

Université de Limoges
École doctorale ED 524

Année 2017

EA 3842 Homéostasie Cellulaire et Pathologies, Limoges
Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS UMR 5095, Bordeaux

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'université de Limoges

Discipline: Biologie Santé/ Cancérologie

Présentée et soutenue par

Mohamad EL Dhaybi

Le 24 Octobre 2017

**Déterminants moléculaires non-apoptotiques
de l'activité oncogénique de Bcl-x_L: rôle de la
monodéamidation de Bcl-x_L**

Thèse co-dirigée par: **Dr. Muriel Priault** et **Dr. Mireille Verdier**

JURY:

Président du Jury:

M. Serge Battu: Professeur, EA 3842 Homéostasie Cellulaire et Pathologies, Université de Limoges

Rapporteurs:

Mme Pascale Belenguer: Professeur, Centre de Biologie Intégrative, CNRS UMR 5169, Université de Toulouse

M. Pierre Vacher: CR1, Institut Bergognié, INSERM U1218, Université de Bordeaux

Examineurs:

Mme. Anne Devin: DR2, Institut de Biochimie et Génétiques Cellulaires, CNRS UMR 5095, Université de Bordeaux

Mme. Muriel Priault, CR1, Institut de Biochimie et Génétiques Cellulaires, CNRS UMR 5095, Université de Bordeaux

Mme. Mireille Verdier, M.C.U, EA 3842 Homéostasie et Pathologies Cellulaires, Université de Limoges



Remerciements:

Avant tout, je remercie les membres de jury d'avoir accepté de consacrer leur temps pour lire ma thèse. Je vous remercie pour les analyses que vous avez faites de mon travail, pour les remarques pertinentes et les discussions tout au long de ma soutenance.

Durant ma thèse, j'ai eu la chance de travailler dans 2 laboratoires, celui de l'IBGC à Bordeaux et l'équipe "Homéostasie Cellulaires et Pathologies" à Limoges, où j'ai rencontré des personnes agréables qui m'ont apporté de bonnes conditions de travail.

Un grand MERCI à mes directrices de thèse Muriel et Mireille. Je vous remercie beaucoup pour votre patience, pour le grand effort que vous avez fourni pour faire évoluer mon niveau scientifique. Merci beaucoup pour votre soutien tout au long de cette période.

Merci Stephen de m'avoir accueilli dans ton équipe à Bordeaux, et de m'avoir donné l'occasion de mener le mieux possible ce travail.

Merci Nadine pour ta gentillesse, et la bienveillance envers tous les membres de l'équipe. Je n'oublie pas les bons moments, surtout "la dictée" dans ma première année de thèse.

Un grand MERCI également à Claude, tu m'as vraiment aidé à avancer dans mon projet, tu étais comme une grande sœur pour moi, toujours disponible pour m'aider et répondre à mes questions.

Je souhaite également remercier tous les collègues du laboratoire à Bordeaux stagiaires, thésards et titulaires pour leur aide et leur gentillesse. Merci donc à Pierre, Cécile, Johan, Lilit, Alexandre, Marie, Sandra, Elodie...

J'adresse mes remerciements encore à Anne, Arnaud, Michel et Benoît avec qui j'ai eu le plaisir de partager de nombreuses discussions très profitables à mon projet et en particulier sur la partie «métabolisme».

Je n'oublie pas non plus de remercier les membres de l'équipe de Limoges, malgré les courtes périodes que j'ai passées chez vous. Merci Marie-Odile de m'avoir bien accueilli dans ton équipe. Je tiens à remercier encore Serge et Gaëlle pour le temps que vous m'avez consacré afin de me former sur la machine "sdFFF" .

Merci beaucoup Hussein, Sophie, Barbara, Hafidha, Sabrina, Aurélie, Amandine... Vous êtes tous agréables et vous contribuez à donner une ambiance

familiale au laboratoire.

Ce mémoire est également l'opportunité de remercier énormément ma famille (papa, maman et mes 2 frères) pour leurs encouragements et leur soutien durant toutes mes périodes difficiles à l'étranger, loin d'eux.

J'ai eu la chance d'avoir à mes cotés des amis précieux durant toutes ces années. Merci Benbo, Karim, Khaled, Mahmoud (alla yestor !!) , Khalifa (huyyy w mn ba3d) , Bourak...

Bien évidemment je veux finir en remerciant l'association libanaise pour la recherche scientifique, qui m'a financé durant toute la période de ma thèse et qui m'a permis d'atteindre mon but.

Table de matières

I) Introduction.....	1
A. Cancer: Généralités.....	1
A.1. Échelle cellulaire:.....	3
<i>a) Les mutations et l'instabilité génétique:.....</i>	<i>3</i>
<i>b) Une indépendance vis-à-vis des signaux de croissance:.....</i>	<i>5</i>
<i>c) Une résistance au phénomène d'apoptose:.....</i>	<i>5</i>
<i>d) Dérégulations métaboliques des cellules cancéreuses:.....</i>	<i>5</i>
<i>e) Capacité proliférative illimitée:.....</i>	<i>6</i>
A.2. Hétérogénéité tumorale:.....	6
<i>a) Théorie de l'évolution clonale:.....</i>	<i>7</i>
<i>b) Théorie des cellules souches cancéreuses:.....</i>	<i>8</i>
b.i) Caractéristiques des cellules souches cancéreuses (CSC):.....	9
b.ii) Limites de la théorie des CSC:.....	11
A.3. Micro-environnement tumoral:.....	12
<i>a) Définition du micro-environnement tumoral:.....</i>	<i>12</i>
a.i) Micro-environnement primaire:.....	13
a.ii) Micro-environnement invasif:.....	14
a.iii) Micro-environnement métastatique:.....	14
<i>b) Enjeu thérapeutique:.....</i>	<i>15</i>
B. Apoptose:.....	17
B.1. Généralités:.....	17
<i>a) Découverte:.....</i>	<i>17</i>
<i>b) Définition:.....</i>	<i>17</i>
<i>c) Mécanismes:.....</i>	<i>18</i>
B.2. Les protéines de la famille Bcl-2:.....	19
<i>a) Découverte du membre fondateur:.....</i>	<i>19</i>
<i>b) Définition des motifs BH:.....</i>	<i>20</i>
<i>c) Classification structurale et fonctionnelle:.....</i>	<i>21</i>
c.i) Les membres pro-apoptotiques à multi-motifs:.....	21
c.ii) Les membres pro-apoptotiques à BH3-seulement:.....	22
c.iii) Les protéines anti-apoptotiques:.....	23
C. Bcl-x_L et survie cellulaire:.....	26
C.1. Carte d'identité de Bcl-x_L:.....	26
<i>a) Modifications post-traductionnelles (PTM):.....</i>	<i>26</i>
<i>b) Fonctions non apoptotiques de Bcl-x_L:.....</i>	<i>27</i>

C.2.Rôle de Bcl-x_L dans l'autophagie:	27
<i>a)Autophagie: Découverte, définition et mécanisme:</i>	27
a.i)Découverte:	27
a.ii)Définition:	28
a.iii)Mécanismes d'induction de l'autophagie:	29
a.iv)Fonctions de l'autophagie:	32
<i>b)Controverse sur les fonctions de Bcl-x_L:</i>	33
C.3.Déamidation de Bcl-x_L:	33
<i>a)Définition de la déamidation:</i>	33
a.i)Importance biologique:	33
a.ii)Probabilité de la déamidation:	34
a.iii)Mécanisme réactionnel:	34
<i>b)État de connaissance sur la déamidation de Bcl-x_L:</i>	36
b.i)Découverte:	36
b.ii)La double déamidation de Bcl-x _L :	36
<i>c)Monodéamidation de Bcl-x_L:</i>	43
c.i)Mise en évidence:	43
c.ii)Conséquences fonctionnelles:	44
D.Objectif de cette étude:	45
II)Résultats:	47
A.Mise en évidence de la forme monodéamidée de Bcl-x_L:	47
A.1.Visualisation de la forme déamidée de Bcl-x_L par un gel de type Tris-Glycine-SDS-PAGE:	47
A.2.Visualisation de la forme déamidée par un gel Tris-Taurine-Glycine:...	51
A.3.Conclusion:	55
B.Conséquences fonctionnelles de la monodéamidation de Bcl-x_L:	56
B.1.Effet de la déamidation sur la stabilité de Bcl-x_L:	56
<i>a)Effet de la déamidation sur la stabilité de Bcl-x_L en conditions contrôles:</i>	56
<i>b)Effet de la déamidation sur la stabilité de Bcl-x_L en conditions de stress génotoxiques:</i>	58
<i>c)Conclusion:</i>	60
B.2.Monodéamidation et propriété anti-apoptotique de Bcl-x_L:	61
B.3.Monodéamidation et propriétés oncogéniques de Bcl-x_L:	61
<i>a)Étude de la clonogénéicité:</i>	62
<i>b)Étude de la tumorigénicité:</i>	63
b.i)Approche <i>in ovo</i> :	63
b.ii)Approche <i>in vivo</i> :	64

c) Conclusion:.....	66
B.4. Monodéamidation de Bcl-x_L et cellules souches cancéreuses (CSC):..	66
a) Analyse de marqueurs des cellules souches.....	66
b) Sensibilité au traitement 5-Fluorouracil (5FU):.....	69
c) Enrichissement en CSC par sdFFF:.....	70
d) Déamidation de Bcl-x _L dans la fraction F1:.....	72
B.5. Monodéamidation de Bcl-x_L et métabolisme cellulaire:.....	73
a) Mesure de la taille des cellules:.....	73
b) Effet de la monodéamidation de Bcl-x _L sur le métabolisme.....	75
cellulaire:.....	75
b.i) Mesure de la vitesse glycolytique des cellules HCT 116.....	77
b.ii) Mesure de la respiration mitochondriale:.....	79
c) Mesure du ratio ATP/ADP:.....	83
d) Conclusion:.....	84
B.6. Effet de la monodéamidation de Bcl-x_L sur l'autophagie:.....	85
a) Étude de l'effet de la forme monodéamidée de Bcl-x _L sur l'autophagie par la voie Tor : (Collaboration avec le Dr. Raul Duran Bordeaux).....	85
a.i) Effet de la monodéamidation sur l'activation classique de mTor:.....	87
a.ii) Effet de la monodéamidation sur l'activation de mTor via la voie de glutaminolyse:.....	89
b) Conclusion:.....	91
c) Étude d'effet de la monodéamidation de Bcl-x _L sur la voie de signalisation autophagique médiée par l'oncogène Ras:.....	91
d) Étude des interactions Bcl-x _L /Ras par immunoprécipitation:.....	93
e) Analyse d'interactions Bcl-x _L / Ras par BRET:.....	96
C. Partenaires d'interaction:.....	99
C.1. Effet de TAP-tag sur la fonction anti- apoptotique de Bcl-x _L	101
C.2. Purification et identification des partenaires:.....	103
C.3. Interaction entre la forme IsoAspartates de Bcl-x _L et la protéine Bax:.....	106
III) Discussion générale et perspectives.....	112
A. Migration sur gel SDS-PAGE: Est-ce la meilleure stratégie pour discriminer l'état de déamidation de Bcl-x_L?.....	113
B. Forme monodéamidée N52D N66A: Réorganisation structurale de Bcl-x_L.....	115
C. Déamidation et cancer:.....	115
C.1. Monodéamidation de Bcl-x _L : Effet métabolique ?.....	118
D. Relations entre la monodéamidation de Bcl-x_L et la stimulation	

de l'autophagie:.....	119
E.Partenaires moléculaires de Bcl-x _L N52D N66A:.....	121
F.Inclure l'étude des formes isoAsp:.....	122
IV)Conclusion:.....	125
V)Matériels et méthodes:.....	127
A.Techniques de Biologie moléculaire:.....	127
A.1.Amplification bactérienne d'ADN plasmidique:.....	127
<i>a)Transformation des bactéries compétentes par choc thermique:.....</i>	<i>127</i>
<i>b)Amplification, extraction et purification d'ADN plasmidique:.....</i>	<i>127</i>
A.2.Mutagenèse dirigée par PCR:.....	128
A.3.Clonage des gènes dans les plasmides lentiviraux:.....	129
A.4.Vérification de la séquence nucléotidique d'un plasmide:.....	130
A.5.Étude transcriptomique:.....	131
<i>a)Extraction des ARN totaux:.....</i>	<i>132</i>
<i>b)Transcription inverse des ARNs:.....</i>	<i>132</i>
<i>c)PCR quantitative:.....</i>	<i>133</i>
B.Techniques de Biologie cellulaire:.....	134
B.1.Lignées cellulaires, matériels et milieux de culture:.....	134
B.2.Entretien des cellules en culture :.....	134
B.3.Expression ectopique d'une protéine:.....	135
<i>a)Transfection transitoire:.....</i>	<i>135</i>
<i>b)Production des particules lentivirales.....</i>	<i>136</i>
B.4.Immunofluorescence sur cellules adhérentes:.....	137
B.5.Test de croissance en milieu semi-solide:.....	137
B.6.Tri cellulaire par sdFFF (sedimentation field flow fractionation) :.....	138
B.7.Mesure de la taille des cellules par le coulter counter:.....	139
B.8.Test de cytotoxicité:.....	139
C.Techniques biochimiques:.....	140
C.1.Analyse de l'expression protéique:.....	140
<i>a)Extraction et dosage des protéines totales:.....</i>	<i>140</i>
<i>b)Dosage des protéines par la méthode dite BCA:.....</i>	<i>140</i>
C.2.Immunoprécipitation:.....	140
C.3.Western blot:.....	141
<i>a)Electrophorèse de type Tris-Glycine-SDS-PAGE:.....</i>	<i>141</i>

b)Electrophorèse de type Tris-aurine/Glycine:.....	142
c)Le transfert sur membrane de nitrocellulose:.....	142
d)Immuno-buvardage:.....	143
e)Immunodétection par chimioluminescence:.....	143
C.4.Carence en acides aminées et test de glutaminolyse:.....	144
C.5.Test d'induction d'apoptose.....	145
C.6.BRET (Bioluminescence resonance energy transfer).....	145
C.7.Test de protéolyse par les calpaines :.....	147
C.8.Test de déamidation <i>in vitro</i>:.....	147
C.9.Condition d'obtention de stress génotoxique:.....	148
C.10.Test de respiration mitochondriale.....	148
C.11.Purification des partenaires protéiques par Tandem affinity purification:.....	149
C.12.Détermination de la quantité de lactate dans les milieux:.....	152
C.13.Mesure du ratio ATP/ADP par le HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance):.....	152
D.Techniques de greffe des cellules <i>ex-vivo</i> et <i>in vivo</i> :.....	153
D.1.Greffe cellulaire sur membrane chorio-allantoidienne d'embryon de poulet:.....	153
D.2.Greffe sur souris «nudes».....	154
D.3.Immunohistochimie sur coupes histologiques:.....	154
Bibliographie.....	156
Annexes.....	167

Index des tableaux

Tableau I.1: Exemple de différents oncogènes fréquemment associés au cancer.....	4
Tableau I.2: Les différentes voies de réparation de l'ADN lors des cassures simples et doubles brins. (Iyama and Wilson 2013).....	5
Tableau I.3: Hétérogénéité des tumeurs: caractéristiques des deux théories proposées.....	8
Tableau II.1: Tableau récapitulatif des mutants de déamidation de Bcl-xL utilisés.....	49
Tableau II.2: Liste des partenaires spécifiques de la forme monodéamidée de Bcl-xL.....	104
Tableau V.1: Mode d'obtention des différents mutants générés durant l'étude.....	127
Tableau V.2: Liste des constructions plasmidiques générées par mutagenèse dirigée au cours de cette étude.....	128
Tableau V.3: Listes des séquences des oligonucléotides utilisés durant cette étude.....	128
Tableau V.4: Liste des constructions plasmidiques utilisées et/ou générées durant cette étude par sous-clonage.....	129
Tableau V.5: Types cellulaires, milieux et leurs compositions utilisés durant cette étude.....	133
Tableau V.6: Protocole pour transfection de cellules au phosphate de calcium.....	134
Tableau V.7: Liste des lignées cellulaires générées par sous-clonage au cours de cette étude.....	135
Tableau V.8: Mélange réactionnel pour le test de croissance en milieu semi-solide.....	137
Tableau V.9: Tampons d'extraction des protéines utilisées au cours de cette étude.....	139
Tableau V.10: Composition du gel Tris-Glycine-SDS-PAGE de type Laemmli.....	140
Tableau V.11: Composition du gel de type Tris-Taurine/Glycine.....	141
Tableau V.12: Composition des tampons de transfert et de lavage.....	142
Tableau V.13: Récapitulatif des anticorps utilisés pour cette étude. WB: western blot/ IP: immunoprécipitation/ IF: Immunofluorescence/ IHC: Immunohistochimie.....	143
Tableau V.14: Composition des tampons utilisés pour la "Tandem Affinity purification".....	151

Index des figures

Figure 1: Caractéristiques des cellules cancéreuses.....	3
Figure 2: Représentation des 2 modèles pour expliquer l'hétérogénéité tumorale.....	7
Figure 3: Caractéristiques des CSC.....	11
Figure 4: Les cellules du micro-environnement tumoral.....	13
Figure 5: Les voies d'induction de l'apoptose.....	19
Figure 6: Illustration de la mutation par translocation du gène Bcl-2.....	20
Figure 7: Classification structurale et fonctionnelle des membres de la famille Bcl-2.....	21
Figure 8: Mécanisme d'activation de Bax par les autres membres de la famille Bcl-2.....	23
Figure 9: Structure tri-dimensionnelle de Bcl-xL résolue par cristallographie.....	24
Figure 10: Principales étapes de l'induction de l'autophagie.....	29
Figure 11: Mécanisme moléculaire de l'étape d'élongation et de la formation d'autophagosome.....	31
Figure 12: Représentation de la réaction chimique de la déamidation du résidu asparagine.....	35
Figure 13: Prédiction de la demi-vie de la déamidation des résidus asparagines de Bcl-xL.....	37
Figure 14: Voie de régulation de la double déamidation de Bcl-xL par le Rb suite à un dommage à l'ADN.....	41
Figure 15: Voie de régulation de la double déamidation de Bcl-xL dans des tumeurs malignes hématologiques suite à l'activation des tyrosines kinases oncogéniques (OKT).....	42
Figure 16: Profils de migration de la protéine Bcl-xL et ses formes déamidées dans un lysat de cellules HTB-29 traitées ou non par le cisplatine.....	48
Figure 17: Caractérisation de la forme modifiée de Bcl-xL.....	49
Figure 18: Profil électrophorétique des mutants de déamidation de Bcl-xL comparés à ceux de la protéine native et modifiée.....	50
Figure 19: Profils électrophorétiques des mutants de déamidation surexprimés chez les lignées HCT 116, obtenus sur un gel Tris-Taurine/glycine.....	51
Figure 20: Profils de migration électrophorétique des mutants de Bcl-xL comparés à ceux de la protéine native et la protéine modifiée.....	53
Figure 21: Profil de migration électrophorétique du mutant de Bcl-xL N52D comparé à celui de la protéine native.....	54
Figure 22: Stabilité de Bcl-xL et de ses mutants de déamidation.....	57
Figure 23: Stabilité de Bcl-xL et déamidation induite par stress aux U.V.....	58
Figure 24: Stabilité de Bcl-xL dans différentes lignées cellulaires, suite à l'induction d'un dommage à l'ADN par un traitement par le cisplatine.....	59
Figure 25: Test de croissance en milieu semi-solide des lignées HCT 116.....	62
Figure 26: Étude ex-vivo sur une membrane chorio-allantoïque du poulet.....	63
Figure 27: Expression de Ki67 par immunohistochimie sur des coupes de tumeurs issues des expériences sur CAM.....	64
Figure 28: Taille des tumeurs après xénotransgreffe des cellules HCT 116 sur des souris nues.....	65
Figure 29: Analyse d'expression du transcrit BMI1 par RT-QPCR dans les lignées cellulaires HCT 116.....	67
Figure 30: Expression et de localisation du facteur de transcription Oct-4 par Immunofluorescence indirecte.....	68
Figure 31: Détermination de l'IC ₅₀ du 5-FU pour les différentes lignées cellulaires.....	69
Figure 32: Fractogrammes obtenues à partir des cellules triées par sdFFF.....	71
Figure 33: Déamidation de Bcl-xL dans les fractions triées de la lignée HCT 116 P par sdFFF.....	72
Figure 34: Mesure du volume cellulaire (μm^3) chez les lignées HCT 116.....	74
Figure 35: Mesure du volume cellulaire (μm^3) chez les lignées U2OS.....	75
Figure 36: Fonctionnement de la phosphorylation oxydative mitochondriale illustrant le couplage de la chaîne respiratoire avec la phosphorylation de l'ADP en ATP par l'ATP synthase.....	76
Figure 37: Mesure du flux glycolytique chez les lignées HCT 116 cultivées en forte concentration	

de glucose avec une cinétique de 2 et 4 jours.....	78
Figure 38: Mesure du flux glycolytique chez les lignées HCT 116 cultivées en faible concentration de glucose avec une cinétique de 12 et 24 heures.....	79
Figure 39: Mesure de la respiration mitochondriale dans les lignées HCT 116.....	81
Figure 40: Mesure du ratio ATP/ADP dans les lignées HCT 116.....	83
Figure 41: Voie de signalisation de mTor.....	86
Figure 42: Mesure de la vitesse d'inhibition de mTor suite à une carence en acides aminées.....	88
Figure 43: Mécanisme de l'activation non conventionnelle de mTor par la voie de glutaminolyse.....	89
Figure 44: Étude de l'activité non conventionnelle de mTor par la voie de glutaminolyse.....	90
Figure 45: Voie d'activation et désactivation de l'oncogène Ras.....	92
Figure 46: Vérification des distances de migration après l'immunomarquage contre Flag et contre K-Ras.....	94
Figure 47: Co-Immunoprécipitation de Bcl-xL ou de son mutant monodéamidé N52D N66A avec Flag-Ras WT et ses mutants G12D, G12V, et G13D.....	95
Figure 48: Mesure par BRET de la proximité entre la protéine K-Ras WT et les différents mutants de Bcl-xL (DD, DA, AD et AA).....	97
Figure 49: Niveau d'expression de TAP-Bcl-xL dans les lignées HCT 116.....	100
Figure 50: Mesure des taux d'induction de l'apoptose induite par la staurosporine.....	101
Figure 51: Purification par TAP-TAG des partenaires interagissant avec TAP-Bcl-xL et TAP- Bcl-xL DA.....	103
Figure 52: Co-Immunoprécipitation de Bcl-xL et ses mutants avec Bax exogène purifiée suite à des tests de déamidation in vitro.....	106
Figure 53: Co-Immunoprécipitation de Bcl-xL purifiée et ses mutants avec Bax exogène purifiée suite à des tests de déamidation in vitro:.....	108
Figure 54: Représentation de la réaction Taqman:.....	131
Figure 55: Principe de la technique du BRET développée pour étudier les interactions protéine-protéine.....	146
Figure 56: Composition de la protéine TAP étiquetée avec la séquence Bcl-xL.....	148
Figure 57: Protocole de purification des partenaires par Tandem Affinity Purification.....	150

Résumé:

Bcl-x_L est un oncogène surexprimé dans plusieurs types de cancers et qui joue un rôle important dans la survie cellulaire en régulant deux processus: l'apoptose et l'autophagie. Récemment, nous avons identifié l'existence d'une nouvelle forme de Bcl-x_L qui subit une simple déamidation sur le résidu Asn52. Cette forme monodéamidée est exprimée en conditions contrôlées et apparaît spontanément *in vitro* et *in vivo*. La déamidation de Bcl-x_L produit un mélange de protéines contenant en position 52 soit un résidu Asp, soit un résidu isoAsp. L'objectif de cette thèse est de caractériser les fonctions de ces deux espèces protéiques, et de déterminer comment la monodéamidation de Bcl-x_L modifie les fonctions de survie de cet oncogène. Nous avons montré que le mutant déamido-mimétique Bcl-x_L N52DN66A conserve la même fonction anti-apoptotique que Bcl-x_L native, mais présente une activité autophagique plus grande, et des propriétés oncogéniques et tumorigéniques altérées *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Nous avons étudié certains des mécanismes impliqués dans la régulation de l'autophagie et les propriétés oncogéniques comme la voie mTor, les voies de signalisation médiées par l'oncogène Ras, ainsi que l'activité métabolique et l'état souche des cellules. D'autre part, nous avons aussi développé des tests *in vitro* pour analyser les interactions établies par les formes déamidées de Bcl-x_L comportant un isoAsp. L'ensemble de nos données permet de suggérer une régulation des fonctions de Bcl-x_L par des mécanismes indépendants de l'apoptose, et renforce l'importance d'explorer les fonctions non apoptotiques de cette protéine pour mettre en évidence sa capacité à promouvoir la survie cellulaire et entraîner la progression du cancer.

Mots clés: Bcl-x_L, autophagie, apoptose, cancer, modification post-traductionnelle

Abstract:

Bcl-x_L is an oncogene overexpressed in many types of cancer and which promotes cell survival by regulating two cellular processes : apoptosis and autophagy. We have recently identified a new form of this oncogene, which results from the deamidation of Asn52. This monodeamidated form is expressed under control conditions and is ubiquitously found *in vitro* and *in vivo*. Bcl-x_L monodeamidation produces a mixture of proteins containing either an Asp residue or an IsoAsp residue in position 52. Our goal is to characterise the functions of both species, and to determine how Bcl-x_L monodeamidation modifies the survival functions of this oncogene. We have shown that

the deamidomimetic mutant Bcl-x_L N52DN66A retains the same anti-apoptotic function as the native protein, but exhibits enhanced autophagic activity and impaired clonogenic and tumorigenic properties *in vitro*, *ex-vivo*, and *in vivo*. We have studied certain of the mechanisms which can be involved in the regulation of autophagy and oncogenic properties of Bcl-x_L such as mTor, Ras oncogene signaling pathway, metabolic activity measurement and stemness. We also implement *in vitro* assays to analyse the interactions established by isoAsp containing forms of Bcl-x_L. Altogether our results support the view that deamidation regulates Bcl-x_L oncogenic properties through apoptosis-independent mechanisms, and reinforce the importance of deciphering the non apoptotic functions of this protein to tackle its ability to sustain cell survival and drive cancer progression.

Keywords: Bcl-x_L, autophagy, apoptosis, cancer, post-translational modification

Liste des abréviations:

ADN: Acide désoxyribonucléique

ATP: Adénosine tri-phosphate

ADP: Adénosine di-phosphate

AIF: Apoptosis inducing factor

Apaf-1: Apoptotic protease activating factor

Atg: Autophagy-related

Bad: Bcl-2 antagonist of cell death

Bak: Bcl-2 homologous antagonist killer

Bax: Bcl-2 associated X protein1

Bcl-2: B cell lymphoma 2

Bcl-xL: Bcl-2 related protein long isoform

Beclin-1: Coiled-coil myosin-like Bcl-2-interacting protein

BH: Bcl-2 homology domain

Bid: BH3-interacting domain death agonist

Bif1: Bax-interacting factor 1

Bim: Bcl-2-interacting mediator of cell death

Bok: Bcl-2 related ovarian killer

BRET: Bioluminescence resonance energy transfer

Caspase: Cysteine-aspartate protease

CSC: Cellules souches cancéreuses

CCL1: Chemokine (C-C motif) ligand 1

CAF: Cancer-Associated-Fibroblast

CAM: Chorio-allantoid membrane

CED: Cell-death-abnormal

CMA: Chaperone Mediated Autophagy

DED: Death effector domain

DAB: 3,3'- Diaminobenzidine

DIABLO: Direct-IAP-binding protein with low pI

DISC: Death inducing signal complex

eIF2: Eukaryotic Initiation Factor 2 alpha

EC: Endothelial Cell

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

EGF: Epidermal growth factor

FADD: Fas-associated protein with death domain

FLIP: FLICE inhibitory protein

GAP: GTP-ase activation protein

GEF: Guanine nucleotide exchange factor

HCT 116: Human colon tumor 116

HIV: Human immunodeficiency virus

Hsp 60: Heat shock protein 60

IAPs: Inhibitor of apoptosis

IP3: Inositol phosphate 3

JNK: c-Jun N-terminal protein kinase 1

KFERQ: motif pentapeptidique Lysine - Phenylalanine - Glutamate - Arginine - Glutamine

LC3: Microtubule-Associated Protein Light Chain 3

LGR5: Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled Receptor 5

L-LDH: L-Lactate Déshydrogénase

MAC: Mitochondrial apoptosis-induced channel

Mcl-1: Myeloid cell leukemia 1

mTor: Mammalian target of rapamycin

NHE-1: Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1

OKT: Oncogenic kinase tyrosin

OCT: Optimal cutting temperature

PARP: Poly-(ADP ribose) polymérase

PE: Phosphatidyléthanolamine

PI3KC3: Phosphatidylinositol 3-kinase de classe 3

PIMT: Protein iso-aspartyl methyl transferase

PI(3)P: Phosphatidylinositol-3-phosphate

PUMA: p53 up-regulated modulator of apoptosis

PTP: Permeability transition pore

PTM: Post-translation modification

Raptor: Regulatory Associated Protein of mTOR

ROS: Reactive Oxygen Species

SDS: Sodium dodecyl sulphate polyacrilamde gel electrophoresis

SdFFF: Sedimentation field flux fractionnation

TNF: Tumor necrosis factor

TEM: Microscope électronique à transmission

TAP: Tandem Affinity Purification

ULK: Unc-51-like kinase

UV: Ultra-violet

UVRAG: Ultra-violet irradiation resistance associated gene

4 E-BP1 : Eukaryotic initiation factor 4 Enhancer-Binding Protein 1

5-FU : 5-FluoroUracile

Introduction

I) Introduction

Cette thèse s'inscrit dans la thématique d'étude des déterminants moléculaires non-apoptotiques de l'oncogène Bcl-x_L et du rôle de la monodéamidation sur ses propriétés oncogéniques. Ce travail a été effectué dans l'équipe "mitochondries, stress, et morts cellulaires" de l'Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires de Bordeaux sous la direction du Dr Muriel Priault en co-direction avec le Dr Mireille Verdier dans l'équipe "Homéostasie Cellulaire et Pathologies" à la faculté de Médecine de l'Université de Limoges.

Comme mon projet de thèse porte sur l'étude de l'oncogène Bcl-x_L, je présenterai en première partie le cancer de façon générale pour mieux comprendre quelques concepts étudiés dans ma thèse. La seconde partie sera ciblée sur l'oncogène Bcl-x_L et son rôle dans la survie cellulaire et enfin je parlerai de la modification post-traductionnelle de Bcl-x_L par déamidation.

A. Cancer: Généralités

Le mot "Cancer" tire son origine du mot latin homonyme qui signifie crabe. C'est Hippocrate de Cros, un médecin grec connu comme étant le père de la médecine moderne (né vers - 460 et décédé vers -370), qui a comparé le cancer à un crabe par analogie de l'aspect des tumeurs du sein avec cet animal lorsqu'elles s'étendent à la peau. Il n'est pas le premier à le décrire, mais c'est lui qui a donné le nom cancer. Le mot «Karkinos» qui signifie crabe en grec, représente pour Hippocrate un crabe qui mange les tissus et conduit à la mort. Cependant, il faut attendre des siècles pour que la technologie se développe et permette plus que des théories et des descriptions (Imbault-Huart 1984).

Le cancer est connu aujourd'hui comme une principale cause de maladie dans le monde. L'organisation mondiale de la santé (OMS) a estimé à environ 16 millions les nouveaux cas de cancer diagnostiqués en 2014. Il s'agit principalement des cancers du sein, du poumon, des cancers colorectaux et de l'estomac. Cette pathologie reste également la principale cause de mortalité dans le monde avec 8,2

millions de décès en 2014. Plus de la moitié de ces décès sont dus aux cancers du poumon, de l'estomac, du foie et colorectal (Bradbury et al. 2014).

Des progrès considérables ont été faits en matière de détection et de thérapies, mais l'amélioration de la lutte contre le cancer nécessite une connaissance encore plus approfondie des mécanismes impliqués dans son origine et sa progression.

Depuis des années, il est admis que le cancer est une maladie génétique. Les premières réflexions sur son origine ont proposé qu'il était causé par des anomalies génétiques touchant une cellule unique, devenant alors capable de se multiplier indéfiniment en une masse excessive de cellules et former ainsi une tumeur. Mais à mesure que la composition cellulaire des tumeurs a pu être étudiée, la vision d'une tumeur faite de cellules cancéreuses identiques a dû laisser la place à celle d'une tumeur hétérogène, faites de plusieurs types de cellules cancéreuses, toujours en évolution.

Une vision plus contemporaine est que le développement d'une pathologie cancéreuse n'est pas limité à l'accumulation des anomalies génétiques touchant des cellules. En effet, des observations ont mis l'accent, au niveau tissulaire, sur l'importance des interactions entre les cellules cancéreuses et leur micro-environnement au cours de l'évolution de la pathologie.

Ainsi, il convient aujourd'hui de considérer le cancer à plusieurs niveaux, allant de l'échelle cellulaire à celle de la tumeur. Ces différents niveaux d'organisation, sont le reflet à la fois de la progression des connaissances mais aussi de la complexité de son étiologie et de son évolution. Dans un effort de synthèse et de clarification, Hanahan et Weinberg ont décrit en 2000, puis complété en 2011, les caractéristiques principales des cellules tumorales et des tumeurs (D. Hanahan and Weinberg 2000; Douglas Hanahan and Weinberg 2011) (Figure 1). Leurs réflexions intègrent d'une part les modifications qui affectent les cellules pour accompagner la transformation tumorale, et d'autre part les modifications affectant l'interaction entre les cellules cancéreuses et les tissus environnants. Ces deux aspects sont détaillés ci-après.

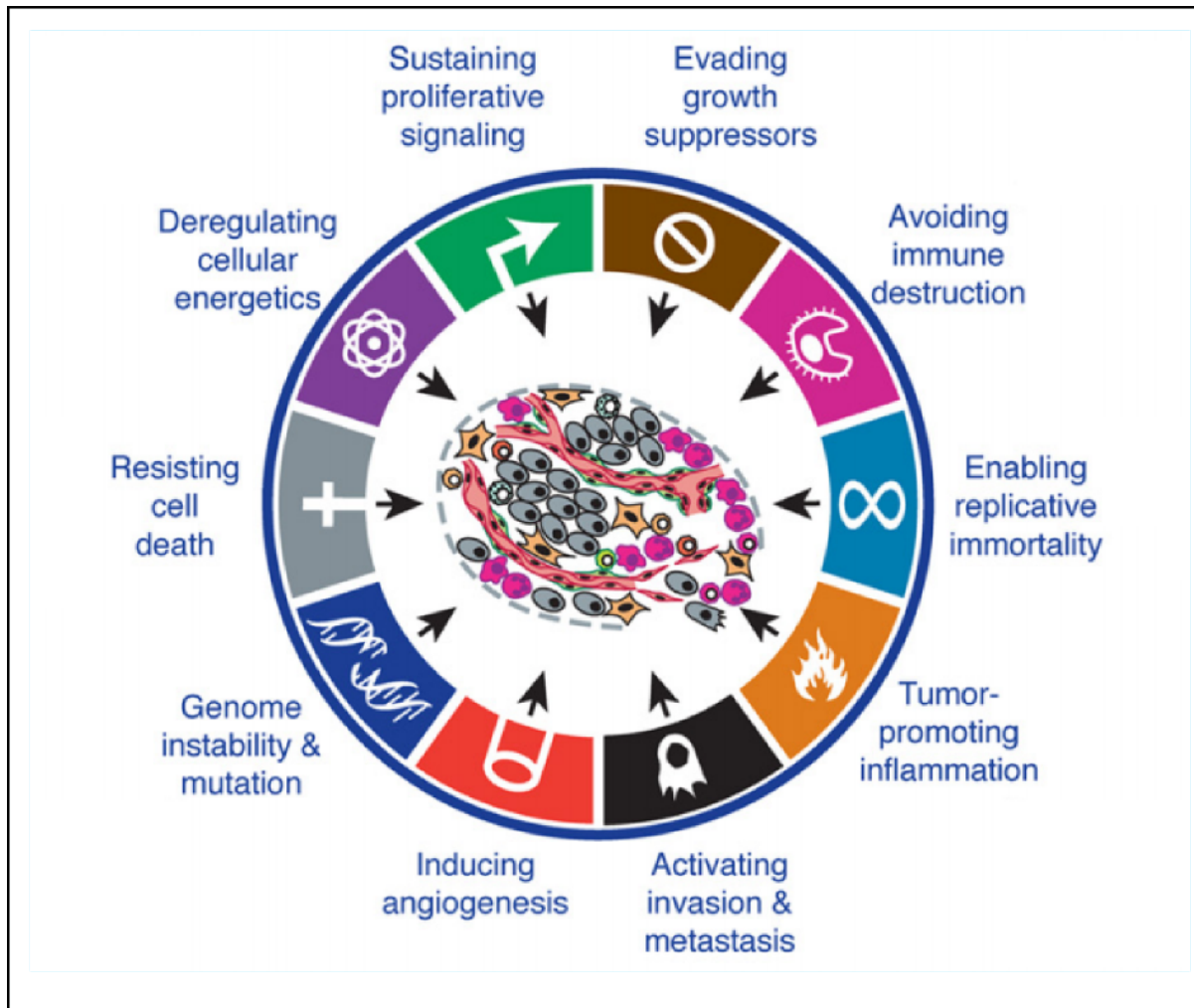


Figure 1: Caractéristiques des cellules cancéreuses

Cette figure englobe les différentes caractéristiques des cellules cancéreuses décrites par Hanahan et Weinberg et qui sont impliquées dans les mécanismes de l'oncogenèse. La représentation circulaire plutôt que linéaire illustre que l'acquisition de ces caractéristiques se fait sans chronologie fixe. Figure tirée de (*Douglas Hanahan and Weinberg 2011*).

A.1. Échelle cellulaire:

La vision du cancer comme une maladie génétique est fondée sur l'identification de gènes dont la mutation contribue à la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse.

a) Les mutations et l'instabilité génétique:

Il existe 3 catégories de gènes associés aux maladies cancéreuses: les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs, et les gènes de réparation de l'ADN.

- Les oncogènes: Les oncogènes sont des gènes qui, dans les cellules normales, contrôlent les voies de signalisation régulant la prolifération et la différenciation

cellulaire. Leur expression et activation doivent être finement régulées pour garantir le maintien de l'homéostasie cellulaire. En condition physiologique, ils sont définis comme des proto-oncogènes. Lorsqu'ils sont exprimés/activés de façon anormale par des facteurs chimiques (le tabac, les polluants) ou physiques (les rayonnements U.V) (J. Hall and Angèle 1999), ils entraînent une dérégulation de la prolifération cellulaire qui devient alors illimitée.

Dans le tableau I.1 , je cite quelques exemples d'oncogènes dont la mutation est fréquemment associée au cancer.

Nom	Cancer	Référence
H-Ras/K-Ras/N-Ras	Pratiquement tous les cancers humains	(M.-J. Kim et al. 2011)
Abl	Leucémie Myéloïde Chronique (95 %)	(Cao et al. 2003)
c-myc	Pratiquement tous les cancers humains	(Li et al. 2003)

Tableau I.1: Exemple de différents oncogènes fréquemment associés au cancer.

Les gènes suppresseurs de tumeurs: La seconde catégorie comprend les gènes suppresseurs du tumeur (TSG). Ce sont des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire. Le plus connu est probablement *TP 53*, codant la protéine p53, qualifiée de «gardien du génome». Ces TSGs peuvent être spécifiques de certains cancers. Par exemple, le gène *RB1* est impliqué dans le rétinoblastome, les gènes *BRCA1* et *BRCA2* dans les cancers du sein (J. M. Hall et al. 1990) et *APC* dans le cancer du colon (Nishisho et al. 1991).

Les gènes de réparation de l'ADN: La troisième catégorie correspond aux gènes codant des protéines capables de réparer les lésions de l'ADN, ce qui empêche la modification de l'expression d'oncogènes et/ou de suppresseurs de tumeurs.

Je cite dans le tableau I.2 les voies principales de réparation de l'ADN lors des cassures simples et doubles brins.

Lésion de l'ADN	Voie de réparation
Cassure simple brin d'ADN	- Réparation par BER (base excision repair) - Réparation par NER (nucleotid excision repair)
Cassure double brin	- Réparation par jonction des extrémités non- homologues (JENH) - Voie de recombinaison homologue

Tableau I.2: Les différentes voies de réparation de l'ADN lors des cassures simples et doubles brins. (Iyama and Wilson 2013).

b) Une indépendance vis-à-vis des signaux de croissance:

Les cellules normales se divisent seulement lorsqu'elles reçoivent des signaux mitogènes transduits par des cytokines et des facteurs de croissances. La fixation de ces molécules sur les récepteurs de la membrane plasmique de la cellule cible induit souvent l'oligomérisation/activation des récepteurs, qui transduisent une signalisation mitogène. Celle-ci doit être extrêmement régulée pour éviter une prolifération incontrôlée. Les cellules tumorales n'ont plus besoin de ces signaux pour se multiplier parce que leurs récepteurs aux facteurs de croissance ou les molécules de signalisations en aval sont activés en permanence.

c) Une résistance au phénomène d'apoptose:

Lorsqu'une cellule normale est exposée à un stress qui engage son intégrité, elle exécute un programme de mort génétiquement contrôlé qui s'appelle l'apoptose (que l'on décrira plus loin). Une caractéristique largement répandue dans les cellules cancéreuses est que le programme apoptotique est rendu inopérant, par des mécanismes qui soit inhibent les gènes induisant la mort (pro-apoptotiques), soit conduisent à la surexpression de protéines de survie (anti-apoptotiques) (Hanahan and Weinberg 2000).

d) Dérégulations métaboliques des cellules cancéreuses:

Les cellules cancéreuses soutiennent un rythme de proliférations plus élevé que les cellules normales. Une grande quantité de métabolites est donc nécessaire à la biosynthèse des macromolécules (protéines, acides gras, carbohydrates et acides nucléiques) pour dupliquer les cellules. La synthèse de ces métabolites nécessite aussi une grande quantité d'énergie en peu de temps. Dans les années 1930, Otto H. Warburg avait observé que les cellules cancéreuses produisent de l'énergie

(ATP) via la glycolyse au lieu de la phosphorylation oxydative, même en présence d'oxygène. En effet, même si la glycolyse a un rendement plus faible que les oxydations phosphorylantes en terme de production d'ATP par glucose consommé, les cellules cancéreuses présentent une dérégulation cinétique des enzymes glycolytiques qui garantit au final une production plus rapide, puisque le glucose n'est pas limitant (Razungles et al. 2013).

e) Capacité proliférative illimitée:

En conditions physiologiques, la prolifération est limitée par deux processus: la sénescence, qui provoque un arrêt de la capacité réplivative des cellules, et l'apoptose qui conduit à la mort cellulaire. Nous avons vu précédemment que les cellules cancéreuses sont souvent résistantes à l'induction de l'apoptose, et de la même façon, elles présentent des mutations qui les rendent résistantes à la sénescence (ex: les mutations de l'oncogène Ras) (Hanahan and Weinberg 2011).

Si, il y a quelques années, le cancer était considéré comme le résultat de la prolifération anarchique d'une cellule présentant une mutation lui conférant un avantage sélectif de survie et prolifération, l'évolution des connaissances a conduit à revoir ce concept. Aujourd'hui, nous considérons que les tumeurs ne constituent pas un ensemble de clones de cette unique cellule anormale, mais plutôt un ensemble de clones issus de plusieurs cellules anormales. Cette vision est en accord avec l'observation faite par les pathologistes d'une tumeur présentant des cellules de morphologies variées, d'où le concept de l'hétérogénéité tumorale.

A.2. Hétérogénéité tumorale:

L'hétérogénéité tumorale est un concept connu depuis 1976 et est expliquée par la présence de différents clones émergent de cellules ayant acquis de façon non synchrone et continuant à acquérir au fur et à mesure de la progression tumorale, des mutations dans des gènes différents (Nowell 1976).

A l'heure actuelle, deux modèles se confrontent pour rendre compte de l'hétérogénéité tumorale: le modèle de l'évolution clonale, reposant sur le principe de sélection naturelle de Darwin (modèle stochastique), et le modèle des cellules souches cancéreuses (modèle hiérarchique) (figure 2).

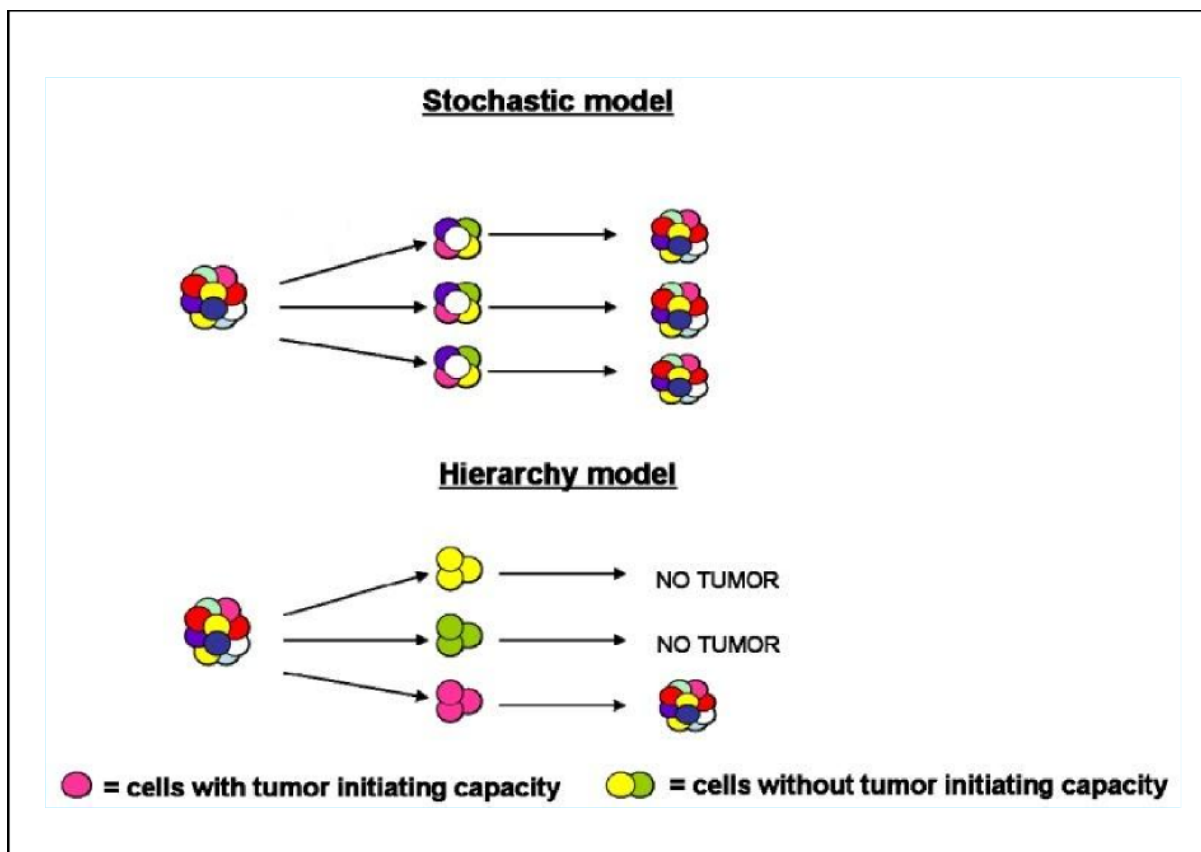


Figure 2: Représentation des 2 modèles pour expliquer l'hétérogénéité tumorale

Dans le modèle stochastique, chaque cellule cancéreuse a une capacité équivalente élevée de prolifération tumorale. Dans le **modèle hiérarchique, seulement une sous-population est capable de créer une tumeur ; ce sont les cellules** souches cancéreuses (en rouge). Figure tirée de (Catalano et al. 2011)

a) Théorie de l'évolution clonale:

En 1976, Peter Nowell a proposé un modèle d'évolution clonale pour expliquer la croissance tumorale et les dérégulations qui se produisent dans les tumeurs solides. Selon cette théorie, la tumeur prend son origine dans l'apparition d'une cellule cancéreuse unique, donnant naissance à des cellules filles, qui acquièrent dans le temps des mutations génétiques au fur et à mesure de leur multiplication et qui sont à l'origine d'une évolution linéaire de la population tumorale (Nowell 1976).

Dans ce modèle classique, dit stochastique, il n'existe pas de hiérarchie entre les cellules, c'est à dire que chaque cellule ou clone présent dans la tumeur est capable de proliférer et contribuer de manière équivalente à la croissance tumorale (Shackleton et al. 2009).

Cependant, pour rendre compte de l'hétérogénéité tumorale, il a fallu modifier le modèle clonal en y ajoutant la notion de «diversification clonale»: une fois la tumeur

initiée, sa composition cellulaire pourrait diverger par la présence de plusieurs clones de cellules cancéreuses, ayant acquis des altérations génétiques successives. Ce modèle permet d'intégrer les altérations décrites par Hanahan et Weinberg, qui sont un pré-requis à la transformation tumorale, mais sans qu'il n'existe de chronologie définie dans leur enchaînement. L'hétérogénéité tumorale résulterait donc de cellules ayant acquis de façon asynchrone ces altérations.

Dans ces modèles dits «classiques», toutes les cellules cancéreuses qui composent la tumeur sont considérées comme ayant le même potentiel tumorigène. C'est la limite du modèle classique, qui ne rend pas compte du fait que, dans certaines tumeurs comme la leucémie, seulement une petite fraction des cellules possède un potentiel tumorigène après transplantation. Cette observation a mené à la formulation de la théorie des cellules souches cancéreuses.

b) Théorie des cellules souches cancéreuses:

La théorie des cellules souches cancéreuses (CSC) propose que au sein de la masse tumorale, seule une fraction des cellules est tumorigène c'est à dire capable d'initier la formation d'une tumeur après transplantation. Ainsi, même si les cellules tumorales peuvent se multiplier pendant un temps, seules les cellules souches cancéreuses peuvent donner naissance indéfiniment à de nouvelles cellules (elles-mêmes cancéreuses mais non tumorigènes) grâce à leur capacité d'auto-renouvellement (Shackleton et al. 2009).

Je résume dans le tableau I.3 les caractéristiques de ces 2 modèles décrits ci-dessus.

	Modèle stochastique	Modèle hiérarchique
Origine du cancer	Chaque cellule a une probabilité équivalente de proliférer et former une tumeur.	Une rare population de cellules souches cancéreuses est initiatrice du cancer.
Mécanismes tumorigènes	Mécanismes tumorigènes présents dans chaque cellule.	Mécanismes tumorigènes présents uniquement dans les cellules souches cancéreuses.

Tableau I.3: Hétérogénéité des tumeurs: caractéristiques des deux théories proposées.

En 1994, l'étude des cellules sanguines et de la moelle osseuse (M.O) des patients leucémiques, leurs greffes dans des souris « nues » et leurs analyses en cytométrie en flux a permis l'identification d'une cellule à l'origine de leucémies qui exprime le marqueur CD 34 (Lapidot et al. 1994).

En 1997, d'autres travaux effectués par "Bonnet et Dick" dans des tumeurs de type leucémique ont montré que seulement une petite fraction de cellules isolées chez un patient est susceptible de reproduire la maladie chez des souris immunodéprimées en engendrant tous les différents types cellulaires caractérisant la leucémie (Bonnet and Dick 1997). Par la suite, les CSC ont été identifiées dans de nombreuses tumeurs solides comme le cancer du pancréas, du sein, de la prostate et les glioblastomes. Ces CSC possèdent plusieurs caractéristiques décrites dans le paragraphe suivant.

b.i) Caractéristiques des cellules souches cancéreuses (CSC):

Les CSC présentent plusieurs caractéristiques, dont certaines communes avec les cellules souches physiologiques: (figure 3)

1) Capacité d'auto-renouvellement illimité: Afin de se maintenir dans l'organisme, les CS conservent leur capacités d'auto-renouvellement en se divisant de façon symétrique ce qui génère deux cellules souches, ou asymétrique en produisant une cellule souche d'un part et un progéniteur d'autre part (cellule plus différenciée).

2) Multi-potentialité: Les CSC ont la capacité de se différencier pour donner les différents types de cellules présentes dans la tumeur. Cette différenciation est le support de l'hétérogénéité tumorale (Anderson et al. 2011).

3) Capacité d'initiation d'une tumeur: Les CSC sont définies comme des sous-populations capables d'initier une tumeur lorsqu'elles sont transplantées dans des souris immunodéprimées (Ieta et al. 2008).

4) Capacité de résistance aux traitements: Les CSC ont la capacité de résister aux traitements anti-cancéreux. Bao et al. ont montré sur des gliomes que les CSC irradiées survivent plus longtemps que les cellules différenciées (Bao et al. 2006). Cela repose sur leur cycle cellulaire très long, proche de la quiescence, et sur leur capacité accrue à activer l'autophagie, ce qui les rend en partie insensibles à leur

environnement.

5) Expression des marqueurs spécifiques des CSC:

Le très petit nombre de CSC au sein des tumeurs (environ 3%) nécessite l'emploi d'outils performants pour pouvoir les discriminer des autres cellules. En 1994, dans un modèle de leucémie myéloïde aiguë, l'expression du marqueur CD34 a permis de caractériser les cellules souches leucémiques (Lapidot et al. 1994). D'autres marqueurs exprimés à la surface cellulaire, comme le CD 133 ou le CD 44, ont été utilisés ensuite pour identifier les CSC dans différentes tumeurs solides (Yeung et al. 2010, Niwa, Miyazaki, and Smith 2000). D'autres marqueurs, comme LGR5 (associé à la voie WNT dans le cancer colo-rectal), ont été récemment identifiés et joueraient un rôle dans la prolifération et la résistance aux radiothérapies (Hirsch et al. 2014). Actuellement, il n'existe pas de technique permettant de distinguer une cellule souche normale ou une CSC. Les marqueurs utilisés comme CD44 ou CD133 ne sont pas des marqueurs exclusifs des CSC car on peut les trouver encore dans d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales.

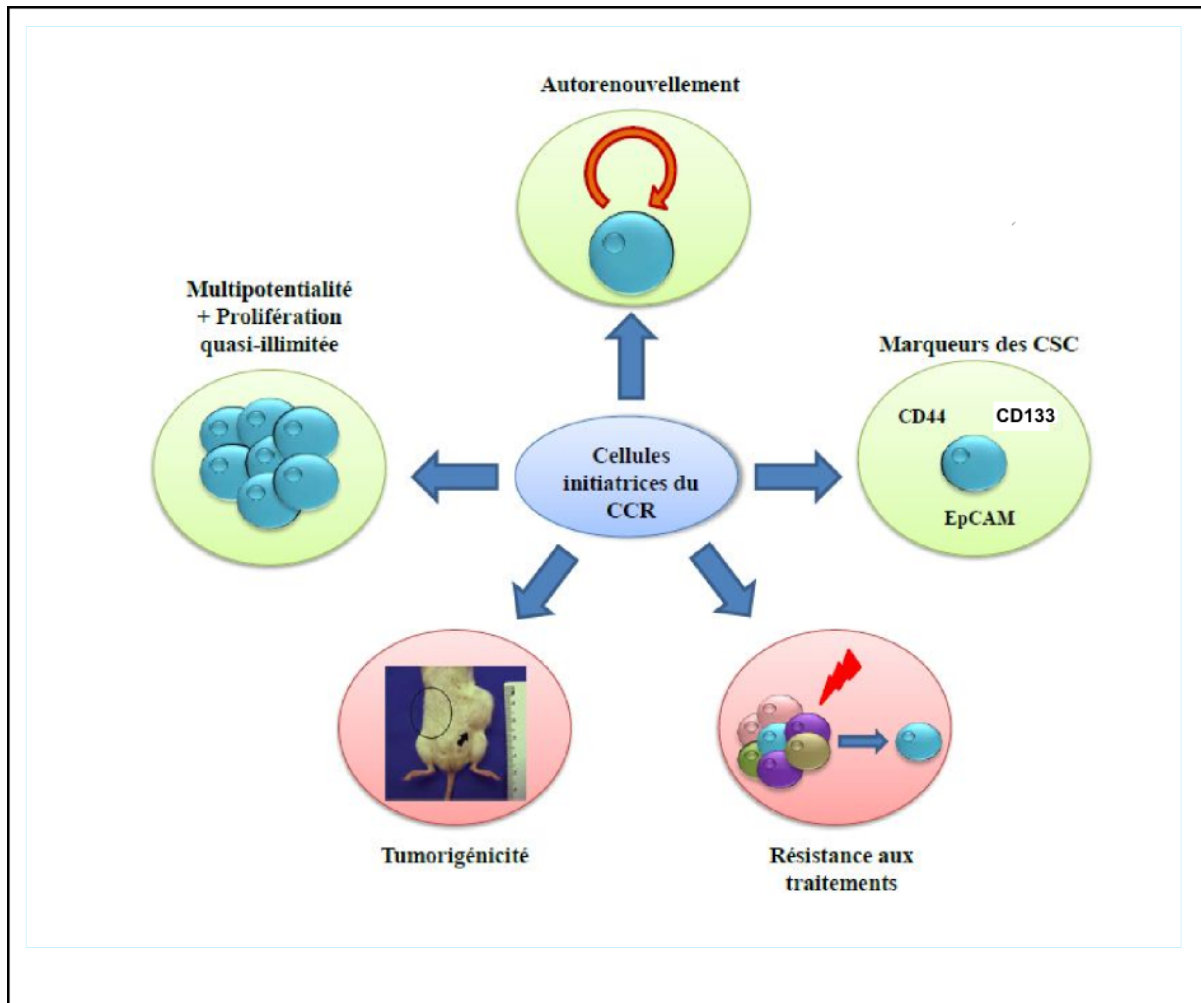


Figure 3: Caractéristiques des CSC

Les différentes propriétés des CSC sont l'auto-renouvellement, l'expression de marqueurs spécifiques tels que le CD44, l'EpCAM, ou encore le CD133, la multi-potentialité, ainsi que la prolifération quasi-illimitée dans le temps (responsables de l'origine de la tumeur), la capacité de tumorigénicité in vivo, et enfin la résistance au traitement.

Figure issue de la thèse de Carole Melin, 2012.

b.ii) Limites de la théorie des CSC:

Le point principal de la controverse sur le concept de CSC est le manque d'essai «fonctionnel», de marqueurs de surface cellulaire pour distinguer une CSC d'une cellule normale. En effet, si le modèle des CSC était suffisant pour rendre compte de la formation de toutes les tumeurs et de leur hétérogénéité, les marqueurs devraient être détectables quelle que soit la tumeur. Le fait que l'utilisation de ces marqueurs ne soit pas généralisable est une des raisons qui remettent en question l'existence des CSC et le potentiel tumorigène qui leur est prêté.

Ces deux théories, qui ne sont pas exclusives l'une de l'autre, ne sont pas suffisantes pour rendre compte de la complexité de l'évolution des tumeurs.

Récemment, l'importance de l'interaction des cellules tumorales avec le milieu qui les environne (appelé le micro-environnement) a été soulignée, parce que la croissance de la tumeur dépend de ces interactions.

A.3. Micro-environnement tumoral:

a) Définition du micro-environnement tumoral:

Le concept de micro-environnement tumoral a été introduit par la théorie graine-sol (seed and soil). Cette théorie, proposée pour expliquer la dissémination des cellules tumorales dans l'organisme, confère un rôle important au micro-environnement (le sol) dans lequel se trouve la cellule cancéreuse (la graine) (Paget 1989).

Le micro-environnement tumoral est l'environnement cellulaire dans lequel la tumeur existe. Il comprend les vaisseaux sanguins environnants, les cellules immunitaires, les fibroblastes, les molécules de signalisation et la matrice extracellulaire (ECM). La nature du micro-environnement est considérée comme un facteur clé de la progression tumorale en cela que la cellule cancéreuse est «instruite» par son micro-environnement. On distingue 3 types de micro-environnements, qui définissent 3 états différents de tumeurs récapitulées dans la figure 4.

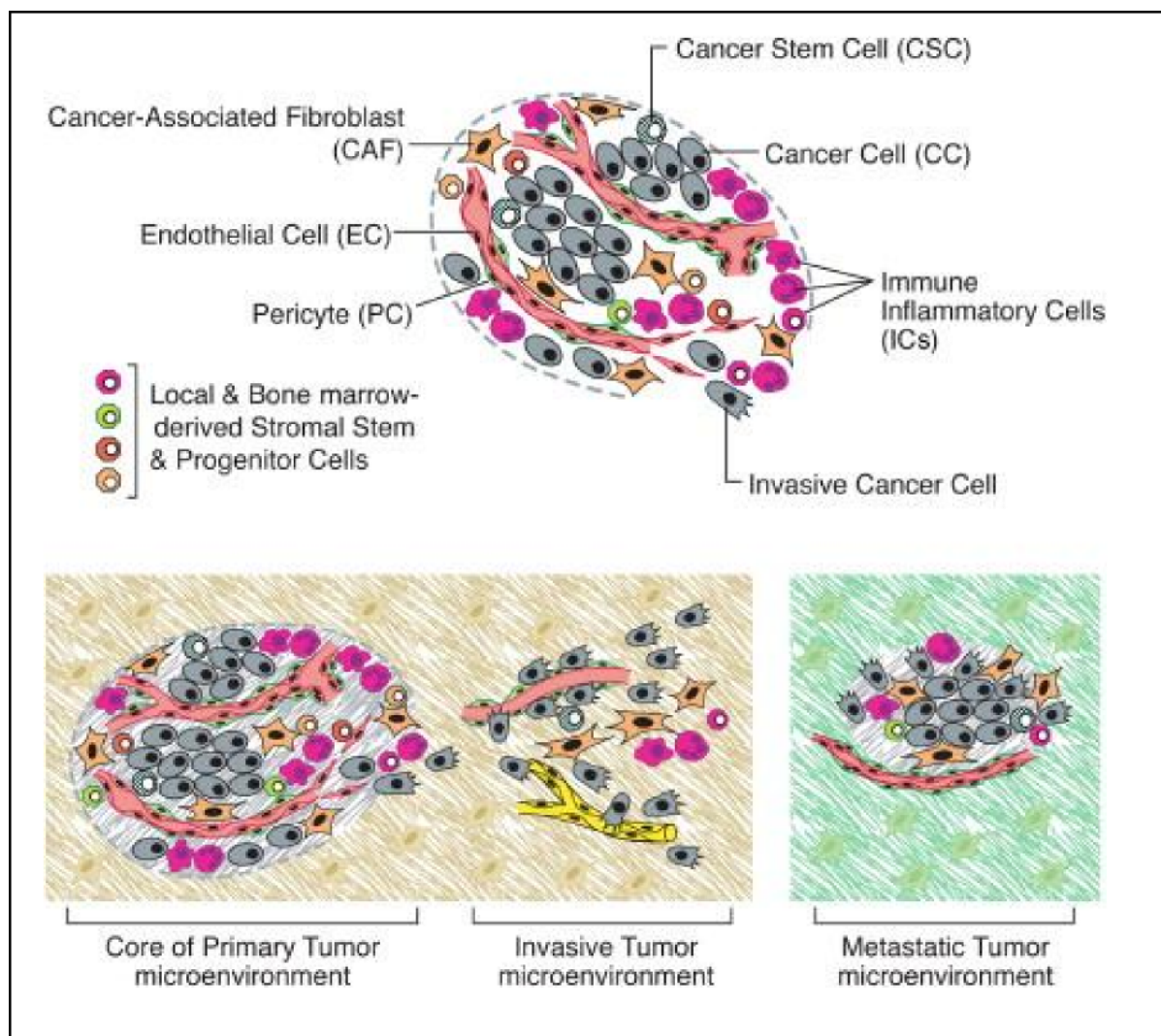


Figure 4: Les cellules du micro-environnement tumoral

Un assemblage de types cellulaires distincts constitue la plupart des tumeurs solides. Le parenchyme et le stroma des tumeurs contiennent des types et des sous-types distincts de cellules qui favorisent la croissance et la progression de la tumeur. Il existe 3 types de micro-environnement: le micro-environnement primaire, le micro-environnement invasif, et le micro-environnement métastatique.

Figure tirée de (Hanahan and Weinberg 2011).

a.i) Micro-environnement primaire:

Au niveau tissulaire, la tumeur n'est pas formée simplement de cellules cancéreuses mais d'un ensemble de cellules tumorales et de cellules saines, qui contribuent à son développement (comme les cellules endothéliales, les macrophages et les fibroblastes) en lui apportant des fonctions ou des capacités non acquises par les cellules cancéreuses. Cette association des différents types cellulaires constituent ce qu'on appelle "le micro-environnement primaire". Par exemple, l'angiogenèse permet le recrutement des vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux existants afin d'apporter de l'oxygène et d'autres facteurs indispensables

à la croissance tumorale comme le VEGF-A induisant la croissance des capillaires sanguins dans la tumeur. De plus, les tumeurs sont infiltrées par des cellules immunitaires pouvant provoquer des réactions inflammatoires dans les tissus adjacents. Les cellules inflammatoires secrètent des substances chimiques comme les interleukines (IL-1, IL-6, IL-8 et les chimiokines CCL1) qui régulent la prolifération des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg 2011).

a.ii) Micro-environnement invasif:

La capacité de migration des cellules cancéreuses est une étape indispensable au processus d'invasion. Dans un tissu sain, les cellules ont besoin, pour survivre, d'établir des connexions entre elles et aussi avec la matrice extra-cellulaire. La survie des cellules tumorales n'est plus aussi dépendante de ces contacts. Elles peuvent se détacher de leur support tissulaire, sans entraver leur survie. C'est ce qui va favoriser la migration des cellules tumorales. Les cellules cancéreuses utilisent le processus de dédifférenciation, appelé transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), qui permet de générer des cellules de phénotype mésenchymateux à partir d'un épithélium. Les cellules en TEM perdent leur adhésion cellule-cellule (par une diminution de l'expression des cadhérines). Le signal qui participe au déclenchement de la TEM est le facteur transformant TGF- β (Transforming Growth Factor beta) qui est produit par les macrophages et les fibroblastes de la tumeur. Les cellules cancéreuses sont alors capables d'envahir la matrice extra-cellulaire du tissu où la tumeur s'est formée, puis de franchir la lame basale des vaisseaux sanguins ou lymphatiques (intravasation) (McCormack and O'Dea 2013).

a.iii) Micro-environnement métastatique:

Le processus d'invasion décrit précédemment est une première étape vers la métastase. Les cellules cancéreuses qui ont atteint le sang ou la lymphe circulent jusqu'à leur extravasation qui leur permet d'envahir un nouveau territoire. Les métastases s'implantent pour former de nouvelles tumeurs à distance de la tumeur originelle (Talmadge and Fidler 2010).

L'émergence du concept du micro-environnement et de ses rôles dans la progression tumorale, a permis de modifier notre compréhension des phénomènes

de résistance aux traitements anticancéreux. Le micro-environnement est même devenu une cible à part entière pour élaborer de nouvelles approches pour le traitement des cancers.

b) Enjeu thérapeutique:

Si le micro-environnement tumoral «instruit» effectivement les cellules cancéreuses dans leur progression tumorale, il devient alors une cible non négligeable dans la lutte contre le cancer. Par exemple, les traitements anti-angiogéniques, dont la plupart ciblent le VEGF et/ou son récepteur, se sont largement développés ces dernières années, en association à la chimiothérapie, dans les tumeurs solides, avec une efficacité variable selon le type de tumeur (rein, côlon, poumon, ovaire, sein). L'objectif d'un traitement anti-angiogénique est de combattre la croissance tumorale en empêchant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Le premier médicament anti-angiogénique est un anticorps monoclonal anti-VEGF: le bevacizumab. Actuellement, de nouveaux agents anti-angiogéniques sont sur le marché, comme les ITKs (inhibiteurs de tyrosine kinase), qui inhibent plusieurs cibles des récepteurs VEGF (VEGF1, 2, PDGFR), associés à d'autres voies de signalisation comme celle de l'EGFR (Rapisarda and Melillo 2012). De plus, l'immunothérapie est également explorée, et offre des approches différentes. Il a été montré que la tumeur peut limiter l'action du système immunitaire en formant un environnement dans lequel s'accumulent plusieurs types cellulaires qui diminuent l'activité des cellules immunitaires comme les lymphocytes cytotoxiques. L'identification des cytokines qui jouent un rôle dans la régulation des cellules immunitaires ainsi que leurs propriétés stimulantes affectées par les cellules cancéreuses a conduit à la mise au point de nouvelles thérapies. On peut citer par exemple: les inhibiteurs du TNF-alpha (tumor necrosis factor), cytokine impliquée dans des processus inflammatoires, les inhibiteurs de la voie NF- κ B (inhibiteur de IKK β) qui régule un certain nombre de protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire et la prolifération (Cavallo, Curcio, and Forni 2005). La compréhension des effets secondaires, des mécanismes d'action et de résistance restent des points clés du développement de ces thérapies.

