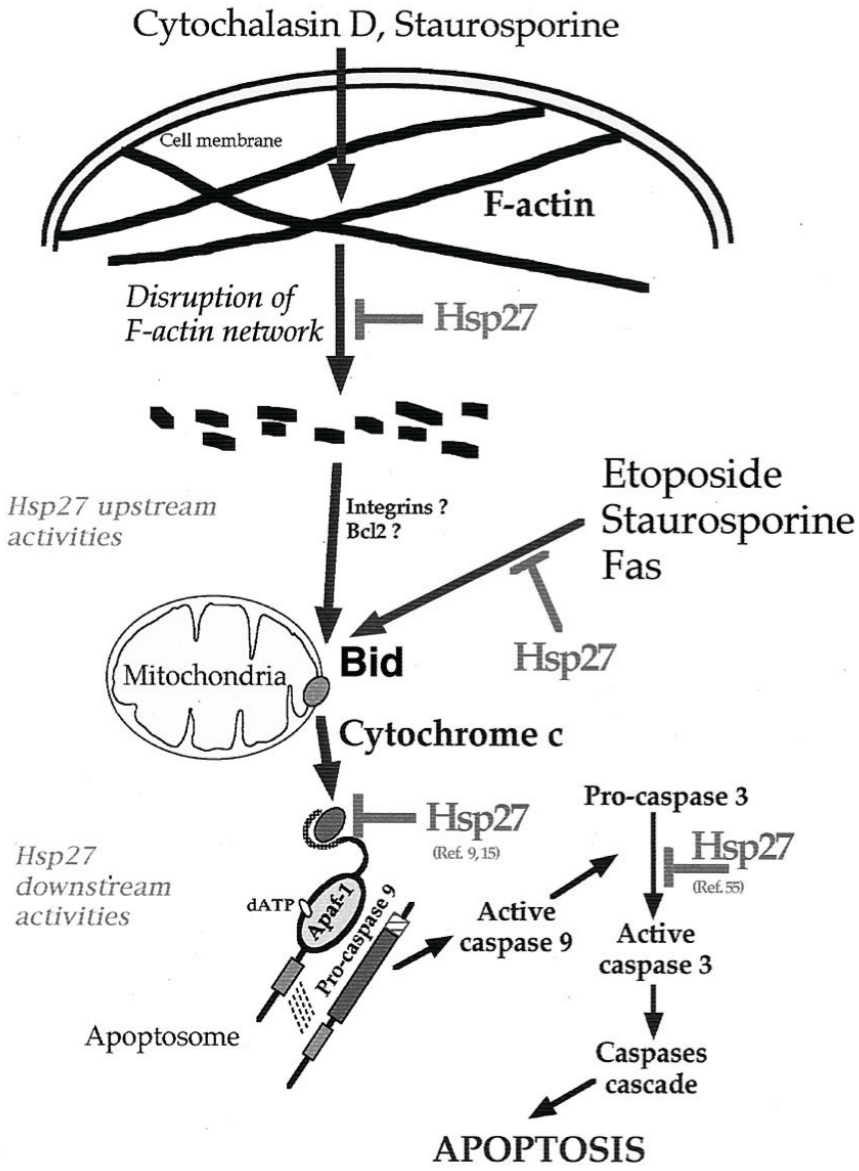


Figure 24 : Inhibition de l'apoptose par Hsp27 (Paul et al. 2002).

Le concept selon lequel la voie MK2/Hsp27 confère une survie cellulaire, est soutenu par quelques études récentes. Les cellules cancéreuses du poumon PC6 soumises aux différents types de stress (H2O2, Etoposide ou TNFa) présentent une augmentation du clivage de la caspase-3 et subissent l'apoptose en présence d'un dominant-négatif de MK2. La substitution des sérines phosphorylables par MK2 par des alanines non-phosphorylables dans Hsp27 augmente également le clivage de la caspase-3 et l'apoptose de ces cellules dans les mêmes conditions *(Shi et al. 2011)*. L'équipe de Yin confirme ces résultats en proposant que la phosphorylation de Hsp27 par MK2 soit essentielle à l'activation des voies pro-survie. L'apoptose des cellules HeLa en réponse au TNF-α est augmentée en absence de MK2 ou de la tri-phosphorylation de Hsp27 dans ces cellules. En effet, dans les cellules HeLa, l'inhibition de MK2 par l'inhibiteur

pharmacologique CMPD1 ou par des ARNs interférents diminue la phosphorylation des kinases ERK et p38 induite par le TNF-α. Alors que la surexpression de Hsp27 tri-phosphorylée augmente cette phosphorylation. Le TNF-α entraine l'interaction entre Hsp27 phosphorylée et la kinase pro-survie TAK1 (Transforming growth factor β-Activated Kinase), une kinase en amont d'ERK et de p38, dans les cellules HeLa. L'interaction entre Hsp27 et TAK1 dépend de l'activation de MK2 puisque l'inhibition de MK2 diminue cette interaction. Cette dernière est nécessaire à l'activation de TAK1. En absence d'activité de MK2 ou de tri-phosphorylation de Hsp27, la phosphorylation/activation de TAK1 est diminuée. La fonction de survie de la voie MK2/Hsp27 serait relayée ainsi par TAK1 *(Qi et al. 2014)*. Par ailleurs, la voie MK2/Hsp27 est aussi nécessaire à l'activation des voies pro-survie Src/Akt en réponse à TRAIL (Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand). TRAIL induit la phosphorylation activatrice de Src et d'Akt dans les cellules HeLa. Cette phosphorylation est abolie lorsque MK2 est déplétée dans les cellules. De même, lorsque les cellules surexpriment la forme non phosphorylée de Hsp27 (sérines 78 et 82), la phosphorylation de Src et d'Akt est inhibée. Cela provoque l'apoptose des cellules HeLa soumises au TRAIL. L'expression de Hsp27 tri-phosphorylée atténue cet effet contrairement à celle de Hsp27 non-phosphorylée ou à l'absence de MK2 dans ces cellules. De manière similaire à TAK1, l'activation de Src nécessite l'interaction entre Src et Hsp27 phosphorylée. L'absence de la phosphorylation de Hsp27 provoquée par la déplétion de MK2 dans les cellules diminue l'interaction entre Src et Hsp27 *(Qi et al. 2014)*. La phosphorylation de Hsp27 par MK2 serait indispensable pour activer les différentes voies de survie en réponse aux stimuli qui induisent la mort cellulaire.

Quelques études suggèrent que la fonction de survie de Hsp27 est associée à sa capacité de former des complexes multi-protéiques, en particulier avec la kinase anti-apoptotique Akt. Il a été démontré que Hsp27, Akt, MK2, p38 pouvaient former un complexe dans la cellule. Lorsque les neutrophiles sont traités avec du fMLP ou lorsque les cellules de fibrosarcome murin L929 sont sont traitées par H_2O_2, MK2 phosphoryle Akt et Hsp27. Une fois phosphorylée, Hsp27 se dissocie de ses trois partenaires p38, MK2 et Akt *(Rane et al. 2001, Zheng et al. 2006)*. Hsp27 serait nécessaire à l'activation d'Akt par MK2. Dans les granulocytes polynucléaires, des anticorps anti-Hsp27 empêchent l'interaction entre Akt et MK2. De même, la liaison MK2/Akt est altérée lorsque Hsp27 est déplétée dans les cellules épithéliales des tubules rénaux HK-11. La perte de l'association entre MK2 et Akt conduit à un déficit de la phosphorylation/activation d'Akt par MK2, ce qui déclenche l'apoptose de ces cellules *(Wu et al. 2007)*. Cependant, une étude récente contredit ces résultats. L'activation d'Akt par MK2 observée dans les macrophages de souris

déficientes en Hsp27 est identique à celle observée dans les macrophages de souris sauvages traités au LPS. La présence de Hsp27 n'est donc pas nécessaire à l'activation d'Akt par MK2 dans ces cellules *(McGuire et al. 2013)*. Il est possible que Hsp27 ne soit pas nécessaire à l'interaction MK2/Akt dans tous les types cellulaires ni en réponse à toutes les catégories de stimuli.

3- Implication de MK2/Hsp27 dans l'expression des mediateurs inflammatoires

Alors que MK2 est un acteur clé de la production des cytokines inflammatoires, le rôle de sa cible majeure Hsp27 dans ce processus est peu étudié. Pourtant Hsp27 peut réguler l'expression des médiateurs inflammatoires à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel.

3-1-Régulation transcriptionnelle des médiateurs inflammatoires par Hsp27

MK2 et Hsp27 réguleraient indirectement le facteur de transcription majeur NF-κB qui est impliqué dans l'expression des médiateurs inflammatoires. Gorska et ses collègues ont démontré que l'activation de MK2 conduit à la rétention de p38 dans le cytoplasme des cellules HUVECs stimulées par le TNF-α. Dans ces cellules, Hsp27 est phosphorylée et participe à cette rétention. En réduisant le niveau de p38 dans le noyau, MK2 et Hsp27 diminuent la phosphorylation activatrice de la kinase MSK1 (Mitogen and Stress-activated protein Kinase 1) par p38 dans ce compartiment. Cela a pour conséquence une réduction de la phosphorylation de la sous-unité activatrice de NF-κB, p65, par MSK1. Paradoxalement, cette réduction de la phosphorylation de p65 n'équivaut pas à une diminution de l'expression des médiateurs inflammatoires.
En effet, p65 contrôle l'expression transcriptionnelle de son propre régulateur négatif IκB qui l'exporte hors du noyau. Une forte activation de p65 entraine une expression élevée d'IκB contrairement à une activation modérée de p65. En absence de MK2, une augmentation rapide du taux d'IκB est observée ce qui provoque une activité transitoire de p65 et une réduction d'expression des médiateurs inflammatoires. En présence de MK2, l'activité transcriptionnelle de p65 est modérée mais plus durable ce qui permet l'augmentation de la transcription de gènes de médiateurs inflammatoires. MK2 et Hsp27 maintiennent l'activation de p65 dans le temps en séquestrant p38 dans le cytoplasme et permettent ainsi l'expression de VCAM-1 dans les cellules HUVECs traitées au TNF-α *(Gorska et al. 2007)*.

De plus, Hsp27 peut induire la dégradation du régulateur négatif de p65, IκB. Lorsque les cellules HeLa sont stimulées par l'IL-1, la kinase TAK1 est phosphorylée ce qui entraine l'activation de la kinase IKK (IκB Kinase). Une fois activée, IKK ubiquitine IκB et conduit IκB à la dégradation. La dégradation d'IκB permet ainsi l'activation de la voie NF-κB. Hsp27 est nécessaire à l'activation complète de la kinase TAK1 (Figure 25). La suppression de Hsp27 ou de TAK1 inhibe l'activité de la kinase IKK dans les cellules HeLa traitées à l'IL-1. Cependant, Alford et ses collègues n'ont détecté que peu de dégradation d'IκB *(Alford et al. 2007)*. Le mécanisme par lequel Hsp27 régule la transcription des médiateurs inflammatoires reste à identifier.

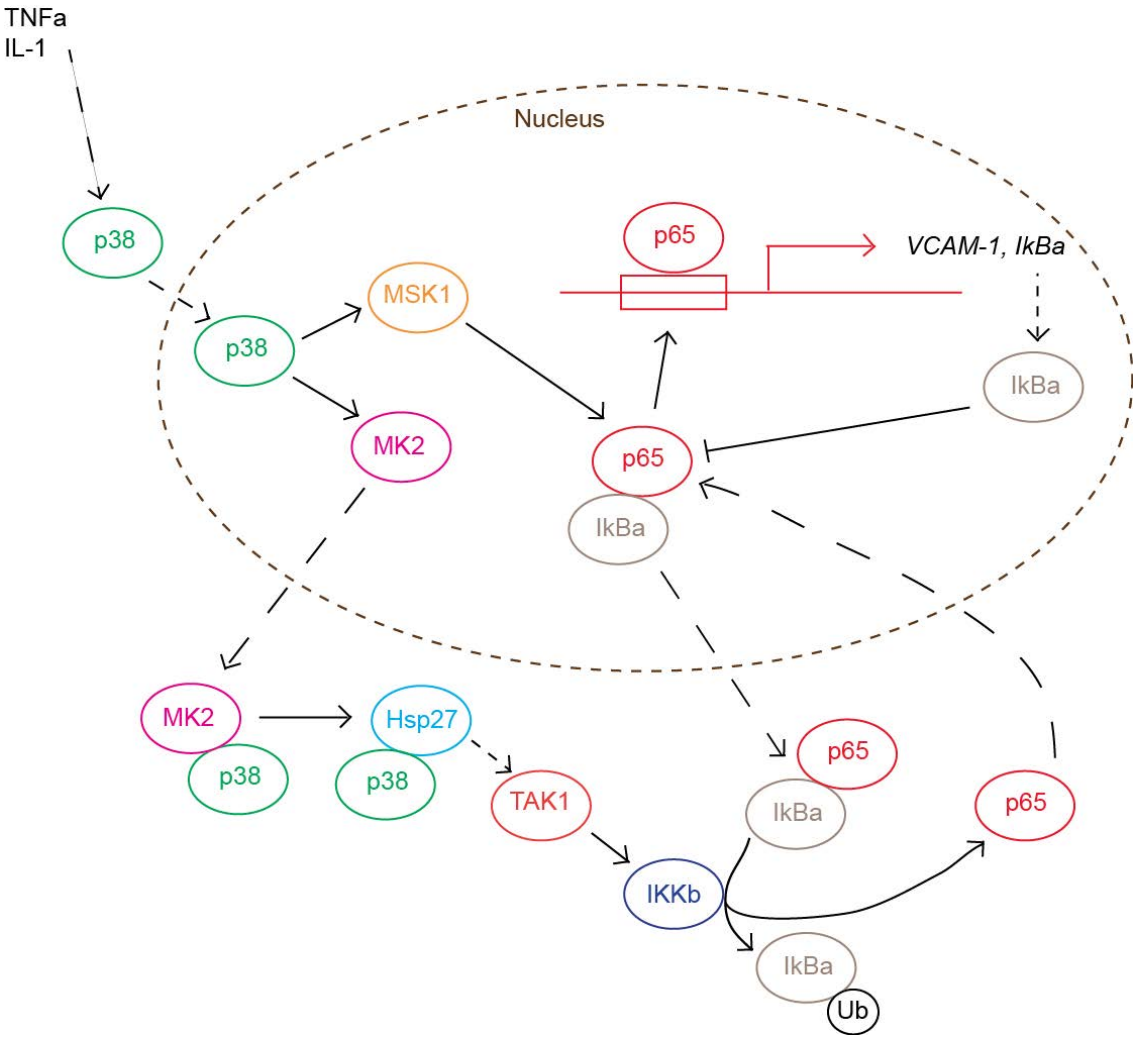


Figure 25 : Régulation transcriptionnelle par la voie MK2/Hsp27.

3-2-Régulation post-transcriptionnelle des médiateurs inflammatoires par Hsp27

Lasa et son équipe ont remarqué que la forme mimant la triple phosphorylation des sérines 15, 78 et 82 de Hsp27 stabilise les ARNm rapporteurs « ß-globin-Cox », qui possèdent des éléments riches en AU (AREs), dans les cellules HeLa. Les formes mimant une simple ou une double phosphorylation de Hsp27 peuvent aussi les stabiliser mais dans une proportion moindre. Toutefois, ces travaux n'ont pas permis d'identifier le mécanisme sous-jacent *(Lasa et al. 2000)*. La déplétion de Hsp27 entraine une diminution de la production d'IL-6, d'IL-8 et de Cox-2 par les cellules HeLa traitées avec de l'IL-1. L'expression de ces cytokines est liée d'une part à leur transcription et d'autre part à la stabilisation de leurs ARNm. L'ajout d'actinomycine D qui inhibe la transcription entraine une diminution de ces ARNm dans les cellules. Cette diminution est majorée en absence de Hsp27. Hsp27 permet ainsi la stabilisation des ARNm d'IL-6, d'IL-8 et de Cox-2 en réponse à l'IL-1 sans affecter ceux de Bcl-x, de GADD45α, de p21 ou de c-Fos. Hsp27 ne stabiliserait pas les ARNm d'IL-6 et de Cox-2 de manière directe mais régulerait leur stabilisation en activant les voies MAPKs en amont de MK2. En effet, l'inhibition de l'expression de Hsp27 dans les cellules provoque une diminution de l'activation de MKK3/MKK6, de p38 et de MK2 *(Alford et al. 2007)*.

Quelques années plus tard, l'équipe de Knapinski a démontré que la surexpression de Hsp27 tri-phosphorylée dans la lignée de monocytes THP-1 stabilise les ARNm de TNF-α et d'IL-1. Hsp27 interagit avec AUF-1 (AU-binding Factor 1) dans un complexe composé de différentes isoformes d'AUF-1, des facteurs d'initiation de la traduction et différents Hsps, capable de recruter la machinerie de dégradation des ARNm. Hsp27 est elle-même une ARE-BP (ARE-Binding Protein) essentielle à la dégradation rapide des ARE-ARNm *(Sinsimer et al. 2008)*. La triple phosphorylation de Hsp27 déstabilise l'association entre Hsp27 et AUF-1, et conduit à la fois AUF-1 et Hsp27 vers la voie de dégradation par le protéasome *(Knapinska et al. 2011)*.

De même, la surexpression de Hsp27 tri-phosphorylée entraine une dégradation d'AUF-1 contrairement à celle de Hsp27 non-phosphorylable dans les cellules HeLa. Cette dégradation est restituée en absence de la protéine β-TrCP (ß-Transducin repeat-Containing Protein), une sous-unité de reconnaissance du substrat du complexe ubiquitine ligase SCF (Skp1-Cullin-F-box protein). Hsp27 phosphorylée forme un complexe avec la sous-unité p40 phosphorylée d'AUF-1 et β-TrCP alors que la forme non-phosphorylable de Hsp27 ne peut se lier ni à AUF-1 ni à β-TrCP. La phosphorylation de Hsp27 permet l'ubiquitinylation d'AUF-1 par β-TrCP et ainsi la dégradation d'AUF-1. La surexpression de β-TrCP dans les cellules HeLa qui expriment Hsp27

tri-phosphorylée stabilisent les ARNm de TNF-α et de Cox-2. De résultats similaires sont obtenus avec la déplétion d'AUF-1 dans les cellules. Ces données suggèrent que la dégradation d'AUF-1 par la voie MK2/Hsp27/β-TrCP permet la stabilisation des ARE-ARNm *(Li et al. 2013)*.

CHAPITRE IV : ROLE DE MK2 DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE

1-ROLE DE MK2 DANS LES MALADIES INFLAMMATOIRES

Aux vues de l'implication de diverses cibles de MK2 dans l'inflammation, MK2 a beaucoup été étudiée dans de nombreux modèles de maladies à composantes inflammatoires. Kotlyarov et ses collaborateurs sont les premiers à démontrer que l'invalidation de MK2 dans les souris les rend plus résistantes aux dommages hépatiques induits par le LPS/D-galactosamine *(Kotlyarov et al. 1999)*. Cependant, la suppression de MK2 chez la souris peut aussi avoir des effets dramatiques. La perte de MK2 aurait pour conséquence de rendre les souris plus sensibles aux infections bactériennes étant donné que la réponse inflammatoire y est réduite. Dans un modèle d'infection par les bactéries *Listeria monocytogenes*, les souris $MK2^{-/-}$ sont incapables de réduire la croissance bactérienne. Une mortalité plus importante est alors observée chez les souris $MK2^{-/-}$ contrairement aux souris sauvages *(Lehner et al. 2002)*.

Quelques années plus tard, plusieurs études ont démontré l'effet bénéfique de l'inhibition de MK2 *in vivo* dans des modèles de maladies inflammatoires. Dans un modèle d'arthrite rhumatoïde les souris déficientes en MK2 présentent une diminution d'incidence d'arthrite rhumatoïde et des atteintes moins sévères *(Hegen et al. 2006)*. La déplétion de MK2 chez les souris réduit le développement de la pancréatite induite par la céruléine, un colorant *(Tietz et al. 2006)*. De même pour l'inflammation vasculaire induite par l'angiotensine II *(Ebrahimian et al. 2011)*. Dans un modèle murin, le LPS provoque une inflammation dans les régions palatines qui conduit à une perte osseuse parodontale. Cette perte est fortement ralentie par l'injection de petits ARNs interférents de MK2 dans les régions palatines de ces souris. L'inhibition de MK2 par des ARNs interférents diminue non seulement l'infiltrat inflammatoire mais aussi les ostéoclastes qui détruisent le tissu osseux *(Li et al. 2011)*. La colite induite par le sulfate de sodium de dextran chez les souris est moins sévère lorsque les souris sont invalidées pour MK2 en comparaison aux souris sauvages *(Li et al. 2013)*.

D'autres études sur des modèles d'inflammation de la peau présentent des résultats différents. L'absence de MK2 chez les souris réduit l'inflammation de la peau provoquée par contact avec l'oxazolone *(Funding et al. 2009)* mais ne montre aucun effet anti-inflammatoire dans l'hypersensibilité induite par DNFB (2,4-dinitrofluorobenzene) *(Schottelius et al. 2010)*. Ainsi la

modulation de l'inflammation par MK2 pourrait dépendre des modèles d'inflammation, du type de stimuli ou encore des organes cibles dans les études.

Bobo et ses collaborateurs ont été les premiers à constater qu'il existait une corrélation entre l'élévation de phospho-MK2 et la présence de *Clostridia difficiles* chez les patients. Dans des échantillons de selles des patients, une corrélation entre l'augmentation d'IL-8 et l'infection par les *Clostridia difficiles* a été également observée. Ces résultats ont suggéré que la voie MK2 pouvait être impliquée dans l'inflammation intestinale des patients infectés par les *Clostridia difficiles (Bobo et al. 2013)*. MK2 pourrait être ainsi une cible thérapeutique intéressante dans les maladies inflammatoires. Par conséquent, il serait intéressant d'étudier l'activation de MK2 chez des patients atteints d'autres pathologies à composantes inflammatoires.

2-ROLE DE MK2 DANS LE CANCER

L'association entre l'inflammation et le cancer est bien reconnue. Johansen et ses collègues ont démontré que MK2 joue un rôle dans le développement des tumeurs épidermiques *via* la régulation de la réponse inflammatoire et l'apoptose des cellules dont l'ADN est endommagé *(Johansen et al. 2009)*. En arrêtant la progression du cycle cellulaire, les cellules cancéreuses sont capables de réparer les dommages à l'ADN causés par des agents de chimiothérapies et d'échapper ainsi à l'apoptose. L'équipe de Yaffe a constaté que l'inhibition de MK2 chez les souris déficientes en p53 confère une sensibilité aux chimiothérapies *(Reinhardt et al. 2007)*. Plus récemment, il a été démontré que la voie MK2 permet également une résistance aux radiations ionisantes dans des cellules cancéreuses du pancréas *(Wang et al. 2014)*. La résistance des tumeurs à ces chimiothérapies et aux radiations ionisantes pourrait être liée à une augmentation d'expression et d'activité de MK2.

La surexpression de MK2 dans un cancer a été observée pour la première fois dans le cancer du sein. Cette surexpression est accompagnée d'une augmentation d'activité de MK2 dans les échantillons tumoraux en comparaison à celle des échantillons contrôles *(Salh et al. 2002)*. Les marquages immunohistochimiques des échantillons humains de cancers du cou et du cerveau révèlent une forte présence de phospho-MK2 dans ces tumeurs *(Reinhardt et al. 2010)*. Une équipe américaine rapporte une différence d'expression de MK2 dans le cancer de prostate selon l'origine ethnique. MK2 est davantage exprimée dans les échantillons des patients américains d'origine africaine que ceux d'origine caucasienne. Cette différence pourrait s'expliquer par une liaison basale augmentée des récepteurs d'androgènes sur le promoteur du gène de *MAPKAPK2*

dans les cellules des patients d'origine africaine par rapport aux patients d'origine caucasienne. L'incidence et le taux de mortalité du cancer de la prostate étant plus élevés chez les premiers en comparaison aux deuxièmes, MK2 pourrait participer au développement et à la progression du cancer de la prostate *(Wang et al. 2013)*.

Une augmentation de l'expression de MK2 a été observée également dans d'autres types de cancer. Une analyse génomique des cellules plasmatiques néoplasiques et normales a permis d'identifier l'augmentation d'expression de 46 gènes dans les myélomes multiples. Parmi ces gènes, se trouvent *MAPKAPK2* dont l'expression des ARNm est surexprimée dans 58% des 31 échantillons de myélomes multiples. Cependant, les résultats d'immunohistochimie de ces échantillons indiquent que l'augmentation de l'expression protéique de MK2 est visible seulement dans 21% des cas *(Felix et al. 2009)*. Dans des tumeurs gastro-intestinales stromales issues de 139 patients, MK2 est fortement exprimée dans 44,6% des cas. Cette expression est associée à la présence des métastases et à la récidive. La forte expression de MK2 pourrait être due à une altération du chromosome 1, où se situe le gène de MK2, qui survient fréquemment dans les tumeurs gastro-intestinales stromales. L'étude indique également une corrélation entre la diminution de la survie sans progression des patients et l'augmentation de MK2 chez 133 patients avec des tumeurs résécables. MK2 pourrait être ainsi un facteur indépendant de pronostic de survie sans progression dans les tumeurs gastro-intestinales stromales *(Birner et al. 2012)*.

L'augmentation de MK2 dans le cancer peut être le résultat d'une amplification du promoteur du gène de MK2. En effet, l'équipe de Lu a constaté en recherchant dans la Database des Variants Génomiques (DGV) trois catégories de variations du nombre de copies (CNV) de *MAPKAPK2*, g.CNV-2091, g.CNV-30450 et g.CNV-71062. Etant donné la faible fréquence de g.CNV-2091 et de g.CNV-71062, l'équipe a choisi g.CNV-30450 qui couvre la région du promoteur de *MAPKAPK2* d'une longueur de 1,7 kilobases. Trois types de g.CNV-30450 (deux, trois ou quatre copies) ont été mis en évidence dans les échantillons sanguins de 4789 sujets contrôles et de cancer du poumon. Les individus portants quatre copies de g.CNV-30450 présentent un risque deux fois plus élevé de cancer du poumon, une médiane de survie plus faible et un risque accru de décès en comparaison aux individus portant deux ou trois copies de g.CNV-30450. Cependant, aucune corrélation significative n'a été observée entre les paramètres cliniques et les génotypes g.CNV-30450. Liu et ses collaborateurs ont vérifié ensuite si le nombre de copies de g.CNV-30450 pouvait être associé à l'expression de *MAPKAPK2*. En effet, l'expression de MK2 est plus importante en présence d'une double copie de g.CNV-30450 par rapport à une seule copie. Le génotype de quatre copies de g.CNV-30450 est corrélé à l'augmentation significative des taux d'ARNm et de protéines de MK2. L'équipe de Lu suggère ainsi que g.CNV-30450

pourrait être un biomarqueur de la susceptibilité et de pronostic du cancer du poumon *(Liu et al. 2012)*. Ces résultats ont été également retrouvés dans 1590 échantillons de carcinome nasopharyngé en comparaison aux 1979 échantillons non-cancéreux. De plus, les génotypes g.CNV-30450 sont positivement corrélés à l'infection par le virus d'Epstein-Barr. L'association de MK2 et l'infection par le virus d'Epstein-Barr pourrait être un indicateur de risque de développement du carcinome nasopharyngé *(Yang et al. 2014)*.

PROBLEMATIQUE

Une des protéines sur laquelle se portent certains projets de recherche du groupe de Laura Fouassier est la protéine adaptatrice EBP50 (Ezrin-radixin-moesin-Binding Protein 50). EBP50 est exprimée dans le foie et est localisée essentiellement au niveau subapical des cellules épithéliales du foie, les hépatocytes et les cellules épithéliales biliaires. En tant que protéine adaptatrice, EBP50 permet la formation des complexes protéiques à l'aide de ses domaines PDZ (PSD95/DlgA/ZO-1-like). Elle concentre, compartimente, positionne différents acteurs protéiques et participe ainsi à la régulation de l'activité de ses partenaires et à la transduction du signal. Dans les cancers du foie, le rôle d'EBP50 est controversé. Elle peut être suppresseur de tumeur ou oncogène selon sa localisation subapicale ou cytoplasmique *(Claperon et al. 2011)*. Afin de mieux comprendre le rôle d'EBP50 dans la carcinogenèse hépatique et d'identifier de nouveaux partenaires, un crible double hybride a été effectué à partir d'une banque d'ADNc de foie humain. Par cette approche, le groupe de Laura Fouassier a identifié un nouveau partenaire d'EBP50, la kinase MK2.