Dans ce chapitre, nous avons vu que le développement tumoral est un processus multifactoriel, lié à des anomalies génétiques touchant un ensemble de cellules ainsi

qu' à des interactions des cellules cancéreuses avec leur micro-environnement. Mais, la croissance d'une tumeur n'est pas seulement la conséquence d'une prolifération cellulaire excessive. Nous avons déjà évoqué qu'elle résulte aussi souvent d'un déséquilibre entre la prolifération et l'apoptose, qui est une mort cellulaire programmée dont nous parlerons en détail dans la seconde partie de ce chapitre.

B. Apoptose:

B.1. Généralités:

a) Découverte:

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus qui a été mis en évidence en 1972 par John Kerr par lequel les cellules déclenchent leur autodestruction (suicide) sans réaction inflammatoire en réponse à un signal intra ou extra-cellulaire (Kerr, Wyllie, and Currie 1972).

En 1983, Horvitz et ses collègues ont décrit les gènes essentiels qui déterminent le devenir des 1090 cellules du nématode "*Caenorhabditis elegans*", dont 131 doivent disparaître au cours du développement embryonnaire (Horvitz et al. 1983). Parmi les gènes découverts, quatre sont impliqués dans une voie de signalisation qui contrôle la mort cellulaire par apoptose: Ced-3, Ced-4, Ced-9 et Egl-1. Ces recherches, menées par John Sulston, Robert Horvitz et Sydney Brenner ont décrypté le programme génétique contrôlant l'apoptose. Ces chercheurs ont reçu le prix Nobel de Médecine et Physiologie en 2002. Depuis ces travaux chez le nématode, il a été montré que l'apoptose est un processus conservé à travers les espèces et qui est retrouvé chez tous les protozoaires.

b) Définition:

La mort par apoptose est un processus actif au cours duquel la cellule exprime un ensemble de gènes entraînant des modifications structurales et biochimiques. Elle se caractérise par la compaction de la chromatine, la fragmentation de l'ADN, la condensation du cytoplasme et la formation de corps apoptotiques qui seront éliminés par phagocytose par les cellules environnantes du système immunitaire. Cette étape de phagocytose prévient d'une nécrose qui est accompagnée d'une perte d'intégrité membranaire, de la libération du contenu cellulaire toxique pour les cellules avoisinantes en provoquant une réaction inflammatoire locale.

L'apoptose joue un rôle important dans l'embryogenèse, dans le maintien de l'homéostasie cellulaire des tissus adultes (notamment immunitaire), dans la réparation des tissus et dans la régression des tumeurs (Tang and Porter 1996).

c) Mécanismes:

L'apoptose peut être stimulée par divers types de signaux extra-cellulaires (ligands se fixant à des récepteurs de mort) ou perçus au niveau intracellulaire comme l'exposition aux U.V., la privation en facteur de croissance, les lésions d'ADN. Selon la nature de ces différents signaux, on peut distinguer deux principales voies d'activation de l'apoptose:

- La voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque est activée lorsque les ligands (TRAIL, FAS-L) circulant à l'extérieur des cellules, se fixent sur les récepteurs (TNFR1, FAS/CD95) présents sur la membrane plasmique des cellules à éliminer. La fixation des ligands conduit à la multimérisation des récepteurs et à un changement conformationnel de leur domaine cytoplasmique appelé DD (Death Domain), qui recrute des protéines telles que TRADD (TNFR associated protein with DD) sur le TNFR ou FADD (FAS associated protein with DD) sur FAS. La pro-caspase 8 est recrutée et activée par clivage et initie une cascade d'activation d'autres caspases effectrices (les caspases 3, 6 et 7).

- La voie dite intrinsèque ou mitochondriale, qui a été identifiée à la fin des années 1990, est généralement induite par des signaux internes à la cellule tels que les lésions de l'ADN. Ces signaux induisent des modifications de la perméabilité mitochondriale, qui aboutissent à la libération de divers facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome c, l'endonucléase G et l'AIF (Apoptosis inducing factor), les protéines Smac/Diablo et Omi/HtrA2. Le cytochrome c libéré dans le cytosol interagit avec Apaf1 (Apoptotic peptidase activating factor 1) pour recruter la caspase 9. Ce complexe appelé apoptosome va activer la caspase 3. Cette famille de protéase est responsable de l'exécution du programme de mort par clivage de plusieurs molécules aboutissant à des modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose (Er et al. 2006) (figure 5).

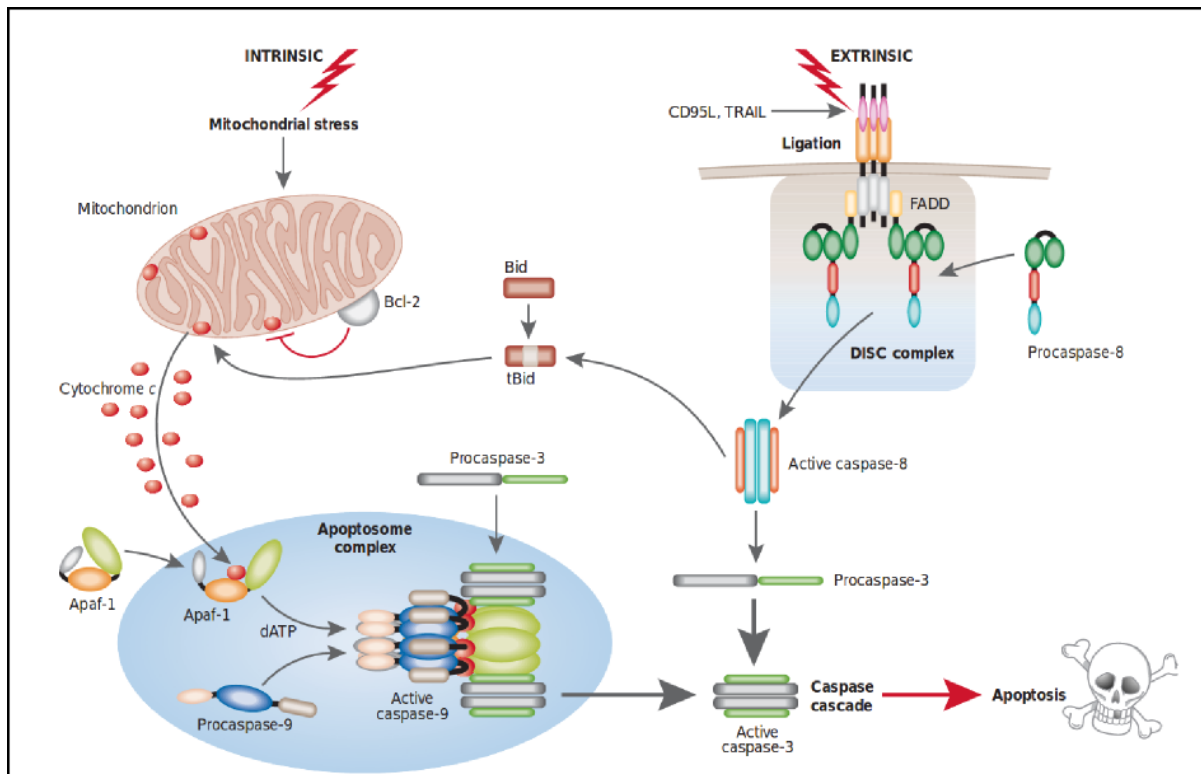


Figure 5: Les voies d'induction de l'apoptose

Deux voies apoptotiques majeures sont illustrées: une voie passant par l'activation du récepteur de mort («extrinsèque») et la voie mitochondriale («intrinsèque»). L'activation des récepteurs de mort entraîne une activation rapide de la caspase 8 (initiatrice) après son recrutement à un complexe récepteur-ligand trimérisé (DISC) à travers la molécule adaptatrice (FADD). Dans la voie intrinsèque, l'apoptose induite par le stress entraîne une modification de la perméabilité des mitochondries et la libération de protéines telles que le cytochrome c, à partir de l'espace inter-membranaire mitochondrial. Une fois libéré, le cytochrome c se lie à l'oligomère de protéines Apaf1, ce qui entraîne la formation du complexe apoptosome (cyt c-Apaf1-caspase 9) et l'activation de la caspase exécutive 3. Figure tirée de (**MacFarlane and Williams 2004**).

La perméabilisation des mitochondries au cours de l'apoptose constitue donc un événement primordial pour l'initiation du processus. Elle est essentiellement régulée par les protéines de la famille de Bcl-2.

B.2. Les protéines de la famille Bcl-2:

a) Découverte du membre fondateur:

Le gène *B cell lymphoma 2* (*Bcl-2*), membre fondateur de la famille a été découvert en 1984 suite à une translocation chromosomique (14;18) fréquemment retrouvée dans les cancers lymphoïdes dérivant de lymphocytes B. Ce gène anti-apoptotique est exprimé par de nombreux types cellulaires et surtout par les lymphocytes B et T (Tsujimoto et al. 1984) (figure 6).

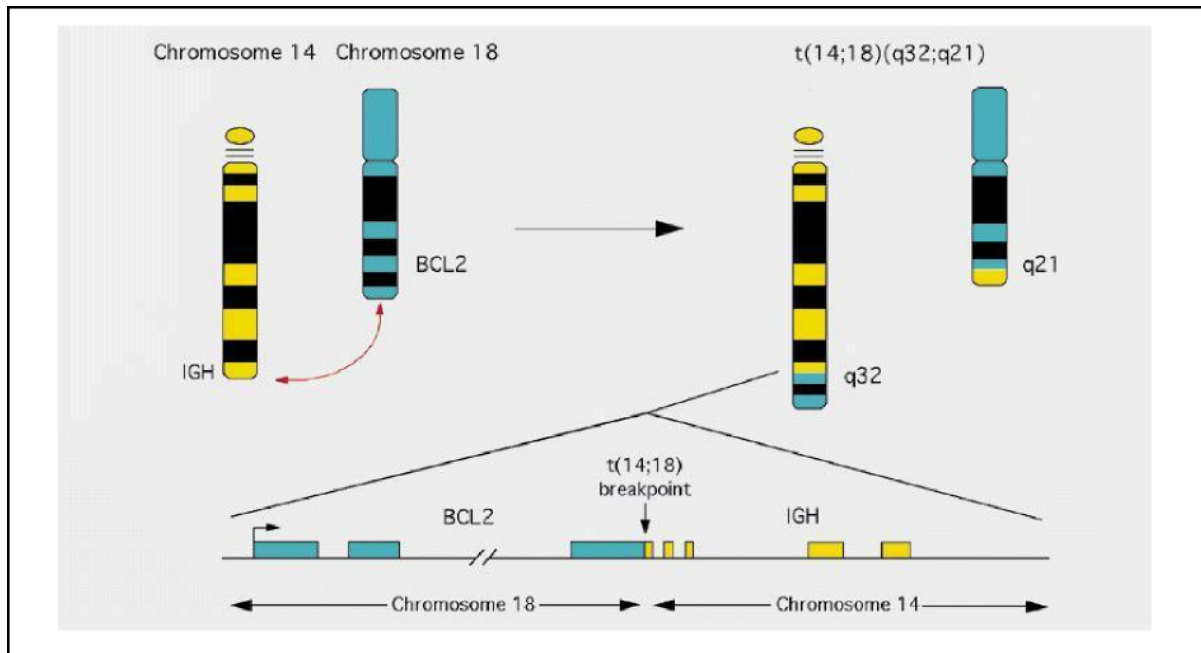


Figure 6: Illustration de la mutation par translocation du gène Bcl-2

Le gène Bcl-2 situé sur le chromosome 18 est transloqué directement sur le chromosome 14 . Cette translocation place Bcl-2 sous dépendance du promoteur fort des chaînes lourdes d'immunoglobuline(IgH).

Figure issue de <http://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsbcl2.html>

b) Définition des motifs BH:

Un alignement des séquences des membres de la famille de Bcl-2 a conduit à la mise en évidence de séquences conservées d'acides aminés nommées BH pour « Bcl-2 Homology ». Ces motifs sont numérotés de BH1 à BH4 par ordre de découverte. Ces protéines possèdent de un à quatre motifs BH, appelés abusivement «domaines» dans la littérature. En biologie structurale, un domaine définit une portion de protéine capable d'auto-assemblage, quels que soient les éléments de structure secondaire le composant. Étant donné que les séquences BH ne font que quelques résidus de long et n'ont pas cette propriété d'auto-assemblage, nous emploierons le terme «motifs BH» comme recommandé par A. Aouacheria (Aouacheria et al. 2015).

c) Classification structurale et fonctionnelle:

Une classification structurale et fonctionnelle permet de subdiviser les membres de la famille Bcl-2 en 3 groupes: les protéines anti-apoptotiques, les protéines pro-apoptotiques à multi-motifs, les protéines pro-apoptotiques BH3-seulement (figure 7).

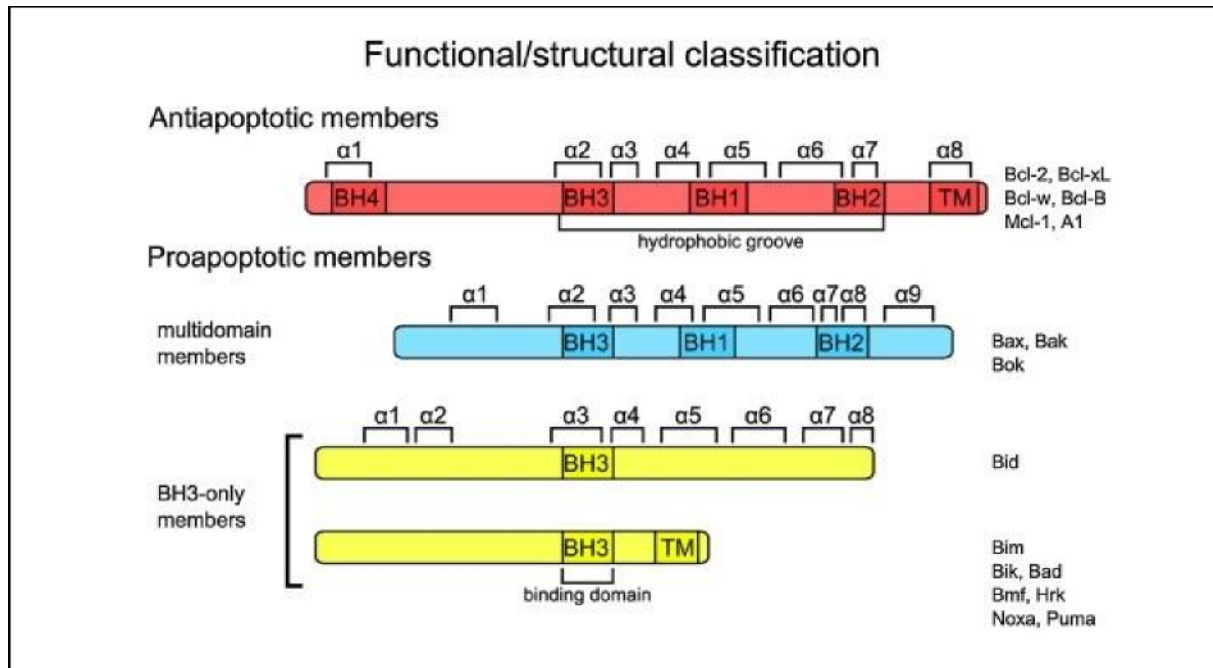


Figure 7: Classification structurale et fonctionnelle des membres de la famille Bcl-2

Les membres de cette famille sont définis par deux critères, l'un fonctionnel (activité anti- ou pro-apoptotique), et l'autre structural, correspondant à la présence de un à quatre motifs d'homologie à Bcl-2 appelés motifs BH (de BH1 à BH4 dans l'ordre de leur découverte). Figure tirée de **(Renault, Dejean, and Manon 2017)**.

c.i) Les membres pro-apoptotiques à multi-motifs:

Ce sous-groupe comprend Bax, Bak et Bok. Ces protéines possèdent les 3 motifs BH (BH1, BH2 et BH3). En l'absence de signaux de mort, Bax est localisé dans le cytosol sous forme monomérique inactive, tandis que Bak et Bok résident dans la membrane externe mitochondriale où elles sont maintenues sous forme inactive par les membres anti-apoptotiques. Elles sont chacune capable de modifier la perméabilité de la membrane mitochondriale externe, assurant le relargage du cytochrome c dans le cytosol et donc l'induction de l'apoptose (Dejean et al. 2005).

Bax est la protéine la plus étudiée, et l'état actuel des connaissances est résumé ci-dessous.

La façon dont Bax induit la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe n'est toujours pas résolue. Plusieurs hypothèses se sont succédées pour expliquer la perméabilisation mitochondriale.

La première hypothèse a été que l'apoptose provoque l'ouverture d'un canal protéique appelé PTP (Permeability Transition Pore): la composition putative de ce pore impliquait des protéines et canaux (VDAC) de la membrane externe en continuité avec des protéines et canaux (ANC) de la membrane interne. Aujourd'hui, cette hypothèse est réfutée depuis l'étude qui a montré que l'absence des protéines composant le PTP n'affecte pas l'exécution de l'apoptose, mais plutôt celle de la nécrose (Nakagawa et al. 2005). De plus, aujourd'hui, il semble que l'ATP synthase soit en fait le constituant du PTP. Il a été montré que la pompe F_1F_0 -ATP synthase peut réversiblement subir une transition dépendante des ions Ca^{2+} qui permet la transition de perméabilité de la membrane interne mitochondriale (Bernardi et al. 2015).

Une autre hypothèse reposant sur les analyses structurales de Bax, Bcl-2 et Bcl- x_L proposait que Bax soit capable de former des pores dans les membranes. Des études électrophysiologiques ont effectivement montré l'existence d'un canal appelé MAC (Mitochondrial Apoptosis-induced Channel), présent seulement quand Bax est exprimé, régulable par Bcl- x_L , et dont la taille est compatible avec le passage du cytochrome c (Pavlov et al. 2001). Cette hypothèse reste toujours d'actualité.

Enfin une troisième hypothèse envisage que Bax soit capable de déstabiliser les lipides de la membrane mitochondriale externe pour stabiliser la formation d'un pore lipidique (Renault and Manon 2011). Cette hypothèse reste toujours d'actualité.

c.ii) Les membres pro-apoptotiques à BH3-seulement:

Les membres BH3-seulement possèdent un seul motif BH, le motif BH3. Il en existe 8 à l'heure actuelle (Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, Puma). Les protéines Bid et Bim sont appelées "activateurs", car ils activent directement Bax et Bak en induisant des changements conformationnels et leur adressage dans les mitochondries. A l'inverse, il existe d'autres protéines appelées dé-répresseurs comme Bad et Noxa, qui ne peuvent pas lier directement à Bax et Bak mais agissent indirectement en neutralisant des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl- x_L (Elkholi, Floros, and Chipuk 2011) (figure 8).

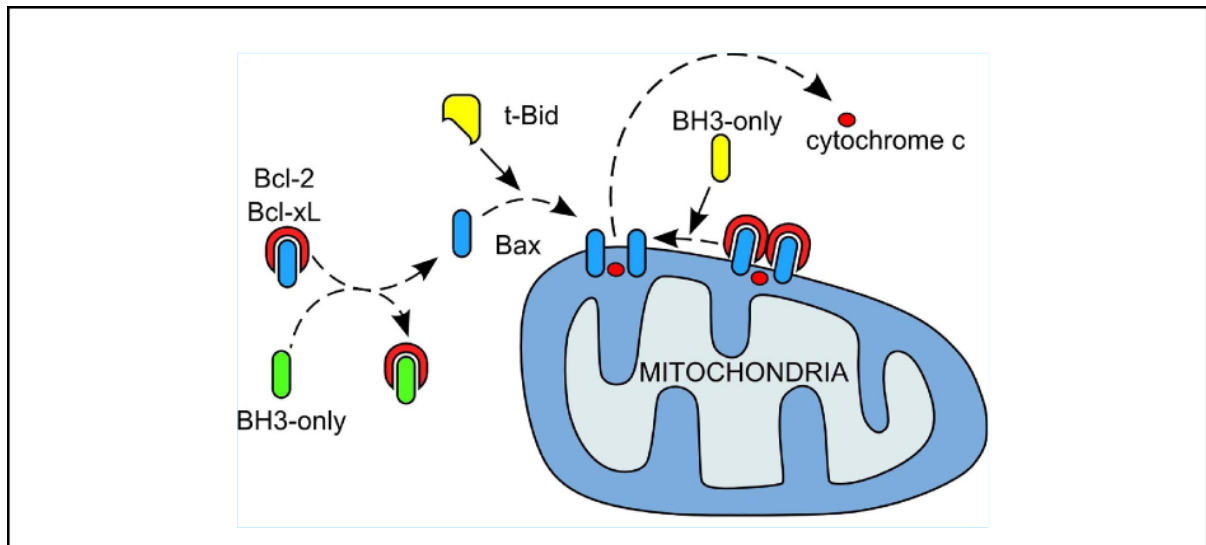


Figure 8: Mécanisme d'activation de Bax par les autres membres de la famille Bcl-2

En conditions non-apoptotiques, Bax (bleu) est séquestrée dans le cytosol par les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L (rouge). Après un signal de mort, les protéines inhibitrices BH3-seulement (telles que Bad, en vert) piègent les protéines anti-apoptotiques, induisant ainsi la libération de Bax. Les protéines activatrices BH3-seulement (telles que tBid, en jaune) permettent l'adressage / insertion / oligomérisation de Bax dans la membrane externe mitochondriale. Figure tirée de **(Renault and Manon 2011)**.

c.iii) Les protéines anti-apoptotiques:

Les protéines anti-apoptotiques de cette famille sont Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, Bcl-w, Bfl-1, Bcl-B. Les plus étudiées sont Bcl-2, Bcl-x_L (Bcl-2 related gene isoform) et Mcl-1 (myeloid cell leukemia 1) (Boise et al. 1993).

Ces protéines sont localisées majoritairement dans la membrane externe mitochondriale et le cytosol (Jeong et al. 2004) et minoritairement dans le réticulum endoplasmique (Chen-Levy, Nourse, and Cleary 1989) et au niveau de l'enveloppe nucléaire par l'intermédiaire de leur segment transmembranaire (Alnemri et al. 1992).

Du point de vue structural, ces protéines se caractérisent par la présence de 4 motifs BH (BH1,2,3 et 4). Le motif BH4 semble être un élément clef dans la fonction de ces protéines. En effet, des études ont montré que sa délétion peut diminuer les fonctions anti-apoptotiques de Bcl-2 et Bcl-x_L (Huang, Adams, and Cory 1998).

En 1996, il a été montré par cristallographie et par résonance magnétique nucléaire (RMN) que ces protéines (Bcl-2, Bcl-x_L et Mcl-1) disposent d'une boucle flexible non structurée qui relie les motifs BH3 et BH4 (Muchmore et al. 1996) (Czabotar et al. 2007) (figure 9).

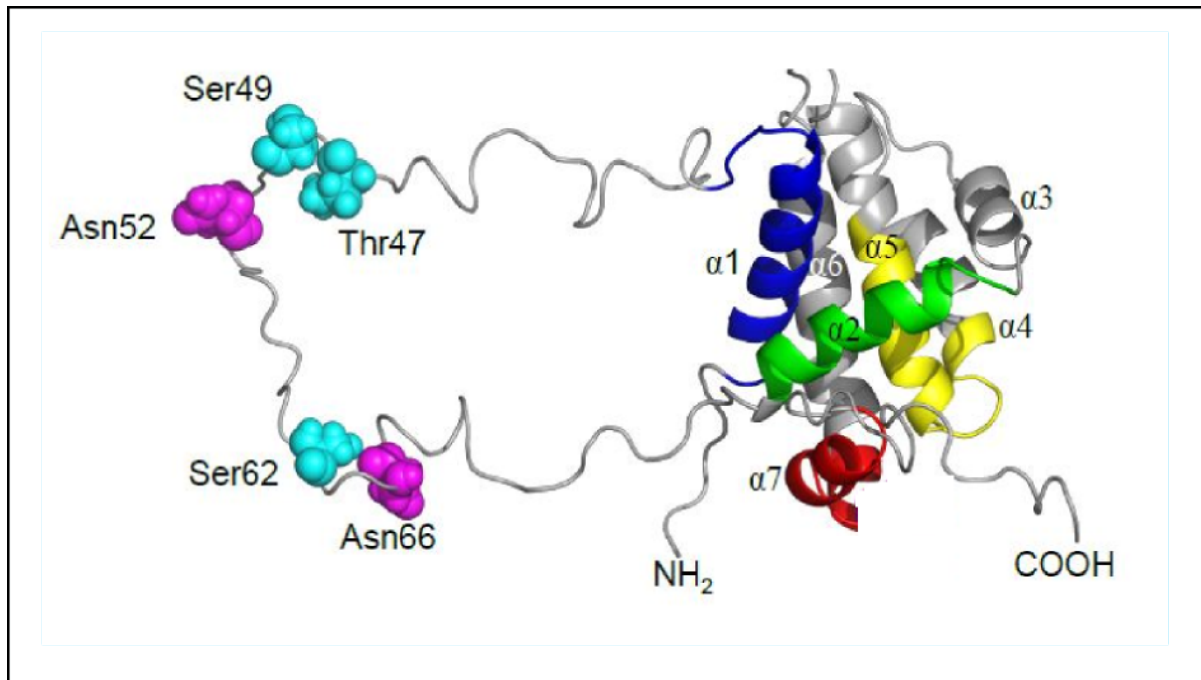


Figure 9: Structure tri-dimensionnelle de Bcl-X_L résolue par cristallographie

Les 4 motifs BH en formes d'hélices α : BH1 (en jaune), BH2 (en rouge), BH3 (en vert) et BH4 (en bleu) sont représentés. En plus, Bcl-x_L dispose d'une grande boucle flexible non structurée sur laquelle les résidus Asn52, Asn66, Ser62, Ser49 et Thr47 sont placés (**Beaumatin et al. 2017**)

D'un point de vue fonctionnel, ces protéines jouent un rôle anti-apoptotique en neutralisant les membres pro-apoptotiques comme Bax et Bak afin de prévenir la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et l'induction de l'apoptose (Renault, Dejean, and Manon 2017) (figure 9). Les motifs BH1, BH2 et BH3 de Bcl-2 et Bcl-x_L forment un sillon hydrophobe dans lequel vient interagir le motif BH3 des protéines pro-apoptotiques à multi-motifs (Bax, Bak, et Bok). Cette interaction neutralise les membres pro-apoptotiques. Par contre, lors de l'induction de l'apoptose, cette interaction est rompue par les protéines à BH3-seulement (Bad, Noxa), ce qui libère Bax et Bak.

Les protéines anti-apoptotiques sont impliquées dans la survie des cellules saines et cancéreuses. Pour résister à l'apoptose, les cellules cancéreuses augmentent l'expression des facteurs de survie comme Bcl-2 et Bcl-x_L et diminuent l'expression des facteurs de mort comme Bax et Bak (Hanahan and Weinberg 2000).

L'homologie de structure entre Bcl-2 et Bcl-x_L évoque des redondances dans les fonctions, mais il est apparu dans plusieurs travaux qu'elles ont des rôles différents selon les tissus d'un organisme.

Des études ont montré que Bcl-x_L se distingue de Bcl-2 en fonction des inducteurs d'apoptose (comme les lésions d'ADN, les radiations U.V...). Des travaux conduits sur des lignées cellulaires issues de cancer du sein montrent que Bcl-x_L est 10 fois plus efficace à inhiber l'apoptose que Bcl-2 (Fiebig et al. 2006). Par ailleurs, des souris K.O pour Bcl-2 restent viables mais avec des défauts notamment dans le système lymphoïde résultant en une apoptose des lymphocytes tandis que des souris KO pour Bcl-x_L meurent au 13ème jour du développement embryonnaire (Veis et al. 1993).

Une autre différence importante tient au fait que, parmi les membres de la famille Bcl-2, seul Bcl-x_L peut subir une modification post-traductionnelle appelée "déamidation" dans les cellules en conditions contrôles (Beaumat et al. 2016) ou exposées à des dommages d'ADN (Poruchynsky et al. 1998). Nous parlerons largement de cette modification dans la suite de ce chapitre.

Donc, nous avons vu que Bcl-x_L et Bcl-2 exercent toutes les deux des fonctions anti-apoptotiques qui leur permettent de réguler la survie cellulaire par des mécanismes sensiblement différents. Depuis quelques années, il a été montré que ces protéines peuvent aussi établir des interactions en dehors des protéines de la famille de Bcl-2, et que cela leur permet de réguler la survie en contrôlant d'autres processus cellulaires que l'apoptose. Nous parlerons dans la suite de ce chapitre des différentes fonctions de Bcl-x_L et son mode régulation afin de promouvoir la survie cellulaire.

C. Bcl-x_L et survie cellulaire:

C.1. Carte d'identité de Bcl-x_L:

La protéine Bcl-x_L est issue de l'épissage alternatif du gène *Bcl-x*. En effet, celui-ci peut conduire à l'expression de l'isoforme longue Bcl-x_L qui protège de l'apoptose et l'isoforme courte Bcl-x_s, qui provoque l'apoptose. Le promoteur du gène *Bcl-x* contient des motifs de fixation de plusieurs facteurs de transcription: Sp1, AP-1, Oct1, Ets, Rel/NF-kB, STATs et GATA-1 parmi lesquels 3 familles de facteurs de transcription (STATs, Rel/NF-kB, et ETs) se sont avérées avoir un rôle important dans la régulation de l'expression du gène Bcl-x (Aouacheria, Brunet, and Gouy 2005).

Bcl-x_L est une protéine anti-apoptotique composée de 233 acides aminés, et exprimée majoritairement dans le tissu hématopoïétique et dans le système nerveux central (SNC) (Motoyama et al. 1995). Comme beaucoup d'autres protéines, Bcl-x_L peut être la cible de modifications post-traductionnelles qui jouent un rôle dans la régulation de sa fonction anti-apoptotique. Nous verrons dans la suite comment cette protéine globulaire formée de 8 hélices alpha subit des modifications post-traductionnelles qui touchent sa boucle non structurée reliant le BH3 au BH4.

a) Modifications post-traductionnelles (PTM):

La fonction de Bcl-x_L est régulée par 3 types de modifications post-traductionnelles:

- **Clivage:** En conditions apoptotiques, Bcl-x_L peut être clivée par la caspase 3 après le résidu aspartate 61, ce qui la libère de son motif BH4 du côté N-terminal et induit l'apoptose des cellules. Donc, le clivage de Bcl-x_L amplifierait la réponse apoptotique des cellules (Clem et al. 1998).

- **Phosphorylation:** Lorsque les cellules sont exposées à un traitement déstabilisant les microtubules, Bcl-x_L est phosphorylée sur les sérine 49, 62 (situées dans sa boucle non structurée) par la kinase SAPJ/JNK (stress activated protein kinase/ c Jun N terminal kinase). Cela restreint sa capacité à interagir avec des protéines pro-apoptotiques et facilite l'induction de l'apoptose (Upreti et al. 2006). Il a été également montré que Bcl-x_L peut être phosphorylée sur les résidus thréonine

47 et 115 abolissant là encore ses fonctions anti-apoptotiques.

- **Déamidation:** c'est une réaction chimique qui touche certains résidus asparagines et glutamines. Nous parlerons en détail dans la suite de ce chapitre de la façon dont elle affecte les fonctions de Bcl-x_L.

Toutes ces PTM modifient les fonctions anti-apoptotiques de Bcl-x_L, Mais depuis quelques années, les données s'accumulent pour montrer que Bcl-x_L peut réguler la survie cellulaire par d'autres mécanismes que la régulation de l'apoptose.

b) Fonctions non apoptotiques de Bcl-x_L:

A coté de sa capacité à inhiber l'apoptose, Bcl-x_L peut assurer d'autres fonctions cellulaires:

1) Elle peut moduler l'homéostasie calcique en empêchant le flux calcique au niveau du réticulum endoplasmique par interaction avec le récepteur de l'IP3 et au niveau de la membrane externe mitochondriale par interaction avec VDAC (Bonneau et al. 2013) pour revue.

2) Elle peut moduler le phénomène fission/fusion mitochondriale en augmentant la longueur des mitochondries dans les neurones (Berman et al. 2009).

3) Elle est capable de stimuler la respiration mitochondriale en interagissant avec l'ATP synthase au niveau de la membrane mitochondriale interne (Alavian et al. 2011). Ce point sera re-discuté plus tard dans la partie "Résultats".

4) Elle régule l'autophagie: la fonction autophagique de Bcl-x_L est un axe de recherche développé depuis près de 10 ans dans le laboratoire, et le paragraphe suivant est consacré à la description de l'état actuel des connaissances (Priault et al. 2010; Maiuri et al. 2007).

C.2. Rôle de Bcl-x_L dans l'autophagie:

a) Autophagie: Découverte, définition et mécanisme:

a.i) Découverte:

Au cours des années 1950, le processus d'autophagie (se manger soi-même) a été découvert comme une voie majeure de dégradation des constituants cellulaires

par les lysosomes chez les eucaryotes supérieurs, et par la vacuole chez les levures et les plantes. La première observation du phénomène autophagique a été réalisée par microscopie électronique à transmission (TEM) de cellules de canal rénal de souris. Les "vacuoles" et "corps denses" (appelés aujourd'hui autophagosomes et autophagolysosomes) caractéristiques du processus ont été décrits. La TEM était alors un outil majeur pour identifier des vacuoles autophagiques (Clark 1957).

Dans les années 60, la caractérisation physiologique de l'autophagie a permis de montrer qu'elle était induite par des carences nutritives, et inhibée par la restauration d'un niveau nutritif normal (Ashford and Porter 1962).

Alors que ces premières études ciblaient principalement les caractéristiques morphologiques de l'autophagie, il a fallu attendre les années 1990 et les travaux réalisés par l'équipe de **Yoshinori Ohsumi** sur la levure pour aboutir à la caractérisation génétique du processus (Prix Nobel de Médecine 2016). A ce jour, une quarantaine de gènes de la famille ATG a été identifiée, et des études ont montré que la plupart de ces gènes sont conservés au cours de l'évolution, chez tous les organismes eucaryotes testés depuis les levures jusqu'aux mammifères, en passant par la drosophile, les plantes, et les nématodes. Ces gènes sont impliqués dans la formation des autophagosomes, dans leur maturation (allongement, fermeture, fusion lysosomiale ...) ou dans la régulation de l'amplitude de la réponse autophagique.

a.ii) Définition:

L'état actuel des connaissances permet de définir 3 types distincts d'autophagie:

- La macro-autophagie, appelée couramment autophagie, par laquelle les autophagosomes dégradent les constituants cellulaires de façon non sélective.
- La micro-autophagie par laquelle les lysosomes ou les vacuoles prélèvent de façon non sélective des éléments cellulaires par invagination.
- l'autophagie médiée par les chaperonnes (Chaperone Mediated Autophagy = CMA). Ce type concerne spécifiquement des protéines possédant le motif pentapeptidique KFERQ, leur transport à travers la membrane lysosomale, et leur dégradation.

Ayant travaillé essentiellement sur la macro-autophagie, je ne parlerai que de l'autophagie qui requiert la formation d'autophagosomes.

L'autophagie est définie comme un processus de dégradation intracellulaire, complémentaire du protéasome, qui permet la séquestration des constituants cellulaires et des organites dans des vésicules spécialisées appelées "autophagosomes" dont la taille est de 300-900 nm dans la levure, et 500-1500 nm dans les cellules mammifères. Formé dès que les cellules sont soumises à un stress (par exemple une carence nutritive), l'autophagosome transporte du matériel cellulaire vers les lysosomes, et leur fusion forme des "autophagolysosomes". Le contenu des autophagosomes est dégradé par les enzymes et les hydrolases lysosomales. En conditions de stress, l'autophagie alimente la cellule par recyclage des substrats dégradés, et permet la synthèse de macromolécules essentielles à la survie (Klionsky and Emr 2000) (figure 10).

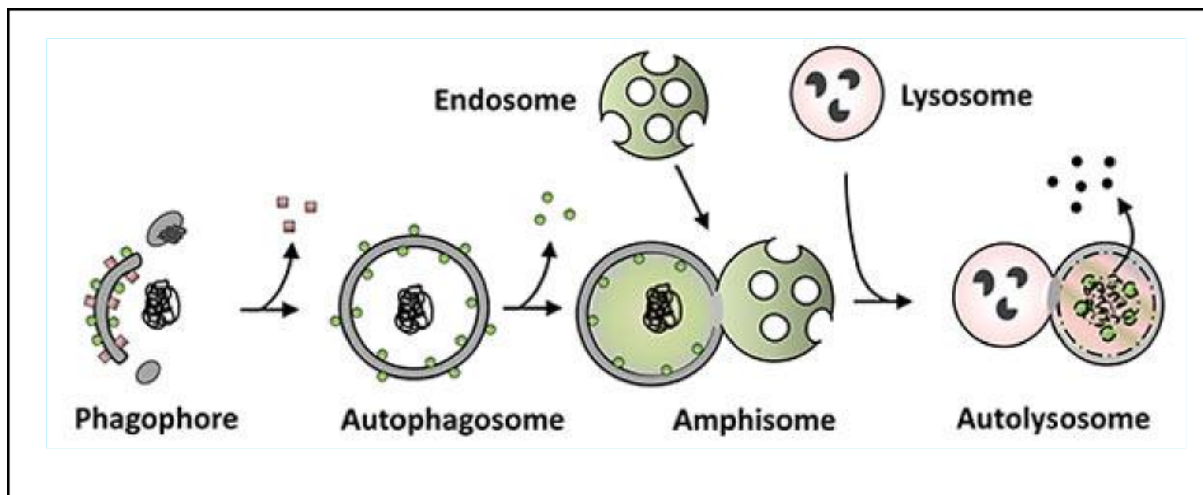


Figure 10: Principales étapes de l'induction de l'autophagie

L'autophagie est initiée par la formation du phagophore qui séquestre du matériel cytoplasmique et se referme en formant un autophagosome. Ce dernier va fusionner avec la vacuole ou le lysosome pour dégrader et recycler le chargement du corps autophagique (*Klionsky and Emr 2000*).

a.iii) Mécanismes d'induction de l'autophagie:

- Initiation de la formation des autophagosomes:

Durant cette étape, certaines protéines ATG se retrouvent localisées sur une structure lipidique appelée «phagophore». L'origine des lipides constituant le phagophore est débattue, de même que l'origine des lipides servant ensuite à

l'élongation de la membrane autophagosomale. Des études ont montré que ces membranes semblent pouvoir, selon les conditions et les types cellulaires, recevoir la contribution de nombreux compartiments membranaires: le réticulum endoplasmique (Hayashi-Nishino et al. 2009), la mitochondrie (Hailey et al. 2010), la membrane nucléaire (English, Chemali, and Desjardins 2009), l'appareil de golgi (Itoh et al. 2008) ou encore la membrane plasmique (Ravikumar et al. 2010).

L'initiation de l'autophagie nécessite un grand nombre d'acteurs groupés en plusieurs complexes qui interagissent entre eux afin de former le phagophore.

- le complexe ULK (Unc-51-like-kinase), constitué de ULK 1/2, ATG13, ATG 101 et ATG17. L'état de phosphorylation de ce complexe est contrôlé directement par le complexe kinase mTORC1, et lorsqu'il est hypophosphorylé (mTORC1 inactif), il est transloqué au site d'initiation des autophagosomes, où il active le complexe PI3K.

- Le complexe PI3K de classe III constitué de Beclin 1, p150, ATG14 et VPS34 (vacuolar protein sorting). Le complexe PI3K produit du PI3P (Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphate). Sa présence permet de recruter au phagophore les protéines ATG qui ont une haute affinité pour ce lipide (Mizushima et al. 1998).

- Élongation:

L'élongation de la membrane autophagosomale est régulée par deux systèmes de conjugaison similaires aux systèmes d'ubiquitination appelés « Ubiquitin-like conjugaison system » qui sont : le système de conjugaison ATG12-ATG5, et le système de conjugaison LC3-PE (Light Chain 3-Phosphatidyl-ethanolamine).

- Le système ATG5-ATG12: La liaison covalente d'ATG12 à ATG5 nécessite une activation de deux enzymes ATG7 (E1) et ATG10 (E2). Le complexe ATG12/ATG5 formé s'associe à ATG16 pour constituer un complexe multimérique qui est recruté à la membrane autophagosomale. Ce complexe se dissociera de l'autophagosome avant la fermeture de celui-ci (Mizushima et al. 1998).

- Le système de conjugaison LC3-PE :

Dans ce système, LC3 (orthologue de la protéine ATG8 de la levure) est activée par ATG7 (E1), transférée sur ATG3 (E2), et enfin conjuguée à une molécule de phosphatidyl éthanolamine (PE), donnant naissance au conjugué LC3-PE ou LC3-II. LC3-II est insérée dans les feuillettes externes des membranes externes et internes

du phagophore. La fraction de LC3-II située sur la surface interne sera dégradée après la fusion avec le lysosome, alors que la fraction exposée au cytosol sera déconjuguée pour être réutilisée. LC3-II est le marqueur le plus utilisée pour mesurer le flux autophagique (Geng and Klionsky 2008) (figure 11).

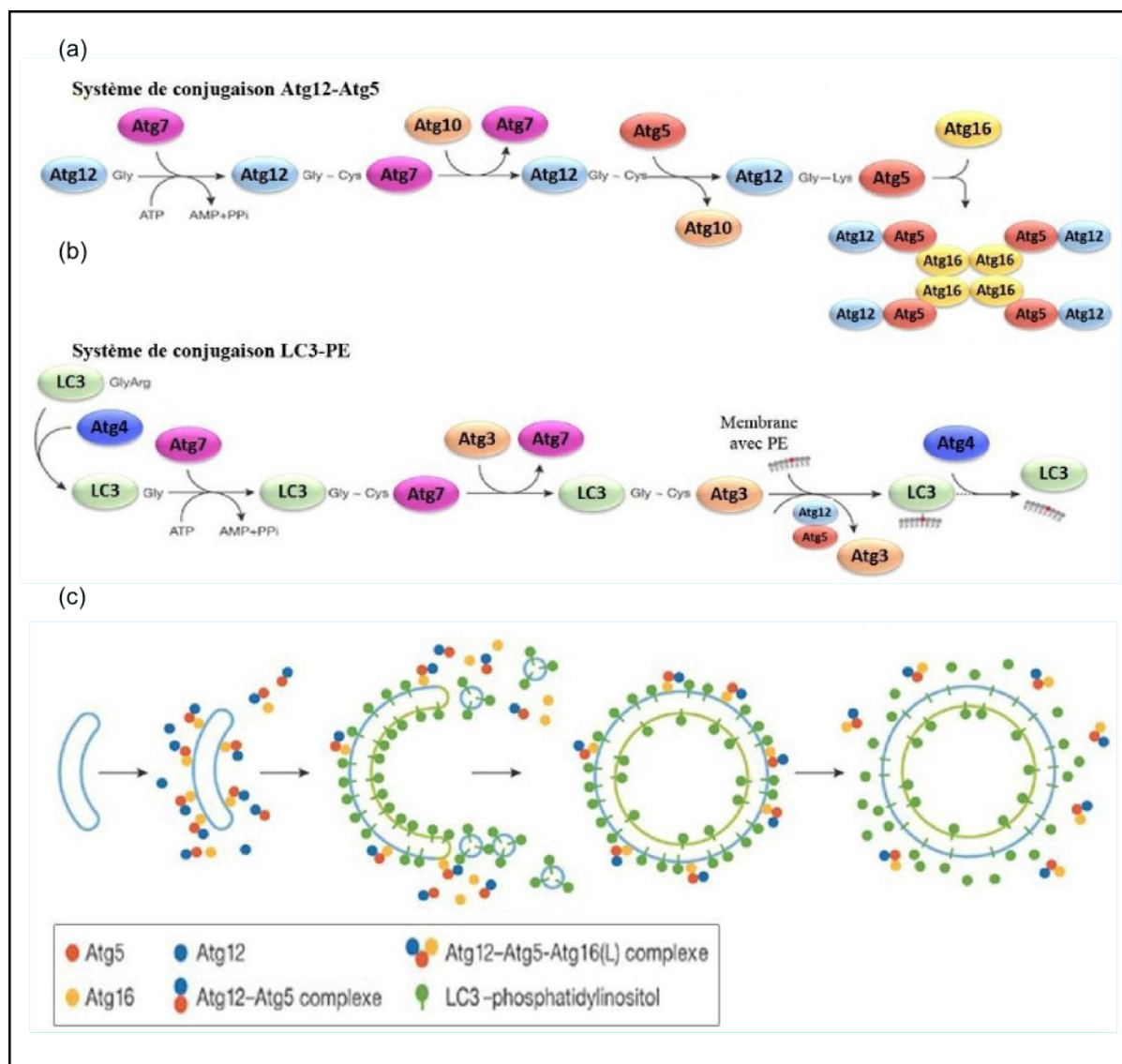


Figure 11: Mécanisme moléculaire de l'étape d'élongation et de la formation d'autophagosome

Les figures (a) et (b) représentent l'activation des protéines afin de former les systèmes de conjugaison d'ATG12-ATG5, et de LC3-PE.

La figure (c) montre le mécanisme de la formation des vésicules autophagiques par les 2 systèmes de conjugaison ATG12-ATG5 et LC3-PE. Le complexe ATG12-ATG5-ATG16 est situé sur la face externe du phagophore et permet le recrutement du LC3-II qui est nécessaire à l'expansion du phagophore. Lors de la formation de l'autophagosome, le complexe ATG12-ATG5-ATG16 se dissocie, et ATG4 libère par protéolyse le LC3 présent sur la face externe. Figure tirée de (Geng and Klionsky 2008).

- Maturation des autophagosomes:

La maturation des autophagosomes se termine par la fermeture de la vésicule autophagosomale. Enfin, la fusion avec le lysosome formera un autophagolysosome qui peut dégrader son contenu. Il peut exister une étape intermédiaire facultative de fusion entre un autophagosome précoce et une vésicule endosomale. Les autophagosomes acquièrent des pompes à protons lorsqu'elles sont fusionnées avec les vésicules endosomales, ce qui permet l'acidification des autophagosomes. Cette dernière est importante dans la maturation car les hydrolases lysosomales sont des enzymes dont l'activité est permise à pH acide.

- Terminaison du processus et reformation des lysosomes:

L'autophagie se termine par la dégradation de tous les constituants cellulaires dans les autolysosomes pour synthétiser des substrats et des macromolécules (aa, acides nucléiques,..) essentiels à la survie cellulaire. Pour continuer à maintenir une nouvelle activité autophagique, les lysosomes consommés par fusion avec les autophagosomes génèrent des tubules et des vésicules proto-lysosomales qui finissent par mûrir et reformer des lysosomes fonctionnels (Yu et al. 2010).

a.iv) Fonctions de l'autophagie:

L'autophagie a été initialement caractérisée comme un processus essentiel à l'homéostasie et la survie cellulaire lorsque les cellules sont soumises à des conditions de stress. Mais depuis, il a été montré que l'autophagie est impliquée dans des processus physiologiques notamment la réponse immunitaire (présentation des antigènes et élimination des pathogènes). Elle peut aussi avoir un rôle de remodelage puisque elle est induite durant certains stades du développement et est nécessaire à la disparition des tissus embryonnaires (Mizushima and Levine 2010). De plus, les dérégulations de l'autophagie jouent un rôle dans plusieurs pathologies comme les maladies neurodégénératives et le cancer. La découverte de la protéine Beclin-1 connue comme un suppresseur de tumeur et identifiée comme un partenaire physique de Bcl-2 a été un élément essentiel pour comprendre les liens moléculaires entre l'apoptose et l'autophagie (Levine, Sinha, and Kroemer 2008).

b) Controverse sur les fonctions de Bcl-x_L:

En 2005 et 2007, les équipes de B. Levine et G. Kroemer ont respectivement montré que Bcl-2 et Bcl-x_L interagissent avec Beclin-1 et l'empêchent ainsi de stimuler le complexe PI3KCIII pour l'initiation de l'autophagie (Levine, Sinha, and Kroemer 2008). Cependant, les études de notre équipe sont en désaccord avec l'étude originelle et montrent que Bcl-x_L ou Bcl-2 joue un rôle pro-autophagique dans les lignées HCT 116, mais par des mécanismes différents: Le rôle pro-autophagique de Bcl-2 dépendrait de sa capacité à interagir avec un partenaire à BH3 (potentiellement Beclin-1). Par contre, Bcl-x_L semble exercer un effet autophagique plus fort que Bcl-2, et stimule la formation des autophagosomes indépendamment d'une interaction avec un partenaire à BH3, donc indépendamment de Beclin-1 (Priault et al. 2010).

Ces contradictions observées dans la littérature doivent être résolues. Dans notre laboratoire, nous avons vu que dans des cellules HCT 116 exposées à une carence nutritive, Bcl-x_L régule deux étapes de l'autophagie: la formation des autophagosomes et leur maturation. Ces fonctions sont différentes et requièrent des partenaires différents. Durant cette thèse, nous nous sommes notamment intéressés à caractériser du point de vue moléculaire comment Bcl-x_L assure ses fonctions autophagiques, en se focalisant sur les conséquences fonctionnelles provoquées par la modification post-traductionnelle par déamidation, à laquelle Bcl-x_L est éligible.

C.3. Déamidation de Bcl-x_L:

a) Définition de la déamidation:

La déamidation est une modification post-traductionnelle qui affecte certains résidus asparagines et glutamines des protéines et les transforme en aspartates et glutamates respectivement. Chez les eucaryotes supérieurs, elle est considérée comme une réaction chimique non enzymatique car à l'heure actuelle, aucune enzyme n'a été mise en évidence pour catalyser la déamidation des résidus asparagines.

a.i) Importance biologique:

La déamidation est un processus biologique qui affecte un pourcentage très élevé de protéines (N. E. Robinson and Robinson 2001c). Cette déamidation pourrait modifier la structure de ces protéines, moduler leurs durées de vie et leurs fonctions,

d'où l'importance d'être étudiée. La déamidation est un processus spontané très lent. La demi-vie à pH neutre et à 37 °C est estimée de moins de 1-500 jours pour les asparagines à plus de 100 à 500 jours pour les glutamines (N. E. Robinson and Robinson 2001a). Il est important de mettre ces vitesses de réaction en balance avec la demi-vie biologique des protéines, pour raisonner sur l'importance physiologique de la déamidation. Se basant sur ces faits, il est légitime en biologie, de se focaliser sur la déamidation des résidus Asn plutôt que Gln; c'est ce qui a été fait pour Bcl-x_L comme nous le verrons plus tard.

a.ii) Probabilité de la déamidation:

En 2001, Robinson et al. ont déterminé les différents facteurs pouvant stimuler la déamidation des protéines. Ils ont montré une dépendance aux températures élevées, à l'augmentation de la force ionique des tampons contenant les protéines, et aux pH extrêmes (N. E. Robinson and Robinson 2001b).

En 2004, Robinson et al. ont aussi montré une corrélation directe entre la séquence d'acides aminés entourant l'asparagine et la vitesse de déamidation. Une asparagine a une durée de vie d'autant plus courte (et donc une probabilité de déamidation plus grande) qu'elle est entourée de résidus de petite taille comme la glycine. L'absence d'encombrement stérique dû à l'absence de la chaîne latérale de la glycine favorise la déamidation.

Enfin, un dernier facteur qui influence la déamidation est la structure secondaire et tertiaire de la protéine. Des études menées sur la structure tri-dimensionnelle des protéines montrent qu'une asparagine placée dans un environnement non structuré a une plus grande susceptibilité à être déamidée (N. E. Robinson et al. 2004).

a.iii) Mécanisme réactionnel:

La déamidation des résidus asparagines d'une protéine est une réaction chimique non enzymatique qui aboutit à la formation des résidus aspartates et isoaspartates dans un ratio 1:3 selon le mécanisme présenté dans la figure 12. Cette réaction se fait par une perte de la fonction amide, libération d'une molécule ammoniacque, et la production d'un groupement carboxylique. Comme le montre la figure, cette réaction passe par un intermédiaire imide cyclique nommé succinimide qui est formé entre la

chaîne latérale du résidu asparagine et le groupement NH de l'acide aminé suivant. L'ouverture de ce cycle par hydrolyse spontanée produit un mélange de 70-85 % d'iso-aspartates et de 15-30 % d'aspartates (Geiger and Clarke 1987).

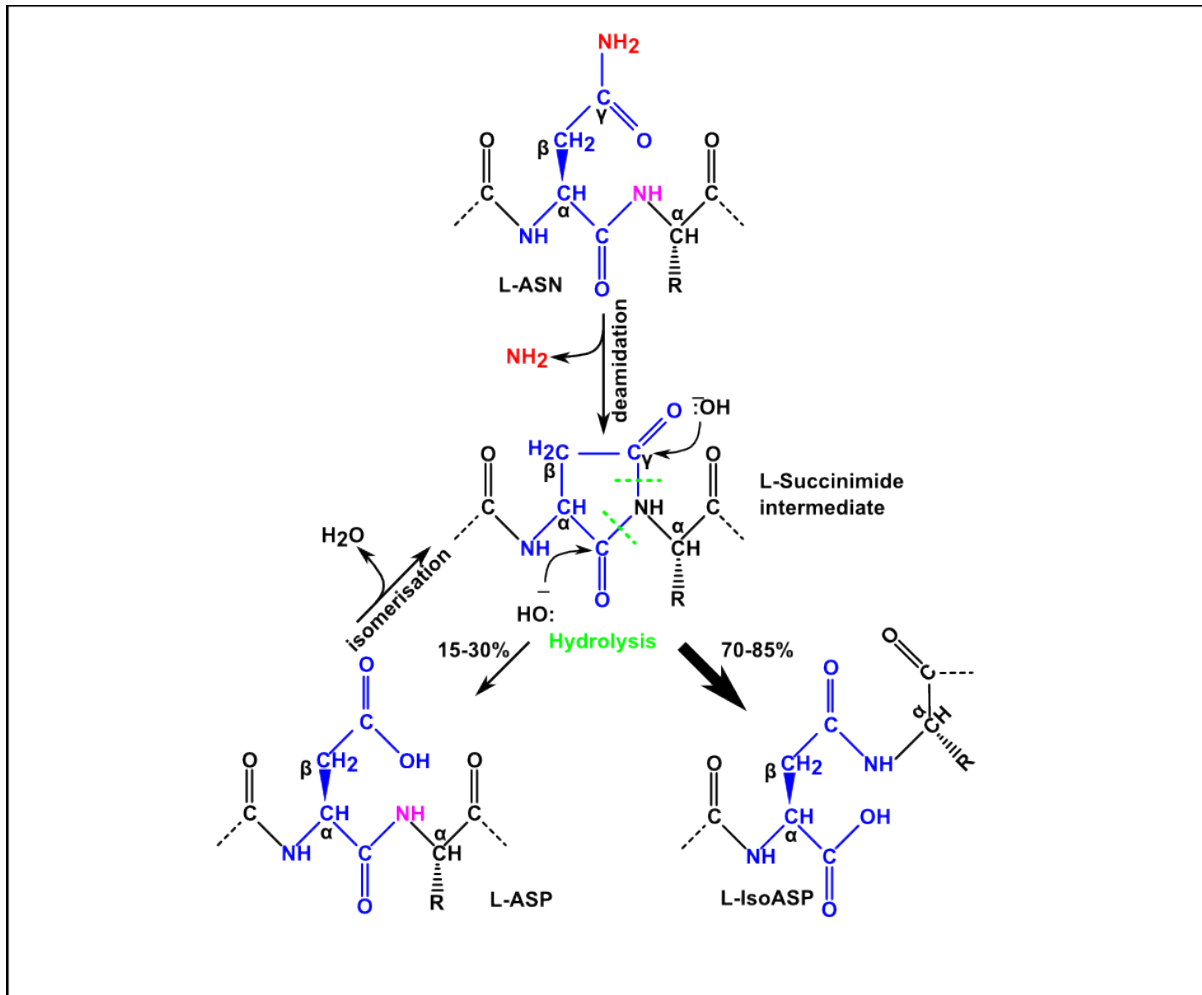


Figure 12: Représentation de la réaction chimique de la déamidation du résidu asparagine

Cette réaction se fait par la perte de la fonction amide (NH₂) et la libération d'une molécule ammoniacque avec une formation d'un groupe carboxylique. Elle passe par un cycle succinimide intermédiaire, qui à son tour va s'hydrolyser pour produire un mélange de 2 résidus: 15-30 % aspartates et 70-85% isoaspartate. En outre, les résidus aspartate sont aussi susceptibles d'être isomérisés pour donner un cycle succinimide. Ce cycle va produire de nouveau par hydrolyse un mélange de 2 résidus: aspartate et isoaspartate. Figure issue de (**N. E. Robinson and Robinson 2004**).

Les résidus isoaspartates sont considérés comme des résidus «anormaux» pour plusieurs raisons: (i) aucun codon ne code pour ce résidu, et (ii) les isoAsp modifient la structure primaire, secondaire et tertiaire de la protéine en allongeant d'un atome de carbone la chaîne peptidique.

Il est à noter qu'une enzyme de réparation appelée PCMT/PIMT (protéine L-isoaspartyl méthyltransférase) permet la méthylation des protéines contenant les résidus isoaspartates, et les convertit en aspartates. La structure des protéines ainsi déamidées est certes éditée de façon permanente puisque la séquence initiale n'est pas restaurée, mais les altérations structurales apportées par les IsoAsp sont levées par cette «réparation partielle».

Donc, l'activité de PCMT est essentielle à diminuer la quantité des protéines endommagées dans la cellule (Cimmino et al. 2008).

b) État de connaissance sur la déamidation de Bcl-x_L:

b.i) Découverte:

La première étude mentionnant la susceptibilité de Bcl-x_L à être déamidée a été publiée par Aritomi et al. avec la description de la structure de Bcl-x_L par cristallographie. La chromatographie échangeuse d'anions a permis de séparer la protéine Bcl-x_L purifiée en deux fractions correspondant à deux pics différents. Par quantification des résidus isoAsp dans chaque fraction, ils ont montré que l'une contenait Bcl-x_L native et l'autre contenait des résidus aspartates et isoaspartates sur les positions 52 et/ou 66 de la protéine (Aritomi et al. 1997). Les auteurs s'interrogeaient en conclusion sur l'existence d'une telle modification in vivo, et sur ses conséquences fonctionnelles sur l'activité anti-apoptotique de la protéine.

b.ii) La double déamidation de Bcl-x_L:

- Découverte et identification des résidus:

Dans Bcl-x_L humaine, 4 résidus (Asn33, Asn52, Asn54 et Asn66) sont localisés dans la boucle non structurée, trois (Asn52, 66 et 185) sont suivies de résidus glycine. En accord avec les facteurs structuraux cités précédemment qui favorisent la déamidation, les résidus asparagines 52 et 66 sont prédits par l'algorithme développé par Robinson et al pour présenter la plus grande probabilité à être déamidées (Deverman et al. 2002) (figure 13).

En 2002, le laboratoire de Weintraub a mené des expériences qui prouvent de façon indirecte que Bcl-x_L est susceptible de voir ses résidus Asn52 et Asn66 déamidés en réponse à divers agents endommageant l'ADN (cisplatine, etoposide,

radiations U.V), mais aucune mention n'est faite d'une déamidation de Bcl-x_L en conditions normales de culture.

Asparagine	Predicted Deamidation Half-Life (Relative)
5	6,050
33	64
52	1
54	405
66	1
128	36,023
136	299
175	4,095
185	543

Figure 13: Prédiction de la demi-vie de la déamidation des résidus asparagines de Bcl-x_L

Les demi-vies des résidus asparagines ont été calculées en utilisant l'algorithme de Robinson (**Noah E. Robinson 2002**). Ces calculs sont basés sur la structure cristalline de Bcl-x_L (**Muchmore et al. 1996**) et effectués en utilisant le programme sur le site suivant <http://deamidation.entrewave.com>. Les 2 résidus Asn52 et 66 ont la même demi-vie. Elle est beaucoup plus courte relativement aux autres résidus. Figure tirée de (**Deverman et al. 2002**).

De façon étonnante, même si la déamidation ne confère qu'une charge négative supplémentaire et un incrément de masse de 1 Da, l'état de déamidation de Bcl-x_L peut être résolu et discriminé par SDS-PAGE, où des différences dans la mobilité électrophorétique des différentes espèces déamidées sont observées (Deverman et al. 2002).

La protéine Bcl-x_L (en extrait protéique total ou purifiée) migre sous forme d'un doublet: la forme native, et la forme déamidée contenant des aspartates/isoaspartates et ayant une mobilité électrophorétique diminuée comparativement à la forme native.

Expérimentalement, il n'est pas classique pour des différences de charge et de masse si petites de donner des différences de migration remarquables sur des gels de type SDS-PAGE. Mais ces «artefacts» de migration constituent probablement la

méthode la plus utilisée pour identifier les formes déamidées de Bcl-x_L.

Le groupe de Weintraub a été le premier à caractériser et identifier les résidus déamidés de Bcl-x_L par mutagenèse dirigée. Mimer la déamidation en remplaçant les Asn 52 et 66 par des résidus Asp (N52D/N66D) produit une protéine qui migre à une distance plus courte que Bcl-x_L native en SDS-PAGE. A l'inverse, remplacer les résidus 52 et 66 par une alanine les rend non déamidables (N52A/N66A), Ce mutant co-migre avec la bande de Bcl-x_L native en SDS-PAGE. Cette stratégie a été un argument fort pour suggérer que la modification de Bcl-x_L est une double déamidation des résidus asparagines 52 et 66 (Deverman et al. 2002; Zhao et al. 2007a).

- Conséquences fonctionnelles:

Les premières observations faites sur la déamidation de Bcl-x_L montrent que le taux de déamidation de Bcl-x_L est supérieur dans les cellules hépatiques saines par rapport à celui observé dans les carcinomes hépatiques (Takehara and Takahashi 2003) Cette étude laisse envisager que les cellules tumorales pourraient acquérir une résistance à l'apoptose en supprimant la déamidation de Bcl-x_L. L'hypothèse la plus directe qui a été proposée pour expliquer cette résistance est que la déamidation pourrait altérer les fonctions anti-apoptotiques de Bcl-x_L.

Par ailleurs, une autre équipe a montré que lorsque des cellules sont soumises à des conditions de stress, le taux de déamidation de Bcl-x_L augmente. C'est le cas des stress génotoxiques qui sont induits par un traitement des cellules avec du cisplatine. L'utilisation du mutant déamido-mimétique de Bcl-x_L (N52D/N66D) a montré une perte d'interaction avec des partenaires pro-apoptotiques comme Bim, alors que la forme non déamidable (N52A/N66A) conservait cette capacité (Deverman et al. 2002). Cependant, un erratum est paru après 1 an, expliquant que la perte d'interaction de ce mutant n'est pas liée à la déamidation mais était causée par une autre mutation fortuite.

D'autres travaux ont permis à ce même laboratoire de proposer plus tard que la déamidation de Bcl-x_L induite par un stress génotoxique expose une séquence PEST qui cible Bcl-x_L pour la dégradation médiée par les calpaïnes (Dho et al. 2013) Cependant, il faut souligner que les deux articles publiés par le laboratoire de Weintraub ne montrent pas de résultats cohérents: la même lignée cellulaire

(principalement les cellules d'ostéosarcome SAOS-2) exposée aux mêmes traitements génotoxiques ne montre pas la dégradation de Bcl-x_L déamidée dans l'article de Deverman et al (Deverman et al. 2002), contrairement à l'article de Dho et al. (Dho et al. 2013).

D'une façon surprenante, cette dégradation de Bcl-x_L déamidée n'a été confirmée que dans une seule autre étude dans les cellules myéloïdes (Fares et al. 2015) alors que bon nombre d'autres études menées par d'autres laboratoires ne l'ont pas observée, ni dans les lymphocytes en réponse à d'autres drogues génotoxiques (Zhao et al. 2007a; Zhao, Yang, and Alexander 2004), ni dans des lignées cellulaires d'hépatome (Asakura et al. 2008), ni en condition contrôle dans des cellules HCT116 cultivées (Beaumat et al. 2016).

Dans la littérature, Alexander et al. ont proposé une autre explication sur la perte de la fonction anti-apoptotique de Bcl-x_L déamidée en se basant sur plusieurs travaux (Zhao et al. 2007a). Ils ont montré que les traitements alcalins (pH=10) induisent majoritairement des formes isoAsp52 et 66 (70-85%). La protéine Bcl-x_L purifiée exposée à un pH alcalin est séparée par chromatographie échangeuse d'anions en 3 pics (A, B et C) avec une augmentation d'un incrément de 1 Da respectivement. Par des expériences d'immunoprécipitation, les auteurs ont montré que seule la fraction correspondant au pic C perdait complètement son interaction avec la protéine pro-apoptotique Bim. Par analyse en spectrométrie de masse, cette fraction contient majoritairement des formes isoAsp52 et 66. Cette étude montre que Bcl-x_L déamidée en isoAsp52 et 66 n'est plus capable d'interagir avec la protéine Bim alors Bcl-x_L déamidée en Asp52 et 66 conserve cette capacité. Ces observations ont été corrélées, et le laboratoire d'Alexander a proposé que les principales espèces de Bcl-x_L générées par la déamidation *in situ* ne soient pas des formes Asp52/Asp66, mais des formes Iso-Asp52/ IsoAsp66, dont l'incapacité à séquestrer les protéines pro-apoptotiques de Bcl-2 explique la perte de la fonction anti-apoptotique de Bcl-x_L déamidée (Zhao et al. 2007a)

- Mécanismes et voies de signalisation:

Au moins deux voies différentes sont impliquées dans la régulation de la déamidation de Bcl-x_L dans les cellules suite à des dommages d'ADN.

- **Voie de régulation par la protéine Rb:**

Le laboratoire de Weintraub a décrit que la déamidation de Bcl-x_L est contrôlée négativement par la protéine de rétinoblastome (Rb), qui est essentiellement connue comme suppresseur de tumeur. La fonction de Rb est régulée par son état de phosphorylation: lorsqu'une cellule est prête à se diviser, Rb est phosphorylée et perd sa capacité à séquestrer (et à réprimer) le facteur de transcription E2F, ce qui permet une progression du cycle cellulaire. L'expression de Rb supprime à la fois la déamidation de Bcl-x_L et sa dégradation médiée par la calpaïne en réponse aux dommages causés par l'ADN. L'inhibition de la déamidation de Bcl-x_L dépend de l'état de phosphorylation de Rb: l'inhibition de la phosphorylation de Rb par l'olomoucine, un inhibiteur de la kinase dépendante de la cycline, supprime la déamidation de Bcl-x_L (Deverman et al. 2002) (figure 14).

Chang et al. ont renforcé ce concept en étudiant la protéine adénovirale E1A (inhibiteur de Rb): dans les cellules de cancer de l'ovaire contenant une activité normale de Rb, l'expression d'E1A conduit à une stimulation de la déamidation de Bcl-x_L suite à un stress génotoxique. À l'inverse, l'expression d'E1A mutée supprime la déamidation de Bcl-x_L (Chang et al. 2006). Le mécanisme précis par lequel Rb supprime la déamidation de Bcl-x_L n'a pas encore été élucidé. De plus, il a été montré que Rb est incapable de supprimer la déamidation de Bcl-x_L dans le modèle thymocytaire utilisé par le laboratoire d'Alexander (Zhao, Yang, and Alexander 2004), suggérant que la déamidation de Bcl-x_L régulée par Rb dépend probablement des types cellulaires.