La littérature scientifique sur les fonctions de MK2 est abondante mais très peu d'études ont été menées dans le foie. Identifiée comme la principale kinase de la protéine chaperonne Hsp27, MK2 participe à la régulation de la migration cellulaire, du cycle cellulaire, de l'inflammation et de la résistance au stress oxydatif *(Gaestel 2006, Reinhardt et al. 2009, Cai et al. 2011)*. Dans le cancer, MK2 serait pro-oncogène. Elle permet la survie des cellules cancéreuses soumises au stress oxydatif et confère à celles-ci une résistance aux chimiothérapies. MK2 est surexprimée dans certains cancers tels que le cancer du sein, le cancer du poumon et les tumeurs stromales gastro-intestinales *(Salh et al. 2002, Birner et al. 2012, Liu et al. 2012)*.

Par ailleurs, le stress oxydatif, qui active fortement MK2, est l'un des acteurs clés du développement et de la progression tumorale hépatique *(Nishikawa et al. 2009, Jaeschke 2011)*. Le rôle de la kinase MK2 en réponse au stress oxydatif n'étant pas connu dans les cancers du foie, j'ai alors entrepris des expériences sur les lignées épithéliales cancéreuses hépatiques afin de :

- déterminer les fonctions de MK2 dans la réponse au stress oxydatif,
- étudier l'interaction entre MK2 et EBP50,
- identifier le rôle d'EBP50 en conditions de stress oxydatif,
- examiner l'expression de MK2, de la principale cible de MK2, Hsp27 et d'EBP50 dans les tumeurs du foie.

RESULTATS

Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 (MK2) associates with ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 (EBP50) and confers resistance to oxidative stress in human liver cancer cells*

Thanh Huong Nguyen Ho-Bouldoires[1,2], Audrey Clapéron[1,2], Martine Mergey[1,2], Dominique Wendum[1,2,3], Christèle Desbois-Mouthon[1,2], Laetitia Fartoux[1,2,4], Hamza Chettouh[1,2], Fatiha Merabtene[1,2], Olivier Scatton[1,2,5], Matthias Gaestel[6], Françoise Praz[1,2], Chantal Housset[1,2,4], and Laura Fouassier[1,2]

[1]*INSERM, UMR_S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, F-75012, Paris, France;*

[2]*Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine F-75012, Paris, France*

[3]*AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, F-75012 Paris, France*

[4]*AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Hépatologie, F-75012 Paris, France*

[5]*AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service de Chirurgie Hépato-Biliaire et Transplantation Hépatique F-75012, Paris, France*

[6]*Institute of Physiological Chemistry, Hannover Medical School, Carl-Neuberg-Str. 1, D-30625 Hannover, Germany*

*__Running title:__ MK2-mediated resistance to oxidative stress in liver cancer

To whom correspondence should be addressed : Laura Fouassier, Ph.D., INSERM UMR_S938, Centre de Recherche Saint-Antoine, 27 rue Chaligny, 75571 Paris cedex 12, France, Tel: (33) 6 98 77 40 01; Fax: (33) 1 40 01 13 52; E-mail: laura.fouassier@inserm.fr

Keywords: liver cancer, MAPKAPK2, cell signaling, reactive oxygen species, hydrogen peroxide, scaffold protein, EBP50/NHERF-1, EGFR

CAPSULE

Background: MK2 can act as a pro-carcinogenic kinase.

Results: In liver cancer cells, MK2 is activated by oxidative stress and promotes survival by stimulating antioxidant defense, inflammation and the HB-EGF/EGFR axis. Its action is mediated by interaction with EBP50 and Hsp27.

Conclusion: MK2 promotes liver cancer through antioxidant action.

Significance: MK2 is a new potential therapeutic target in liver cancer.

ABSTRACT

Oxidative stress caused by excessive reactive oxygen species (ROS) plays a prominent role in carcinogenesis. ROS activate signaling pathways including receptor tyrosine kinase and intracellular kinases. MAPK-activated protein kinase 2 (MK2), a component of a major pathway activated by oxidative stress, phosphorylates several targets including its bona fide substrate Hsp27. MK2 is also a regulator of inflammatory cytokines. The generation of ROS causing oxidative stress occurs in liver diseases, during their progression to liver cancer. Therefore, we aimed to define the expression and function of MK2 in liver cancer using human hepatocellular carcinoma (HCC) and cholangiocarcinoma (CCA) cell lines, and tissue samples. We found that H2O2-induced oxidative stress triggered MK2 activation and phosphorylation of Hsp27 in CCA and HCC cells. Pharmacological inhibition of MK2 enhanced oxidative stress-induced cell apoptosis. This effect was accompanied by a decrease in the phosphorylation of Hsp27, antioxidant defense and HB-EGF/EGFR activation. The expression of IL-8, an inflammatory mediator that plays a role in cancer cell survival, was also decreased after inhibition of MK2. We identified the scaffold protein EBP50 as a new binding protein of MK2. EBP50 contributed to up-regulate the MK2/Hsp27 pathway in liver cancer cells upon stimulation by H2O2. MK2, Hsp27 and EBP50 expressions were all upregulated in human specimens of hepatocellular carcinoma. Overall, these data provide evidence for a role of MK2 in resistance to oxidative stress in liver cancers.

INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma (HCC) and cholangiocarcinoma (CCA) are primary malignant tumors of the liver, both with poor prognosis and limited therapeutic options (1,2). The development of both tumors is associated with chronic viral infections (i.e. viral hepatitis B or C), excessive alcohol consumption and nonalcoholic steatohepatitis (NASH). All these conditions are the source of excessive ROS production in the liver, which would contribute to hepatocarcinogenesis (3-8). ROS overproduction has been demonstrated by electron paramagnetic resonance in human HCC biopsies (9).

Oxidative stress refers to an imbalance in favor of reactive oxygen species (ROS) at the expense of antioxidant defenses. Persistent oxidative stress has been associated with carcinogenesis. In tumors, due to a high metabolic activity, malignant cells produce high quantities of ROS such as hydrogen peroxide (H2O2) that causes oxidative stress (10). Besides inducing DNA damage, ROS including H2O2 activate signaling molecules such as the epidermal growth factor receptor (EGFR)(11-13) and intracellular kinases like the mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase 2 (MK2) (14-16) that belongs to the p38 MAPK signaling cascade (17,18).

MK2 regulates pleotropic cellular functions, which comprise cell cycle, survival, apoptosis, inflammation and resistance to oxidative stress (19-23). The heat shock protein Hsp27 is one of the major substrates of MK2 (24). The regulation of Hsp27 by MK2 was demonstrated in MK2-deficient mice in which the phosphorylation of Hsp27 is lost (21). Hsp27 displays anti-apoptotic properties (25,26) and regulates the expression of interleukin-8 (IL-8), a proinflammatory chemokine involved in cancer cell survival (27,28). MK2 can also phosphorylate other substrates such as Akt, a pro-survival kinase, and Mouse Double Minute 2 homolog (MDM2), a negative regulator of the pro-apoptotic protein p53 (29,30). MK2 has been identified as a pro-carcinogenic kinase involved in the regulation of cell cycle, cell invasion and resistance to chemotherapy in cancer cells (20,31-34). Moreover, MK2 overexpression was previously demonstrated in multiple myeloma (35), lung cancer (36), gastrointestinal stromal tumors (37) and breast cancer (38).

To date, the expression of MK2 in liver cancer has not been examined, although the protein has been detected in normal liver tissue (39-41). Furthermore, the role of MK2 in response to oxidative stress remains to be determined in liver cancer biology. The purpose of the study was to decipher the contribution of MK2 in human liver cancer cells exposed to H2O2-induced oxidative stress. We show that MK2 activation contributes to resistance against oxidative stress by counteracting apoptosis and triggering pro-survival signals in malignant hepatic cells. This

pro-carcinogenic effect of MK2 is likely due in part to 1/ upregulation of proteins involved in the antioxidant defenses, Nfr2 and HO-1, 2/ increased expression of IL-8 and the EGFR ligand HB-EGF associated with an activation of EGFR. Furthermore, we demonstrate that the MK2-dependent signaling pathway is regulated by EBP50, a scaffold protein identified here as a novel binding protein of MK2. Finally, enhanced expression of MK2, Hsp27 and EBP50 is observed in human liver tumors, supporting a biological role of the MK2 pathway in liver carcinogenesis. Overall, the present work highlights a role for the p38MAPK/MK2 pathway in resistance to oxidative stress that may participate to liver carcinogenesis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Patients and liver tumor specimens - Samples of HCC and paired adjacent nontumoral liver tissue (n = 70) or intraheptic CCA tumors (n = 10) were obtained from patients who underwent liver resection in Saint-Antoine Hospital (APHP, Tumor bank HUEP, "TumeurEst"). Characteristics of patients with HCC are provided in Table 1. CCA patients' median age was 66 yr (range 54-79) with well or moderately differentiated CCA (massive subtype, mean size 9 cm; range 4.5-15 cm). According to the TNM staging system (7th edition), four lesions were T1 (solitary tumor without vascular invasion), one was T2a (solitary tumor with vascular invasion) and five were T2b (multiple tumors) (42). Non tumoral liver tissue showed no significant fibrosis except in one patient who had chronic hepatitis B with few fibrous septa. Histologically normal liver tissue (control liver samples) was obtained from 8 patients who underwent partial hepatectomy for the treatment of metastases or benign tumor. Tissue samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

Cell models - Human HCC cell lines included PLC/PRF5 cells provided by Dr. Christine Perret (Institut Cochin, Paris, France), and HepG2 cells from ATCC. Human CCA cell lines included Mz-ChA-1 cells provided by Dr. A. Knuth (Zurich University, Switzerland), and EGI-1 cells obtained from DSMZ, Germany. HeLa cells were obtained from ATCC.
The cells were incubated in hydrogen peroxide (H2O2) from Sigma-Aldrich (100-1000 μM) to induce oxidative stress. In some experiments, the MK2 inhibitor (MK2 inhibitor III, Merck) (5 μM) was added to the culture medium 1 h before H2O2.

Cell viability was measured using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Cells were incubated with the tetrazolium dye MTT at the final concentration of 0.1 mg/mL for 4h at 37°C. Absorbance of the colored solution was quantified by a spectrophotometer (Tecan) at 560 nm.

Immunostaining - Paraffin-embedded human tissue samples were cut in 4-μm sections and antigens were unmasked as indicated in Table 2. Sections were incubated sequentially with H2O2 for 5 min, with blocking serum (Protein block serum-free, Dako) for 20 min, with primary antibodies (Table 2) for 30 min and with secondary biotinylated antibodies (Trekkie Biotinylated Rabbit/Mouse link, Biocare Medical) for 20 min. Sections were finally incubated with TrekAvidin-HRP for 20 min. The Autostainer Plus (Dako) was used to perform

immunostainings. The color was developed using amino-ethyl-carbazole (AEC peroxidase substrate kit; Vector Laboratories, Ltd.). The sections were counterstained with haematoxylin and mounted with Glycergel (Dako).

For immunofluorescence, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, permeabilized in 0.1% Surfact-Amps X100 (Thermo Scientific) and blocked with 1% albumin and 10% goat serum for 1 h at room temperature. The cells were incubated overnight with primary antibodies (Table 2) and then for 1 h at room temperature with secondary fluorescent antibodies (Invitrogen). Cell nuclei were counterstained with DRAG-5 (Invitrogen) for 5 min during the final wash before mounting (Fluoromount; EMS). Cells were observed with an epifluorescence or an SP2 confocal microscope (Leica).

Western blotting - Cells were lysed on ice in Laemmli buffer (Biorad) supplemented with β-mercaptoethanol or in RIPA buffer supplemented with 1 mM orthovanadate and a cocktail of protease inhibitors (Roche Diagnostics). Proteins were heated for 5 min at 96°C, subjected to SDS-PAGE migration and transferred to nitrocellulose membranes (Biorad). The blots were blocked with TBS (0.1%) Tween-20 containing 5% bovine serum albumin and incubated with primary antibodies (Table 2) overnight at 4°C and with secondary horseradish peroxidase-linked antibodies (Cell Signaling) for 1 h at room temperature. Immune complexes were visualized by enhanced chemiluminescence (Pierce).

IL-8 assay - IL-8 in cell supernatants was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a human anti-IL-8 kit (DuoSet, R&D Systems Europe) according to the manufacturer's instructions.

RNA isolation and gene expression analysis - Total RNA was extracted from cell cultures using RNeasy Mini Kit (Qiagen). For tissues, a preliminary RNA extraction step was conducted using TRIzol Reagent (Life Technologies). RNA was reverse-transcribed and quantified by real time PCR on a LightCycler® 480 instrument (Roche) using SYBR Green chemistry and specific primers (Table 3). For each sample, gene expression was normalized to hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) mRNA content and was expressed relatively to the same calibrator (for human samples). The relative quantity of each target mRNA was determined from duplicates using the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Gene silencing - Hsp27 and EBP50 expression was silenced by using a pool of four siRNA (ON-TARGET*plus* SMARTpool, Dharmacon). Control siRNA was a pool from Dharmacon (siGENOME non-targeting siRNA pool 2). Transient transfections were performed with 75-100 nM of siRNA using DharmaFECT 4 (Thermo Scientific).

Yeast two-hybrid screen - The coding sequence of human EBP50 (GI number 29165827) was amplified by PCR and cloned into pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen). Bait cloning into pB27 (N-LexA-bait C fusion) and Y2H screening of a commercialized human liver cDNA library (human liver RP1) were performed by Hybrigenics, S. A. Eighty-two millions interactions were tested with EBP50 and after selection, 272 positive clones were analyzed. cDNA fragments corresponding to positive "prey" clones were amplified by PCR and sequenced at their 5′ and 3′ junctions. The resulting sequences were searched against GenBank using a fully automated procedure, assigned a "Predicted Biological Score" indicative of the confidence of interactions.

Immunoprecipitation - Cells were harvested in the immunoprecipitation buffer (NP-40) supplemented with 1 mM orthovanadate and a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics) and subjected to centrifugation for 15 min at 4 °C. Precleared proteins (1 mg) were incubated with antibodies (4 µg) (Table 2) overnight at 4 °C. Immunoprecipitated proteins were suspended in Laemmli buffer and subjected to western blot analysis.

Glutathione-S-transferase (GST) pull-down - GST pull-down was performed as previously described (43). Protein lysate from HeLa cells or Mz-ChA-1 cells was incubated with GST-fusion protein beads for 2 h at 4°C. The beads were extensively washed 4 times with 1 mL PBS. Bound protein fractions were eluted with Laemmli buffer and analyzed by western blot.

Statistical analysis - Results are given as mean ± SEM. Data were analyzed using Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc.). Data obtained from *in vitro* experiments in cell lines were compared using Mann-Whitney U and Wilcoxon tests. Statistical tests were two-sided. Expression data obtained from human tissue specimens were compared using Mann-Whitney U test (unpaired data) and Wilcoxon test (paired data). Correlations between MK2, Hsp27 and EBP50 mRNA expression in human liver tissue samples were conducted using Spearman rank correlation coefficient. *P* value of less than 0.05 was considered significant.

RESULTS

Oxidative stress triggered by H_2O_2 activates MK2 in liver cancer cells – We first determined whether MK2 was activated by oxidative stress challenge in liver cancer cells. MK2 activity, which was monitored by a shift in electrophoretic mobility and by phosphorylation of its *bona fide* substrate Hsp27, was examined in human HCC (PLC/PRF5, HepG2) and CCA (Mz-ChA-1, EGI-1) cell lines exposed to a sub-lethal dose of H_2O_2 (500 μM) for 30 min, 1 h and 2 h in the presence or absence of MK2 inhibitor (MK2i). In western blot assays, MK2 was visualized with a specific antibody that recognizes MK2 irrespective of its phosphorylation status, and MK2 phosphorylation was detected by a shift towards lower electrophoretic mobility. Upon H_2O_2 treatment, the phosphorylation level of MK2 and Hsp27 was increased in all cell lines (Fig. 1A). MK2i, an ATP-competitive inhibitor of MK2 (44) markedly reduced H_2O_2 induction of phospho-Hsp27 without affecting the activation status of MK2.

Inhibition of MK2 sensitizes liver cancer cells to H_2O_2-induced apoptosis – MK2 regulates cell survival. Analysis of cell survival was performed using the MTT assay in HCC and CCA cells treated with H_2O_2 (100-1000 μM) in the presence or absence of MK2i (Fig. 1B). In all cell lines, H_2O_2 induced a dose-dependent decrease in cell viability. In the presence of H_2O_2, MK2i caused a reduction of cell viability to a greater extent compared to H_2O_2. To further determine whether the decreased survival induced by MK2i was due to cell apoptosis, we analyzed p53 nuclear localization by immunofluorescence (Fig. 2A) and the cleavage of caspase-3 and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) by western blot (Fig. 2B) in two cell lines representative of the two types of liver tumors, PLC/PRF5 (HCC) and Mz-ChA-1 (CCA) cells. In the presence of H_2O_2 and MK2i, a higher nuclear expression of p53 and a stronger cleavage of the caspase-3/PARP were observed in cells compared to H_2O_2 alone. These findings indicate that MK2 displays an anti-apoptotic role leading to the survival of liver cancer cells upon oxidative stress.

Inhibition of MK2 diminishes H_2O_2-induced nuclear Nrf2 and HO-1 expression and increases DNA damage in liver cancer cells – To further understand the role of MK2 in cell survival, we first examined whether MK2 affected antioxidant defenses. The nuclear factor-erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2) is a major regulator of the antioxidant response. Nfr2 induces the transcription of genes encoding proteins involved in cellular protection against oxidative stress, such as the heme oxygenase 1 (HO-1) (45). Upon exposure to H_2O_2, Nrf2 accumulated into the nucleus of PLC/PRF5 and Mz-ChA-1 cells (Fig. 3A) and the expression of HO-1

increased in these cells (Fig. 3B). Inhibition of MK2 prevented the nuclear localization of Nrf2 and reduced the expression of HO-1 induced by H_2O_2 (Fig. 3A and B). The loss of the antioxidant response induced by MK2i in H_2O_2-treated cells correlated with an increase in DNA damage, as attested by a greater increase in nuclear foci number and total protein expression of γH2AX, a marker of DNA-double strand breaks, compared to H_2O_2 alone (Fig. 3C and D). These data suggest that MK2 protects liver cancer cells against oxidative stress by inducing an antioxidant response required for cell survival.

The MK2 mediates H_2O_2-induced IL-8 expression via phosphorylation of Hsp27 – MK2 regulates the expression of IL-8, a chemokine involved not only in inflammation but also in tumor cell survival (28). We investigated whether MK2 regulated IL-8 expression in Mz-ChA-1 and PLC/PRF5 cells exposed to H_2O_2 in the presence or absence of MK2i. Upon H_2O_2 treatment, IL-8 mRNA expression and protein secretion were significantly enhanced in PLC/PRF5 and Mz-ChA-1 cells and inhibition of MK2 abrogated these effects (Fig. 4A and B). Since Hsp27 is phosphorylated by MK2 (Fig. 1A) and a regulator of IL-8 expression in Hela cells (27), we examined the contribution of Hsp27 to IL-8 mRNA expression in liver cancer cells exposed to H_2O_2. The siRNA pool against Hsp27 (siHsp27) significantly reduced Hsp27 mRNA level in the cells (Fig. 4C). Loss of Hsp27 diminished significantly the level of IL-8 mRNA in H_2O_2-treated cells (Fig. 4D). These data were consistent with a positive regulation of IL-8 expression by the MK2/Hsp27 axis in liver cancer cells exposed to H_2O_2.

Inhibition of MK2 abrogates H_2O_2-induced HB-EGF/EGFR signaling in liver cancer cells – H_2O_2 promotes EGFR phosphorylation and increases expression of the EGFR ligand HB-EGF in epithelial cell types (13,46,47). Given the importance of the EGFR axis in liver carcinogenesis (48-50), we investigated the potential of the MK2 pathway to regulate this process. H_2O_2 induced the phosphorylation of EGFR (Fig. 5A) and caused a twofold augmentation of HB-EGF mRNA expression in Mz-ChA-1 and PLC/PRF5 cells (Fig. 5B). MK2i led to a marked reduction of H_2O_2-induced phosphorylation of EGFR and expression of HB-EGF mRNA (Fig. 5A and B). MK2i had no effect on amphiregulin, another EGFR ligand the expression of which increased under H_2O_2 treatment (data not shown). Likewise, the downregulation of Hsp27 by siRNA reduced H_2O_2-mediated HB-EGF overexpression (Fig. 5C). Furthermore, the addition of exogenous HB-EGF activated MK2 and caused phosphorylation of Hsp27, thereby amplifying MK2 signaling (Fig. 5D). These results suggest that MK2 confers resistance to oxidative stress in

liver cancer cells by regulating the HB-EGF/EGFR axis presumably through a positive feedback loop.

The MK2/Hsp27 signaling is regulated by the scaffold protein ezrin-radixin-moesin binding phosphoprotein 50 (EBP50) - A yeast two-hybrid screen of human liver cDNA identified EBP50, a PDZ protein highly expressed in the liver, as a binding protein of MK2. Consistently, the analysis of the MK2 protein sequence revealed the presence of a PDZ motif LTRL at the C-terminus (Fig. 6A). The interaction between the two proteins was confirmed *in vitro* by GST pull-down and *in cellulo* by immunoprecipitation (Fig. 6B and C). GST pull-down experiments were performed with Hela cell lysate using GST-EBP50 fusion proteins containing either WT-EBP50, or each of the two PDZ domains of EBP50, PDZ1 and PDZ2 (Fig. 6B). Western blot analysis indicated that MK2 binds EBP50, through its two PDZ domains. In this experiment, Akt, which is a binding partner for EBP50, was used as a positive control (51). Reciprocal immunoprecipitation experiments using either MK2 (Fig 6C, left panel) or EBP50 antibody (Fig 6C, right panel) showed that EBP50 interacted both with MK2 and phospho-MK2 in Mz-ChA-1 cells.

We then analyzed whether EBP50 could modulate MK2-dependent signaling. In Mz-ChA-1 and PLC/PRF5 cell lines treated with H_2O_2, the downregulation of EBP50 with siRNA reduced phosphorylation of Hsp27 without affecting MK2 activation (Fig. 6D). This result indicates that EBP50 is required for the stimulation of the phosphorylation of Hsp27 in oxidative stress condition. Interestingly, GST pull-down analysis showed that Hsp27 associated with EBP50 only when Mz-ChA-1 cells were treated with H_2O_2 and not in control conditions (Fig. 6E). Functionally, down-regulation of EBP50 by siRNA altered MK2-dependent effects. Loss of EBP50 induced a further increase of H_2O_2-induced caspase-3 and PARP cleavage (Fig. 6F) and DNA damages attested by gH2AX protein expression (Fig. 6G). Furthermore, the downregulation of EBP50 counteracted H_2O_2-induction of HB-EGF (Fig. 6H) and of IL-8 (Fig. 6I) mRNA expression.

Expressions of MK2, Hsp27 and EBP50 are upregulated in human liver tumors – We examined the mRNA levels of MK2, Hsp27 and EBP50 in 70 HCC tumors (T) and paired surrounding non-tumor liver tissues (NT) as well as in 8 healthy livers. MK2, Hsp27 and EBP50 mRNA levels were similar between non-tumor liver tissues and healthy livers (data not shown), whereas they were significantly higher in HCC tumors compared with matched non-tumor tissues (Fig. 7A). Spearman correlation analysis showed a strong correlation between the levels of

mRNA encoding the three proteins ($p<0.0001$) (MK2 and Hsp27, $r=0.59$; MK2 and EBP50, $r=0.65$; Hsp27 and EBP50, $r=0.60$). To validate the overexpression at the protein level, immunohistochemistry of MK2, Hsp27 and EBP50 was performed (Fig. 7B) on seven HCC tumors. The proteins were found highly expressed in tumor cells compared with matched non-tumor tissues. Immunohistochemistry analysis was also performed in 10 CCA tumors in which, a higher expression of MK2, Hsp27 and EBP50 was observed in comparison to non-tumoral bile duct epithelium (Fig. 7C). These results supported a role of the MK2/Hsp27/EBP50 signaling module in liver cancers.

DISCUSSION

Cancer cells produce excessive ROS that can activate signaling cascades including of receptor tyrosine kinases and intracellular kinases. MK2 is a kinase activated in response to oxidative stress. The major findings in this study provide evidence that: 1/ ROS, i.e. H_2O_2, activate MK2 and increase phosphorylation of Hsp27 in liver cancer cells; 2/ pharmacological inhibition of MK2 enhances the deleterious effects of H_2O_2-induced oxidative stress on cell survival, and abrogates antioxidant defenses and cytoprotective signals such as the HB-EGF/EGFR signaling and IL-8 expression; 3/ MK2 signaling towards Hsp27 is regulated by the scaffold protein EBP50, a protein expressed in liver epithelia and overexpressed in liver cancers; 4/ in parallel to EBP50, the levels of MK2 and Hsp27 are also upregulated in human liver tumors.

The heat shock protein Hsp27 has been identified as a major substrate of MK2 (24). We found that H_2O_2 was a potent activator of MK2 responsible for the phosphorylation of Hsp27 in liver cancer cells. Because Hsp27 displays anti-apoptotic properties (25), it may contribute to the cytoprotective properties of MK2 in liver cancer cells subjected to oxidative stress. Inhibition of Hsp27 by siRNA sensitizes cells to H_2O_2-induced apoptosis (data not shown), strengthening the anti-apoptotic role of Hsp27 as previously suggested in colon cancer stem cells (52). In neutrophils, anti-apoptotic function of Hsp27 is mediated by Akt, which is another substrate of MK2 (26). In these cells, Hsp27 regulates Akt activation and cell apoptosis by mediating interaction between Akt and its upstream activator MK2 (53). An MK2-dependent activation of Akt was also observed in liver cancer cells exposed to H_2O_2 (data not shown). Recently, a regulation of the MK2-Hsp27-Akt signaling cascade by the Rit GTPases has been highlighted as mediating anti-apoptotic pathway (23). Therefore, we propose a role for both, Hsp27 and Akt in the pro-survival effects of MK2.

Previous investigations have demonstrated that ROS interfere with the EGFR pathway. EGFR has a major contribution to carcinogenesis in HCC and CCA (48,49). H_2O_2 has been shown to regulate EGFR by inducing its phosphorylation (13,46,54). We show that EGFR activation by H_2O_2 depends on activity of MK2 in liver cancer cells. In addition to the regulation of EGFR, it has been shown that H_2O_2 increased the synthesis of EGFR ligands including amphiregulin and HB-EGF in gastric epithelial cells (13) and in bladder and lung carcinoma cell lines (46). In the latter study, the molecular mechanisms underlying the upregulation of HB-EGF relied on increased activity of the metalloprotease TACE, leading to the ectodomain shedding of proHB-EGF into HB-EGF, and the subsequent activation of EGFR (46). Consistently, it was demonstrated in monocytes that MK2 activity is necessary for ROS-stimulated TACE activation

(55). Here, we show that H_2O_2-induced HB-EGF expression depends on MK2 and Hsp27. We cannot exclude a regulation of HB-EGF mRNA by tristetraprolin (TTP). The MK2 substrate TTP is known as an mRNA destabilizing factor, which binds to AU-rich mRNA elements and is inactivated by phosphorylation (56). In addition, Hsp27 has recently also been described as a regulator of the stability of mRNAs containing AREs (57). Using the database "AREsite" (58), we found the presence of an ARE in the 3'UTR in HB-EGF mRNA. Therefore, increased expression of HB-EGF could be explained by the inactivation of the potential HB-EGF mRNA destabilizer TTP and/or by the increased ability of Hsp27 to stabilize HB-EGF mRNA. Of course, an effect of MK2 and Hsp27 on TACE activity in cancer liver cells cannot be excluded. Furthermore, we show that the HB-EGF/EGFR signaling module activates the MK2-Hsp27 pathway, suggesting the existence of a positive feedback loop.