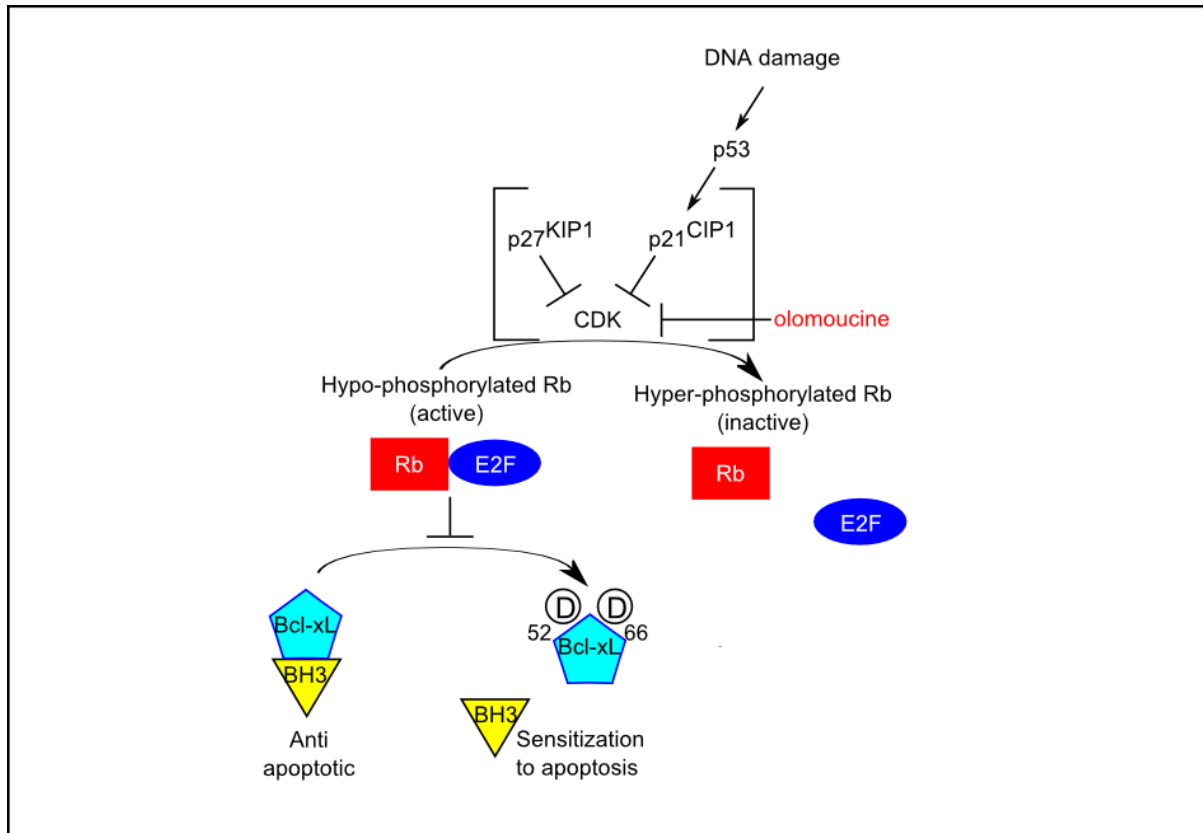


Figure 14: Voie de régulation de la double déamidation de Bcl-x_L par le Rb suite à un dommage à l'ADN.

Suite à un dommage de l'ADN, p53 est stabilisée, conduisant à une inhibition de CDK par p27^{KIP1} et p21^{CIP1}. Dans ce cas, Rb hypophosphorylé est capable de séquestrer le facteur de transcription E2F. la fonction anti-apoptotique de Bcl-x_L est maintenue puisque sa déamidation sur les résidus asparagines 52 et 66 est inhibée (**Beaumatin et al. 2017**).

•Voie de régulation par NHE-1:

Une voie de signalisation totalement différente a été caractérisée par les équipes de Alexander et Green dans les tumeurs hématologiques (Zhao, Yang, and Alexander 2004). Les tyrosines kinases oncogéniques (TK) comme les kinases BCR-ABL, p56^{LCK} et JAK2V617F sont constitutivement activées dans des tumeurs malignes hématologiques. Ces TK inhibent la déamidation de Bcl-x_L et la réponse apoptotique suite aux dommages à l'ADN. Ce mécanisme se fait par une séquestration cytoplasmique du facteur de transcription FOXO3 et à la diminution de l'expression de catalase ce qui entraîne une accumulation de ROS intracellulaire (figure 15).

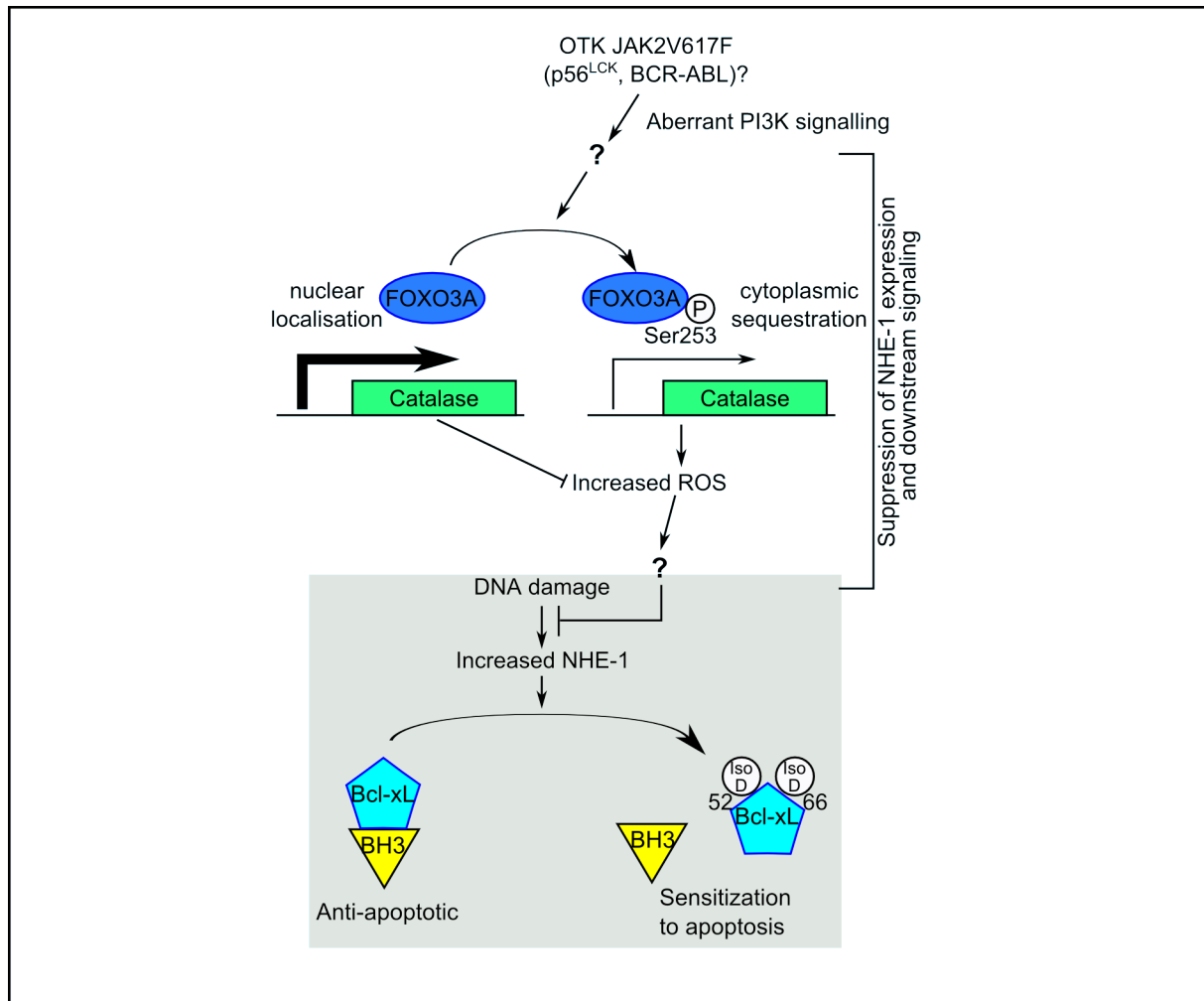


Figure 15: Voie de régulation de la double déamidation de Bcl-xL dans des tumeurs malignes hématologiques suite à l'activation des tyrosines kinases oncogéniques (OKT)

Certaines tyrosines kinases existent sous forme oncogénique (résultant de la mutation de JAK2 V617F, p56lck, ou BCR-ABL). Elles sont alors capables de séquestrer le facteur de transcription FOXO3 dans le cytoplasme, ce qui conduit à la diminution de l'expression de la catalase et produit une accumulation de ROS intracellulaires. l'expression de NHE-1 est alors inhibée, et la double déamidation de Bcl-x_L en réponse à un dommage d'ADN ne se produit pas (**Beaumatin et al. 2017**).

NHE-1 (Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1) est un échangeur sodium/proton situé dans la membrane plasmique. Il est surexprimé en réponse à des dommages à l'ADN, augmentant le pH intracellulaire d'environ 0,5 unité. Cette variation de pH induit alors une augmentation du taux de déamidation de Bcl-x_L (Zhao et al. 2007b). Le mécanisme par lequel les tyrosines kinases oncogéniques (OKT) suppriment la voie "NHE-1/ déamidation de Bcl-x_L" reste encore inconnu.

Il est à noter que l'inhibition de la voie de déamidation de Bcl-x_L n'est pas une caractéristique générale des cancers hématologiques parce que d'autres types

d'OTK (comme NPM-ALK et FGFR3 TK) sont incapables de supprimer cette voie. De même, bien que l'inactivation des protéines FOXO et des ROS intracellulaires élevés sont retrouvés dans de nombreux cancers, il est peu probable que l'inhibition de la voie «NHE-1/déamidation de Bcl-x_L» soit une caractéristique générale du cancer, car la déamidation de Bcl-x_L est efficacement induite par les stress génotoxiques dans les ostéosarcomes, le cancer cervical, de la vessie et de l'ovaire (Deverman et al. 2002; Chang et al. 2006).

c) Monodéamidation de Bcl-x_L:

c.i) Mise en évidence:

Les études menées par les laboratoires qui s'intéressent à la déamidation de Bcl-x_L portent essentiellement sur la double déamidation des résidus Asn52 et 66, bien que des données indiquent l'existence de plusieurs niveaux de déamidation dans la plupart des lignées cellulaires testées, soit cultivées dans des conditions normales, soit exposées à des dommages à l'ADN.

Deverman et al. mentionnent l'existence d'une forme plus lente de Bcl-x_L, détectée dans les cellules SAOS-2 non traitées et qui co-migre avec le mutant mono-déamido-mimétique de Bcl-x_L (N52DN66A); cependant, ils n'ont pas étudié cette forme. Zhao et al. ont aussi observé une forme monodéamidée de Bcl-x_L dans les granulocytes des patients atteints de leucémies ainsi que dans ceux des témoins, mais aucune caractérisation de cette forme n'a été faite.

Notre laboratoire est le premier à avoir étudié la déamidation de Bcl-x_L dans des cellules cultivées en conditions contrôles, sans aucun traitement induisant de dommages à l'ADN. Nous avons montré que Bcl-x_L extraite de diverses lignées cultivées en conditions contrôles, migrait sous forme d'un doublet et que le retard sur gel n'était pas causé par une phosphorylation (Beaumat et al. 2016). En utilisant des mutants déamido-mimétiques simples ou doubles sur les résidus 52 et 66, nous avons montré que chaque mutant adoptait un profil électrophorétique caractéristique en SDS-PAGE, permettant de les discriminer. Cette approche nous a conduit à identifier une forme vraisemblablement monodéamidée de Bcl-x_L sur le résidu asparagine 52. L'existence de cette forme de Bcl-x_L a été observée dans toutes lignées cancéreuses et lignées normales que nous avons à disposition au laboratoire, ainsi que in vivo, dans des tissus de souris. Cette étude a aussi apporté

la première indication que les Asn52 et Asn66 pourraient ne pas être également susceptibles à la déamidation. Le fait que le résidu asparagine 66 soit réfractaire à la déamidation suggère que son environnement structural diffère de celui du résidu 52. Par conséquent, contrairement aux données issues de la cristallographie par rayons X et de RMN, la large boucle non structurée pourrait bien adopter une structure définie dans les cellules, peut être grâce à des interactions avec des partenaires (Beaumat et al. 2016).

c.ii) Conséquences fonctionnelles:

La monodéamidation de Bcl-x_L diffère significativement de la double déamidation à la fois pour son apparition et ses fonctions. Notre laboratoire a étudié la caractérisation fonctionnelle du mutant récapitulant la monodéamidation du résidu 52 (N52D N66A) et a montré qu'il conserve les mêmes propriétés anti-apoptotiques que Bcl-x_L native. Il stimule même davantage l'autophagie que Bcl-x_L native suite à une carence en nutriments (Beaumat et al. 2016). Les mécanismes impliqués ont été explorés durant ma thèse.

D. Objectif de cette étude:

Durant ma thèse, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à poursuivre la mise en évidence et la caractérisation de la forme monodéamidée de Bcl-x_L (N52D N66A) en optimisant les approches pour discriminer l'état de déamidation de Bcl-x_L. Les résultats obtenus seront présentés dans le chapitre 1, intitulé: Caractérisation et mise en évidence de la forme monodéamidée.

D'autre part, puisque Bcl-x_L possède des propriétés oncogéniques, nous avons étudié dans un second temps, l'effet de la monodéamidation sur ces propriétés. De plus, comme la monodéamidation stimule l'activité autophagique de Bcl-x_L, nous nous sommes intéressés à comprendre les mécanismes et les voies de signalisations sous-jacents, qui sont impliqués dans la régulation de l'autophagie.

La difficulté de la thématique réside dans la formation d'espèces contenant des résidus Iso-Asp, qui ne peuvent être reproduits par mutagenèse dirigée, à la différence des aspartates. Pour cela, nous avons développé durant notre étude des tests *in vitro* pour analyser les interactions établies par les formes de Bcl-x_L déamidées en Asp et celles déamidées en Iso-Asp.

Enfin, une autre stratégie testée dans cette étude a consisté à réaliser des expériences de TAP-tag différentiel entre TAP- Bcl-x_L et TAP- Bcl-x_L N52D N66A pour identifier des partenaires spécifiques de chacune des deux formes. A travers les partenaires identifiés, nous souhaitons explorer les fonctions exercées spécifiquement par la forme déamidée de Bcl-x_L.

Résultats

II) Résultats:

Nous avons vu dans l'introduction que la déamidation de Bcl-x_L est une modification post-traductionnelle décrite pour affecter essentiellement les résidus asparagines 52 et 66 situés dans sa boucle non structurée. Cette déamidation transforme les résidus asparagines en aspartates et isoaspartates. La difficulté de la thématique concernant la déamidation des protéines réside dans la difficulté d'étudier les protéines contenant des résidus Iso-Asp, qui ne peuvent être reproduits par mutagenèse dirigée, à la différence des aspartates. Je présenterai donc mes travaux de thèse en abordant dans la première et la deuxième partie les travaux concernant la caractérisation du mutant déamido-mimétique Bcl-x_L N52DN66A. La caractérisation des formes IsoAsp sera présentée dans la troisième partie.

A. Mise en évidence de la forme monodéamidée de Bcl-x_L:

A.1. Visualisation de la forme déamidée de Bcl-x_L par un gel de type Tris-Glycine-SDS-PAGE:

Comme d'autres laboratoires avant nous, nous avons utilisé la migration sur un gel SDS-PAGE pour analyser les profils de migration de Bcl-x_L à partir d'extraits protéiques totaux de cellules en culture. Le SDS-PAGE est une technique consistant à faire migrer des protéines dans un gel, sous l'influence d'un champ électrique, permettant ainsi leur séparation. La séparation est réalisée en conditions dénaturantes en raison de l'ajout de SDS. En se liant à la protéine, le SDS empêche son repliement et lui confère une charge nette négative. En présence de SDS, les protéines auront donc toutes une charge apparente négative, elles migreront toutes vers l'anode. Cela signifie que le poids moléculaire des protéines sera le principal facteur intervenant dans leur séparation.

Des travaux réalisés sur des mutants récapitulant les déamidations de Bcl-x_L ont établi que la déamidation peut être évaluée par des différences dans les profils de migration visualisées sur un gel de type SDS-PAGE (Deverman et al. 2002). Un exemple est illustré dans la figure 16, où des cellules HTB-29 soumises ou non à des dommages à l'ADN (traitement au cisplatine) ont été lysées et le profil de migration de Bcl-x_L a été analysé. En condition contrôle, Bcl-x_L migre sous forme de doublet. Selon l'interprétation des auteurs (Deverman et al. 2002), le traitement

cisplatine provoque la conversion quasi totale de Bcl-xL en la forme double déamidée (figure 16). Mais là où les auteurs voient une bande unique de Bcl-xL après traitement au cisplatine, migrant plus lentement et présentée comme Bcl-xL double déamidée, nous avons suspecté qu'il existait en fait deux bandes (bande simple et double déamidée) (figure 16).

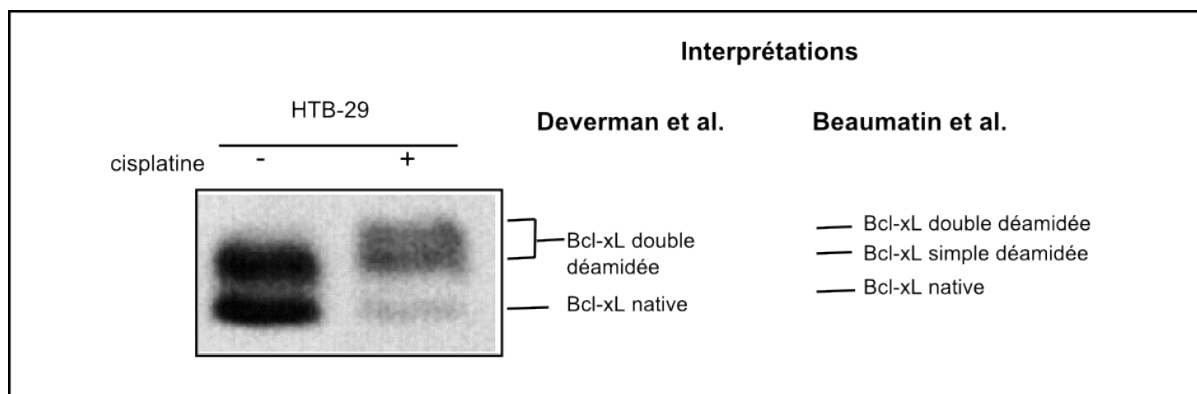


Figure 16: Profils de migration de la protéine Bcl-x_L et ses formes déamidées dans un lysat de cellules HTB-29 traitées ou non par le cisplatine

Des cellules HTB-29 sont traitées par le cisplatine. Les extraits protéiques totaux sont soumis à une électrophorèse sur un gel de type SDS-PAGE et un western blot dirigé contre Bcl-x_L (**Deverman et al. 2002**)

Je récapitulerai ici les arguments obtenus précédemment au laboratoire (thèse de Florian Beaumatin), en faveur de l'existence d'une forme monodéamidée de Bcl-x_L. Dans les cellules HCT116 cultivées en conditions contrôles, Bcl-x_L endogène (extraite de cellules de mammifères ou purifiée à partir de bactéries) migre sous forme d'un doublet: la forme native (qui migre le plus vite) et la forme modifiée (qui présente un retard de migration). La bande de migration plus lente n'est pas supprimée par un traitement par λ-phosphatase et cette bande ne co-migre pas avec la forme double déamidée de Bcl-x_L produite par exposition des extraits protéiques à un pH alcalin. Ces résultats montrent que la bande modifiée n'est ni produite par une phosphorylation, ni une double déamidation. Ils sont en faveur d'une simple déamidation de Bcl-x_L (Beaumatin et al. 2016) (figure 17).

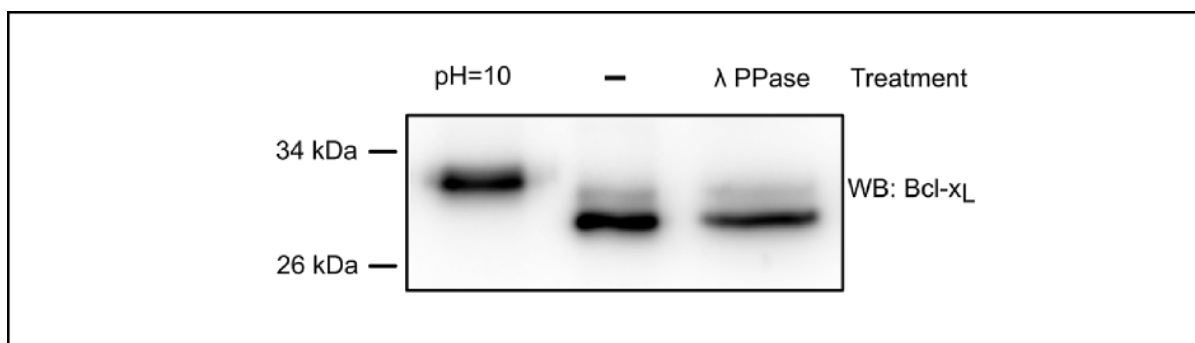


Figure 17: Caractérisation de la forme modifiée de Bcl-x_L

Les extraits protéiques totaux issus des cellules HCT116 ont été séparés sur SDS-PAGE en parallèle avec des extraits cellulaires soumis à un traitement alcalin, ou un traitement par λ-phosphatase. L'immunodétection a été effectuée par un western blot dirigé contre Bcl-x_L. Résultats publiés dans (**Beaumatin et al. 2016**).

Afin d'identifier le résidu asparagine déamidé, la mutagenèse dirigée a été utilisée pour générer des mutants qui récapitulent les différents états de déamidation. La mutation qui remplace le résidu asparagine en aspartate en position 52 et/ou 66 (notée N52D et N66D) récapitule l'effet de la déamidation. A l'inverse, une mutation en alanine génère une forme de la protéine non déamidable sur les positions mutées (N52A N66A). La littérature nous indiquant, d'après des algorithmes de prédiction de déamidation sur Bcl-x_L que seuls les résidus asparagines 52 et/ou 66 sont susceptibles d'être déamidés, nous avons généré les simples et les doubles mutants déamidés ou non déamidables de Bcl-x_L (tableau II.1).

Noms	Mutations	Forme de Bcl-x _L
Bcl-x _L AA	N52 A N66 A	Non déamidable
Bcl-x _L AD	N52 A N66 D	Déamidable sur le résidu 66
Bcl-x _L DD	N52 D N66 D	Déamidable sur les résidus 52 et 66
Bcl-x _L DA	N52 D N66 A	Déamidable sur le résidu 52

Tableau II.1: Tableau récapitulatif des mutants de déamidation de Bcl-x_L utilisés

Les cellules HCT116 ont été transduites pour exprimer ces mutants à des niveaux d'expression comparables. Des extraits cellulaires de protéines totales ont été réalisés, et analysés en SDS-PAGE de type Laemmli sur un mini-gel de 6 cm avec une migration de 1h 30 min et sur un autre gel de 16 cm avec une longue migration pendant 24h. Les résultats sont présentés dans la figure 18.

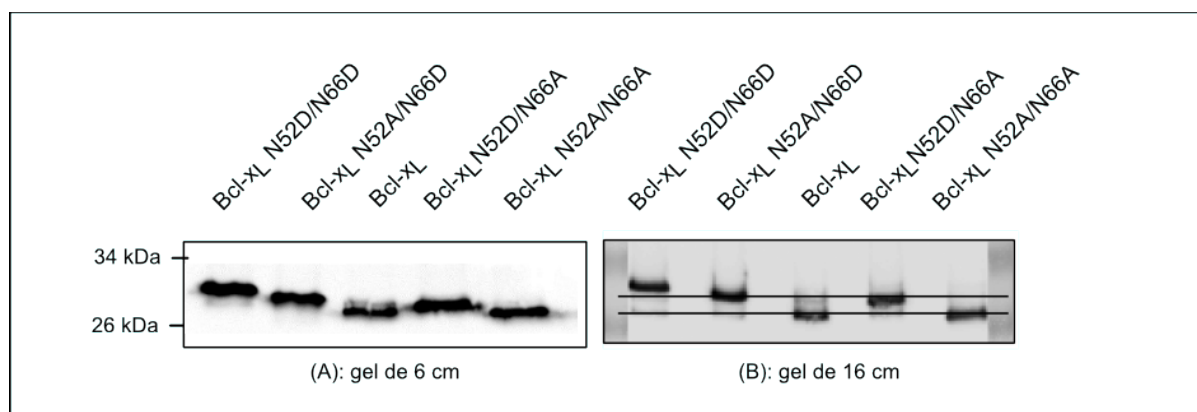


Figure 18: Profil électrophorétique des mutants de déamidation de Bcl-x_L comparés à ceux de la protéine native et modifiée

La figure 18 (A) correspond à une migration sur un gel de 6 cm, tandis que (B) correspond à une migration sur un gel de 16 cm. Les extraits protéiques issus des HCT 116 exprimant les différents mutants déamido-mimétiques ou Bcl-x_L sont soumis à une électrophorèse de type Tris-SDS-PAGE 12 % de 6cm et de 16 cm avant de réaliser un western blot dirigé contre Bcl-x_L. Résultats publiés dans (Beaumat *et al.* 2016) (n>5).

Ces résultats montrent de façon très claire que l'état de déamidation est mieux discriminé et résolu en utilisant un grand gel de 16 cm comparativement au mini-gel de 6 cm. L'analyse de ces profils de migration montre que le mutant N52D N66D de Bcl-x_L possède un profil électrophorétique plus retardé par rapport aux autres mutants et à la protéine modifiée. Nous avons constaté aussi que le mutant N52A N66A migre à la même distance apparente que la protéine native. De plus, nous observons que tous les mutants migrent sous forme d'une seule bande, suggérant qu'ils ne subissent pas de modifications post-traductionnelles supplémentaires qui les feraient migrer en plusieurs bandes.

D'une façon intéressante, nous avons constaté que seul le mutant N52D N66A migre à la même distance que la forme modifiée. Donc, ces résultats suggèrent que la modification post-traductionnelle subie par Bcl-x_L est une déamidation simple de l'asparagine 52.

La séparation par SDS-PAGE sur un gel de type Laemmli de 16 cm nous a permis de conforter l'hypothèse de l'existence d'une simple déamidation de Bcl-x_L en offrant une meilleure résolution des profils de migration par rapports aux études de nos concurrents (Beaumat *et al.* 2016).

Durant ma thèse, afin de palier au problème du temps de migration, nous avons

essayé de mettre au point une nouvelle composition de gels permettant d'avoir une meilleure séparation des profils de migration avec une courte durée de migration.

A.2. Visualisation de la forme déamidée par un gel Tris-Taurine-Glycine:

Dans ce type de gel, nous avons utilisé des ampholytes (la taurine, un dérivé d'acide aminé soufré, et la glycine). L'ajout des ampholytes dans la composition du gel permet, par interaction avec les protéines, une meilleure séparation des bandes protéiques.

Nous avons répété la même expérience sur les mêmes mutants de Bcl-x_L récapitulant les états de déamidation, en réalisant une électrophorèse sur un gel Tris-Taurine/glycine de 6 cm. 1h 30 minutes de migration suffisent pour visualiser les différences de migration présentées dans la figure 19.

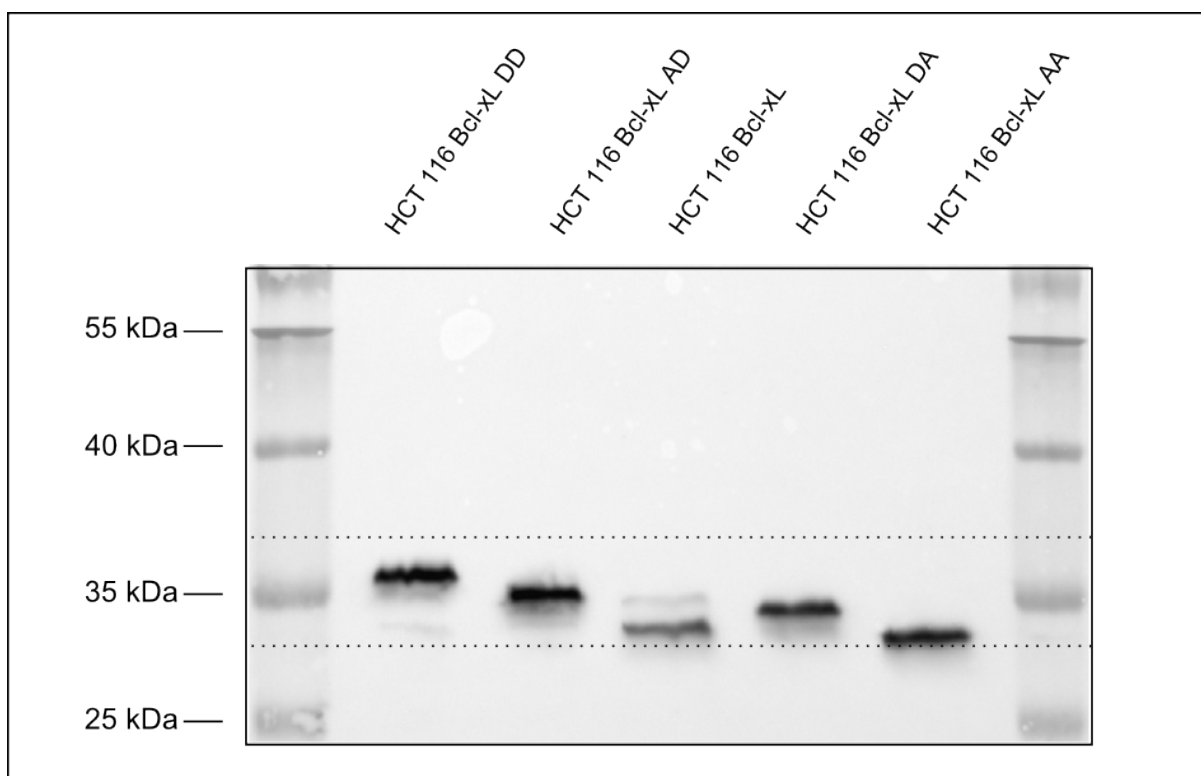


Figure 19: Profils électrophorétiques des mutants de déamidation surexprimés chez les lignées HCT 116, obtenus sur un gel Tris-Taurine/glycine.

Les extraits protéiques totaux issus des lignées HCT 116 exprimant les différents mutants déamidomimétiques ou Bcl-x_L sont soumis à une électrophorèse de type Tris-Taurine/glycine (de 6cm) avant de réaliser un western blot contre Bcl-x_L (n>5).

Le changement de la composition du gel a permis d'avoir une meilleure séparation des protéines en optimisant la durée de migration, mais nous avons remarqué que le profil de migration des mutants est modifié: le mutant N52DN66A ne co-migre plus avec la forme modifiée de Bcl-x_L, et le mutant N52AN66A ne co-migre plus avec Bcl-x_L native.

Nous avons envisagé deux explications :

1) soit la nouvelle composition du gel révélait que nous nous étions trompés en proposant que de la forme modifiée de Bcl-x_L résulte d'une simple déamidation de l'Asn52.

2) soit l'introduction des alanines par mutagenèse rendait la protéine plus hydrophobe et était responsable de la plus grande distance de migration. Si cette hypothèse était correcte, nous devons en théorie aussi retrouver cet effet en SDS-PAGE de type Laemmli en tirant la migration au maximum. Nous avons décidé de réaliser la même expérience mais cette fois avec un gel de type Laemmli de 26 cm et une migration de 30h. Les résultats sont présentés dans la figure 20.

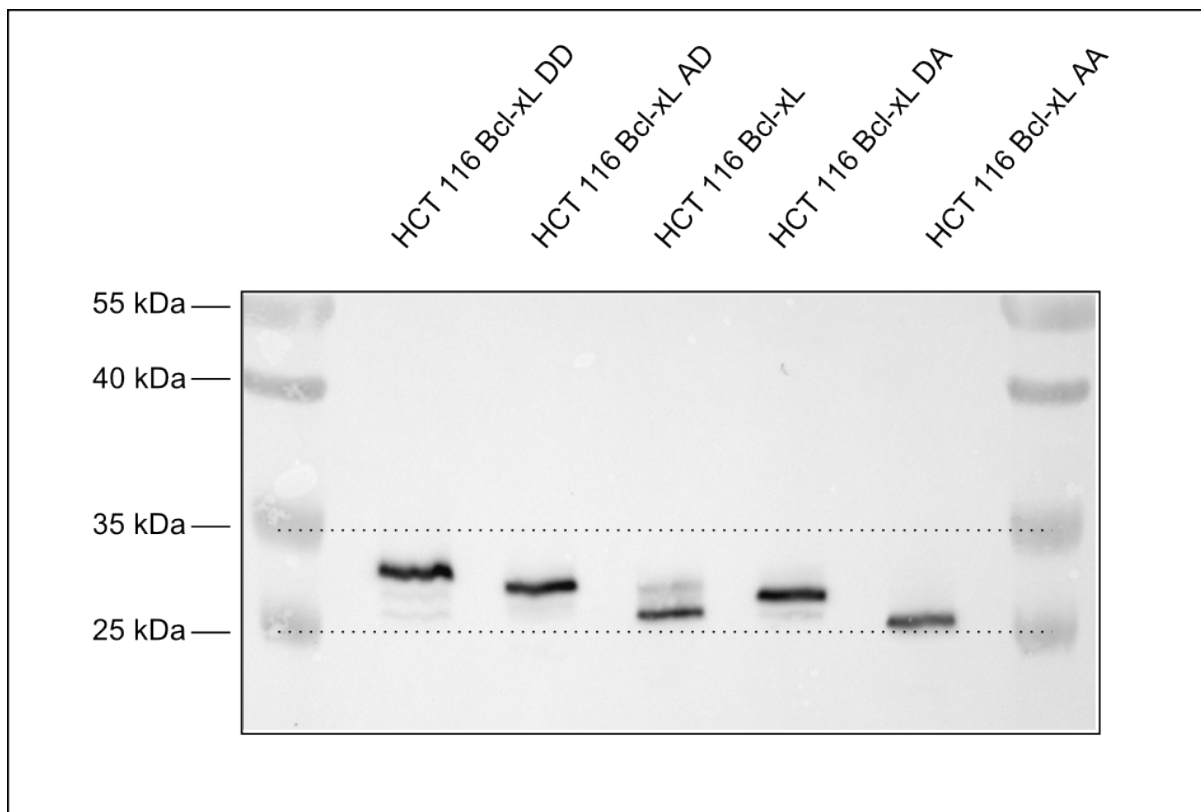


Figure 20: Profils de migration électrophorétique des mutants de Bcl-x_L comparés à ceux de la protéine native et la protéine modifiée.

Les extraits protéiques totaux issus des lignées HCT 116 exprimant les différentes formes de Bcl-x_L sont soumis à une électrophorèse de type Tris-SDS-PAGE d'une dimension de 26 cm (30h de migration) avant de réaliser un western blot contre Bcl-x_L (n=1).

Les mêmes résultats ont été observés avec l'électrophorèse Tris-SDS-PAGE (26cm/30h) et avec celle réalisée sur un mini-gel de type Tris-Taurine/Glycine. Le mutant N52A N66A migre plus vite que la protéine native, et le mutant N52D N66A adopte une migration intermédiaire entre la protéine native et sa forme modifiée.

Du point de vue technique, nous pouvons conclure que ce n'est pas la composition du gel qui influence les profils de migration mais plutôt la distance et la durée de la migration. L'utilisation du gel Tris-Taurine/glycine a permis d'optimiser la durée de migration avec une meilleure résolution et séparation des protéines.

Pour compléter la démonstration, nous avons généré un simple mutant N52D de Bcl-x_L sans remplacer le résidu N66 par une alanine. Une électrophorèse sur un gel Tris-Taurine/Glycine, un western blot dirigé contre Bcl-x_L montrent les résultats présentés dans la figure 21.

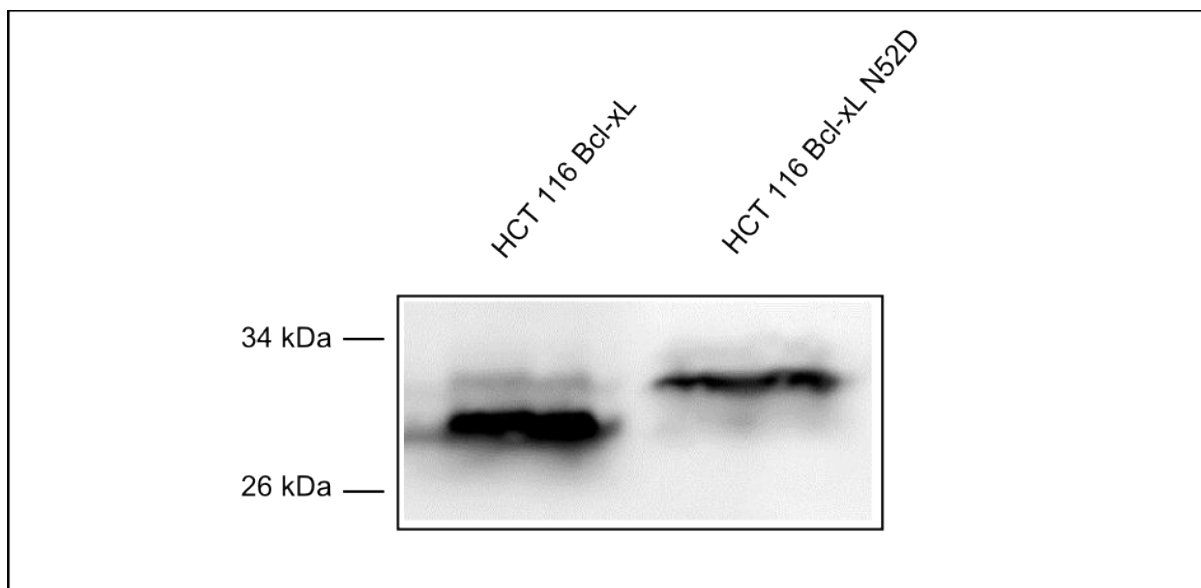


Figure 21: Profil de migration électrophorétique du mutant de Bcl-xL N52D comparé à celui de la protéine native.

Les extraits protéiques totaux issus des lignées HCT 116 Bcl-x_L et Bcl-x_L N52D sont soumis à une électrophorèse de type Tris-Taurine/Glycine d'une dimension de 6 cm avant de réaliser un western blot contre Bcl-x_L (n=3).

Cette figure confirme que le mutant N52D co-migre avec la forme modifiée de Bcl-x_L. Alors, ce n'est pas la composition du gel qui a modifié les profils de migration, mais c'est plutôt l'introduction de l'alanine qui était responsable de la grande distance de migration.

Ces résultats nous sensibilisent au fait que les acides aminés choisis pour les substitutions par mutagenèse dirigée ne sont pas aussi «silencieux» qu'on pourrait le souhaiter, et nous incitent à réfléchir sur un autre choix pour rendre l'Asn66 non déamidable.

A.3. Conclusion:

Pour récapituler, les arguments accumulés jusqu'ici par le laboratoire en faveur de l'existence d'une simple déamidation de Bcl-x_L sont :

- les distances de migration des mutants déamido-mimétiques en SDS-PAGE de type Laemmli ou de type Taurine/glycine.

- L'électrophorèse bi-dimensionnelle (thèse de Florian Beaumatin, et Beaumatin et al., Oncotarget 2016) montre que la modification de Bcl-x_L introduit une/des charge(s) négative(s) dans la protéine, et un très petit incrément de taille. Donc cette modification n'est ni un clivage, ni une ubiquitination.

- le traitement des extraits protéiques à la lambda-phosphatase montre de plus qu'il ne s'agit pas d'une phosphorylation.

Les tentatives de caractérisation par spectrométrie de masse s'étant jusqu'ici révélées infructueuses, nous n'avons toujours pas de preuve irréfutable de l'identité de la forme modifiée de Bcl-x_L, mais la somme des arguments ci-dessus indique que cette modification est vraisemblablement une déamidation de l'Asn52.

Étant les premiers à suggérer l'existence de cette forme monodéamidée, nous en avons poursuivi la caractérisation fonctionnelle.

B. Conséquences fonctionnelles de la monodéamidation de Bcl-x_L:

Il nous a semblé pertinent de comprendre comment cette modification affecte les fonctions de cette protéine, et contribue à la régulation des processus cellulaires dans lesquels Bcl-x_L est impliquée. C'est ce que je vais aborder dans ce second paragraphe.

B.1. Effet de la déamidation sur la stabilité de Bcl-x_L:

Parmi les études précédemment publiées sur ce sujet, celle effectuée par Dho et al, avec les cellules SAOS-2 et HTB-29, montre que la double déamidation de Bcl-x_L induite par un stress génotoxique (suite à un traitement cisplatine, ou etoposide ou UV), peut conduire Bcl-x_L à exposer une séquence PEST, ce qui rend la forme double déamidée éligible à être dégradée par les calpaines (Dho et al. 2013).

Cependant, notre laboratoire a préalablement montré que seule l'Asn52 de Bcl-x_L est déamidée dans des cellules cultivées en conditions contrôles et des tissus de souris n'ayant reçu aucun traitement. Ni la forme double déamidée de Bcl x_L, ni la forme simple déamidée en position N66 ne sont détectées.

Au cours de ma thèse, nous avons voulu répondre à plusieurs questions :

1) confirmer si la double déamidation accélère la dégradation de Bcl-x_L en condition de stress génotoxiques, et déterminer si la simple déamidation produit le même effet, toujours en condition de stress génotoxique.

2) déterminer si la simple déamidation de Bcl-x_L altère la demi-vie de la protéine lorsque les cellules sont maintenues en conditions contrôles.

Pour répondre à ces questions, plusieurs tests ont été réalisés dans différentes lignées cellulaires.

a) Effet de la déamidation sur la stabilité de Bcl-x_L en conditions contrôles:

Dans un premier temps, nous avons testé i) si la monodéamidation, observée en absence de stress, peut affecter la stabilité de Bcl-x_L. et si oui, ii) si l'inhibition des

calpaïnes peut empêcher la dégradation de Bcl-x_L et de la forme monodéamidée.

Nous avons contrôlé l'efficacité de l'inhibiteur de calpaïne employé (le cocktail «calpain inhibitor 1» commercialisé par Sigma) en utilisant comme rapporteur la protéine Mcl-1, connue pour avoir une courte durée de vie et être la cible de diverses protéases ainsi que du protéasome. Nous avons utilisé Hsp60 comme un contrôle de charge (figure 22).

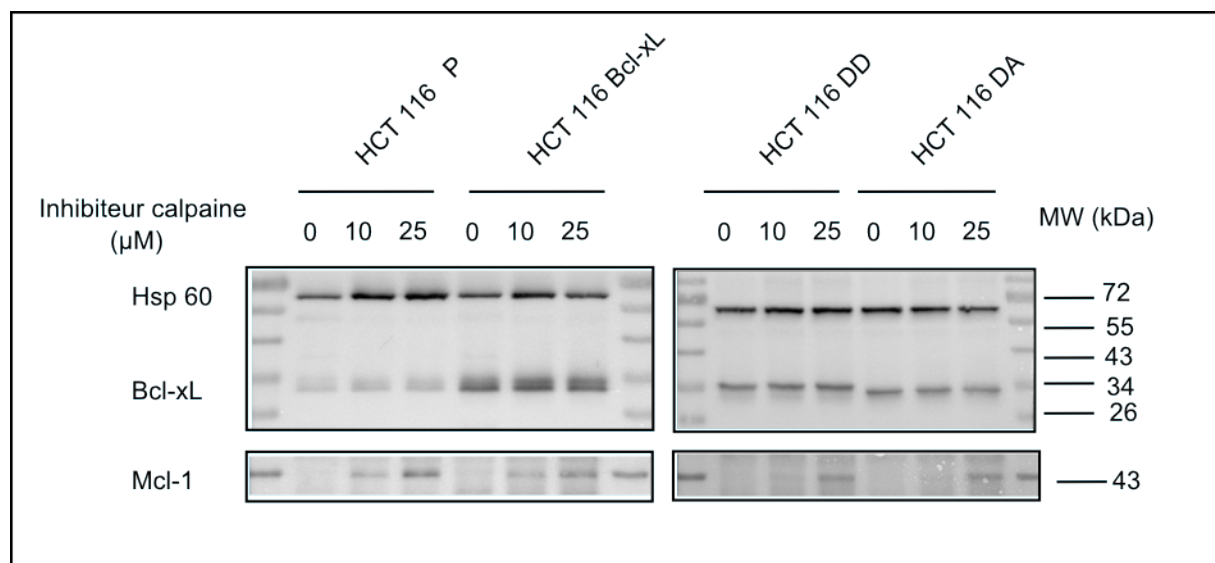


Figure 22: Stabilité de Bcl-x_L et de ses mutants de déamidation.

Des cellules HCT 116 sont cultivées en condition contrôle puis traitées avec l'inhibiteur de calpaïne à des concentrations de 10 et 25 μM pendant 24h. Les extraits totaux sont soumis à une électrophorèse de type Tris-Glycine-SDS-PAGE 12% suivi d'un western blot dirigé contre Bcl-x_L, Hsp60 et Mcl-1 (n=3) Résultats publiés dans (Beaumat et al. 2016).

La figure ci-dessus montre que l'expression de Bcl-x_L reste stable quel que soit son état de déamidation. Ceci montre que quand les cellules sont maintenues en conditions «contrôle» de culture, la déamidation ne rend pas Bcl-x_L éligible à être dégradée par les calpaïnes et que la déamidation n'affecte pas la stabilité de Bcl-x_L sur le temps de l'expérience.

Ces observations nous ont conduits à nous demander si la déamidation de Bcl-x_L modifiait sa stabilité lorsque les cellules HCT 116 sont soumises à un stress génotoxique, comme il a été montré avec les SaOS-2 et les HTB-29 par Dho et al.

b) Effet de la déamidation sur la stabilité de Bcl-x_L en conditions de stress génotoxiques:

Nous avons donc poursuivi nos expériences en exposant les HCT 116 à un stress génotoxique par irradiation UV et addition de 5-FU: ce traitement est décrit par Dho et al pour avoir deux conséquences: (1) induire la double déamidation de Bcl-x_L, et (2) entraîner sa dégradation. Nous avons donc mené l'expérience en absence et en présence d'inhibiteur de calpaines (figure 23).

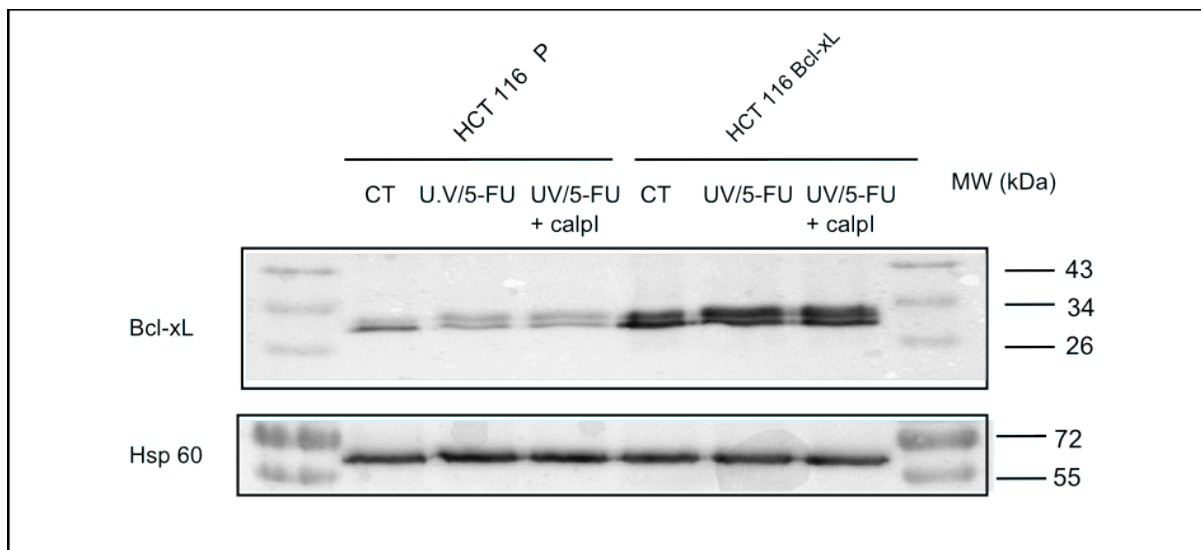


Figure 23: Stabilité de Bcl-x_L et déamidation induite par stress aux U.V

Les cellules HCT 116 sont traitées aux UV 45s à 450 μ J puis cultivées 16h en présence de 45 μ M de 5 Fluoro-Uracile (5 FU). Les cellules sont traitées avec l'inhibiteur de calpaines (calpl) pendant 24h. Les extraits totaux issus de ces cellules sont soumis à une séparation en Tris-Glycine-SDS-PAGE 12 % et western blot dirigé contre Bcl-x_L et Hsp60 (n=2).

Les résultats montrent qu'en cas de stress génotoxique, l'état de déamidation de Bcl-x_L est modifié dans les cellules parentales, mais que cela ne s'accompagne pas d'une dégradation dans la lignée HCT116. En accord avec cette observation, l'inhibition des calpaines ne mène à aucune accumulation de Bcl-x_L, ce qui semble contradictoire avec les travaux de (Dho et al. 2013).

Nous avons décidé de répéter ces expériences en utilisant les mêmes lignées que Dho et al, ainsi que d'autres lignées cellulaires comme RKO et HT-29. Nous avons traité ces cellules avec du cisplatine pour induire un stress génotoxique. Puis nous avons mené cette expérience avec ou/et sans inhibiteur de calpaines pour savoir si la dégradation de Bcl-x_L est induite par une autre voie que les calpaines, nous avons aussi inhibé le protéasome par un traitement avec le MG132 et celle de

l'autophagie par un traitement avec la Bafilomycine A1.

Afin de vérifier que le dommage à l'ADN a été efficace, un western blot dirigé contre la protéine gamma-H2AX a été réalisé. Cette dernière est connue comme une variante de la famille des histones, qui est recrutée et phosphorylée au site où l'ADN est endommagé. Les résultats sont présentés dans la figure 24.

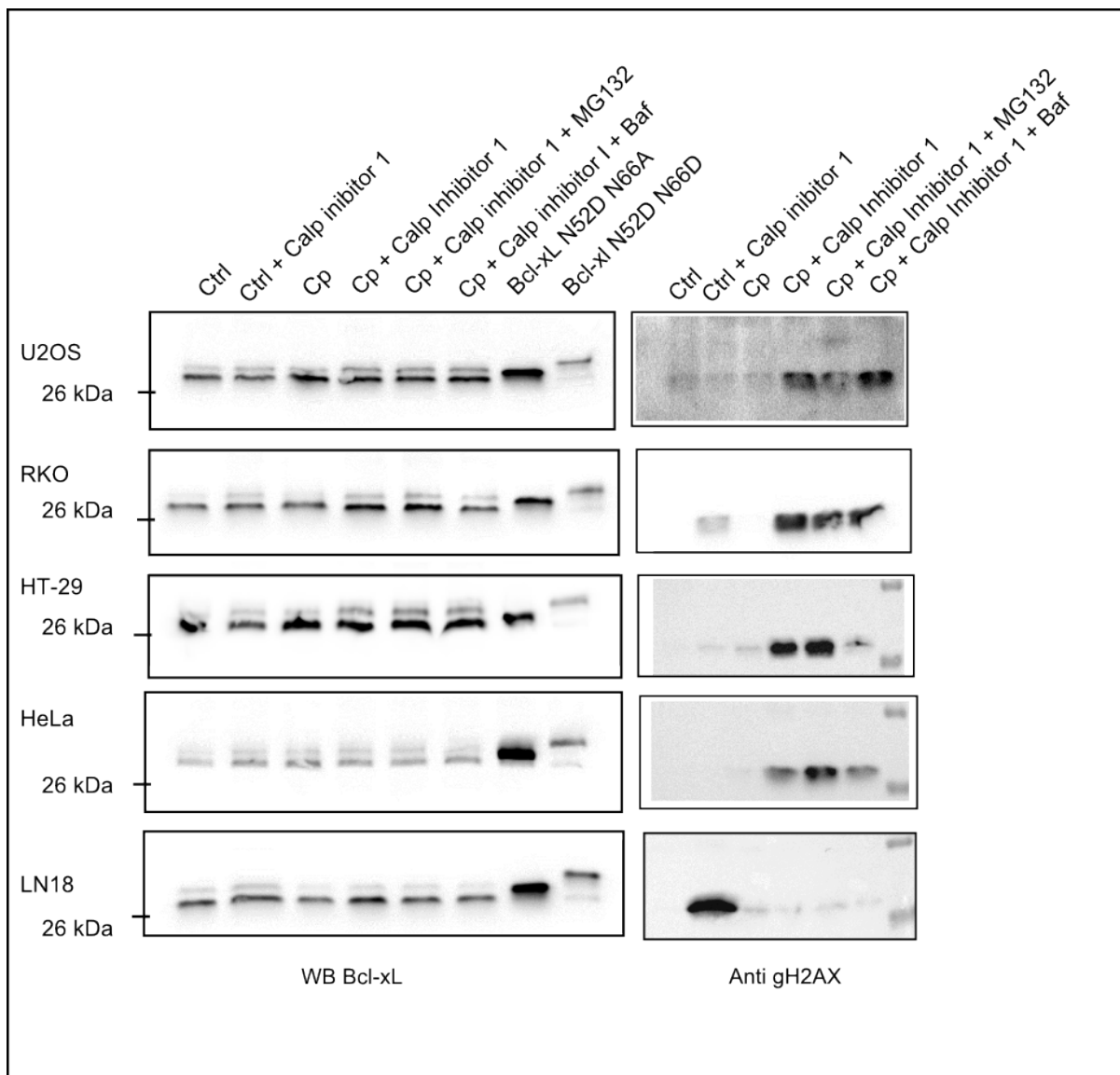


Figure 24: Stabilité de Bcl-x_L dans différentes lignées cellulaires, suite à l'induction d'un dommage à l'ADN par un traitement par le cisplatine

Les cellules sont traitées par le cisplatine à une concentration de 10 μ M pendant 48 heures. Puis, ces cellules sont traitées par un inhibiteur des calpaines (15 μ M) pendant 24h, en présence ou en absence de MG 132 (10 μ M) pendant 3h, et de Bafilomycine A1 (0,1 μ M) pendant 3h 30 minutes. Les extraits totaux issus de ces cellules sont soumis à une séparation en Tris-Glycine-Taurine 12 % suivie d'un western blot dirigé contre Bcl-x_L et la protéine gamma-H2AX (n=2).

cp: cisplatine; Baf: Bafilomycine A1

Les résultats montrent d'une part les profils de migration de Bcl-x_L en réponse aux différents traitements, et d'autre part, le taux de phosphorylation de gamma-H2AX chez ces lignées. Concernant la détection de gamma-H2AX, nous remarquons un faible signal en conditions contrôle et cisplatine, et une accumulation de la phosphoprotéine suite à l'inhibition que ce soit des calpaines, du protéasome ou de l'autophagie.

Ces observations nous confirment d'un part que le stress génotoxique est efficace et d'autre part que la protéine gamma-H2AX est dégradée par les différentes voies de protéolyse analysées.

Lorsqu'on inhibe les calpaines en condition contrôle, l'expression de Bcl-x_L ne varie pas. Concernant l'effet du stress génotoxique, les lignées testées se répartissent en 2 catégories: les lignées «résistantes», et les lignées «sensibles». Les lignées sensibles (RKO, HT-29, et LN18) montrent une diminution significative de Bcl-x_L déamidée en condition cisplatine (piste 3); les inhibiteurs des voies de protéolyse empêchent efficacement cette dégradation. Les lignées «résistantes» ne montrent aucune modification de profil de migration ou de l'expression de Bcl-x_L en condition cisplatine, indiquant que ces lignées ne stimulent pas la déamidation de Bcl-x_L en réponse au stress génotoxique. De façon intéressante, nous avons remarqué que la forme déamidée de Bcl-x_L co-migre avec Bcl-x_L (N52D N66A) et non avec la forme double déamidée (N52D N66D) comme cela a été publié par Dho et al.

c) Conclusion:

En conclusion, malgré un stress génotoxique efficace, les conditions expérimentales utilisées ne nous ont pas permis d'observer la double déamidation massive décrite par l'équipe Weintraub dans ces mêmes conditions. Nous observons une simple déamidation, et seules quelques lignées semblent disposer d'une voie de signalisation fonctionnelle aboutissant à la déamidation/dégradation de Bcl-x_L. Il est possible que la simple déamidation soit un pré-requis pour observer la double déamidation, et même si nous avons utilisé exactement les conditions décrites par Dho et al, nous ne pouvons pas exclure qu'une durée de traitement plus longue nous aurait permis d'aboutir à une forme double déamidée de Bcl-x_L, comme publié par le laboratoire de Weintraub (Deverman et al. 2002; Dho et al. 2013).

Ces différentes expériences menées sur l'effet de la déamidation sur la stabilité de Bcl-x_L montrent que:

- 1) En condition contrôle, la déamidation (mono ou double) n'affecte pas sur la stabilité de Bcl-x_L.
- 2) Toutes les lignées ne disposent pas d'une voie fonctionnelle de déamidation/dégradation de Bcl-x_L en réponse à un stress génotoxique.
- 3) La simple déamidation suffit à induire la dégradation de Bcl-x_L dans certaines lignées en réponse au stress génotoxique.

B.2. Monodéamidation et propriété anti-apoptotique de Bcl-x_L:

Dans notre laboratoire, l'effet de la forme monodéamidée (N52DN66A) sur la fonction anti-apoptotique de Bcl-x_L a déjà été testé: l'apoptose a été induite par un traitement à la staurosporine sur les lignées HCT 116 P, HCT 116 Bcl-x_L et HCT 116 surexprimant les différents mutants de la déamidation de Bcl-x_L. L'induction de l'apoptose a été suivie par les mesures de taux de clivage de la protéine PARP 1 et des mesures de marquage annexine V / iodure de propidium et a montré une fonction anti-apoptotique intacte de la protéine monodéamidée. Des expériences de co-immunoprécipitation ont aussi montré que les mutants déamido-mimétiques conservent la même capacité que Bcl-x_L native à interagir avec Bax et Bim. Ces résultats ont été publiés (Beaumat et al. 2016).

J'ai poursuivi la caractérisation fonctionnelle du mutant Bcl-x_L N52DN66A. Dans la suite de ce chapitre, nous verrons comment la monodéamidation régule les fonctions oncogéniques de Bcl-x_L.

B.3. Monodéamidation et propriétés oncogéniques de Bcl-x_L:

Les oncogènes ont la faculté de modifier plusieurs paramètres cellulaires comme la prolifération, la migration et la formation de métastases. Nous avons décidé de tester l'effet de la monodéamidation sur les propriétés oncogéniques de Bcl-x_L.

a) Étude de la clonogénicité:

Dans une première approche, nous avons testé *in vitro* l'effet de la déamidation sur le potentiel clonogénique de Bcl-x_L en milieu semi-polymérisé, c'est à dire sur sa capacité à former des clones cellulaires en absence d'ancrage au substrat. Nous avons cultivé des cellules HCT 116 dans un milieu semi-polymérisé à base de collagène, et compté le nombre de clones formés après 3 semaines de culture (figure 25).

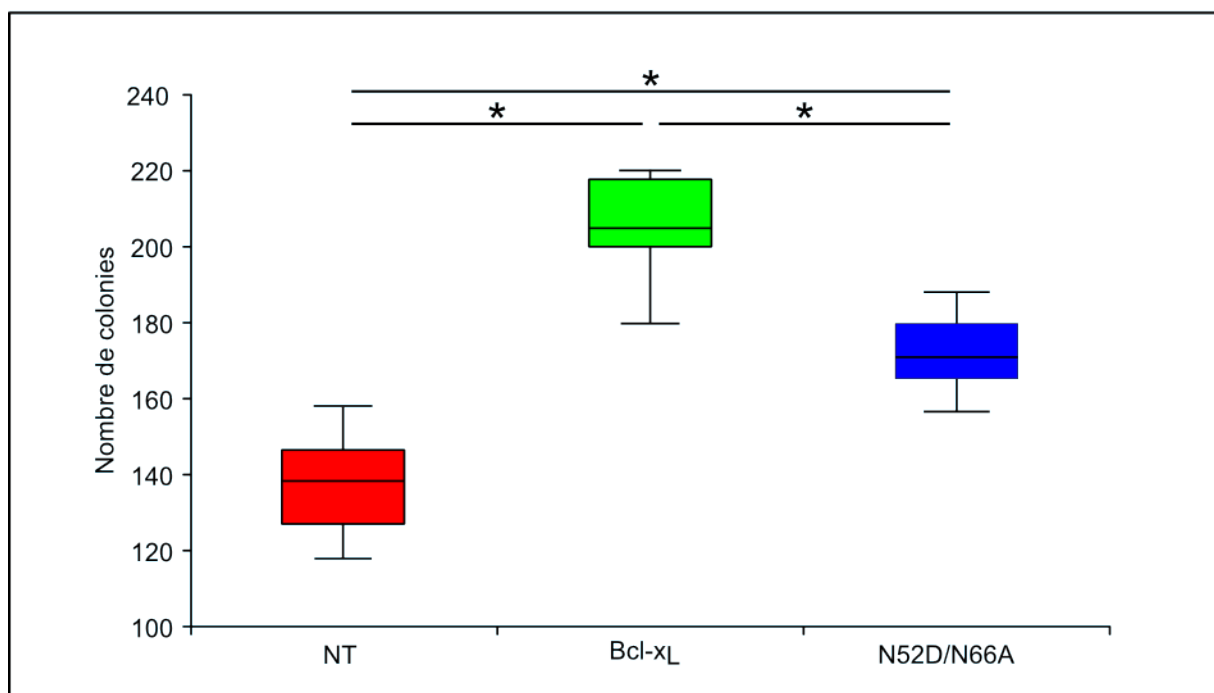


Figure 25: Test de croissance en milieu semi-solide des lignées HCT 116.

500 cellules sontensemencées dans un milieu semi-polymérisé en collagène (n=3, en 6 exemplaires) Un test de Fisher (PLSD) est utilisé pour les analyses statistiques (* p-value <0.0001).

Le nombre de clones formés à partir des cellules surexprimant Bcl-x_L augmente significativement comparativement aux cellules non infectées, ce qui vérifie l'effet oncogénique déjà connu de Bcl-x_L. Nous avons observé que ce nombre de clones formés à partir des cellules surexprimant la forme monodéamidée (N52D N66A Bcl-x_L) diminue significativement par rapport à la forme native de Bcl-x_L.

Nous avons pu conclure que le mutant mimant la monodéamidation de Bcl-x_L N52D N66A a un potentiel clonogénique diminué *in vitro*.

b) Étude de la tumorigénicité:

b.i) Approche *in ovo*:

Pour étudier l'effet de la déamidation sur le potentiel tumorigénique de Bcl-x_L, nous avons utilisé la membrane chorio-allantoïque de poulet (CAM) comme un modèle de greffe *ex-vivo*. Ce modèle nous permet de visualiser rapidement la formation de tumeurs puisque la CAM est richement vascularisée (figure 26).

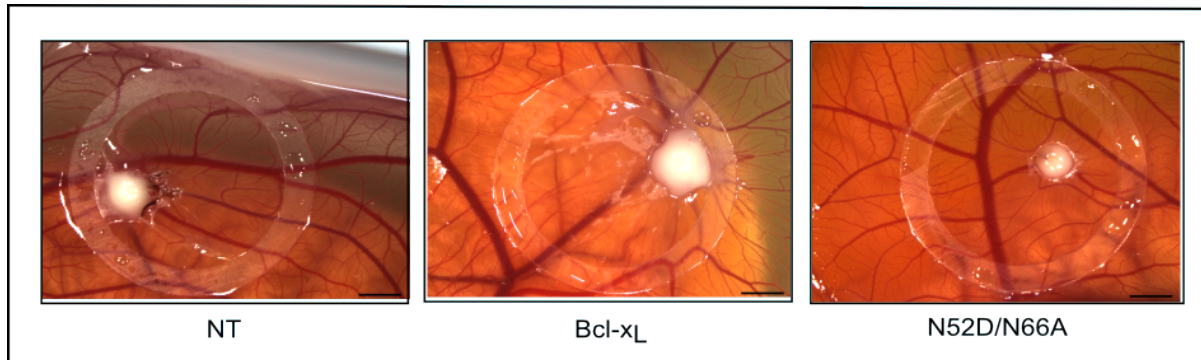


Figure 26: Étude *ex-vivo* sur une membrane chorio-allantoïque du poulet.

3 millions de cellules provenant des différentes lignées HCT 116 ont été greffées sur la membrane chorio-allantoïque du poulet. 3 jours après, une observation macroscopique est faite et permet de visualiser la tumeur formée (n=3, en triplicat).

3 jours après la greffe, nous avons observé que les tumeurs dérivées des cellules surexprimant Bcl-x_L sont plus grosses que celles dérivées des cellules HCT 116 parentales, ce qui valide la capacité tumorigène connue de Bcl-x_L. D'une façon intéressante, nous avons observé que les tumeurs dérivées des cellules surexprimant le mutant mimant la monodéamidation de Bcl-x_L (N52D N66A) sont plus petites que celle surexprimant Bcl-x_L native, **ceci montre que la forme monodéamidée de Bcl-x_L (N52D N66A) a des propriétés tumorigéniques altérées par rapport à Bcl-x_L.**

La dérégulation de la prolifération cellulaire est une des propriétés remarquables des oncogènes. Pour étudier l'effet de la monodéamidation sur la capacité proliférative de Bcl-x_L, nous avons effectué des analyses histologiques sur des coupes de tumeurs excisés de la greffe de CAM, et en utilisant Ki67 comme marqueur de prolifération (figure 27).

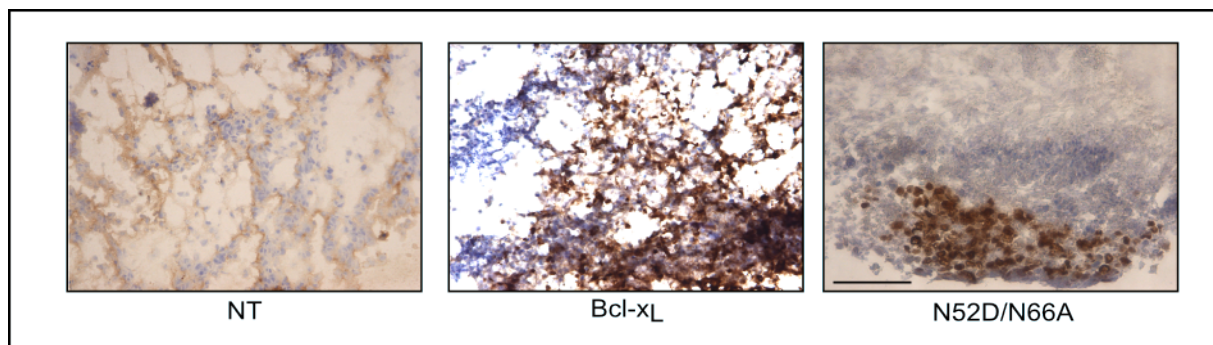


Figure 27: Expression de Ki67 par immunohistochimie sur des coupes de tumeurs issues des expériences sur CAM.