IL-8 (also named CXL8) is an inflammatory chemokine regulated by MK2 that promotes immune infiltration, angiogenesis, and cancer cell survival (22,59,60). Previous work published by DeForge et al. (61), has shown that IL-8 expression was upregulated by oxidative stress in HCC cells, HepG2. Here, we underline a positive regulation of IL-8 mRNA by MK2 and Hsp27 in response to oxidative stress in liver cancer cells, which is accompanied by a higher secretion of IL-8 in cell supernatants. IL-8 expression is controlled through mRNA stabilization (62). Accordingly, we found that MK2 stabilized H_2O_2-induced IL-8 mRNA in Mz-ChA-1 and PLC/PRF5 cells (data not shown). Expression of IL-8 mRNA that contains AU-rich elements could be regulated by TTP and Hsp27. In CCA, little information is available regarding IL-8 expression by tumor cells. However, a higher basal expression of IL-8 was measured in human cholangiocytes isolated from livers of patients with primary sclerosing cholangitis, a hepatobiliary disease that can progress to CCA, as compared with normal cholangiocytes (63). Regarding HCC, a higher serum concentration of IL-8 was found in patients, which interestingly was positively correlated with a reduced level of antioxidants (64). In HCC tissue, IL-8 expression was strongly detected in tumor cells that represent the major producer (65). Once secreted, IL-8 binds G protein-coupled receptors CXCR1 and CXCR2. In human CCA, a strong expression of CXCR2 has been observed (66) and stimulation of the CCA cell line Mz-ChA-1 by IL-8 has been shown to increase cell proliferation (67). In human HCC, expression levels of CXR2 were significantly increased in HCC compared with adjacent and normal liver tissues (68). Thus, the resistance to oxidative stress of liver cancer cells may be related to a higher production of IL-8, which in turn could act as a proliferative and/or prosurvival mediator through an autocrine fashion.

Scaffold proteins containing PDZ domains organize signaling complexes (69). We herein identified a new regulation of the MK2 signaling pathway by the scaffold PDZ protein EBP50.

EBP50 is highly expressed in normal liver, and specifically in hepatocytes and cholangiocytes (43,70). In both liver tumors, an upregulation of EBP50 expression has been reported and suggested to participate in carcinogenesis by stimulating b-catenin and EGFR pathways in HCC and CCA, respectively (71,72). Previous works performed by our team and others have shown that EBP50 regulated cellular signaling pathway including the receptor tyrosine kinases EGFR (71,73) and PDGFR (74), and the intracellular kinases Akt (51) and PKCζ (75). In liver cancer cells exposed to oxidative stress, EBP50 appeared to facilitate phosphorylation of Hsp27 by MK2. While in basal condition, no interaction was evidenced between EBP50 and Hsp27, an interaction was highlighted in cells treated with H_2O_2, indicating that EBP50 may be involved in the formation of a signaling complex required for MK2 to phosphorylate Hsp27. Accordingly, downregulation of EBP50 in liver cancer cells, increased apoptosis and DNA damage induced by H_2O_2, suggesting a regulation of H_2O_2-induced MK2 signaling by EBP50. In addition, the regulation of the HB-EGF and IL-8 levels seems to be dependent on EBP50. Therefore, we provide a new regulatory mechanism of MK2 signaling and highlight a novel function of EBP50 in liver biology.

Finally, we found that HCC tumors displayed higher expression of MK2, Hsp27 and EBP50 compared with adjacent noncancerous liver tissues. By performing correlation analysis, we found a combined deregulation of the three proteins. In agreement with the expression of mRNA, the protein level of MK2, Hsp27 and EBP50 was higher in HCC tumor. Expression of MK2 at the protein level has been previously showed to be associated with a higher activity of the kinase in breast cancer (38). Augmentation of Hsp27 level was observed both in serum (76) and liver tumor tissue (77,78) from patients with HCC. Hsp27 expression was also increased in tumor and bile of patients with CCA (79). We found that the level of EBP50 mRNA was enhanced in HCC tissue and accompanied by an increase of the immunostaining of EBP50 as previously reported by Shibata et *al.* (72). EBP50 immunostaining was also higher in CCA tissues in keeping with our previous observations (71). Together, these novel observations reinforce a potential role of the MK2/Hsp27/EBP50 axis in liver tumors.

In summary (Fig. 8), we have demonstrated that ROS activated an MK2-dependent signaling pathway in liver cancer cells, which provides cell ability to survive and to activate cytoprotective mechanisms including antioxidant defenses and activation of the HB-EGF/EGFR axis. Upregulation of the MK2 signaling module including EBP50 and HSP27 *in vivo* in human liver tumors and *in vitro* in stressed liver cancer cells provide a mechanism whereby liver tumors progress under oxidative stress. These data have implication regarding the role played by MK2

pathway in resistance to oxidative stress and underscore potential of MK2 as a therapeutic target in liver cancers.

Acknowledgments - The authors thank Cancer-Est Tumor Bank for providing human liver tissues, Yves Chrétien for performing statistical analysis on human samples, Sylvana Tahraoui and Corina Buta for their technical assistance.

FOOTNOTES

*This work was supported by the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" (To THB), Fondation de France (to AC and THB), Fonds CSP (to LF and CH), Fondation ARC pour le Recherche sur le Cancer (to THB), ANR-09-PIRI-0013 (to AC), INCA-DGOS-5790 (to CDM)

[1]To whom correspondence should be addressed: INSERM UMR_S938, Centre de Recherche Saint-Antoine, 27 rue Chaligny, 75571 Paris cedex 12, France, Tel.: (33) 6 98 77 40 01; Fax: (33) 1 40 01 13 52; E-mail: laura.fouassier@inserm.fr

[2]The abbreviations used are: MK2, mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2; HCC, hepatocellular carcinoma; CCA, cholangiocarcinoma; ROS, reactive oxygen species; EBP50, ezrin-radixin-moesin binding phosphoprotein 50; ERM, ezrin-radixin-moesin; NHERF-1, Na^+/H^+ exchanger regulatory factor 1; PDZ, postsynaptic density 95/disc-large/zona occludens; siRNA, small interfering RNA; HB-EGF, heparin-binding EGF-like growth factor; IL-8, interleukin-8; HO-1, heme oxygenase 1; Nfr2, nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

REFRENCES

1. Razumilava, N., and Gores, G. J. (2014) Cholangiocarcinoma. *Lancet*
2. Bruix, J., Gores, G. J., and Mazzaferro, V. (2014) Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. *Gut* **63**, 844-855
3. Yu, J., Shen, J., Sun, T. T., Zhang, X., and Wong, N. (2013) Obesity, insulin resistance, NASH and hepatocellular carcinoma. *Semin. Cancer Biol.* **23**, 483-491
4. Ha, H. L., Shin, H. J., Feitelson, M. A., and Yu, D. Y. (2010) Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* **16**, 6035-6043
5. Paracha, U. Z., Fatima, K., Alqahtani, M., Chaudhary, A., Abuzenadah, A., Damanhouri, G., and Qadri, I. (2013) Oxidative stress and hepatitis C virus. *Virol. J.* **10**, 251
6. Marra, M., Sordelli, I. M., Lombardi, A., Lamberti, M., Tarantino, L., Giudice, A., Stiuso, P., Abbruzzese, A., Sperlongano, R., Accardo, M., Agresti, M., Caraglia, M., and Sperlongano, P. (2011) Molecular targets and oxidative stress biomarkers in hepatocellular carcinoma: an overview. *J. Transl. Med.* **9**, 171
7. Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., and Aggarwal, B. B. (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1603-1616
8. Tien Kuo, M., and Savaraj, N. (2006) Roles of reactive oxygen species in hepatocarcinogenesis and drug resistance gene expression in liver cancers. *Mol. Carcinog.* **45**, 701-709
9. Valgimigli, M., Valgimigli, L., Trere, D., Gaiani, S., Pedulli, G. F., Gramantieri, L., and Bolondi, L. (2002) Oxidative stress EPR measurement in human liver by radical-probe technique. Correlation with etiology, histology and cell proliferation. *Free Radic. Res.* **36**, 939-948
10. Costa, A., Scholer-Dahirel, A., and Mechta-Grigoriou, F. (2014) The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment. *Semin. Cancer Biol.* **25**, 23-32
11. Son, Y., Kim, S., Chung, H. T., and Pae, H. O. (2013) Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. *Meth. Enzymol.* **528**, 27-48
12. Chan, H. L., Chou, H. C., Duran, M., Gruenewald, J., Waterfield, M. D., Ridley, A., and Timms, J. F. (2010) Major role of epidermal growth factor receptor and Src kinases in promoting oxidative stress-dependent loss of adhesion and apoptosis in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 4307-4318

13. Miyazaki, Y., Hiraoka, S., Tsutsui, S., Kitamura, S., Shinomura, Y., and Matsuzawa, Y. (2001) Epidermal growth factor receptor mediates stress-induced expression of its ligands in rat gastric epithelial cells. *Gastroenterology* **120**, 108-116
14. Gutierrez-Uzquiza, A., Arechederra, M., Bragado, P., Aguirre-Ghiso, J. A., and Porras, A. (2012) p38alpha mediates cell survival in response to oxidative stress via induction of antioxidant genes: effect on the p70S6K pathway. *J. Biol. Chem.* **287**, 2632-2642
15. Shaw, M., Cohen, P., and Alessi, D. R. (1998) The activation of protein kinase B by H2O2 or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2. *Biochem. J.* **336 (Pt 1)**, 241-246
16. Tran, H., Maurer, F., and Nagamine, Y. (2003) Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *Mol. Cell Biol.* **23**, 7177-7188
17. Stokoe, D., Campbell, D. G., Nakielny, S., Hidaka, H., Leevers, S. J., Marshall, C., and Cohen, P. (1992) MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase. *Embo J.* **11**, 3985-3994
18. Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., and Nebreda, A. R. (1994) A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **78**, 1027-1037
19. Reinhardt, H. C., and Yaffe, M. B. (2009) Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 245-255
20. Johansen, C., Vestergaard, C., Kragballe, K., Kollias, G., Gaestel, M., and Iversen, L. (2009) MK2 regulates the early stages of skin tumor promotion. *Carcinogenesis* **30**, 2100-2108
21. Kotlyarov, A., Neininger, A., Schubert, C., Eckert, R., Birchmeier, C., Volk, H. D., and Gaestel, M. (1999) MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. *Nat. Cell Biol.* **1**, 94-97
22. Moretto, N., Bertolini, S., Iadicicco, C., Marchini, G., Kaur, M., Volpi, G., Patacchini, R., Singh, D., and Facchinetti, F. (2012) Cigarette smoke and its component acrolein augment IL-8/CXCL8 mRNA stability via p38 MAPK/MK2 signaling in human pulmonary cells. *Am. J. Physiol. Lung cell. Mol. Physiol.* **303**, L929-938
23. Cai, W., Rudolph, J. L., Harrison, S. M., Jin, L., Frantz, A. L., Harrison, D. A., and Andres, D. A. (2011) An evolutionarily conserved Rit GTPase-p38 MAPK signaling pathway mediates oxidative stress resistance. *Mol. Biol. Cell* **22**, 3231-3241

24. Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D. G., Cohen, P., and Gaestel, M. (1992) Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett.* **313**, 307-313
25. Kostenko, S., and Moens, U. (2009) Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 3289-3307
26. Rane, M. J., Pan, Y., Singh, S., Powell, D. W., Wu, R., Cummins, T., Chen, Q., McLeish, K. R., and Klein, J. B. (2003) Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *J. Biol. Chem.* **278**, 27828-27835
27. Alford, K. A., Glennie, S., Turrell, B. R., Rawlinson, L., Saklatvala, J., and Dean, J. L. (2007) Heat shock protein 27 functions in inflammatory gene expression and transforming growth factor-beta-activated kinase-1 (TAK1)-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* **282**, 6232-6241
28. Waugh, D. J., and Wilson, C. (2008) The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**, 6735-6741
29. Rane, M. J., Coxon, P. Y., Powell, D. W., Webster, R., Klein, J. B., Pierce, W., Ping, P., and McLeish, K. R. (2001) p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **276**, 3517-3523
30. Weber, H. O., Ludwig, R. L., Morrison, D., Kotlyarov, A., Gaestel, M., and Vousden, K. H. (2005) HDM2 phosphorylation by MAPKAP kinase 2. *Oncogene* **24**, 1965-1972
31. Xu, L., Chen, S., and Bergan, R. C. (2006) MAPKAPK2 and HSP27 are downstream effectors of p38 MAP kinase-mediated matrix metalloproteinase type 2 activation and cell invasion in human prostate cancer. *Oncogene* **25**, 2987-2998
32. Kumar, B., Koul, S., Petersen, J., Khandrika, L., Hwa, J. S., Meacham, R. B., Wilson, S., and Koul, H. K. (2010) p38 mitogen-activated protein kinase-driven MAPKAPK2 regulates invasion of bladder cancer by modulation of MMP-2 and MMP-9 activity. *Cancer Res.* **70**, 832-841
33. Reinhardt, H. C., Aslanian, A. S., Lees, J. A., and Yaffe, M. B. (2007) p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell* **11**, 175-189
34. Manke, I. A., Nguyen, A., Lim, D., Stewart, M. Q., Elia, A. E., and Yaffe, M. B. (2005) MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Mol. Cell* **17**, 37-48
35. Felix, R. S., Colleoni, G. W., Caballero, O. L., Yamamoto, M., Almeida, M. S., Andrade, V. C., Chauffaille Mde, L., Silva, W. A., Jr., Begnami, M. D., Soares, F. A., Simpson, A. J., Zago,

M. A., and Vettore, A. L. (2009) SAGE analysis highlights the importance of p53csv, ddx5, mapkapk2 and ranbp2 to multiple myeloma tumorigenesis. *Cancer Lett.* **278**, 41-48

36. Liu, B., Yang, L., Huang, B., Cheng, M., Wang, H., Li, Y., Huang, D., Zheng, J., Li, Q., Zhang, X., Ji, W., Zhou, Y., and Lu, J. (2012) A functional copy-number variation in MAPKAPK2 predicts risk and prognosis of lung cancer. *Am. J. Hum. Genet.* **91**, 384-390
37. Birner, P., Beer, A., Vinatzer, U., Stary, S., Hoftberger, R., Nirtl, N., Wrba, F., Streubel, B., and Schoppmann, S. F. (2012) MAPKAP kinase 2 overexpression influences prognosis in gastrointestinal stromal tumors and associates with copy number variations on chromosome 1 and expression of p38 MAP kinase and ETV1. *Clin. Cancer Res.* **18**, 1879-1887
38. Salh, B., Marotta, A., Wagey, R., Sayed, M., and Pelech, S. (2002) Dysregulation of phosphatidylinositol 3-kinase and downstream effectors in human breast cancer. *Int. J. Cancer* **98**, 148-154
39. Engel, K., Plath, K., and Gaestel, M. (1993) The MAP kinase-activated protein kinase 2 contains a proline-rich SH3-binding domain. *FEBS Lett.* **336**, 143-147
40. Zu, Y. L., Ai, Y., Gilchrist, A., Maulik, N., Watras, J., Sha'afi, R. I., Das, D. K., and Huang, C. K. (1997) High expression and activation of MAP kinase-activated protein kinase 2 in cardiac muscle cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 2159-2168
41. Gorska, M. M., Liang, Q., Stafford, S. J., Goplen, N., Dharajiya, N., Guo, L., Sur, S., Gaestel, M., and Alam, R. (2007) MK2 controls the level of negative feedback in the NF-kappaB pathway and is essential for vascular permeability and airway inflammation. *J. Exp. Med.* **204**, 1637-1652
42. Edge, S. B., American Joint Committee on Cancer., and American Cancer Society. (2010) *AJCC cancer staging handbook : from the AJCC cancer staging manual*, 7th ed., Springer, New York
43. Fouassier, L., Yun, C. C., Fitz, J. G., and Doctor, R. B. (2000) Evidence for ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 (EBP50) self-association through PDZ-PDZ interactions. *J. Biol. Chem.* **275**, 25039-25045.
44. Anderson, D. R., Meyers, M. J., Vernier, W. F., Mahoney, M. W., Kurumbail, R. G., Caspers, N., Poda, G. I., Schindler, J. F., Reitz, D. B., and Mourey, R. J. (2007) Pyrrolopyridine inhibitors of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 (MK-2). *J. Med. Chem.* **50**, 2647-2654
45. Shelton, P., and Jaiswal, A. K. (2013) The transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2): a protooncogene? *FASEB J.* **27**, 414-423

46. Fischer, O. M., Hart, S., Gschwind, A., Prenzel, N., and Ullrich, A. (2004) Oxidative and osmotic stress signaling in tumor cells is mediated by ADAM proteases and heparin-binding epidermal growth factor. *Mol. Cell Biol.* **24**, 5172-5183
47. Rao, G. N. (1996) Hydrogen peroxide induces complex formation of SHC-Grb2-SOS with receptor tyrosine kinase and activates Ras and extracellular signal-regulated protein kinases group of mitogen-activated protein kinases. *Oncogene* **13**, 713-719
48. Sirica, A. E. (2008) Role of ErbB family receptor tyrosine kinases in intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J. Gastroenterol.* **14**, 7033-7058
49. Berasain, C., Perugorria, M. J., Latasa, M. U., Castillo, J., Goni, S., Santamaria, M., Prieto, J., and Avila, M. A. (2009) The epidermal growth factor receptor: a link between inflammation and liver cancer. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **234**, 713-725
50. Claperon, A., Mergey, M., Aoudjehane, L., Ho-Bouldoires, T. H., Wendum, D., Prignon, A., Merabtene, F., Firrincieli, D., Desbois-Mouthon, C., Scatton, O., Conti, F., Housset, C., and Fouassier, L. (2013) Hepatic myofibroblasts promote the progression of human cholangiocarcinoma through activation of epidermal growth factor receptor. *Hepatology*
51. Wang, B., Yang, Y., and Friedman, P. A. (2008) Na/H Exchange Regulatory Factor 1, a Novel AKT-associating Protein, Regulates Extracellular Signal-regulated Kinase Signaling through a B-Raf-Mediated Pathway. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1637-1645
52. Lin, S. P., Lee, Y. T., Wang, J. Y., Miller, S. A., Chiou, S. H., Hung, M. C., and Hung, S. C. (2012) Survival of cancer stem cells under hypoxia and serum depletion via decrease in PP2A activity and activation of p38-MAPKAPK2-Hsp27. *PLoS One* **7**, e49605
53. Wu, R., Kausar, H., Johnson, P., Montoya-Durango, D. E., Merchant, M., and Rane, M. J. (2007) Hsp27 regulates Akt activation and polymorphonuclear leukocyte apoptosis by scaffolding MK2 to Akt signal complex. *J. Biol. Chem.* **282**, 21598-21608
54. Gamou, S., and Shimizu, N. (1995) Hydrogen peroxide preferentially enhances the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett.* **357**, 161-164
55. Scott, A. J., O'Dea, K. P., O'Callaghan, D., Williams, L., Dokpesi, J. O., Tatton, L., Handy, J. M., Hogg, P. J., and Takata, M. (2011) Reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase mediate tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) activation in primary human monocytes. *J. Biol. Chem.* **286**, 35466-35476
56. Ronkina, N., Menon, M. B., Schwermann, J., Tiedje, C., Hitti, E., Kotlyarov, A., and Gaestel, M. (2010) MAPKAP kinases MK2 and MK3 in inflammation: complex regulation of TNF biosynthesis via expression and phosphorylation of tristetraprolin. *Biochem. Pharmacol.* **80**, 1915-1920

57. Li, M. L., Defren, J., and Brewer, G. (2013) Hsp27 and F-box protein beta-TrCP promote degradation of mRNA decay factor AUF1. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 2315-2326
58. Gruber, A. R., Fallmann, J., Kratochvill, F., Kovarik, P., and Hofacker, I. L. (2011) AREsite: a database for the comprehensive investigation of AU-rich elements. *Nucleic Acids Res.* **39**, D66-69
59. Shi, J. X., Su, X., Xu, J., Zhang, W. Y., and Shi, Y. (2012) MK2 posttranscriptionally regulates TNF-alpha-induced expression of ICAM-1 and IL-8 via tristetraprolin in human pulmonary microvascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung cell. Mol. Physiol.* **302**, L793-799
60. Gales, D., Clark, C., Manne, U., and Samuel, T. (2013) The Chemokine CXCL8 in Carcinogenesis and Drug Response. *ISRN oncology* **2013**, 859154
61. DeForge, L. E., Preston, A. M., Takeuchi, E., Kenney, J., Boxer, L. A., and Remick, D. G. (1993) Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J. Biol. Chem.* **268**, 25568-25576
62. Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H., and Kracht, M. (2002) Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 847-855
63. Tabibian, J. H., Trussoni, C. E., O'Hara, S. P., Splinter, P. L., Heimbach, J. K., and LaRusso, N. F. (2014) Characterization of cultured cholangiocytes isolated from livers of patients with primary sclerosing cholangitis. *Lab. Invest.*
64. Yahya, R. S., Ghanem, O. H., Foyouh, A. A., Atwa, M., and Enany, S. A. (2013) Role of interleukin-8 and oxidative stress in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin. Lab.* **59**, 969-976
65. Akiba, J., Yano, H., Ogasawara, S., Higaki, K., and Kojiro, M. (2001) Expression and function of interleukin-8 in human hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* **18**, 257-264
66. Sueoka, H., Hirano, T., Uda, Y., Iimuro, Y., Yamanaka, J., and Fujimoto, J. (2014) Blockage of CXCR2 suppresses tumor growth of intrahepatic cholangiocellular carcinoma. *Surgery* **155**, 640-649
67. Amura, C. R., Brodsky, K. S., Gitomer, B., McFann, K., Lazennec, G., Nichols, M. T., Jani, A., Schrier, R. W., and Doctor, R. B. (2008) CXCR2 agonists in ADPKD liver cyst fluids promote cell proliferation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **294**, C786-796
68. Liu, Z., Yang, L., Xu, J., Zhang, X., and Wang, B. (2011) Enhanced expression and clinical significance of chemokine receptor CXCR2 in hepatocellular carcinoma. *J. Surg. Res.* **166**, 241-246
69. Zhang, M., and Wang, W. (2003) Organization of signaling complexes by PDZ-domain scaffold proteins. *Acc. Chem. Res.* **36**, 530-538

70. Fouassier, L., Duan, C. Y., Feranchak, A. P., Yun, C. H., Sutherland, E., Simon, F., Fitz, J. G., and Doctor, R. B. (2001) Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 is expressed at the apical membrane of rat liver epithelia. *Hepatology* **33**, 166-176.
71. Claperon, A., Guedj, N., Mergey, M., Vignjevic, D., Desbois-Mouthon, C., Boissan, M., Saubamea, B., Paradis, V., Housset, C., and Fouassier, L. (2012) Loss of EBP50 stimulates EGFR activity to induce EMT phenotypic features in biliary cancer cells. *Oncogene* **31**, 1376-1388
72. Shibata, T., Chuma, M., Kokubu, A., Sakamoto, M., and Hirohashi, S. (2003) EBP50, a beta-catenin-associating protein, enhances Wnt signaling and is over-expressed in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **38**, 178-186
73. Lazar, C. S., Cresson, C. M., Lauffenburger, D. A., and Gill, G. N. (2004) The Na+/H+ exchanger regulatory factor stabilizes epidermal growth factor receptors at the cell surface. *Mol. Biol. Cell* **15**, 5470-5480
74. Maudsley, S., Zamah, A. M., Rahman, N., Blitzer, J. T., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J., and Hall, R. A. (2000) Platelet-derived growth factor receptor association with Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor potentiates receptor activity. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 8352-8363.
75. Leslie, K. L., Song, G. J., Barrick, S., Wehbi, V. L., Vilardaga, J. P., Bauer, P. M., and Bisello, A. (2013) Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 (EBP50) and nuclear factor-kappaB (NF-kappaB): a feed-forward loop for systemic and vascular inflammation. *J. Biol. Chem.* **288**, 36426-36436
76. Gruden, G., Carucci, P., Lolli, V., Cosso, L., Dellavalle, E., Rolle, E., Cantamessa, A., Pinach, S., Abate, M. L., Campra, D., Brunello, F., Bruno, G., Rizzetto, M., and Perin, P. C. (2013) Serum heat shock protein 27 levels in patients with hepatocellular carcinoma. *Cell Stress Chaperones* **18**, 235-241
77. Lee, I. N., Chen, C. H., Sheu, J. C., Lee, H. S., Huang, G. T., Yu, C. Y., Lu, F. J., and Chow, L. P. (2005) Identification of human hepatocellular carcinoma-related biomarkers by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **4**, 2062-2069
78. Lim, S. O., Park, S. G., Yoo, J. H., Park, Y. M., Kim, H. J., Jang, K. T., Cho, J. W., Yoo, B. C., Jung, G. H., and Park, C. K. (2005) Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules. *World J. Gastroenterol.* **11**, 2072-2079

79. Sato, Y., Harada, K., Sasaki, M., Yasaka, T., and Nakanuma, Y. (2012) Heat shock proteins 27 and 70 are potential biliary markers for the detection of cholangiocarcinoma. *Am. J. Pathol.* **180**, 123-130

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Oxidative stress triggered by H_2O_2 activates MK2/Hsp27 pathway in liver cancer cells. A. Analysis of H_2O_2-stimulated MK2-dependent signaling pathway in HCC (PLC/PRF5, HepG2) and CCA **(**Mz-ChA-1, EGI-1) cell lines. Cells were treated with 500 μM of H_2O_2 in the presence or absence of MK2i (5 μM). The phosphorylation status of MK2 and Hsp27 was examined by western blot. MK2 was visualized using a specific antibody that recognizes MK2 irrespective of its phosphorylation status; MK2 phosphorylation was attested by an upper shift in electrophoretic mobility. Phosphorylated and total Hsp27 were detected by two different antibodies. B. Cells were incubated with increasing doses of H_2O_2 for 48 h in the presence or absence of MK2i. Cell viability was measured using a MTT assay. Statistical analysis: n=6 in duplicate; Mann-Whitney; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, *vs* no H_2O_2. $^{\#}$ $P < 0.05$, $^{\#\#}$ $P < 0.01$, $^{\#\#\#}$ $P < 0.001$ *vs* H_2O_2 without MK2i.

FIGURE 2. Inhibition of MK2 sensitizes liver cancer cells to oxidative stress-induced apoptosis. Cells were treated with 250 μM (PLC/PRF5) or 500 μM (Mz-ChA-1) of H_2O_2 for 24 h in the presence or absence of MK2i. A-B: p53 nuclear expression was analyzed by immunofluorescence (A) and caspase-3 and PARP cleavage was evaluated by western blot (B).

FIGURE 3. Inhibition of MK2 reduces the nuclear localization of Nfr2 and total expression of HO-1, and increases DNA damage. Cells were treated with 250 μM (PLC/PRF5) or 500 μM (Mz-ChA-1) of H_2O_2 for 2 h (A), 8 h (B) and 24 h (C, D) in the presence or absence of MK2i. A. Subcellular localization Nfr2 was analyzed by immunofluorescence; B. HO-1 expression was analyzed by western blot. C-D: Nuclear localization and protein level of gH2AX were evaluated by immunofluorescence (C) and western blot (D), respectively.

FIGURE 4. The MK2/Hsp27 pathway regulates H_2O_2-induced IL-8 expression. A-B: Cells were incubated with 250 μM (PLC/PRF5) or 500 μM (Mz-ChA-1) of H_2O_2 for 5 h (A) or 24 h (B) in the presence or absence of MK2i, were subjected to RT-PCR analysis of IL-8 (A), and analysis of IL-8 concentration by ELISA in the supernatant (B). C-D: Cells transiently transfected with Hsp27 or Cont siRNA for 67 h and incubated with H_2O_2 for 5 h, were subjected to RT-PCR analysis of Hsp27 (C) and IL-8 (D). Statistical analysis: n=6 in duplicate; Wilcoxon rank-signed test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ *vs* control or siCont, Mann-Whitney; $^{\#}$ $P < 0.05$; $^{\#\#}$ $P < 0.01$ *vs* H_2O_2.

FIGURE 5. Inhibition of MK2 abrogates H_2O_2-induced activation of HB-EGF/EGFR axis in

liver cancer cells. A. EGFR activation in response to H_2O_2 was analyzed by western blot. B-C: RT-PCR analysis of HB-EGF mRNA expression in liver cancer cell lines. Cells were treated with 250 μM (PLC/PRF5) or 500 μM (Mz-ChA-1) of H_2O_2 for 5 h in the presence or absence of MK2i (B). Cells were transiently transfected with Hsp27 or control siRNA for 67 h and treated with H_2O_2 for 5 h (C). D. Analysis of MK2 activation in response to HB-EGF by western blot. PLC/PRF5 and Mz-ChA-1 cells were serum-deprived for 24 h and pretreated with or without MK2i 1 hour prior to incubation with HB-EGF (50 ng/mL) for 30 min. Statistical analysis: n = 6 in duplicate; Wilcoxon rank-signed test; ** $P < 0.01$ *vs* Cont or siCont; Mann-Whitney; $^{\#}$ $P < 0.05$ *vs* H_2O_2.

FIGURE 6. The MK2/Hsp27 pathway is regulated by the scaffold protein EBP50. A. MK2 owns protein a typical PDZ motif at its COOH-tail, LTRL. B-C: MK2 binds to EBP50. GST pull-down analysis was performed by incubating the immobilized GST recombinant proteins of EBP50 (left panel and middle panel) with Hela cell lysate (right panel). Western blot analysis using MK2 and AKT antibodies (B). MK2 (left panel) or EBP50 (right panel) was immunoprecipitated with specific antibody or control immunoglobulin G from whole-cell lysates of Mz-ChA-1 cells. Western blotting was performed with an antibody against EBP50 (left panel) or MK2 (right panel) (C). D. Loss of EBP50 decreases MK2-dependent cell signaling. Mz-ChA-1 and PLC/PRF5 cells were transiently transfected with EBP50 or control siRNA for 72 h and treated or not with 500 μM (Mz-ChA-1) or 250 μM (PLC/PRF5) of H_2O_2. Phosphorylated status of MK2 and Hsp27 was analyzed by western blotting. E. H_2O_2 promotes interaction between EBP50 and Hsp27. Mz-ChA-1 cells were treated or not with 500 μM of H_2O_2 for 30 min. Cell lysate was incubated with 25 μg of GST only or GST-EBP50 for 2 h and Hsp27 was detected by western blotting. F-I: Loss of EBP50 causes cell death and DNA damages. PLC/PRF5 and Mz-ChA-1 cells were transiently transfected with EBP50 or control siRNA for 48 h and treated or not with H_2O_2 for 24 h (F-G) or 5 h (I). Western blotting was performed to analyze cleavage of caspase-3 and PARP (F) and gH2AX expression (G). H-I: HB-EGF (H) and IL-8 (I) mRNA expression was analyzed by RT-PCR. Statistical analysis: n = 6 in duplicate; Wilcoxon rank-signed test; ** $P < 0.01$ *vs* siCont; Mann-Whitney; $^{\#}$ $P < 0.05$ *vs* H_2O_2.

FIGURE 7. MK2, Hsp27 and EBP50 status in human liver tumors. A. Real-time PCR analysis of MK2, Hsp27 and EBP50 mRNA expression in 70 human paired HCC (T)/nontumor (NT) liver tissue samples. B-C: Representative immunostaining showing overexpression of MK2, HSP27 and EBP50 in a HCC tumor compared to paired nontumor tissue (n=7) (B) and in CCA tumor (n=10) compared to normal liver (C). Statistical analysis: T *vs* NT: Wilcoxon test for paired values. ***, $P < 0.001$.

FIGURE 8. Hypothetical model depicting the role of MK2 in protecting liver cancer cells from oxidative stress. Upon oxidative stress, MK2 is activated and triggers 1/ phosphorylation of Hsp27; 2/ antioxidant defense through Nrf2 and HO-1; 3/ overexpression of IL-8 and HB-EGF, and activation of EGFR; 4/ inhibition of apoptosis. EBP50 acting as a scaffold of MK2 regulates the MK2/Hsp27 pathway.

Figure 1

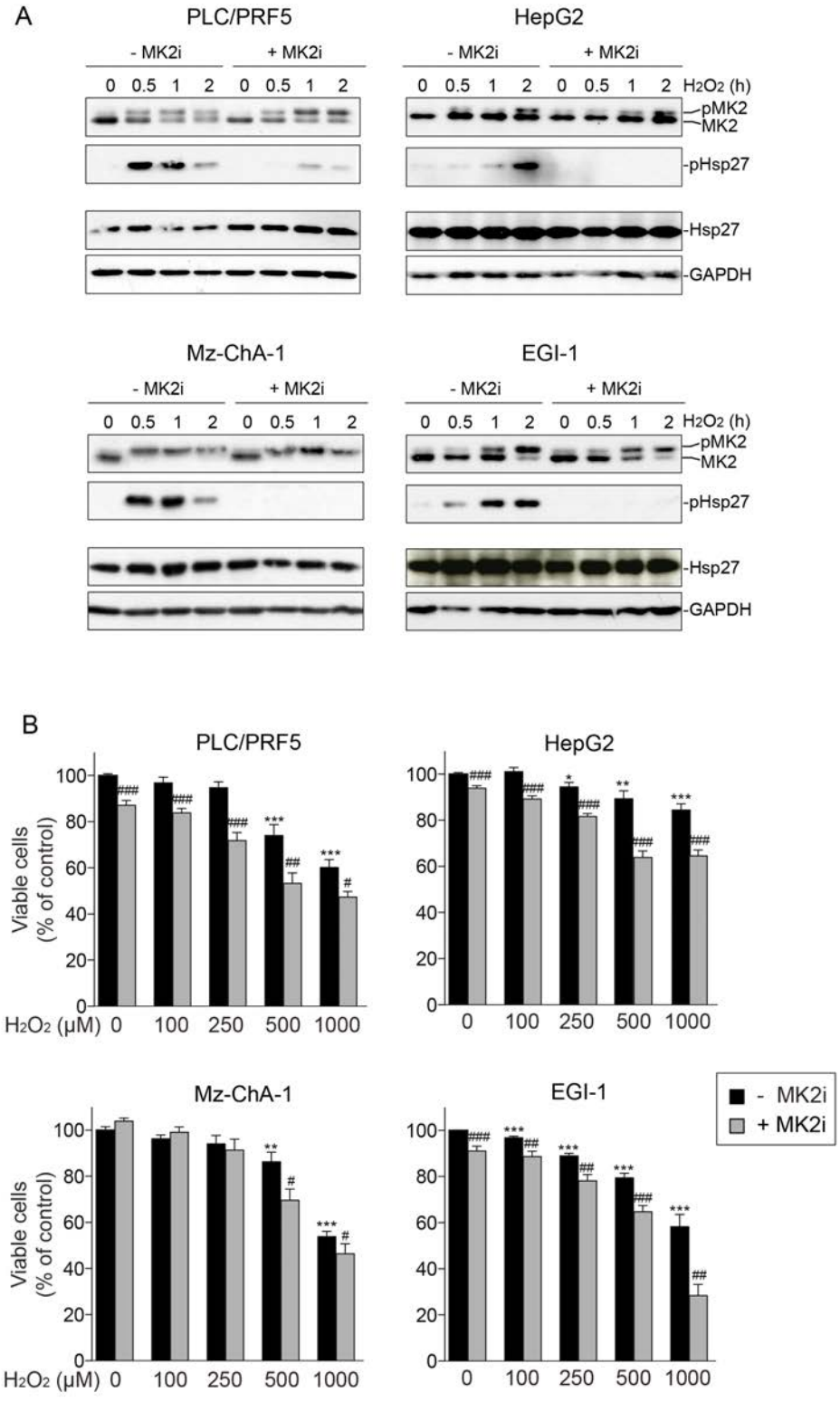

A
PLC/PRF5
HepG2
Mz-ChA-1
EGI-1
- MK2i
+ MK2i
0 0.5 1 2 0 0.5 1 2
H2O2 (h)
pMK2
MK2
pHsp27
Hsp27
GAPDH
B
Viable cells (% of control)
H2O2 (μM) 0 100 250 500 1000
- MK2i
+ MK2i

Figure 2

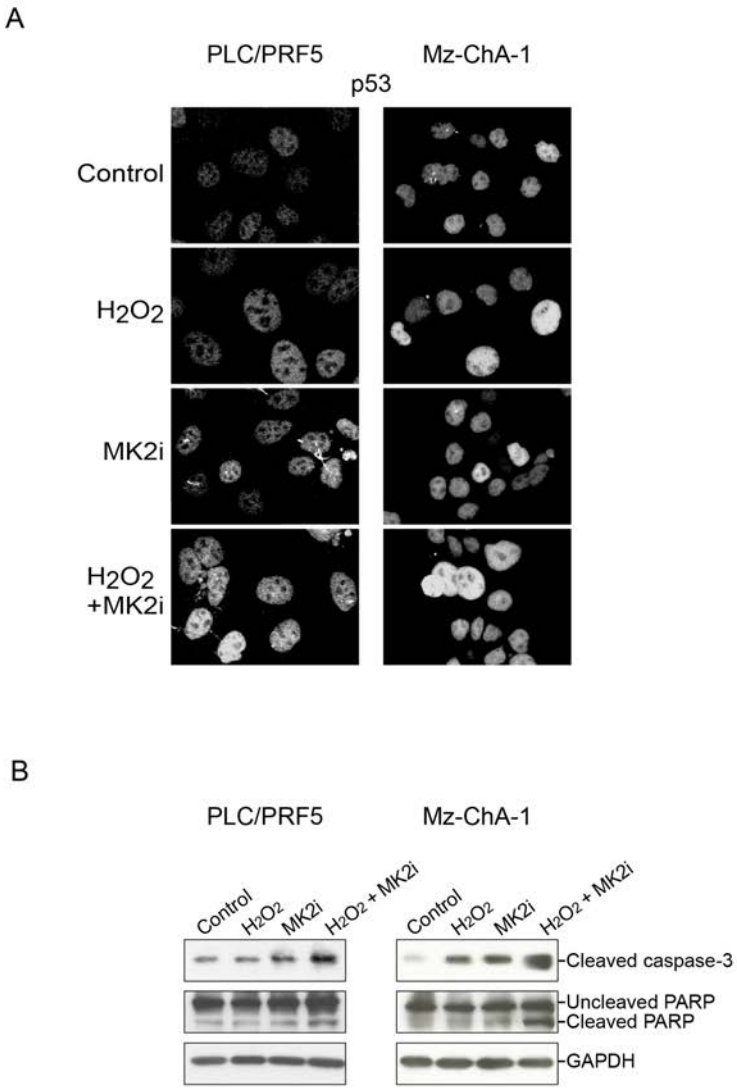

A
PLC/PRF5
Mz-ChA-1
p53
Control
H2O2
MK2i
H2O2 +MK2i
B
PLC/PRF5
Mz-ChA-1
Control
H2O2
MK2i
H2O2 + MK2i
Cleaved caspase-3
Uncleaved PARP
Cleaved PARP
GAPDH

Figure 3

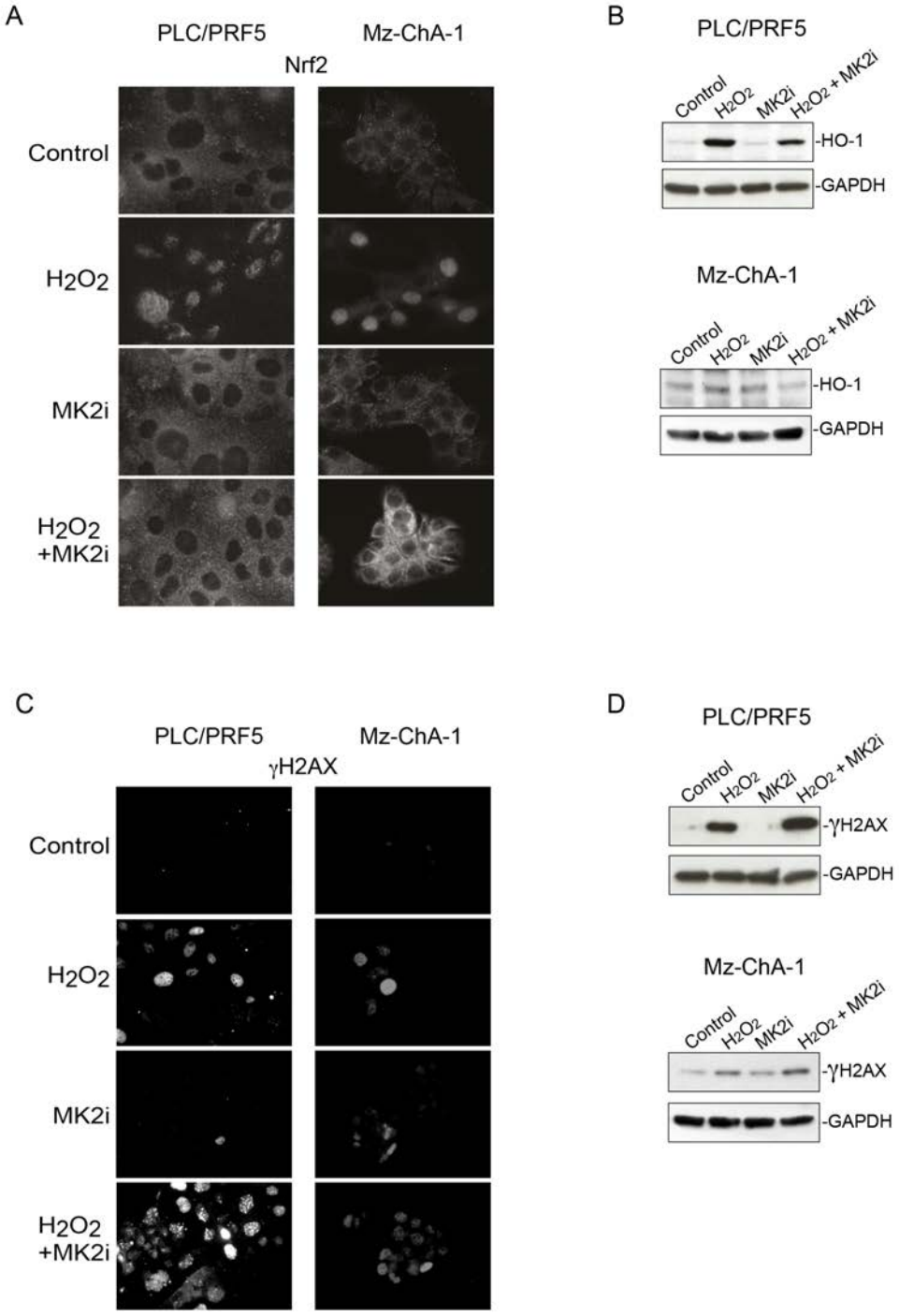

A
PLC/PRF5
Mz-ChA-1
Nrf2
Control
H2O2
MK2i
H2O2 +MK2i
B
PLC/PRF5
Control
H2O2
MK2i
H2O2 + MK2i
-HO-1
-GAPDH
Mz-ChA-1
Control
H2O2
MK2i
H2O2 + MK2i
-HO-1
-GAPDH
C
PLC/PRF5
Mz-ChA-1
γH2AX
Control
H2O2
MK2i
H2O2 +MK2i
D
PLC/PRF5
Control
H2O2
MK2i
H2O2 + MK2i
-γH2AX
-GAPDH
Mz-ChA-1
Control
H2O2
MK2i
H2O2 + MK2i
-γH2AX
-GAPDH

Figure 4

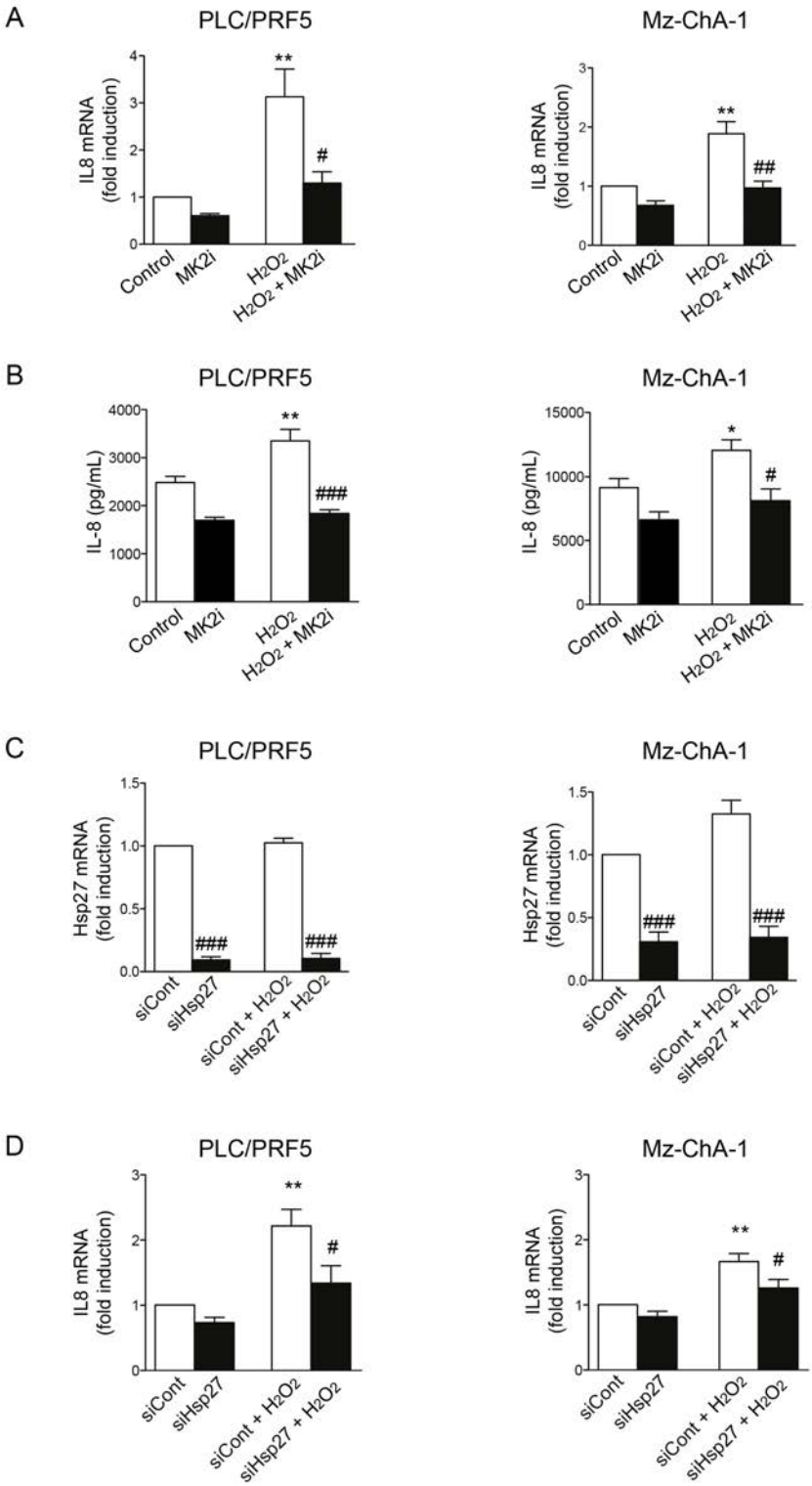

A
PLC/PRF5
Mz-ChA-1
IL8 mRNA (fold induction)
Control
MK2i
H2O2
H2O2 + MK2i
B
IL-8 (pg/mL)
C
Hsp27 mRNA (fold induction)
siCont
siHsp27
siCont + H2O2
siHsp27 + H2O2
D

Figure 5

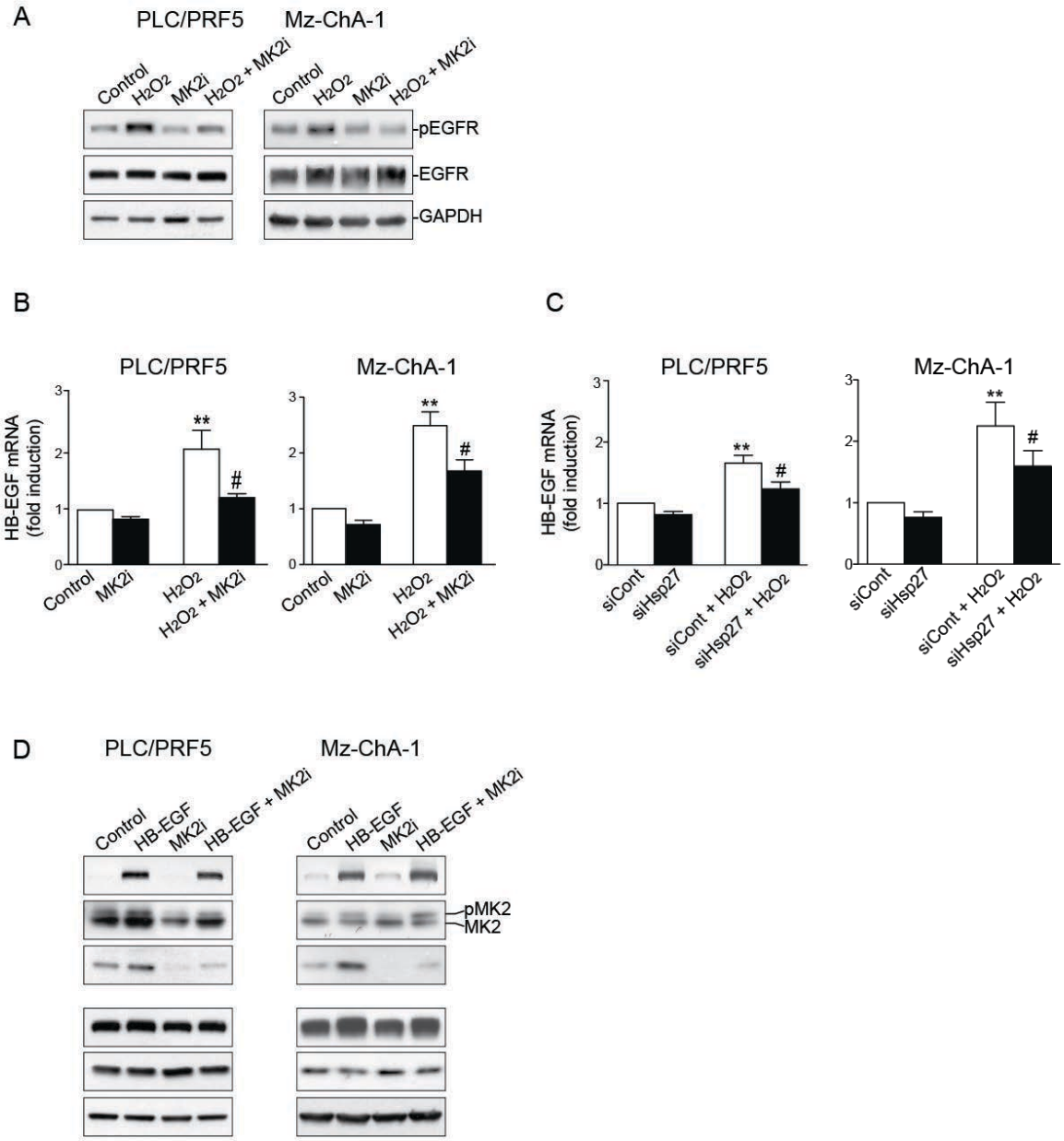

A
PLC/PRF5
Mz-ChA-1
Control
H2O2
MK2i
H2O2 + MK2i
pEGFR
EGFR
GAPDH
B
PLC/PRF5
Mz-ChA-1
HB-EGF mRNA (fold induction)
**
#
Control
MK2i
H2O2
H2O2 + MK2i
C
PLC/PRF5
Mz-ChA-1
HB-EGF mRNA (fold induction)
siCont
siHsp27
siCont + H2O2
siHsp27 + H2O2
D
PLC/PRF5
Mz-ChA-1
Control
HB-EGF
MK2i
HB-EGF + MK2i
pMK2
MK2

Figure 6

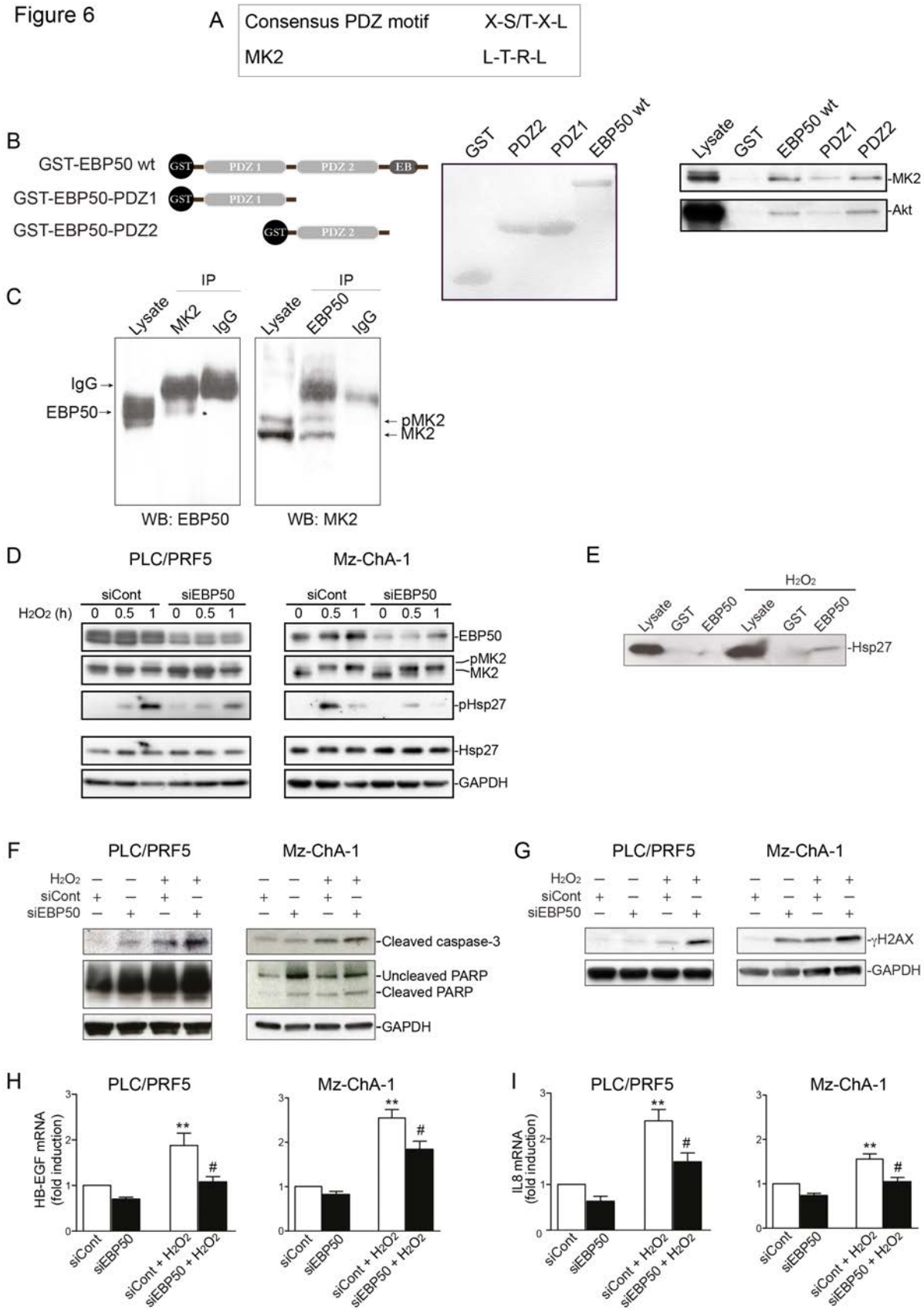

A
Consensus PDZ motif X-S/T-X-L
MK2 L-T-R-L
B
GST-EBP50 wt
GST-EBP50-PDZ1
GST-EBP50-PDZ2
GST
PDZ 1
PDZ 2
EB
GST PDZ2 PDZ1 EBP50 wt
Lysate GST EBP50 wt PDZ1 PDZ2
MK2
Akt
C
IP
Lysate MK2 IgG
Lysate EBP50 IgG
IgG
EBP50
pMK2
MK2
WB: EBP50
WB: MK2
D
PLC/PRF5
Mz-ChA-1
siCont siEBP50
H2O2 (h) 0 0.5 1 0 0.5 1
EBP50
pMK2
MK2
pHsp27
Hsp27
GAPDH
E
H2O2
Lysate GST EBP50 Lysate GST EBP50
Hsp27
F
PLC/PRF5
Mz-ChA-1
H2O2
siCont
siEBP50
Cleaved caspase-3
Uncleaved PARP
Cleaved PARP
GAPDH
G
PLC/PRF5
Mz-ChA-1
γH2AX
GAPDH
H
PLC/PRF5
Mz-ChA-1
HB-EGF mRNA (fold induction)
siCont
siEBP50
siCont + H2O2
siEBP50 + H2O2
I
PLC/PRF5
Mz-ChA-1
IL8 mRNA (fold induction)