Des sections de tumeurs obtenues à partir des cellules surexprimant Bcl-x_L et sa forme monodéamidée N52D/N66A sont réalisées, puis marquées par des anticorps contre Ki67 utilisé comme marqueur de prolifération (n=3)

L'analyse de l'expression de Ki67 montre que plus de 90 % des cellules tumorales dérivées de la lignée HCT116 Bcl-x_L native expriment ce marqueur de prolifération, tandis que ce marquage est diminué chez celles dérivées des cellules surexprimant Bcl-x_L N52D N66A. **Donc, l'expression de la forme monodéamidée (N52D N66A) diminue l'effet prolifératif de l'oncogène Bcl-x_L.**

b.ii) Approche *in vivo*:

Cette étude de la tumorigénicité *ex vivo* a été complétée par une approche *in vivo* où nous avons greffé des souris «nudes» avec les mêmes cellules HCT 116 que pour le test CAM (figure 28).

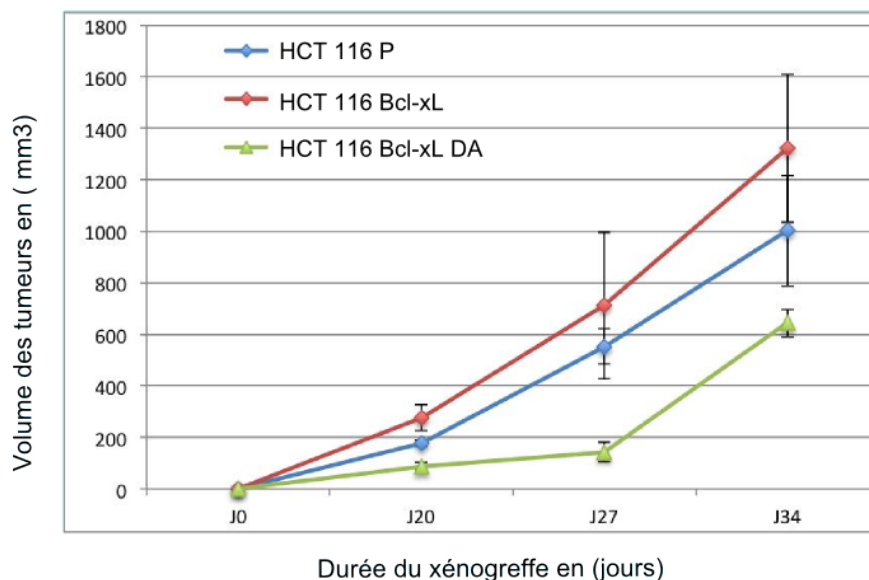
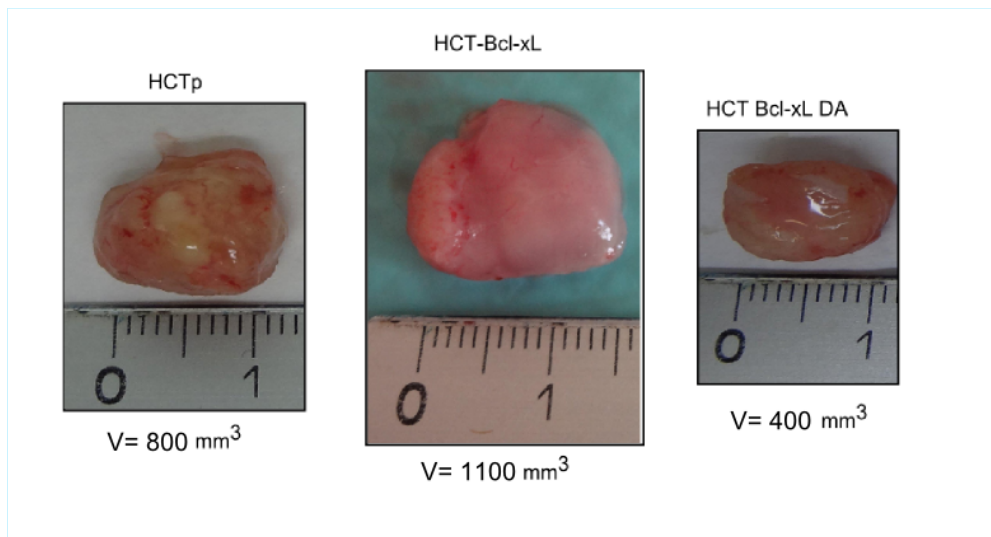


Figure 28: Taille des tumeurs après xéno greffe des cellules HCT 116 sur des souris nudes.

1 million de cellules HCT 116 exprimant les différentes formes de Bcl-x_L ont été greffées dans la patte antérieure de l'animal. La croissance tumorale a été suivie pendant un mois, avant le sacrifice de l'animal et le prélèvement de la tumeur. (n=5 pour chaque groupe).

La figure ci-dessus montre l'évolution de la taille des tumeurs au cours de la greffe et un exemple de tumeurs excisées un mois après la greffe. Nous pouvons constater que les tumeurs dérivées des cellules surexprimant Bcl-x_L sont plus grosses que celles dérivées des cellules HCT 116 parentales, ce qui confirme la capacité tumorigène connue de Bcl-x_L. Cependant, les tumeurs dérivées des cellules surexprimant le mutant mimant la monodéamidation de Bcl-x_L (N52D N66A) sont plus petites que celle surexprimant Bcl-x_L native, ceci confirme les résultats

observés *ex-vivo* sur la membrane chorio-allantoïque du poulet.

c) Conclusion:

Nous pouvons conclure de l'ensemble de ces expériences que l'expression de la forme monodéamidée de Bcl-x_L (N52D N66A) altère ses propriétés oncogéniques et tumorigènes *in vitro*, *ex-vivo* et *in vivo*.

B.4. Monodéamidation de Bcl-x_L et cellules souches cancéreuses (CSC):

La baisse des capacités tumorigènes de la forme monodéamidée de Bcl-x_L pourrait être due à une variation quantitative et/ou qualitative du compartiment des cellules souches cancéreuses (CSC). En effet, selon la théorie des CSC, ces cellules ont la capacité de s'auto-renouveler, de se différencier en cellules non-souches et d'initier la formation d'une nouvelle tumeur. Cette petite sous-population serait donc l'unique support de la capacité tumorigène à l'origine de la formation d'une structure ayant une organisation hiérarchique. Par ailleurs, ces cellules, caractérisées par un cycle cellulaire long, seraient, pour la plupart, résistantes aux thérapies visant les cellules cyclantes. Pour tester cette hypothèse, nous avons analysé quelques propriétés caractéristiques de ces cellules dans les 3 lignées cellulaires.

a) Analyse de marqueurs des cellules souches

Il est assez difficile de mettre en évidence la présence de CSC dans une population cellulaire car il n'existe pas de marqueur formel et incontestable de ce compartiment. Nous avons donc recherché l'expression de plusieurs d'entre eux par deux approches complémentaires.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'expression de marqueurs connus pour être associés au phénotype «souche». Nous avons réalisé une analyse transcriptionnelle du transcrit BMI1, connue comme un facteur de transcription spécifique des cellules souches. L'expression de ce transcrit a été quantifiée par Q-RT-PCR (figure 29).

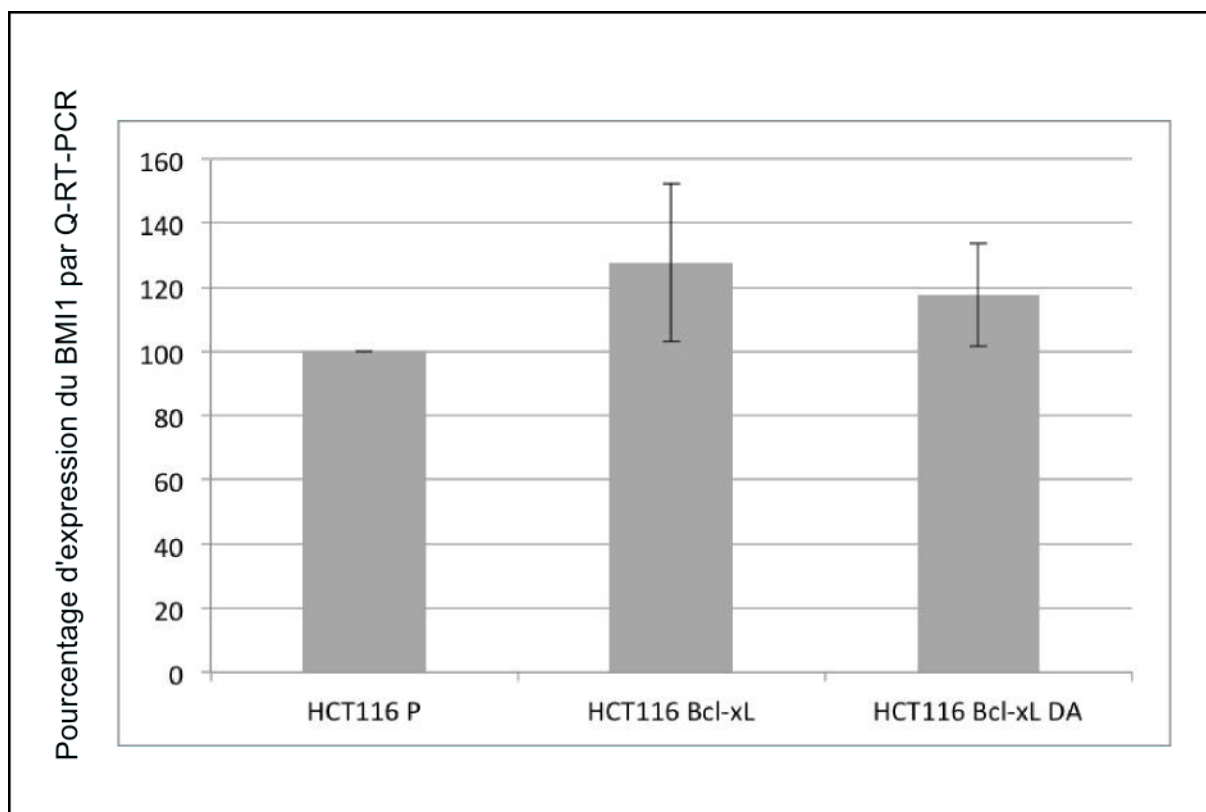


Figure 29: Analyse d'expression du transcrit BMI1 par RT-QPCR dans les lignées cellulaires HCT 116

La quantification du transcrit BMI1 a été réalisée par RT-PCR quantitative en référence à celle du gène de ménage GAPDH; les valeurs obtenues pour les cellules HCT 116 P sont utilisées comme référence pour déterminer les variations d'expression de BMI1 (n=1 en triplicat).

La figure ci-dessus montre que la quantification du facteur BMI1 par Q-RT-PCR présente de petites variations avec une augmentation dans la lignée sur-exprimant Bcl-x_L dans sa forme native, celle-ci étant plus faible lorsque la protéine est monodéamidée.

Remarque: la recherche de l'expression du transcrit de LGR5 (récepteur fortement exprimé dans les CSC) par la même approche n'a pas pu être exploitée en raison de la trop faible expression de ce transcrit dans les conditions testées.

Comme l'analyse transcriptionnelle des marqueurs de CS n'était pas suffisante pour montrer une différence de l'état souche entre les différentes lignées, nous avons complété cette étude par l'analyse de l'expression protéique d'un autre marqueur connu pour être associé au phénotype souche. Oct 4 est un facteur de transcription exprimé et actif dans les cellules souches donc sa localisation (nucléaire) est très importante. Son expression et sa localisation ont été analysés

par immunofluorescence. Les résultats sont présentés dans la figure 30.

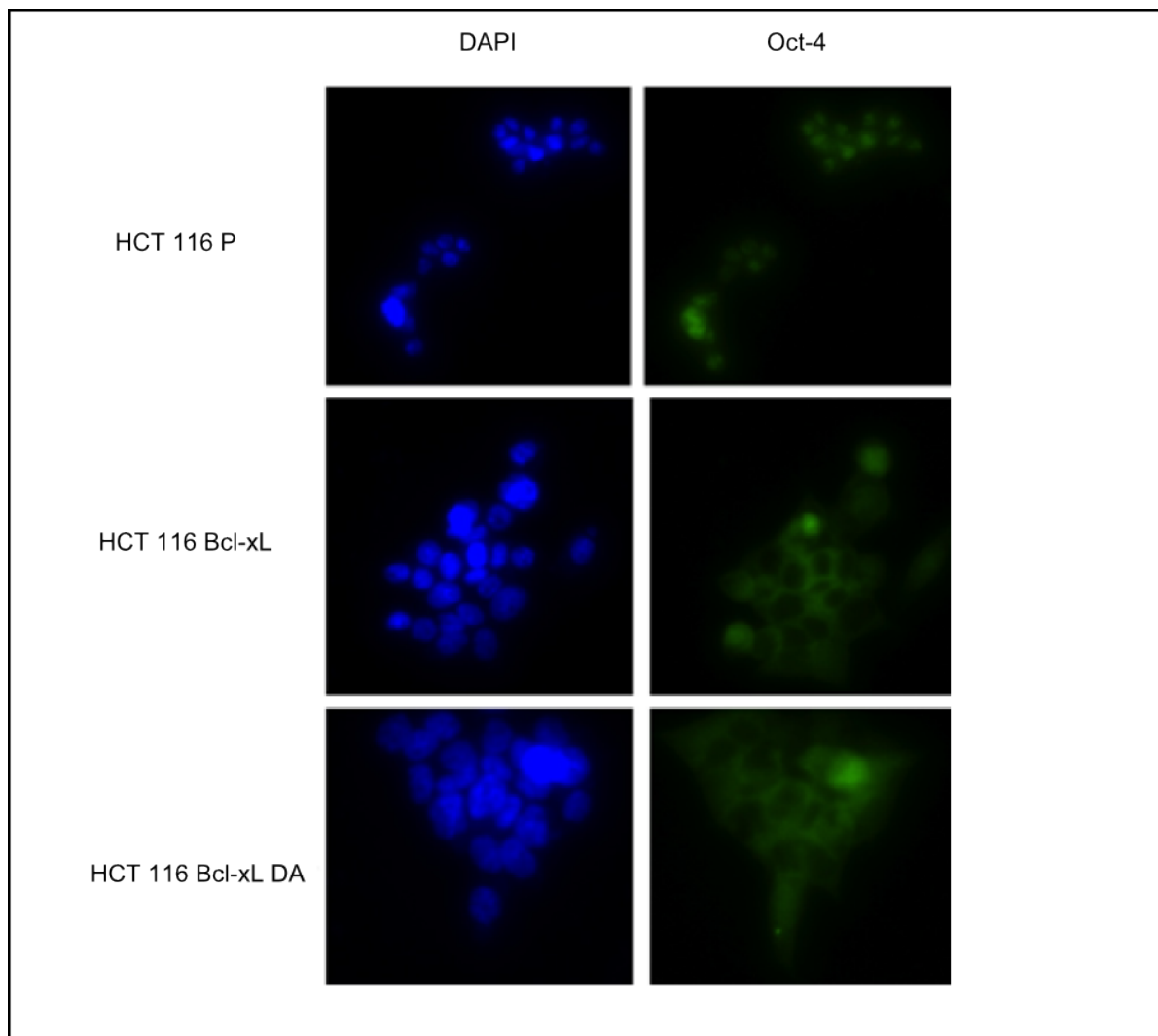


Figure 30: Expression et de localisation du facteur de transcription Oct-4 par Immunofluorescence indirecte:

10000 cellules sont cultivées sur des lames labtech pendant 24h. Afin de visualiser la localisation cytoplasmique/nucléaire, ces cellules sont incubées avec l'anticorps anti-Oct-4 puis marquées avec l'anticorps secondaire Alexa 488 (en vert). Le marquage nucléaire est détecté avec le DAPI (coloration bleue). Le marquage est observé à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence, puis les images sont traitées avec le logiciel Image J (n=3).

L'analyse par immunofluorescence de l'expression d'Oct4 montre que les 3 lignées cellulaires expriment le facteur de transcription. Cependant, il y a peu de colocalisation du marquage DAPI (nucléaire) avec le marquage Alexa488 (Oct4), indiquant une localisation majoritairement cytoplasmique, en faveur d'une absence d'activité de ce facteur de transcription.

b) Sensibilité au traitement 5-Fluorouracil (5FU):

Une des caractéristiques des CSC repose sur leur résistance aux traitements anticancéreux car ce sont des cellules peu cyclantes. Nous avons donc recherché si les trois lignées HCT116 présentent des différences de sensibilité au 5FU, chimiothérapie fréquemment utilisée dans le traitement du cancer colorectal en bloquant la synthèse de l'ADN en phase S.

Afin de déterminer l'IC-50 (représentant l'inhibition de 50 % de la croissance cellulaire) du 5-FU, la cytotoxicité de différentes concentrations (0-20 μM) a été déterminée pour les trois lignées par un test de cytotoxicité XTT après 48h de culture en présence de la drogue (figure 31).

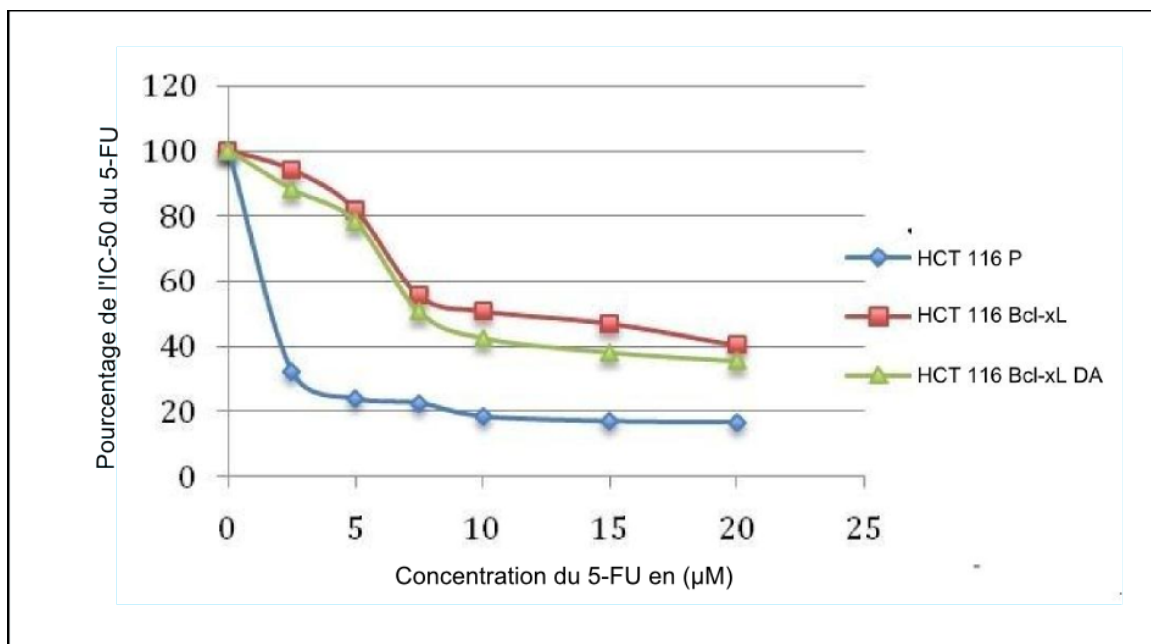


Figure 31: Détermination de l'IC-50 du 5-FU pour les différentes lignées cellulaires.

La survie cellulaire a été déterminée par un test XTT, après 48H de culture en présence d'un traitement au 5-FU pour des concentrations croissantes de 0 à 20 μM (n=2, en triplicat).

Nous observons que les cellules HCT116 parentales présentent une grande sensibilité au 5-FU puisque dès la 1^{ère} concentration (2.5 μM), une perte d'environ 60% de la viabilité est observée. Pour les lignées surexprimant Bcl-x_L dans sa forme native ou déamidée, une concentration de 7.5 μM permet d'atteindre leur IC-50. Cette plus grande résistance au 5-FU (par rapport à la lignée parentale) pourrait être due à la surexpression de Bcl-x_L, que la protéine soit déamidée ou non.

Cette première approche, réalisée sur les lignées cellulaires non triées, ne révèle que très peu de différences imputables à la déamidation de Bcl-x_L. Cela pourrait être dû à la très faible proportion de CSC dans les cultures. Pour cibler plus spécifiquement cette sous-population cellulaire, nous avons essayé d'enrichir les cultures en CSC par une technique originale, la sdFFF (collaboration avec Pr. Serge Battu).

c) Enrichissement en CSC par sdFFF:

La sdFFF est une technique reposant sur le tri des cellules en fonction de leurs caractéristiques physiques, développée dans le laboratoire EA 3842 de l'Université de Limoges. Des travaux précédents de l'équipe ont montré son efficacité pour l'enrichissement en CSC issues de la lignée HCT116 dans la 1^{ère} fraction éluée, F1 (Mélin et al. 2012).

Les cellules ont été triées par sdFFF et l'absorbance à 254nm a été suivie au cours de l'élution du pic total des cellules. Les trois fractogrammes ainsi obtenus ont été superposés (figure 32) (A). A l'issue du tri, les cellules ont été cultivées en labteck et leur morphologie a été observée (figure 32) (B).

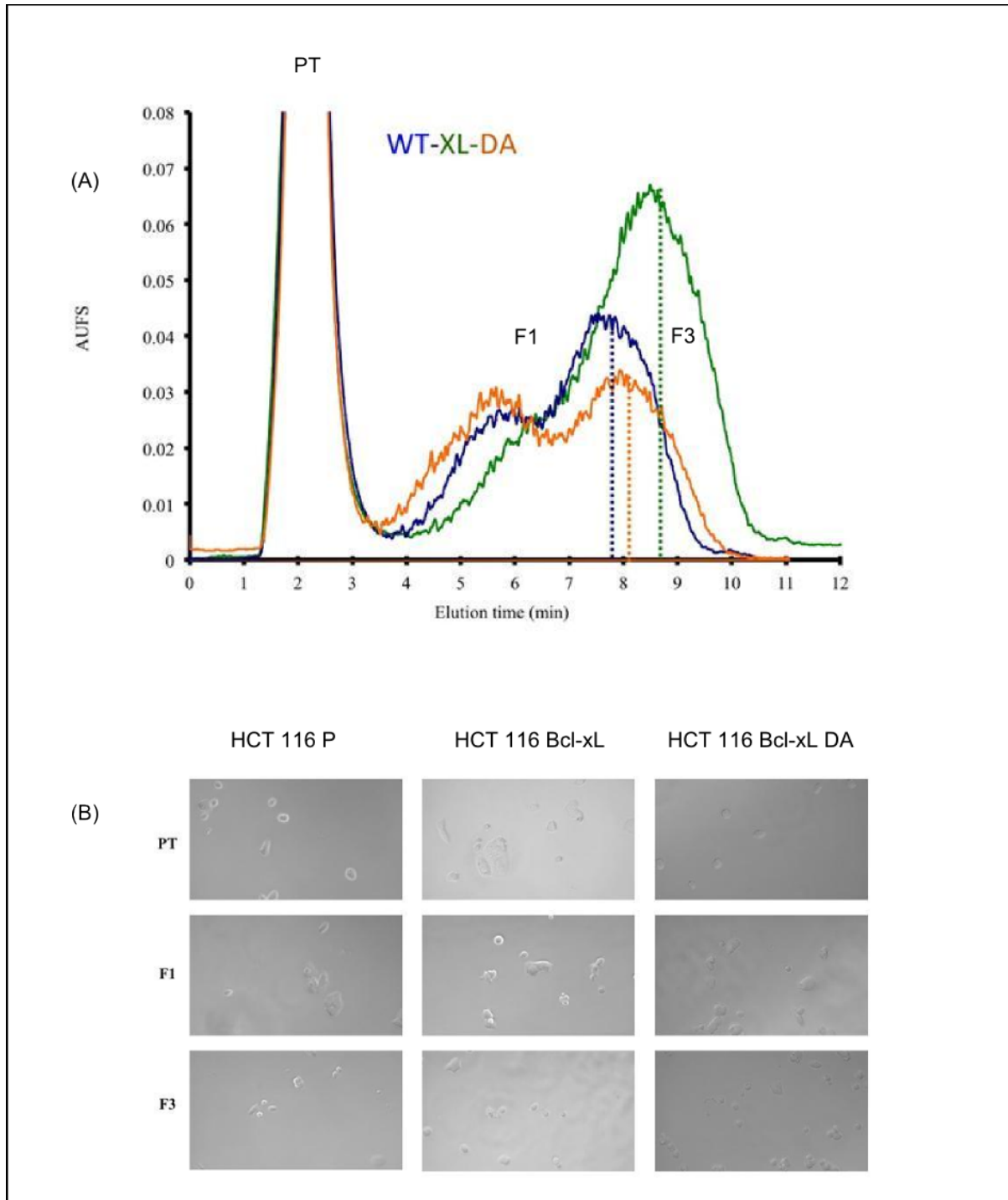


Figure 32: Fractogrammes obtenues à partir des cellules triées par sdFFF

$2,5 \cdot 10^5$ cellules sont injectées, puis séparées en fonction du temps d'éluion dépendant des critères physiques (taille, densité,...). Les profils d'éluion de 3 lignées cellulaires HCT 116 sont représentés dans la **figure (A)**. Les différentes fractions ont été cultivées en labteck et observées par microscope **figure (B)**. PT: pic total, F1: fraction F1, F3: fraction F3 (n=5).

Les fractogrammes montrent une différence de profil d'éluion entre les trois lignées, avec un déplacement vers la gauche (fraction F1) de la lignée surexprimant Bcl-x_L monodéamidée. Comme attendu, les cellules présentes en F1 sont de plus

grande taille que celles éluées en F3. Cette analyse est en faveur d'une augmentation de la sous-population de cellules souches (fraction F1) dans la lignée Bcl-x_L N52DN66A.

d) Déamidation de Bcl-x_L dans la fraction F1:

Pour tester le lien entre la déamidation et la phénotype «souche» des cellules, nous avons alors évalué par western blot la déamidation de Bcl-x_L dans les différentes fractions issues de la lignée sauvage (figure 33).

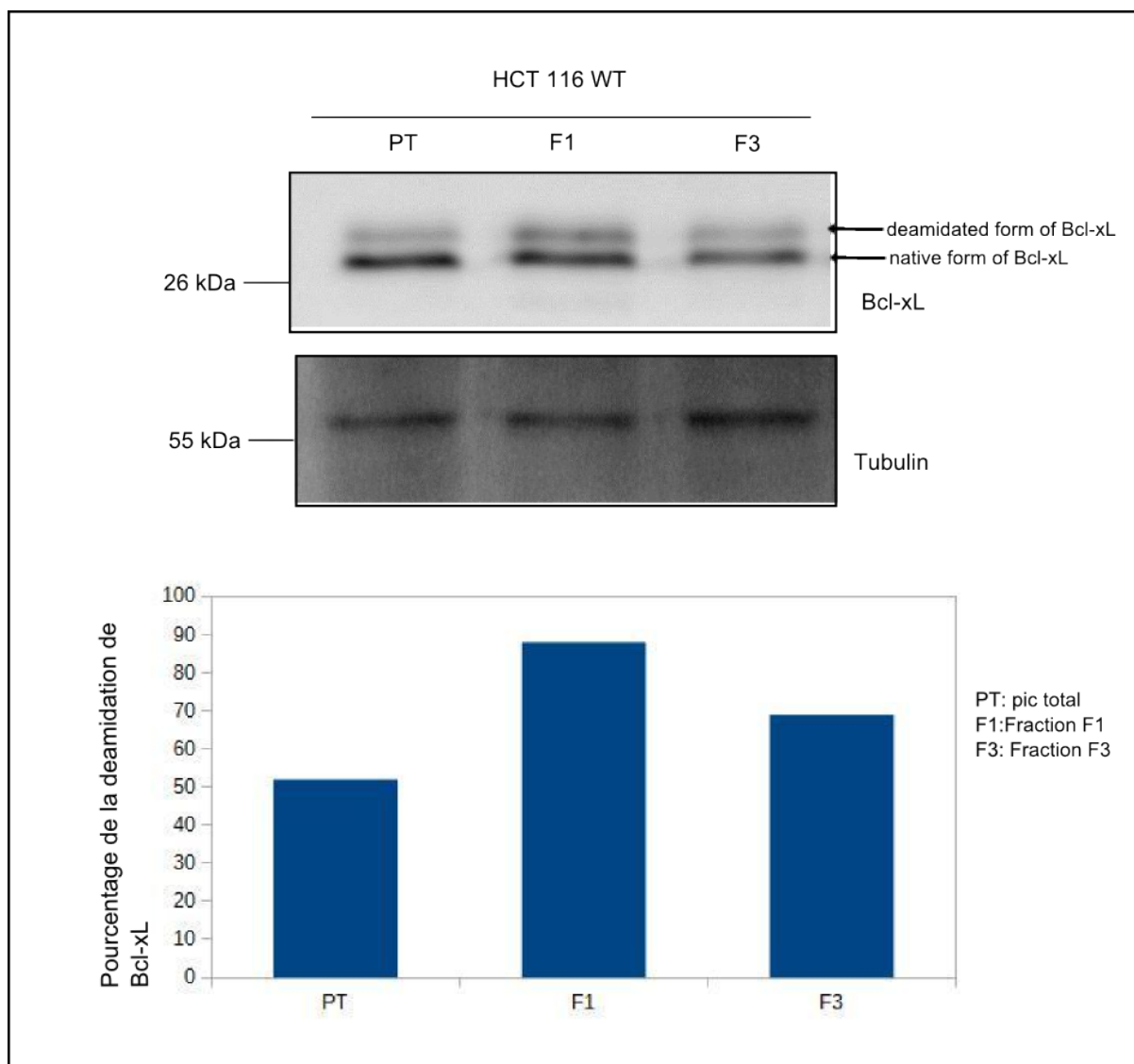


Figure 33: Déamidation de Bcl-x_L dans les fractions triées de la lignée HCT 116 P par sdFFF

Les extraits protéiques totaux issues des fractions (PT, F1, F3) triées de la lignée HCT 116P par sdFFF sont soumis à une électrophorèse de type Tris-SDS-PAGE afin de réaliser un western blot contre Bcl-x_L et la tubuline utilisée comme un contrôle de charge. La quantification de la déamidation de Bcl-x_L a été faite par le logiciel Image J (n=1).

L'analyse par western blot montre que la première fraction éluée par sdFFF, correspondant à une fraction enrichie en CSC, est plus riche en forme monodéamidée de Bcl-x_L. Ceci est complété par une analyse quantitative du pourcentage de déamidation de la protéine totale Bcl-x_L. Cette analyse montre un pourcentage de déamidation élevé (88%) dans la fraction F1 comparativement aux fractions (PT et F3). Cette observation va dans le sens d'un lien existant entre cette modification post-traductionnelle et le compartiment des CSC.

D'autres analyses, en particulier la recherche de l'expression d'un plus grand nombre de marqueurs de cellules souches devront être réalisées sur les fractions issues du tri par SdFFF. Les premiers essais pour enrichir ce compartiment, par tri à l'aide de la SdFFF, devront être poursuivis par des tests fonctionnels pour améliorer les résultats et performances de cet enrichissement.

B.5. Monodéamidation de Bcl-x_L et métabolisme cellulaire:

a) Mesure de la taille des cellules:

Les résultats obtenus par les expériences de xénogreffes nous permettent de suggérer que la petite taille des tumeurs dérivées des cellules surexprimant Bcl-x_L N52D N66A pourrait être due soit à une différence de la taille des cellules, soit à un ralentissement de la croissance cellulaire.

Pour vérifier la première hypothèse, le volume des cellules HCT 116 parentales, HCT 116 Bcl-x_L et HCT 116 Bcl-x_L N52D N66A a été mesuré à l'aide d'un "Coulter Counter" (collaboration avec le Pr Michel Moenner, IBGC). Les données sont traitées par le logiciel Multisizer 4. Les résultats sont présentés dans la figure 34.

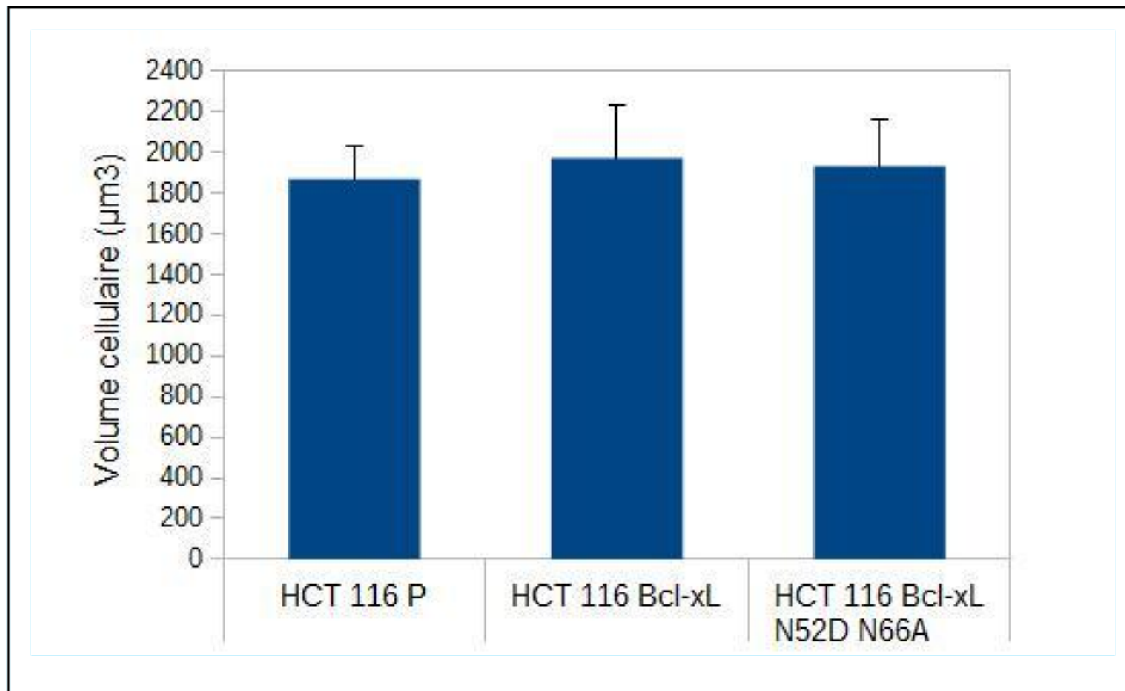


Figure 34: Mesure du volume cellulaire (μm^3) chez les lignées HCT 116

Des lignées HCT116 P, HCT116 Bcl-x_L, et HCT116 Bcl-x_L N52D N66A sont décollées avec de la trypsine. Le volume cellulaire est mesuré en (μm^3) à l'aide d'un coulter counter (n=4).

Cette figure nous montre que la taille des cellules ne varie pas entre les lignées HCT 116 testées. Nous avons confirmé ces résultats par des mesures du volume cellulaire effectués sur d'autres lignées comme les U2OS (figure 35).

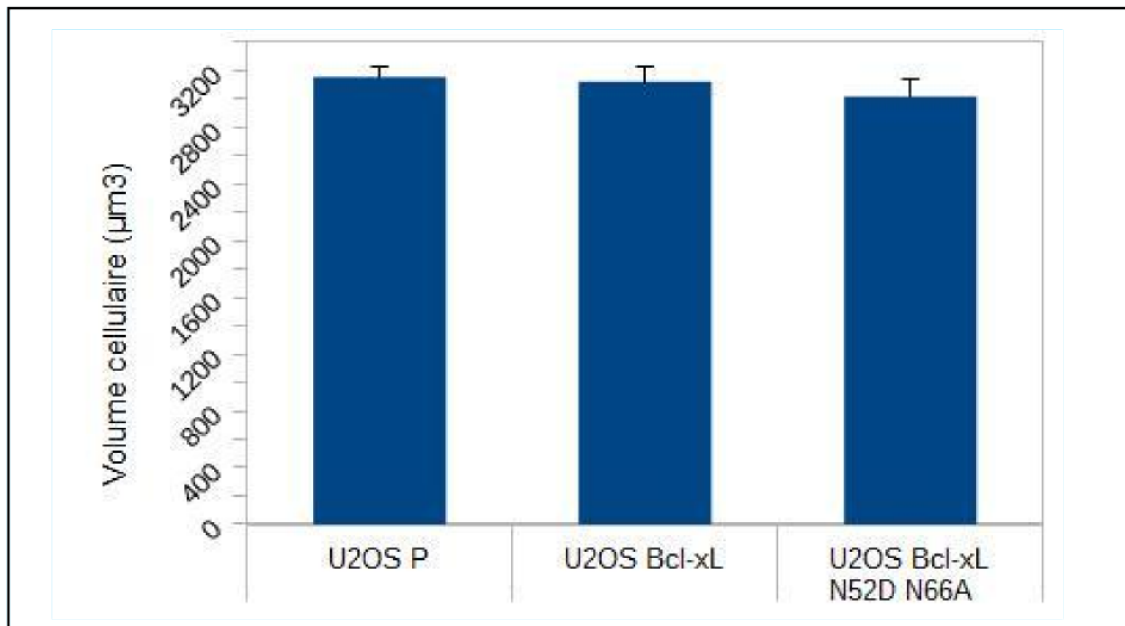


Figure 35: Mesure du volume cellulaire (μm^3) chez les lignées U2OS.

Des lignées U2OS P, U2OS Bcl-xL, et U2OS Bcl-xL N52D N66A sont décollées par le trypsine. Le volume cellulaire est mesuré en (μm^3) à l'aide d'un coulter counter (n=4)

Là encore, on n'observe aucune différence de taille entre les 3 lignées cellulaires.

Donc, nous pouvons conclure que la différence de taille entre les tumeurs dérivées des cellules surexprimant soit Bcl-x_L soit sa forme monodéamidée, n'est pas liée à une différence de taille des cellules greffées.

b) Effet de la monodéamidation de Bcl-x_L sur le métabolisme cellulaire:

Dans l'intention de relier les observations faites avec Bcl-x_L N52D N66A *in vitro* (diminution de clonogénécité en milieu semi-polymérisé) et *in vivo* (formation de tumeurs plus petites), nous avons supposé que lorsque les cellules exprimant ce mutant sont xéno greffées sur CAM ou sur souris, elles prolifèrent moins vite que les cellules exprimant Bcl-x_L native.

Nous savons que la croissance et la prolifération cellulaire sont contrôlées par l'activité métabolique des cellules. Nous avons donc poursuivi ce travail en testant l'effet de la monodéamidation de Bcl-x_L sur le métabolisme cellulaire.

Dans les cellules des mammifères, il y a deux possibilités permettant d'obtenir de l'énergie à partir de glucose, qui est la source de carbone physiologique des cellules. La première est la glycolyse et permet l'obtention d'ATP et NADH à partir d'ADP et NAD. Dans ce cas, le glucose est transformé en pyruvate, puis réduit en lactate (fermentation lactique) dans le cytoplasme et en absence d'O₂. La deuxième possibilité est la phosphorylation oxydative (OXPHOS), qui a lieu dans les mitochondries et en présence d'O₂.

La phosphorylation oxydative (OXPHOS) permet le transfert d'électrons depuis les molécules réductrices (NADH) vers des oxydants (O₂) à travers une série de réactions d'oxydo-réduction dans les complexes (I-IV) de la chaîne respiratoire qui, en même temps, pompe des protons (H⁺) depuis la matrice vers l'espace inter-membranaire. Le gradient de protons générés par la chaîne respiratoire est utilisé par l'ATP synthase pour synthétiser l'ATP à partir d'ADP et Pi. La consommation d'oxygène est donc couplée à la synthèse d'ATP (figure 36).

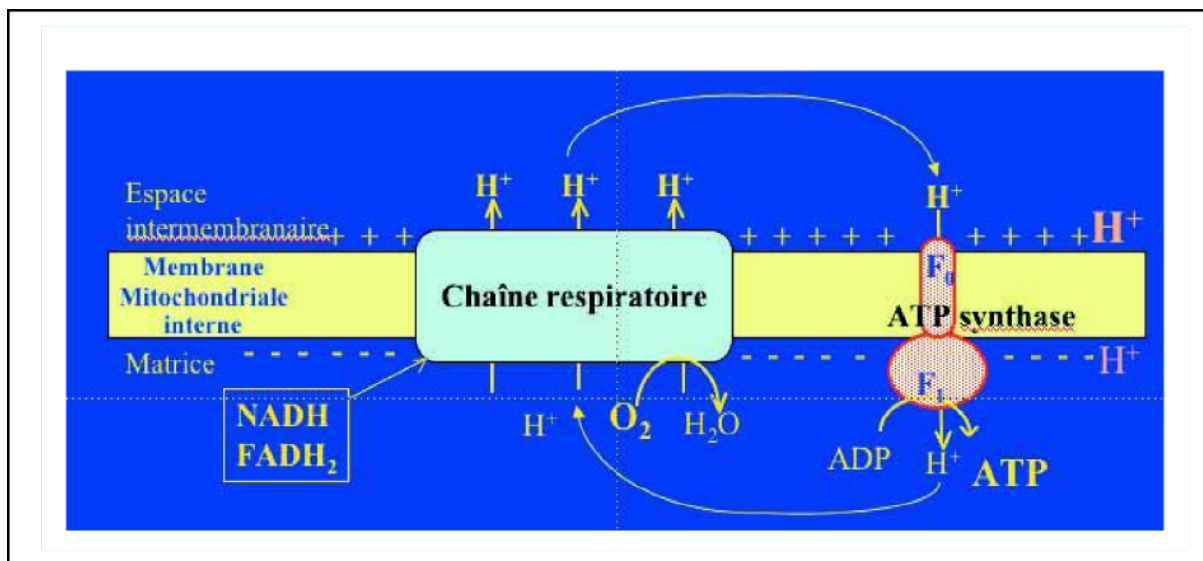


Figure 36: Fonctionnement de la phosphorylation oxydative mitochondriale illustrant le couplage de la chaîne respiratoire avec la phosphorylation de l'ADP en ATP par l'ATP synthase.

Les oxydations accompagnant la circulation des électrons le long de la chaîne respiratoire libèrent de l'énergie utilisée par des pompes à protons pour générer un gradient de concentration de protons autour de la membrane mitochondriale interne. Le gradient électrochimique qui en résulte fournit l'énergie nécessaire qui permet à l'ATP synthase de produire de l'ATP (**Razungles et al. 2013**).

En 1930, lors de ses observations sur des cellules cancéreuses, Otto H. Warburg a remarqué une concentration anormalement élevée de lactate. Or, cet acide est le

résultat d'une fermentation du glucose. Ayant démontré que les cellules cancéreuses changent leur métabolisme pour adopter un métabolisme anaérobie, O. Warburg a émis l'hypothèse selon laquelle les cellules cancéreuses n'ont pas besoin d'un milieu riche en oxygène pour se développer. Donc, dans les tumeurs, les cellules cancéreuses produisent de l'énergie (ATP) via la glycolyse au lieu de la phosphorylation oxydative, même en présence d'oxygène.

La glycolyse en aérobiose, tout comme la glycolyse en anaérobiose, a lieu dans le cytosol, et aboutit à la production de pyruvate à partir du glucose, à la phosphorylation de l'ADP en ATP et à la ré-oxydation du NADH en NAD (lors de la réduction du lactate) (Razungles et al. 2013) pour revue.

b.i) Mesure de la vitesse glycolytique des cellules HCT 116

Nous avons émis l'hypothèse que le ralentissement de la croissance cellulaire observée dans les cellules exprimant la forme monodéamidée de Bcl-x_L pourrait être lié à une diminution de l'activité métabolique des cellules.

Pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré dans un premier temps la vitesse glycolytique dans les lignées HCT 116 (collaboration avec le Dr. Anne Devin, IBGC).

Dans une première série d'expériences, nous avons déterminé le flux glycolytique qui est reflété par la production de lactate (produit par fermentation du pyruvate) en fonction du temps. Pour ce faire, nous avonsensemencé les différentes lignées cellulaires dans un milieu à une forte concentration de glucose (4,5 g/L), puis nous avons déterminé le flux glycolytique 2 et 4 jours après la culture. Les résultats obtenues sont représentés dans la figure 37.

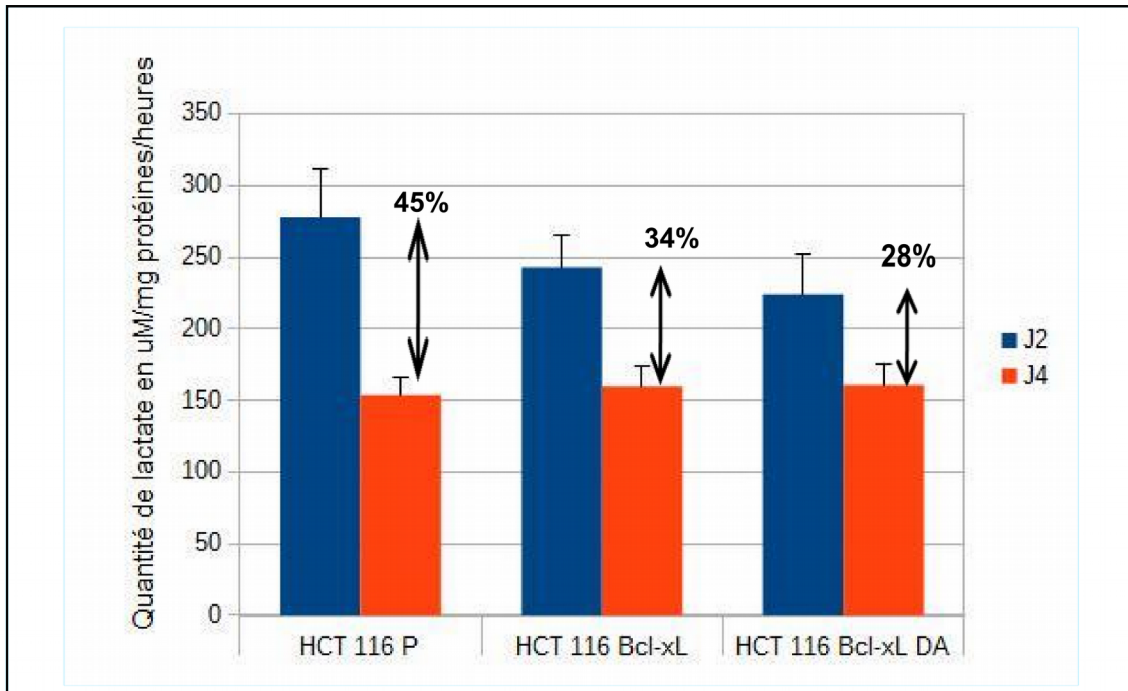


Figure 37: Mesure du flux glycolytique chez les lignées HCT 116 cultivées en forte concentration de glucose avec une cinétique de 2 et 4 jours.

Des lignées HCT 116 P, HCT 116 Bcl-x_L, HCT 116 Bcl-x_L DA ont été cultivées dans un milieu à une forte concentration du glucose (4,5 g/L) pendant 2 et 4 jours avec une confluence croissante qui varie entre 40 et 80%. Le flux glycolytique a été mesuré en normalisant la quantité de lactate produite en µM avec la quantité de protéine en (mg) en fonction du temps (heures) (n=3). L'analyse statistique a été faite par un test de student (t-test).

D'après l'analyse statistique, la diminution du flux glycolytique observée après 2 jours de culture n'est pas significativement différente entre les différentes lignées testées. Cela signifie que le flux glycolytique ne varie pas, ni en cas de surexpression de Bcl-x_L, ni en cas de déamidation.

La culture dans un milieu contenant 4,5 g/L de glucose n'étant pas physiologique, nous avons voulu nous rapprocher des conditions de glycémie normale pour voir si nous pouvions mettre en évidence une différence d'activité glycolytique dans ces nouvelles conditions.

Pour ce faire, nous avonsensemencé les différentes lignées cellulaires dans un milieu contenant 1 g/L de glucose, puis nous avons déterminé le flux glycolytique après 12 et 24 heures. Les résultats sont présentés dans la figure 38.

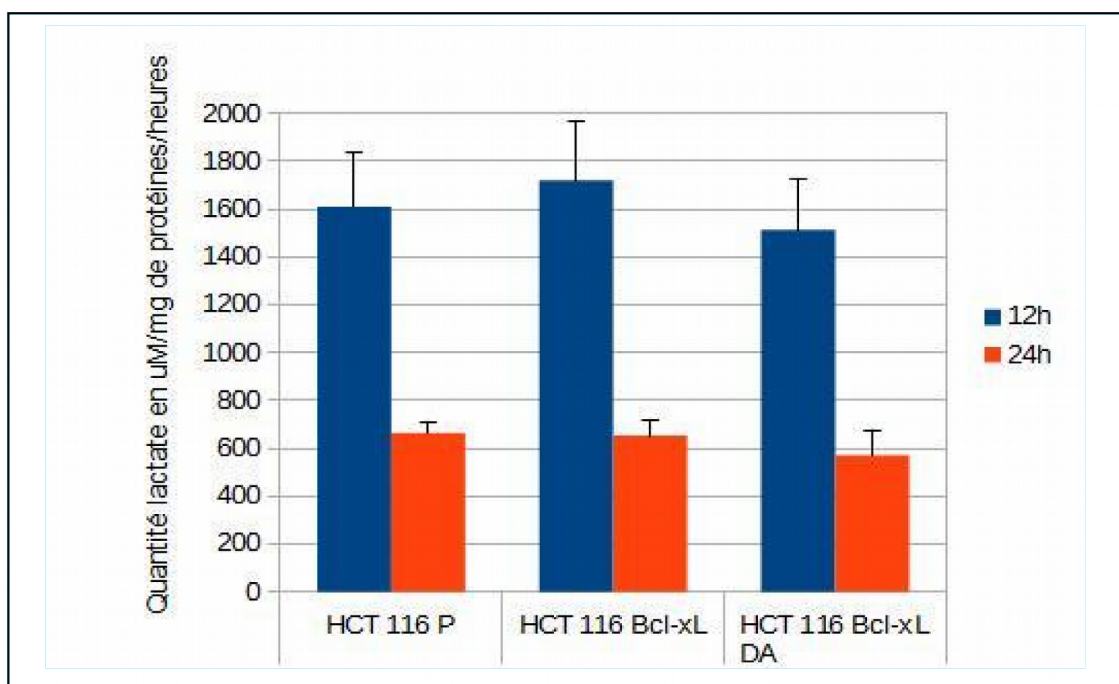


Figure 38: Mesure du flux glycolytique chez les lignées HCT 116 cultivées en faible concentration de glucose avec une cinétique de 12 et 24 heures

Des lignées HCT 116 P, HCT 116 Bcl-x_L, HCT 116 Bcl-x_L DA ont été cultivées dans un milieu en faible concentration de glucose (1g/L) pendant 12h et 24h, avec une confluence croissante qui varie entre 40 et 80%. Le flux glycolytique a été mesuré en normalisant la quantité de lactate produite en µM avec la quantité de protéine en (mg) en fonction du temps (heures) (n=3).

La figure montre qu'après 12h, le flux glycolytique est comparable dans les lignées testées. Après 24h, on remarque une diminution importante de ce flux chez toutes lignées cellulaires. Cela s'explique par le fait que les cellules ont consommé tout le glucose au bout de 12h. Par contre, cette diminution de ce flux ne varie pas en fonction des lignées cellulaires testées.

Donc le flux glycolytique ne varie pas, ni en cas de surexpression de Bcl-x_L, ni en cas de déamidation dans ces conditions. Il est possible que les conditions expérimentales définies par la culture *in vitro* des cellules (pression en O₂, adhérence sur des boîtes en plastique, glycémie...) ne récapitulent pas des conditions de croissance *in vivo* (nutrition et vascularisation des cellules).

b.ii) Mesure de la respiration mitochondriale:

Nous avons mesuré le flux respiratoire des cellules après les avoir adaptées pendant une semaine à différentes sources de carbone. Ce travail a été effectué en

collaboration avec le Dr Arnaud Mourier (IBGC).

Ces expériences ont été réalisées dans 3 conditions différentes, où les cellules ont été cultivées en présence de différents substrats carbonés. Les résultats des mesures d'activité respiratoire sont présentés dans la figure 39, où le flux d'O₂ a été mesuré dans différents états respiratoires:

- Respiration endogène (endo), c'est la mesure du flux d'O₂ couplé à la pompe ATP synthase qui permet la synthèse d'ATP.

- Respiration découplée de l'ATP synthase en présence de CCCP: les ions H⁺ rentrent dans la matrice grâce à ce découplant et on mesure le flux maximal d'O₂.

- Respiration non phosphorylante en présence d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase): l'entrée des H⁺ à travers l'ATP synthase est inhibée, ce qui réduit le pompage de protons par la chaîne respiratoire, le transfert d'électrons et donc la réduction de l'O₂ par le complexe IV.

- Respiration inhibée en présence de l'inhibiteur de complexe III de la chaîne respiratoire (Antimycine A). Cette condition permet de mesurer la consommation d'oxygène non mitochondriale, c'est à dire celle qui n'est pas liée au fonctionnement de la chaîne respiratoire.

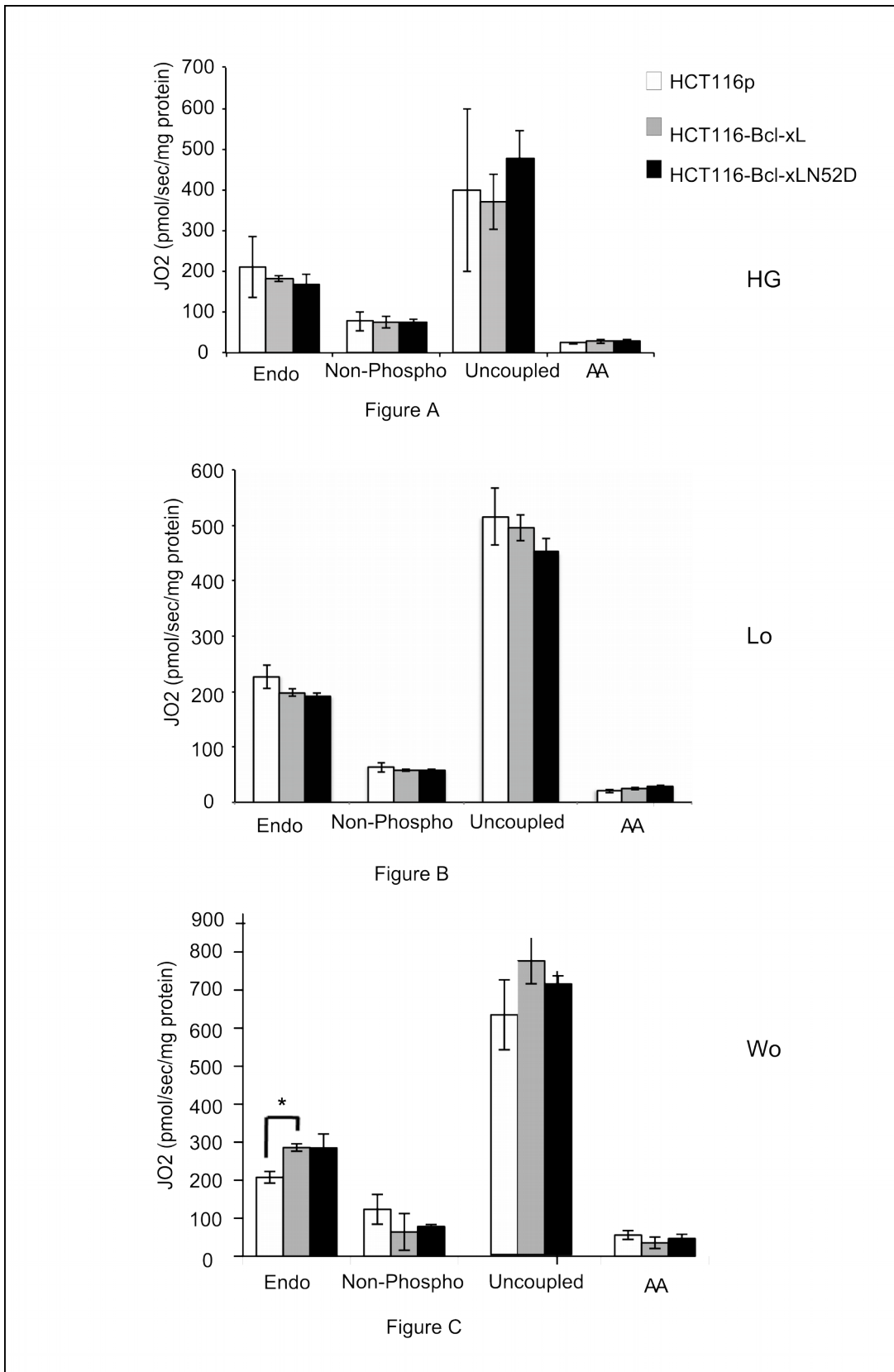


Figure 39: Mesure de la respiration mitochondriale dans les lignées HCT 116

Des cellules HCT116 exprimant Bcl-xL et Bcl-xL N52DN66A sont cultivées dans 3 milieux différents: milieu Optimem, HG=high glucose (A), DMEM à faible concentration du glucose, Lo=low glucose (B), et milieu supplémenté en pyruvate, glutamine et galactose, Wo=without glucose. La consommation d'oxygène est mesurée par oxygraph 2K. La respiration cellulaire est normalisée à la quantité de protéines (mg) (n=4). L'analyse statistique a été fait par un test de student (t-test) (* p-value<0,05).

Nous avons observé que les différents traitements ont les effets attendus dans toutes les lignées testées, avec une augmentation importante du flux d'O₂ avec le découplant CCCP et une réduction du flux en présence d'oligomycine: ces données confirment l'inhibition de la pompe ATP synthase et que le flux d'O₂ est couplé par cette pompe. Le faible flux d'O₂ observé en présence de l'antimycine A confirme que le flux d'O₂ mesuré dans les autres conditions est majoritairement dû à la respiration mitochondriale.

Dans une première approche (figure 39) (A), les cellules sont cultivées dans un milieu à forte concentration de glucose (4,5 g/L), utilisé comme condition contrôle. Dans ces conditions, nous n'observons aucune différence du flux d'O₂ entre les trois lignées cellulaires, quel que ce soit l'état de respiration mesuré.

Donc, ni la surexpression de Bcl-x_L, ni sa déamidation ne modifient les performances de la chaîne respiratoire lorsque les cellules sont cultivées en forte glycémie.

Dans une deuxième série d'expériences, les cellules ont été adaptées à la culture à une faible concentration de glucose (1 g/L) afin de se rapprocher des conditions physiologiques des cellules (figure 39) (B). Là encore, il n'y a aucune différence significative du flux d'O₂ observé entre les trois lignées testées.

Enfin, nous avons adapté les cellules à la croissance dans un milieu sans glucose, mais supplémenté avec de la glutamine, du pyruvate, et du galactose, cela pour stimuler au maximum la capacité respiratoire des cellules par les mitochondries (figure 39) (C).

La figure 39 (C) montre un flux respiratoire découplé plus élevé (800 pmol/sec d'O₂) par rapport aux cellules cultivées en forte et faible concentration de glucose (500 pmol/sec d'O₂), ce qui est attendu lorsque la respiration mitochondriale est stimulée par l'ajout des substrats respiratoires dans le milieu sans glucose.

D'autre part, nous avons remarqué que la respiration endogène augmente d'environ 30 % ($p < 0.05$) chez les cellules surexprimant Bcl-x_L et sa forme monodéamidée par rapport aux parentales suggérant que Bcl-x_L et sa forme monodéamidée stimulent le flux d'O₂ couplé par la pompe ATP synthase. Mais, il n'y a aucune différence observée entre les trois lignées dans les autres états de respiration mesurés.

Donc, ces résultats montrent que la surexpression de Bcl-x_L et de sa forme monodéamidée stimule la vitesse de la respiration mitochondriale couplée, mais aucune différence n'est observée concernant l'effet de déamidation sur le rôle de Bcl-x_L.

c) Mesure du ratio ATP/ADP:

Nous avons voulu tester si la stimulation de vitesse de respiration endogène par Bcl-x_L était corrélée à un meilleur couplage de la chaîne respiratoire avec l'ATP synthase dans les cellules qui expriment Bcl-x_L (ou le N52D N66A). Pour cela, nous avons mesuré le ratio ATP/ADP (collaboration avec le Dr Benoît Pinson, IBGC). Pour ce faire, les lignées HCT 116 P, Bcl-x_L, et Bcl-x_L N52D N66A sont cultivées avec une confluence de 40%. Ces cellules sont extraites dans l'éthanol 70% supplémenté par 10 mM HEPES. Environ 150000 cellules sont injectées sur HPLC, et l'aire des pics ATP et ADP est déterminée par le logiciel "Chromoleon" (figure 40).

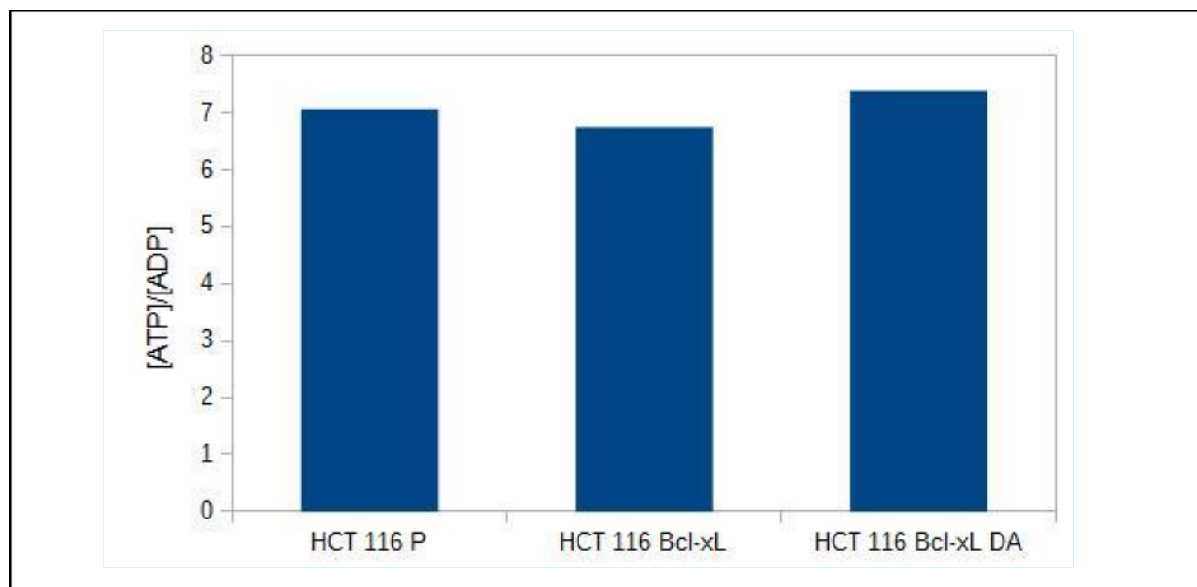


Figure 40: Mesure du ratio ATP/ADP dans les lignées HCT 116

Des cellules HCT 116 P, HCT 116 Bcl-x_L et HCT 116 Bcl-x_L N52D N66A sont cultivées en triplicat dans des plaques 6 puits, lysées et extraites par l'ajout successif de 3 mL d'éthanol 70% supplémenté par 10 mM d'HEPES à pH 7,4. Les extraits cellulaires sont resuspendus dans 500-1000 µL d'eau selon le nombre des cellules. Environ 150000 cellules diluées dans de l'eau sont injectées sur HPLC à 10 °C. L'aire des pics ATP et ADP est déterminée par le logiciel "Chromoleon" (n=1).

Les résultats montrent que le ratio ATP/ADP ne varie pas dans les différentes

lignées testées. Ce travail réalisé est insuffisant pour tirer une conclusion puisque cette expérience n'est faite qu'une seule fois. Pour cela, cette expérience devrait être répétée plusieurs fois pour améliorer les résultats et avoir des différences significatives entre les lignées cellulaires.

d) Conclusion:

La baisse du pouvoir tumorigène de Bcl-x_L monodéamidé pourrait être liée soit à une différence de taille, soit à un ralentissement de la croissance cellulaire. Les résultats obtenus ont montré que la monodéamidation de Bcl-x_L n'a aucun effet sur la taille des cellules. Puisque la croissance cellulaire peut être contrôlée par l'activité métabolique des cellules, nous avons testé l'effet de la monodéamidation de Bcl-x_L sur le métabolisme cellulaire en mesurant le flux glycolytique et la respiration mitochondriale (phosphorylation oxydative) des cellules. L'ensemble de nos résultats ont montré que le flux glycolytique (que ce soit en forte ou faible glycémie) ne varie pas, ni en cas de surexpression de Bcl-x_L, ni en cas de déamidation. D'autre part, le flux respiratoire des cellules est mesuré dans 3 conditions différentes où les cellules sont cultivées en présence de différents substrats carbonés. L'ensemble de nos résultats montre que ni la surexpression de Bcl-x_L, ni sa déamidation ne modifient les performances de la chaîne respiratoire lorsque les cellules sont cultivées en forte et faible glycémie. Lorsque la respiration mitochondriale est stimulée par l'ajout des substrats respiratoires dans un milieu sans glucose (pyruvate, glutamine et galactose), la surexpression de Bcl-x_L et de sa forme monodéamidée stimule la vitesse mitochondriale couplée, mais aucune différence n'est observée concernant l'effet de la déamidation sur le rôle de Bcl-x_L. Cette stimulation de vitesse de respiration endogène par Bcl-x_L et sa forme monodéamidée pourrait être corrélée à un meilleur couplage de la chaîne respiratoire avec l'ATP synthase. Le ratio ATP/ADP ne varie pas entre les différents lignées cellulaires testées.

L'ensemble de ces expériences devront être encore poursuivies et répétées plusieurs fois pour améliorer les résultats en diminuant les barres d'erreurs et avoir des différences significatives permettant de tirer des conclusions et de répondre à toutes nos questions et nos hypothèses émises.

B.6. Effet de la monodéamidation de Bcl-x_L sur l'autophagie:

La régulation de l'autophagie est une des fonctions de Bcl-x_L les plus récemment identifiées (Maiuri et al. 2007). En 2010, les fonctions pro-autophagiques de Bcl-x_L dans les cellules HCT 116 Bax -/- et des MEFs ont été observées au laboratoire. (Priault et al. 2010). Comprendre comment Bcl-x_L stimule l'autophagie dans cette lignée cellulaire s'avère une question essentielle pour l'étude des fonctions de survie de cet oncogène. Sachant que l'effet de la déamidation de Bcl-x_L (mono ou double) sur les fonctions autophagiques de la protéine n'avait pas été étudié dans la littérature, notre laboratoire s'est investi dans cette tâche. L'équipe a montré que parmi les mutants déamido-mimétiques, le mutant N52D/N66A est celui qui stimule le plus fortement la protéolyse autophagique (Beaumat et al. 2016). Un des objectifs de ma thèse était de comprendre comment la monodéamidation de Bcl-x_L augmente son activité pro-autophagique.

L'autophagie peut être régulée par différents acteurs. Nous nous sommes concentrés sur Tor et Ras et nous avons voulu savoir si la monodéamidation de Bcl-x_L modifie la signalisation autophagique médiée par Ras et Tor.

a) Étude de l'effet de la forme monodéamidée de Bcl-x_L sur l'autophagie par la voie Tor : (Collaboration avec le Dr. Raul Duran Bordeaux).

mTor est une sérine thréonine kinase qui a un rôle important dans la croissance et la survie cellulaire. Elle s'organise en deux types de complexes protéiques différents: mTorC1 est sensible à la rapamycine et associé avec Raptor (regulatory associated protein of mTor), alors que mTorC2 est résistant à la rapamycine. La rapamycine agit en bloquant la liaison mTor à Raptor et empêche la formation du complexe mTorC1.

Le complexe mTorC1 a pour principales cibles le répresseur traductionnel 4-EBP1 (eucaryotic initiation factor 4E binding protein 1) qui libère le facteur de traduction lorsqu'il est activé, et la protéine S6K appartenant à la sous-unité 40S qui est impliquée dans la recrutement des sous-unités ribosomales (figure 41).