Figure 7

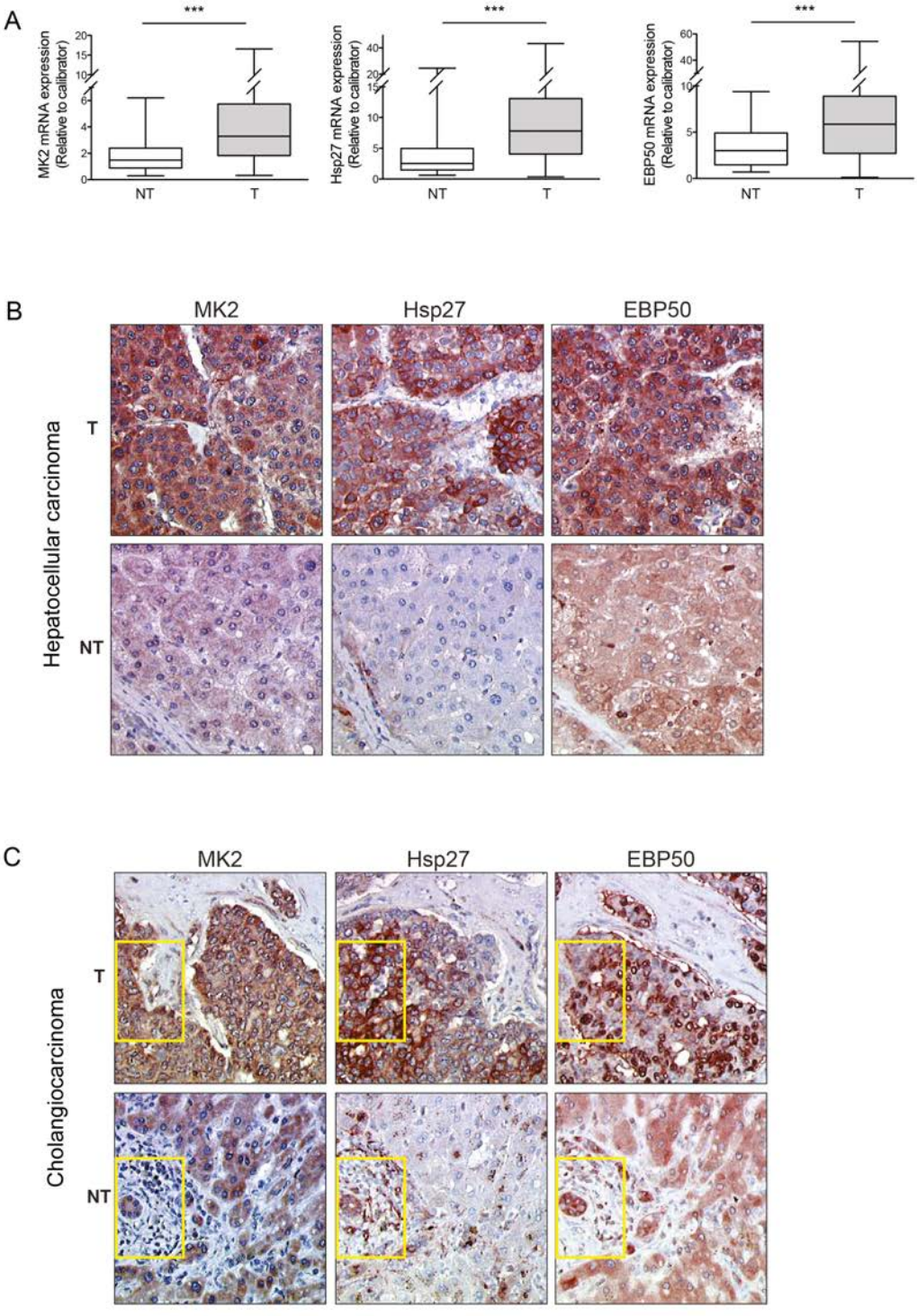

A
MK2 mRNA expression (Relative to calibrator)
Hsp27 mRNA expression (Relative to calibrator)
EBP50 mRNA expression (Relative to calibrator)
***
NT
T
B
MK2
Hsp27
EBP50
Hepatocellular carcinoma
T
NT
C
MK2
Hsp27
EBP50
Cholangiocarcinoma
T
NT

Figure 8

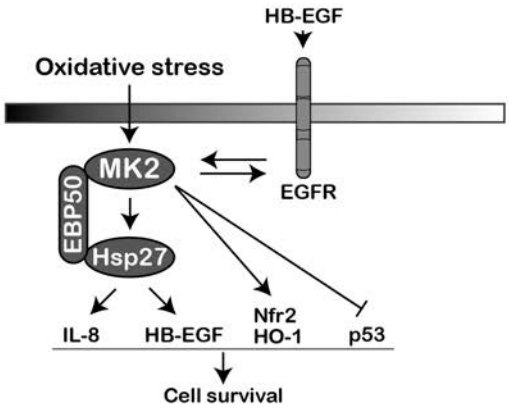

HB-EGF
Oxidative stress
MK2
EBP50
Hsp27
EGFR
IL-8
HB-EGF
Nfr2
HO-1
p53
Cell survival

Table 1 : Clinical and pathological characteristics of 70 patients with HCC

Age (years)	
Mean (± SD)	62 (± 13)
Sex ratio (M/F)	5.4 (59/11)
Etiology of chronic liver disease, n	
HCV infection	
HBV infection	14 (20 %)
Alcohol abuse	20 (29 %)
Hemochromatosis	4 (6 %)
NASH	2 (3 %)
Combined viral hepatitis and alcohol	9 (13%)
Combined metabolic syndrome and	7 (10 %)
alcohol	6 (9 %)
Undetermined	8 (11 %)
Cirrhosis, n (%)	33 (47 %)
Tumor size (mm)	
Mean (± SD)	63.1 (± 48.8)
Number of tumors, n	
Single	55 (77 %)
Multiple	15 (23 %)
Tumor grade, n *	
Well differentiated	11 (16%)
Moderately differentiated	35 (51 %)
Poorly differentiated	23 (33 %)
Invasion	14 (20 %)

* n=69 available

Table 2 : Primary antibodies used for immunodetection

Name	*Species*	*Manufacturer*	*Clone*	*Dilution*	*Antigen unmasking*
Akt	Rabbit	Cell Signaling	C67E7	1/1000 (WB)	
Caspase-3	Rabbit	Cell Signaling		1/500 (WB)	
EBP50	Rabbit	Pierce		1/1000 (WB), 1/200 (IHC & IP)	Citrate, pH 6 (15 min 95°C)
EGFR	Rabbit	Santa Cruz		1/250 (WB)	
GAPDH	Mouse	Santa Cruz	6C5	1/5000 (WB)	
HO-1	Mouse	Pierce	HO-1-1	1/1000 (WB)	
Hsp27	Rabbit	Enzo		1/1000 (WB)	
Hsp27	Mouse	Enzo	G3.1	1/200 (IHC)	Citrate, pH 6 (15 min 95°C)
MK2	Rabbit	Cell Signaling		1/1000 (WB & IP)	
MK2	Mouse	Santa Cruz	H-66	1/50 (IHC)	EDTA, pH 9 (15 min 95°C)
Nrf2	Rabbit	Santa Cruz	C-20	1/200 (IF)	
p-S78-Hsp27	Rabbit	Cell Signaling		1/1000 (WB)	
p-Y1068 EGFR	Rabbit	Cell Signaling		1/1000 (WB)	
p53	Mouse	Santa Cruz	B-P3	1/200 (IF)	
PARP	Rabbit	Cell Signaling	H-250	1/1000 (WB)	
gH2AX	Mouse	Millipore	JBW301	1/1000 (WB) 1/500 (IF)	

WB, western blot; IHC, immunohistochemistry; IP, immunoprecipitation; IF, immunofluorescence.

Table 3 : Primers used for quantitative real-time PCR

Genes	*Forward*	*Reverse*
SLC9A3R1 (EBP50)	5' GGCTGGCAACGAAAATGAGC 3'	5' TGTCGCTGTGCAGGTTGAAG 3'
HBEGF	5' GAAAGACTTCCATCTAGTCACAAACA 3'	5' GGGAGGCCCAATCCTAGA 3'
HPRT	5' TAATTGGTGGAGATGATCT 3'	5' TGCCTGACCAAGGAAAGC 3'
HSP27	5' TCCCTGGATGTCAACCACTT 3'	5' GATGTAGCCATGCTCGTCCT 3'
IL8 (CXCL8)	5' GTGATTGAGAGTGGACCACA 3'	5' CTCTGCACCCAGTTTTCCTT 3'
MAPKAPK2	5' GGATGTCAAGCCTGAGAAT 3'	5' CCAGCACTTCTGGAGCCAC 3'

DISCUSSION

Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre de l'homéostasie redox cellulaire en faveur d'une accumulation des espèces réactives de l'oxygène (i.e H_2O_2). Le stress oxydatif peut conduire à la carcinogenèse hépatique, contribuer à la fois au développement et à la progression tumorale *via* des effets mutagènes et épigénétiques des espèces réactives de l'oxygène *(Loeb 2011, Nishida et al. 2013)*.

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent activer des voies de signalisation telle que la voie de MK2. Il s'agit d'une voie qui est impliquée dans un large panel de réponses cellulaires comme la migration, le contrôle du cycle cellulaire, l'inflammation et la résistance aux stresses *(Gaestel 2006, Reinhardt et al. 2009)*. Dans les cancers du foie, la fonction de MK2 en réponse au stress oxydatif est inconnue.

Nos résultats ont permis de mettre en évidence la participation de la kinase MK2 dans différentes réponses cellulaires qui semblent conférer aux cellules cancéreuses hépatiques une résistance au stress oxydatif. Nous avons ainsi démontré que la voie MK2 est activée dans des lignées cancéreuses hépatocytaires et biliaires en réponse au stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L'activation de MK2 dans les cellules cancéreuses du foie permet aux cellules de survivre en condition de stress oxydatif *via* l'inhibition de l'apoptose.

L'inhibition de l'apoptose observée pourraient être relayée par l'une des principales cibles de MK2, la protéine chaperonne Hsp27 qui a été décrit comme une protéine anti-apoptotique *(Stokoe et al. 1992)*. En effet, la phosphorylation de Hsp27 réduit l'activation de la voie pro-apoptotique caspase 3 et est nécessaire à l'activation de la voie pro-survie Src/Akt *(Shi et al. 2011, Qi et al. 2014)*. Dans les cellules cancéreuses hépatiques, la phosphorylation d'Hsp27 est observée suite à un traitement au H_2O_2 et est inhibée par l'inactivation de MK2. Afin de confirmer le rôle anti-apoptotique de Hsp27 dans la réponse au H_2O_2, nous avons inhibé l'expression de Hsp27 à l'aide d'ARN interférents dans les cellules cancéreuses hépatiques. Le clivage de PARP induit par H_2O_2 est plus élevé en absence de Hsp27 qu'en sa présence ce qui suggère que Hsp27 confère aux cellules cancéreuses hépatiques une résistance à l'apoptose en réponse à H_2O_2 (résultats non montrés).

La réponse anti-apoptotique de MK2 est justifiée par l'augmentation de p53 dans le noyau des lignées cancéreuses hépatiques lorsque MK2 est inhibée. Cette augmentation peut s'expliquer par l'inhibition du régulateur négatif de p53, MDM2 qui poly-ubiquitine p53 et l'entraine vers la voie de dégradation dans le noyau et le cytoplasme *(Shi et al. 2012)*. La phosphorylation de MDM2 par

MK2 semble augmenter l'activité d'ubiquitinylation de MDM2 dans les cellules U2OS soumises au stress oxydatif *(Weber et al. 2005)*. Nous avons observé la phosphorylation de MDM2 en réponse au stress oxydatif dans nos cellules. Cette phosphorylation est abrogée en présence de MK2i mais le niveau de MDM2 total est également diminuée (résultats non montrés). La diminution du taux de MDM2 total peut en effet justifier l'accumulation nucléaire de p53 observée en présence de MK2i dans les cellules soumises au stress oxydatif. Il est possible que la phosphorylation de MDM2 par MK2 stabilise MDM2 en condition de stress oxydatif et qu'en absence de MK2, MDM2 est déstabilisé et dégradé. La dégradation de MDM2 peut être assurée par l'activation des voies de contrôle du cycle cellulaire ATM/ATR lorsque les cellules subissent d'importantes lésions de l'ADN. Ce mécanisme permet l'expression par p53 des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose *(Shiloh et al. 2013)*. En effet, nous avons observée des cassures de l'ADN induit par H_2O_2 comme l'atteste l'expression de γH2AX, la forme phosphorylée de l'histone H2AX qui permet la localisation des cassures de l'ADN *(Kang et al. 2012)*. L'expression de γH2AX est augmentée en absence de MK2 ce qui correspond à un nombre plus élevé de cassures de l'ADN. L'augmentation des lésions de l'ADN peut être due soit à un défaut de réparation de l'ADN soit à une augmentation de stress oxydatif, soit les deux. Sakurai et ses collaborateurs ont démontré que la déplétion en p38α, une kinase activatrice de MK2, entraine une accumulation des espèces réactives de l'oxygène dans le foie des souris *(Sakurai et al. 2013)*. Nous avons alors émis l'hypothèse selon laquelle MK2 pourrait réguler l'homéostasie redox dans les cellules cancéreuses du foie en induisant l'expression de molécules antioxydantes. Les antioxydants limiteraient les lésions de l'ADN induit par le stress oxydatif en réduisant le stress oxydatif lui-même dans les cellules.

Les antioxydants prennent en charge les espèces réactives de l'oxygène en excès afin de maintenir l'intégrité cellulaire et génomique. L'expression des antioxydants est majoritairement assurée par le facteur de transcription Nrf2. Nrf2 est réprimé à l'état basal dans le cytoplasme par Keap1 qui facilite l'ubiquinylation et la dégradation de Nrf2. Lors d'un stress oxydatif, l'inhibition de Nrf2 par Keap1 est levée ce qui permet à Nrf2 d'être transloqué dans le noyau *(Ma et al. 2012)*. Nrf2 induit l'expression d'une batterie de gènes impliqués dans la restauration de l'homéostasie redox mais aussi dans l'élimination des protéines endommagées, dans le métabolisme et l'efflux des xénobiotiques *(Shelton et al. 2013)*. Parmi les protéines induites par Nrf2, HO-1 (Hsp32) est l'une des protéines de détoxification des plus étudiées qui intervient dans le catabolisme de l'hème *(Reichard et al. 2007)*. L'inhibition de HO-1 provoque l'apoptose des cellules cancéreuses hépatiques *in vitro* et *in vivo* suggérant un rôle anti-apoptotique de HO-1 *(Sass et al. 2008)*. Nous avons démontré que MK2 favorise l'expression de HO-1 résultante d'une augmentation de

l'activité de Nrf2 dans les cellules tumorales hépatobiliaires soumises au stress oxydatif. L'augmentation des cassures de l'ADN induites par H_2O_2 en absence de MK2 serait due à une diminution de l'activité de Nrf2 qui régule positivement l'expression des enzymes du catabolisme des espèces réactives de l'oxygène *(Rangasamy et al. 2004, Banning et al. 2005, Kim et al. 2007)*. De plus, Nrf2 a été décrite récemment comme responsable de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 en réponse aux stress oxydatif dans les cellules cancéreuses hépatiques *(Niture et al. 2012)*. L'effet anti-apoptotique de MK2 pourrait être ainsi relayé par Nrf2 et HO-1.

Nous ne pouvons pas non plus exclure la possibilité que ces cassures de l'ADN soient dues à une défaillance des contrôles du cycle cellulaire en absence de MK2. En effet, les phosphatases Cdc25 qui régulent positivement la progression du cycle cellulaire sont des cibles de MK2. Lorsque l'ADN est endommagé, MK2 est capable d'arrêter la progression du cycle cellulaire en désactivant les Cdc25 *(Reinhardt et al. 2007)*. L'arrêt du cycle cellulaire est nécessaire à la réparation des lésions de l'ADN qui est essentielle au maintien de l'intégrité génomique *(Reinhardt et al. 2009)*. Le défaut de contrôle dans le cycle cellulaire empêche la réparation des lésions de l'ADN ce qui favorise l'apoptose des cellules *(Castedo et al. 2004)*. MK2 pourrait participer à l'activation de la réparation de l'ADN et favoriser ainsi la survie cellulaire.

La survie cellulaire peut être soutenue par l'activation de la voie EGFR qui confère une résistance à l'apoptose en réponse au stress oxydatif *(Chaturvedi et al. 2014)*. Nous avons observée une plus grande sensibilité des cellules tumorales hépatobiliaires à l'apoptose induite par H_2O_2 en présence d'un inhibiteur pharmacologique d'EGFR, gefitinib. Le clivage de la caspase 3 et de PARP à la suite d'un traitement des cellules par H_2O_2 est augmenté par l'ajout de gefitinib (résultats non montrés). Nous avons démontré que MK2 est responsable de l'activation d'EGFR dans les cellules tumorales hépatobiliaires stimulées par H_2O_2. Il a été décrit qu'EGFR peut être activée *via* l'activation de la métalloprotéase TACE qui est une cible de MK2 et qui permet l'excrétion de HB-EGF, un ligand d'EGFR, en clivant l'ectodomaine du pro-HB-EGF en HB-EGF *(Fischer et al. 2004, Scott et al. 2011)*. Nous proposons ici un nouveau mécanisme par lequel MK2 régule de manière positive l'expression et la stabilité des ARNm de HB-EGF dans les cellules tumorales hépatobiliaires. Hsp27 semble participer à la régulation des ARNm de HB-EGF même si nous ne pouvons pas exclure l'implication d'autres cibles de MK2. En effet, les ARNm qui possèdent à leur région 3'UTR des séquences riches en AU (AREs) sont finement régulées par des protéines de liaison dont fait partie Hsp27 *(Li et al. 2013)* et d'autres cibles de MK2 comme TTP *(von Roretz et al. 2011)*. A l'aide d'AREsite *(Gruber et al. 2011)*, nous avons constaté que les ARNm de HB-EGF possèdent à leurs 3'UTR plusieurs séquences riches en AU, ce qui indique la possibilité que les ARNm de HB-EGF soient stabilisés par Hsp27 ou par d'autres protéines cibles de MK2. Nos

résultats suggèrent que la voie MK2/Hsp27 permet la résistance à l'apoptose induite par le stress oxydatif *via* l'activation d'EGFR par son ligand HB-EGF.

MK2 régule l'expression d'un certain nombre de médiateurs pro-inflammatoires en stabilisant leurs ARNm qui possèdent également des séquences riches en AU *(Gaestel 2006)*. Parmi les cytokines régulées par MK2, il a été démontré qu'IL-8 permet la prolifération et la survie des cellules cancéreuses en agissant comme un facteur de croissance autocrine *(Ciarcia et al. 2012, Gales et al. 2013)*. Nous avons démontré ici que MK2 permet la production d'IL-8 en réponse à H_2O_2. Il est probable que cette production soit dépendante de Hsp27 *via* la stabilisation des ARNm d'IL-8. Il est également possible que Hsp27 régule l'expression d'IL-8 au niveau transcriptionnel puisqu'il est capable de recruter les facteurs de transcription NF-κB et Chop sur le promoteur d'*IL-8 (Bezzerri et al. 2011)*. Bien que nous n'ayons pas démontré l'implication d'IL-8 dans la survie de nos cellules en réponse au stress oxydatif, il a été décrit que l'IL-8 stimule la prolifération des cellules tumorales biliaires Mz-ChA-1 *(Amura et al. 2008)*. La stimulation de la prolifération par l'IL-8 a été également rapportée dans d'autres types de cellules tumorales et celle-ci est relayée *via* la transactivation d'EGFR *(Venkatakrishnan et al. 2000, Luppi et al. 2007)*. Nous pouvons donc envisager que l'activation d'EGFR par MK2 puisse s'effectuer à la fois *via* la production d'IL-8 et *via* l'expression de HB-EGF.

De plus, certaines études associent l'activation de la voie EGFR à l'augmentation de l'activité de Nrf2, surtout dans le cancer du poumon où cette association favorise la prolifération cellulaire, la progression tumorale et la résistance aux chimiothérapies *(Papaiahgari et al. 2007, Weaver et al. 2012, Yamadori et al. 2012)*. En complément de nos résultats, nous proposons que la voie de MK2/EGFR/Nrf2 contribue à la survie des cellules cancéreuses hépatobiliaires en condition de stress oxydatif. Il est possible également que la voie MK2/EGFR/Nrf2 confère aux cellules tumorales hépatocytaires et biliaires une résistance aux chimiothérapies, cela reste à explorer.

Nos résultats ont permis également d'identifier une nouvelle régulation de la voie de signalisation de MK2 par la protéine adaptatrice EBP50. EBP50 contribue à la transduction du signal en formant des complexes protéiques *via* ses domaines PDZ. Dans le foie, EBP50 est exprimée dans les hépatocytes et les cellules biliaires *(Fouassier et al. 2000, Fouassier et al. 2001, Claperon et al. 2011)*, cependant le rôle d'EBP50 dans la réponse au stress oxydatif n'a pas été étudié dans les cancers du foie. Nous avons démontré qu'EBP50 interagit avec MK2 grâce à ses deux domaines PDZ. EBP50 est capable de lier à la fois les formes non phosphorylées et phosphorylées de MK2 et semble participer à la phosphorylation de Hsp27 par MK2. Bien que l'interaction entre EBP50 et Hsp27 dans les cellules ne soit pas démontrée à l'état basal, EBP50 est capable de lier Hsp27 en

condition de stress oxydatif. Cela suggère qu'EBP50 est impliquée dans la formation de complexe de signalisation requis pour la phosphorylation de Hsp27 par MK2. En effet, EBP50 peut interagit avec la kinase Akt *(Wang et al. 2008)* qui a été décrite comme une des kinases de Hsp27 *(Kostenko et al. 2009)*. EBP50 pourrait faciliter la formation du complexe entre p38/MK2/Akt et Hsp27 *(Rane et al. 2001, Zheng et al. 2006)*. Nous avons démontré également que EBP50 participe aux réponses cellulaires dans lesquelles MK2 est impliquée. Elle régule négativement l'apoptose, et positivement l'expression de HB-EGF et d'IL-8. Nous avons ainsi mis en évidence une nouvelle voie de signalisation de MK2 et une nouvelle fonction d'EBP50 dans les cellules cancéreuses hépatiques.

L'augmentation de l'expression de MK2, de Hsp27 et d'EBP50 dans les tissus tumoraux de cholangiocarcinome et du carcinome hépatocellulaire en comparaison aux tissus non tumoraux adjacents renforce l'implication de ces trois protéines dans la carcinogenèse hépatobiliaire.
Nous confirmons dans nos échantillons humains l'augmentation de Hsp27 qui a été décrit dans le carcinome hépatocellulaire et dans le cholangiocarcinome par plusieurs autres études *(Joo et al. 2005, Lee et al. 2005 7624, Lim et al. 2005, Sato et al. 2012, Gruden et al. 2013)*. Dans une étude de 66 cas de carcinome hépatocellulaire, une forte expression de Hsp27 a été associée à un mauvais pronostic dans le sous-groupe d'hépatite B. Tandis que dans le sous-groupe d'hépatite C, une forte expression de Hsp27 tend à être associée à un bon pronostic, avec une survie globale et sans progression augmentée chez les patients *(Harimoto et al. 2004)*. En corrélation avec les paramètres clinico-pathologiques, l'expression de Hsp27 est associée positivement avec l'expression de l'alpha-fœtoprotéine *(Luk et al. 2006)*. De manière intéressante, l'expression de Hsp27 a été détectée uniquement dans le sérum des patients atteints de carcinome hépatobiliaire dans 90% des cas. La présence de Hsp27 dans le sérum a été ainsi proposée comme biomarqueur de carcinome hépatocellulaire *(Feng et al. 2005)*. Dans le cholangiocarcinome, l'expression de Hsp27 a été corrélée à une augmentation de la prolifération cellulaire et de la taille de la tumeur ainsi qu'à l'invasion capsulaire et vasculaire. Son expression est également associée à un très mauvais pronostic *(Romani et al. 2007)*. De même que pour le carcinome hépatocellulaire, les taux de Hsp27 dans la bile et dans le sérum ont été également proposés comme biomarqueur de cholangiocarcinome. La détection de Hsp27 peut atteindre une sensibilité de 90% et une spécificité de 100% *(Sato et al. 2012)*. C'est pourquoi, nous procéderons prochainement à des études plus approfondies de corrélations entre l'expression de Hsp27 et les paramètres clinico-pathologiques d'une part et les étiologies d'autre part.

Similaire à Hsp27, nous confirmons de nouveau l'augmentation d'EBP50 dans les échantillons de cholangiocarcinome *(Claperon et al. 2012)* mais aussi dans ceux du carcinome hépatocellulaire *(Shibata et al. 2003)*. Le rôle pro-oncogène d'EBP50 serait lié à sa localisation subcellulaire. Dans le tissu sain, EBP50 se situe sous la membrane apicale des cellules où elle stabilise l'interaction entre la β-caténine et l'E-cadhérine, ce qui inhibe la migration cellulaire et supprime la croissance indépendante de l'ancrage. EBP50 y joue ainsi un rôle de suppresseur de tumeur *(Kreimann et al. 2007)*. Au contraire, EBP50 est localisée préférentiellement au niveau cytoplasmique et nucléaire dans le cancer. Sa localisation est associée à une translocation nucléaire de la β-caténine et à une augmentation de l'expression de gènes cibles de la voie Wnt/β-caténine. Elle est reliée également à l'activation de la voie EGFR et à une augmentation de la prolifération et de la migration cellulaires *(Shibata et al. 2003, Hayashi et al. 2010, Claperon et al. 2012)*. Dans nos échantillons de tumeurs hépatobiliaires, nous avons observé une forte expression d'EBP50 au niveau cytoplasmique mais aussi nucléaire. Nous pouvons supposer que cette localisation permet à EBP50 de former des complexes protéiques tel celui que nous décrivons précédemment. Des études *in vitro* seront à entreprendre afin de déterminer la localisation d'EBP50 en réponse au stress oxydatif et la relation entre cette localisation et les changements de liaisons avec les partenaires d'EBP50.

Contrairement à l'expression de Hsp27 et d'EBP50 qui a été déjà étudiée dans les cancers hépatobiliaires, nous avons mis en évidence pour la première fois une augmentation de MK2 dans ces cancers. L'expression de MK2 dans le foie sain a été rapportée précédemment comme l'une des plus faibles en comparaison aux autres organes *(Zu et al. 1995)*. Dans les tumeurs hépatobiliaires, l'augmentation d'expression de MK2 peut être associée à une augmentation de l'activité de MK2. En effet, la protéine MK2 purifiée à partir des échantillons de tumeur du sein, présente une activité kinase significativement plus élevée que MK2 purifiée à partir des tissus normaux *(Salh et al. 2002)*. Il est possible que cela soit également le cas dans les tumeurs hépatobiliaires.

L'augmentation de MK2 dans le foie tumoral pourrait être une conséquence de la progression tumorale dans lequel les cellules cancéreuses mettent en place des mécanismes de résistance à l'apoptose. Cette résistance à l'apoptose confère aux cellules tumorales la capacité de survivre en condition de stress notamment en réponse aux chimiothérapies. Plusieurs études ont indiqué un rôle de MK2 et de ses cibles telles que Hsp27 et AATF dans la résistance aux chimiothérapies *(Reinhardt et al. 2007, Hopker et al. 2012, Pavan et al. 2014)*. Par ailleurs, une étude indique que le sorafenib, le seul traitement oral avec une efficacité prouvée pour le carcinome hépatocellulaire, provoque la mort des cellules cancéreuses hépatiques *via* la production des espèces réactives de

l'oxygène *in vitro*. Cette production est également présente dans le sérum des patients atteints de carcinome hépatocellulaire qui sont traités au sorafenib. Une augmentation du stress oxydatif rapporté par la teneur des protéines oxydées dans le sérum après 15 jours de traitement semble être un facteur prédictif de survie sans progression et de la survie globale *(Coriat et al. 2012)*. Cependant, l'effet de sorafenib sur la survie globale reste modeste et limité dans le temps par la survenue d'une résistance au traitement *(Dekervel et al. 2013)*. La voie EGFR a été décrite comme un facteur potentiel de cette résistance *(Galmiche et al. 2014)*. Grâce aux données que nous avons obtenues *in vitro*, nous pouvons également supposer que cette résistance s'effectue à travers MK2 qui confère aux cellules cancéreuses hépatobiliaires une résistance au stress oxydatif *via* l'activation d'EGFR. Des combinaisons entre le sorafenib et des inhibiteurs de MK2 pourraient être envisagées dans le but d'améliorer l'efficacité du sorafenib.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Notre travail a permis de mettre en évidence le rôle de la kinase MK2 dans la résistance au stress oxydatif des cellules tumorales hépatobiliaires. MK2 favorise la survie cellulaire dans un environnement de stress *via* l'activation de plusieurs voies de défense et /ou de réponses adaptatrices. D'une part, MK2 active la réponse anti-oxydante Nrf2 qui permet la détoxification cellulaire des espèces réactives de l'oxygène mais qui paradoxalement participe à la progression tumorale en inhibant l'apoptose et en favorisant la prolifération *(Perera et al. 2011)*. D'autre part, MK2 active la voie EGFR qui est fortement impliquée dans la carcinogenèse hépatobiliaire *(Sirica 2008, Berasain et al. 2009)*. Par ailleurs, MK2 induit la production de la chimiokine IL-8 (CXCL8) qui facilite l'infiltration des cellules immunitaires, l'angiogenèse et la survie cellulaire *(Waugh et al. 2008)*. L'ensemble de ces résultats suggère que MK2 pourrait être impliquée dans la progression tumorale hépatique.

Nous avons démontré pour la première fois que MK2 est impliquée dans la régulation de la réponse anti-oxydante et dans l'expression de HB-EGF. Nous avons confirmé le rôle de MK2 dans la régulation de l'expression d'IL-8 dans les cellules tumorales hépatobiliaires. Cependant, la fonction migratoire de MK2 n'a pas été étudiée. Nos résultats préliminaires sur les cellules tumorales biliaires Mz-ChA-1 indiquent que MK2 participe à la migration cellulaire induite par les agonistes d'EGFR, EGF et HB-EGF. EGF et HB-EGF induisent tous deux la phosphorylation de Hsp27 qui est inhibée par MK2i. Cela suggère que la migration induite pourrait s'effectuer *via* la phosphorylation de Hsp27 *(Kostenko et al. 2009)*. La migration cellulaire s'effectue en défaisant les jonctions cellulaires. Gorska et ses collaborateurs ont décrit une augmentation de la β-caténine, composante des jonctions adhérentes, à la membrane des cellules endothéliales de souris $MK2^{-/-}$ *(Gorska et al. 2007)*. Ceci suggère que MK2 régule la localisation de la β-caténine. De plus, l'axe MK2/Hsp27 peut être impliqué dans le processus d'invasion. MK2 stabilise les ARNm de MMP2 et MMP9 et augmente leur activité dans les cellules du cancer de la prostate *(Xu et al. 2006)* et de la vessie *(Kumar et al. 2010) via* la phosphorylation de Hsp27. Ainsi, des expériences peuvent être envisagées afin de déterminer comment MK2 régule la migration et l'invasion des cellules tumorales biliaires.

Nous avons identifié un nouveau partenaire de MK2, la protéine d'échafaudage EBP50. EBP50 est capable non seulement d'interagir avec MK2 mais elle permet également la régulation de la

phosphorylation de Hsp27, de l'expression de HB-EGF et d'IL-8 par MK2. Nos travaux ont permis ainsi de mettre en évidence de nouvelles fonctions d'EBP50 qui n'ont pas été décrites auparavant. Notre équipe a démontré qu'en absence d'EBP50 à la membrane cellulaire, les cellules tumorales biliaires acquièrent un phénotype migratoire *(Claperon et al. 2012)*. Nous avons observé qu'en réponse au stress oxydatif, EBP50 est délocalisée de la région subapicale dans le cytoplasme des cellules tumorales biliaires. De plus, EBP50, qui est une phospho-protéine, semble être plus phosphorylée et la quantité d'EBP50 dans la cellule est significativement diminuée lors d'un traitement par H_2O_2 ou par l'EGF. Nous pouvons étudier l'influence de la diminution d'EBP50 à la membrane cellulaire et de son statut de phosphorylation dans l'acquisition du phénotype migratoire des cellules tumorales biliaires. Par ailleurs, EBP50 possède un motif phosphorylable par MK2. Nous pouvons supposer qu'une phosphorylation d'EBP50 soit possible par MK2 en réponse au H_2O_2 ou à l'EGF et que cette phosphorylation serait impliquée dans la migration cellulaire.

Nous avons également démontré pour la première fois une augmentation de l'expression de MK2 dans le carcinome hépatocellulaire et dans le cholangiocarcinome. Cette donnée renforce nos résultats *in vitro* et l'idée de la fonction oncogénique de MK2. Il sera intéressant de rechercher des corrélations entre l'augmentation de l'expression de MK2 et les paramètres clinico-pathologiques afin de déterminer si MK2 peut être un facteur prédictif de développement du cancer primitif du foie ou de pronostic.

BIBLIOGRAPHIE

1 Alessi, D. R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen and B. A. Hemmings (1996). "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1." EMBO J **15**(23): 6541-6551.

2 Alford, K. A., S. Glennie, B. R. Turrell, L. Rawlinson, J. Saklatvala and J. L. Dean (2007). "Heat shock protein 27 functions in inflammatory gene expression and transforming growth factor-beta-activated kinase-1 (TAK1)-mediated signaling." The Journal of biological chemistry **282**(9): 6232-6241.

3 Allen, K., H. Jaeschke and B. L. Copple (2011). "Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel mechanism of inflammation during obstructive cholestasis." Am J Pathol **178**(1): 175-186.

4 Ambade, A., D. Catalano, A. Lim and P. Mandrekar (2012). "Inhibition of heat shock protein (molecular weight 90 kDa) attenuates proinflammatory cytokines and prevents lipopolysaccharide-induced liver injury in mice." Hepatology **55**(5): 1585-1595.

5 Amura, C. R., K. S. Brodsky, B. Gitomer, K. McFann, G. Lazennec, M. T. Nichols, A. Jani, R. W. Schrier and R. B. Doctor (2008). "CXCR2 agonists in ADPKD liver cyst fluids promote cell proliferation." Am J Physiol Cell Physiol **294**(3): C786-796.

6 Andersen, J. B. and S. S. Thorgeirsson (2012). "Genetic profiling of intrahepatic cholangiocarcinoma." Curr Opin Gastroenterol **28**(3): 266-272.

7 Baffy, G., E. M. Brunt and S. H. Caldwell (2012). "Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace." J Hepatol **56**(6): 1384-1391.

8 Banning, A., S. Deubel, D. Kluth, Z. Zhou and R. Brigelius-Flohe (2005). "The GI-GPx gene is a target for Nrf2." Mol Cell Biol **25**(12): 4914-4923.

9 Barsyte-Lovejoy, D., D. Y. Mao and L. Z. Penn (2004). "c-Myc represses the proximal promoters of GADD45a and GADD153 by a post-RNA polymerase II recruitment mechanism." Oncogene **23**(19): 3481-3486.

10 Ben-Levy, R., S. Hooper, R. Wilson, H. F. Paterson and C. J. Marshall (1998). "Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2." Curr Biol **8**(19): 1049-1057.

11 Ben-Levy, R., I. A. Leighton, Y. N. Doza, P. Attwood, N. Morrice, C. J. Marshall and P. Cohen (1995). "Identification of novel phosphorylation sites required for activation of MAPKAP kinase-2." EMBO J **14**(23): 5920-5930.

12 Benndorf, R., K. Hayess, S. Ryazantsev, M. Wieske, J. Behlke and G. Lutsch (1994). "Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity." J Biol Chem **269**(32): 20780-20784.

13 Berasain, C., M. J. Perugorria, M. U. Latasa, J. Castillo, S. Goni, M. Santamaria, J. Prieto and M. A. Avila (2009). "The epidermal growth factor receptor: a link between inflammation and liver cancer." Exp Biol Med (Maywood) **234**(7): 713-725.

14 Bertero, T., C. Gastaldi, I. Bourget-Ponzio, V. Imbert, A. Loubat, E. Selva, R. Busca, B. Mari, P. Hofman, P. Barbry, G. Meneguzzi, G. Ponzio and R. Rezzonico (2011). "miR-483-3p controls proliferation in wounded epithelial cells." FASEB J **25**(9): 3092-3105.

15 Bezzerri, V., M. Borgatti, A. Finotti, A. Tamanini, R. Gambari and G. Cabrini (2011). "Mapping the transcriptional machinery of the IL-8 gene in human bronchial epithelial cells." J Immunol **187**(11): 6069-6081.

16 Birner, P., A. Beer, U. Vinatzer, S. Stary, R. Hoftberger, N. Nirtl, F. Wrba, B. Streubel and S. F. Schoppmann (2012). "MAPKAP kinase 2 overexpression influences prognosis in gastrointestinal stromal tumors and associates with copy number variations on chromosome 1 and expression of p38 MAP kinase and ETV1." Clin Cancer Res **18**(7): 1879-1887.

17 Bobo, L. D., R. E. El Feghaly, Y. S. Chen, E. R. Dubberke, Z. Han, A. H. Baker, J. Li, C. A. Burnham and D. B. Haslam (2013). "MAPK-activated protein kinase 2 contributes to Clostridium difficile-associated inflammation." Infect Immun **81**(3): 713-722.

18 Bolanos, J. P. (2013). "Adapting glycolysis to cancer cell proliferation: the MAPK pathway focuses on PFKFB3." Biochem J **452**(3): e7-9.

19 Bollig, F., R. Winzen, M. Gaestel, S. Kostka, K. Resch and H. Holtmann (2003). "Affinity purification of ARE-binding proteins identifies polyA-binding protein 1 as a potential substrate in MK2-induced mRNA stabilization." Biochem Biophys Res Commun **301**(3): 665-670.

20 Brook, M. and N. K. Gray (2012). "The role of mammalian poly(A)-binding proteins in co-ordinating mRNA turnover." Biochem Soc Trans **40**(4): 856-864.

21 Brook, M., C. R. Tchen, T. Santalucia, J. McIlrath, J. S. Arthur, J. Saklatvala and A. R. Clark (2006). "Posttranslational regulation of tristetraprolin subcellular localization and protein stability by p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways." Mol Cell Biol **26**(6): 2408-2418.

22 Bruix, J., G. J. Gores and V. Mazzaferro (2014). "Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives." Gut **63**(5): 844-855.

23 Bulavin, D. V., Y. Higashimoto, I. J. Popoff, W. A. Gaarde, V. Basrur, O. Potapova, E. Appella and A. J. Fornace, Jr. (2001). "Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase." Nature **411**(6833): 102-107.

24 Busuttil, R. A., A. M. Garcia, C. Cabrera, A. Rodriguez, Y. Suh, W. H. Kim, T. T. Huang and J. Vijg (2005). "Organ-specific increase in mutation accumulation and apoptosis rate in CuZn-superoxide dismutase-deficient mice." Cancer Res **65**(24): 11271-11275.

25 Butt, E., D. Immler, H. E. Meyer, A. Kotlyarov, K. Laass and M. Gaestel (2001). "Heat shock protein 27 is a substrate of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets: phosphorylation-induced actin polymerization caused by HSP27 mutants." J Biol Chem **276**(10): 7108-7113.

26 Cai, W., J. L. Rudolph, S. M. Harrison, L. Jin, A. L. Frantz, D. A. Harrison and D. A. Andres (2011). "An evolutionarily conserved Rit GTPase-p38 MAPK signaling pathway mediates oxidative stress resistance." Molecular Biology of the Cell **22**(17): 3231-3241.

27 Cannell, I. G., Y. W. Kong, S. J. Johnston, M. L. Chen, H. M. Collins, H. C. Dobbyn, A. Elia, T. R. Kress, M. Dickens, M. J. Clemens, D. M. Heery, M. Gaestel, M. Eilers, A. E. Willis and M. Bushell (2010). "p38 MAPK/MK2-mediated induction of miR-34c following DNA damage prevents Myc-dependent DNA replication." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(12): 5375-5380.

28 Caputo, F., R. Vegliante and L. Ghibelli (2012). "Redox modulation of the DNA damage response." Biochem Pharmacol **84**(10): 1292-1306.

29 Cargnello, M. and P. P. Roux (2011). "Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases." Microbiol Mol Biol Rev **75**(1): 50-83.

30 Castedo, M., J. L. Perfettini, T. Roumier, K. Andreau, R. Medema and G. Kroemer (2004). "Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition." Oncogene **23**(16): 2825-2837.

31 Chance, B., H. Sies and A. Boveris (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." Physiol Rev **59**(3): 527-605.

32 Chang, E., K. S. Heo, C. H. Woo, H. Lee, N. T. Le, T. N. Thomas, K. Fujiwara and J. Abe (2011). "MK2 SUMOylation regulates actin filament remodeling and subsequent migration in endothelial cells by inhibiting MK2 kinase and HSP27 phosphorylation." Blood **117**(8): 2527-2537.

33 Chang, M. H., S. L. You, C. J. Chen, C. J. Liu, C. M. Lee, S. M. Lin, H. C. Chu, T. C. Wu, S. S. Yang, H. S. Kuo, D. S. Chen and G. Taiwan Hepatoma Study (2009). "Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study." J Natl Cancer Inst **101**(19): 1348-1355.

34 Chaturvedi, R., M. Asim, M. B. Piazuelo, F. Yan, D. P. Barry, J. C. Sierra, A. G. Delgado, S. Hill, R. A. Casero, Jr., L. E. Bravo, R. L. Dominguez, P. Correa, D. B. Polk, M. K. Washington, K. L. Rose, K. L. Schey, D. R. Morgan, R. M. Peek, Jr. and K. T. Wilson (2014). "Activation of EGFR and ERBB2 by Helicobacter pylori results in survival of gastric epithelial cells with DNA damage." Gastroenterology **146**(7): 1739-1751 e1714.

35 Cheng, K. C., D. S. Cahill, H. Kasai, S. Nishimura and L. A. Loeb (1992). "8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions." J Biol Chem **267**(1): 166-172.

36 Cheng, T. J. and Y. K. Lai (1998). "Identification of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2 as a vimentin kinase activated by okadaic acid in 9L rat brain tumor cells." J Cell Biochem **71**(2): 169-181.

37 Cheng, T. J., Y. F. Tseng, W. M. Chang, M. D. Chang and Y. K. Lai (2003). "Retaining of the assembly capability of vimentin phosphorylated by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2." J Cell Biochem **89**(3): 589-602.

38 Chevalier, D. and B. G. Allen (2000). "Two distinct forms of MAPKAP kinase-2 in adult cardiac ventricular myocytes." Biochemistry **39**(20): 6145-6156.

39 Chrestensen, C. A., M. J. Schroeder, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, J. W. Pelo, M. T. Worthington and T. W. Sturgill (2004). "MAPKAP kinase 2 phosphorylates tristetraprolin on in vivo sites including Ser178, a site required for 14-3-3 binding." J Biol Chem **279**(11): 10176-10184.

40 Chuma, M., S. Hige, M. Nakanishi, K. Ogawa, M. Natsuizaka, Y. Yamamoto and M. Asaka (2008). "8-Hydroxy-2'-deoxy-guanosine is a risk factor for development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection." J Gastroenterol Hepatol **23**(9): 1431-1436.

41 Ciarcia, R., M. T. Vitiello, M. Galdiero, C. Pacilio, V. Iovane, D. d'Angelo, D. Pagnini, G. Caparrotti, D. Conti, V. Tomei, S. Florio and A. Giordano (2012). "Imatinib treatment inhibit IL-6, IL-8, NF-KB and AP-1 production and modulate intracellular calcium in CML patients." J Cell Physiol **227**(6): 2798-2803.

42 Claperon, A., N. Guedj, M. Mergey, D. Vignjevic, C. Desbois-Mouthon, M. Boissan, B. Saubamea, V. Paradis, C. Housset and L. Fouassier (2012). "Loss of EBP50 stimulates EGFR activity to induce EMT phenotypic features in biliary cancer cells." Oncogene **31**(11): 1376-1388.

43 Claperon, A., M. Mergey and L. Fouassier (2011). "Roles of the scaffolding proteins NHERF in liver biology." Clin Res Hepatol Gastroenterol **35**(3): 176-181.

44 Clerk, A., A. Michael and P. H. Sugden (1998). "Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes." Biochem J **333 (Pt 3)**: 581-589.

45 Clifton, A. D., P. R. Young and P. Cohen (1996). "A comparison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAP kinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress." FEBS Lett **392**(3): 209-214.

46 Cooke, M. S., M. D. Evans, M. Dizdaroglu and J. Lunec (2003). "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease." FASEB J **17**(10): 1195-1214.

47 Cooper, J. A. and D. A. Schafer (2000). "Control of actin assembly and disassembly at filament ends." Curr Opin Cell Biol **12**(1): 97-103.

48 Coriat, R., C. Nicco, C. Chereau, O. Mir, J. Alexandre, S. Ropert, B. Weill, S. Chaussade, F. Goldwasser and F. Batteux (2012). "Sorafenib-induced hepatocellular carcinoma cell death depends on reactive oxygen species production in vitro and in vivo." Mol Cancer Ther **11**(10): 2284-2293.

49 Cox, A. G., C. C. Winterbourn and M. B. Hampton (2010). "Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling." Biochem J **425**(2): 313-325.

50 Cullinan, S. B., J. D. Gordan, J. Jin, J. W. Harper and J. A. Diehl (2004). "The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase." Mol Cell Biol **24**(19): 8477-8486.

51 De Bont, R. and N. van Larebeke (2004). "Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data." Mutagenesis **19**(3): 169-185.

52 De Wit, R., M. Makkinje, J. Boonstra, A. J. Verkleij and J. A. Post (2001). "Hydrogen peroxide reversibly inhibits epidermal growth factor (EGF) receptor internalization and coincident ubiquitination of the EGF receptor and Eps15." FASEB J **15**(2): 306-308.

53 De Zio, D., V. Cianfanelli and F. Cecconi (2013). "New insights into the link between DNA damage and apoptosis." Antioxid Redox Signal **19**(6): 559-571.

54 Dekervel, J., J. van Pelt and C. Verslype (2013). "Advanced unresectable hepatocellular carcinoma: new biologics as fresh ammunition or clues to disease understanding?" Curr Opin Oncol **25**(4): 409-416.

55 Devasagayam, T. P., S. Steenken, M. S. Obendorf, W. A. Schulz and H. Sies (1991). "Formation of 8-hydroxy(deoxy)guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen." Biochemistry **30**(25): 6283-6289.

56 DeYulia, G. J., Jr., J. M. Carcamo, O. Borquez-Ojeda, C. C. Shelton and D. W. Golde (2005). "Hydrogen peroxide generated extracellularly by receptor-ligand interaction facilitates cell signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(14): 5044-5049.

57 Ebrahimian, T., M. W. Li, C. A. Lemarie, S. M. Simeone, P. J. Pagano, M. Gaestel, P. Paradis, S. Wassmann and E. L. Schiffrin (2011). "Mitogen-activated protein kinase-

activated protein kinase 2 in angiotensin II-induced inflammation and hypertension: regulation of oxidative stress." Hypertension **57**(2): 245-254.

58 Engel, K., A. Kotlyarov and M. Gaestel (1998). "Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation." EMBO J **17**(12): 3363-3371.

59 Engel, K., K. Plath and M. Gaestel (1993). "The MAP kinase-activated protein kinase 2 contains a proline-rich SH3-binding domain." FEBS Lett **336**(1): 143-147.

60 Engel, K., H. Schultz, F. Martin, A. Kotlyarov, K. Plath, M. Hahn, U. Heinemann and M. Gaestel (1995). "Constitutive activation of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 by mutation of phosphorylation sites and an A-helix motif." J Biol Chem **270**(45): 27213-27221.

61 Epand, R. F., J. C. Martinou, S. Montessuit and R. M. Epand (2004). "Fatty acids enhance membrane permeabilization by pro-apoptotic Bax." Biochem J **377**(Pt 2): 509-516.

62 Eyers, C. E., H. McNeill, A. Knebel, N. Morrice, S. J. Arthur, A. Cuenda and P. Cohen (2005). "The phosphorylation of CapZ-interacting protein (CapZIP) by stress-activated protein kinases triggers its dissociation from CapZ." Biochem J **389**(Pt 1): 127-135.

63 Felix, R. S., G. W. Colleoni, O. L. Caballero, M. Yamamoto, M. S. Almeida, V. C. Andrade, L. Chauffaille Mde, W. A. Silva, Jr., M. D. Begnami, F. A. Soares, A. J. Simpson, M. A. Zago and A. L. Vettore (2009). "SAGE analysis highlights the importance of p53csv, ddx5, mapkapk2 and ranbp2 to multiple myeloma tumorigenesis." Cancer Lett **278**(1): 41-48.

64 Feng, J. T., Y. K. Liu, H. Y. Song, Z. Dai, L. X. Qin, M. R. Almofti, C. Y. Fang, H. J. Lu, P. Y. Yang and Z. Y. Tang (2005). "Heat-shock protein 27: a potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome analysis." Proteomics **5**(17): 4581-4588.

65 Feng, S. and X. He (2013). "Mechanism-based inhibition of CYP450: an indicator of drug-induced hepatotoxicity." Curr Drug Metab **14**(9): 921-945.

66 Filosto, S., E. M. Khan, E. Tognon, C. Becker, M. Ashfaq, T. Ravid and T. Goldkorn (2011). "EGF receptor exposed to oxidative stress acquires abnormal phosphorylation and aberrant activated conformation that impairs canonical dimerization." PLoS One **6**(8): e23240.

67 Fischer, O. M., S. Hart, A. Gschwind, N. Prenzel and A. Ullrich (2004). "Oxidative and osmotic stress signaling in tumor cells is mediated by ADAM proteases and heparin-binding epidermal growth factor." Mol Cell Biol **24**(12): 5172-5183.

68 Fouassier, L., C. Y. Duan, A. P. Feranchak, C. H. Yun, E. Sutherland, F. Simon, J. G. Fitz and R. B. Doctor (2001). "Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 is expressed at the apical membrane of rat liver epithelia." Hepatology **33**(1): 166-176.

69 Fouassier, L., C. C. Yun, J. G. Fitz and R. B. Doctor (2000). "Evidence for ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 (EBP50) self-association through PDZ-PDZ interactions." Journal of Biological Chemistry **275**(32): 25039-25045.

70 Freshney, N. W., L. Rawlinson, F. Guesdon, E. Jones, S. Cowley, J. Hsuan and J. Saklatvala (1994). "Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27." Cell **78**(6): 1039-1049.

71 Funding, A. T., C. Johansen, M. Gaestel, B. M. Bibby, L. L. Lilleholt, K. Kragballe and L. Iversen (2009). "Reduced oxazolone-induced skin inflammation in MAPKAP kinase 2 knockout mice." J Invest Dermatol **129**(4): 891-898.

72 Gaestel, M. (2006). "MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd." Nature Reviews Molecular Cell Biology **7**(2): 120-130.

73 Gaestel, M. (2008). "Specificity of signaling from MAPKs to MAPKAPKs: kinases' tango nuevo." Front Biosci **13**: 6050-6059.

74 Gaestel, M., W. Schroder, R. Benndorf, C. Lippmann, K. Buchner, F. Hucho, V. A. Erdmann and H. Bielka (1991). "Identification of the phosphorylation sites of the murine small heat shock protein hsp25." J Biol Chem **266**(22): 14721-14724.

75 Gaitanaki, C., S. Konstantina, S. Chrysa and I. Beis (2003). "Oxidative stress stimulates multiple MAPK signalling pathways and phosphorylation of the small HSP27 in the perfused amphibian heart." J Exp Biol **206**(Pt 16): 2759-2769.

76 Gales, D., C. Clark, U. Manne and T. Samuel (2013). "The Chemokine CXCL8 in Carcinogenesis and Drug Response." ISRN Oncol **2013**: 859154.

77 Galmiche, A., B. Chauffert and J. C. Barbare (2014). "New biological perspectives for the improvement of the efficacy of sorafenib in hepatocellular carcinoma." Cancer Lett **346**(2): 159-162.

78 Gamell, C., A. G. Susperregui, O. Bernard, J. L. Rosa and F. Ventura (2011). "The p38/MK2/Hsp25 pathway is required for BMP-2-induced cell migration." PLoS One **6**(1): e16477.

79 Gamou, S. and N. Shimizu (1995). "Hydrogen peroxide preferentially enhances the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor." FEBS Lett **357**(2): 161-164.

80 Garrido, C., P. Ottavi, A. Fromentin, A. Hammann, A. P. Arrigo, B. Chauffert and P. Mehlen (1997). "HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs." Cancer Res **57**(13): 2661-2667.

81 Gazdar, A. F. (2009). "Personalized medicine and inhibition of EGFR signaling in lung cancer." N Engl J Med **361**(10): 1018-1020.

82 Goldkorn, T., N. Balaban, K. Matsukuma, V. Chea, R. Gould, J. Last, C. Chan and C. Chavez (1998). "EGF-Receptor phosphorylation and signaling are targeted by H2O2 redox stress." Am J Respir Cell Mol Biol **19**(5): 786-798.

83 Gong, P., D. Stewart, B. Hu, N. Li, J. Cook, A. Nel and J. Alam (2002). "Activation of the mouse heme oxygenase-1 gene by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) is mediated by the stress response elements and transcription factor Nrf2." Antioxid Redox Signal **4**(2): 249-257.

84 Gorman, A. M., B. Heavey, E. Creagh, T. G. Cotter and A. Samali (1999). "Antioxidant-mediated inhibition of the heat shock response leads to apoptosis." FEBS Lett **445**(1): 98-102.

85 Gorska, M. M., Q. Liang, S. J. Stafford, N. Goplen, N. Dharajiya, L. Guo, S. Sur, M. Gaestel and R. Alam (2007). "MK2 controls the level of negative feedback in the NF-kappaB pathway and is essential for vascular permeability and airway inflammation." Journal of Experimental Medicine **204**(7): 1637-1652.

86 Griseri, P. and G. Pages (2014). "Control of Pro-Angiogenic Cytokine mRNA Half-Life in Cancer: The Role of AU-Rich Elements and Associated Proteins." J Interferon Cytokine Res **34**(4): 242-254.

87 Gruber, A. R., J. Fallmann, F. Kratochvill, P. Kovarik and I. L. Hofacker (2011). "AREsite: a database for the comprehensive investigation of AU-rich elements." Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D66-69.

88 Gruden, G., P. Carucci, V. Lolli, L. Cosso, E. Dellavalle, E. Rolle, A. Cantamessa, S. Pinach, M. L. Abate, D. Campra, F. Brunello, G. Bruno, M. Rizzetto and P. C. Perin (2013). "Serum heat shock protein 27 levels in patients with hepatocellular carcinoma." Cell Stress Chaperones **18**(2): 235-241.

89 Guay, J., H. Lambert, G. Gingras-Breton, J. N. Lavoie, J. Huot and J. Landry (1997). "Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27." J Cell Sci **110 (Pt 3)**: 357-368.

90 Gurgis, F. M., W. Ziaziaris and L. Munoz (2014). "Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in neuroinflammation, heat shock protein 27 phosphorylation, and cell cycle: role and targeting." Mol Pharmacol **85**(2): 345-356.