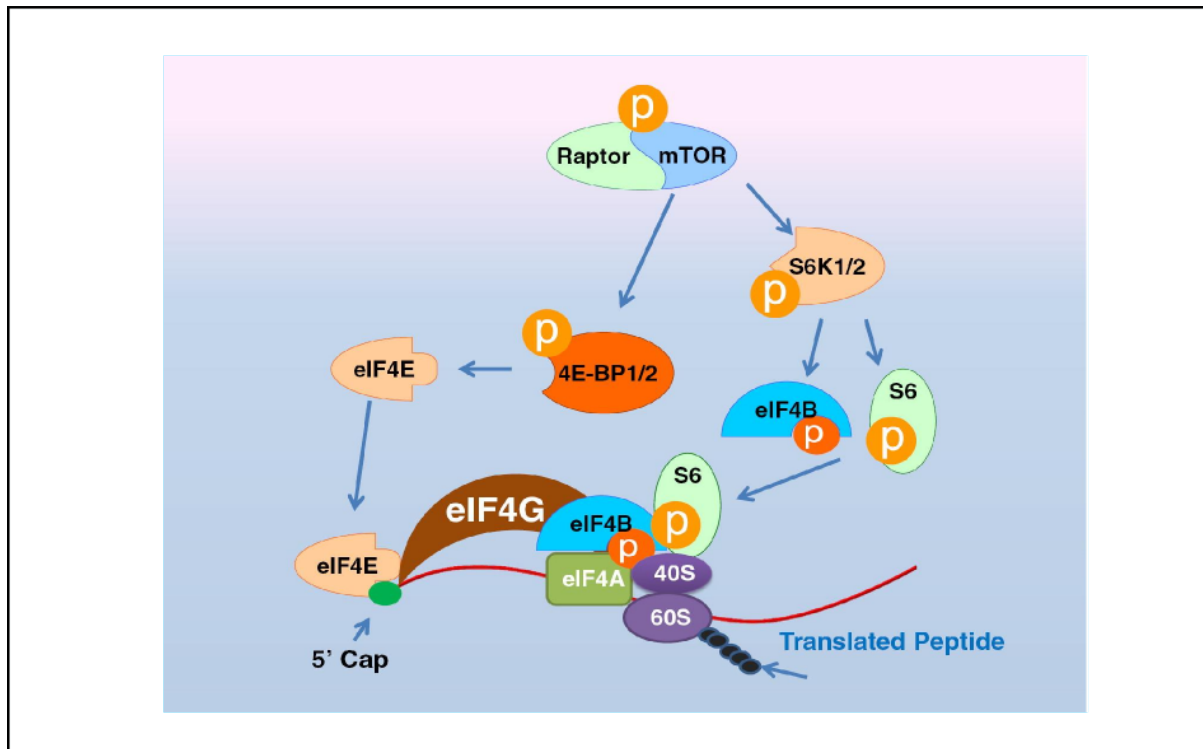


Figure 41: Voie de signalisation de mTor

L'activation de mTor par association avec Raptor va phosphoryler les substrats 4 EBP-1/2 et s6K 1/2. La phosphorylation de 4E-BP1/2 provoque la libération du facteur eIF4E, qui en se combinant avec le complexe d'initiation de traduction, va entraîner la traduction des protéines. De même, la phosphorylation de s6K1/2 provoque la libération du s6 et eIF4B phosphorylées, ce qui conduit également une augmentation de la traduction des protéines.

4E-BP1/2: eIF4E-binding protein1/2, **40S:** an eukaryotic small ribosomal subunit. **60S:** an eukaryotic large ribosomal subunit. **eIF4E/B/G/A:** eukaryotic translation initiation factor 4E/4B/4G/4A. **mTOR:** mammalian target of rapamycin. **p:** phosphorylated. **S6K1/2:** p70 ribosomal S6 Kinase 1/2

Figure tirée de (**Lutz et al. 2015**)

L'inhibition des fonctions des 2 substrats s6K et 4-EBP1 par déphosphorylation lorsque mTORC1 est inactive peut provoquer l'arrêt de la prolifération cellulaire en bloquant la transition G1/S du cycle cellulaire. Il existe plusieurs signaux qui régulent l'activité du complexe mTorC1 comme les facteurs de croissance, l'état énergétique, la disponibilité en nutriment et le stress (Fumarola, La Monica, and Guidotti 2005).

a.i) Effet de la monodéamidation sur l'activation classique de mTor:

mTorC1 contrôle l'autophagie en réponse au stress nutritionnel. En cas d'un carence nutritionnelle, mTorC1 est inhibée, et le processus d'autophagie est stimulé. Nous nous sommes demandés si la monodéamidation de Bcl-x_L modifie la signalisation autophagique médiée par Tor en réponse à la carence nutritive. Nous avons choisi de comparer dans 3 lignées cellulaires HCT 116 P, HCT 116 Bcl-x_L et HCT 116 Bcl-x_L N52D N66A, la vitesse d'inhibition de Tor en réponse à la carence. Pour cela, les cellules sont cultivées en conditions contrôle, puis transférées pendant 1 et 2 heures dans du milieu HBSS (carence en acides aminées et en sérum). Afin de garantir que la régulation de l'activité de mTor n'est contrôlée que par le retrait ou l'ajout d'acides aminés, le milieu HBSS est supplémenté avec 100 nM d'insuline. L'activité de mTor est évaluée par la phosphorylation de son substrat 4-EBP1, et par l'expression de la protéine totale utilisée comme contrôle de charge. Les résultats sont présentés dans la figure 42.

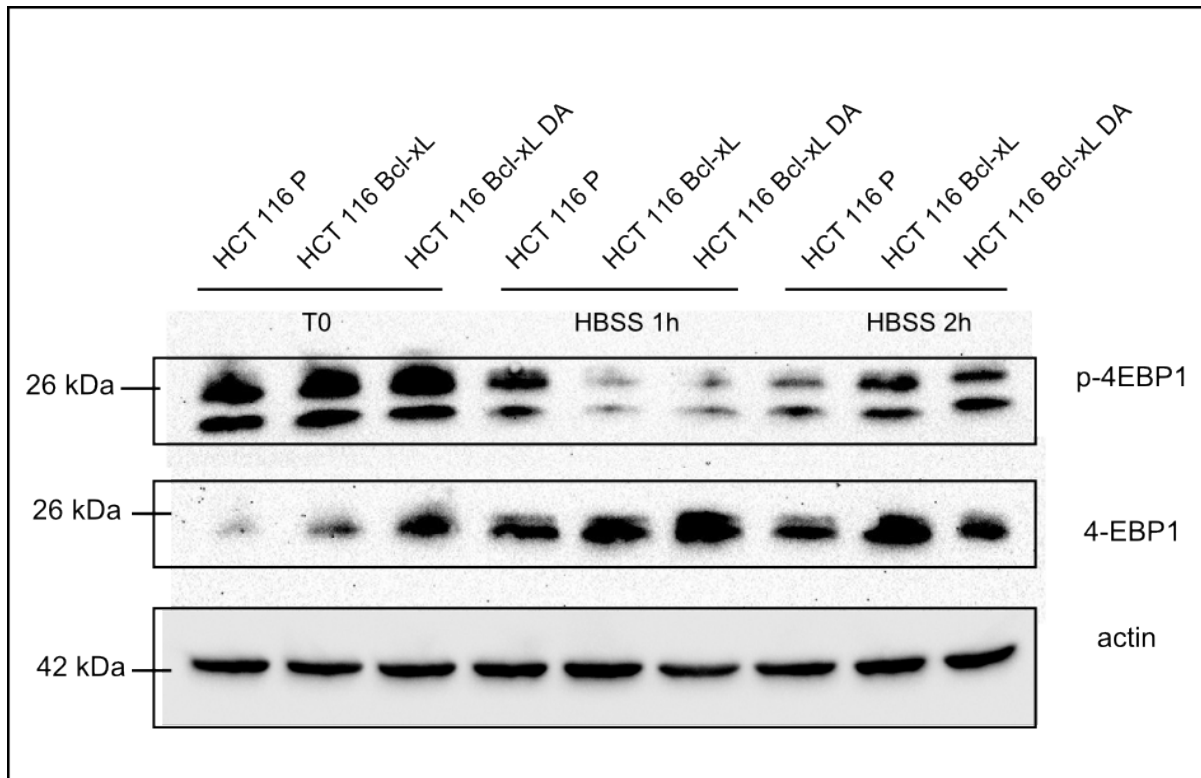


Figure 42: Mesure de la vitesse d'inhibition de mTor suite à une carence en acides aminés.

Des lignées cellulaires HCT 116 P, HCT 116 Bcl-xL et HCT 116 Bcl-xL N52DN66A sont incubées pendant 1 et 2 heures dans du milieu HBSS carencé en acides aminés. Les extraits totaux issus de ces cellules sont soumis à une électrophorèse sur un gel de type SDS-PAGE et un western blot dirigé contre les protéines phospho-4 EBP1, 4-EBP1 ; l'actine est utilisée comme un contrôle de charge (n=1).

A T0, l'expression de la protéine totale 4-EBP1 est plus forte chez les lignées surexprimant la forme monodéamidée de Bcl-x_L par rapport aux deux autres lignées. Après une cinétique de 1 et 2 h de carence en acides aminés, on remarque que la phosphorylation de 4-EBP1 diminue par rapport au T0 chez les différentes lignées cellulaires. Cela confirme l'efficacité de la carence en acides aminés à inhiber la voie mTor.

De plus, nous avons remarqué que la phosphorylation de 4-EBP1 diminue davantage dans les lignées surexprimant Bcl-x_L et la forme monodéamidée. Le résultat est d'autant plus marqué proportionnellement aux quantités totales de 4EBP1 dans chaque lignée.

Donc, l'activité de mTor est plus fortement réprimée par la carence lorsque les cellules surexpriment Bcl-x_L ou sa forme monodéamidée.

a.ii) Effet de la monodéamidation sur l'activation de mTor via la voie de glutaminolyse:

Récemment, des études ont montré que mTor peut être régulée par une autre voie que celle de la carence nutritive. C'est le cas de la voie de glutaminolyse.

mTorC1 est fortement régulée par le métabolisme de certains acides aminés, particulièrement, la leucine, la glutamine et l'arginine. La glutamine est l'acide aminé le plus abondant dans le sérum, et constitue une source d'azote pour les cellules. Dans la cellule, la glutamine peut être, soit utilisée directement dans certaines réactions biochimiques, soit dégradée en glutamate, processus appelé "la glutaminolyse". Des études récentes ont montré que l'ajout de la glutamine, même pendant une carence en acides aminés suffit à réactiver la voie mTor, malgré la carence nutritive. Les mécanismes de cette activité non conventionnelle de mTor restent encore à élucider (Durán and Hall 2012) (figure 43).

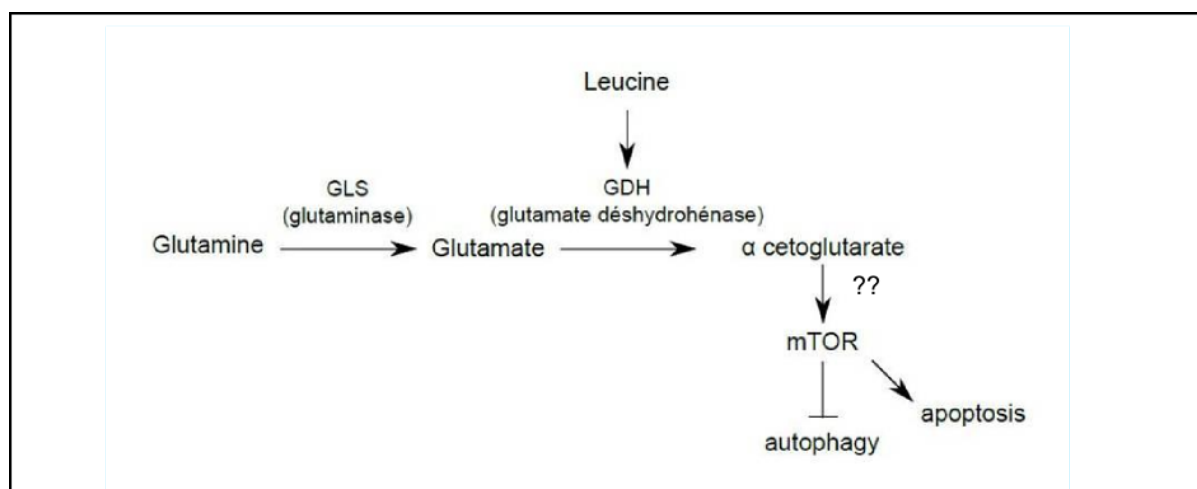


Figure 43: Mécanisme de l'activation non conventionnelle de mTor par la voie de glutaminolyse

La glutamine est dégradée en glutamate par une enzyme appelée Glutaminase (GLS) puis en alpha-cétoglutarate, intermédiaire du cycle de Krebs, par une enzyme appelée "glutamate déshydrogénase ou GDH". Cet intermédiaire va activer mTor, qui à son tour, inhibe l'autophagie et stimule l'apoptose, par des mécanismes encore peu étudiés. La leucine est un activateur allostérique de l'enzyme GDH qui, par conséquent, augmente la production du alpha-cétoglutarate à partir du glutamate.

Nous avons voulu savoir si la déamidation de Bcl-x_L modifiait cette voie non conventionnelle de réactivation de mTOR par la glutamine. Nous avons cultivé les lignées cellulaires dans un milieu carencé en acides aminées et complété avec 100 nM d'insuline pendant 4 heures. Puis, les cellules sont re-stimulées par

l'addition de leucine (0,8 mM) et de glutamine (2 mM) durant 30 min. L'activité de mTor est évalué par la phosphorylation de 4-EBP1 (figure 44).

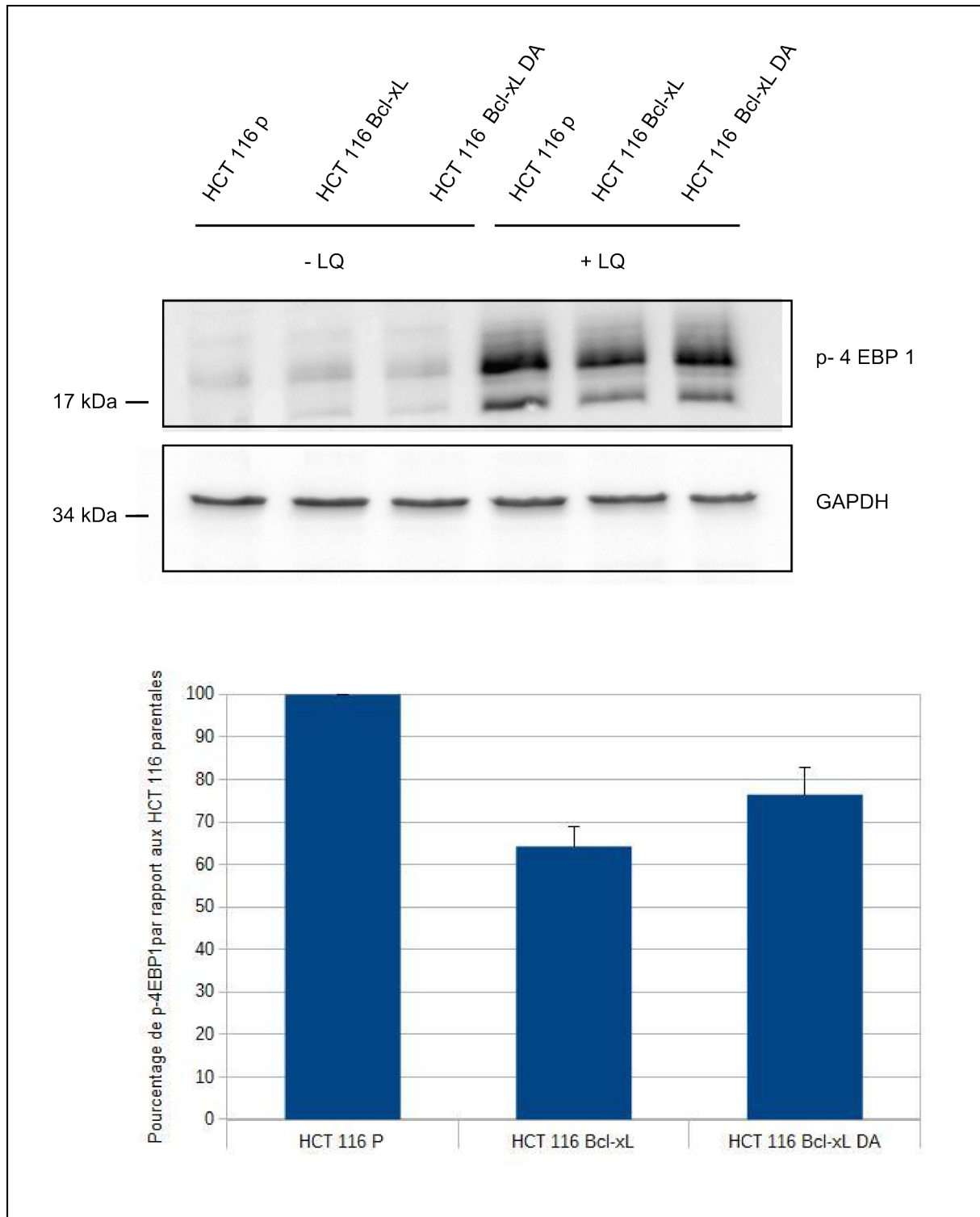


Figure 44: Étude de l'activité non conventionnelle de mTor par la voie de glutaminolyse

Des lignées HCT 116 sont cultivées pendant 4 h dans un milieu carencé en sérum et en acides aminés (HBSS) pour inhiber mTor. La voie mTor est réactivée par l'ajout de 0.8 mM de leucine et 2 mM de glutamine durant 30 min. L'activité de mTor est évaluée par la phosphorylation du substrat 4-EBP1. Une quantification du pourcentage de la phosphorylation de 4-EBP1 a été effectuée chez les lignées HCT 116 Bcl-xL et HCT 116 Bcl-xL N52DN66A par rapport aux HCT 116 parentales (n=4).

Nous observons que l'expression de Bcl-x_L empêche partiellement la réactivation de TOR (diminution de 38%). Cet effet inhibiteur est mitigé par la monodéamidation de Bcl-x_L, puisque l'expression du mutant N52D N66A conduit à une inhibition moins efficace de la réactivation de mTOR (diminution de 24%).

b) Conclusion:

Dans cette étude, nous avons observé que la surexpression de Bcl-x_L ou sa forme monodéamidée diminue l'activité de mTor en réponse à une carence en acides aminés. D'autre part, nous avons remarqué le même effet de Bcl-x_L sur l'activation de mTor par la glutaminolyse, tandis que cette réduction d'activité est moins importante en cas de déamidation. Ceci semble contradictoire avec les résultats concernant l'effet stimulateur de la monodéamidation sur l'activité autophagique de Bcl-x_L, et sera discuté dans la partie "Discussion".

L'autophagie est un processus qui n'est pas régulé que par la voie mTor. Il a été montré que la protéine Ras joue également un rôle dans la régulation de l'autophagie. Elle peut être tantôt stimulatrice par l'activation de la voie ERK/RAF, et tantôt inhibitrice en activant la voie AKT/PI3K (Guo et al. 2011). Dans la suite de cette partie, nous avons étudié l'effet de la forme monodéamidée de Bcl-x_L sur la voie autophagique médiée par Ras.

c) Étude d'effet de la monodéamidation de Bcl-x_L sur la voie de signalisation autophagique médiée par l'oncogène Ras:

Une autre voie connue pour réguler l'autophagie est la voie de signalisation médiée par l'oncogène Ras. Il a été démontré qu'il existe des interactions physiques et fonctionnelles entre les oncogènes K-Ras et Bcl-x_L (Bivona et al. 2006). Nous nous sommes donc demandés si la monodéamidation pourrait affecter ces interactions, et si la signalisation de l'autophagie médiée par Ras était impactée par l'état monodéamidé de Bcl-x_L.

Les protéines Ras sont des petites GTPases qui appartiennent à la famille des protéines G monomériques. Ras est associée à la face interne de la membrane plasmique et capable de fixer du GTP, et de l'hydrolyser en GDP. Ras active les

voies de transduction qu'elle contrôle lorsqu'elle est liée au GTP, et est inactive lorsqu'elle a hydrolysé le GTP en GDP. L'état d'activation de Ras est dépendant de protéines régulatrices appelées GEF et GAP. Les GEF (Guanine Nucléotide Exchange Factors) catalysent le relargage de GDP par Ras alors que les GAP (GTPase Activating Proteins) stimulent l'activité d'hydrolyse du GTP par Ras. (Colicelli 2004).

Il existe trois isoformes de Ras, K-Ras, H-Ras et N-Ras. Les protéines issues de ces gènes ont une masse moléculaire de 21 kDa d'où leur nom (p21). Ces trois isoformes sont largement exprimées mais K-Ras l'est souvent dans tous les types du cancer. Les mutations activatrices les plus fréquentes concernent les résidus 12, 13 et 61 de K-Ras (Figure 45).

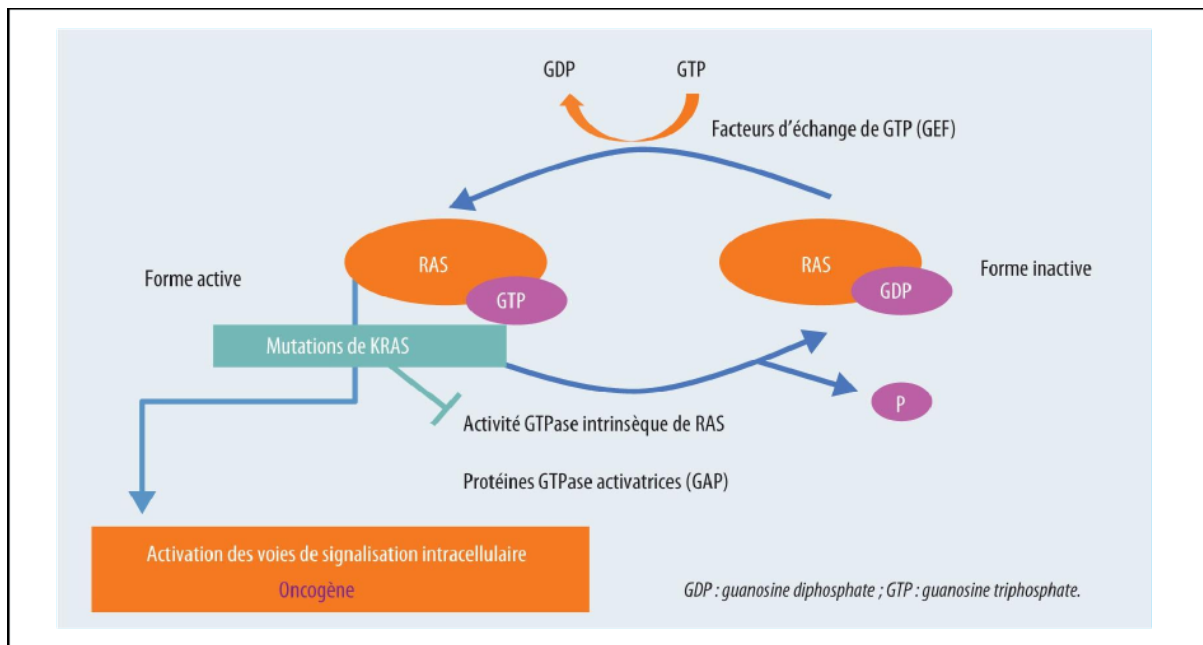


Figure 45: Voie d'activation et désactivation de l'oncogène Ras

L'activation de l'oncogène Ras dépend de protéines régulatrices comme GEF et GAP. Les GAP (GTPase Activating Proteins) stimulent l'hydrolyse du GTP en GDP pour inactiver Ras, tandis que les GEF (Guanine Nucléotide Exchange Factors) permettent le relargage du GDP par Ras. La mutation du Ras va inhiber son activité GTPasique et stimuler l'activation des voies de signalisation intracellulaires (Rajalingam et al. 2007).

L'oncogène RAS est impliqué dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la sénescence, l'apoptose, la transition épithélio-mésenchymateuse (Kim et al. 2001). Son activation favorise un taux basal élevé

d'autophagie ce qui entraîne la survie des cellules tumorales en réponse à une carence nutritive (Guo et al. 2011). Des travaux ont montré que l'interaction entre K-RAS G12V et Bcl-x_L, à la mitochondrie, induit l'apoptose (Bivona et al. 2006). D'autres travaux ont aussi montré que l'échappement des cellules à la sénescence induite par l'oncogène K-Ras est corrélée à une dédifférenciation cellulaire et une dépendance à Bcl-x_L et Mcl-1 pour la survie (de Carné Trécesson et al. 2011). Nous avons voulu savoir si la déamidation de Bcl-x_L modifie son interaction physique avec K-Ras et si il pouvait en résulter une modification des voies de signalisations dans lesquelles ces deux protéines sont engagées.

Nous avons donc comparé les interactions entre K-Ras (sauvage ou constitutivement active (G12D, G12V et G13D) et Bcl-x_L (sauvage ou monodéamidée).

d) Étude des interactions Bcl-x_L/Ras par immunoprécipitation:

La protéine K-Ras, utilisée dans ces expériences, est étiquetée par une séquence Flag afin d'en optimiser la détection. Des cellules HEK sont co-transfectées avec Bcl-x_L, Bcl-x_L N52D N66A et Flag-Ras WT et ses différentes formes mutées (G12D, G12V et G13D). Dans un premier temps, nous avons vérifié que le rajout de la séquence Flag ne modifie pas la reconnaissance de K-Ras par l'anticorps (figure 46).

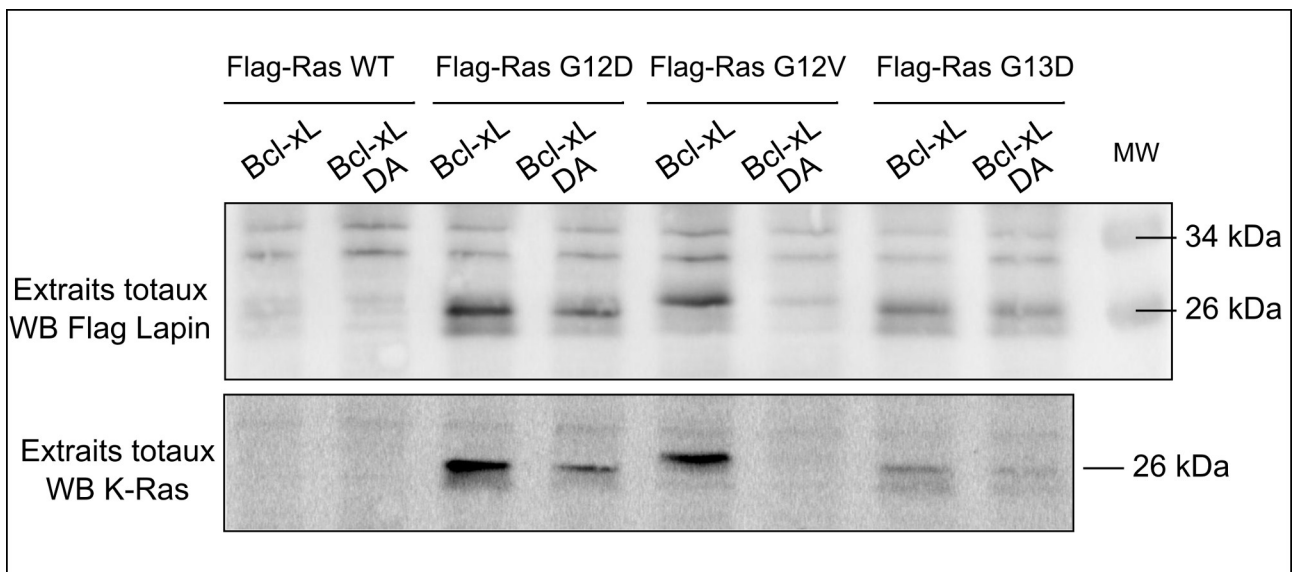


Figure 46: Vérification des distances de migration après l'immunomarquage contre Flag et contre K-Ras.

Des cellules HEK sont co-transfectées avec Bcl-x_L, Bcl-xL N52DN66A et Flag-Ras WT et ses différentes formes mutées (G12D, G12V et G13D). Les extraits totaux sont soumis à une séparation de type Tris-Glycine-SDS- PAGE 12 % et à des westerns blots dirigés contre Flag et K-Ras (n=1).

Nous avons observé que les anticorps anti Flag et les anticorps anti K-Ras reconnaissent une même bande ; la distance de migration obtenue après révélation de K-Ras et de Flag est identique (26kDa) (figure 46). On peut donc utiliser l'anticorps anti-Flag pour les IP.

Dans un second temps, des immunoprécipitations contre l'épitope Flag sont réalisées (figure 47).

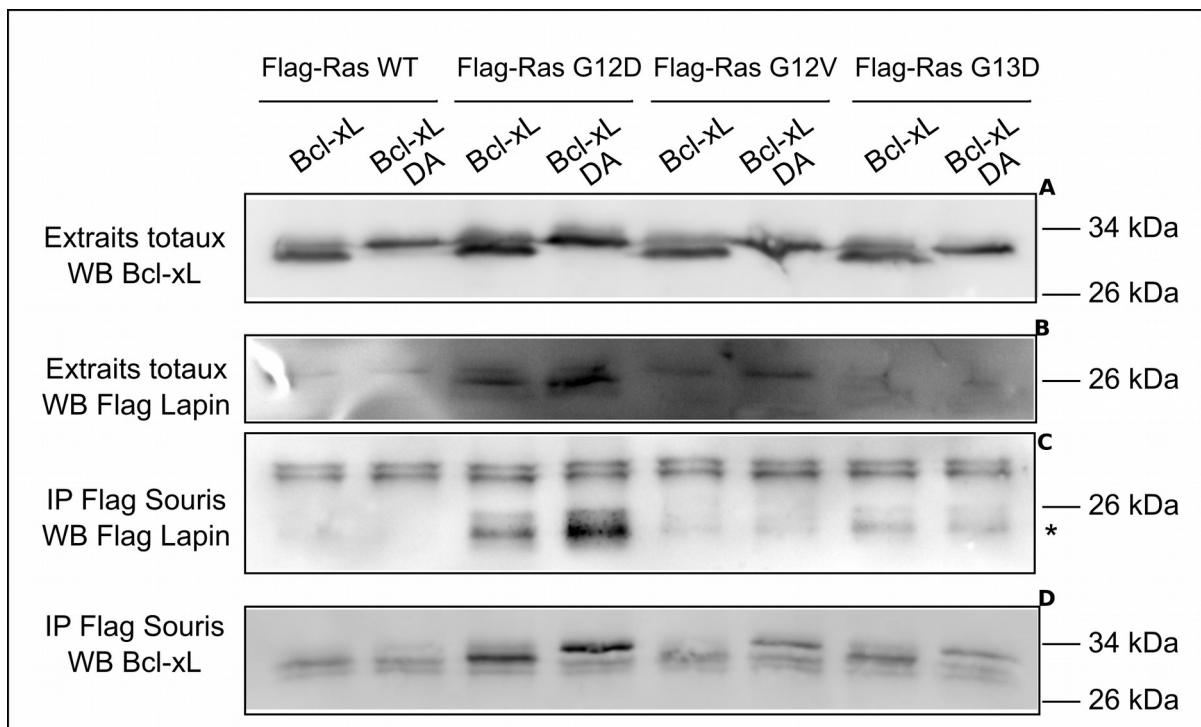


Figure 47: Co-Immuno-précipitation de Bcl-x_L ou de son mutant monodéamidé N52D N66A avec Flag-Ras WT et ses mutants G12D, G12V, et G13D

Des cellules HEK 293 sont co-transfectées avec Bcl-x_L, Bcl-x_L N52DN66A et Ras WT et ses différents mutants indiqués sur la figure. Des immunoprécipitations contre l'épitope Flag sont réalisées et soumises à une séparation de type Tris-Glycine-SDS-PAGE 12% et à des western blots dirigées contre Flag et Bcl-x_L (n=1).

La figure 47 montre, en accord avec les résultats publiés par le laboratoire, que l'expression de Bcl-x_L conduit à la détection d'un doublet: la bande du bas correspond à Bcl-x_L native, alors que la bande qui a la plus courte distance de migration est la forme spontanément monodéamidée. Pour chaque combinaison de transfection avec Flag K-Ras, le niveau d'expression de Bcl-x_L et Bcl-x_L DA est similaire.

Ces résultats montrent que les différentes formes de Flag K-Ras ne migrent pas à la même distance, ceci étant dû aux substitutions ponctuelles correspondant aux mutations. Flag K-Ras G12D semble être mieux exprimée ou plus stable que les autres formes de Flag K-Ras. Pour chaque combinaison de transfection avec Bcl-x_L ou Bcl-x_L DA, l'intensité des bandes correspondant aux variants de Flag K-Ras est comparable.

En accord avec les signaux détectés dans les extraits totaux, le signal correspondant à Flag K-Ras G12D en co-expression avec Bcl-x_L native et déamidée est plus intense que les autres variants de Flag K-Ras. Après l'immunoprécipitation de Flag-Ras et ses variants par l'anticorps Flag, nous avons analysé la présence de Bcl-x_L et Bcl-x_L DA dans les éluats des IP Flag.

En cas de co-expression avec Flag-Ras WT, nous avons observé que Bcl-x_L endogène interagit avec Flag K-Ras WT, mais pas la forme monodéamidée de Bcl-x_L. Cela suggère que la déamidation de Bcl-x_L entraînerait une perte d'interaction avec Flag K-Ras WT. Ce résultat n'est pas observé avec les mutants activés de Ras, pour lesquels une interaction comparable est observée avec Bcl-x_L native et avec le mutant déamido-mimétique.

En conclusion de ces expériences, la forme monodéamidée de Bcl-x_L entraînerait la perte d'interaction avec son partenaire K-Ras sauvage. En revanche, lorsque K-Ras est mutée, la déamidation de Bcl-x_L ne modifierait pas cette interaction.

e) Analyse d'interactions Bcl-x_L/ Ras par BRET:

L'analyse par IP des interactions entre protéines se fait sur des extraits protéiques. Nous avons souhaité utiliser une méthode alternative pour confirmer l'existence de ces interactions dans des cellules vivantes.

Une méthode permettant de quantifier l'affinité apparente entre Bcl-x_L native/Bcl-x_L N52D N66A et Ras sauvage/ Ras mutée est la technique BRET.

Cette expérience a été effectuée par Fabien Gautier dans le laboratoire du Dr. Philippe Juin à Nantes et par le Dr. Yann Percherancier (IMS) à Bordeaux. Nous avons utilisé un plasmide exprimant Rluc-KRas qui a été construit par un sous-clonage des séquences codant K-Ras dans le vecteur pRluc-C2, et des plasmides exprimant YFP-Bcl-x_L construits par un sous-clonage de Bcl-x_L et ses différents mutants déamido-mimétiques (DD, DA, AD, et AA). Les cellules ont été transfectées avec des quantités croissantes (50 à 1500 ng/puits) de plasmides codants pour l'accepteur de BRET (e-YFP Bcl-x_L et les mutants), et des quantités constantes (50 ng/puits) de plasmides exprimant le donneur BRET (R-Luc KRas). Le substrat cœlenterenzine H est injecté et le BRET est mesuré immédiatement.

En principe, R-Luc catalyse la transformation du substrat DBC en cœlenteramide avec une émission concomitante de la lumière bleue. Lorsqu'un accepteur adéquat est en proximité suffisante, il va capturer l'énergie de la lumière bleue émise par la réaction R-Luc/DBC, et son excitation permettra une émission d'un signal lumineux jaune. Les valeurs d'émission du signal obtenues à 530 nm ont été divisées par les valeurs obtenues à 480 nm. Le ratio BRET a été calculé par la soustraction des valeurs du signal BRET obtenues avec la co-expression donneur et récepteur par celles obtenues avec la protéine donneur exprimée seule. Les résultats sont présentés dans la figure 48.

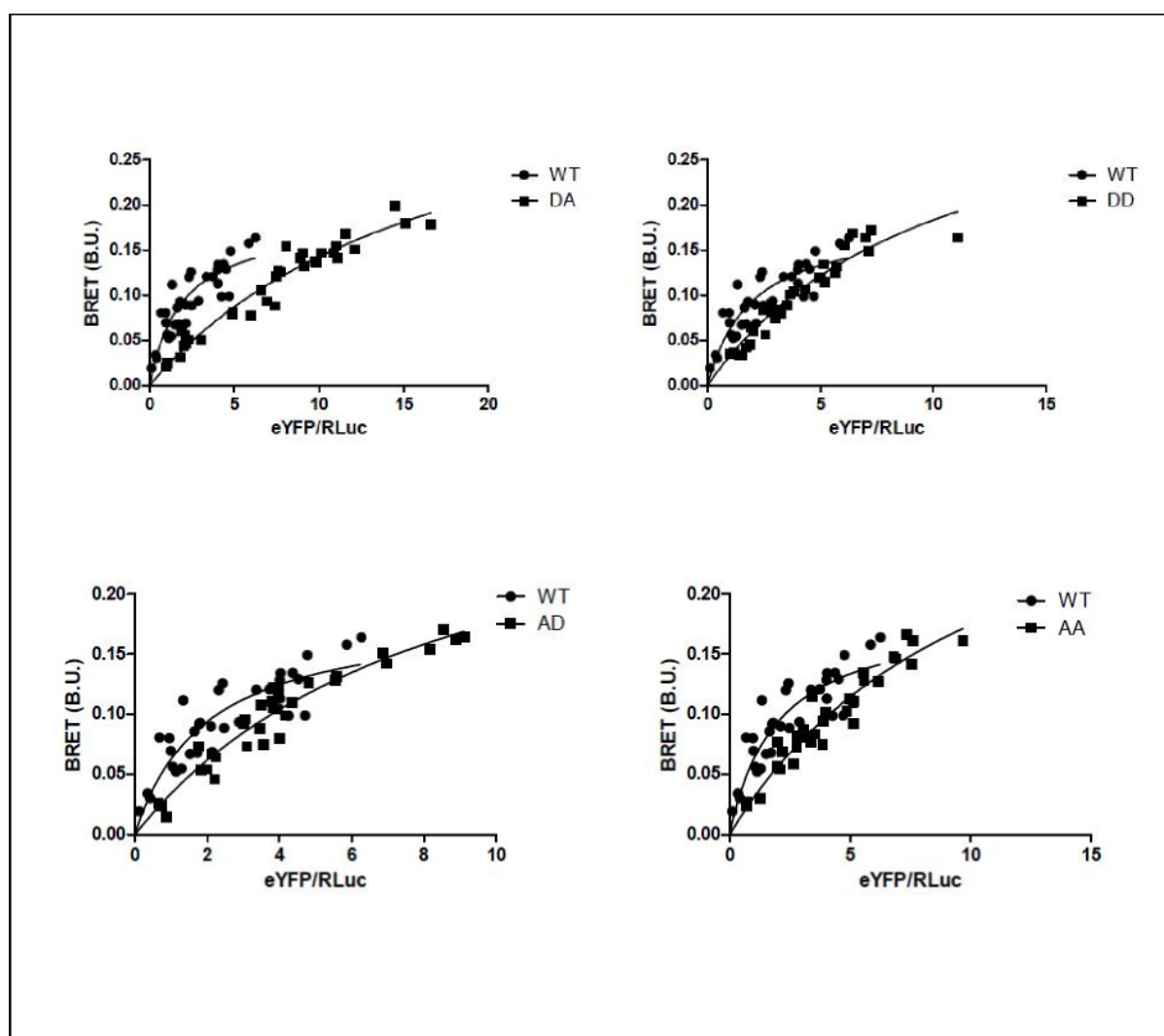


Figure 48: Mesure par BRET de la proximité entre la protéine K-Ras WT et les différents mutants de Bcl-x_L (DD, DA, AD et AA).

Des cellules HEK sont transfectées avec des plasmides codants pour l'accepteur de BRET (e-YFP Bcl-x_L et les mutants), et des plasmides exprimant le donneur BRET (R-Luc KRas). Le substrat cœlenterazine H est injecté et le BRET est mesuré immédiatement. Le ratio BRET a été calculé par la soustraction des valeurs du signal BRET obtenues avec la co-expression donneur et récepteur par celles obtenues avec la protéine donneur exprimée seule (n=3).

Nos résultats montrent que le ratio du BRET calculé (eYFP/R-Luc) entre K-Ras WT et le mutant DA est plus faible comparativement aux autres mutants. La proximité entre ces deux protéines serait donc plus faible.

Donc, ces résultats préliminaires montrent que la forme monodéamidée (N52D N66A) perdrait son interaction avec K-Ras WT. L'étude d'interaction avec les mutants de K-Ras est encore en cours d'analyse.

En conclusion de cette partie, nous avons montré que la monodéamidation de Bcl-x_L diminuait son interaction avec Ras WT. Les mêmes expériences seront répétées avec les mutants de Ras (G12D, G12V, et G13D). Enfin, la prochaine étape sera de regarder l'effet de cette perte d'interaction sur les voies de signalisation médiée par K-Ras WT et les différents mutants.

C. Partenaires d'interaction:

A côté de sa fonction anti-apoptotique, Bcl-x_L peut jouer un rôle important dans des nombreux processus cellulaires, comme l'homéostasie calcique, la prolifération cellulaire, le métabolisme mitochondrial, l'autophagie, etc... Toutes ces fonctions peuvent être expliquées par la capacité qu'a Bcl-x_L à interagir avec des partenaires autres que les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Les travaux précédents dans le laboratoire ont montré que la monodéamidation de Bcl-x_L sur son résidu asparagine 52 qui se produit spontanément *in vivo* et dans les cellules en culture, contribue à augmenter la fonction autophagique par rapport à la protéine native. Notre laboratoire a réalisé une caractérisation biochimique qui permet de montrer que la forme native et la forme déamidée de Bcl-x_L forment des complexes supramoléculaires homotypiques dans les mitochondries, c'est à dire que les protéines déamidées s'assemblent entre elles, sans qu'il y ait de complexes mixtes avec les protéines natives. Cette organisation en complexes mutuellement exclusifs suggère que la protéine native et la protéine monodéamidée pourraient avoir des partenaires propres à chacune des formes. Durant ma thèse, nous nous sommes intéressés à réaliser une caractérisation différentielle des partenaires mitochondriaux et cytosoliques de Bcl-x_L native et déamidée. Une «Tandem Affinity Purification» a été réalisée sur ces 2 formes de la protéine, et les partenaires identifiés par spectrométrie de masse.

Après la préparation des constructions plasmidiques de TAP-Bcl-x_L et ses mutants, nous avons produit des particules lentivirales afin d'infecter les lignées HCT 116 et générer les lignées cellulaires présentant un niveau de surexpression de TAP-Bcl-x_L comparable à celui détecté dans les lignées HCT 116 Bcl-x_L utilisées pour toutes les autres expériences de cette thèse. Ces niveaux d'expression sont visualisés dans la figure 49.

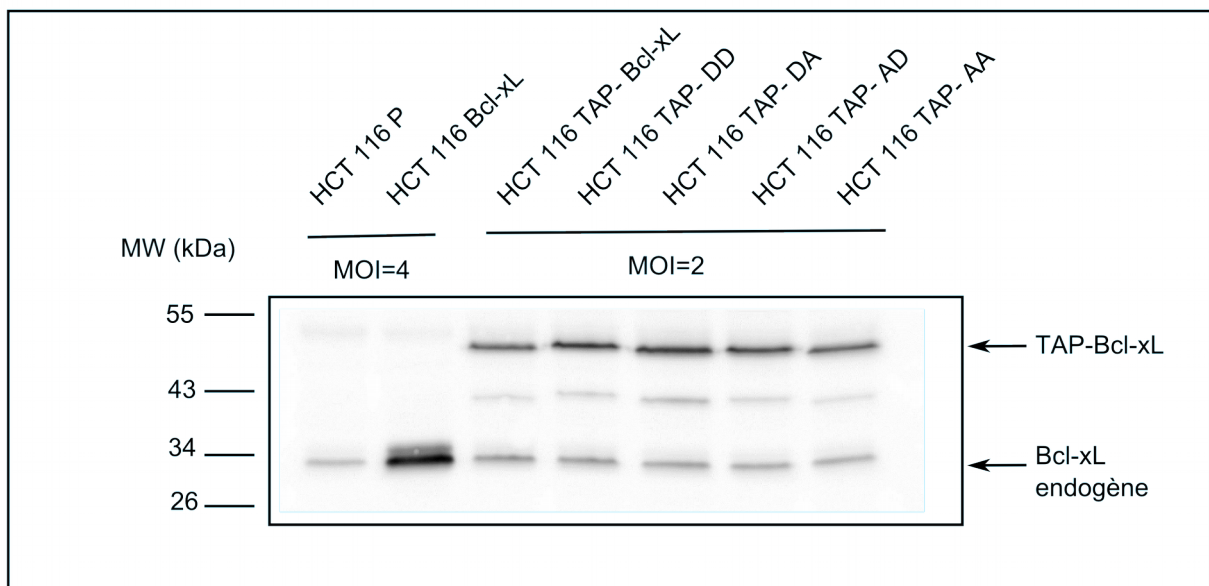


Figure 49: Niveau d'expression de TAP-Bcl-x_L dans les lignées HCT 116.

Des lignées HCT 116 sont infectées avec des particules lentivirales qui transduisent l'expression de TAP-Bcl-x_L et les différents mutants DD, DA, AD et AA avec une MOI=2. Les extraits totaux sont soumis à une séparation en Tris-Glycine-SDS-PAGE et 12% et le western blot est dirigé contre Bcl-x_L (n=3).

Nous observons que l'expression de TAP-Bcl-x_L et les différents mutants est deux fois moins importante que celle de Bcl-x_L native. Dans ces conditions, le niveau de surexpression de TAP-Bcl-x_L nous a semblé idéal pour ne pas induire d'interaction artéfactuelle.

C.1. Effet de TAP-tag sur la fonction anti- apoptotique de Bcl-x_L

Bcl-x_L est étiquetée par la séquence TAP sur son coté N-terminal. Comme, cette étiquette est une de grande taille (24 kDa), il est possible qu'elle affecte la structure de Bcl-x_L et sa capacité à établir des interactions fonctionnelles (avec des partenaires apoptotiques ou même en dehors de la famille Bcl-2). Nous avons donc jugé nécessaire de tester si l'ajout de l'étiquette TAP affectait la fonction apoptotique de Bcl-x_L. Nous avons réalisé cette expérience sur les cellules HeLa. L'induction de l'apoptose est réalisée par un traitement par la staurosporine sur des cellules HeLa qui surexpriment Bcl-x_L et TAP-Bcl-x_L et elle est suivie par les mesures de taux de clivage de la protéine PARP1 (figure 50).

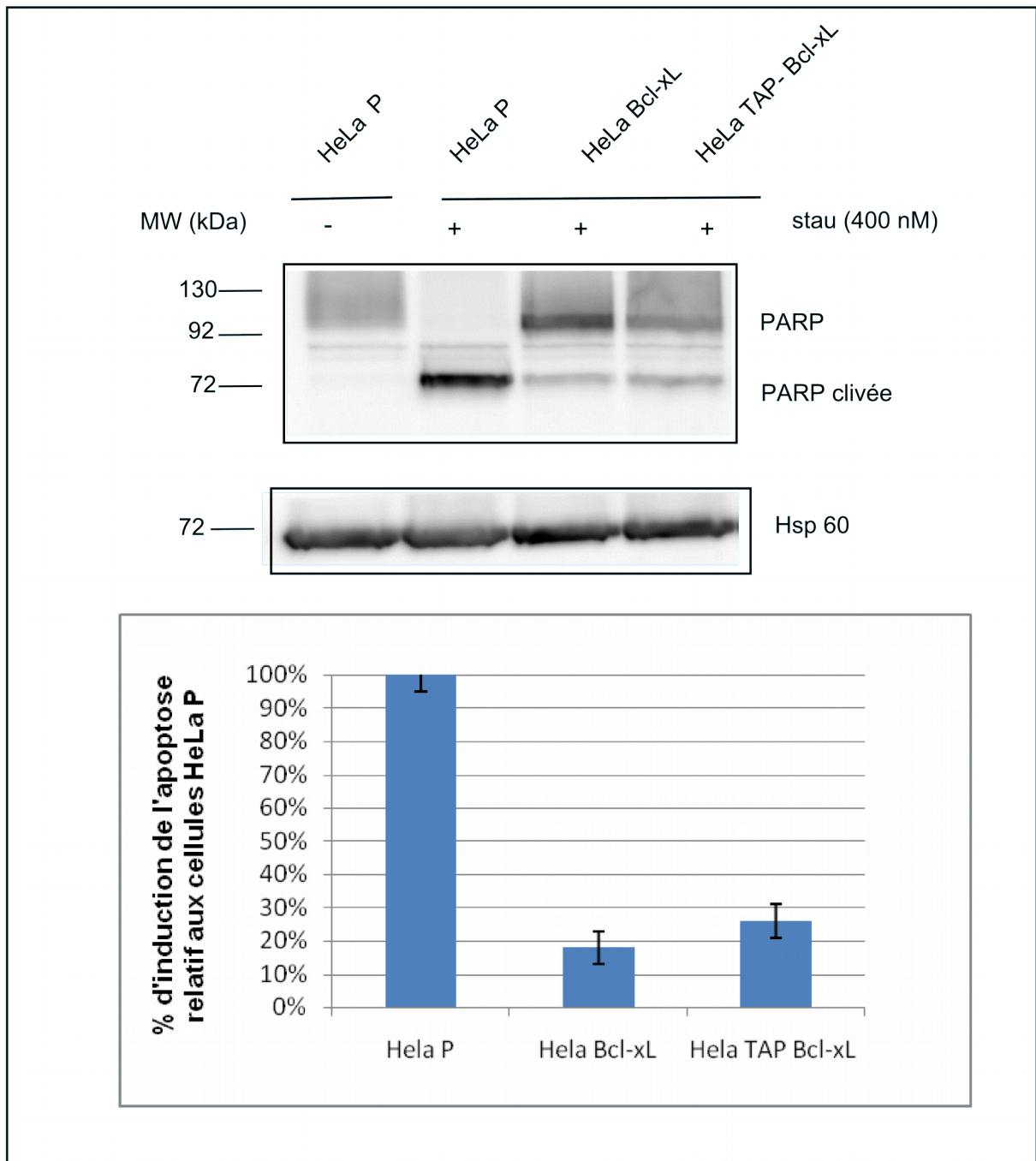


Figure 50: Mesure des taux d'induction de l'apoptose induite par la staurosporine.

Des cellules HeLa non transduites ou surexprimant Bcl-x_L et TAP-Bcl-x_L sont cultivées pendant 4h dans un milieu contrôle supplémenté de 400 nM de staurosporine. Des extraits protéiques sont réalisés et soumis à une séparation en Tris-Glycine-SDS-PAGE 8% et à un western blot dirigé contre PARP. L'image du haut représente un des résultats utilisés pour quantifier le taux d'induction de l'apoptose. L'induction de l'apoptose est calculée comme le rapport du signal de la protéine PARP clivée sur le total des signaux (PARPs + PARP clivée), normalisée à 100 % pour les cellules non transduites (n=4).

D'après cette figure, l'induction de l'apoptose par 4h de traitement à la staurosporine pour des cellules surexprimant Bcl-x_L est inhibée de 80 % environ comparativement aux cellules non transduites. Aucune différence significative n'est observée concernant l'activité anti-apoptotique de TAP-Bcl-x_L.

Donc, l'addition de l'étiquette TAP au Bcl-x_L n'affecte pas sa capacité à inhiber l'apoptose.

C.2. Purification et identification des partenaires:

Étant donné que Bcl-x_L est une protéine localisée majoritairement dans le cytosol et la membrane externe mitochondriale, nous avons décidé de réaliser des purifications des partenaires membranaires et cytosoliques, à la fois pour TAP-Bcl-x_L et pour le mutant déamido-mimétique TAP-Bcl-x_L N52DN66A. Brièvement, les cellules ont été lysées mécaniquement, puis la centrifugation de ce lysat nous a permis de séparer les membranes totales des protéines cytosoliques. Les extraits protéiques sont soumis à une purification par affinité en tandem. Les éluats ont été concentrés et résolus sur SDS-PAGE (figure 51).

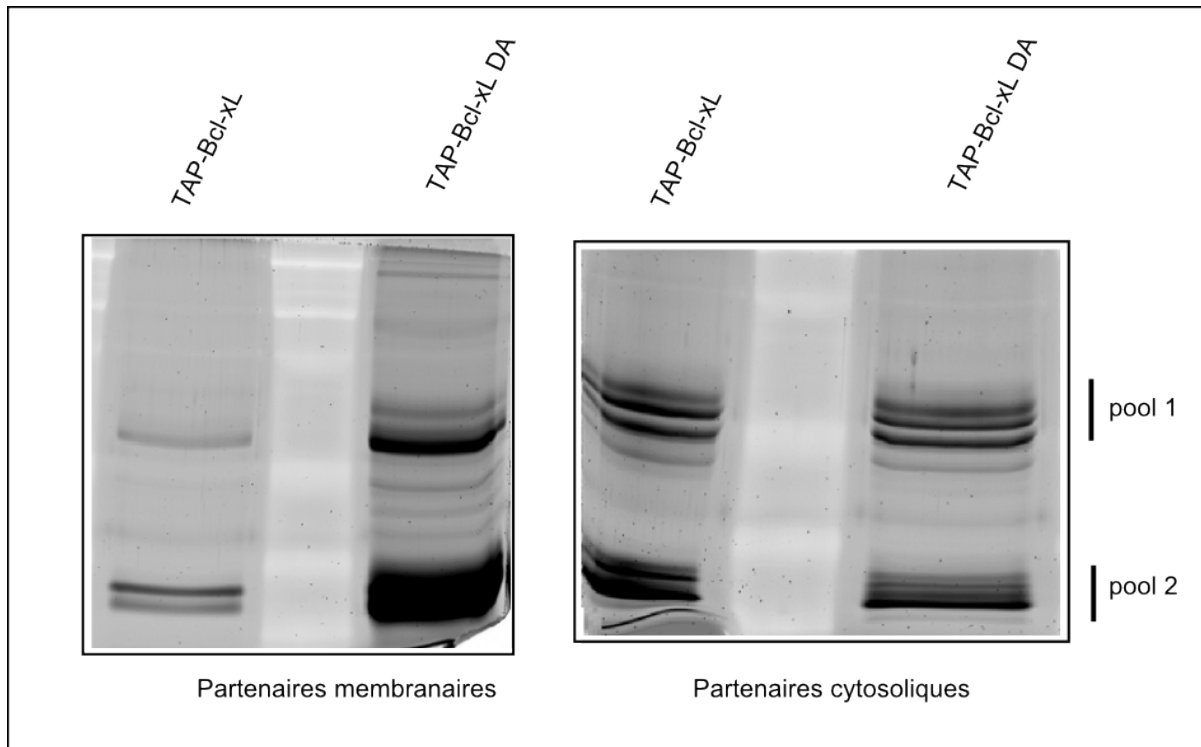


Figure 51: Purification par TAP-TAG des partenaires interagissant avec TAP-Bcl-x_L et TAP-Bcl-x_L DA

Des extraits protéiques membranaires et cytosoliques issus des lignées HCT 116 surexprimant TAP-Bcl-x_L et TAP-Bcl-x_L N52D N66A sont purifiés par affinité en tandem. Les éluats sont concentrés et résolus sur un gel SDS-PAGE coloré par le bleu de coomassie. Les bandes sont digérées, puis les peptides sont poolés pour être ensuite analysés par spectrométrie de masse (n=3).

Les bandes correspondantes aux protéines les plus abondantes ont été coupées des gels et leur identité a été déterminée par spectrométrie de masse (collaboration Felix Elortza, BioGUNE, Espagne).

Une liste des protéines co-éluées avec TAP-Bcl-x_L et TAP-Bcl-x_L N52D N66A a été produite. Je cite dans le tableau II.2 les partenaires identifiés interagissant spécifiquement avec Bcl-x_L N52D N66A, ainsi que leurs localisations et leurs fonctions.

Partenaire	Localisation	Fonction
Nucleolin OS=Homo sapiens	nucléaire	impliqué dans la croissance des cellules eucaryotes
ARF 1 (ADP-ribosylation factor 1 OS)	ribosomale	Trafic des protéines à travers les compartiments cellulaires
CPSM (Carbamoyl-phosphate synthase)	mitochondriale	- enzyme qui catalyse la réaction ATP et bicarbonate pour produire de l'ADP et du carboxyphosphate - impliquée dans le cycle de l'urée
MCM4 (DNA replication licensing factor)	nucléaire	essentiel dans l'initiation de la réplication du génome.

Tableau II.2: Liste des partenaires spécifiques de la forme monodéamidée de Bcl-x_L.

Nous avons montré que la forme monodéamidée de Bcl-x_L (N52D N66A) stimule l'autophagie dans les cellules cultivées et diminue les propriétés oncogéniques et tumorigène *in vitro* et *in vivo*. Les mécanismes impliqués sont en cours d'exploration. La spécificité d'interaction seulement avec la forme monodéamidée (N52D N66A) nous laisse supposer un lien entre la fonction, la localisation de ces partenaires et le phénotype de ce mutant.

La prochaine étape sera de vérifier par IP l'interaction de ces partenaires avec la forme monodéamidée seule.

Comme indiqué dans le tableau III-2, les protéines nucléaires MCM 4 et la nucléoline jouent un rôle dans la croissance cellulaire et la réplication du génome. La protéine ribosomale ARF 1 peut avoir un rôle dans le trafic des protéines à travers les compartiments cellulaires, et la protéine mitochondriale CPSM est impliquée dans le cycle d'urée. Nous ne pouvons pas expliquer directement comment l'interaction de ces partenaires spécifiquement avec la forme monodéamidée pourrait avoir un effet sur son phénotype. Il est nécessaire d'étudier ces partenaires par surexpression ou extinction par ARN interférence dans des lignées HCT 116 Bcl-x_L N52D N66A. Une fois que ces lignées cellulaires seront générées, des tests *in vitro* et *in vivo* pourront être réalisés pour déterminer si ces partenaires participent aux fonctions de la forme monodéamidées de Bcl-x_L déjà observés.

C.3. Interaction entre la forme IsoAspartates de Bcl-x_L et la protéine Bax:

La difficulté de la thématique concernant la déamidation des protéines réside dans l'étude des espèces contenant des résidus Iso-Aspartates, qui ne peuvent pas être reproduits par mutagenèse dirigée, à la différence des formes déamidées en Aspartates. Nous nous sommes concentrés dans la première partie de notre projet à caractériser la forme déamidée en aspartates. Cette partie est maintenant consacrée à la caractérisation des conséquences d'une déamidation de Bcl-x_L en isoAsp.

Dans la littérature, Alexander et al. ont montré que les traitements alcalins (pH=10) induisent majoritairement des formes isoAsp52 et 66 (70-85%). L'exposition à un pH alcalin de la protéine Bcl-x_L purifiée est séparé en 3 pics (A, B et C) après une chromatographie par échanges d'anions avec une augmentation d'un incrément de 1 Da respectivement. Par des expériences d'immunoprécipitation, les auteurs ont montré que seule la fraction correspondant au pic C perdait complètement son interaction avec la protéine pro-apoptotique Bim. Par analyse en spectrométrie de masse, cette fraction contient majoritairement des formes isoAsp52 et 66. Alors les formes isoAsp52 et 66 perdaient complètement son interaction avec les protéines pro-apoptotiques Bim et PUMA, alors que la forme non déamidable la conserve (Zhao et al. 2007b). Il est important de comprendre pourquoi la forme isoaspartate perd sa capacité d'interagir avec des partenaires pro-apoptotiques tandis que la forme aspartate la conserve, puisque ces 2 résidus sont situés dans la même boucle non structurée de Bcl-x_L. Dans un premier temps, nous avons répété les mêmes expériences que celles réalisées dans la littérature afin de vérifier les conclusions. Nous avons commencé par étudier les interactions entre la forme isoaspartate de Bcl-x_L et la protéine pro-apoptotique Bax dans des extraits cellulaires.

Lorsque la déamidation est stimulée *in vitro*, les formes Iso-Asp sont censées être majoritaires et représenter 70-85% de la protéine. Nous avons mis au point des conditions de traitements alcalins (pH=10, 37 °C pendant 24h) *in vitro* pour induire la déamidation. Ces tests ont été réalisés sur des extraits protéiques totaux de cellules surexprimant la protéine Bcl-x_L et différents mutants: Bcl-x_L N52D N66D, Bcl-x_L N52D N66A, et Bcl-x_L N66A (sans toucher le résidu Asn52). Nous avons vérifié que le

traitement alcalin induit la double déamidation de Bcl-x_L. Pour cela, nous avons utilisé le mutant N52D N66A comme étalon de migration. Ces extraits sont incubés avec Bax exogène purifiée pour palier la dégradation de Bax endogène par le choc alcalin. Des immunoprécipitations ont été réalisées contre Bax afin d'étudier son interaction avec Bcl-x_L et ses mutants (figure 52).

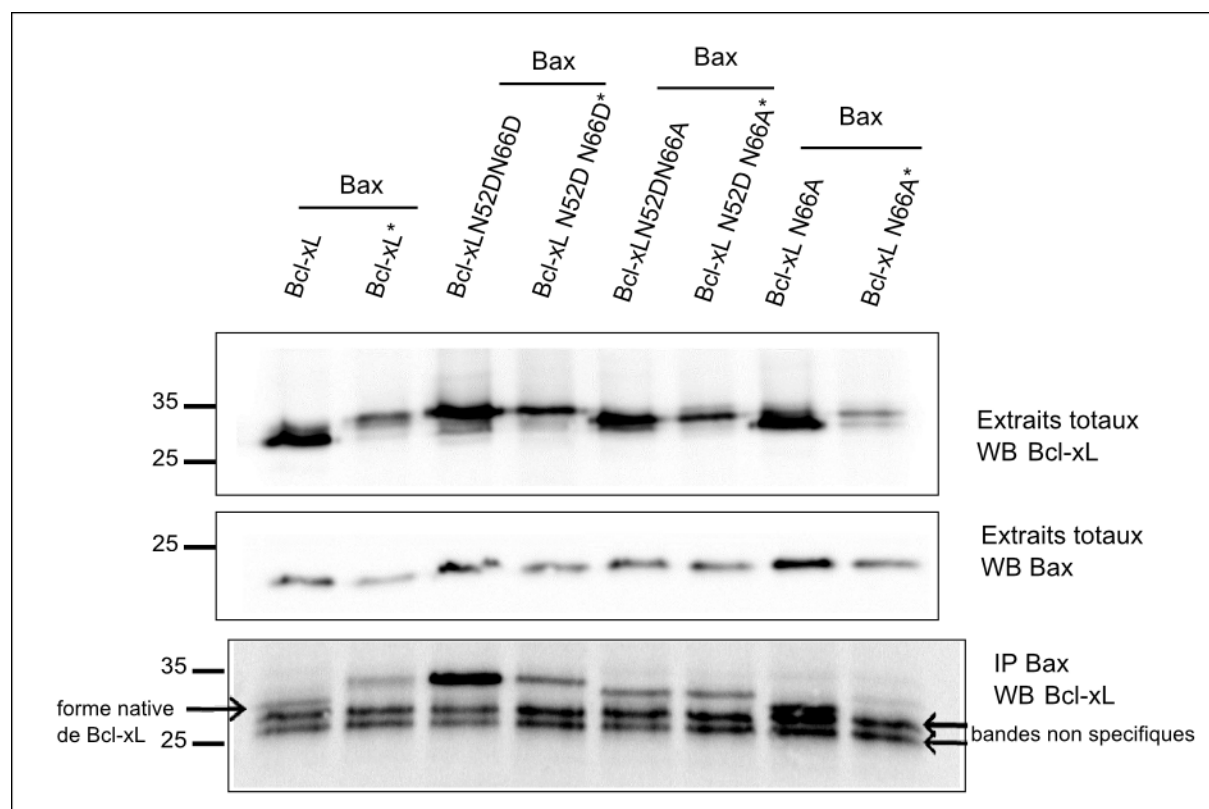


Figure 52: Co-Immunoprécipitation de Bcl-x_L et ses mutants avec Bax exogène purifiée suite à des tests de déamidation *in vitro*

Des tests de déamidation *in vitro* ont été réalisés sur 1 mg d'extraits totaux de Bcl-x_L et de ses mutants N52D N66D, N52D N66A et N66 A par traitement alcalin à pH=10 pendant 24h à 37 °C (notés*). Ces extraits sont incubés avec 100 ng de Bax exogène. Des immunoprécipitations contre Bax sont réalisées et soumises à une séparation de type Tris-Glycine-SDS-PAGE 12% et à des western blots dirigées contre Bax et Bcl-x_L (n>5).

Bcl-xL*: Bcl-xL exposée à pH=10 pendant 24h / Bcl-xL N66A*: Bcl-xL N66A exposée à pH=10 pendant 24h.

Il apparaît que lorsque Bcl-x_L et ses mutants sont déamidés, les niveaux d'expression de Bcl-x_L diminuent comparativement à ceux des formes non déamidées. Ceci peut être expliqué par une dégradation de la protéine suite à un traitement alcalin à pH=10 pendant 24h. Les extraits sont ramenés à pH=7 avant de rajouter Bax exogène. La figure 56 montre que le niveau d'expression de Bax est presque similaire dans tous les extraits totaux. Après l'immunoprécipitation de Bax,

nous avons analysé la présence de Bcl-x_L et ses différents mutants dans les éluats des IP.

Que les extraits totaux soient soumis à un traitement alcalin ou pas, nous avons observé une interaction avec Bax exogène. Donc tous les mutants de déamidation de Bcl-x_L conservent la capacité à interagir avec Bax.

Concernant le mutant Bcl-x_L N66A, sa déamidation *in vitro* produira une forme monodéamidée en position 52. Ce mutant interagit avec Bax, qu'il soit déamidé *in vitro* ou pas. Le signal est plus faible que dans les autres pistes à cause du faible «input» de protéines avant l'IP.

Ces résultats réalisés à partir d'extraits cellulaires nous montrent que les formes mono et double déamidée de Bcl-x_L obtenues suite à un traitement alcalin conservent leur interaction avec Bax.

Dans un second temps, nous avons répété la même expérience en réalisant le test *in vitro* par un choc alcalin (pH=10) pendant 24h sur les protéines purifiées de Bcl-x_L, et des différents mutants (N52A, N66A, et N52A N66A), cela pour induire une simple déamidation en isoAsp sur le résidu 52 et 66. Nous avons utilisé le mutant N52A N66A comme étalon de migration. Ces extraits sont incubés avec Bax exogène purifiée et des immunoprécipitations ont été réalisées contre Bax afin d'étudier son interaction avec Bcl-x_L et ses mutants. Les résultats sont présentés dans la figure 53.