91 Han, J., J. D. Lee, L. Bibbs and R. J. Ulevitch (1994). "A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells." Science **265**(5173): 808-811.

92 Hanna, P. M. and R. P. Mason (1992). "Direct evidence for inhibition of free radical formation from Cu(I) and hydrogen peroxide by glutathione and other potential ligands using the EPR spin-trapping technique." Arch Biochem Biophys **295**(1): 205-213.

93 Hannigan, M. O., L. Zhan, Y. Ai, A. Kotlyarov, M. Gaestel and C. K. Huang (2001). "Abnormal migration phenotype of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2-/- neutrophils in Zigmond chambers containing formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine gradients." J Immunol **167**(7): 3953-3961.

94 Harimoto, N., M. Shimada, S. Aishima, D. Kitagawa, S. Itoh, E. Tsujita, S. Maehara, A. Taketomi, S. Tanaka, K. Shirabe and Y. Maehara (2004). "The role of heat shock protein 27 expression in hepatocellular carcinoma in Japan: special reference to the difference between hepatitis B and C." Liver Int **24**(4): 316-321.

95 Hayashi, Y., J. R. Molina, S. R. Hamilton and M. M. Georgescu (2010). "NHERF1/EBP50 is a new marker in colorectal cancer." Neoplasia **12**(12): 1013-1022.

96 Hayes, J. D., J. U. Flanagan and I. R. Jowsey (2005). "Glutathione transferases." Annu Rev Pharmacol Toxicol **45**: 51-88.

97 Hayes, J. D. and M. McMahon (2006). "The double-edged sword of Nrf2: subversion of redox homeostasis during the evolution of cancer." Mol Cell **21**(6): 732-734.

98 Hegen, M., M. Gaestel, C. L. Nickerson-Nutter, L. L. Lin and J. B. Telliez (2006). "MAPKAP kinase 2-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis." J Immunol **177**(3): 1913-1917.

99 Heidenreich, O., A. Neininger, G. Schratt, R. Zinck, M. A. Cahill, K. Engel, A. Kotlyarov, R. Kraft, S. Kostka, M. Gaestel and A. Nordheim (1999). "MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo." J Biol Chem **274**(20): 14434-14443.

100 Hitti, E., T. Iakovleva, M. Brook, S. Deppenmeier, A. D. Gruber, D. Radzioch, A. R. Clark, P. J. Blackshear, A. Kotlyarov and M. Gaestel (2006). "Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element." Molecular and Cellular Biology **26**(6): 2399-2407.

101 Hong, S., H. Noh, H. Chen, R. Padia, Z. K. Pan, S. B. Su, Q. Jing, H. F. Ding and S. Huang (2013). "Signaling by p38 MAPK stimulates nuclear localization of the microprocessor component p68 for processing of selected primary microRNAs." Sci Signal **6**(266): ra16.

102 Hopker, K., H. Hagmann, S. Khurshid, S. Chen, P. Hasskamp, T. Seeger-Nukpezah, K. Schilberg, L. Heukamp, T. Lamkemeyer, M. L. Sos, R. K. Thomas, D. Lowery, F. Roels, M. Fischer, M. C. Liebau, U. Resch, T. Kisner, F. Rother, M. P. Bartram, R. U. Muller, F. Fabretti, P. Kurschat, B. Schumacher, M. Gaestel, R. H. Medema, M. B. Yaffe, B. Schermer, H. C. Reinhardt and T. Benzing (2012). "AATF/Che-1 acts as a phosphorylation-dependent molecular modulator to repress p53-driven apoptosis." EMBO J **31**(20): 3961-3975.

103 Hopker, K., H. Hagmann, S. Khurshid, S. Chen, B. Schermer, T. Benzing and H. C. Reinhardt (2012). "Putting the brakes on p53-driven apoptosis." Cell Cycle **11**(22): 4122-4128.

104 Hosomura, N., H. Kono, M. Tsuchiya, K. Ishii, M. Ogiku, M. Matsuda and H. Fujii (2011). "HCV-related proteins activate Kupffer cells isolated from human liver tissues." Dig Dis Sci **56**(4): 1057-1064.

105 Hu, Z., Y. Wang, W. V. Graham, L. Su, M. W. Musch and J. R. Turner (2006). "MAPKAPK-2 is a critical signaling intermediate in NHE3 activation following Na+-glucose cotransport." J Biol Chem **281**(34): 24247-24253.

106 Huang, C. K., L. Zhan, Y. Ai and J. Jongstra (1997). "LSP1 is the major substrate for mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in human neutrophils." J Biol Chem **272**(1): 17-19.

107 Huang, R. P., A. Peng, A. Golard, M. Z. Hossain, R. Huang, Y. G. Liu and A. L. Boynton (2001). "Hydrogen peroxide promotes transformation of rat liver non-neoplastic epithelial cells through activation of epidermal growth factor receptor." Mol Carcinog **30**(4): 209-217.

108 Huang, R. P., J. X. Wu, Y. Fan and E. D. Adamson (1996). "UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates." J Cell Biol **133**(1): 211-220.

109 Huot, J., H. Lambert, J. N. Lavoie, A. Guimond, F. Houle and J. Landry (1995). "Characterization of 45-kDa/54-kDa HSP27 kinase, a stress-sensitive kinase which may activate the phosphorylation-dependent protective function of mammalian 27-kDa heat-shock protein HSP27." Eur J Biochem **227**(1-2): 416-427.

110 Hyder, C. L., H. M. Pallari, V. Kochin and J. E. Eriksson (2008). "Providing cellular signposts--post-translational modifications of intermediate filaments." FEBS Lett **582**(14): 2140-2148.

111 Imlay, J. A. (2008). "Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide." Annu Rev Biochem **77**: 755-776.

112 Itoh, K., T. Chiba, S. Takahashi, T. Ishii, K. Igarashi, Y. Katoh, T. Oyake, N. Hayashi, K. Satoh, I. Hatayama, M. Yamamoto and Y. Nabeshima (1997). "An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements." Biochem Biophys Res Commun **236**(2): 313-322.

113 Jackson, R. M. and R. Garcia-Rojas (2008). "Kinase activity, heat shock protein 27 phosphorylation, and lung epithelial cell glutathione." Experimental lung research **34**(5): 245-262.

114 Jackson, R. M. and C. Gupta (2010). "Hypoxia and kinase activity regulate lung epithelial cell glutathione." Experimental lung research **36**(1): 45-56.

115 Jaeschke, H. (2011). "Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts." J Gastroenterol Hepatol **26 Suppl 1**: 173-179.

116 Jagielska, J., P. R. Kapopara, G. Salguero, M. Scherr, H. Schutt, K. Grote, B. Schieffer and U. Bavendiek (2012). "Interleukin-1 assembles a proangiogenic signaling module consisting of caveolin-1, tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK), and MAPK-activated protein kinase 2 in endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(5): 1280-1288.

117 Jakob, U., M. Gaestel, K. Engel and J. Buchner (1993). "Small heat shock proteins are molecular chaperones." J Biol Chem **268**(3): 1517-1520.

118 Janknecht, R. (2001). "Cell type-specific inhibition of the ETS transcription factor ER81 by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2." J Biol Chem **276**(45): 41856-41861.

119 Jiang, F., Y. Zhang and G. J. Dusting (2011). "NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair." Pharmacol Rev **63**(1): 218-242.

120 Jiao, J., S. L. Friedman and C. Aloman (2009). "Hepatic fibrosis." Curr Opin Gastroenterol **25**(3): 223-229.

121 Johansen, C., C. Vestergaard, K. Kragballe, G. Kollias, M. Gaestel and L. Iversen (2009). "MK2 regulates the early stages of skin tumor promotion." Carcinogenesis **30**(12): 2100-2108.

122 Joo, M., J. G. Chi and H. Lee (2005). "Expressions of HSP70 and HSP27 in hepatocellular carcinoma." J Korean Med Sci **20**(5): 829-834.

123 Kahle, N. A., G. Brenner-Weiss, J. Overhage, U. Obst and G. M. Hansch (2013). "Bacterial quorum sensing molecule induces chemotaxis of human neutrophils via induction of p38 and leukocyte specific protein 1 (LSP1)." Immunobiology **218**(2): 145-151.

124 Kanagasabai, R., K. Karthikeyan, K. Vedam, W. Qien, Q. Zhu and G. Ilangovan (2010). "Hsp27 protects adenocarcinoma cells from UV-induced apoptosis by Akt and p21-dependent pathways of survival." Mol Cancer Res **8**(10): 1399-1412.

125 Kang, M. A., E. Y. So, A. L. Simons, D. R. Spitz and T. Ouchi (2012). "DNA damage induces reactive oxygen species generation through the H2AX-Nox1/Rac1 pathway." Cell Death Dis **3**: e249.

126 Kao, J. H. and D. S. Chen (2005). "Changing disease burden of hepatocellular carcinoma in the Far East and Southeast Asia." Liver Int **25**(4): 696-703.

127 Karlsson, A. and C. Dahlgren (2002). "Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes." Antioxid Redox Signal **4**(1): 49-60.

128 Kato, K., H. Ito, K. Kamei, Y. Inaguma, I. Iwamoto and S. Saga (1998). "Phosphorylation of alphaB-crystallin in mitotic cells and identification of enzymatic activities responsible for phosphorylation." J Biol Chem **273**(43): 28346-28354.

129 Kayyali, U. S., C. M. Pennella, C. Trujillo, O. Villa, M. Gaestel and P. M. Hassoun (2002). "Cytoskeletal changes in hypoxic pulmonary endothelial cells are dependent on MAPK-activated protein kinase MK2." J Biol Chem **277**(45): 42596-42602.

130 Kensler, T. W., N. Wakabayashi and S. Biswal (2007). "Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 89-116.

131 Khan, E. M., J. M. Heidinger, M. Levy, M. P. Lisanti, T. Ravid and T. Goldkorn (2006). "Epidermal growth factor receptor exposed to oxidative stress undergoes Src- and caveolin-1-dependent perinuclear trafficking." J Biol Chem **281**(20): 14486-14493.

132 Kiley, P. J. and G. Storz (2004). "Exploiting thiol modifications." PLoS Biol **2**(11): e400.

133 Kim, Y. J., J. Y. Ahn, P. Liang, C. Ip, Y. Zhang and Y. M. Park (2007). "Human prx1 gene is a target of Nrf2 and is up-regulated by hypoxia/reoxygenation: implication to tumor biology." Cancer Res **67**(2): 546-554.

134 Klaunig, J. E., L. M. Kamendulis and B. A. Hocevar (2010). "Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis." Toxicol Pathol **38**(1): 96-109.

135 Knapinska, A. M., F. M. Gratacos, C. D. Krause, K. Hernandez, A. G. Jensen, J. J. Bradley, X. Wu, S. Pestka and G. Brewer (2011). "Chaperone Hsp27 modulates AUF1 proteolysis and AU-rich element-mediated mRNA degradation." Molecular and Cellular Biology **31**(7): 1419-1431.

136 Knauf, U., U. Jakob, K. Engel, J. Buchner and M. Gaestel (1994). "Stress- and mitogen-induced phosphorylation of the small heat shock protein Hsp25 by MAPKAP kinase 2 is not essential for chaperone properties and cellular thermoresistance." EMBO J **13**(1): 54-60.

137 Knebel, A., H. J. Rahmsdorf, A. Ullrich and P. Herrlich (1996). "Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents." EMBO J **15**(19): 5314-5325.

138 Kobayashi, M., M. Nishita, T. Mishima, K. Ohashi and K. Mizuno (2006). "MAPKAPK-2-mediated LIM-kinase activation is critical for VEGF-induced actin remodeling and cell migration." EMBO J **25**(4): 713-726.

139 Kostenko, S. and U. Moens (2009). "Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology." Cell Mol Life Sci **66**(20): 3289-3307.

140 Kotlyarov, A., A. Neininger, C. Schubert, R. Eckert, C. Birchmeier, H. D. Volk and M. Gaestel (1999). "MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis." Nature Cell Biology **1**(2): 94-97.

141 Krahenbuhl, S., C. Talos, S. Fischer and J. Reichen (1994). "Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria." Hepatology **19**(2): 471-479.

142 Kreimann, E. L., F. C. Morales, J. de Orbeta-Cruz, Y. Takahashi, H. Adams, T. J. Liu, P. D. McCrea and M. M. Georgescu (2007). "Cortical stabilization of beta-catenin contributes to NHERF1/EBP50 tumor suppressor function." Oncogene **26**(36): 5290-5299.

143 Krokan, H. E., R. Standal and G. Slupphaug (1997). "DNA glycosylases in the base excision repair of DNA." Biochem J **325 (Pt 1)**: 1-16.

144 Kumar, B., S. Koul, J. Petersen, L. Khandrika, J. S. Hwa, R. B. Meacham, S. Wilson and H. K. Koul (2010). "p38 mitogen-activated protein kinase-driven MAPKAPK2 regulates invasion of bladder cancer by modulation of MMP-2 and MMP-9 activity." Cancer Res **70**(2): 832-841.

145 Lambeth, J. D. (2004). "NOX enzymes and the biology of reactive oxygen." Nat Rev Immunol **4**(3): 181-189.

146 Lasa, M., K. R. Mahtani, A. Finch, G. Brewer, J. Saklatvala and A. R. Clark (2000). "Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade." Molecular and Cellular Biology **20**(12): 4265-4274.

147 Lavoie, J. N., G. Gingras-Breton, R. M. Tanguay and J. Landry (1993). "Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. HSP27 stabilization of the microfilament organization." J Biol Chem **268**(5): 3420-3429.

148 Lavoie, J. N., H. Lambert, E. Hickey, L. A. Weber and J. Landry (1995). "Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27." Mol Cell Biol **15**(1): 505-516.

149 Lazaridis, K. N., M. Strazzabosco and N. F. Larusso (2004). "The cholangiopathies: disorders of biliary epithelia." Gastroenterology **127**(5): 1565-1577.

150 Lee, I. N., C. H. Chen, J. C. Sheu, H. S. Lee, G. T. Huang, C. Y. Yu, F. J. Lu and L. P. Chow (2005). "Identification of human hepatocellular carcinoma-related biomarkers by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry." J Proteome Res **4**(6): 2062-2069.

151 Lehner, M. D., F. Schwoebel, A. Kotlyarov, M. Leist, M. Gaestel and T. Hartung (2002). "Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2-deficient mice show increased susceptibility to Listeria monocytogenes infection." J Immunol **168**(9): 4667-4673.

152 Lemasters, J. J., A. L. Nieminen, T. Qian, L. C. Trost, S. P. Elmore, Y. Nishimura, R. A. Crowe, W. E. Cascio, C. A. Bradham, D. A. Brenner and B. Herman (1998). "The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy." Biochim Biophys Acta **1366**(1-2): 177-196.

153 Leung, T. M. and N. Nieto (2013). "CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease." J Hepatol **58**(2): 395-398.

154 Li, M. L., J. Defren and G. Brewer (2013). "Hsp27 and F-box protein beta-TrCP promote degradation of mRNA decay factor AUF1." Mol Cell Biol **33**(11): 2315-2326.

155 Li, Q., H. Yu, R. Zinna, K. Martin, B. Herbert, A. Liu, C. Rossa, Jr. and K. L. Kirkwood (2011). "Silencing mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2 arrests inflammatory bone loss." J Pharmacol Exp Ther **336**(3): 633-642.

156 Li, Y., K. Inoki, P. Vacratsis and K. L. Guan (2003). "The p38 and MK2 kinase cascade phosphorylates tuberin, the tuberous sclerosis 2 gene product, and enhances its interaction with 14-3-3." J Biol Chem **278**(16): 13663-13671.

157 Li, Y. Y., B. Yuece, H. M. Cao, H. X. Lin, S. Lv, J. C. Chen, S. Ochs, A. Sibaev, E. Deindl, C. Schaefer and M. Storr (2013). "Inhibition of p38/Mk2 signaling pathway improves the anti-inflammatory effect of WIN55 on mouse experimental colitis." Lab Invest **93**(3): 322-333.

158 Lillig, C. H., C. Berndt and A. Holmgren (2008). "Glutaredoxin systems." Biochim Biophys Acta **1780**(11): 1304-1317.

159 Lim, S. O., S. G. Park, J. H. Yoo, Y. M. Park, H. J. Kim, K. T. Jang, J. W. Cho, B. C. Yoo, G. H. Jung and C. K. Park (2005). "Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules." World J Gastroenterol **11**(14): 2072-2079.

160 Litwin, J. A., A. Volkl, J. Muller-Hocker, T. Hashimoto and H. D. Fahimi (1987). "Immunocytochemical localization of peroxisomal enzymes in human liver biopsies." Am J Pathol **128**(1): 141-150.

161 Liu, B., L. Yang, B. Huang, M. Cheng, H. Wang, Y. Li, D. Huang, J. Zheng, Q. Li, X. Zhang, W. Ji, Y. Zhou and J. Lu (2012). "A functional copy-number variation in MAPKAPK2 predicts risk and prognosis of lung cancer." Am J Hum Genet **91**(2): 384-390.

162 Ljubuncic, P., B. Fuhrman, J. Oiknine, M. Aviram and A. Bomzon (1996). "Effect of deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on lipid peroxidation in cultured macrophages." Gut **39**(3): 475-478.

163 Loeb, L. A. (2011). "Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting." Nat Rev Cancer **11**(6): 450-457.

164 Lu, A. L., X. Li, Y. Gu, P. M. Wright and D. Y. Chang (2001). "Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions." Cell Biochem Biophys **35**(2): 141-170.

165 Luk, J. M., C. T. Lam, A. F. Siu, B. Y. Lam, I. O. Ng, M. Y. Hu, C. M. Che and S. T. Fan (2006). "Proteomic profiling of hepatocellular carcinoma in Chinese cohort reveals heat-shock proteins (Hsp27, Hsp70, GRP78) up-regulation and their associated prognostic values." Proteomics **6**(3): 1049-1057.

166 Luppi, F., A. M. Longo, W. I. de Boer, K. F. Rabe and P. S. Hiemstra (2007). "Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation." Lung Cancer **56**(1): 25-33.

167 Ma, L., R. Rohatgi and M. W. Kirschner (1998). "The Arp2/3 complex mediates actin polymerization induced by the small GTP-binding protein Cdc42." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15362-15367.

168 Ma, Q. and X. He (2012). "Molecular basis of electrophilic and oxidative defense: promises and perils of Nrf2." Pharmacol Rev **64**(4): 1055-1081.

169 Maghzal, G. J., K. H. Krause, R. Stocker and V. Jaquet (2012). "Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases." Free Radic Biol Med **53**(10): 1903-1918.

170 Maillard, E. (2011). "[Epidemiology, natural history and pathogenesis of hepatocellular carcinoma]." Cancer Radiother **15**(1): 3-6.

171 Maitra, S., C. F. Chou, C. A. Luber, K. Y. Lee, M. Mann and C. Y. Chen (2008). "The AU-rich element mRNA decay-promoting activity of BRF1 is regulated by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2." RNA **14**(5): 950-959.

172 Mak, B. C. and R. S. Yeung (2004). "The tuberous sclerosis complex genes in tumor development." Cancer Invest **22**(4): 588-603.

173 Malhi, H., S. F. Bronk, N. W. Werneburg and G. J. Gores (2006). "Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis." J Biol Chem **281**(17): 12093-12101.

174 Manke, I. A., A. Nguyen, D. Lim, M. Q. Stewart, A. E. Elia and M. B. Yaffe (2005). "MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation." Molecular cell **17**(1): 37-48.

175 Marchese, F. P., A. Aubareda, C. Tudor, J. Saklatvala, A. R. Clark and J. L. Dean (2010). "MAPKAP kinase 2 blocks tristetraprolin-directed mRNA decay by inhibiting CAF1 deadenylase recruitment." J Biol Chem **285**(36): 27590-27600.

176 Marnett, L. J. (2000). "Oxyradicals and DNA damage." Carcinogenesis **21**(3): 361-370.

177 Masella, R., R. Di Benedetto, R. Vari, C. Filesi and C. Giovannini (2005). "Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes." J Nutr Biochem **16**(10): 577-586.

178 May, R. C., E. Caron, A. Hall and L. M. Machesky (2000). "Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcgammaR or CR3." Nat Cell Biol **2**(4): 246-248.

179 McGuire, V. A., A. Gray, C. E. Monk, S. G. Santos, K. Lee, A. Aubareda, J. Crowe, N. Ronkina, J. Schwermann, I. H. Batty, N. R. Leslie, J. L. Dean, S. J. O'Keefe, M. Boothby, M. Gaestel and J. S. Arthur (2013). "Cross talk between the Akt and p38alpha pathways in macrophages downstream of Toll-like receptor signaling." Mol Cell Biol **33**(21): 4152-4165.

180 Mehlen, P., K. Schulze-Osthoff and A. P. Arrigo (1996). "Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death." J Biol Chem **271**(28): 16510-16514.

181 Meng, W., L. L. Swenson, M. J. Fitzgibbon, K. Hayakawa, E. Ter Haar, A. E. Behrens, J. R. Fulghum and J. A. Lippke (2002). "Structure of mitogen-activated protein kinase-activated protein (MAPKAP) kinase 2 suggests a bifunctional switch that couples kinase activation with nuclear export." J Biol Chem **277**(40): 37401-37405.

182 Michelotti, G. A., M. V. Machado and A. M. Diehl (2013). "NAFLD, NASH and liver cancer." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **10**(11): 656-665.

183 Mifune, M., H. Ohtsu, H. Suzuki, H. Nakashima, E. Brailoiu, N. J. Dun, G. D. Frank, T. Inagami, S. Higashiyama, W. G. Thomas, A. D. Eckhart, P. J. Dempsey and S. Eguchi (2005). "G protein coupling and second messenger generation are indispensable for metalloprotease-dependent, heparin-binding epidermal growth factor shedding through angiotensin II type-1 receptor." J Biol Chem **280**(28): 26592-26599.

184 Miguel, S. M., M. Namdar-Attar, T. Noh, B. Frenkel and I. Bab (2005). "ERK1/2-activated de novo Mapkapk2 synthesis is essential for osteogenic growth peptide mitogenic signaling in osteoblastic cells." J Biol Chem **280**(45): 37495-37502.

185 Miyazaki, Y., Y. Shinomura, S. Tsutsui, Y. Yasunaga, S. Zushi, S. Higashiyama, N. Taniguchi and Y. Matsuzawa (1996). "Oxidative stress increases gene expression of heparin-binding EGF-like growth factor and amphiregulin in cultured rat gastric epithelial cells." Biochem Biophys Res Commun **226**(2): 542-546.

186 Mullins, R. D., J. A. Heuser and T. D. Pollard (1998). "The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6181-6186.

187 Nakamura, J. and J. A. Swenberg (1999). "Endogenous apurinic/apyrimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues." Cancer Res **59**(11): 2522-2526.

188 Nakashima, M., S. Adachi, I. Yasuda, T. Yamauchi, J. Kawaguchi, M. Itani, T. Yoshioka, R. Matsushima-Nishiwaki, Y. Hirose, O. Kozawa and H. Moriwaki (2011). "Phosphorylation status of heat shock protein 27 plays a key role in gemcitabine-induced apoptosis of pancreatic cancer cells." Cancer Lett **313**(2): 218-225.

189 Nault, J. C. and J. Zucman-Rossi (2014). "Genetics of hepatocellular carcinoma: the next generation." J Hepatol **60**(1): 224-226.

190 Neininger, A., H. Thielemann and M. Gaestel (2001). "FRET-based detection of different conformations of MK2." EMBO Rep **2**(8): 703-708.

191 Neufeld, B., A. Grosse-Wilde, A. Hoffmeyer, B. W. Jordan, P. Chen, D. Dinev, S. Ludwig and U. R. Rapp (2000). "Serine/Threonine kinases 3pK and MAPK-activated protein kinase 2 interact with the basic helix-loop-helix transcription factor E47 and repress its transcriptional activity." J Biol Chem **275**(27): 20239-20242.

192 Neve, E. P. and M. Ingelman-Sundberg (2000). "Molecular basis for the transport of cytochrome P450 2E1 to the plasma membrane." J Biol Chem **275**(22): 17130-17135.

193 Nguyen, T., P. J. Sherratt and C. B. Pickett (2003). "Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element." Annu Rev Pharmacol Toxicol **43**: 233-260.

194 Nishida, N. and M. Kudo (2013). "Oxidative stress and epigenetic instability in human hepatocarcinogenesis." Dig Dis **31**(5-6): 447-453.

195 Nishigori, C., Y. Hattori and S. Toyokuni (2004). "Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis." Antioxid Redox Signal **6**(3): 561-570.

196 Nishikawa, T., T. Nakajima, T. Katagishi, Y. Okada, M. Jo, K. Kagawa, T. Okanoue, Y. Itoh and T. Yoshikawa (2009). "Oxidative stress may enhance the malignant potential of human hepatocellular carcinoma by telomerase activation." Liver Int **29**(6): 846-856.

197 Nishiyama, A., H. Masutani, H. Nakamura, Y. Nishinaka and J. Yodoi (2001). "Redox regulation by thioredoxin and thioredoxin-binding proteins." IUBMB Life **52**(1-2): 29-33.

198 Niture, S. K. and A. K. Jaiswal (2012). "Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis." J Biol Chem **287**(13): 9873-9886.

199 Nohl, H., L. Gille and K. Staniek (2005). "Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria." Biochem Pharmacol **69**(5): 719-723.

200 Novellasdemunt, L., L. Bultot, A. Manzano, F. Ventura, J. L. Rosa, D. Vertommen, M. H. Rider, A. Navarro-Sabate and R. Bartrons (2013). "PFKFB3 activation in cancer cells by the p38/MK2 pathway in response to stress stimuli." Biochem J **452**(3): 531-543.

201 Nowsheen, S., R. L. Wukovich, K. Aziz, P. T. Kalogerinis, C. C. Richardson, M. I. Panayiotidis, W. M. Bonner, O. A. Sedelnikova and A. G. Georgakilas (2009). "Accumulation of oxidatively induced clustered DNA lesions in human tumor tissues." Mutat Res **674**(1-2): 131-136.

202 Ohta, T., K. Iijima, M. Miyamoto, I. Nakahara, H. Tanaka, M. Ohtsuji, T. Suzuki, A. Kobayashi, J. Yokota, T. Sakiyama, T. Shibata, M. Yamamoto and S. Hirohashi (2008). "Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth." Cancer Res **68**(5): 1303-1309.

203 Okuda, M., K. Li, M. R. Beard, L. A. Showalter, F. Scholle, S. M. Lemon and S. A. Weinman (2002). "Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein." Gastroenterology **122**(2): 366-375.

204 Oliveira-Marques, V., H. S. Marinho, L. Cyrne and F. Antunes (2009). "Role of hydrogen peroxide in NF-kappaB activation: from inducer to modulator." Antioxid Redox Signal **11**(9): 2223-2243.

205 Palmer, W. C. and T. Patel (2012). "Are common factors involved in the pathogenesis of primary liver cancers? A meta-analysis of risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma." J Hepatol **57**(1): 69-76.

206 Pandey, P., R. Farber, A. Nakazawa, S. Kumar, A. Bharti, C. Nalin, R. Weichselbaum, D. Kufe and S. Kharbanda (2000). "Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3." Oncogene **19**(16): 1975-1981.

207 Papaiahgari, S., A. Yerrapureddy, P. M. Hassoun, J. G. Garcia, K. G. Birukov and S. P. Reddy (2007). "EGFR-activated signaling and actin remodeling regulate cyclic stretch-induced NRF2-ARE activation." Am J Respir Cell Mol Biol **36**(3): 304-312.

208 Paul, C., F. Manero, S. Gonin, C. Kretz-Remy, S. Virot and A. P. Arrigo (2002). "Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release." Mol Cell Biol **22**(3): 816-834.

209 Pavan, S., D. Musiani, E. Torchiaro, G. Migliardi, M. Gai, F. Di Cunto, J. Erriquez, M. Olivero and M. F. Di Renzo (2014). "HSP27 is required for invasion and metastasis triggered by hepatocyte growth factor." Int J Cancer **134**(6): 1289-1299.

210 Perera, R. M. and N. Bardeesy (2011). "Cancer: when antioxidants are bad." Nature **475**(7354): 43-44.

211 Perier, C. and M. Vila (2012). "Mitochondrial biology and Parkinson's disease." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(2): a009332.

212 Peus, D., A. Meves, R. A. Vasa, A. Beyerle, T. O'Brien and M. R. Pittelkow (1999). "H2O2 is required for UVB-induced EGF receptor and downstream signaling pathway activation." Free Radic Biol Med **27**(11-12): 1197-1202.

213 Piotrowicz, R. S., E. Hickey and E. G. Levin (1998). "Heat shock protein 27 kDa expression and phosphorylation regulates endothelial cell migration." FASEB J **12**(14): 1481-1490.

214 Plath, K., K. Engel, G. Schwedersky and M. Gaestel (1994). "Characterization of the proline-rich region of mouse MAPKAP kinase 2: influence on catalytic properties and binding to the c-abl SH3 domain in vitro." Biochem Biophys Res Commun **203**(2): 1188-1194.

215 Poulsen, H. E. (2005). "Oxidative DNA modifications." Exp Toxicol Pathol **57 Suppl 1**: 161-169.

216 Qi, S., Y. Xin, Z. Qi, Y. Xu, Y. Diao, L. Lan, L. Luo and Z. Yin (2014). "HSP27 phosphorylation modulates TRAIL-induced activation of Src-Akt/ERK signaling through interaction with beta-arrestin2." Cell Signal **26**(3): 594-602.

217 Qi, Z., L. Shen, H. Zhou, Y. Jiang, L. Lan, L. Luo and Z. Yin (2014). "Phosphorylation of heat shock protein 27 antagonizes TNF-alpha induced HeLa cell apoptosis via regulating TAK1 ubiquitination and activation of p38 and ERK signaling." Cell Signal **26**(7): 1616-1625.

218 Radford, I. R. and P. N. Lobachevsky (2008). "Clustered DNA lesion sites as a source of mutations during human colorectal tumourigenesis." Mutat Res **646**(1-2): 60-68.

219 Raman, M., S. Earnest, K. Zhang, Y. Zhao and M. H. Cobb (2007). "TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage." EMBO J **26**(8): 2005-2014.

220 Rane, M. J., P. Y. Coxon, D. W. Powell, R. Webster, J. B. Klein, W. Pierce, P. Ping and K. R. McLeish (2001). "p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils." J Biol Chem **276**(5): 3517-3523.

221 Rangasamy, T., C. Y. Cho, R. K. Thimmulappa, L. Zhen, S. S. Srisuma, T. W. Kensler, M. Yamamoto, I. Petrache, R. M. Tuder and S. Biswal (2004). "Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice." J Clin Invest **114**(9): 1248-1259.

222 Razumilava, N. and G. J. Gores (2014). "Cholangiocarcinoma." Lancet **383**(9935): 2168-2179.

223 Reichard, J. F., G. T. Motz and A. Puga (2007). "Heme oxygenase-1 induction by NRF2 requires inactivation of the transcriptional repressor BACH1." Nucleic Acids Res **35**(21): 7074-7086.

224 Reinhardt, H. C., A. S. Aslanian, J. A. Lees and M. B. Yaffe (2007). "p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage." Cancer Cell **11**(2): 175-189.

225 Reinhardt, H. C., I. G. Cannell, S. Morandell and M. B. Yaffe (2011). "Is post-transcriptional stabilization, splicing and translation of selective mRNAs a key to the DNA damage response?" Cell Cycle **10**(1): 23-27.

226 Reinhardt, H. C., P. Hasskamp, I. Schmedding, S. Morandell, M. A. van Vugt, X. Wang, R. Linding, S. E. Ong, D. Weaver, S. A. Carr and M. B. Yaffe (2010). "DNA damage activates a spatially distinct late cytoplasmic cell-cycle checkpoint network controlled by MK2-mediated RNA stabilization." Mol Cell **40**(1): 34-49.

227 Reinhardt, H. C. and M. B. Yaffe (2009). "Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2." Current Opinion in Cell Biology **21**(2): 245-255.

228 Rhee, S. G., S. W. Kang, T. S. Chang, W. Jeong and K. Kim (2001). "Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases." IUBMB Life **52**(1-2): 35-41.

229 Rizvi, S. and G. J. Gores (2013). "Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma." Gastroenterology **145**(6): 1215-1229.

230 Rogalla, T., M. Ehrnsperger, X. Preville, A. Kotlyarov, G. Lutsch, C. Ducasse, C. Paul, M. Wieske, A. P. Arrigo, J. Buchner and M. Gaestel (1999). "Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation." The Journal of biological chemistry **274**(27): 18947-18956.

231 Rolo, A. P., P. J. Oliveira, A. J. Moreno and C. M. Palmeira (2000). "Bile acids affect liver mitochondrial bioenergetics: possible relevance for cholestasis therapy." Toxicol Sci **57**(1): 177-185.

232 Roma, M. G. and E. J. Sanchez Pozzi (2008). "Oxidative stress: a radical way to stop making bile." Ann Hepatol **7**(1): 16-33.

233 Romani, A. A., P. Crafa, S. Desenzani, G. Graiani, C. Lagrasta, M. Sianesi, P. Soliani and A. F. Borghetti (2007). "The expression of HSP27 is associated with poor clinical outcome in intrahepatic cholangiocarcinoma." BMC Cancer **7**: 232.

234 Ronkina, N., M. B. Menon, J. Schwermann, J. S. Arthur, H. Legault, J. B. Telliez, U. S. Kayyali, A. R. Nebreda, A. Kotlyarov and M. Gaestel (2011). "Stress induced gene expression: a direct role for MAPKAP kinases in transcriptional activation of immediate early genes." Nucleic acids research **39**(7): 2503-2518.

235 Rouse, J., P. Cohen, S. Trigon, M. Morange, A. Alonso-Llamazares, D. Zamanillo, T. Hunt and A. R. Nebreda (1994). "A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins." Cell **78**(6): 1027-1037.

236 Rousseau, S., I. Dolado, V. Beardmore, N. Shpiro, R. Marquez, A. R. Nebreda, J. S. Arthur, L. M. Case, M. Tessier-Lavigne, M. Gaestel, A. Cuenda and P. Cohen (2006). "CXCL12 and C5a trigger cell migration via a PAK1/2-p38alpha MAPK-MAPKAP-K2-HSP27 pathway." Cell Signaling **18**(11): 1897-1905.

237 Rousseau, S., N. Morrice, M. Peggie, D. G. Campbell, M. Gaestel and P. Cohen (2002). "Inhibition of SAPK2a/p38 prevents hnRNP A0 phosphorylation by MAPKAP-K2 and its interaction with cytokine mRNAs." EMBO J **21**(23): 6505-6514.

238 Rowlett, R. M., C. A. Chrestensen, M. J. Schroeder, M. G. Harp, J. W. Pelo, J. Shabanowitz, R. DeRose, D. F. Hunt, T. W. Sturgill and M. T. Worthington (2008). "Inhibition of tristetraprolin deadenylation by poly(A) binding protein." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **295**(3): G421-430.

239 Runchel, C., A. Matsuzawa and H. Ichijo (2011). "Mitogen-activated protein kinases in mammalian oxidative stress responses." Antioxidants & redox signaling **15**(1): 205-218.

240 Sakurai, T., M. Kudo, A. Umemura, G. He, A. M. Elsharkawy, E. Seki and M. Karin (2013). "p38alpha inhibits liver fibrogenesis and consequent hepatocarcinogenesis by curtailing accumulation of reactive oxygen species." Cancer Res **73**(1): 215-224.

241 Salh, B., A. Marotta, R. Wagey, M. Sayed and S. Pelech (2002). "Dysregulation of phosphatidylinositol 3-kinase and downstream effectors in human breast cancer." Int J Cancer **98**(1): 148-154.

242 Salinthone, S., M. Ba, L. Hanson, J. L. Martin, A. J. Halayko and W. T. Gerthoffer (2007). "Overexpression of human Hsp27 inhibits serum-induced proliferation in airway smooth muscle myocytes and confers resistance to hydrogen peroxide cytotoxicity." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**(5): L1194-L1207.

243 Sarkisian, C. J., B. A. Keister, D. B. Stairs, R. B. Boxer, S. E. Moody and L. A. Chodosh (2007). "Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis." Nat Cell Biol **9**(5): 493-505.

244 Sass, G., P. Leukel, V. Schmitz, E. Raskopf, M. Ocker, D. Neureiter, M. Meissnitzer, E. Tasika, A. Tannapfel and G. Tiegs (2008). "Inhibition of heme oxygenase 1 expression by small interfering RNA decreases orthotopic tumor growth in livers of mice." Int J Cancer **123**(6): 1269-1277.

245 Sato, Y., K. Harada, M. Sasaki, T. Yasaka and Y. Nakanuma (2012). "Heat shock proteins 27 and 70 are potential biliary markers for the detection of cholangiocarcinoma." Am J Pathol **180**(1): 123-130.

246 Schlessinger, J. (2002). "Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor." Cell **110**(6): 669-672.

247 Schottelius, A. J., U. Zugel, W. D. Docke, T. M. Zollner, L. Rose, A. Mengel, B. Buchmann, A. Becker, G. Grutz, S. Naundorf, A. Friedrich, M. Gaestel and K. Asadullah (2010). "The role of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in the p38/TNF-alpha pathway of systemic and cutaneous inflammation." J Invest Dermatol **130**(2): 481-491.

248 Scott, A. J., K. P. O'Dea, D. O'Callaghan, L. Williams, J. O. Dokpesi, L. Tatton, J. M. Handy, P. J. Hogg and M. Takata (2011). "Reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase mediate tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) activation in primary human monocytes." J Biol Chem **286**(41): 35466-35476.

249 Sekiguchi, M. and T. Tsuzuki (2002). "Oxidative nucleotide damage: consequences and prevention." Oncogene **21**(58): 8895-8904.

250 Severi, T., H. van Malenstein, C. Verslype and J. F. van Pelt (2010). "Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets." Acta Pharmacol Sin **31**(11): 1409-1420.

251 Shaw, M., P. Cohen and D. R. Alessi (1998). "The activation of protein kinase B by H2O2 or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2." Biochem J **336 (Pt 1)**: 241-246.

252 Shelton, P. and A. K. Jaiswal (2013). "The transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2): a protooncogene?" FASEB J **27**(2): 414-423.

253 Shen, H. M. and C. N. Ong (1996). "Mutations of the p53 tumor suppressor gene and ras oncogenes in aflatoxin hepatocarcinogenesis." Mutat Res **366**(1): 23-44.

254 Shen, Y. C., Z. Z. Lin, C. H. Hsu, C. Hsu, Y. Y. Shao and A. L. Cheng (2013). "Clinical trials in hepatocellular carcinoma: an update." Liver Cancer **2**(3-4): 345-364.

255 Shi, D. and W. Gu (2012). "Dual Roles of MDM2 in the Regulation of p53: Ubiquitination Dependent and Ubiquitination Independent Mechanisms of MDM2 Repression of p53 Activity." Genes Cancer **3**(3-4): 240-248.

256 Shi, G. X., L. Jin and D. A. Andres (2011). "A rit GTPase-p38 mitogen-activated protein kinase survival pathway confers resistance to cellular stress." Molecular and cellular biology **31**(10): 1938-1948.

257 Shi, J. X., X. Su, J. Xu, W. Y. Zhang and Y. Shi (2012). "MK2 posttranscriptionally regulates TNF-alpha-induced expression of ICAM-1 and IL-8 via tristetraprolin in human pulmonary microvascular endothelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **302**(8): L793-L799.

258 Shibata, T., M. Chuma, A. Kokubu, M. Sakamoto and S. Hirohashi (2003). "EBP50, a beta-catenin-associating protein, enhances Wnt signaling and is over-expressed in hepatocellular carcinoma." Hepatology **38**(1): 178-186.

259 Shiloh, Y. and Y. Ziv (2013). "The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(4): 197-210.

260 Sia, D., Y. Hoshida, A. Villanueva, S. Roayaie, J. Ferrer, B. Tabak, J. Peix, M. Sole, V. Tovar, C. Alsinet, H. Cornella, B. Klotzle, J. B. Fan, C. Cotsoglou, S. N. Thung, J. Fuster, S. Waxman, J. C. Garcia-Valdecasas, J. Bruix, M. E. Schwartz, R. Beroukhim, V. Mazzaferro and J. M. Llovet (2013). "Integrative molecular analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma reveals 2 classes that have different outcomes." Gastroenterology **144**(4): 829-840.

261 Singh, S., D. W. Powell, M. J. Rane, T. H. Millard, J. O. Trent, W. M. Pierce, J. B. Klein, L. M. Machesky and K. R. McLeish (2003). "Identification of the p16-Arc subunit of the Arp 2/3 complex as a substrate of MAPK-activated protein kinase 2 by proteomic analysis." J Biol Chem **278**(38): 36410-36417.

262 Sinsimer, K. S., F. M. Gratacos, A. M. Knapinska, J. Lu, C. D. Krause, A. V. Wierzbowski, L. R. Maher, S. Scrudato, Y. M. Rivera, S. Gupta, D. K. Turrin, M. P. De La Cruz, S. Pestka and G. Brewer (2008). "Chaperone Hsp27, a novel subunit of AUF1 protein complexes, functions in AU-rich element-mediated mRNA decay." Mol Cell Biol **28**(17): 5223-5237.

263 Siomek, A., K. Brzoska, B. Sochanowicz, D. Gackowski, R. Rozalski, M. Foksinski, E. Zarakowska, A. Szpila, J. Guz, T. Bartlomiejczyk, B. Kalinowski, M. Kruszewski and R. Olinski (2010). "Cu,Zn-superoxide dismutase deficiency in mice leads to organ-specific increase in oxidatively damaged DNA and NF-kappaB1 protein activity." Acta Biochim Pol **57**(4): 577-583.

264 Sirica, A. E. (2008). "Role of ErbB family receptor tyrosine kinases in intrahepatic cholangiocarcinoma." World J Gastroenterol **14**(46): 7033-7058.

265 Smith, J. A., C. E. Poteet-Smith, D. A. Lannigan, T. A. Freed, A. J. Zoltoski and T. W. Sturgill (2000). "Creation of a stress-activated p90 ribosomal S6 kinase. The carboxyl-terminal tail of the MAPK-activated protein kinases dictates the signal transduction pathway in which they function." J Biol Chem **275**(41): 31588-31593.

266 Sokol, R. J., R. Dahl, M. W. Devereaux, B. Yerushalmi, G. E. Kobak and E. Gumpricht (2005). "Human hepatic mitochondria generate reactive oxygen species and undergo the permeability transition in response to hydrophobic bile acids." J Pediatr Gastroenterol Nutr **41**(2): 235-243.

267 Stauffer, J. K., A. J. Scarzello, Q. Jiang and R. H. Wiltrout (2012). "Chronic inflammation, immune escape, and oncogenesis in the liver: a unique neighborhood for novel intersections." Hepatology **56**(4): 1567-1574.

268 Stoecklin, G., T. Stubbs, N. Kedersha, S. Wax, W. F. Rigby, T. K. Blackwell and P. Anderson (2004). "MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay." EMBO J **23**(6): 1313-1324.

269 Stoecklin, G., S. A. Tenenbaum, T. Mayo, S. V. Chittur, A. D. George, T. E. Baroni, P. J. Blackshear and P. Anderson (2008). "Genome-wide analysis identifies interleukin-10 mRNA as target of tristetraprolin." J Biol Chem **283**(17): 11689-11699.

270 Stokoe, D., D. G. Campbell, S. Nakielny, H. Hidaka, S. J. Leevers, C. Marshall and P. Cohen (1992). "MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase." EMBO J **11**(11): 3985-3994.

271 Stokoe, D., B. Caudwell, P. T. Cohen and P. Cohen (1993). "The substrate specificity and structure of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-2." Biochem J **296 (Pt 3)**: 843-849.

272 Stokoe, D., K. Engel, D. G. Campbell, P. Cohen and M. Gaestel (1992). "Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins." FEBS Letters **313**(3): 307-313.

273 Sutherland, C., J. Alterio, D. G. Campbell, B. Le Bourdelles, J. Mallet, J. Haavik and P. Cohen (1993). "Phosphorylation and activation of human tyrosine hydroxylase in vitro by mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP-kinase-activated kinases 1 and 2." Eur J Biochem **217**(2): 715-722.

274 Szyniarowski, P., E. Corcelle-Termeau, T. Farkas, M. Hoyer-Hansen, J. Nylandsted, T. Kallunki and M. Jaattela (2011). "A comprehensive siRNA screen for kinases that suppress macroautophagy in optimal growth conditions." Autophagy **7**(8): 892-903.

275 Takaki, A., D. Kawai and K. Yamamoto (2013). "Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH)." Int J Mol Sci **14**(10): 20704-20728.

276 Takii, R., S. Inouye, M. Fujimoto, T. Nakamura, T. Shinkawa, R. Prakasam, K. Tan, N. Hayashida, H. Ichikawa, T. Hai and A. Nakai (2010). "Heat shock transcription factor 1 inhibits expression of IL-6 through activating transcription factor 3." J Immunol **184**(2): 1041-1048.

277 Tanaka, S., K. Miyanishi, M. Kobune, Y. Kawano, T. Hoki, T. Kubo, T. Hayashi, T. Sato, Y. Sato, R. Takimoto and J. Kato (2013). "Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma." J Gastroenterol **48**(11): 1249-1258.

278 Tang, J., X. Yang and X. Liu (2008). "Phosphorylation of Plk1 at Ser326 regulates its functions during mitotic progression." Oncogene **27**(52): 6635-6645.

279 Taniyama, Y., M. Ushio-Fukai, H. Hitomi, P. Rocic, M. J. Kingsley, C. Pfahnl, D. S. Weber, R. W. Alexander and K. K. Griendling (2004). "Role of p38 MAPK and MAPKAPK-2 in angiotensin II-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells." Am J Physiol Cell Physiol **287**(2): C494-C499.

280 Test, S. T. and S. J. Weiss (1984). "Quantitative and temporal characterization of the extracellular H2O2 pool generated by human neutrophils." J Biol Chem **259**(1): 399-405.

281 Thannickal, V. J. and B. L. Fanburg (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(6): L1005-1028.

282 Thomas, G., J. Haavik and P. Cohen (1997). "Participation of a stress-activated protein kinase cascade in the activation of tyrosine hydroxylase in chromaffin cells." Eur J Biochem **247**(3): 1180-1189.

283 Tiedje, C., N. Ronkina, M. Tehrani, S. Dhamija, K. Laass, H. Holtmann, A. Kotlyarov and M. Gaestel (2012). "The p38/MK2-driven exchange between tristetraprolin and HuR regulates AU-rich element-dependent translation." PLoS Genet **8**(9): e1002977.

284 Tietz, A. B., A. Malo, J. Diebold, A. Kotlyarov, A. Herbst, F. T. Kolligs, B. Brandt-Nedelev, W. Halangk, M. Gaestel, B. Goke and C. Schafer (2006). "Gene deletion of MK2 inhibits TNF-alpha and IL-6 and protects against cerulein-induced pancreatitis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **290**(6): G1298-1306.

285 Tong, K. I., A. Kobayashi, F. Katsuoka and M. Yamamoto (2006). "Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism." Biol Chem **387**(10-11): 1311-1320.

286 Toyokuni, S., K. Okamoto, J. Yodoi and H. Hiai (1995). "Persistent oxidative stress in cancer." FEBS Lett **358**(1): 1-3.

287 Ueda, K., H. Kosako, Y. Fukui and S. Hattori (2004). "Proteomic identification of Bcl2-associated athanogene 2 as a novel MAPK-activated protein kinase 2 substrate." J Biol Chem **279**(40): 41815-41821.

288 Valgimigli, L., M. Valgimigli, S. Gaiani, G. F. Pedulli and L. Bolondi (2000). "Measurement of oxidative stress in human liver by EPR spin-probe technique." Free Radic Res **33**(2): 167-178.

289 Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chem Biol Interact **160**(1): 1-40.

290 Venkatakrishnan, G., R. Salgia and J. E. Groopman (2000). "Chemokine receptors CXCR-1/2 activate mitogen-activated protein kinase via the epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells." J Biol Chem **275**(10): 6868-6875.

291 Vertii, A., C. Hakim, A. Kotlyarov and M. Gaestel (2006). "Analysis of properties of small heat shock protein Hsp25 in MAPK-activated protein kinase 2 (MK2)-deficient cells: MK2-dependent insolubilization of Hsp25 oligomers correlates with susceptibility to stress." Journal of Biological Chemistry **281**(37): 26966-26975.

292 von Roretz, C., S. Di Marco, R. Mazroui and I. E. Gallouzi (2011). "Turnover of AU-rich-containing mRNAs during stress: a matter of survival." Wiley Interdiscip Rev RNA **2**(3): 336-347.

293 Wang, B., Y. Yang and P. A. Friedman (2008). "Na/H exchange regulatory factor 1, a novel AKT-associating protein, regulates extracellular signal-regulated kinase signaling through a B-Raf-mediated pathway." Molecular Biology of the Cell **19**(4): 1637-1645.

294 Wang, B. D., Q. Yang, K. Ceniccola, F. Bianco, R. Andrawis, T. Jarrett, H. Frazier, S. R. Patierno and N. H. Lee (2013). "Androgen receptor-target genes in african american prostate cancer disparities." Prostate Cancer **2013**: 763569.

295 Wang, L., H. Yang, P. L. Palmbos, G. Ney, T. A. Detzler, D. Coleman, J. Leflein, M. Davis, M. Zhang, W. Tang, J. K. Hicks, C. M. Helchowski, J. Prasad, T. S. Lawrence, L. Xu, X. Yu, C. E. Canman, M. Ljungman and D. M. Simeone (2014). "ATDC/TRIM29 phosphorylation by ATM/MAPKAP kinase 2 mediates radioresistance in pancreatic cancer cells." Cancer Res **74**(6): 1778-1788.

296 Wang, X., M. A. Khaleque, M. J. Zhao, R. Zhong, M. Gaestel and S. K. Calderwood (2006). "Phosphorylation of HSF1 by MAPK-activated protein kinase 2 on serine 121, inhibits transcriptional activity and promotes HSP90 binding." Journal of Biological Chemistry **281**(2): 782-791.

297 Wang, X., D. Wu, L. Yang, L. Gan and A. I. Cederbaum (2013). "Cytochrome P450 2E1 potentiates ethanol induction of hypoxia and HIF-1alpha in vivo." Free Radic Biol Med **63**: 175-186.

298 Wang, X. W., S. P. Hussain, T. I. Huo, C. G. Wu, M. Forgues, L. J. Hofseth, C. Brechot and C. C. Harris (2002). "Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma." Toxicology **181-182**: 43-47.

299 Ward, J. F. (1994). "The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences." Int J Radiat Biol **66**(5): 427-432.

300 Waugh, D. J. and C. Wilson (2008). "The interleukin-8 pathway in cancer." Clin Cancer Res **14**(21): 6735-6741.

301 Weaver, Z., S. Difilippantonio, J. Carretero, P. L. Martin, R. El Meskini, A. J. Iacovelli, M. Gumprecht, A. Kulaga, T. Guerin, J. Schlomer, M. Baran, S. Kozlov, T. McCann, S. Mena, F. Al-Shahrour, D. Alexander, K. K. Wong and T. Van Dyke (2012). "Temporal molecular and biological assessment of an erlotinib-resistant lung adenocarcinoma model reveals markers of tumor progression and treatment response." Cancer Res **72**(22): 5921-5933.

302 Weber, H. O., R. L. Ludwig, D. Morrison, A. Kotlyarov, M. Gaestel and K. H. Vousden (2005). "HDM2 phosphorylation by MAPKAP kinase 2." Oncogene **24**(12): 1965-1972.

303 Weiner, O. D., G. Servant, M. D. Welch, T. J. Mitchison, J. W. Sedat and H. R. Bourne (1999). "Spatial control of actin polymerization during neutrophil chemotaxis." Nat Cell Biol **1**(2): 75-81.

304 Werz, O., J. Klemm, B. Samuelsson and O. Radmark (2000). "5-lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5261-5266.

305 Wettstein, G., P. S. Bellaye, O. Micheau and P. Bonniaud (2012). "Small heat shock proteins and the cytoskeleton: an essential interplay for cell integrity?" Int J Biochem Cell Biol **44**(10): 1680-1686.

306 Wilusz, C. J., M. Wormington and S. W. Peltz (2001). "The cap-to-tail guide to mRNA turnover." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(4): 237-246.

307 Wu, R., H. Kausar, P. Johnson, D. E. Montoya-Durango, M. Merchant and M. J. Rane (2007). "Hsp27 regulates Akt activation and polymorphonuclear leukocyte apoptosis by scaffolding MK2 to Akt signal complex." J Biol Chem **282**(30): 21598-21608.

308 Wu, Y., L. Zhan, Y. Ai, M. Hannigan, M. Gaestel, C. K. Huang and J. A. Madri (2007). "MAPKAPK2-mediated LSP1 phosphorylation and FMLP-induced neutrophil polarization." Biochem Biophys Res Commun **358**(1): 170-175.

309 Xiao, Z., Z. Chen, A. H. Gunasekera, T. J. Sowin, S. H. Rosenberg, S. Fesik and H. Zhang (2003). "Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents." J Biol Chem **278**(24): 21767-21773.

310 Xu, L., S. Chen and R. C. Bergan (2006). "MAPKAPK2 and HSP27 are downstream effectors of p38 MAP kinase-mediated matrix metalloproteinase type 2 activation and cell invasion in human prostate cancer." Oncogene **25**(21): 2987-2998.

311 Yamadori, T., Y. Ishii, S. Homma, Y. Morishima, K. Kurishima, K. Itoh, M. Yamamoto, Y. Minami, M. Noguchi and N. Hizawa (2012). "Molecular mechanisms for the regulation of Nrf2-mediated cell proliferation in non-small-cell lung cancers." Oncogene **31**(45): 4768-4777.

312 Yang, L., B. Liu, F. Qiu, B. Huang, Y. Li, D. Huang, R. Yang, X. Yang, J. Deng, Q. Jiang, Y. Zhou and J. Lu (2014). "The effect of functional MAPKAPK2 copy number variation CNV-30450 on elevating nasopharyngeal carcinoma risk is modulated by EBV infection." Carcinogenesis **35**(1): 46-52.

313 Yoshizawa, H. (2002). "Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection in Japan: projection to other countries in the foreseeable future." Oncology **62 Suppl 1**: 8-17.

314 Zelko, I. N., T. J. Mariani and R. J. Folz (2002). "Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression." Free Radic Biol Med **33**(3): 337-349.

315 Zeng, Y., H. Sankala, X. Zhang and P. R. Graves (2008). "Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies." Biochem J **413**(3): 429-436.

316 Zhang, J., Y. J. Cao, F. Y. Li, J. Li, L. B. Yao and E. K. Duan (2003). "Effects of fibronectin, VEGF and angiostatin on the expression of MMPs through different signaling pathways in the JEG-3 cells." Am J Reprod Immunol **50**(4): 273-285.

317 Zhao, W., M. Liu, N. J. D'Silva and K. L. Kirkwood (2011). "Tristetraprolin regulates interleukin-6 expression through p38 MAPK-dependent affinity changes with mRNA 3' untranslated region." J Interferon Cytokine Res **31**(8): 629-637.

318 Zheng, C., Z. Lin, Z. J. Zhao, Y. Yang, H. Niu and X. Shen (2006). "MAPK-activated protein kinase-2 (MK2)-mediated formation and phosphorylation-regulated dissociation of the signal complex consisting of p38, MK2, Akt, and Hsp27." J Biol Chem **281**(48): 37215-37226.

319 Zu, Y. L., Y. Ai, A. Gilchrist, N. Maulik, J. Watras, R. I. Sha'afi, D. K. Das and C. K. Huang (1997). "High expression and activation of MAP kinase-activated protein kinase 2 in cardiac muscle cells." Journal of molecular and cellular cardiology **29**(8): 2159-2168.

320 Zu, Y. L., Y. Ai and C. K. Huang (1995). "Characterization of an autoinhibitory domain in human mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2." Journal of Biological Chemistry **270**(1): 202-206.

321 Zu, Y. L., F. Wu, A. Gilchrist, Y. Ai, M. E. Labadia and C. K. Huang (1994). "The primary structure of a human MAP kinase activated protein kinase 2." Biochem Biophys Res Commun **200**(2): 1118-1124.