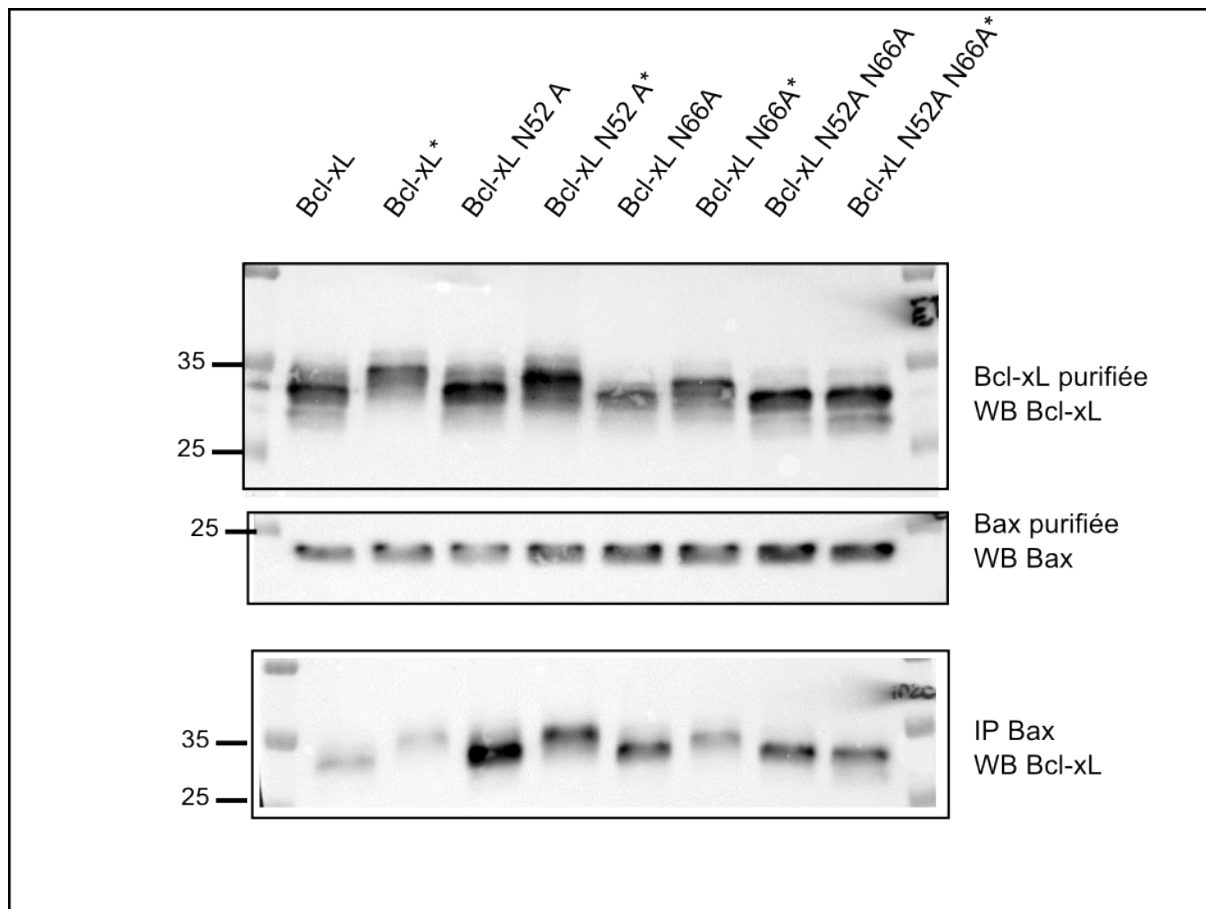


Figure 53: Co-Immuno-précipitation de Bcl-x_L purifiée et ses mutants avec Bax exogène purifiée suite à des tests de déamidation *in vitro*:

10 µg de protéines recombinantes 10-Histidine-site de coupure facteur Xa-Bcl-x_L et ses mutants (N52A, N66A et N52A N66A) sont purifiées puis clivées de l'étiquette 10-histidine (facteur Xa). Ensuite, 180 ng de ces protéines purifiées et clivées sont incubées à pH=10 pendant 24h à 37 °C, neutralisées avec HCl 3N (notés*). Ces protéines déamidées sont incubées avec 180 ng de Bax exogène. Des immunoprécipitations contre Bax sont réalisées et soumises à une séparation de type Tris-Glycine-SDS-PAGE 12% et à des western blots dirigées contre Bax et Bcl-x_L.

Bcl-x_L*: Bcl-x_L exposée à pH=10 pendant 24h / Bcl-x_L N66A*: Bcl-x_L N66A exposée à pH=10 pendant 24h (n>5).

Nous observons que, contrairement aux résultats obtenus avec les extraits totaux soumis à un pH alcalin pendant 24h, le niveau d'expression de Bcl-x_L et ses mutants est élevé et reste stable, que la protéine soit déamidée ou non. Le niveau d'expression de Bax est presque similaire. Après l'immunoprécipitation de Bax, nous avons analysé la présence de Bcl-x_L et ses différents mutants dans les éluats des IP et nous avons montré une interaction de Bcl-x_L purifiée avec tous les mutants de Bax exogène. Donc, tous les mutants de déamidation de Bcl-x_L conservent la capacité à interagir avec Bax.

Ces résultats, obtenus avec Bcl-x_L purifiée, nous confirment encore une fois que les formes mono et double déamidées de Bcl-x_L en isoAsp obtenues suite à un traitement alcalin conservent leur interaction avec Bax. Il sera important de confirmer ces résultats en analysant les interactions avec d'autres partenaires que Bax, comme Bim et PUMA et dans un second temps de quantifier la forme isoaspartate générée par le traitement alcalin.

Dans notre projet, nous nous sommes intéressés à caractériser la forme monodéamidée en Aspartates puisque ces espèces peuvent être reproduits par mutagenèse dirigée. Dans le cadre d'identification des partenaires, la prochaine étape sera d'analyser *in vitro* la capacité des protéines partenaires de Bcl-x_L N52D N66A purifiées par TAP-tag à interagir avec Bcl-x_L N66A qui aura été soumis à déamidation *in vitro* et produira donc majoritairement une forme isoAsp en position 52. Un premier candidat facile à tester sera Ras.

Discussion générale et Perspectives

III) Discussion générale et perspectives

Récemment, notre laboratoire a montré que Bcl-x_L exerce ses fonctions de survie à travers la régulation d'au moins 2 processus: l'apoptose et l'autophagie. Ce travail se focalisait sur l'étude de la déamidation que Bcl-x_L subit dans la lignée HCT 116 pour déterminer si elle affecte les fonctions pro-autophagiques de cette protéine. Les études portant sur la modification post-traductionnelle de Bcl-x_L ont envisagé un état de déamidation de Bcl-x_L dans le contexte d'un stress génotoxique et ont caractérisé une double déamidation de Bcl-x_L qui touche de façon équiprobable les résidus Asn52 et 66 situés dans sa boucle non structurée (Deverman et al. 2002; Zhao et al. 2007b). Cette déamidation transforme les résidus aspargines en aspartates et isoaspartates. La difficulté consiste dans l'étude des formes isoAsp puisqu'elles ne peuvent être reproduites par mutagenèse dirigée. Pour cela, la majorité de mes travaux de thèse est focalisée sur la caractérisation de la forme aspartate, mais mon manuscrit intègre aussi les données les plus récentes de l'équipe sur la caractérisation de la forme isoAsp, un projet qui sera amené à se développer de façon conséquente.

Dans la littérature, différentes approches ont été mises en oeuvre afin d'accumuler des arguments en faveur de la déamidation d'un résidu précis de Bcl-x_L comme les outils de prédiction algorithmique, la génération des mutants de déamidation par mutagenèse et la migration sur gel de type Laemmli. Mais, ces outils n'ont pas apporté une identification précise de la forme déamidée. Pour cela, nous avons essayé d'optimiser ces approches pour accumuler plus d'arguments prouvant une identification formelle de la forme déamidée. Pour l'heure, l'ensemble des résultats obtenus converge vers une déamidation simple de l'asparagine 52, en absence d'un signal génotoxique, dans différents types de cellules cultivées, normales et cancéreuses, et tous les tissus de souris où Bcl-x_L était détectable.

Un des objectifs de cette thèse était de poursuivre la mise en évidence et la caractérisation fonctionnelle de la forme monodéamidée de Bcl-x_L. Les différentes expériences mises en oeuvre dans ma thèse ont permis d'optimiser des outils et des approches pour améliorer la discrimination de l'état de déamidation de Bcl-x_L. Bien que des hypothèses restent encore à valider, l'ensemble des résultats obtenus nous confirme que la modification post-traductionnelle de Bcl-x_L est vraisemblablement une simple déamidation sur le résidu Asn52.

Un autre objectif de cette thèse était également la poursuite de la caractérisation des fonctions oncogéniques de Bcl-x_L indépendantes de son activité anti-apoptotique ainsi que l'étude de l'effet de la forme monodéamidée (N52D N66A) sur ces fonctions par des approches moléculaires et des analyses physio-pathologiques *in vitro* et *in vivo*.

Cette monodéamidation qui n'affecte pas ses fonctions anti-apoptotiques, renforce cependant ses fonctions autophagiques, et diminue ses propriétés oncogéniques et tumorigènes (Beaumat et al. 2016), les mécanismes sous-jacents ont été explorés durant ma thèse.

La suite de ce manuscrit a pour objectif de discuter toutes les observations, les hypothèses émises, et présente les différents modèles proposés dans cette étude.

A. Migration sur gel SDS-PAGE: Est-ce la meilleure stratégie pour discriminer l'état de déamidation de Bcl-x_L?

Dans la littérature, les travaux réalisés sur les mutants récapitulant la déamidation de Bcl-x_L (par mutagenèse dirigée) montrent que l'outil le plus utilisé pour évaluer l'état de déamidation de Bcl-x_L est la migration sur gel SDS-PAGE de type Laemmli. Dans la littérature, les expériences prouvent une double déamidation sur ces 2 résidus en réponse à des stress génotoxiques (Deverman et al., 2002). Aucune étude ne mentionne une déamidation de Bcl-x_L en condition normale de culture. Par contre, l'ensemble des résultats obtenus au laboratoire durant la thèse de F. Beaumat par différents outils (électrophorèse bi-dimensionnelle, test de phosphorylation/déphosphorylation, les distances de migration des déamidomimétiques en SDS-PAGE de type Laemmli) étaient des arguments suggérant l'existence d'une simple déamidation sur le résidu Asn52 de Bcl-x_L en condition normale. Suite à ces observations, nous avons pensé qu'il était souhaitable de mettre au point d'autres outils afin d'optimiser les profils de migration et confirmer notre hypothèse. Durant notre étude, nous avons montré que différents paramètres comme la dimension du gel, sa composition et la durée de migration pouvaient affecter les profils électrophorétiques de Bcl-x_L et de ses mutants de déamidation.

La migration sur gel de type Laemmli montre que le mutant N52D N66A co-migre avec la forme modifiée, tandis que la migration sur gel Tris-Taurine/Glycine montre

que ce mutant migre de façon intermédiaire entre la forme native et la forme modifiée, et que le mutant N52A N66A migre plus vite que la forme native.

Ces différents résultats pourraient suggérer que l'identité de la forme modifiée de Bcl-x_L est ambiguë. Les hypothèses que nous envisageons sont que soit la nouvelle composition du gel, soit que l'introduction des alanines par mutagenèse pourrait être responsable de la plus grande distance de migration.

Pour l'heure, nos résultats permettent seulement d'écarter la première hypothèse, puisque nous avons observé les mêmes profils de migration en utilisant un gel SDS-PAGE de type Laemmli de 26 cm et en étirant au maximum la distance de migration (figure 20). Pour répondre à la deuxième hypothèse, nous avons généré un mutant Bcl-x_L N52D sans remplacer le résidu N66, et réalisé une électrophorèse sur un gel Tris-Taurine/Glycine. Nous avons montré que ce mutant N52D co-migre avec la forme modifiée. Cela confirme que l'introduction de l'alanine était responsable de la grande distance de migration.

En effet, le mutant non déamidable (N52A N66A) utilisé au cours de notre étude représente une forme de la protéine pour laquelle les résidus asparagines sont substitués par alanine. Or, ce mutant non déamidable, d'après ces résultats observés, nous montre que la substitution par l'alanine n'est pas aussi silencieuse, et nous incite à réfléchir à un autre choix que l'alanine pour rendre l'Asn66 non déamidable.

Bien que les outils utilisés durant notre étude supportent le fait que cette modification est vraisemblablement une simple déamidation de l'Asn52, l'identification formelle de cette modification n'est pas réalisée et constitue une des perspectives à ce travail. Il nous manque une preuve directe irréfutable de l'identité de la forme modifiée de Bcl-x_L. Il faudra réaliser une purification de la protéine totale Bcl-x_L suivie d'une analyse par spectrométrie de masse pour détecter tous les acides aminés modifiés. Donc, la migration sur gel SDS-PAGE reste pour l'heure l'outil le plus utilisé pour discriminer l'état de déamidation de Bcl-x_L, mais ne peut pas être le meilleur outil pour tirer des conclusions irréfutables et précises sur l'identification de la forme déamidée de Bcl-x_L.

B. Forme monodéamidée N52D N66A: Réorganisation structurale de Bcl-x_L

Les prédictions algorithmiques faites par Robinson et al. sur la probabilité de la déamidation se sont basées sur la structure tri-dimensionnelle de Bcl-x_L. Si cette structure est fautive, la probabilité de la déamidation serait encore fautive.

La détection de la forme monodéamidée (N52D N66A) a mis en évidence que le résidu Asn66 semblait réfractaire à la déamidation (Beaumat et al., 2016). Cela a soulevé un point qui s'oppose aux prédictions *in silico*, et suggère que les résidus Asn52 et 66 n'ont pas une équiprobabilité à être déamidés dans les cellules. Notre hypothèse est que la région décrite par la cristallographie aux rayons X et les données RMN (sur la protéine isolée ou purifiée) (Muchmore et al. 1996) comme une grande boucle non structurée contenant Asn52 et Asn66, pourrait bien adopter une structure définie dans les cellules, due soit à l'insertion des protéines dans la membrane, soit à son interaction avec des partenaires spécifiques, ou les deux. Suite à ces observations, nous avons suggéré que Bcl-x_L déamidée (N52D N66A) puisse adopter une structure différente que celle de Bcl-x_L native. Pour prouver cette hypothèse, il faudrait visualiser par cristallographie la structure tri-dimensionnelle de Bcl-x_L déamidée et la comparer avec celle de Bcl-x_L native.

C. Déamidation et cancer:

Nous avons montré que la forme monodéamidée N52D N66A stimule l'autophagie de survie dans les cellules HCT 116 cultivées en condition de stress nutritif, et diminue les propriétés oncogéniques et tumorigènes de Bcl-x_L *in vitro* et *in vivo*. Lorsque les cellules sont greffées sur CAM, nous avons observé une tumeur de taille plus petite avec les cellules surexprimant la forme monodéamidée par rapport à celles surexprimant Bcl-x_L. De plus, les analyses histologiques sur les coupes de tumeurs prélevées sur CAM montrent que la forme monodéamidée diminue l'effet prolifératif de l'oncogène Bcl-x_L. Ce résultat nous a permis d'élargir notre thématique de recherche en étudiant des aspects particuliers, spécifiquement liés aux caractéristiques des cellules cancéreuses. Ces études permettent de lier la déamidation au cancer. Par observation macroscopique des tumeurs prélevées, nous avons constaté que le nombre des vaisseaux sanguins dans la tumeur dérivée

des cellules surexprimant la forme monodéamidée est moins important que celles surexprimant Bcl-x_L (donnée non présentée). Un des processus responsable de recrutement des vaisseaux sanguins vers la tumeur est la néo-angiogenèse. Elle est activée par différents facteurs, y compris l'hypoxie ou encore les oncogènes (Mukhopadhyay D et al., 1995). Dans ce cadre, il serait possible que la petite taille de tumeur dérivée des cellules surexprimant la forme monodéamidée soit due à un défaut de vascularisation suggérant que la déamidation pourrait empêcher le recrutement des vaisseaux sanguins. Cette hypothèse est étayée par des études faites sur le rôle de Bcl-x_L dans l'angiogenèse. Il a été montré que Bcl-x_L augmente *in vitro* la prolifération des cellules endothéliales et la formation des vaisseaux sanguins *in vivo*. En outre, la surexpression de Bcl-x_L induit une augmentation de l'expression de l'interleukine pro-angiogénique (CXCL8) (Giorgini S et al., 2007) (Donatella Del Bufalo et al., 2013). Dans le contexte de notre travail, pour savoir si la déamidation de Bcl-x_L modifie le processus d'angiogenèse, il serait intéressant d'analyser l'expression de cette interleukine dans des extraits protéiques issus de cultures cellulaires et de tumeurs dérivées des cellules surexprimant Bcl-x_L et sa forme monodéamidée N52 D N66A. Le marquage de facteurs angiogéniques comme le couple VEGF/VEGFR pourra être envisagé par des analyses immunohistologiques sur les coupes de tumeur (obtenues sur CAM ou sur souris). Puisque l'hypoxie peut induire la transcription du facteur HIF-1 qui induit de nombreux gènes impliqués dans l'angiogenèse comme le VEGF A et B (Pouyssegur et al. 2004), il serait intéressant de jouer sur le facteur HIF-1 soit en l'inhibant, soit en le stabilisant dans les différentes lignées cellulaires HCT 116 P, HCT 116 Bcl-x_L et HCT 116 Bcl-x_L N52D N66A, puis les greffer de nouveau sur CAM afin de vérifier si l'effet de déamidation sur la fonction de Bcl-x_L est dépendant de la pression d'O₂.

La baisse des capacités tumorigènes de la forme monodéamidée de Bcl-x_L pourrait être due à une variation quantitative et/ou qualitative du compartiment des cellules souches cancéreuses. Ces cellules sont caractérisées par leur capacité d'initier une nouvelle tumeur, et par la résistance aux thérapies qui constitue une cause fréquente de récurrence de cancers. Nous avons souhaité étudier l'effet de la forme monodéamidée de Bcl-x_L sur les différents paramètres des CSC dans le cadre du cancer colorectal. Pour tester cette hypothèse, des premiers tris des lignées cellulaires HCT 116 P, HCT 116 Bcl-x_L et HCT 116 Bcl-x_L N52D N66A ont été initiés

par une technique appelée sdFFF (sedimentation field flow fractionation), permettant de récolter différentes sous-populations (PT, F1 et F3). Cet outil représente une technique de tri efficace, rapide, et n'interférant pas avec la physiologie initiale des cellules (Bégaud-Grimaud G et al., 2006). De nombreux travaux de l'équipe de Limoges ont permis de proposer des champs d'application à la sdFFF, que ce soit dans le tri cellulaire (Cailleteau C et al., 2010) ou dans le suivi d'évènements biologiques tels que l'autophagie (Naves T et al., 2012).

De plus, les analyses phénotypiques réalisées sur les fractions triées par sdFFF à partir des lignées HCT 116 révèlent une expression augmentée des marqueurs de CS (CD44, CD 166, ...) dans la fraction F1, validant l'efficacité de cette technique pour l'enrichissement en CSC (Mélin et al., 2012). Dans cette étude, les cellules de la F1 des HCT116 possédaient une capacité à former des colonies *in vitro* (tests de clonogénicité) supérieure à la population originale, confirmant donc leur propriété d'auto-renouvellement (Mélin et al., 2012).

D'autres travaux réalisés sur des cultures cellulaires de glioblastome (Bertrand J et al., 2009) ont montré que la fraction de cellules ayant les caractéristiques les plus indifférenciées sont les plus résistantes à l'apoptose induite par Fas, pouvant expliquer, au moins en partie, la chimio résistance de ces cellules.

En effet, une caractéristique fonctionnelle des CSC repose sur leur capacité à résister aux traitements anti-cancéreux (Bao et al., 2006). Un des plus utilisés dans le cas des CCR (cancer colorectal) est le 5-FU. L'évaluation de sa toxicité montre que la surexpression de Bcl-x_L entraîne une meilleure résistance au traitement qu'il soit mono-déamidé ou non. Cela semble indiquer que la déamidation n'aurait pas d'impact sur la survie cellulaire, confirmant encore une fois que la déamidation conserve la fonction anti-apoptotique de Bcl-x_L (Beaumat et al. 2016).

L'intérêt de cette étude était de déterminer l'impact oncogénique et tumorigénique de la déamidation de Bcl-x_L sur le compartiment des cellules souches dans une culture de cellules de cancer colorectal, ce qui permettrait *in fine* de définir Bcl-x_L déamidée comme une nouvelle cible thérapeutique. Bien que nous n'ayons pas détecté de variations d'expression et localisation de 2 facteurs de transcription (oct 4 et BMI1) associés aux CSC dans les populations cellulaires totales, les résultats préliminaires, obtenus après sdFFF, montrent des profils d'élution différents entre les

3 lignées avec une augmentation de la fraction F1 pour la lignée exprimant la forme monodéamidée de Bcl-x_L. Cela laisse supposer la présence plus importante de CSC dans cette lignée. Cette hypothèse est renforcée par la plus forte expression de la forme Bcl-x_L monodéamidée dans la fraction F1 de la lignée parentale. Ces premiers essais doivent être complétés par des tests phénotypiques (expression et localisation des marqueurs des CSC) et fonctionnels (test de clonogénicité, évaluation de la mort cellulaire, de la prolifération, résistance aux traitements) réalisés sur les différentes fractions sub-cellulaire. De cette façon, nous chercherons à savoir si la surexpression de Bcl-x_L et sa forme monodéamidée modifient les caractéristiques fonctionnelles de la lignée HCT 116 et particulièrement dans la fraction des CSC.

C.1. Monodéamidation de Bcl-x_L: Effet métabolique ?

En parallèle, toujours dans le souci de relier les observations faites avec Bcl-x_L N52D N66A *in vitro* (augmentation de l'activité autophagique, diminution de clonogénicité en milieu semi-solide) et *in vivo* (formation de tumeurs de petites tailles), nous avons cherché des modifications métaboliques qui pourraient expliquer que lorsque les cellules sont xénotreffées en modèle de CAM ou dans la souris, elles prolifèrent moins vite que les cellules exprimant Bcl-x_L native. Nous avons testé en collaboration avec le Dr Arnaud Mourier, à l'IBGC, les activités respiratoires endogènes, stimulées ou découplées des cellules cultivées dans diverses conditions (nature et concentration du substrat carboné). L'ensemble de nos résultats a montré que ni la surexpression de Bcl-x_L, ni sa déamidation ne modifient les performances de la chaîne respiratoire lorsque les cellules sont cultivées en forte glycémie. La surexpression de Bcl-x_L stimule la vitesse de la respiration mitochondriale couplée lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu supplémenté des substrats respiratoires, mais aucune différence n'est observée concernant l'effet de déamidation sur le rôle métabolique de Bcl-x_L. Dans la littérature, des études ont montré que Bcl-x_L stimule la respiration mitochondriale en interagissant avec la sous-unité B de la pompe F1 F₀ ATP synthase et augmente le transport net des ions H⁺ par F1 F₀ pendant l'activité F1 F₀ ATP synthase (Elizabeth A. Jonas et al., 2011). Ces données semblent cohérentes avec nos résultats et nous incitent à envisager d'autres expériences (interaction avec la pompe ATP synthase, transport des ions

H⁺...) pour comprendre, dans nos conditions, les mécanismes sous-jacents par lequel Bcl-x_L et sa forme monodéamidée stimulent la respiration couplée. D'autre part, nous avons aussi analysé en collaboration avec le Dr Anne Devin l'activité glycolytique des cellules. Pour l'heure, le rôle de Bcl-x_L et sa forme monodéamidée dans l'activité glycolytique n'est pas étudié dans la littérature. Les résultats obtenus semblent encourageants puisque nous avons observé des différences de flux glycolytique dans les lignées surexprimant Bcl-x_L et sa forme monodéamidée, mais ces données sont encore trop variables pour tirer des conclusions. Afin de diminuer les barres d'erreurs observées et d'avoir des différences significatives, il faudra répéter ces expériences de façon reproductible pour améliorer les résultats et tirer des conclusions définitives. En effet, les conditions expérimentales *in vitro* (pression en O₂, adhérence sur des boîtes en plastiques,...) ne récapitulent pas les conditions de croissance *in vivo* (nutrition, vascularisation). Ceci nous incite à envisager des expériences *in vitro* en modifiant les conditions de culture pour s'approcher au mieux des conditions présentes *in vivo*. Les pistes que nous souhaitons développer reposent sur la culture en hypoxie (pour se rapprocher de la pression d'O₂ présente *in vivo*), ou encore la culture en suspension afin de perdre l'adhérence et de se rapprocher des conditions présentes dans le test de clonogénicité.

D. Relations entre la monodéamidation de Bcl-x_L et la stimulation de l'autophagie:

La régulation de l'autophagie est une des fonctions identifiées de Bcl-x_L (Maiuri et al., 2007). Alors que la majorité des études publiées ont montré que Bcl-2 et Bcl-x_L inhibent l'autophagie (Patingre et al., 2005) notamment en interagissant avec Beclin 1 pour bloquer la stimulation du complexe initiateur PI3K (Levine, Sinha and Kroemer, 2008), les études faites par notre laboratoire sont en désaccord et montrent que Bcl-x_L joue un rôle pro-autophagique dans les lignées HCT 116 cultivées dans un milieu carencé en nutriments (Priault et al., 2010; Beaumatin et al., 2016). L'ensemble de ces données nous incitent à comprendre comment Bcl-x_L stimule l'autophagie. De plus, ayant observé que la forme monodéamidée de Bcl-x_L exerçait une stimulation de l'autophagie plus forte que la forme native, nous avons tenté de caractériser les voies de signalisation sous-jacentes. En collaboration avec le Dr Raul Duran (IECB, Bordeaux) nous avons exploré les voies dépendantes de

mTor. L'activité du complexe mTorC1 est régulée par différents signaux comme la disponibilité en nutriments et l'hypoxie. En condition de carence nutritive, mTor est inhibée et l'autophagie est stimulée (Corcelle, Puustinen, and Jäättelä 2009).

La vitesse d'inhibition de Tor est comparée dans les lignées HCT 116 en réponse à une carence en nutriments. L'activité de mTor est plus fortement réprimée par la carence lorsque les cellules surexpriment Bcl-x_L ou sa forme monodéamidée, ce qui suggère l'implication de la voie mTor dans le rôle autophagique de Bcl-x_L. Néanmoins, ces données n'apportent pas d'arguments en faveur de l'effet stimulateur de l'autophagie par la monodéamidation de Bcl-x_L. Récemment, des études ont montré que l'ajout de la leucine et la glutamine suffisent à réactiver la voie mTor malgré la carence nutritive; c'est le cas de la voie de glutaminolyse (Durán and Hall 2012). La question posée était de savoir si la monodéamidation de Bcl-x_L modifiait cette voie non conventionnelle de la réactivation de mTor. Le même effet de Bcl-x_L est observé sur l'activité de mTor (diminution de 38%), tandis qu'une diminution moins forte de cette activité est visible en cas de déamidation. Dans le sens où l'activation de mTor inhibe l'autophagie, ce résultat semble contradictoire avec l'effet stimulateur de la monodéamidation sur le rôle autophagique de Bcl-x_L. Il est connu que lorsque mTor est activée, elle est transloquée du cytosol vers les lysosomes pour inhiber l'autophagie par interaction avec le complexe ULK/ATG13. Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents, la prochaine étape sera de vérifier la localisation subcellulaire de mTOR lorsque les cellules surexpriment Bcl-x_L et la forme monodéamidée. De plus, l'activité de mTor peut être régulée par plusieurs voies de signalisation. L'activation de mTorC1 par la voie Wnt/ β -caténine inhibe l'autophagie, tandis que son inhibition par la voie AMPK augmente l'autophagie (Inoki et al. 2006). Dans le but de clarifier l'effet de la monodéamidation sur l'activité de mTor, il serait intéressant d'aller plus loin pour étudier les voies régulatrices de mTor en cas de surexpression de Bcl-x_L et de sa forme monodéamidée.

En parallèle, toujours dans le but de comprendre l'effet de la monodéamidation sur l'autophagie, nous avons exploré en collaboration avec le Dr Philippe Juin (Nantes) les voies dépendantes de Ras. La protéine Ras joue un rôle dans la régulation de l'autophagie, et il a été montré l'existence d'interactions physiques entre les oncogènes K-Ras et Bcl-x_L (Bivona et al. 2006). Après analyse des

immunoprécipitations, il apparaît que la forme monodéamidée de Bcl-x_L entrainerait la perte d'interaction avec son partenaire K-Ras sauvage. En revanche, lorsque K-Ras est mutée, la déamidation de Bcl-x_L ne modifierait pas cette interaction. Cependant, pour confirmer ces résultats, il faudrait répéter l'expérience en effectuant cette fois-ci des IP contre Bcl-x_L pour vérifier que les résultats de cette expérience restent valides dans les deux sens. Une méthode alternative, la BRET, est utilisée pour confirmer l'existence de ces interactions dans les cellules vivantes. Les résultats préliminaires montrent le même effet de la forme monodéamidée (N52D N66A) avec K-Ras WT. L'étude des interactions avec les mutants de K-Ras est en cours d'analyse. On pourrait donc dire que dans les cellules normales, la proportion de Bcl-x_L monodéamidée serait capable de réguler l'interaction avec son partenaire K-Ras. En revanche, dans les cellules cancéreuses où K-Ras est mutée, cette modification post-traductionnelle de Bcl-x_L perdait son rôle régulateur dans cette interaction.

Il est connu que Ras peut stimuler l'autophagie en activant la RAF/ERK, ou l'inhiber en activant la voie AKT/PI3K (Guo et al. 2011). Une fois les résultats confirmés, la prochaine question à laquelle il faudrait apporter une réponse serait de savoir si cette perte d'interaction pourrait avoir des répercussions sur les voies de signalisations dans lesquelles ces deux protéines sont impliquées.

E. Partenaires moléculaires de Bcl-x_L N52D N66A:

Dans notre laboratoire, nous avons analysé sur gel de polyacrylamide non dénaturant les profils de migration d'extraits mitochondriaux exprimant Bcl-x_L ou Bcl-x_L N52D N66A. Une deuxième dimension en condition dénaturantes a permis de montrer que Bcl-x_L s'assemble dans les complexes qui ne contiennent pas la forme mono-déamidée, et vice versa. Ces données indiquent que les protéines déamidées s'assemblent entre elles, sans qu'il y ait de complexes mixtes avec les protéines natives, suggérant l'existence des partenaires spécifiques de deux formes. Nous avons initié des expériences de TAP-tag différentiel entre TAP- Bcl-x_L et TAP- Bcl-x_L N52D N66A pour tenter les identifier. L'analyse par spectrométrie de masse nous a déjà permis de valider le protocole et le modèle cellulaire puisque parmi les partenaires solubles de Bcl-x_L figurent Rab, Ras..., comme dans l'étude de I. Iaccarino (Vento et al. 2010). A travers les partenaires identifiés, nous voulons étudier les fonctions exercées par la forme déamidée de Bcl-x_L seulement.

Parmi les partenaires identifiés spécifiques pour Bcl-x_L N52DA N66A, on retrouve les protéines nucléaires MCM4 et la nucléoïne (croissance cellulaire et la réplication du génome), la protéine ribosomale ARF1 (trafic cellulaire) et la protéine mitochondriale CPSM (cycle de l'urée). La sélection des partenaires nécessite d'étudier leurs fonctions et de les lier avec le phénotype de la forme monodéamidée. Par exemple, le rôle de la nucléoïne et CPSM dans la réplication du génome et la croissance cellulaire pourrait être impliqué dans le ralentissement de la croissance cellulaire et la baisse tumorigénique observées chez le mutant N52D N66A. Afin d'aller plus loin, plusieurs travaux sont proposés pour la suite de ce projet. Il est tout d'abord nécessaire de vérifier par IP l'interaction de ces partenaires avec la forme monodéamidée. Pour comprendre si elles affectent ses fonctions, différentes approches telles que la surexpression ou l'extinction par l'ARN interférence dans les cellules surexprimant Bcl-x_L N52D N66A seront envisagées.

Nous avons supposé que l'identification des partenaires spécifiques pourrait être d'un grand intérêt pour cibler de façon spécifique la déamidation de Bcl-x_L. Seulement ces données permettraient de caractériser les voies spécifiques contrôlées par Bcl-x_L monodéamidée et comprendre comment cette modification contrôle la fonction oncogénique de la protéine indépendamment de son activité anti-apoptotique.

F. Inclure l'étude des formes isoAsp:

La plus grande partie de ma thèse se focalisait sur l'étude de la forme monodéamidée en aspartate (N52D N66A). La difficulté de cette étude concernant la déamidation de Bcl-x_L est la formation d'espèces contenant des résidus Iso-Aspartates, qui ne peuvent pas être reproduits par mutagenèse dirigée comme les formes déamidées en Aspartates. Les études réalisées *in vivo* ou même *in cellulo* sont donc vouées à n'être que partielles puisqu'elles n'intègrent pas l'existence des formes Iso-Asp. De plus, lorsque la déamidation est stimulée *in vitro*, les formes Iso-Asp sont décrites comme étant majoritaires (70-85%). Bien sûr, dans les cellules ou dans les tissus, les proportions de protéines contenant des résidus Asp ou Iso-Asp sont établies en fonction de l'activité de réparation de l'enzyme PCMT/PIMT, qui convertit les Iso-Asp en Asp. Ces formes isoAsp sont considérées comme des résidus anormaux qui modifient la structure primaire et secondaire des protéines. Il a

été montré que les formes isoAsp52 et isoAsp66 de Bcl-x_L perdent leurs interactions avec des protéines pro-apoptotiques comme Bim (Deverman et al., 2002), tandis que les formes Asp52 et 66 les conservent. Cependant, cet argument ne paraît pas valide pour plusieurs raisons. D'abord, la déamidation ne convertit pas totalement l'asparagine en isoaspartate. Celle-ci est convertie en isoAsp et asp avec des proportions variant entre 70:30 à 85:15, selon les protéines (N. E. Robinson and Robinson 2004). Ceci signifie que 15 à 30 % de Bcl-x_L déamidée resterait susceptible d'interagir avec Bim. Or, les expériences de co-immunoprécipitation réalisés par Zhao et al. ne montrent aucune interaction entre la protéine modifiée qu'ils observent et Bim (Zhao et al., 2007b). La seconde raison est qu'aucune étude n'a prouvé que la modification de la structure de Bcl-x_L par les formes isoAsp peut toucher la région par laquelle cette protéine interagit avec des partenaires pro-apoptotiques. Comme les explications envisagées ci-dessus n'ont pas été discutées et confirmées dans les travaux de D.R Alexander, son argument sur la perte d'interaction de la forme isoAsp de Bcl-x_L avec Bim n'est pas juste, et il manque davantage d'arguments pour la rendre irréfutable. L'ensemble de ces observations nous a incité à répéter ces expériences en développant des tests *in vitro* pour analyser les interactions établies par les formes de Bcl-x_L déamidées en IsoAsp. L'ensemble de nos résultats montrent que suite à un traitement alcalin, les formes mono ou double déamidées (N52D et N66D) ne perdent pas leurs interactions avec la protéine pro-apoptotique Bax. Ces résultats semblent contradictoires avec celles obtenues dans la littérature (Zhao et al. 2007b). Il paraît donc important d'analyser les interactions avec d'autres partenaires pro-apoptotiques comme Bim et PUMA. Afin de confirmer nos résultats et de conclure que les formes isoAsp52 et 66 n'affectent pas les interactions de Bcl-x_L avec ses partenaires, il faut s'assurer que le traitement alcalin induit majoritairement des formes isoAsp comme observées dans la littérature par une quantification des formes isoAsp contenant dans la protéine Bcl-x_L. Elle sera réalisée par un transfert enzymatique des groupes méthyles radioactifs à partir d'un substrat (³H)-S-adenosyl-L-méthionine ou (³H) AdoMet dans une réaction catalysée par l'enzyme PIMT (Protein L-isoaspartyl-methyltransferase). Une prochaine étape intéressante à poursuivre dans ce projet serait d'analyser *in vitro* les partenaires de la forme monodéamidée en isoAsp52 et les comparer avec celles identifiées de Bcl-x_L Asp52.

Conclusion

IV) Conclusion:

Pour conclure, le travail réalisé dans ma thèse a permis dans un premier temps d'accumuler davantage d'arguments sur l'existence de la forme monodéamidée de Bcl-x_L (N52D N66A). Les mécanismes sous-jacents à la fonction pro-autophagique de cette forme monodéamidée de Bcl-x_L nous ont conduit à incriminer la voie mTor et la voie de signalisation médiée par l'oncogène Ras. D'autre part, ces travaux ont permis d'ouvrir une nouvelle piste liant de façon directe la forme monodéamidée de Bcl-x_L au cancer. La monodéamidation altère les propriétés oncogéniques et tumorigéniques *in vitro* et *in vivo*. Ceci a apporté de nouvelles pistes intéressantes qui nous incitent à élargir notre connaissance et aller plus loin en étudiant des aspects particuliers liés au cancer comme les dérégulations métaboliques des cellules cancéreuses et les cellules souches cancéreuses. Cette étude ouvre de nouvelles perspectives à long terme comme par exemple, l'identification des partenaires spécifiques de cette forme monodéamidée afin de cibler de façon directe la déamidation de Bcl-x_L et élaborer de nouvelles approches thérapeutiques contre le cancer.

Matériels et Méthodes

V) Matériels et méthodes:

A. Techniques de Biologie moléculaire:

Durant cette thèse, des constructions plasmidiques ont été utilisées afin de générer des mutants ponctuels pour lesquels un ou plusieurs résidus de la séquence de la protéine d'intérêt sont modifiés. Diverses techniques et protocoles sont employés pour l'obtention de ces mutants.

A.1. Amplification bactérienne d'ADN plasmidique:

Le but est d'amplifier une grande quantité de plasmide à partir de 50 ng de plasmide. Ce protocole comprend les étapes suivantes: la transformation des bactéries chimio-compétentes et leur culture en milieu sélectif pour atteindre une biomasse suffisante et extraire l'ADN plasmidique pour le purifier.

a) Transformation des bactéries compétentes par choc thermique:

La transformation des bactéries compétentes est réalisée en mettant 50 ng de plasmide au contact des cellules. Les bactéries sont incubées sur glace avec le plasmide durant 30 minutes avant de subir un choc thermique à 42 °C pendant 20 s. Les cellules sont refroidies sur glace quelques instants puis incubées 1h à 37 °C dans du milieu LB (1% extrait de levures, 1,6% bacto-tryptone, 1% NaCl ajusté à pH=7,5, et pouvant être additionné de 1% d'agar pour culture sur milieu solide). Finalement, les bactéries sont centrifugées puis étalées sur des boîtes de LB solide contenant un antibiotique permettant la sélection des bactéries transformées et incubées durant une nuit à 37 °C. La souche E.Coli STBL2 est utilisée pour amplifier les plasmides lentiviraux et la souche DH5 α est utilisée pour les autres plasmides.

b) Amplification, extraction et purification d'ADN plasmidique:

La première étape consiste à transférer un clone du milieu solide dans 3 mL de milieu LB sélectif liquide et à placer le tube à 37 °C. Lorsque les bactéries sont en phase stationnaire de croissance, elles sont récoltées et l'ADN plasmidique est extrait en utilisant le Kit "GeneJet plasmid miniprep" (Fermentas). Le principe repose sur la lyse alcaline de la paroi bactérienne, l'élimination des débris cellulaires, l'adsorption de l'ADN sur colonne échangeuse d'anions suivie de son élution dans

un volume final d'environ 30 à 50 μL .

Pour disposer d'une plus grande quantité de plasmide, il est possible d'ensemencer 100 mL de milieu LB sélectif à partir de 3 mL de la culture bactérienne de 3 mL. Cette nouvelle culture est incubée à 37°C jusqu'à atteindre la phase stationnaire de croissance. Les bactéries sont récoltées par centrifugation et l'ADN plasmidique est extrait et purifié à l'aide du Kit "Midiprep NucleoBond" (Machery Nagel). Ce protocole permet de récupérer entre 500 et 1000 ng/ μL de plasmide.

Le dosage des préparations d'ADN est effectué par mesure de l'absorbance à 260 nm à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop (Thermo scientific). La pureté est estimée par le rapport des absorbances lues à 260 nm et 280 nm.

A.2. Mutagenèse dirigée par PCR:

La matrice utilisée pour toutes les mutagenèses a été un plasmide contenant pRc-CMV Bcl-xL shR (shR signifie que nous avons introduit dans le gène codant Bcl-xL une mutation silencieuse rendant son ARN messager résistant aux séquences de shARN ciblant le nucléotide 58 de la protéine native). Le mode d'obtention des différents mutants générés durant cette étude est décrit dans le tableau V.1 (Kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene)).

Mélange réactionnel	Mélange réactionnel
- Plasmide matriciel (50 ng)	94°C 5 minutes
- Oligonucléotides sens et anti-sens (125 ng de chaque)	94°C 30 secondes
- Tampon de réaction	45°C 1 minute
- Taq polymérase (1X)	72°C 8 minutes
- H ₂ O (50 μL)	7 °C 10 minutes
	} 20 X

Tableau V.1: Mode d'obtention des différents mutants générés durant l'étude.

Pour finir, le produit de cette PCR est incubé pendant 1h 30 min à 37°C en présence d'1 μL d'enzyme de restriction Dpn1, afin de digérer le plasmide matriciel méthylé par les bactéries qui ont permis son amplification. Cette étape permet de dégrader l'ADN matrice non muté avant de procéder à l'amplification bactérienne du plasmide muté néosynthétisé.

Les différentes constructions plasmidiques générées par mutagenèse dirigée au cours de cette étude sont citées dans le tableau V.2 suivant.

Constructions plasmidiques
pRc-CMV-Bcl-xL ShR N52D N66D
pRc-CMV-Bcl-xL ShR N52D N66A
pRc-CMV-Bcl-xL ShR N52A N66D
pRc-CMV-Bcl-xL ShR N52A N66A
pcDNA EF1 TAP- Bcl-xL ShR N52D N66D
pcDNA EF1 TAP- Bcl-xL ShR N52D N66A
pcDNA EF1 TAP- Bcl-xL ShR N52A N66D
pcDNA EF1 TAP- Bcl-xL ShR N52A N66A

Tableau V.2: Liste des constructions plasmidiques générées par mutagenèse dirigée au cours de cette étude.

Les séquences des oligonucléotides utilisés pour générer ces mutants sont listées dans le tableau V.3.

Nom de l'oligonucléotide	Séquence
N52D	5'- CCCAGTGCCATCGATGGCAACCCATCCTG-3'
N52A	5'- GAGACCCCCAGTGCCATCGCCGGCAACCCATCCTG-3'
N66D	5'- CAGCCCCGCGGTGGATGGAGCCACTG-3'
N66A	5'- CAGCCCCGCGGTGGCCGGAGCCACTGGCC-3'

Tableau V.3: Listes des séquences des oligonucléotides utilisés durant cette étude.

A.3. Clonage des gènes dans les plasmides lentiviraux:

Deux types de plasmides ont été utilisés au cours de notre étude: des plasmides classiques d'expression mammifères (pCMV) et des plasmides lentiviraux (pCDH). Dans le plasmide classique, l'ADN est transfecté par une méthode chimique (phosphate au calcium), tandis que dans les plasmides lentiviraux, le gène contenu est dans le plasmide transcrit et l'ARNm est vectorisé par des particules lentivirales de type HIV-1 qui permettent de contrôler précisément le niveau d'expression de la protéine codée.

Pour faire des expériences de transduction lentivirale, il est nécessaire de sous-cloner des gènes d'intérêt dans le plasmide pCDH permettant l'expression du lentitransgène souhaité. Les sous-clonages des gènes se déroulent comme décrit

ci-après:

Deux enzymes de restriction sont utilisées pour exciser le gène d'intérêt du plasmide d'origine. Les produits de digestion sont purifiés du gel d'agarose à l'aide du Kit QIAquick (QIAGEN™). Le vecteur devant recevoir l'insert est ouvert par digestion enzymatique selon des sites de restriction compatibles avec les enzymes bordant l'insert. La seconde étape consiste à lier l'insert au vecteur. L'insert et le vecteur sont mélangés généralement dans un rapport molaire insert/vecteur compris entre 2 et 4 ligués par l'ADN ligase (Invitrogen) puis amplifiés par transformation bactérienne. Les constructions plasmidiques obtenues sont décrites dans le tableau V.4.

Constructions plasmidiques	Enzymes de restrictions utilisées
pRRL Sin Flag 3X K-RAS WT	NheI et PstI
pRRL Sin Flag 3X K-RAS G12D	NheI et PstI
pRRL Sin Flag 3X K-RAS G 12V	NheI et PstI
pRRL Sin Flag 3X K-RAS G 13D	NheI et PstI
pEYFP-C1- Bcl-xL	Laboratoire de P.Juin Nantes
pEYFP-C1- Bcl-xL DD	KpnI et HindIII
pEYFP-C1- Bcl-xL DA	KpnI et HindIII
pEYFP-C1- Bcl-xL AD	KpnI et HindIII
pEYFP-C1- Bcl-xL AA	KpnI et HindIII
pCDH-Bcl-xL ShR N52D N66D	NheI et EcoRI
pCDH-Bcl-xL ShR N52D N66A	NheI et EcoRI
pCDH-Bcl-xL ShR N52A N66D	NheI et EcoRI
pCDH-Bcl-xL ShR N52A N66A	NheI et EcoRI
pCDH- EF1- TAP-Bcl-xL	XBa1 et Sma1
pCDH-EF1-TAP-Bcl-xL N52D N66D	XBa1 et Sma1
pCDH- EF1- TAP-Bcl-xL N52D N66A	XBa1 et Sma1
pCDH- EF1- TAP-Bcl-xL N52A N66A	XBa1 et Sma1
pCDH- EF1- TAP-Bcl-xL N52A N66D	XBa1 et Sma1

Tableau V.4: Liste des constructions plasmidiques utilisées et/ou générées durant cette étude par sous-clonage.

A.4. Vérification de la séquence nucléotidique d'un plasmide:

Cette étape est réalisée afin de vérifier l'intégrité des séquences nucléotidiques des plasmides générés. Nous avons recours au séquençage par une société privée

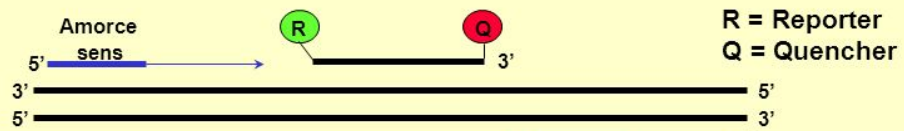
(Eurofins MWG Operon), et nous nous conformons aux recommandations pour fournir la quantité de plasmide nécessaires au séquençage.

A.5. Étude transcriptomique:

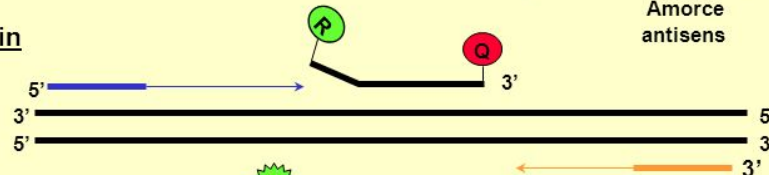
Cette approche a été utilisée pour quantifier les transcrits de LGR5 et BMI1, marqueurs de cellules souches, dans les lignées exprimant les différentes formes de Bcl-x_L et dans les sous-populations cellulaires triées par sdFFF. Pour cette quantification, deux gènes de ménages, la GADPH et l'ACTB, ont servi de référence d'expression. La technologie utilisée est celle de la PCR quantitative par sonde Taqman (Perkin-Elmer) où plus l'intensité de fluorescence est élevée, plus la quantité relative du transcrit d'intérêt est importante (figure 54).

Sonde Taqman

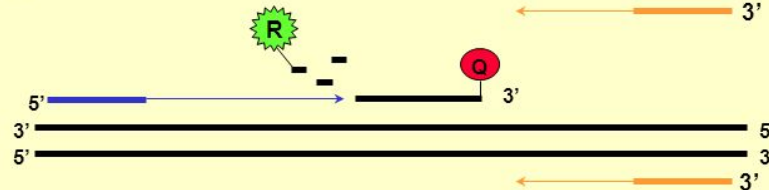
Polymérisation



Déplacement du brin



Clivage



Fin de la polymérisation



Figure 54: Représentation de la réaction Taqman:

La sonde Taqman est marquée en 5' par une molécule fluorescente appelée « Reporter R » et en 3' par une autre molécule fluorescente appelée « Quencher Q ». De par sa proximité, le Quencher absorbe la fluorescence du Reporter. Au cours de la polymérisation, l'activité exonucléase 5'-3' de la Taq Polymérase dégrade la sonde Taqman libérant ainsi le Reporter qui augmente son émission de fluorescence. La dégradation de la sonde est proportionnelle à l'augmentation de la fluorescence, au nombre de copies d'ADN effectué et à la quantité d'ADN matrice présente au début de la réaction.

a) Extraction des ARN totaux:

L'extraction d'ARN est réalisée sur des culots cellulaires stockés à -80°C à partir des fractions cellulaires triées par sdFFF. Le kit Qiagen (RNAeasy kit, Qiagen) a été utilisé pour cette extraction effectuée par transfert sur colonne. A la dernière étape d'extraction, les ARN_s sont élués dans 30 μL d'eau « RNase free » et dosés par spectrophotométrie (Nanodrop, ThermoScientist) à 260 nm.

b) Transcription inverse des ARNs:

Les ARN_s ainsi extraits sont transformés et amplifiés en ADN complémentaire (ADNc) par RT-PCR. La rétro transcription est faite sur 2 μg d'ARN grâce au kit « High Capacity cDNA Reverse transcription » (Applied Biosystems). Les échantillons d'ARN sont incubés avec un mix de tampon RT contenant l'enzyme « Multiscribe Reverse Transcriptase », un mélange de dNTP et les RT Random primer puis placés

dans le thermocycleur qui va effectuer différentes étapes: dénaturation du brin d'ARN, hybridation des amorces, synthèse d'ADNc (polymérisation) et dégradation du brin d'ARN par la RNase.

c) PCR quantitative:

Avec les ADNc obtenus, la réaction de qPCR est réalisée en plaque de 96 puits. Chaque puits contient 100 ng d'ADNc additionné du master mix Taqman rapide (TaqMan® Fast Advanced Master Mix, Life Technologies) contenant la Taq polymérase (AmpliTaq® Fast DNA Polymerase), des dNTP avec des dUTP ainsi qu'un tampon de réaction. 0,4 µM du mélange amorces sens/anti-sens et des sondes sont rajoutés au mix.

Dans notre travail, toutes les sondes Taqman utilisées sont couplées en 5' avec le 6- CarboxyFluorescien ou 6FAM (Reporter) et en 3' par le Minor groove Binder-Non Fluorescent Quencher ou MGBNFQ (Quencher). Les mélanges amorces/ sondes pour les gènes d'intérêt BMI1 et LGR5 et pour les gènes de référence GAPDH et ACTB proviennent de ThermoScientific (ref: Hs00995536_m1, Hs00969422_m1 et Hs02758991_g1, Hs99999903_m1, respectivement).

La réaction de Q-PCR est réalisée à l'aide du StepOne™ System (Life Technologies). Le programme d'amplification commence par une première dénaturation à 95°C pendant 12 s, cette étape sert également à activer la Taq polymérase. Elle est suivie de 40 cycles comprenant chacun une dénaturation à 95°C de 2 s, suivie d'une hybridation des amorces et sondes à 60°C pendant 20s.

Au cours de la réaction, l'appareil va mesurer la fluorescence émise par la dégradation des sondes au fur et à mesure des cycles de qPCR. Lorsqu'elle dépasse le seuil établi par l'appareil, un nombre de cycle est déterminé, c'est le «Cycle Threshold» ou «Ct». On calcule ensuite le $dCt = Ct(\text{gène d'intérêt}) - Ct(\text{gène de référence})$.

B. Techniques de Biologie cellulaire:

B.1. Lignées cellulaires, matériels et milieux de culture:

Les différentes lignées cellulaires utilisées ainsi que les milieux de culture utilisés durant cette étude sont décrits dans le tableau V.5.

Type cellulaire	Milieu	Composition
HCT116 (Cancer colorectal humain)	OptiMem (Invitrogen)	5 % SVF (sérum veau foetal), pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL)
HeLa (Cancer du col d'utérus)	RPMI	10% SVF (sérum veau foetal), penicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL)
HEK 293 (Human Embryonic Kidney)	DMEM	4,5 g/L glucose, 10 % SVF (sérum veau foetal), pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL)
SAOS-2 (ostéosarcome humain)	DMEM	4,5 g/L glucose, 10 % SVF (sérum veau foetal), pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL)
U2OS (ostéosarcome humain)	DMEM	4,5 g/L glucose, 10 % SVF (sérum veau foetal), penicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL)
RKO (Cancer du colon)	DMEM	4,5 g/L glucose, 10 % SVF (sérum veau foetal), (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL)
HT-29 (adénocarcinome de l'épithélium colique)	DMEM	4,5 g/L glucose, 10 % SVF (sérum veau foetal), penicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL)
LN18 (Gliome humaine)	DMEM	4,5 g/L glucose, 10 % SVF (sérum veau foetal), penicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL)

Tableau V.5: Types cellulaires, milieux et leurs compositions utilisés durant cette étude.

Le milieu utilisé pour induire une carence nutritive est le milieu HBSS (Invitrogen) complémenté à 2,2 g/L NaHCO₃. Ces cellules adhérentes sont cultivées dans un incubateur à 37°C, 5% de CO₂ et environ 98 % d'hygrométrie relative.

B.2. Entretien des cellules en culture :

Les cellules sont cultivées en boîtes de 10 cm de diamètre et sont diluées et changées de boîtes dès que leur confluence excède 80 %. Pour ce faire, le milieu de culture est retiré, les cellules sont lavées avec 2 mL de DPBS (Invitrogen) puis incubées 5 minutes à 37 °C en présence de 2 mL de trypsine/EDTA (Invitrogen). Les

cellules ainsi "dissociées" sont reprises dans leur ancien milieu de culture et centrifugées 5 min à 80 x g. Le surnageant est par la suite éliminé, le culot cellulaire repris par 10 mL de milieu neuf et 1 mL sert à ensemercer une nouvelle boîte contenant 9 mL de milieu neuf.

B.3. Expression ectopique d'une protéine:

a) Transfection transitoire:

La transfection par "phosphate de calcium" est utilisée pour la réalisation de production de particules lentivirales et des expériences de co-immunoprécipitation dans les cellules de la lignée HEK 293.

Le protocole suivant est un exemple pour la transfection de cellules cultivées dans une boîte de 10 cm de diamètre.

Autant de boîtes de cellules sontensemencées, que de combinaisons de plasmides à transférer.

Dans un premier temps, le milieu OptiMEM est remplacé par 7 mL de milieu DMEM environ 30 minutes avant la transfection. 50 mL de solution de HBS 2X (NaCl 280 mM, KCl 10 mM, Na₂HPO₄ 1,5mM, HEPES 50 mM, pH= 7,12) sont préparés et filtrés à travers un filtre 0,2 µ, puis un mélange décrit dans le tableau V.6 est effectué.

Expérience	production lentivirale	Co-Immuno- précipitation
ADN plasmidique	- 6 µg pLP1 - 6 µg pLP2 - 5 µg pVSVG - 12 µg pLentitransgène	- 6 µg pBcl-xL - 6 µg p Flag K-Ras
H ₂ O qsp	450 µL	450 µL
CaCl ₂ 2,5 M	50 µL	50 µL
HBS 2X	500 µL	500 µL

Tableau V.6: Protocole pour transfection de cellules au phosphate de calcium.

Le contenu du tube est réparti sur les cellules pour une incubation de 8 heures, avant de renouveler le milieu de culture.

b) Production des particules lentivirales

Ce protocole permet de délivrer (transduire) un gène d'intérêt par l'intermédiaire d'une particule lentivirale afin de produire des lignées cellulaires réfractaires aux méthodes chimiques. La production consiste à ensemercer, le premier jour, 4 boîtes de 10 cm de diamètre avec environ $3 \cdot 10^6$ cellules de la lignée HEK 293. La transfection des cellules à l'aide du phosphate de calcium est effectuée le lendemain. Le troisième jour, les cellules produisent les particules lentivirales. Cette production est associée à la sécrétion de particules virales qui sont alors libérées dans le surnageant de culture. C'est pourquoi le milieu DMEM est supplémenté de 20 mM HEPES, permettant ainsi de maintenir le pH extracellulaire proche de la neutralité afin de ne pas endommager les particules dont l'infectiosité est diminuée par des pH acides ou alcalins. Après 24 à 48h dans ce milieu, les particules sont récoltées en déposant le surnageant de culture sur un coussin de saccharose; le tout est alors soumis à une ultracentrifugation de 1h30 à 100 000 x g. Les particules retrouvées dans le culot, sont finalement reprises dans 400 μ L de DPBS.

Le titre des suspensions lentivirales est déterminé par un test ELISA détectant la protéine virale p24: il a été effectué par la plateforme lentivirale de l'université de Bordeaux. Puis les productions sont utilisées pour infecter des cellules et générer des lignées cellulaires stables. Les différentes lignées générées sont décrites dans le tableau V.7 suivant.

Lignées cellulaires	Constructions utilisées
HCT 116 TAP Bcl-xL shR	pCDH- EF1 TAP Bcl-xL shR
HCT 116 TAP Bcl-xL DD shR	pCDH- EF1 TAP Bcl-xL N 52D N66D shR
HCT 116 TAP Bcl-xL DA shR	pCDH- EF1 TAP Bcl-xL N 52D N66A shR
HCT 116 TAP Bcl-xL AD shR	pCDH- EF1 TAP Bcl-xL N 52A N66D shR
HCT 116 TAP Bcl-xL AA shR	pCDH- EF1 TAP Bcl-xL N 52A N66A shR
HeLa Bcl-xL	pCDH- EF1 Bcl-xL shR
HeLa Bcl-xL DA	pCDH- EF1 Bcl-xL N52D N66A shR
U2OS Bcl-xL	pCDH- EF1 Bcl-xL shR
U2OS Bcl-xL DA	pCDH- EF1 Bcl-xL N52d N66A shR
SAOS-2 Bcl-xL	pCDH- EF1 Bcl-xL shR
SAOS-2 Bcl-xL DA	pCDH- EF1 Bcl-xL N52D N66A shR

Tableau V.7: Liste des lignées cellulaires générées par sous-clonage au cours de cette étude.

B.4. Immunofluorescence sur cellules adhérentes:

Les cellules sont cultivées jusqu'à 50 % de confluence dans des boîtes contenant des lamelles de verre stériles. La fixation des cellules est effectuée dans un bain de PBS contenant 4 % de paraformaldéhyde durant 20 minutes à température ambiante. Après 2 lavages avec du PBS, les cellules sont perméabilisées 10 minutes dans une solution de PBS contenant 0,1 % de triton X100 et de nouveau lavées avec 3 bains de PBS. L'étape de saturation est assurée en plaçant les lamelles dans une solution de PBS-BSA 3 % durant 30 minutes au terme desquelles 3 lavages en PBS sont effectués. Les cellules sont ensuite incubées en présence de l'anticorps primaire (anti-Oct4/POU5F1, Thermofisher), dilué dans du PBS-BSA 0,1 % durant 2 heures à température ambiante. 3 lavages sont opérés avant l'incubation durant 30 minutes avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 (Molecular probes) dilué avec PBS-BSA 0,1 %. Finalement, les lamelles sont de nouveau lavées et montées sur une lame, avec une goutte de milieu de montage contenant du DAPI (Fluoroshield mounting Medium, Sigma Aldrich). La polymérisation est terminée après 24h à 4°C.

B.5. Test de croissance en milieu semi-solide:

Ce test de croissance évalue la capacité des cellules à reformer une colonie (un clone) en milieu semi-solide. Il est le reflet des propriétés de cellules souches mais également de l'agressivité cellulaire pour des cellules tumorales. Il peut se faire sur une matrice de type Agar/Agarose ou Collagène. Nous avons utilisé le collagène extrait du queue des rats âgés de 10 semaines.

Tous les réactifs utilisés pour ce test ont été maintenus sur glace pour éviter la polymérisation trop rapide du collagène. 500 cellules sont cultivées en triplicat dans des plaques de 6 puits. Un mélange des solutions décrit dans le tableau suivant est effectué dans l'ordre dans un erlenmeyer stérile de 25 mL (conservé à -20 °C depuis la veille) en homogénéisant par rotation à chaque fois et sans faire de bulles (tableau V.8).

Milieu de culture	8,25 mL
Collagène	4,5 mL
NaOH 0,1N	0,75 mL
Suspension cellulaire (1000cell/mL)	1,5 mL
Total	15 mL

Tableau V.8: Mélange réactionnel pour le test de croissance en milieu semi-solide.

C'est l'addition de la soude qui déclenche la polymérisation. Dès que la préparation est réalisée, 5 mL sont répartis dans chaque puits. Quand la polymérisation est faite, 2 mL du milieu OptiMem frais sont versés pour recouvrir le milieu semi-polymérisé. Ce milieu sera changé chaque 2/3 jours.

Au bout de 20 jours, le milieu de culture est enlevé complètement, et une fixation des disques de collagène est faite en PFA 4 % pendant 15 min à 4 °C. Les colonies sont ensuite marquées avec du cristal violet, puis rincées par des bains successifs de PBS jusqu'à ce qu'elles soient clairement visibles pour le comptage.

B.6. Tri cellulaire par sdFFF (sedimentation field flow fractionation) :

La sdFFF est une méthode de séparation par couplage flux-force, apparentée à la chromatographie liquide, où la colonne de chromatographie est remplacée par un canal creux en forme de ruban. La séparation des éléments est basée sur leur élution différentielle dans une phase mobile passant dans le canal, lui-même soumis à un champ externe gravitationnel perpendiculaire, généré par la rotation du bol contenant le canal. Les fractions cellulaires sont séparées en fonction de plusieurs critères physiques de taille, et de densité (ainsi que de rigidité, déformabilité...) sans aucun marquage préalable.

Cette technique est applicable à de nombreux domaines tels que la microbiologie ou la cancérologie. Nous l'avons utilisée dans mon projet dans le but d'isoler des sous-populations enrichies en cellules souches cancéreuses à partir des lignées cellulaires HCT 116 exprimant les différents variants de déamidation de Bcl-x_L.

Les cellules en culture sont dissociées de façon classique par la trypsine/EDTA. Elles sont comptées sur une lame de Malassez et finalement re-suspendues dans la

phase mobile (PBS, pH=7,4 et Milieu de culture, 70/30, vol/vol) à une densité de 2.5×10^6 /mL, pour une quantité injectée de 2.5×10^5 cellules. Au cours du tri, 3 fractions sont récoltées: le pic total (PT), correspondant à l'ensemble de la suspension cellulaire, la fraction F1, regroupant les cellules les moins retenues et la fraction F3, regroupant les cellules les plus retenues par le canal.

B.7. Mesure de la taille des cellules par le coulter counter:

La grande majorité des compteurs automatiques de cellules intègrent cette technologie, appelée le principe coulter. Les systèmes Beckman coulter qui utilisent ce principe sont appelés des instruments «coulter». Cette méthode peut servir à mesurer toute matière particulaire pouvant être mise en suspension dans une solution électrolytique. Durant cette étude, le volume des cellules a été mesuré à l'aide de cette technique.

Les cellules sontensemencées avec une confluence de 70% dans des plaques 12 puits, rincées au PBS, puis décollées par le trypsine. Ensuite, les cellules sont remises en suspension dans un milieu OptiMem pour les compter et mesurer leur volume par le "coulter counter".

B.8. Test de cytotoxicité:

Pour évaluer la résistance à la chimiothérapie, reflet de l'activité des cellules souches, un traitement au 5-Fluoro-uracile (5-FU) a été réalisé et la cytotoxicité a été analysée par un test XTT. Il permet la détection de l'activité enzymatique de la succinate déshydrogénase mitochondriale, reflet de la viabilité cellulaire. Dans le test, l'enzyme va réduire les sels de Tétrazolium en formazan, causant une coloration mesurable en spectrophotométrie UV/Visible.

Pour cela, les cellules sont cultivées en plaque 96 puits et le traitement par le 5-FU est réalisé à différentes concentrations (allant de 0 à 20 μ M) en triplicat pour une durée de 48H. A l'issue du traitement, le milieu est remplacé par le milieu réactionnel contenant le XTT. Après 3h30 d'incubation, l'absorbance du formazan est quantifiée à 450 nm avec une longueur d'onde de référence supérieure à 650 nm.

C. Techniques biochimiques:

C.1. Analyse de l'expression protéique:

a) Extraction et dosage des protéines totales:

L'extrait protéique total est obtenu en solubilisant un culot cellulaire avec du tampon d'extraction dit "RIPA" ou bien dans du tampon dit "CHAPS" dans le cas des expériences de co-immunoprécipitation. L'extraction se fait pendant 20 min sur la glace et est suivie par une centrifugation à 12000 xg pendant 20 min. La composition de ces tampons d'extraction est décrite dans le tableau V.9.

Tampon d'extraction protéique	Composition
RIPA	100 mM Tris (pH=7,4), 0,5 % Nonidet P-40, 0,1 % SDS, 0,5 % déoxycholate de sodium, inhibiteurs de protéases Mini (Roche).
CHAPS	1% CHAPS, 10 mM Hepes pH= 7,4, 150mM NaCl, inhibiteurs de protéases Mini (Roche).

Tableau V.9: Tampons d'extraction des protéines utilisées au cours de cette étude.

b) Dosage des protéines par la méthode dite BCA:

Cette méthode colorométrique est basée sur la réduction des ions Cu^{2+} en ions Cu^+ par les protéines en milieu alcalin. Le complexe formé par l'acide bicinchonique avec les ions Cu^+ possède un maximum d'absorbance à 562 nm. Le dosage des protéines est réalisé en diluant 1 μL de l'échantillon à doser dans 5 μL d'eau distillée auxquels sont ajoutés 100 μL du mélange A et B (50:1 Kit BCA, (Thermo scientific)). Le lecteur spectrophotométrique de microplaque Polarstar Omega (OMG Lactech) mesure l'absorbance à 562 nm et la concentration de l'extrait protéique est déterminée contre une gamme d'étalon de BSA (0-20 μg) réalisée simultanément et traitée de façon identique.

C.2. Immunoprécipitation:

Des cellules HEK 293 co-transfectées avec Flag-Ras WT, Bax et Bcl-x_L ou des mutants de Bcl-x_L sont cultivées jusqu'à confluence de 80 % dans des boîtes de 10 cm de diamètre, puis décollées mécaniquement, lavées par du DPBS, puis centrifugées 5 min à 450 xg. Les protéines sont extraites avec le tampon CHAPS. Après dosage des protéines totales par BCA, chaque IP est réalisée sur 1 mg d'extraits protéiques totaux, mis en présence de 2 μg d'anticorps de souris anti Flag

pendant 2 heures à +4 °C sous agitation.

Ensuite, pour chaque réaction d'IP 50 µL de résine d'agarose greffée avec la protéine G sont équilibrés dans 500 µL de tampon CHAPS pendant 2h, puis mis en contact avec les extraits protéiques et remis sous agitation en chambre froide pendant 5 heures. La fraction de protéines n'ayant pas été retenues sur la résine (Flow Through) est récupérée après centrifugation pour être analysée. Les billes de résines, sur lesquelles sont fixés les anticorps et les complexes protéiques retenus, sont lavées 5 fois par 500 µL du tampon CHAPS. Les complexes sont élués dans 30 µL de tampon de Laemmli 1X (30 mM Tris pH=6,7, 5 % Glycérol, 1 % SDS et du bleu de bromophénol) et sont dénaturés pendant 5 minutes à 95°C. Le surnageant, contenant les complexes de protéines dissociées, est récupéré pour être analysé par western-blots.

C.3. Western blot:

C'est une technique qui permet d'identifier et détecter des protéines spécifiques dans un échantillon biologique.

a) Electrophorèse de type Tris-Glycine-SDS-PAGE:

En SDS-PAGE, les protéines sont séparées par migration dans un gel de polyacrylamide soumis à un champs électrique (tableau V.10). La séparation des différentes protéines se fait en fonction de leur poids moléculaire.

Le SDS-PAGE est une technique consistant à faire migrer des protéines dans un gel, sous l'influence d'un champ électrique, permettant ainsi leur séparation. La séparation est réalisée en conditions dénaturantes en raison de l'ajout de SDS.

Le protocole de ce type d'électrophorèse dérive du protocole original mis au point dans les années 1970 par U.K Laemmli (Laemmli 1970).

Tampon de migration	Composition
Gel de concentration (Tris-Glycine-SDS-PAGE)	5% Acrylamide-BisAcrylamide (30;0,8), 0,1% SDS,125 mM Tris pH=6,8 ,0,1% TEMED,0,13 % APS
Gel de séparation (Tris-Glycine-SDS-PAGE)	12% Acrylamide-BisAcrylamide (30;0,8), 0,1% SDS,125 mM Tris pH=8,8 ,0,1% TEMED,0,13 % APS

Tableau V.10: Composition du gel Tris-Glycine-SDS-PAGE de type Laemmli.

b) Electrophorèse de type Tris-aurine/Glycine:

Dans ce type de gel, des ampholytes tels que la taurine ont été ajoutés dans la composition du gel qui ne contient pas de SDS. Ces ampholytes permettent, par interaction avec les protéines, une meilleure séparation des bandes protéiques. Cette technique est donc adaptée à la séparation des différentes formes de Bcl-x_L.

Les échantillons sont déposés dans un gel de 6 cm, 16 cm et 26 cm dont la composition est donnée dans le tableau V.11 et une intensité de 25 mA constante par gel est appliquée. La migration des protéines dure de 1h 30 min pour les gels de 6 cm et de 24 à 30 heures pour les gels de 16 et 26 cm. Des marqueurs de masse moléculaire (PageRuler, Invitrogen) sont déposés dans un puits afin de suivre la migration et d'apprécier la masse moléculaire apparente des bandes protéiques qui seront révélées par la suite.

Tampon	Composition
Gel de concentration (Tris-Taurine/Glycine)	5% Acrylamide-BisAcrylamide (30;0,8), Tris Hcl 75 mM non ajusté, Taurine 200 mM, Glycine 125 mM, Hcl 23 mM, TEMED 0,1%, APS 0,13%
Gel de séparation (Tris-Taurine/Glycine)	12% Acrylamide-BisAcrylamide (30;0,8), Tris Hcl 75 mM non ajusté, Taurine 200 mM, Glycine 125 mM, Hcl 23 mM, TEMED 0,1%, APS 0,13%

Tableau V.11: Composition du gel de type Tris-Taurine/Glycine.

Remarque: Au cours des expériences, il a parfois été nécessaire de réaliser des gels de séparation dont la quantité d'Acrylamide-BisAcrylamide était de 8%, 10% ou 16% en fonction de la taille des protéines à séparer.

A la fin de la migration, les protéines contenues dans le gel sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Amersham™ Protran™).

c) Le transfert sur membrane de nitrocellulose:

Le transfert des protéines est réalisé en disposant le gel de polyacrylamide au contact d'une membrane de nitrocellulose. L'ensemble est disposé entre des feuilles de papiers Whatman. Les protéines sont transférées en milieu liquide dans un

tampon de transfert 1X sur une membrane de nitrocellulose 0,2 μ . Le générateur est réglé à 350 mA pour le transfert d'une durée 1h30.

d) Immuno-buvardage:

Suite au transfert des protéines, l'immuno-buvardage de la membrane débute par une étape de saturation de 30 minutes à température ambiante dans un bain de lait (3%) ou BSA (3%) (Bovine serum albumin) solubilisés dans une solution de PBS-tween ou TBS-tween (tableau V.12).

Tampon	Composition
Tampon de migration 5X	246 g Glycine, 60 g Tris, 15 g SDS
Tampon de transfert 10X	144 g Glycine, 30 g Tris
PBS -Tween 20 X	NaCl 180 g, Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O 26,7 g, NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O 7,7g, Tween 20 11g, pH 7,4
TBS-Tween	NaCl 180 g, Tris 122g, Tween 0,1% 11g, pH 8,4

Tableau V.12: Composition des tampons de transfert et de lavage.

L'incubation de l'anticorps primaire, dilué dans la solution de PBS-tween ou TBS-tween, a lieu durant 2 h à température ambiante (ou une nuit à 4 °C). Après lavages, l'anticorps secondaire spécifique, couplé à la peroxydase de raifort diluée à 1/5000 ème est incubé pendant 1 heure à température ambiante.

e) Immunodétection par chimioluminescence:

L'immunodétection des protéines est réalisée en incubant la membrane dans une solution de révélation ECL Plus (PerkinElmer). La chimioluminescence est détectée par des acquisitions de durées fixes à la caméra Gbox® (Syngene), puis les images sont analysées à l'aide du logiciel image J. Tous les anticorps utilisés dans cette étude sont décrits dans le tableau V.13.

Anticorps	Expérience	Dilution/Quantité	Source	Fournisseur
Bcl-x _L	WB/IP	2500 ème/2µg	Lapin	Ab32370 Abcam
Flag	WB/IP	2500 ème/2µg	Souris	SIGMA
K-Ras	WB/IP	2500 ème/2µg	Souris	Santa Cruz
4-EBP1	WB	1000 ème	Lapin	Cell signaling
phospho 4-EBP1	WB	1000 ème	Lapin	Cell signaling
s6	WB	1000 ème	Lapin	Cell signaling
phospho s6	WB	1000 ème	Lapin	Cell signaling
s6 Kinase	WB	1000 ème	Lapin	Cell signaling
phospho s6 Kinase	WB	1000 ème	Lapin	Cell signaling
PARP 1	WB	2500 ème	Lapin	Roche
Hsp60	WB	2500 ème	Chèvre	SANTA CRUZ
GAPDH	WB	2500 ème	Souris	SIGMA
Mcl-1	WB	1000 ème	Lapin	Santa Cruz
Oct-4	IF	500 ème	Lapin	Santa Cruz
Ki67	IHC	200 ème	Souris	Santa Cruz
II ^{aire} anti-chèvre	WB	5000 ème	Lapin	Jackson ImmunoResearch
II ^{aire} anti-lapin	WB	5000 ème	Chèvre	Jackson ImmunoResearch
II ^{aire} anti-souris	WB	5000 ème	Chèvre	Jackson ImmunoResearch
Alexa Fluor 488	IF	1000 ème	Lapin	Invitrogen
Alexa Fluor 568	IF	1000 ème	souris	Invitrogen

Tableau V.13: Récapitulatif des anticorps utilisés pour cette étude. WB: western blot/ IP: immunoprécipitation/ IF: Immunofluorescence/ IHC: Immunohistochimie.

C.4. Carence en acides aminées et test de glutaminolyse:

Les cellules sont ensemencées dans des boîtes de 6 cm de diamètre au jour 1 en ajoutant la quantité de cellules nécessaire pour avoir une confluence au dessous de 50% le lendemain. Au jour 2, le milieu de culture est enlevé, et les cellules sont lavées 2 fois avec 2 mL du PBS. Elles sont ensuite incubées pendant 4 heures dans 2 mL de milieu HBSS pour induire la carence en acides aminées et en sérum. Afin de garantir que la régulation de l'activité de mTOR n'est contrôlée que par le retrait ou l'ajout d'acides aminés, le milieu HBSS est supplémenté avec 100 nM d'insuline. Puis, ces cellules sont re-stimulées par l'addition de leucine (0,8 mM) et de glutamine (2 mM) durant 30 min. Les cellules sont récoltées, les protéines sont extraites avec du tampon RIPA contenant des inhibiteurs de phosphatases (P0044 et P5726 Sigma), et les échantillons sont préparés pour analyse par western blot.

C.5. Test d'induction d'apoptose

Les cellules HeLa sont cultivées jusqu'à 80 % de confluence, puis elles sont lavées avec du DPBS et placées dans un milieu RPMI supplémenté de 0,4 μM de staurosporine et laissées en culture durant 6h.

A la fin du traitement, les cellules sont lavées au DPBS, décollées mécaniquement puis centrifugées 5 min à 450 xg. Finalement, une extraction protéique est réalisée en tampon RIPA, et 25 μg de protéines totales sont soumises à une électrophorèse de type Tris-Glycine SDS-PAGE 8 %. Des western blots dirigés contre la protéine PARP I et Hsp60 sont utilisés pour détecter spécifiquement les bandes correspondant à la protéine PARP et au produit de son clivage induit au cours de l'apoptose. Les signaux correspondant à Hsp60 servent de témoins de charge pour la normalisation des résultats. L'intensité des différentes bandes est quantifiée à l'aide du logiciel image J.

C.6. BRET (Bioluminescence resonance energy transfer)

Le BRET (Bioluminescence resonance energy transfer) est une technique de mise en évidence des interactions entre les protéines. Elle est fondée sur le principe du transfert d'énergie entre un donneur bioluminescent et un accepteur fluorescent. L'énergie du donneur provient d'une molécule bioluminescente la coelenterazine H DeepBlue C (DBC), qui va émettre des photons en présence de l'enzyme luciférase ou (R-Luc). Ces photons permettront d'exciter une molécule de type YFP qui va émettre une fluorescence si les conditions de proximité et de géométrie pour un transfert sont remplies. Les plasmides exprimant Rluc ont été construits par un sous-clonage des séquences codants KRas dans le vecteur pR-Luc-C2 (Biosignal Packard). Les plasmides exprimant eYFP ont été construits par un sous-clonage de Bcl-x_L et ses différents mutants (N52D N66A, N52D N66D, N52A N66D, N52A N66A) dans le vecteur p-EYFP-C1. Tous ces étiquetages avec les séquences de KRas et Bcl-x_L ont été effectués en leurs cotés N-terminal, cela pour conserver le rôle du coté C-terminal dans l'ancrage membranaire de ces 2 protéines.

Tests de courbes de saturation du BRET: 24 heures avant la transfection, les cellules sontensemencées dans des plaques de 12 puits. Les cellules sont transfectées avec des quantités croissantes (50 à 1500 ng/puits) de plasmides codants pour l'accepteur de BRET (e-YFP Bcl-xL et les mutants), et des quantités constantes (50 ng/puits) de plasmides exprimant le donneur BRET (R-Luc KRas) en utilisant le lipofectamine 2000 comme agent de transfection (Life technologies). Après 24 heures, les cellules sont collectées et cultivées en duplicat dans des plaques de 96 puits. Après 24 h, ces cellules sont traitées durant 16h. Avant les mesures de BRET, les cellules sont lavées 1 fois avec le PBS. Le substrat coelenterenzine H (Interchim) est injecté dans les plaques à une molarité de 5 μ M, et le BRET est mesuré immédiatement et successivement encore 5 autres fois. Le BRET est contrôlé en utilisant le lumino/fluorometer Mithras (Berthold Technologies, France). En principe, Rluc catalyse la transformation du substrat DBC en coelenteramide avec une émission concomitante de la lumière bleue. Lorsqu'un accepteur adéquat est en proximité suffisante, il va capturer l'énergie de la lumière bleue émise par la réaction R-Luc/DBC, et son excitation permettra une émission d'un signal lumineux jaune. Les valeurs d'émission du signal obtenues à 530 nm ont été divisées par les valeurs obtenues à 480 nm. Le ratio BRET a été calculé par la soustraction des valeurs du signal BRET obtenues avec la co-expression donneur et récepteur par celles obtenues avec la protéine donneur exprimée seule (Figure 55)

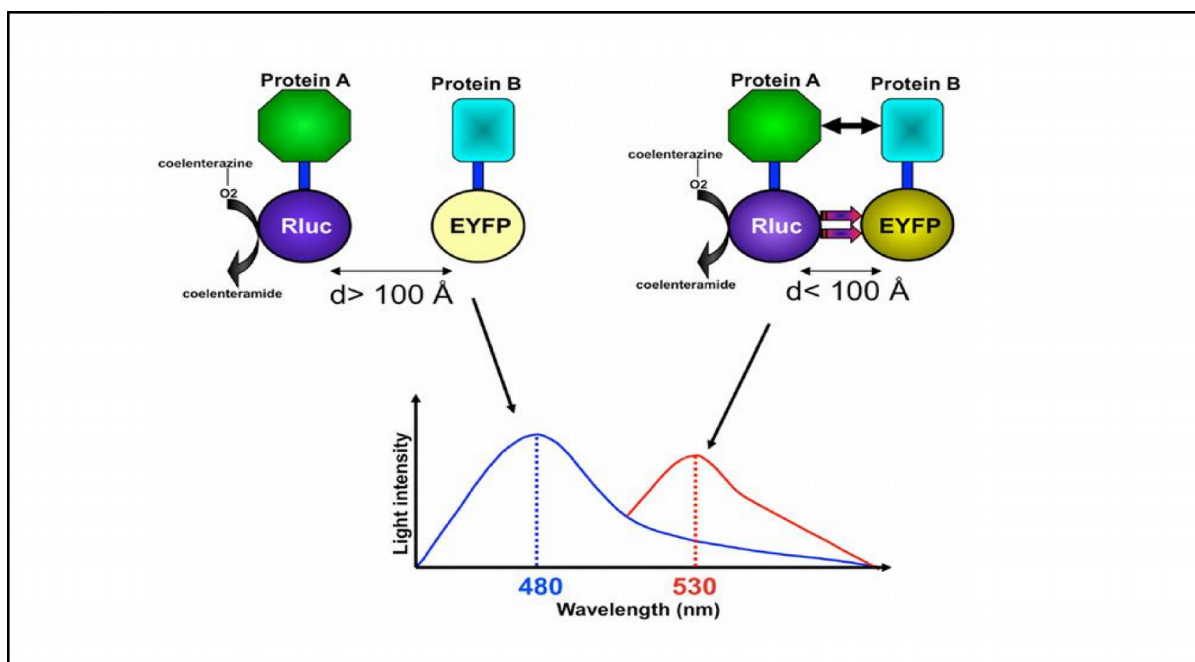


Figure 55: Principe de la technique du BRET développée pour étudier les interactions protéine-protéine.

Pour une étude d'interaction entre protéine A et B par BRET, les protéines de fusion avec RLuc et YFP sont co-exprimées, les signaux luminescents sont mesurés à 480 nM (RLuc) et à 530 nM (YFP) en présence du substrat coelentérazine.

C.7. Test de protéolyse par les calpaines :

Des lignées cellulaires sont cultivées dans des boîtes de 6 cm avec une confluence de 80 %, les cellules sont traitées avec l'inhibiteur de calpaines (Sigma) à des concentrations de 10 et 25 μ M pendant 24h. Les cellules sont récoltées, les protéines sont extraites avec du tampon RIPA puis analysées par un western blot avec des anticorps dirigés contre Bcl-x_L et Mcl-1.

C.8. Test de déamidation *in vitro*:

Les expériences de déamidation *in vitro* de Bcl-x_L et de ses différents mutants sont réalisées sur des extraits totaux et des protéines recombinantes purifiées en incubant dans un tampon alcalin (25 mM du glycine tamponnée à pH=10 avec la soude) pendant 24h à 37 °C. Ce mélange est neutralisé par la suite avec 3 N HCl, afin de revenir à un pH=7.4, puis additionné de tampon de charge avant d'être soumis à une électrophorèse de type SDS-PAGE et un western blot dirigé contre Bcl-x_L.

C.9. Condition d'obtention de stress génotoxique:

Deux types de traitement ont été utilisés pour induire un stress génotoxique:

- Une combinaison d'irradiation UV et d'exposition au 5-FU: les cellules HCT 116 sont cultivées dans du milieu OptiMem jusqu'à 80 % de confluence, puis le milieu est retiré et les cellules sont irradiées sous une lampe à UV réglée à 450 μ j durant 45 s. Par la suite, les cellules sont incubées durant 24 h à 37 °C dans du milieu additionné de 40 μ M de 5- FluoroUracile.

- Un traitement par étoposide: les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 10 μ M d'étoposide durant 24h et 48h.

- Un traitement par cisplatine: les cellules sont cultivées dans du milieu supplémenté avec 10 μ M de cisplatine durant 48 heures.

A la suite du stress, les cellules sont récoltées, les protéines sont extraites avec du tampon RIPA, puis analysées par un western blot utilisant un anticorps dirigé contre Bcl-x_L.

C.10. Test de respiration mitochondriale

Des lignées cellulaires HCT116 P, HCT116 Bcl-x_L, et HCT116 Bcl-x_L N52D N66A sont cultivées dans 3 milieux différents décrits ci-après en prenant soin à chaque fois que la confluence des cellules ne dépassent pas 50 % pour que le couplage chaîne respiratoire/ATP synthase soit optimal:

1) Dans un milieu classique OptiMem à une forte concentration de glucose (4.5 g/L) : Dans ce cas, 750000 cellules sontensemencées dans 5 boites de culture de 10 cm de diamètre au jour 1 pour avoir le lendemain une quantité suffisante de cellules et avec une confluence au dessous de 50 %.

2) Dans un milieu DMEM à une faible concentration de glucose (1g/L) supplémenté de pyruvate (1 mM) et de glutamine (2 mM). Dans ce cas, 1 million de cellules sontensemencées dans 4 boites de 10 cm de diamètre au jour 1 pour avoir une quantité suffisante de cellules au jour 4.

3) Dans un milieu sans glucose supplémenté de glutamine (2 mM), pyruvate (1 mM), et galactose (5 mM) comme source de carbone. Dans ce cas, 1 million de cellules sontensemencées dans 6 boites de 10 cm de diamètre pour récolter 4

millions de cellules après 4 jours.

Les cellules sont dissociées par la trypsine et comptées en utilisant un compteur automatique (Scepter™). La consommation d'oxygène des cellules est déterminée en utilisant l'oxygraphe 2K (Oroboros instrument). Environ 4 millions de cellules sont resuspendues dans 100 µL de milieu de culture puis diluées dans 2,1 mL du même milieu déjà ajouté dans chaque chambre de la machine. La consommation d'oxygène est évaluée sous différentes conditions: d'abord, la respiration endogène des cellules est évaluée 15 minutes après la reprise des cellules dans le milieu de culture. Puis, la respiration non phosphorylante est mesurée après l'addition d'oligomycine (91 ng/mL), inhibiteur de la pompe ATP synthase. Ensuite, la respiration découplée est déterminée par la titration CCCP (45 nM), cela pour une stimulation maximale de la respiration mitochondriale. Finalement, la respiration non mitochondriale est déterminée par l'ajout de l'antimycine A (227 nM), un inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire. La mesure de la respiration est normalisée à la quantité de protéines en mg.

C.11. Purification des partenaires protéiques par Tandem affinity purification:

Cette approche, appelée Tandem Affinity Purification (TAP), a été initialement utilisée dans la levure, mais, plus récemment, a été adaptée pour les cellules de mammifères. Elle permet de purifier des complexes protéiques dans leur forme native, en réalisant une protéine recombinante où la molécule d'intérêt est étiquetée avec un module utilisé pour la purification du complexe. La composition de l'étiquette TAP est représentée dans la (Figure 56).

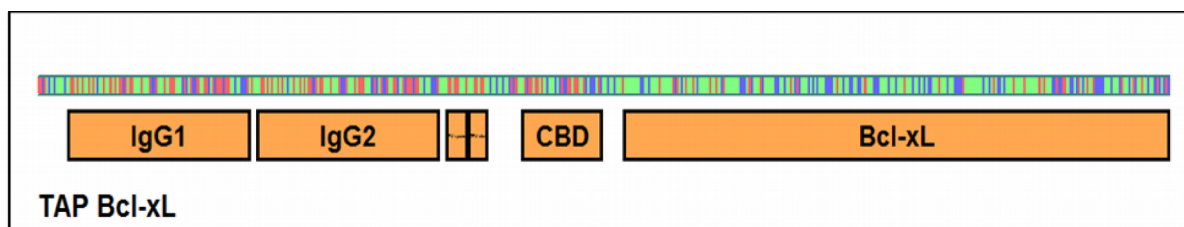


Figure 56: Composition de la protéine TAP étiquetée avec la séquence Bcl-x_L

CBD: Calmodulin Binding Buffer

Les étapes expérimentales de la purification par TAP sont résumées dans la (Figure 57), et les différents tampons sont décrits dans le (Tableau V.14).

Les cellules sont lysées mécaniquement dans 10 mL de tampon de lyse HS buffer à l'aide d'un homogénéisateur de Dounce par une cinquantaine de coups. La lyse est contrôlée sous microscope. Le volume est réparti en 8 tubes eppendorf. Puis, une centrifugation de 16 000 x g pendant 30 min sépare la fraction membranaire (culot 1) de la fraction cytosolique (S1). Le surnageant est dialysé 2 fois dans 450 mL de tampon de dialyse pendant 1 h. Les lysats membranaires sont repris dans 850 µL de tampon d'extraction CAM (Calmodulin binding buffer) pour chaque tube eppendorf placé sur glace pendant 20 min. Les extraits protéiques (S2) sont obtenus par centrifugation 20 min à 12000 x g. Après une équilibration de la colonne de calmoduline, l'extrait total (S2) et le surnageant S1 sont incubés séparément à 4 °C pour toute la nuit sous agitation avec les billes de calmoduline sepharose 4B ajoutées avec 1mM de CaCl₂. Une première élution (E1) est faite sous agitation pendant 15 min dans du tampon d'élution de calmoduline contenant 5 mM d'EGTA et elle est suivie d'une second élution (E2) avec du tampon d'élution de la calmoduline. Ensuite, une équilibration de la colonne d'IgG est effectuée pendant 30 min après un lavage avec le même tampon. Les éluions E1 et E2 sont combinées avant l'incubation sur la colonne de billes liées à l'IgG pendant la nuit à 4 °C sous agitation. Cette incubation est suivie de 2 lavages successifs, l'un avec le tampon d'élution du calmoduline et l'autre dans du tampon du clivage de TEV.

Après les centrifugations, la matrice des billes d'agarose est incubée dans 950 µL de tampon de clivage et 500 U de la protéase TEV (Invitrogen) pendant 2h à température ambiante, suivie d'une rotation toute la nuit à 4 °C.

Les protéines éluées sont collectées (E'1). La matrice d'IgG est incubée dans 1 mL du tampon du clivage contenant 500 mM de NaCl.

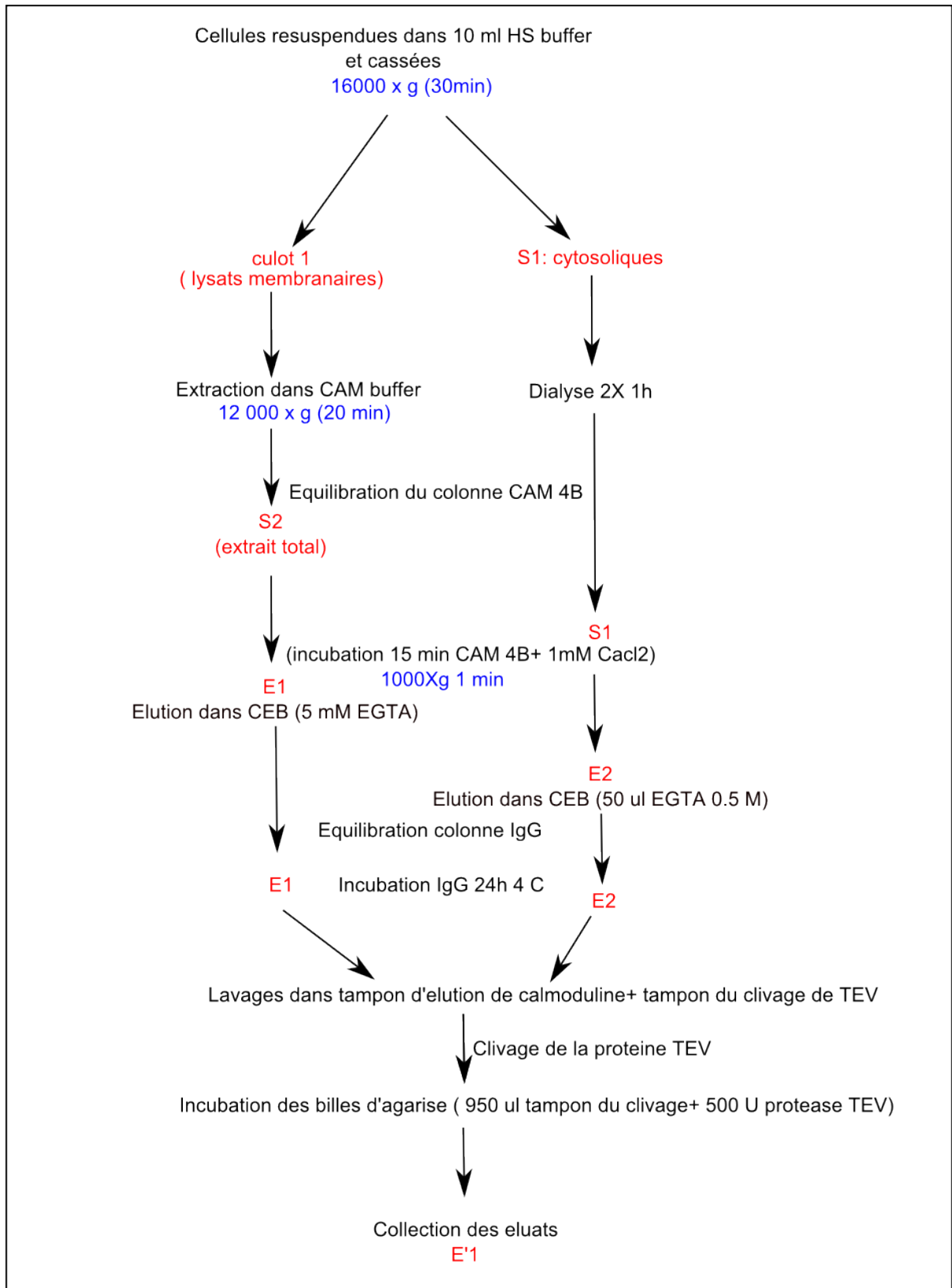


Figure 57: Protocole de purification des partenaires par Tandem Affinity Purification.

Tampons utilisés pour la purification TAP	Compostion
Tampon de lyse HS (homogénisation)	10 mM HEPES, 250 mM sucrose, inhibiteurs des protéases
Tampon Calmodulin extraction buffer CAM	10 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% CHAPS, 1 mM Mg acetate, 1 mM imidazole, 2 mM CaCl ₂ et inhibiteurs des protéases
Tampon Calmodulin elution buffer CEB	10 mM Tris/Hcl pH 8, 150 mM NaCl, 0,1% CHAPS, 1 mM Mg acetate, 1 mM imidazole et 2 mM EGTA
Tampon de clivage TEV	10 mM Tris/HCl pH8, 150 mM NaCl, 0,1% CHAPS, 0,5 mM EDTA et 1 mM DTT
Tampon de dialyse	10 mM Tris/HCl pH8, 150 mM NaCl, 0,1% CHAPS, 1 mM Mg acetate, 1 mM imidazole et 2 mM Cacl2

Tableau V.14: Composition des tampons utilisés pour la "Tandem Affinity purification".

C.12. Détermination de la quantité de lactate dans les milieux:

Des lignées cellulaires HCT 116 sontensemencées dans un milieu OptiMem en réplicats afin de faire une cinétique de mesure du lactate en fonction de la confluence des cellules. Les milieux de culture sont récoltés à J2, J4 pour une confluence qui augmente de 30 à 80 %. Ces surnageants cellulaires sont centrifugés pendant 5 minutes puis maintenus à - 20 °C jusqu'au jour des mesures.

L'enzyme lactate déshydrogénase ou L-LDH (Sigma) transforme le L-lactate en pyruvate en réduisant le NAD en NADH. Le NADH produit par la réaction, est fluorescent et son apparition est suivie à 340 nm dans le spectrophotomètre.

Le dosage est réalisé dans un tampon glycine 0,2 M, hydrazine hydrate pH 9,2, contenant 0,75 mM de NAD⁺ et 2500 U/l de L-LDH. Le mélange est ensuite dilué à 1/200 dans le tampon et la lecture spectrophotométrique est réalisée après 90 minutes contre un contrôle qui ne contient pas de lactate déshydrogénase.

C.13. Mesure du ratio ATP/ADP par le HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance):

Des cellules HCT 116 P, HCT 116 Bcl-x_L et HCT 116 Bcl-x_L N52D N66A sont cultivées en triplicat dans des plaques de 6 puits de façon à avoir une confluence de 40 % le lendemain. Le milieu est enlevé et les cellules sont lavées par 2 mL de PBS. Les cellules sont lysées et extraites par l'ajout successif de 3 mL d'éthanol 70% supplémenté par 10 mM d'HEPES à pH 7,4. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, les extraits cellulaires sont transférés dans des tubes en verre, puis incubés à 80 °C pendant 3 minutes afin d'inhiber les enzymes et d'arrêter

toutes les réactions métaboliques. Ensuite, ces extraits sont évaporés à 80 °C pendant 5 minutes par un rotavator. Les extraits cellulaires sont re-suspendus dans 500-1000 µL d'eau selon le nombre de cellules, puis centrifugés à 15000 x g pendant 30 minutes. Environ 150000 cellules sont injectées sur HPLC à 10 °C. L'aire des pics ATP et ADP est déterminée par le logiciel "Chromeleon", la concentration est calculée en se référant à une gamme étalon d'ATP et ADP de concentration connue.

D. Techniques de greffe des cellules *ex-vivo* et *in vivo* :

D.1. Greffe cellulaire sur membrane chorio-allantoïdienne d'embryon de poulet:

Ce test est utilisé pour étudier la tumorigénicité des lignées cellulaires HCT 116 greffées sur une membrane chorio-allantoïdienne du poulet. L'intérêt de ce modèle est de visualiser rapidement la formation de tumeurs (en 3 à 4 jours) grâce une membrane richement vascularisée qui permet un développement rapide de la tumeur.

Les œufs fécondés proviennent d'un élevage commercial (Ferme avicole Haas, Strasbourg, France) et sont stockés pendant 24h après réception, à température de 16°C. Pour les expériences, ils sont ensuite incubés à 38°C dans une couveuse, en atmosphère humide. Après 2,5 jours d'incubation, 7 à 8 mL d'albumine sont retirés à l'aide d'une seringue puis le contenu de chaque œuf est extrait de sa coquille et placé dans des nacelles de pesée. Elles sont ensuite placées dans des boîtes de Pétri préalablement remplies à moitié d'eau distillée afin d'assurer le maintien d'une hygrométrie correcte.

Les œufs ainsi ouverts sont ensuite incubés 1 semaine à 38 °C sous une atmosphère humide. Au 9^{ème}/10^{ème} jour du développement embryonnaire, la vascularisation de la CAM commence à apparaître. Un anneau en silicone de 1 cm de diamètre et d'1 mm d'épaisseur est déposé sur la membrane. 3 millions de cellules (reprises dans le volume de milieu le plus faible possible, environ 10µL) sont greffées au centre de l'anneau et incubées pendant 3 jours. La masse tumorale qui s'est développée est observée sous un stéréomicroscope (Leica), excisée et aussitôt incluse dans l'OCT (Optimal cutting temperature) à -20°C puis conservée à

-80°C pour les analyses histologiques ultérieures.

D.2. Greffe sur souris «nudes»

La souris «nude» est un modèle d'animal immunodéprimé, déplété en lymphocytes T. Ce modèle permet de réaliser des greffes de cellules humaines sans rejet. De plus, étant dépourvues de pelage ces animaux présentent l'avantage de permettre une très bonne visibilité du point d'injection ainsi qu'un suivi aisé de la croissance tumorale lors de greffes sous-cutanées. Les souris sont hébergées dans la zone SOPF (Specific and Opportunistic Pathogen Free) de l'animalerie de type A1 + de l'Université de Limoges. Elles sont placées dans des cages filtrées, sur portoirs ventilés, dans des locaux maintenus en surpression atmosphérique et leur alimentation est stérilisée au préalable. L'ensemble des manipulations des animaux s'effectue sous une hotte à flux laminaire.

Pour les greffes, les souris sont anesthésiées par injection en intra péritonéal de 80µl d'un mélange Kétamine (4%), xylazine (0.02%) dans du sérum physiologique. Une greffe de 1 million de cellules (dans un volume de 50 µl maximum) est effectuée en sous-cutané dans la patte antérieure de la souris. L'évolution de la tumeur est suivie pendant un mois environ et mesurée régulièrement au pied à coulisses jusqu'à ce que les souris soient sacrifiées. Le calcul du volume de la tumeur prend en compte la longueur (L) et la largeur (l) selon la formule $(L \times l \times (L+l)) \pi/12$. Les tumeurs sont excisées, fixées dans du formol 10% pendant une nuit avant l'inclusion en paraffine le lendemain.

D.3. Immunohistochimie sur coupes histologiques:

L'immunohistochimie est une technique qui permet la détection, à l'intérieur d'une cellule ou d'un tissu, d'un antigène donné.

Dans le cas des greffes réalisées sur CAM, des sections fines de tumeur (7 µm) préalablement fixées en OCT, sont coupées à l'aide du cryostat (Leica CM 3050). Les coupes sont ensuite fixées dans du paraformaldéhyde 4% à 4 °C pendant 20 min. Après 3 lavages dans du PBS, ces coupes sont perméabilisées pendant 10 min dans du PBS/triton X-100 0.1% puis saturées dans une solution tampon de PBS contenant 3 % de BSA pendant 30 min à température ambiante. Ensuite, l'incubation

avec l'anticorps primaire anti-Ki67 (M7240, clone MIB-1, Dako) est réalisée pendant 2h à température ambiante. Après 3 lavages en PBS, la révélation a été réalisée en utilisant le kit EnVision (Dako), qui fournit l'anticorps secondaire, couplé à un polymère marqué à l'HRP, ce qui amplifie la réaction. L'incubation est effectuée pendant 1h à température ambiante. Après 3 lavages en PBS, l'incubation avec le chromogène DAB (3,3'- Diaminobenzidine) (10 min à température ambiante) permet la révélation en provoquant une coloration brune. Les coupes sont ensuite lavées dans du PBS, et contre-colorées pendant 30 secondes dans de l'hématoxyline (permettant de colorer les noyaux). Les coupes sont ensuite observées au microscope Leica DM-RX.

Bibliographie

Bibliographie:

- Alavian, Kambiz N., Hongmei Li, Leon Collis, Laura Bonanni, Lu Zeng, Silvio Sacchetti, Emma Lazrove, et al. 2011. "Bcl-xL Regulates Metabolic Efficiency of Neurons through Interaction with the Mitochondrial F1FO ATP Synthase." *Nature Cell Biology* 13 (10): 1224–33. doi:10.1038/ncb2330.
- Alnemri, E. S., N. M. Robertson, T. F. Fernandes, C. M. Croce, and G. Litwack. 1992. "Overexpressed Full-Length Human BCL2 Extends the Survival of Baculovirus-Infected Sf9 Insect Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (16): 7295–99.
- Anderson, Eric C., Crystal Hessman, Trevor G. Levin, Marcus M. Monroe, and Melissa H. Wong. 2011. "The Role of Colorectal Cancer Stem Cells in Metastatic Disease and Therapeutic Response." *Cancers* 3 (1): 319–39. doi:10.3390/cancers3010319.
- Aouacheria, Abdel, Frédéric Brunet, and Manolo Gouy. 2005. "Phylogenomics of Life-or-Death Switches in Multicellular Animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip Families of Apoptotic Regulators." *Molecular Biology and Evolution* 22 (12): 2395–2416. doi:10.1093/molbev/msi234.
- Aouacheria, Abdel, Christophe Combet, Peter Tompa, and J. Marie Hardwick. 2015. "Redefining the BH3 Death Domain as a 'Short Linear Motif.'" *Trends in Biochemical Sciences* 40 (12): 736–48. doi:10.1016/j.tibs.2015.09.007.
- Aritomi, M., N. Kunishima, N. Inohara, Y. Ishibashi, S. Ohta, and K. Morikawa. 1997. "Crystal Structure of Rat Bcl-xL. Implications for the Function of the Bcl-2 Protein Family." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (44): 27886–92.
- Asakura, Tadashi, Kazuhiro Maeda, Hiroko Omi, Hiroshi Matsudaira, and Kiyoshi Ohkawa. 2008. "The Association of Deamidation of Bcl-xL and Translocation of Bax to the Mitochondria through Activation of JNK in the Induction of Apoptosis by Treatment with GSH-Conjugated DXR." *International Journal of Oncology* 33 (2): 389–95.
- Ashford, T. P., and K. R. Porter. 1962. "Cytoplasmic Components in Hepatic Cell Lysosomes." *The Journal of Cell Biology* 12 (January): 198–202.
- Bao, Shideng, Qiulian Wu, Roger E. McLendon, Yueling Hao, Qing Shi, Anita B. Hjelmeland, Mark W. Dewhirst, Darell D. Bigner, and Jeremy N. Rich. 2006. "Glioma Stem Cells Promote Radioresistance by Preferential Activation of the DNA Damage Response." *Nature* 444 (7120): 756–60. doi:10.1038/nature05236.
- Bertrand J¹, Begaud-Grimaud G, Bessette B, Verdier M, Battu S, Jauberteau MO. 2009. "Cancer stem cells from human glioma cell line are resistant to Fas-induced apoptosis". *Int J Oncol* 2009 Mar;34(3):717-27.
- Beaumat, Florian, Mohamad El Dhaybi, Jean-Paul Lasserre, Bénédicte Salin, Mary Pat Moyer, Mireille Verdier, Stéphen Manon, and Muriel Priault. 2016. "N52 Monodeamidated Bcl-xL

Shows Impaired Oncogenic Properties in Vivo and *in Vitro*.” *Oncotarget* 7 (13): 17129–43. doi:10.18632/oncotarget.7938.

- Beumatin, Florian, Mohamad El Dhaybi, Claude Bobo, Mireille Verdier, and Muriel Priault. 2017. “Bcl-xL Deamidation and Cancer: Charting the Fame Trajectories of Legitimate Child and Hidden Siblings.” *Biochimica Et Biophysica Acta*, June. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.06.012.
- Berman, Sarah B., Ying-bei Chen, Bing Qi, J. Michael McCaffery, Edmund B. Rucker, Sandra Goebels, Klaus-Armin Nave, et al. 2009. “Bcl-X L Increases Mitochondrial Fission, Fusion, and Biomass in Neurons.” *The Journal of Cell Biology* 184 (5): 707–19. doi:10.1083/jcb.200809060.
- Bernardi, Paolo, Fabio Di Lisa, Federico Fogolari, and Giovanna Lippe. 2015. “From ATP to PTP and Back: A Dual Function for the Mitochondrial ATP Synthase.” *Circulation Research* 116 (11): 1850–62. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306557.
- Bivona, Trevor G., Steven E. Quatela, Brian O. Bodemann, Ian M. Ahearn, Michael J. Soskis, Adam Mor, John Miura, et al. 2006. “PKC Regulates a Farnesyl-Electrostatic Switch on K-Ras That Promotes Its Association with Bcl-XL on Mitochondria and Induces Apoptosis.” *Molecular Cell* 21 (4): 481–93. doi:10.1016/j.molcel.2006.01.012.
- Boise, L. H., M. González-García, C. E. Postema, L. Ding, T. Lindsten, L. A. Turka, X. Mao, G. Nuñez, and C. B. Thompson. 1993. “Bcl-X, a Bcl-2-Related Gene That Functions as a Dominant Regulator of Apoptotic Cell Death.” *Cell* 74 (4): 597–608.
- Bonneau, Benjamin, Julien Prudent, Nikolay Popgeorgiev, and Germain Gillet. 2013. “Non-Apoptotic Roles of Bcl-2 Family: The Calcium Connection.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1833 (7): 1755–65. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.01.021.
- Bonnet, D., and J. E. Dick. 1997. “Human Acute Myeloid Leukemia Is Organized as a Hierarchy That Originates from a Primitive Hematopoietic Cell.” *Nature Medicine* 3 (7): 730–37.
- Bradbury, K. E., A. Balkwill, E. A. Spencer, A. W. Roddam, G. K. Reeves, J. Green, T. J. Key, V. Beral, K. Pirie, and Million Women Study Collaborators. 2014. “Organic Food Consumption and the Incidence of Cancer in a Large Prospective Study of Women in the United Kingdom.” *British Journal of Cancer* 110 (9): 2321–26. doi:10.1038/bjc.2014.148.
- Cao, Cheng, Yumei Leng, Chufang Li, and Donald Kufe. 2003. “Functional Interaction between the c-Abl and Arg Protein-Tyrosine Kinases in the Oxidative Stress Response.” *The Journal of Biological Chemistry* 278 (15): 12961–67. doi:10.1074/jbc.M300058200.
- Carné Trécesson, Sophie de, Yannis Guillemin, Audrey Bélanger, Anne-Charlotte Bernard, Laurence Preisser, Elisa Ravon, Erick Gamelin, Philippe Juin, Benjamin Barré, and Olivier Coqueret. 2011. “Escape from p21-Mediated Oncogene-Induced Senescence Leads to Cell Dedifferentiation and Dependence on Anti-Apoptotic Bcl-xL and MCL1 Proteins.” *The Journal of Biological Chemistry* 286 (15): 12825–38. doi:10.1074/jbc.M110.186437.
- Catalano, Veronica, Miriam Gaggianesi, Valentina Spina, Flora Iovino, Francesco Dieli, Giorgio Stassi, and Matilde Todaro. 2011. “Colorectal Cancer Stem Cells and Cell Death.” *Cancers* 3 (2): 1929–46. doi:10.3390/cancers3021929.

- Cavallo, Federica, Claudia Curcio, and Guido Forni. 2005. "Immunotherapy and Immunoprevention of Cancer: Where Do We Stand?" *Expert Opinion on Biological Therapy* 5 (5): 717–26. doi:10.1517/14712598.5.5.717.
- Cailleteau C1, Micallef L, Lepage C, Cardot PJ, Beneytout JL, Liagre B, Battu S. Investigating the relationship between cell cycle stage and diosgenin-induced megakaryocytic differentiation of HEL cells using sedimentation field-flow fractionation. 2010. *Anal Bioanal Chem*. 2010 Oct;398(3):1273-83. doi: 10.1007/s00216-010-4062-4.
- Chang, C.-Y., Y.-M. Lin, W.-P. Lee, H.-H. Hsu, and E. I. T. Chen. 2006. "Involvement of Bcl-X(L) Deamidation in E1A-Mediated Cisplatin Sensitization of Ovarian Cancer Cells." *Oncogene* 25 (18): 2656–65. doi:10.1038/sj.onc.1209294.
- Chen-Levy, Z, J Nourse, and M L Cleary. 1989. "The Bcl-2 Candidate Proto-Oncogene Product Is a 24-Kilodalton Integral-Membrane Protein Highly Expressed in Lymphoid Cell Lines and Lymphomas Carrying the t(14;18) Translocation." *Molecular and Cellular Biology* 9 (2): 701–10.
- Cimmino, Amelia, Rosanna Capasso, Fabbri Muller, Irene Sambri, Lucia Masella, Marianna Raimo, Maria Luigia De Bonis, et al. 2008. "Protein Isoaspartate Methyltransferase Prevents Apoptosis Induced by Oxidative Stress in Endothelial Cells: Role of Bcl-Xl Deamidation and Methylation." *PloS One* 3 (9): e3258. doi:10.1371/journal.pone.0003258.
- Clark, S. L. 1957. "Cellular Differentiation in the Kidneys of Newborn Mice Studies with the Electron Microscope." *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 3 (3): 349–62.
- Clem, R. J., E. H. Cheng, C. L. Karp, D. G. Kirsch, K. Ueno, A. Takahashi, M. B. Kastan, et al. 1998. "Modulation of Cell Death by Bcl-XL through Caspase Interaction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (2): 554–59.
- Colicelli, John. 2004. "Human RAS Superfamily Proteins and Related GTPases." *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment* 2004 (250): RE13. doi:10.1126/stke.2502004re13.
- Corcelle, Elisabeth A., Pietri Puustinen, and Marja Jäättelä. 2009. "Apoptosis and Autophagy: Targeting Autophagy Signalling in Cancer Cells -'trick or Treats'?" *The FEBS Journal* 276 (21): 6084–96. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07332.x.
- Czabotar, Peter E., Erinna F. Lee, Mark F. van Delft, Catherine L. Day, Brian J. Smith, David C. S. Huang, W. Douglas Fairlie, Mark G. Hinds, and Peter M. Colman. 2007. "Structural Insights into the Degradation of Mcl-1 Induced by BH3 Domains." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (15): 6217–22. doi:10.1073/pnas.0701297104.
- Dejean, Laurent M., Sonia Martinez-Caballero, Liang Guo, Cynthia Hughes, Oscar Tejjido, Thomas Ducret, François Ichas, et al. 2005. "Oligomeric Bax Is a Component of the Putative Cytochrome c Release Channel MAC, Mitochondrial Apoptosis-Induced Channel." *Molecular Biology of the Cell* 16 (5): 2424–32. doi:10.1091/mbc.E04-12-1111.

- Deverman, Benjamin E., Brian L. Cook, Scott R. Manson, Robert A. Niederhoff, Ellen M. Langer, Ivana Rosová, Laura A. Kulans, et al. 2002. "Bcl-xL Deamidation Is a Critical Switch in the Regulation of the Response to DNA Damage." *Cell* 111 (1): 51–62.
- DEBABRATA MUKHOPADHYAY*, LEONIDAS TSIOKAS*, XIAO-MAI ZHOU†, DAVID FOSTER‡, JOAN S. BRUGGE† & VIKAS P. SUKHATME*§. "Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation". *Nature* 375, 577 - 581 (15 June 1995); doi:10.1038/375577a0.
- Dho, So Hee, Benjamin E. Deverman, Carlo Lapid, Scott R. Manson, Lu Gan, Jacob J. Riehm, Rajeev Aurora, Ki-Sun Kwon, and Steven J. Weintraub. 2013. "Control of Cellular Bcl-xL Levels by Deamidation-Regulated Degradation." *PLoS Biology* 11 (6): e1001588. doi:10.1371/journal.pbio.1001588.
- Donatella Del Bufalo, Daniela Trisciuglio, and Michele Milella. "Crosstalk Between VEGF and Bcl-2 in Tumor Progression and Angiogenesis". 2013. Austin (TX): Landes Bioscience.
- Durán, Raúl V., and Michael N. Hall. 2012. "Glutaminolysis Feeds mTORC1." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 11 (22): 4107–8. doi:10.4161/cc.22632.
- Elkholi, Rana, Konstantinos V. Floros, and Jerry E. Chipuk. 2011. "The Role of BH3-Only Proteins in Tumor Cell Development, Signaling, and Treatment." *Genes & Cancer* 2 (5): 523–37. doi:10.1177/1947601911417177.
- English, Luc, Magali Chemali, and Michel Desjardins. 2009. "Nuclear Membrane-Derived Autophagy, a Novel Process That Participates in the Presentation of Endogenous Viral Antigens during HSV-1 Infection." *Autophagy* 5 (7): 1026–29.
- Er, Emine, Lisa Oliver, Pierre-François Cartron, Philippe Juin, Stephen Manon, and François M. Vallette. 2006. "Mitochondria as the Target of the pro-Apoptotic Protein Bax." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1757 (9–10): 1301–11. doi:10.1016/j.bbabi.2006.05.032.
- Fares, Mona, Manuchehr Abedi-Valugerdi, Moustapha Hassan, and Zuzana Potáčová. 2015. "DNA Damage, Lysosomal Degradation and Bcl-xL Deamidation in Doxycycline- and Minocycline-Induced Cell Death in the K562 Leukemic Cell Line." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 463 (3): 268–74. doi:10.1016/j.bbrc.2015.05.043.
- Fiebig, Aline A., Weijia Zhu, Catherine Hollerbach, Brian Leber, and David W. Andrews. 2006. "Bcl-XL Is Qualitatively Different from and Ten Times More Effective than Bcl-2 When Expressed in a Breast Cancer Cell Line." *BMC Cancer* 6 (August): 213. doi:10.1186/1471-2407-6-213.
- Fumarola, Claudia, Silvia La Monica, and Guido G. Guidotti. 2005. "Amino Acid Signaling through the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway: Role of Glutamine and of Cell Shrinkage." *Journal of Cellular Physiology* 204 (1): 155–65. doi:10.1002/jcp.20272.
- Geiger, T., and S. Clarke. 1987. "Deamidation, Isomerization, and Racemization at Asparaginyl and Aspartyl Residues in Peptides. Succinimide-Linked Reactions That Contribute to Protein Degradation." *The Journal of Biological Chemistry* 262 (2): 785–94.

- Geng, Jiefei, and Daniel J. Klionsky. 2008. "The Atg8 and Atg12 Ubiquitin-like Conjugation Systems in Macroautophagy. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series." *EMBO Reports* 9 (9): 859–64. doi:10.1038/embor.2008.163.
- Guo, Jessie Yanxiang, Hsin-Yi Chen, Robin Mathew, Jing Fan, Anne M. Strohecker, Gizem Karsli-Uzunbas, Jurre J. Kamphorst, et al. 2011. "Activated Ras Requires Autophagy to Maintain Oxidative Metabolism and Tumorigenesis." *Genes & Development* 25 (5): 460–70. doi:10.1101/gad.2016311.
- Hailey, Dale W., Angelika S. Rambold, Prasanna Satpute-Krishnan, Kasturi Mitra, Rachid Sougrat, Peter K. Kim, and Jennifer Lippincott-Schwartz. 2010. "Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation." *Cell* 141 (4): 656–67. doi:10.1016/j.cell.2010.04.009.
- Hall, J., and S. Angèle. 1999. "Radiation, DNA Damage and Cancer." *Molecular Medicine Today* 5 (4): 157–64.
- Hall, J. M., M. K. Lee, B. Newman, J. E. Morrow, L. A. Anderson, B. Huey, and M. C. King. 1990. "Linkage of Early-Onset Familial Breast Cancer to Chromosome 17q21." *Science (New York, N.Y.)* 250 (4988): 1684–89.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2000. "The Hallmarks of Cancer." *Cell* 100 (1): 57–70.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144 (5): 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hayashi-Nishino, Mitsuko, Naonobu Fujita, Takeshi Noda, Akihito Yamaguchi, Tamotsu Yoshimori, and Akitsugu Yamamoto. 2009. "A Subdomain of the Endoplasmic Reticulum Forms a Cradle for Autophagosome Formation." *Nature Cell Biology* 11 (12): 1433–37. doi:10.1038/ncb1991.
- Hirsch, Daniela, Yue Hu, Thomas Ried, Roland Moll, and Timo Gaiser. 2014. "Transcriptome Profiling of LGR5 Positive Colorectal Cancer Cells." *Genomics Data* 2 (December): 212–15. doi:10.1016/j.gdata.2014.06.005.
- Horvitz, H. R., P. W. Sternberg, I. S. Greenwald, W. Fixsen, and H. M. Ellis. 1983. "Mutations That Affect Neural Cell Lineages and Cell Fates during the Development of the Nematode *Caenorhabditis Elegans*." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 48 Pt 2: 453–63.
- Huang, D. C., J. M. Adams, and S. Cory. 1998. "The Conserved N-Terminal BH4 Domain of Bcl-2 Homologues Is Essential for Inhibition of Apoptosis and Interaction with CED-4." *The EMBO Journal* 17 (4): 1029–39. doi:10.1093/emboj/17.4.1029.
- Ieta, Keisuke, Fumiaki Tanaka, Naotsugu Haraguchi, Yoshiaki Kita, Hiroyuki Sakashita, Koshi Mimori, Toshifumi Matsumoto, Hiroshi Inoue, Hiroyuki Kuwano, and Masaki Mori. 2008. "Biological and Genetic Characteristics of Tumor-Initiating Cells in Colon Cancer." *Annals of Surgical Oncology* 15 (2): 638–48. doi:10.1245/s10434-007-9605-3.
- Imbault-Huart, M. J. 1984. "[Not Available]." *Histoire (Paris, France)*, no. 74: 74–77.

- Inoki, Ken, Hongjiao Ouyang, Tianqing Zhu, Charlotta Lindvall, Yian Wang, Xiaojie Zhang, Qian Yang, et al. 2006. "TSC2 Integrates Wnt and Energy Signals via a Coordinated Phosphorylation by AMPK and GSK3 to Regulate Cell Growth." *Cell* 126 (5): 955–68. doi:10.1016/j.cell.2006.06.055.
- Itoh, Takashi, Naonobu Fujita, Eiko Kanno, Akitsugu Yamamoto, Tamotsu Yoshimori, and Mitsunori Fukuda. 2008. "Golgi-Resident Small GTPase Rab33B Interacts with Atg16L and Modulates Autophagosome Formation." *Molecular Biology of the Cell* 19 (7): 2916–25. doi:10.1091/mbc.E07-12-1231.
- Iyama, Teruaki, and David M. Wilson. 2013. "DNA Repair Mechanisms in Dividing and Non-Dividing Cells." *DNA Repair* 12 (8): 620–36. doi:10.1016/j.dnarep.2013.04.015.
- Jeong, Seon-Yong, Brigitte Gaume, Yang-Ja Lee, Yi-Te Hsu, Seung-Wook Ryu, Soo-Han Yoon, and Richard J Youle. 2004. "Bcl-xL Sequesters Its C-Terminal Membrane Anchor in Soluble, Cytosolic Homodimers." *The EMBO Journal* 23 (10): 2146–55. doi:10.1038/sj.emboj.7600225.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. "Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics." *British Journal of Cancer* 26 (4): 239–57.
- Kim, M. J., Y. S. Lee, K. H. Lee, D. S. Min, S. H. Yoon, S. J. Hahn, M. S. Kim, and Y. H. Jo. 2001. "Site-Specific Localization of Protein Kinase C Isoforms in Rat Pancreas." *Pancreatology: Official Journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et Al.]* 1 (1): 36–42. doi:10.1159/000055790.
- Kim, Min-Jung, Soo-Jung Woo, Chang-Hwan Yoon, Jae-Seong Lee, Sungkwan An, Yung-Hyun Choi, Sang-Gu Hwang, Gyesoon Yoon, and Su-Jae Lee. 2011. "Involvement of Autophagy in Oncogenic K-Ras-Induced Malignant Cell Transformation." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (15): 12924–32. doi:10.1074/jbc.M110.138958.
- Klionsky, D. J., and S. D. Emr. 2000. "Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation." *Science (New York, N.Y.)* 290 (5497): 1717–21.
- Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M. A. Caligiuri, and J. E. Dick. 1994. "A Cell Initiating Human Acute Myeloid Leukaemia after Transplantation into SCID Mice." *Nature* 367 (6464): 645–48. doi:10.1038/367645a0.
- Levine, Beth, Sangita C. Sinha, and Guido Kroemer. 2008. "Bcl-2 Family Members: Dual Regulators of Apoptosis and Autophagy." *Autophagy* 4 (5): 600–606. doi:10.4161/auto.6260.
- Li, Zirong, Sara Van Calcar, Chunxu Qu, Webster K. Cavenee, Michael Q. Zhang, and Bing Ren. 2003. "A Global Transcriptional Regulatory Role for c-Myc in Burkitt's Lymphoma Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (14): 8164–69. doi:10.1073/pnas.1332764100.
- Lutz, Brianna Marie, Sam Nia, Ming Xiong, Yuan-Xiang Tao, and Alex Bekker. 2015. "mTOR, a New Potential Target for Chronic Pain and Opioid-Induced Tolerance and Hyperalgesia."

Molecular Pain 11 (May): 32. doi:10.1186/s12990-015-0030-5.

- MacFarlane, Marion, and Ann C. Williams. 2004. "Apoptosis and Disease: A Life or Death Decision." *EMBO Reports* 5 (7): 674–78. doi:10.1038/sj.embor.7400191.
- Maiuri, M. Chiara, Gaëtane Le Toumelin, Alfredo Criollo, Jean-Christophe Rain, Fabien Gautier, Philippe Juin, Ezgi Tasdemir, et al. 2007. "Functional and Physical Interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like Domain in Beclin-1." *The EMBO Journal* 26 (10): 2527–39. doi:10.1038/sj.emboj.7601689.
- McCormack, Natasha, and Shirley O’Dea. 2013. "Regulation of Epithelial to Mesenchymal Transition by Bone Morphogenetic Proteins." *Cellular Signalling* 25 (12): 2856–62. doi:10.1016/j.cellsig.2013.09.012.
- Mélin, Carole, Aurélie Perraud, Hussein Akil, Marie-Odile Jauberteau, Philippe Cardot, Muriel Mathonnet, and Serge Battu. 2012. "Cancer Stem Cell Sorting from Colorectal Cancer Cell Lines by Sedimentation Field Flow Fractionation." *Analytical Chemistry* 84 (3): 1549–56. doi:10.1021/ac202797z.
- Mizushima, Noboru, and Beth Levine. 2010. "Autophagy in Mammalian Development and Differentiation." *Nature Cell Biology* 12 (9): 823–30. doi:10.1038/ncb0910-823.
- Mizushima, Noboru, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori, Yae Tanaka, Tomoko Ishii, Michael D. George, Daniel J. Klionsky, Mariko Ohsumi, and Yoshinori Ohsumi. 1998. "A Protein Conjugation System Essential for Autophagy." *Nature* 395 (6700): 395–98. doi:10.1038/26506.
- Motoyama, N., F. Wang, K. A. Roth, H. Sawa, K. Nakayama, K. Nakayama, I. Negishi, S. Senju, Q. Zhang, and S. Fujii. 1995. "Massive Cell Death of Immature Hematopoietic Cells and Neurons in Bcl-X-Deficient Mice." *Science (New York, N.Y.)* 267 (5203): 1506–10.
- Muchmore, S. W., M. Sattler, H. Liang, R. P. Meadows, J. E. Harlan, H. S. Yoon, D. Nettesheim, et al. 1996. "X-Ray and NMR Structure of Human Bcl-xL, an Inhibitor of Programmed Cell Death." *Nature* 381 (6580): 335–41. doi:10.1038/381335a0.
- Nakagawa, Takashi, Shigeomi Shimizu, Tetsuya Watanabe, Osamu Yamaguchi, Kinya Otsu, Hirotaka Yamagata, Hidenori Inohara, Takeshi Kubo, and Yoshihide Tsujimoto. 2005. "Cyclophilin D-Dependent Mitochondrial Permeability Transition Regulates Some Necrotic but Not Apoptotic Cell Death." *Nature* 434 (7033): 652–58. doi:10.1038/nature03317.
- Naves T, Battu S, Jauberteau MO, Cardot PJ, Ratinaud MH, Verdier M. 2012. Autophagic subpopulation sorting by sedimentation field-flow fractionation. *Anal Chem.* 2012 Oct 16;84(20):8748-55. doi: 10.1021/ac302032v.
- Nishisho, I., Y. Nakamura, Y. Miyoshi, Y. Miki, H. Ando, A. Horii, K. Koyama, J. Utsunomiya, S. Baba, and P. Hedge. 1991. "Mutations of Chromosome 5q21 Genes in FAP and Colorectal Cancer Patients." *Science (New York, N.Y.)* 253 (5020): 665–69.
- Niwa, H., J. Miyazaki, and A. G. Smith. 2000. "Quantitative Expression of Oct-3/4 Defines Differentiation, Dedifferentiation or Self-Renewal of ES Cells." *Nature Genetics* 24 (4):

372–76. doi:10.1038/74199.

- Nowell, P. C. 1976. “The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations.” *Science (New York, N.Y.)* 194 (4260): 23–28.
- Paget, S. 1989. “The Distribution of Secondary Growths in Cancer of the Breast. 1889.” *Cancer Metastasis Reviews* 8 (2): 98–101.
- Pavlov, E. V., M. Priault, D. Pietkiewicz, E. H. Cheng, B. Antonsson, S. Manon, S. J. Korsmeyer, C. A. Mannella, and K. W. Kinnally. 2001. “A Novel, High Conductance Channel of Mitochondria Linked to Apoptosis in Mammalian Cells and Bax Expression in Yeast.” *The Journal of Cell Biology* 155 (5): 725–31. doi:10.1083/jcb.200107057.
- Poruchynsky, M. S., E. E. Wang, C. M. Rudin, M. V. Blagosklonny, and T. Fojo. 1998. “Bcl-xL Is Phosphorylated in Malignant Cells Following Microtubule Disruption.” *Cancer Research* 58 (15): 3331–38.
- Pouyssegur, J., E. Berra, E. Benizri, F. Dayan, A. Ginouvès, N. Mazure, and D. Roux. 2004. “Hypoxie et Croissance Tumorale.” *Journal de Radiologie* 85 (9): 1375. doi:10.1016/S0221-0363(04)77216-9.
- Priault, Muriel, Erika Hue, Fanny Marhuenda, Paul Pilet, Lisa Oliver, and François M. Vallette. 2010. “Differential Dependence on Beclin 1 for the Regulation of pro-Survival Autophagy by Bcl-2 and Bcl-xL in HCT116 Colorectal Cancer Cells.” *PloS One* 5 (1): e8755. doi:10.1371/journal.pone.0008755.
- Rajalingam, Krishnaraj, Ralf Schreck, Ulf R. Rapp, and Štefan Albert. 2007. “Ras Oncogenes and Their Downstream Targets.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Mitogen-Activated Protein Kinases: New Insights on Regulation, Function and Role in Human Disease*, 1773 (8): 1177–95. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.01.012.
- Rapisarda, Annamaria, and Giovanni Melillo. 2012. “Role of the VEGF/VEGFR Axis in Cancer Biology and Therapy.” *Advances in Cancer Research* 114: 237–67. doi:10.1016/B978-0-12-386503-8.00006-5.
- Ravikumar, Brinda, Kevin Moreau, Luca Jahreiss, Claudia Puri, and David C. Rubinsztein. 2010. “Plasma Membrane Contributes to the Formation of Pre-Autophagosomal Structures.” *Nature Cell Biology* 12 (8): 747–57. doi:10.1038/ncb2078.
- Razungles, Julie, Vincent Cavallès, Stéphan Jalaguier, and Catherine Teyssier. 2013. “[The Warburg effect: from theory to therapeutic applications in cancer].” *Medecine Sciences: M/S* 29 (11): 1026–33. doi:10.1051/medsci/20132911020.
- Renault, Thibaud T., Laurent M. Dejean, and Stéphen Manon. 2017. “A Brewing Understanding of the Regulation of Bax Function by Bcl-xL and Bcl-2.” *Mechanisms of Ageing and Development* 161 (Pt B): 201–10. doi:10.1016/j.mad.2016.04.007.
- Renault, Thibaud T., and Stéphen Manon. 2011. “Bax: Addressed to Kill.” *Biochimie* 93 (9): 1379–91. doi:10.1016/j.biochi.2011.05.013.

- Robinson, N. E., and A. B. Robinson. 2001a. "Molecular Clocks." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (3): 944–49. doi:10.1073/pnas.98.3.944.
- Robinson. 2001b. "Prediction of Protein Deamidation Rates from Primary and Three-Dimensional Structure." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (8): 4367–72. doi:10.1073/pnas.071066498.
- Robinson 2001c. "Deamidation of Human Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (22): 12409–13. doi:10.1073/pnas.221463198.
- Robinson. 2004. "Prediction of Primary Structure Deamidation Rates of Asparaginyl and Glutaminyl Peptides through Steric and Catalytic Effects." *The Journal of Peptide Research: Official Journal of the American Peptide Society* 63 (5): 437–48. doi:10.1111/j.1399-3011.2004.00148.x.
- Robinson, N. E., Z. W. Robinson, B. R. Robinson, A. L. Robinson, J. A. Robinson, M. L. Robinson, and A. B. Robinson. 2004. "Structure-Dependent Nonenzymatic Deamidation of Glutaminyl and Asparaginyl Pentapeptides." *The Journal of Peptide Research: Official Journal of the American Peptide Society* 63 (5): 426–36. doi:10.1111/j.1399-3011.2004.00151.x.
- Robinson, Noah E. 2002. "Protein Deamidation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (8): 5283–88. doi:10.1073/pnas.082102799.
- Shackleton, Mark, Elsa Quintana, Eric R. Fearon, and Sean J. Morrison. 2009. "Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution." *Cell* 138 (5): 822–29. doi:10.1016/j.cell.2009.08.017.
- Simona Giorgini, Daniela Trisciuglio, Chiara Gabellini, Marianna Desideri, Laura Castellini Cristina Colarossi, Uwe Zangemeister-Wittke, Gabriella Zupi and Donatella Del Bufalo. 2007. "Modulation of bcl-xL in Tumor Cells Regulates Angiogenesis through CXCL8 Expression". *Molecular cell research*, 10.1158/1541-7786.MCR-07-0088.
- Takehara, Tetsuo, and Hiroshi Takahashi. 2003. "Suppression of Bcl-xL Deamidation in Human Hepatocellular Carcinomas." *Cancer Research* 63 (12): 3054–57.
- Talmadge, James E., and Isaiah J. Fidler. 2010. "AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective." *Cancer Research* 70 (14): 5649–69. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1040.
- Tang, Dean G., and Arthur T. Porter. 1996. "Apoptosis: A Current Molecular Analysis." *Pathology Oncology Research: POR* 2 (3): 117–31.
- Tsujimoto, Y., J. Yunis, L. Onorato-Showe, J. Erikson, P. C. Nowell, and C. M. Croce. 1984. "Molecular Cloning of the Chromosomal Breakpoint of B-Cell Lymphomas and Leukemias with the t(11;14) Chromosome Translocation." *Science (New York, N.Y.)* 224 (4656): 1403–6.
- Upreti, Meenakshi, Christopher S. Lyle, Brian Skaug, Lihua Du, and Timothy C. Chambers. 2006. "Vinblastine-Induced Apoptosis Is Mediated by Discrete Alterations in Subcellular Location,

Oligomeric Structure, and Activation Status of Specific Bcl-2 Family Members.” *The Journal of Biological Chemistry* 281 (23): 15941–50. doi:10.1074/jbc.M512586200.

Veis, D. J., C. M. Sorenson, J. R. Shutter, and S. J. Korsmeyer. 1993. “Bcl-2-Deficient Mice Demonstrate Fulminant Lymphoid Apoptosis, Polycystic Kidneys, and Hypopigmented Hair.” *Cell* 75 (2): 229–40.

Vento, Maria Teresa, Valeria Zazzu, Alessia Loffreda, Justin R. Cross, Julian Downward, Maria Patrizia Stoppelli, and Ingram Iaccarino. 2010. “Prpf2 Is a Novel Bcl-xL/Bcl-2 Interacting Protein with the Ability to Modulate Survival of Cancer Cells.” *PloS One* 5 (12): e15636. doi:10.1371/journal.pone.0015636.

Yeung, Trevor M., Shaan C. Gandhi, Jennifer L. Wilding, Ruth Muschel, and Walter F. Bodmer. 2010. “Cancer Stem Cells from Colorectal Cancer-Derived Cell Lines.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (8): 3722–27. doi:10.1073/pnas.0915135107.

Yu, Li, Christina K. McPhee, Lixin Zheng, Gonzalo A. Mardones, Yueguang Rong, Junya Peng, Na Mi, et al. 2010. “Termination of Autophagy and Reformation of Lysosomes Regulated by mTOR.” *Nature* 465 (7300): 942–46. doi:10.1038/nature09076.

Y Tian, C-f Kuo, D Sir, L Wang, S Govindarajan, LM Petrovic and J-hJ Ou. Autophagy inhibits oxidative stress and tumor suppressors to exert its dual effect on hepatocarcinogenesis. *Cell Death and Differentiation* (2015) 22, 1025–1034; doi:10.1038/cdd.2014.201

Zhao, Rui, David Oxley, Trevor S. Smith, George A. Follows, Anthony R. Green, and Denis R. Alexander. 2007a. “DNA Damage-Induced Bcl-xL Deamidation Is Mediated by NHE-1 Antiport Regulated Intracellular pH.” *PLoS Biology* 5 (1): e1. doi:10.1371/journal.pbio.0050001.

Zhao, Rui, Feng Tang Yang, and Denis R. Alexander. 2004. “An Oncogenic Tyrosine Kinase Inhibits DNA Repair and DNA-Damage-Induced Bcl-xL Deamidation in T Cell Transformation.” *Cancer Cell* 5 (1): 37–49.

Annexes

N52 monodeamidated Bcl-x_L shows impaired oncogenic properties *in vivo* and *in vitro*

Florian Beaumatin^{1,2}, Mohamad El Dhaybi^{1,2,4}, Jean-Paul Lasserre^{1,2}, Bénédicte Salin^{1,2}, Mary Pat Moyer³, Mireille Verdier⁴, Stéphen Manon^{1,2}, Muriel Priault^{1,2}

¹CNRS, Institut de Biochimie et de Génétique Cellulaires, UMR5095, 33077 Bordeaux, France

²Université Bordeaux Ségalen, Institut de Biochimie et de Génétique Cellulaires, UMR5095, 33077 Bordeaux, France

³INCELL Corporation, San Antonio, TX 78249, USA

⁴EA 3842, Homéostasie Cellulaire et Pathologies, Université de Limoges, 87025 Limoges cedex, France

Correspondence to: Muriel Priault, **e-mail:** muriel.priault@ibgc.cnrs.fr

Keywords: Bcl-x_L, autophagy, apoptosis, cancer, post-translational modification

Received: September 29, 2015

Accepted: January 31, 2016

Published: March 06, 2016

ABSTRACT

Bcl-x_L is a member of the Bcl-2 family, playing a critical role in the survival of tumor cells. Here, we show that Bcl-x_L oncogenic function can be uncoupled from its anti-apoptotic activity when it is regulated by the post-translational deamidation of its Asn52.

Bcl-x_L activity can be regulated by post-translational modifications: deamidation of Asn52 and 66 into Asp residues was reported to occur exclusively in response to DNA damage, and to cripple its anti-apoptotic activity. Our work reports for the first time the spontaneous occurrence of monodeamidated Asp⁵²Bcl-x_L in control conditions, *in vivo* and *in vitro*. In the normal and cancer cell lines tested, no less than 30% and up to 56% of Bcl-x_L was singly deamidated on Asn⁵². Functional analyses revealed that singly deamidated Bcl-x_L retains anti-apoptotic functions, and exhibits enhanced autophagic activity while harboring impaired clonogenic and tumorigenic properties compared to native Bcl-x_L. Additionally, Asp⁵²Bcl-x_L remains phosphorylatable, and thus is still an eligible target of anti-neoplastic agents. Altogether our results complement the existing data on Bcl-x_L deamidation: they challenge the common acceptance that Asn52 and Asn66 are equally eligible for deamidation, and provide a valuable improvement of our knowledge on the regulation of Bcl-x_L oncogenic functions by deamidation.

INTRODUCTION

Bcl-x_L is an oncogene whose over-expression is largely documented in cancers like colorectal adenocarcinoma [1], breast [2] and prostate cancer [3] and multiple myeloma [4]. Bcl-x_L was initially characterized as a Bcl-2 family member [5] displaying anti-apoptotic functions similar to Bcl-2 through its ability to prevent Bax-induced cytochrome c release from mitochondria. In spite of their 43% amino acid identity, their structural similarity, and their critical roles in cancer development and resistance to chemotherapy treatments, Bcl-2 and Bcl-x_L are not redundant proteins: loss of function studies

in mice knocked-out for either gene allowed to discern their respective physiologic roles, Bcl-2 being required for the survival of kidney, melanocytes, stem cells and mature lymphocytes [6], and Bcl-x_L for neuronal and erythroid cells [7]. A comparison of the two proteins carried out in a single cellular context further highlighted (i) that Bcl-2 and Bcl-x_L exhibit functional differences in their inhibition of apoptosis depending on the death inducer and the pertaining signaling pathway, and (ii) that Bcl-x_L is more potent than Bcl-2 to warrant cell survival [8].

Another noticeable difference is the unique susceptibility of Bcl-x_L to undergo a post-translational modification (PTM) called deamidation in cells exposed

to DNA damaging agents, [9, 10]. Deamidation is the transformation of eligible glutamine and asparagine residues into glutamate and aspartate/isoaspartate. Susceptibility for deamidation is conditioned by the primary sequence (notably if glycine is the flanking residue on the α -carboxyl side), by the lack of three-dimensional structure, and is facilitated by high temperatures, extreme pH or high ionic strength [11]. Deamidation affects a great number of proteins (human growth hormone [12], calmodulin [13], tissue plasminogen activator [14], tubulin [15], synapsin [16], Alzheimer's β -amyloid [17], histone H2B [18], protein kinase A [19], cytochrome c... [11]), and has therefore wide biological repercussions because it can lead to structural changes and/or modify their life-span.

Bcl-x_L was shown directly [20] or indirectly [21–23] to undergo a double deamidation of Asn⁵² and Asn⁶⁶. Predictive algorithms calculate an equally probable deamidation for both residues [11] given their location in what is referred to as the flexible loop of Bcl-x_L (this region fails to adopt a defined structure according to X-ray crystallography and NMR data [24]), and the fact that they are both followed by a glycine residue. That cancer cells contain less deamidated Bcl-x_L than normal cells, was a first indication that deamidated Bcl-x_L harbors impaired anti-apoptotic functions; [20, 22, 23] *in vitro* studies further showed that Bcl-x_L deamidation inhibited binding to BH3-containing partners. But because deamidation produces a mixture of Asp and isoAsp, the question raised was which of the two species triggered the loss of function? Work from the Alexander lab clarified the debate opened by Deverman et al [20, 21, 25]. and showed that the prevalent occurrence of β -linked isoaspartyl residues (isoAsp⁵²/isoAsp⁶⁶), which causes more significant alterations in the structure of the protein than conversion into Asp [26], was responsible for disabling Bcl-x_L binding to pro-apoptotic BH3-only partners like Bim and Puma [20]. They also defined the pathway through which DNA-damage leads to NHE-1-induced intracellular alkalization and entails Bcl-x_L deamidation [20]. Additionally, deamidation was also recently shown to be instrumental in the control of Bcl-x_L cellular amount since the deamidated protein is targeted for calpain-mediated degradation in response to cytosolic alkalization [27]. *In fine*, Bcl-x_L deamidation would act both on the function and on the amount of Bcl-x_L to limit its pro-survival activity; as a corollary, suppression of Bcl-x_L deamidation would be another mechanism, unique to this member of the Bcl-2 family, implemented by tumor cells to acquire resistance to apoptosis.

Despite all these insights into deamidation-induced Bcl-x_L loss of function and cancer progression, three important arguments add up and highlight that the matter still deserves thriving attention: (1) cells resort to a repair enzyme called isoaspartyl methyltransferase to convert isoAsp into Asp residues, and thus eliminate the isopeptide bond which alters the conformation of proteins. Knocked

out mice for such an enzyme accumulate 4–8 times more isomerized proteins than wild-type mice [28], suggesting that the restoration of isoAsp into Asp residues is potent enough to prevent the accumulation of damaged proteins and restore normal functions. More specifically regarding deamidated Bcl-x_L, two studies showed that an isoaspartyl methyltransferase called Pimt [29] or PCMT [30] restored its anti-apoptotic functions since cells reacquired protection against stress-induced apoptosis. Therefore, the functional modifications brought by deamidation into Asp residues, and not only isoAsp should be considered. (2) Another important parameter causing a stir in the debate is that both Bcl-2 and Bcl-x_L are involved in the regulation of autophagy, [31, 32] a self-degradation pathway routing cellular components in vesicles called autophagosomes toward lysosomes for degradation and recycling. Autophagy is used by cells to deal with various stresses, and can be instrumental in cancer progression (reviewed in ref [33]). However, consistent with the idea that the two proteins are not interchangeable, we brought evidence of mechanistic differences in their control of autophagy, and showed that stimulation of autophagy was yet another asset allowing Bcl-x_L to keep death at bay [34, 35]. The functional outcome of Bcl-x_L deamidation on its autophagic functions has never been addressed so far. (3) Finally, to the best of our knowledge, studies investigating Bcl-x_L deamidation have only focused on the complete deamidation of the two Asn⁵² and Asn⁶⁶ residues, but never on single deamidation of either residue. We therefore set out to investigate those three points. We addressed the relevance of the occurrence of single deamidation in cultured cells and *in vivo*, and report for the first time the existence of N52-monodeamidated Bcl-x_L; we further performed an exhaustive functional characterization of this newly identified form of Bcl-x_L in cultured cells and *in vivo*.

RESULTS

Monodeamidated Asp⁵²Bcl-x_L is readily detected in control-grown HCT116 colorectal cancer cells.

A pioneering work by the Weintraub lab [21] combining SDS-PAGE of Bcl-x_L deamidation mutants and tandem mass spectrometry, established that deamidation can be appraised by differences in the SDS-PAGE migration profiles. Works published thereafter and reporting Bcl-x_L deamidation in various cell lines show western blots with the native protein at ~30 kDa and either one [21, 22, 36] or two additional bands [20, 21, 23] migrating at shorter distances. However only the uppermost migrating band, resulting from the double deamidation of Asn⁵² and Asn⁶⁶ of Bcl-x_L was functionally characterized, leaving partial deamidation of either Asn⁵² or Asn⁶⁶ unexplored. Unlike these works, where deamidation was always induced by treatments like various DNA-damaging agents or incubation of protein extracts in

an alkaline buffer, we asked whether Bcl-x_L could exist under partially deamidated forms in the absence of any stimulation of deamidation. In control-grown HCT116 cells, we observed that endogenous Bcl-x_L migrates as a doublet. The slower migrating band was not removed by λ-phosphatase treatment, and therefore did not correspond to phosphorylated Bcl-x_L. That lambda phosphatase was active in these conditions was checked in Supplementary Figure S1. This band did not co-migrate with doubly deamidated Bcl-x_L contained in samples exposed to alkaline conditions (Figure 1A). We next compared the migration profiles of mutants of Bcl-x_L recapitulating either complete (N52D/N66D) or single deamidation (N52D/N66A and N52A/N66D) or an undeamidable form of Bcl-x_L (note that substitution of Asn by Asp produces a constitutively deamidated form on the position chosen, while substitution of the second Asn residue by non-deamidable Ala ensures that the protein generated will not be eligible for complete deamidation). In the stable cell lines used for this whole study, we ensured that ectopic proteins were expressed at comparable levels (Supplementary Figure S2A). The upper band in cells expressing Bcl-x_L unambiguously co-migrated with the singly deamidated N52D/N66A form of Bcl-x_L (Figure 1B), supporting that the protein undergoes the single deamidation on the residue Asn52. Those results were corroborated by two-dimensional electrophoresis coupling isoelectric focusing (IEF) experiments to SDS-PAGE, in which this modified form exhibited a more acidic pI than native Bcl-x_L and the non deamidable mutant N52A/N66A (as can be anticipated when Asn residues are converted into Asp), and co-migrated with deamidation

mutants (Supplementary Figure S2B). From all this, we infer that Bcl-x_L deamidation is not always complete, and that partial deamidation of the protein exists in the absence of any DNA-damaging treatment.

Monodeamidated Asp⁵²Bcl-x_L is ubiquitously found in cultured cells

We next performed an SDS-PAGE analysis of the migration profile of Bcl-x_L extracted from nine different cancer cell lines and two normal cell lines, all grown under control conditions. Bcl-x_L invariably migrated as a doublet in all the cell lines tested (Figure 2). The slower band consistently co-migrated with the singly deamidated Bcl-x_L characterized in HCT116. An accurate quantification was performed applying a Gaussian fit on the densitometric profiles from Figure 2 to discriminate native from deamidated Bcl-x_L. Regardless of the level of expression of Bcl-x_L, deamidated Bcl-x_L accounted for no less than 31% and up to 56% of total Bcl-x_L, which further underscores the need to address the biological relevance and the function of this singly deamidated form.

Monodeamidated Asp⁵²Bcl-x_L is ubiquitously found *in vivo*

We analyzed the SDS-PAGE migration profile of Bcl-x_L extracted from tissues of young (4 weeks) and aged mice (> 32 weeks). Extracts from leg muscles and intestine essentially showed barely detectable levels of Bcl-x_L regardless of the age of the mice (not shown)

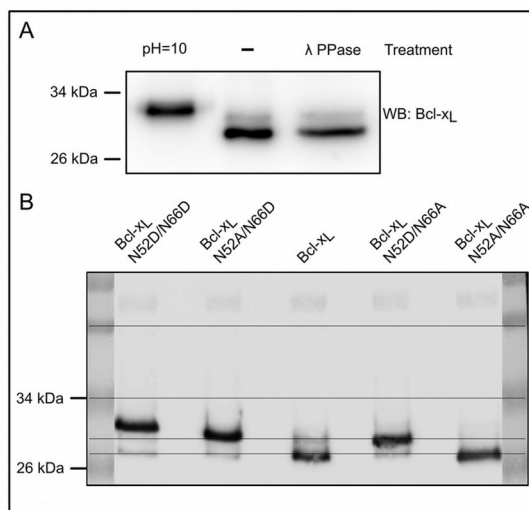


Figure 1: Spontaneous occurrence of monodeamidated Asp⁵²Bcl-x_L in HCT116 colorectal cells. (A) Total protein extracts from HCT116 cells were separated on SDS-PAGE in parallel with cell extracts submitted to alkaline treatment, or λ-phosphatase treatment. Immunodetection was performed against Bcl-x. (B) Total protein extracts from HCT116 cells transduced to express Bcl-xL deamidation mutants were separated on SDS-PAGE. Immunodetection was performed against Bcl-x.

but Bcl-x_L was readily detected in brain, heart and liver tissues. It systematically migrated as a doublet or a triplet (Figure 3). The slow migrating bands (labeled *and **) were not affected upon λ-phosphatase treatment, and the highest band co-migrated with the doubly deamidated form found in alkaline treated samples. Thus, brain extracts from aged mice accumulate mono- and doubly deamidated Bcl-x_L, while young mice present the native and monodeamidated forms. Heart extracts displayed all 3 forms of Bcl-x_L regardless of the age of mice (not shown). Finally, liver extracts only displayed the native and monodeamidated forms regardless of the age (Figure 3).

These results extend what we observed in cultured cells, namely that Asp⁵² monodeamidated Bcl-x_L is readily produced in untreated animal tissues. All the experiments above lead us to conclude that the single deamidation of Bcl-x_L is a widely observed process, occurring in the absence of any DNA-damaging treatment, and its abundance highlights that its functional aftermaths deserve to be thoroughly addressed.

N52 Bcl-x_L deamidation does not modify the half-life of the protein

In silico calculation predicts equivalent deamidation rates for Asn⁵² and Asn⁶⁶ in Bcl-x_L [21]. Our observation that only Asn⁵² Bcl-x_L is deamidated in untreated cells and tissues prompted us to question why neither Asp⁶⁶ Bcl-x_L nor the double deamidated form of Bcl-x_L were detected. Because deamidation times the degradation of some proteins [37, 38], and because the cellular content of Bcl-x_L was shown to decrease in response to DNA damage [27], we hypothesized that the deamidation of Asn⁶⁶ would shorten the half-life of Bcl-x_L proteins, justifying that neither Asp⁶⁶ Bcl-x_L nor Asp⁵²/Asp⁶⁶ Bcl-x_L accumulate in untreated cells.

The degradation rate of native Bcl-x_L and mutants producing singly deamidated Bcl-x_L (N52D/N66A and N52A/N66D), double deamidated Bcl-x_L (N52D/N66D) and non-deamidable Bcl-x_L (N52A/N66A) was traced over time in the presence of cycloheximide (CHX). Mcl-1, another member of the Bcl-2 family, was used as a

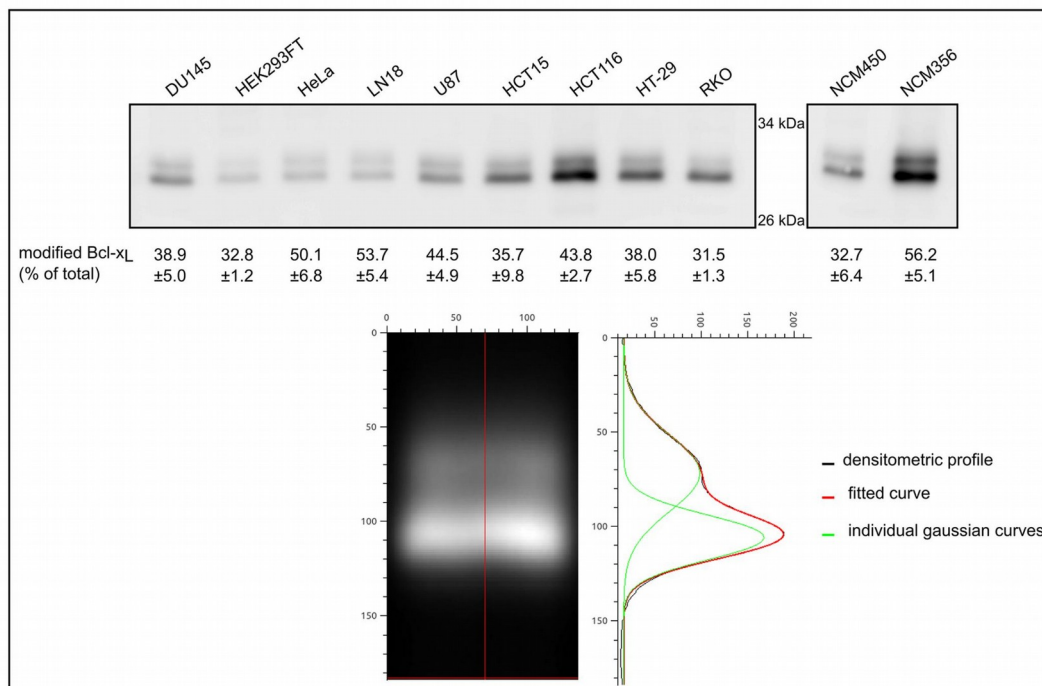


Figure 2: Quantification of monodeamidated Asp⁵²Bcl-x_L in normal and cancer cell lines. Total proteins were extracted from 8 cancer cell lines originating from different tissues, one transformed cell line and 2 normal cell lines derived from colon epithelium. 25 μg of proteins were separated by SDS-PAGE and an immunodetection of Bcl-x_L was performed. In order to resolve the signal corresponding respectively to native and to deamidated Bcl-x_L, a Gaussian fit was applied to the densitometric profiles obtained by western blot, and the areas were measured to calculate the percentage of deamidated Bcl-x_L measured in each cell line. An example of the treatment is shown on HCT116 signal.

positive control for rapid degradation. No change in the kinetics of degradation could be observed between Bcl-x_L endogenous or ectopic native form, and the deamidation mutants (Figure 4A). Likewise, when we assayed whether calpain inhibition would prevent the degradation of Bcl-x_L deamidation mutants, as was described in cells exposed to DNA damage [27], we found no accumulation of either form of Bcl-x_L in control-grown cells, indicating that none of the deamidation mutants is targeted for calpain degradation (Figure 4B). From all these data, we conclude that deamidation does not alter Bcl-x_L half-life in cultured cells that are not challenged by DNA-damaging agents. Most interestingly, these data also provide grounding to surmise that opposite to *in silico* predictions, Asn⁵² and Asn⁶⁶ are not equally prone to deamidation since only Asp⁵²Bcl-x_L is observed in HCT116, and not Asp⁶⁶ Bcl-x_L or Asp⁵²/Asp⁶⁶ Bcl-x_L.

Monodeamidated Asp⁵²Bcl-x_L retains anti-apoptotic function

Bcl-x_L double deamidation into isoAsp⁵²/isoAsp⁶⁶, but not into Asp⁵²/Asp⁶⁶ is responsible for its loss of interaction with BH3-only partners like Bim and Puma [20]. We complemented this analysis by testing the anti-apoptotic function of the singly deamidated N52D/N66A Bcl-x_L in cells exposed to DNA-damage (etoposide/5-FluoroUracile (5-FU) in Figure 5A or UV-irradiation/5-FU in Supplementary Figure S3A) or treated with staurosporine (Figure 5B). Monodeamidation of N52 did neither prevent binding to Bim or Bax (Supplementary Figure S3A and S3B), nor alter its anti-apoptotic functions as assayed by FACS analysis (Figure 5A) or by PARP cleavage (Figure 5B). We also confirmed that fully deamidated Bcl-x_L retained anti-apoptotic functions, in keeping with the literature.

Monodeamidation of N52 enhances Bcl-x_L survival autophagic functions

Ectopic expression of Bcl-x_L was described as of 2003 to extend survival of cells confronted to serum starvation [39], a treatment known to induce autophagy. We corroborated this finding and showed that Bcl-x_L exhibits pro-autophagic activity in different cell lines [34, 35]. To the best of our knowledge, the impact of Bcl-x_L deamidation on autophagy remains unexplored to date. We thus assessed the starvation-induced autophagic activity of HCT116 cells expressing Bcl-x_L N52D/N66D and N52D/N66A. The autophagic degradation of L-[¹⁴C] valine-labeled proteins was measured in cells starved for 6 hours (Figure 6A). Consistent with our previous findings [34], we observed that ectopic expression of Bcl-x_L stimulates autophagic proteolysis compared to control cells, and so did the two deamidation mutants; interestingly, Bcl-x_L N52D/N66A displayed a significantly greater stimulation than native Bcl-x_L. These data were confirmed by conversion of LC3-I into its lipidated LC3-II form to measure the autophagic flux (Figure 6B), and transmission electron micrographs (Supplementary Figure S4 quantified in Figure 6C) where degradative autophagic vesicles were counted. Finally, FACS analysis of plasma membrane integrity showed that autophagy served as a cytoprotective mechanism and was not converted into a death process (Figure 6D).

Cells expressing monodeamidated Asp⁵²Bcl-x_L display restricted clonogenic growth and impaired tumorigenicity

We next assayed the clonogenic and tumorigenic potential of singly deamidated Bcl-x_L. Anchorage-independent growth of cells in a semi-polymerized

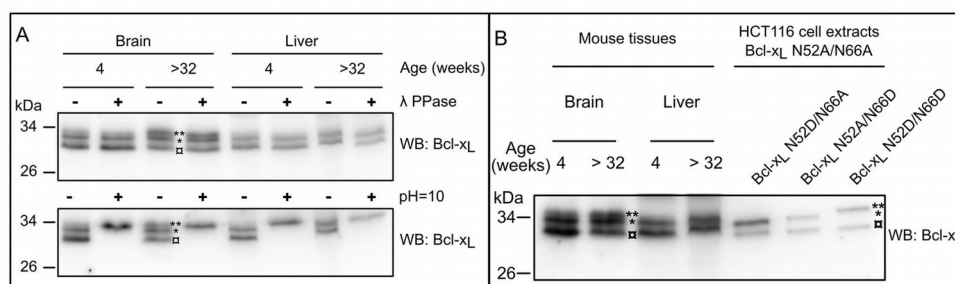


Figure 3: Detection of deamidated forms of Bcl-x_L *in vivo*. (A) Total proteins extracts were performed from brain and liver of 4 week- or > 32 week-old mice. Samples were submitted (+) or not (-) to λ-phosphatase treatment, or submitted (+) to alkaline treatment or left at pH = 7 (-), and separated on SDS-PAGE. Immunodetection was performed against Bcl-x. The amount of proteins loaded was adjusted to obtain equivalent signals for Bcl-x_L. Results are representative of analyses conducted with at least 3 different animals for each age. (B) The same tissue extracts as in panel A were loaded in parallel with total protein extracts from HCT116 cells transfected to express Bcl-x_L deamidation mutants. Extracts from cells expressing Bcl-x_L N52D/N66A, N52A/N66D and N52D/N66D were mixed with N52A/N66A to use the non deamidable form as a reference for comparisons of the migration profiles. The amount of proteins loaded was adjusted to obtain equivalent signals for Bcl-x_L. (□: native undeamidated/undeamidable Bcl-x_L, *singly deamidated Bcl-x_L, **doubly deamidated Bcl-x_L)

medium showed that the number of colonies formed by HCT116-Asp⁵²Bcl-x_L was significantly lower than HCT116-Bcl-x_L (Figure 7A). Hence, monodeamidation of Bcl-x_L on Asn⁵² restricts the clonogenic properties of Bcl-x_L *in vitro*.

We finally used chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) as an *in vivo* model to study tumor formation upon implantation of HCT116 cells. Three days after inoculation, tumors xenografts were visible and were excised from the CAMs. Tumors implanted with HCT116-Bcl-x_L were conspicuously bigger than those derived from non transduced cells, validating CAM as

a relevant model to assay Bcl-x_L tumorigenic potential. Interestingly, tumors derived from HCT116-Asp⁵²Bcl-x_L were smaller than those derived from HCT116-Bcl-x_L (Figure 7B), indicating that monodeamidation impairs Bcl-x_L tumorigenic properties.

This result was substantiated by immunohistochemistry analyses of the mitotic index with Ki67 labeling (Figure 7C). More than 90% of the tumor cells derived from HCT116-Bcl-x_L were Ki67 positive, but the labeling was dramatically decreased in those originating from cells expressing monodeamidated Asp⁵²Bcl-x_L, indicating a much lower proliferation index.

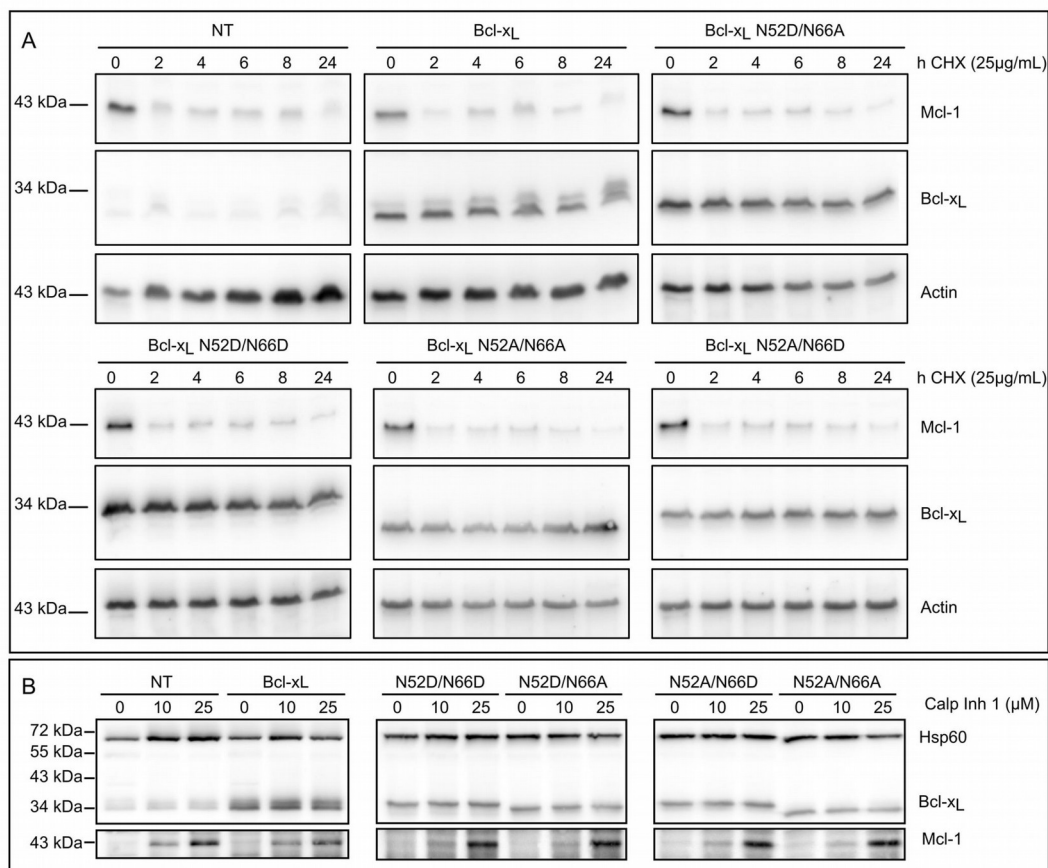


Figure 4: Bcl-x_L deamidation does not alter its half-life. (A) Non transduced HCT116 cells (NT) and HCT116 cells transduced to express Bcl-x_L or the deamidation mutants were incubated with CHX for the indicated time. Total protein extracts were performed and 25 µg of proteins separated on SDS-PAGE. Immunodetection was performed against Bcl-x, actin as a loading control, and Mcl-1 as a positive control for short-lived proteins. Results are representative of 3 independent experiments. (B) Non transduced HCT116 cells (NT) and HCT116 cells transduced to express Bcl-x_L or the deamidation mutants were incubated with calpain inhibitor for 24 h. Total protein extracts were performed and 25 µg of proteins separated on SDS-PAGE. Immunodetection was performed against Bcl-x, HSP60 as a loading control, and Mcl-1 as a positive control for inhibition of calpain-mediated degradation. Results are representative of 3 independent experiments.

Altogether, both *in vitro* and *in vivo* tests showed that monodeamidation of Asn⁵² impairs Bcl-x_L clonogenic and tumorigenic properties.

Monodeamidated Asp⁵²Bcl-x_L remains a target for a selective class of anti-neoplastic agents

We demonstrated so far that monodeamidated Asp⁵²Bcl-x_L has decreased clonogenic and tumorigenic activities, but retains unscathed anti-apoptotic functions. Therefore we last asked whether this modified form would still be an eligible target for anti-neoplastic treatments that prove toxic for cancer cells because they trigger Bcl-2/Bcl-x_L phosphorylation and hence abrogate their anti-apoptotic activity. Taxol and vinblastin are such compounds, that alter the architecture of microtubules and initiate pathways leading to Bcl-2/Bcl-x_L phosphorylation [10]. In HCT116 cells, vinblastin treatment triggered the phosphorylation of native Bcl-x_L (endogenous or ectopic) and also of the singly deamidated mutant Bcl-x_L N52D/N66A (Figure 8). Therefore we conclude that monodeamidated Asp⁵²Bcl-x_L is still susceptible to phosphorylation in response to microtubule-targeting anti-neoplastic agents.

Such a result fosters the idea that the concerted use of drugs can be envisaged to target the anti-apoptotic activity of singly deamidated Asp⁵²Bcl-x_L and further limit its oncogenic properties.

DISCUSSION

A growing body of evidence supports the fact that Bcl-2 family members are not only key regulators of cell apoptosis, but also actively participate in the regulation of vital cellular functions. As a consequence, restricting the oncogenic properties of the anti-apoptotic proteins of this family to their ability to oppose apoptosis is now dated. The work presented here brings further support to this concept, as we identified a novel PTM-modified form of Bcl-x_L which retains full anti-apoptotic functions, but shows impaired oncogenic properties.

Monodeamidated Asp⁵²Bcl-x_L is ubiquitously found

The confrontation of several articles dealing with the PTM of Bcl-x_L led us to elaborate on the

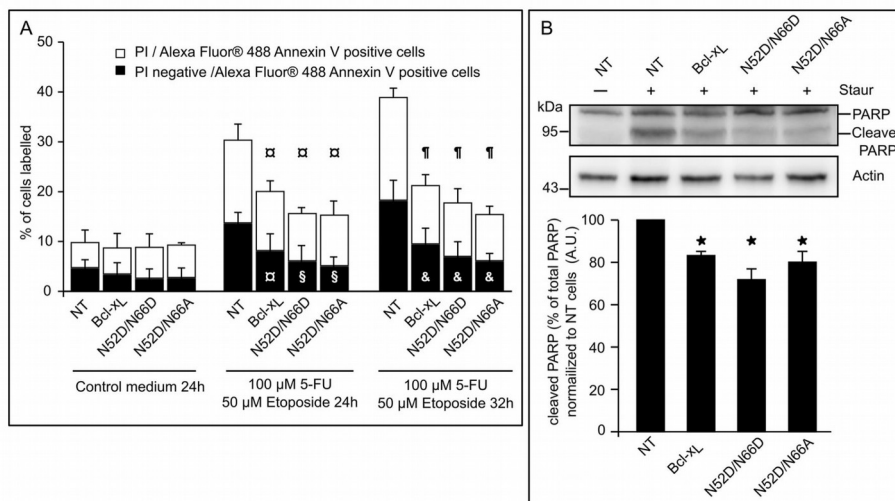


Figure 5: Singly and doubly deamidated forms of Bcl-x_L retain full anti-apoptotic activity. (A) HCT116 cells NT or transduced to express the indicated proteins were submitted or not to DNA-damaging treatment (UV+5-FU) for the indicated times, and labeled with PI and/or Alexa Fluor[®] 488 Annexin V. A minimum of 10 000 cells were counted, and dead cells (labeled by both dyes) or cells dying by apoptosis (labeled by Alexa Fluor[®] 488 Annexin V) were quantified. Results are the mean of at least 3 independent experiments. Error bars show the SD. Student's test was used for statistical analysis vs NT cells. In control conditions, all *p* value are > 0,5 ; at 24 h of treatments, □ *p* < 0,1 and § *p* < 0,05 ; at 32 h of treatments, † *p* < 0,01 and ‡ *p* < 0,05. (B) (Top) Untreated NT HCT116 cells were used to show intact PARP, while HCT116 cells NT or transduced to express the indicated proteins were treated with staurosporine prior to extraction of total proteins. 50 μg of proteins were separated on SDS-PAGE, and immunodetection was performed against PARP and actin. (Bottom) Quantification of the densitometric analysis was performed on 3 independent experiments. Error bars show the SD. Student's test was used for statistical analysis vs NT cells **p* < 0,05.

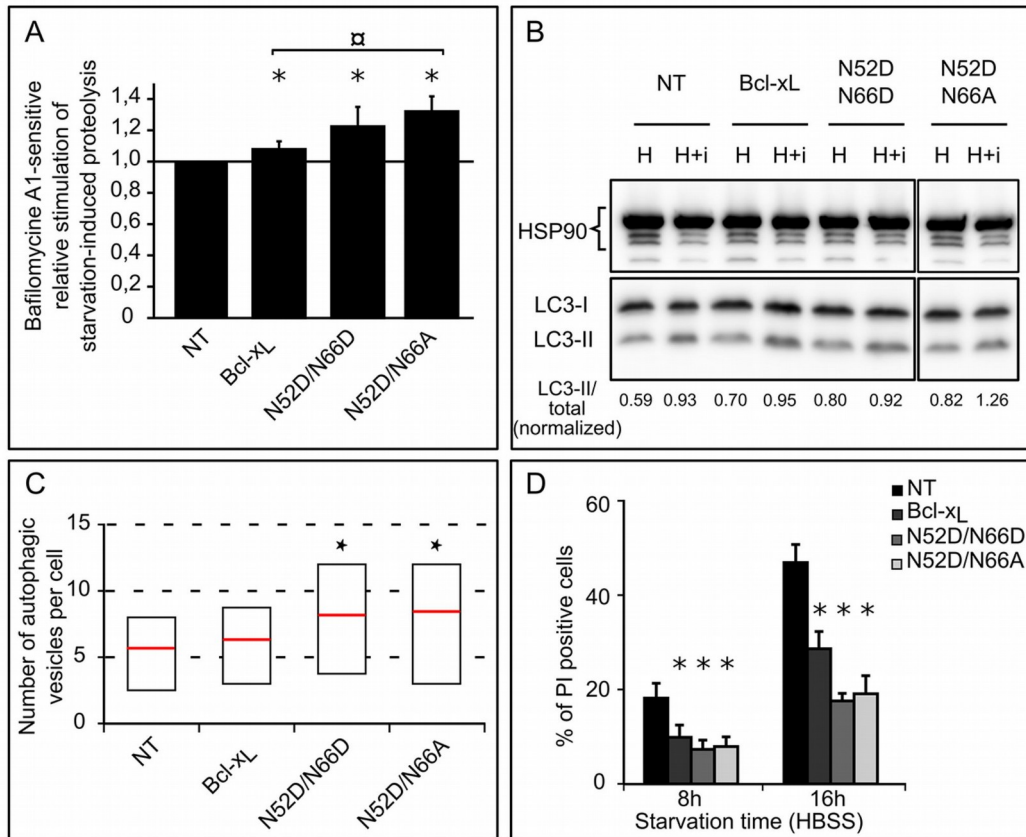


Figure 6: Singly and doubly deamidated forms of Bcl-x_L display increased autophagic activity. (A) Relative stimulation of starvation-induced bafilomycin A1-sensitive degradation of long-lived proteins in HCT116 cells non transfected or transfected to express the indicated proteins. ¹⁴C-Valine-labeled cells were chased for 6 hours in HBSS or HBSS + BafA1, and proteolysis measured. Results represent the bafA1-sensitive proteolytic activities of each cell line relative to that found in NT cells. Results are the mean of 3 independent experiments. Error bars show the S.D. Normality was checked with a Shapiro-Wilk's test. One way ANOVA test followed by Tukey's test vs NT cells calculated **p* < 0.05 and □ *p* < 0.05 vs pBcl-x_L cells. (B) Autophagic flux was measured in HEK293FT cells transiently transfected to express the indicated forms of Bcl-x_L. Immunoblot analysis of endogenous LC3-I and LC3-II levels was performed on total proteins extracted from cells incubated in HBSS or HBSS + Baf + E64d for 60 min. HSP90 was used as a loading control to normalize the ratio LC3-II/total LC3 using the Image J software. The results are representative of 5 independent experiments. (C) Quantification of autophagic vesicles counted per cell on transmission electron micrographs of HCT116 cells non transfected or transfected to express Bcl-x_L or the deamidation mutants: cells were incubated for 6 hours in HBSS + BafA1 to measure the accumulation of autophagosomes, and samples prepared for TEM analysis. A minimum of 50 cells was analyzed for each cell line. Results are presented as box plots, with the bottom and top of the box representing respectively the first and the 3rd quartile, and the red mark indicating the mean (Student test was used to calculate **p* values < 0.05 compared to NT cells). (D) HCT116 cells non transfected or transfected to express the indicated proteins were transferred into HBSS for the indicated time, and plasma membrane permeability was assessed by PI exclusion. A minimum of 10 000 events were quantified by FACS analysis. Results are the mean of 5 independent experiments. Error bars show the SD (Student test was used to calculate **p* values < 0,002 compared to NT cells).

occurrence of monodeamidated Bcl-x_L. To the best of our knowledge, articles reporting on Bcl-x_L deamidation only envisage this modification in the context of DNA damage, and led to the characterization of the doubly deamidated protein on Asn⁵² and Asn⁶⁶. We found that in the absence of any genotoxic cue, a monodeamidated form of Bcl-x_L on Asn⁵² was readily observed in various types of normal and cancer cultured cells (Figures 1 and 2), and all the mouse tissues where Bcl-x_L was detectable (Figure 3).

Deamidation of Asn⁵² as a telltale of structural reorganization

The detection of Asp⁵²Bcl-x_L highlighted that Asn⁶⁶ seemed refractory to deamidation; this raised the salient point that opposite to *in silico* predictions, Asn⁵² and Asn⁶⁶ are not equally prone to deamidation in cells. One plausible hypothesis is that the region described by X-ray crystallography and NMR data (on the isolated, purified protein) as a large unstructured loop containing Asn⁵² and

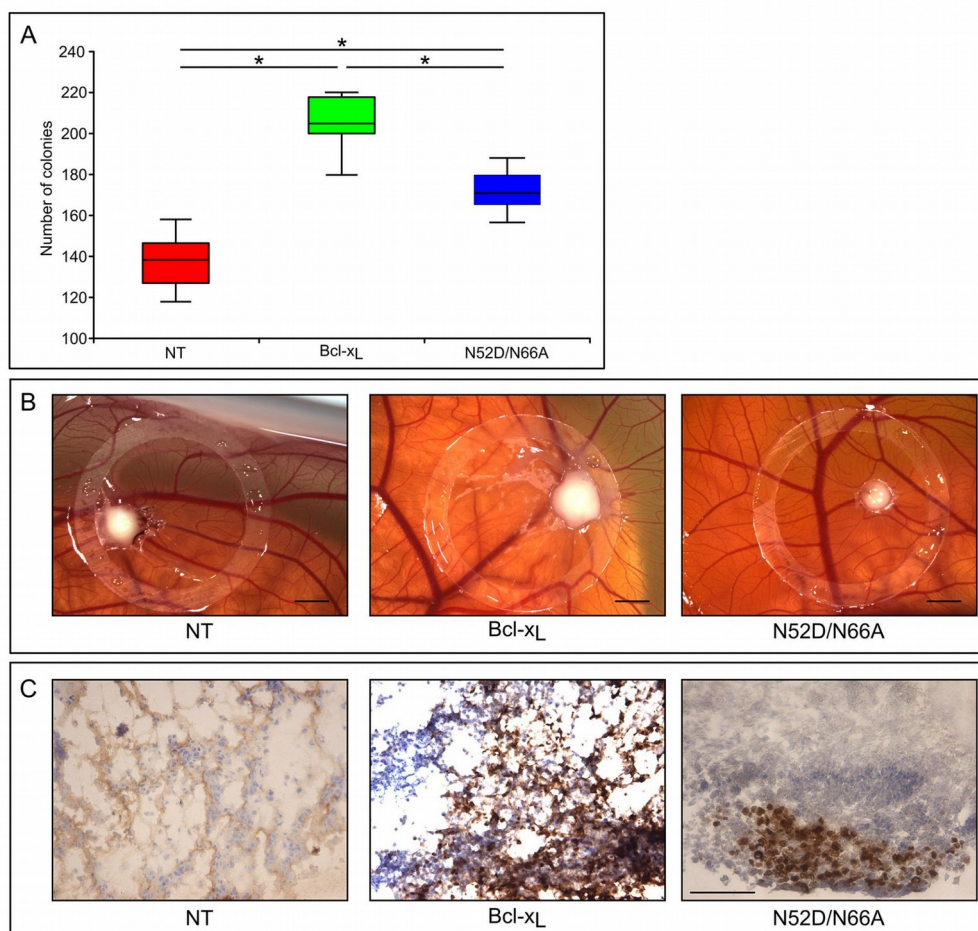


Figure 7: Clonogenic and tumorigenic potential of the singly deamidated form of Bcl-x_L (A) HCT116 cells non transduced or transduced to express the indicated proteins were plated in semi-polymerized collagen medium (500 cells per well in 6-well plates). The colonies were stained and counted 21 days later. Results are the mean of 3 independent experiments. Normality was checked with a Shapiro-Wilk's test. One way ANOVA test followed by PLSD Fisher test was used for statistical analysis (**p* values < 0,0001); error bars show the standard error. (B) Macroscopic features of the chick chorioallantoic membranes at day 3 after implantation of the indicated HCT116 cells. Scale bar = 0, 2 cm. (C) Sections of the tumors originating from the indicated HCT116 cells were labeled with antibodies directed against Ki67 proliferation marker. Scale bar is 50 μM.

Asn⁶⁶, could well adopt a defined structure in cells, due to the protein insertion into membranes, or to its interaction with a binding partner, or both. As a result, deamidation of Asn⁶⁶ could become improbable while leaving Asn⁵² unaffected. To our knowledge, this is the first time that a set of experiments portends the structuring of Bcl-x_L large loop, and could designate this region as a site of intervention for drug design to abolish its oncogenic functions.

Deamidation and Bcl-x_L half-life

The literature shows that cells resort to Bcl-x_L double deamidation to regulate both its function and cellular amount under conditions of DNA damage (Figure 9). In keeping with this observation, the fact that Asp⁶⁶Bcl-x_L was never detected could have been a consequence of an extremely rapid degradation. We refuted this hypothesis when we analyzed the half-life of the deamidation mutants (Figure 4A). These experiments revealed instead that in control-grown cells, all the deamidation mutants proved extremely stable. Further, the cellular amount of all the deamidation mutants remained unchanged when calpain was inhibited (Figure 4B). Therefore, our work nicely complements the data reported by Dho et al. and show that the regulation of Bcl-x_L observed under acute stress does not apply to control-grown cells. Deamidation (either single or double) is not a sufficient cue to trigger calpain-mediated degradation; instead the process seems to require the peculiar cellular context of DNA damage and the ensuing cytoplasmic alkalinization [27].

Drawing the inventory of monodeamidated Asp⁵²Bcl-x_L functions

We found that monodeamidated Asp⁵²Bcl-x_L opposes apoptosis with the same efficiency as native Bcl-x_L or

the double deamidated N52D/N66D Bcl-x_L, the latter observation corroborating others' works [20, 21, 25]. Indeed, both the protection against apoptosis induced by metabolic inhibitors or DNA-damaging agents and the interaction with pro-apoptotic partners like Bim and Bax were unchanged (Figure 5, Supplementary Figure S3). However Asp⁵²Bcl-x_L gains increased autophagic activity compared to native Bcl-x_L, and as a result improves the ability of cells to endure nutrient/serum starvation (Figure 6).

Consequently, although the literature on deamidation casts special emphasis on the conversion of Asn into isoAsp residues due to the structural modification entailed, our results show that deamidation into Asp residues can generate gain of function proteins. The legitimate speculation stemming from this is that cells exposed to moderate stress (thus generating singly deamidated Bcl-x_L), and containing an active repair enzyme PCMT/PIMT that converts isoAsp into Asp residues might not only be more efficiently protected against apoptosis because they restore the structure of Asp⁵²Bcl-x_L, but may also be more prone, as they produce Asp⁵²Bcl-x_L, to induce cytoprotective autophagy as a mechanism opposing the stresses accompanying cellular transformation.

Monodeamidation and anti-cancer treatments

That monodeamidated Asp⁵²Bcl-x_L was ubiquitously found and accounts for such high proportions compared to native Bcl-x_L (Figure 2) proves that it can no longer be legitimately ignored. Our finding that monodeamidation of Asn52 acted as an intra-molecular safeguard that limits Bcl-x_L oncogenic properties (Figure 7) and that it could still be phosphorylated in response to microtubule-targeting anti-neoplastic agents (Figure 8) leads us to elaborate the following rationale: in the early stages of tumorigenesis, intracellular stresses, although intense,

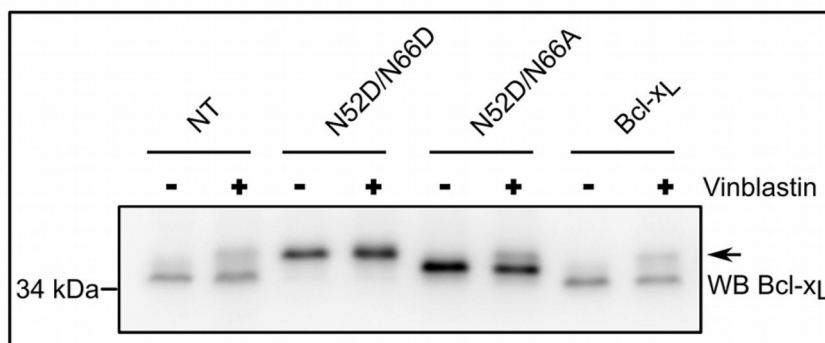


Figure 8: Monodeamidated Asp⁵²Bcl-x_L can be phosphorylated in response to anti-neoplastic agents. HCT116 cells non transduced or transduced to express the indicated proteins were treated or not with 100 nM vinblastin for 24 h, a treatment known to destabilize micro-tubules and induce Bcl-x_L phosphorylation (arrow). Total proteins were extracted and separated on SDS-PAGE. The amount of proteins loaded was adjusted (especially for NT cells) to obtain detectable signals for Bcl-x_L, after immunodetection with anti-Bcl-x antibody. Results are representative of 5 independent experiments.

do not qualify to trigger Bcl-x_L deamidation; hence the stimulation of monodeamidation in combination with microtubule-targeting anti-neoplastic agents could prove an interesting point of intervention to efficiently abrogate Bcl-x_L contribution to cellular transformation (Figure 9). Future work in this direction still awaits the avenue of chemical compounds driving the selective deamidation of Bcl-x_L, or pending that, the identification of specific binding partners and private pathways controlled by monodeamidated Bcl-x_L.

CONCLUSIONS

In light of the conservation of the deamidation-prone asparagines in Bcl-x_L throughout evolution [27], this PTM clearly stands as a multifaceted process modifying proteins structure and sequence: in concert with repair enzymes, deamidation acts as a fine tuning

system partitioning Bcl-x_L proteins in two sub-populations harboring different functions and depending on different regulation pathways (Figure 9).

Shortly after its discovery 20 years ago⁵ Bcl-x_L was identified as one powerful obstacle to successful chemotherapy [40] because it acts at multiple steps of the process of drug resistance acquisition. Our findings that (1) Bcl-x_L large loop is likely to adopt a defined structure in cells, (2) that monodeamidation acts as an internal safeguard for Bcl-x_L oncogenic properties, and (3) that Asp⁵²Bcl-x_L remains a target for anti-neoplastic agents inducing its phosphorylation, are of particular importance for therapies designed to limit the survival means cancer cells can resort to. Bcl-x_L could prove a valuable key to provide at once several points of intervention to kill malignant cells. Our work contributes to characterize such a multi-modal action, and indicates the future directions to enable the identification of new compounds targeting Bcl-x_L.

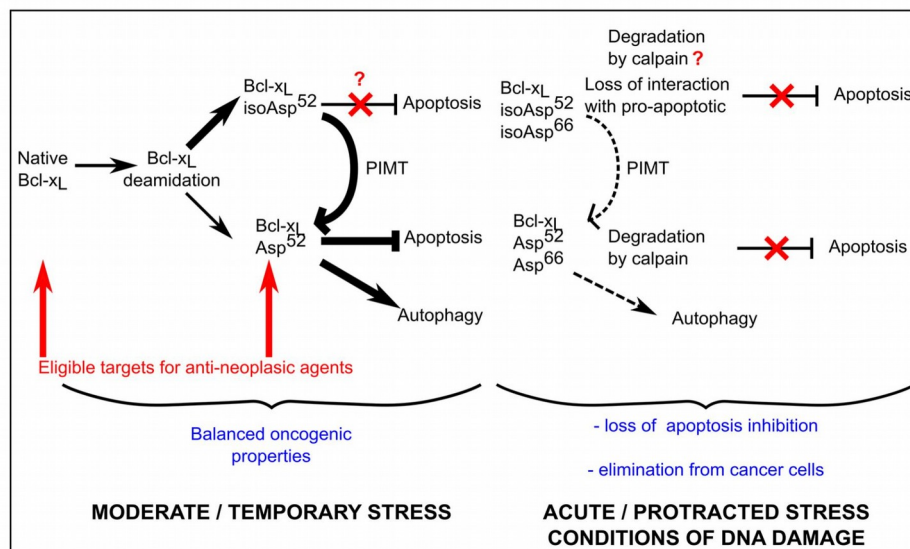


Figure 9: Proposed contribution of Bcl-x_L deamidation to cell survival/death balance. Cells grown under normal conditions (confronted to a moderate stress corresponding to steady state metabolism) produce both native and monodeamidated Bcl-x_L. The literature indicates that deamidation produces 70–85% isoAsp residues [15] which are then very efficiently converted into Asp residues by the repair enzyme PIMT/PCMT. Whether the structural alteration of isoAsp⁵²Bcl-x_L entails functional alterations is currently unknown. We described here that Asp⁵²Bcl-x_L provides efficient protection against apoptosis and stimulated autophagic activity compared to the native protein *in vitro*, while displaying restricted clonogenic and tumorigenic properties *in vivo*. As cells constantly express a mixture of native and Asp⁵² monodeamidated Bcl-x_L, it appears that they deal with a net outcome of balanced oncogenic species. When cells are exposed to protracted/acute stress, the complete deamidation of Bcl-x_L is stimulated, leading to the preponderant formation of isoAsp⁵²/isoAsp⁶⁶Bcl-x_L. Because deamidation targets many proteins, repair enzymes are overwhelmed and the restoration of active conformation of deamidated proteins is less efficient. As a result, cells deal with species of Bcl-x_L that have either lost their ability to provide protection against apoptosis (isoAsp⁵²/isoAsp⁶⁶Bcl-x_L) and/or are targeted for degradation by calpain (whether calpain targets the isoAsp or the Asp forms of doubly deamidated Bcl-x_L was not investigated [27]); as a result, cells can no longer resort to Bcl-x_L anti-apoptotic functions, and either trigger cell death or engage on the multi-step process leading to cellular transformation. Cells that are prone to undertake the later modifications are reported to suppress Bcl-x_L double deamidation in order to still resort to the oncogenic properties of the native protein.

MATERIALS AND METHODS

All cell culture material was from Invitrogen. All chemicals were from Sigma Aldrich. Vinblastin was from MP Biomedical. Staurosporine (S-9300) and Bafilomycin A1 (B-1080) were from LC Laboratories.

Cell lines and cultures

HCT116 cells were obtained from Dr Vogelstein (Baltimore, USA) and grown in Opti-MEM[®] supplemented with 5% fetal calf serum (FCS). HEK293FT cells were grown in DMEM containing 4, 5 g/L glucose supplemented 10% FCS. Growth media contained penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL). NCM460 and NCM356 cells [41] were received through a Material Transfer Agreement with INCELL Corporation, San Antonio, Texas, USA. These cells were grown in M3Base medium (INCELL) supplemented with 10% FCS.

Deamidation mutants of Bcl-x_L were generated by site-directed mutagenesis: N52A: 5'- GAGACCCC AGTGCCATCGCCGGCAACCCATCCTG-3'; N66A: 5'- CAGCCCCGCGGTGGCCGGAGCCACTGGCC-3'; N52D: 5'- CCCAGTGCCATCGATGGCAACCCATCCT G-3'; N66D: 5'- CAGCCCCGCGGTGGATGGAGCCA CTG-3'.

The template used for the mutagenesis was a plasmid containing a cDNA of Bcl-x_L resistant to short hairpin RNA (shRNA) interference owing to four silent point mutations in the region targeted by Bcl-x_L shRNA (5'- AGG AUA CAG CUG GAG UCA G -3').

Recombinant lentiviruses were engineered, produced, and titrated as previously described [34]. A multiplicity of infection of 4 was used to generate stable cell lines from HCT116 cells.

Animals

Wild type BALB/c (BALB/c WT) were purchased from Charles Rivers Laboratories and euthanized at University Bordeaux animal facilities in strict accordance with European legal and ethical rules. Organs were collected, and the powder resulting from cryogenic grinding was solubilized in RIPA buffer (100 mM Tris, 0,5% NP-40, 0,5% sodium-deoxycholate, 0,1% SDS supplemented with proteases inhibitor Mini[®] (Roche Diagnostics)).

Western blot

Total proteins were extracted in RIPA buffer, were separated on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore) and western-blots revealed with ECL (Perkin Elmer). Antibodies used are: rabbit anti-LC3 (#L7543, Sigma Aldrich), rabbit Anti-Bcl-x

(#610213, BD Transduction Laboratories), rabbit anti-Mcl-1 (S-19), goat anti-HSP60 (K-19) and mouse anti-HSP90 (sc-69703) (Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-actin (#MAB1501R, Millipore) and rabbit anti-PARP (#11835238001, Roche Diagnostics). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch. Densitometric profiles were analyzed either with ImageJ when the peaks were separate, or with QtiPlot software when the peaks were overlapping.

λ-Phosphatase treatment

Total proteins were extracted in the presence of phosphatase inhibitors (10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM phenylmethanesulfonylfluoride). The extracts were then diluted 10 times in the dephosphorylation buffer. Dephosphorylation used 200 units of λ-phosphatase (#P0753S, Biolabs) for 2 h at 37°C. The reaction was stopped by 4% SDS, 125 mM Tris pH = 6.8, 20% glycerol, 0.002% (w/v) bromophenol blue.

In vitro deamidation reaction

Total protein extracts were incubated with 25 mM glycine-NaOH, pH = 10 for 24 h at 37°C.

Fluorescence-activated cell-sorting analysis

Apoptosis was induced by 100 µM 5-FU and 50 µM etoposide for 24 and 32 h. Cells were labeled with propidium iodide (PI) and/or Alexa Fluor[®] 488 Annexin V according to the manufacturer's instructions (Dead Cell Apoptosis Kit, Invitrogen). Proper compensation values were applied prior to quantification. For survival under autophagic conditions, cells were transferred into HBSS for 8 h and 16 h, harvested and labeled with PI. Quantifications were made using Accuri flow cytometer and the C-flow software.

PARP detection

Cells were treated for 8 h with 50 µM staurosporine. Immunodetection of intact and cleaved PARP was performed after protein extracts were separated on 10% SDS-PAGE.

Autophagic proteolysis assay

The degradation of radioactive L-[¹⁴C]valine-labeled proteins was measured as previously described [34]. Briefly, cells were incubated for 24 hours in complete medium with 0.1 µCi L-[¹⁴C]valine to label total proteins. Radioactivity was further pre-chased for 1 hour in complete medium in the presence of an excess of L-valine (10 mM) to remove the contribution of short-lived protein degradation. Finally, cells were incubated for 6 hours either

in complete medium or in Hank's Buffered Salts Solution (HBSS) (autophagy was induced by amino acids and serum starvation in Hank's Buffered Salts Solution buffered with 2.2 g/L NaHCO₃) in the presence or in the absence of the lysosomal inhibitor Bafilomycin-A1 and with an excess of L-valine. Supernatants were collected and free amino acids precipitated with 80% trichloroacetic acid (TCA), while proteins in adherent cells were precipitated with 10% TCA. Radioactivity was quantified in a scintillation liquid analyser Tri-carb 2100TR (Packard). Proteolysis is expressed as the percentage of free radio-activity released in the supernatant relative to the total radioactivity.

Autophagic flux assay

HEK293FT cells were transfected with a calcium phosphate method. 48 h later, they were incubated under control conditions or washed and transferred for 60 minutes into starvation medium (HBSS) or starvation medium supplemented with the lysosomal ATPase inhibitor Bafilomycin A1 (0.1 μM) and the cysteine protease inhibitor E64d (10 μg/mL) which inhibits cathepsins B, H and L. Total proteins were immediately extracted and separated by SDS-PAGE.

Protein half-life determination

Sub-confluent cells were treated with CHX (25 μg/mL) for 0–24 h to inhibit cytosolic protein synthesis. Cell lysates were then separated on 12% SDS-PAGE.

Anchorage-independent growth assay

HCT116 cells were resuspended in OptiMEM medium and mixed with collagene type I extracted from 10-week old rat tails; 500 cells were plated in triplicate in 6-well plates, and fresh OptiMEM was layered over the semi-polymerized medium. The medium was refreshed every 3 days, and 21 days after plating, colonies were fixed with paraformaldehyde, stained with crystal violet and counted. Normality was assayed with a Shapiro test, and statistical difference was assayed by a Fisher test.

In vivo tumorigenic assays in chick chorioallantoic membranes

Embryonated eggs were purchased from a local hatchery (HAAS, Kaltenhouse) and incubated 2, 5 days in a 65% humidified chamber at 38°C, before opening. The incubation of chick chorioallantoic membranes was prolonged for 1 more week. At day 9, three million cells were deposited after gentle scratching of the CAM surface, into a 1 cm Ø Teflon ring. Three days after inoculation, tumor were excised, imaged under a MZFL3 stereomicroscope (Leica), and submitted to immunohistochemistry analyses.

Histological analyses

Tumors were immediately frozen and embedded in OCT compound. They were left at –80°C until sectioning. 7 μm-thick tumor sections were cut with a cryo-microtome (Leica CM 3050). Samples were fixed in 4% paraformaldehyde, and saturated in 1% BSA before incubation with Ki67 antibody (M7240, clone MIB-1, Dako). Detection was performed with the EnVision System-HRP-DAB (K4010) from Dako, according to the manufacturer's instructions. Finally, sections were counter-stained with hematoxylin (Merck) before mounting on slides with the Coverquick mounting medium (Labonord). The observation was done under the Leica DM-RX microscope.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Dr Patrick Paumard for helpful discussions about QtiPlot analysis. We are particularly thankful to Drs Franck Couillaud and Karine Pinel respectively for providing the mice used in this study and for technical assistance during animal dissection. The electron microscopy was done in the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France Bioimaging.

Abbreviation

PTM: post-translational modifications; CHX: cycloheximide; CAM: chicken chorioallantoic membrane.

GRANT SUPPORT

This work was supported by the CNRS, Université de Bordeaux, the Conseil Régional d'Aquitaine (to UMR 5095). M.P. is supported by Ligue Régionale Contre le Cancer. F.B. received a PhD grant from the Ministère de la Recherche.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Krajewska M, Moss SF, Krajewski S, Song K, Holt PR, Reed JC. Elevated Expression of Bcl-X and Reduced Bak in Primary Colorectal Adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1996; 56:2422–7.
2. Olopade OI, Adeyanju MO, Safa AR, Hagos F, Mick R, Thompson CB, et al. Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *Cancer J Sci Am.* 1997; 3:230–7.

3. Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, Shabaik A, Sauvageot J, Song K, et al. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am. J. Pathol.* 1996; 148:1567–76.
4. Tu Y, Renner S, Xu F, Fleishman A, Taylor J, Weisz J, et al. BCL-X Expression in Multiple Myeloma: Possible Indicator of Chemoresistance. *Cancer Res.* 1998; 58:256–62.
5. Boise LH, González-García M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, et al. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell.* 1993; 74:597–608.
6. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell.* 1993; 75:229–40.
7. Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Nakayama K, et al. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science.* 1995; 267:1506–10.
8. Fiebig AA, Zhu W, Hollerbach C, Leber B, Andrews DW. Bcl-XL is qualitatively different from and ten times more effective than Bcl-2 when expressed in a breast cancer cell line. *BMC Cancer.* 2006; 6:213.
9. Haldar S, Chintapalli J, Croce CM. Taxol Induces bcl-2 Phosphorylation and Death of Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* 1996; 56:1253–5.
10. Poruchynsky MS, Wang EE, Rudin CM, Blagosklonny MV, Fojo T. Bcl-xL Is Phosphorylated in Malignant Cells following Microtubule Disruption. *Cancer Res.* 1998; 58:3331–8.
11. Robinson NE, Robinson AB. Molecular clocks: deamidation of asparaginy and glutaminyl residues in peptides and proteins. Althouse Press. 2004.
12. Johnson BA, Shirokawa JM, Hancock WS, Spellman MW, Basa LJ, Aswad DW. Formation of isoaspartate at two distinct sites during *in vitro* aging of human growth hormone. *J. Biol. Chem.* 1989; 264:14262–71.
13. Johnson BA, Langmack EL, Aswad DW. Partial repair of deamidation-damaged calmodulin by protein carboxyl methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 1987; 262:12283–7.
14. Paranandi MV, Guzzetta AW, Hancock WS, Aswad DW. Deamidation and isoaspartate formation during *in vitro* aging of recombinant tissue plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:243–53.
15. Najbauer J, Orpizewski J, Aswad DW. Molecular aging of tubulin: accumulation of isoaspartyl sites *in vitro* and *in vivo*. *Biochemistry.* 1996; 35:5183–90.
16. Reissner KJ, Paranandi MV, Luc TM, Doyle HA, Mamula MJ, Lowenson JD, et al. Synapsin I is a major endogenous substrate for protein L-isoaspartyl methyltransferase in mammalian brain. *J. Biol. Chem.* 2006; 281:8389–98.
17. Shimizu T, Matsuoka Y, Shirasawa T. Biological significance of isoaspartate and its repair system. *Biol. Pharm. Bull.* 2005; 28:1590–6.
18. Young AL, Carter WG, Doyle HA, Mamula MJ, Aswad DW. Structural integrity of histone H2B *in vivo* requires the activity of protein L-isoaspartate O-methyltransferase, a putative protein repair enzyme. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:37161–5.
19. Jedrzejewski PT, Girod A, Tholey A, König N, Thullner S, Kinzel V, et al. A conserved deamidation site at Asn 2 in the catalytic subunit of mammalian cAMP-dependent protein kinase detected by capillary LC-MS and tandem mass spectrometry. *Protein Sci.* 1998; 7:457–69.
20. Zhao R, Oxley D, Smith TS, Follows GA, Green AR, Alexander DR. DNA Damage-Induced Bcl-xL Deamidation Is Mediated by NHE-1 Antiport Regulated Intracellular pH. *PLoS Biology.* 2007; 5: e1.
21. Deverman BE, Cook BL, Manson SR, Niederhoff RA, Langer EM, Rosová I, et al. Bcl-xL Deamidation Is a Critical Switch in the Regulation of the Response to DNA Damage. *Cell.* 2002; 111:51–62.
22. Takehara T, Takahashi H. Suppression of Bcl-xL Deamidation in Human Hepatocellular Carcinomas. *Cancer Res.* 2003; 63:3054–7.
23. Zhao R, Follows GA, Beer PA, Scott LM, Huntly BJP, Green AR, et al. Inhibition of the Bcl-xL Deamidation Pathway in Myeloproliferative Disorders. *New England Journal of Medicine.* 2008; 359:2778–89.
24. Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, et al. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature.* 1996; 381:335–41.
25. Deverman BE, Cook BL, Manson SR, Niederhoff RA, Langer EM, Rosová I, et al. Bcl-xL Deamidation Is a Critical Switch in the Regulation of the Response to DNA Damage. *Cell.* 2003; 115:503.
26. Aritomi M, Kunishima N, Inohara N, Ishibashi Y, Ohta S, Morikawa K. Crystal Structure of Rat Bcl-xL IMPLICATIONS FOR THE FUNCTION OF THE Bcl-2 PROTEIN FAMILY. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:27886–92.
27. Dho SH, Deverman BE, Lapid C, Manson SR, Gan L, Riehm JJ, et al. Control of Cellular Bcl-xL Levels by Deamidation-Regulated Degradation. *PLoS Biol.* 2013; 11: e1001588.
28. Kim E, Lowenson JD, MacLaren DC, Clarke S, Young SG. Deficiency of a protein-repair enzyme results in the accumulation of altered proteins, retardation of growth, and fatal seizures in mice. *PNAS.* 1997; 94:6132–7.
29. Huebscher KJ, Lee J, Rovelli G, Ludin B, Matus A, Stauffer D, et al. Protein isoaspartyl methyltransferase protects from Bax-induced apoptosis. *Gene.* 1999; 240:333–41.
30. Cimmino A, Capasso R, Muller F, Sambri I, Masella L, Raimo M, et al. Protein Isoaspartate Methyltransferase Prevents Apoptosis Induced by Oxidative Stress in Endothelial Cells: Role of Bcl-XI Deamidation and Methylation. Abraham E, éditeur. *PLoS ONE.* 2008; 3: e3258.

31. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, et al. Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy. *Cell*. 2005; 122:927–39.
32. Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain J-C, Gautier F, Juin P, et al. Functional and physical interaction between bcl-xl and a bh3-like domain in beclin-1. *EMBO J*. 2007; 26:2527–39.
33. White E, DiPaola RS. The Double-edged Sword of Autophagy Modulation in Cancer. *Clin Cancer Res*. 2009; 15:5308–16.
34. Priault M, Hue E, Marhuenda F, Pilet P, Oliver L, Vallette FM. Differential Dependence on Beclin 1 for the Regulation of Pro-Survival Autophagy by Bcl-2 and Bcl-xL in HCT116 Colorectal Cancer Cells. *PLoS ONE*. 2010; 5: e8755.
35. Oliver L, Hue E, Priault M, Vallette FM. Basal autophagy decreased during the differentiation of human adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2012; 21:2779–88.
36. Asakura T. The association of deamidation of Bcl-xL and translocation of Bax to the mitochondria through activation of JNK in the induction of apoptosis by treatment with GSH-conjugated DXR. *international Journal of Oncology [Internet]*. 1992 [cité 12 nov 2012]; Disponible sur: <http://www.spandidos-publications.com/ijo/33/2/389>
37. Flatmark T, Sletten K. Multiple Forms of Cytochrome c in the Rat Precursor-product relationship between the main component Cy I and the minor components Cy II and Cy III *in vivo*. *J. Biol. Chem*. 1968; 243:1623–9.
38. McKerrow JH, Robinson AB. Primary sequence dependence of the deamidation of rabbit muscle aldolase. *Science*. 1974; 183:85.
39. Figueroa Jr B, Sauerwald TM, Oyler GA, Hardwick JM, Betenbaugh MJ. A comparison of the properties of a Bcl-xL variant to the wild-type anti-apoptosis inhibitor in mammalian cell cultures. *Metabolic Engineering*. 2003; 5:230–45.
40. Minn AJ, Rudin CM, Boise LH, Thompson CB. Expression of bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood*. 1995; 86:1903–10.
41. Moyer MP, Manzano LA, Merriman RL, Stauffer JS, Tanzer LR. NCM460, a normal human colon mucosal epithelial cell line. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim*. 1996; 32:315–7.
42. Eskelinen E-L. Fine structure of the autophagosome. *Methods Mol. Biol*. 2008; 445:11–28.



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Molecular Cell Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamcr

Review

Bcl-x_L deamidation and cancer: Charting the fame trajectories of legitimate child and hidden siblings



Florian Beaumatin^{a,b,1}, Mohamad El Dhaybi^{a,b,c,1}, Claude Bobo^{a,b}, Mireille Verdier^c,
Muriel Priault^{a,b,*}

^a CNRS, Institut de Biochimie et de Génétique Cellulaires, UMR5095, 1 Rue Camille Saint-Saëns, 33077 Bordeaux, France

^b Université de Bordeaux, Institut de Biochimie et de Génétique Cellulaires, UMR5095, 1 Rue Camille Saint-Saëns, 33077 Bordeaux, France

^c EA 3842, Homéostasie Cellulaire et Pathologies, Université de Limoges, 2, rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges Cedex, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Bcl-x_L
Post-translational modification
Deamidation
Apoptosis
Autophagy
Aging

ABSTRACT

Bcl-2 family proteins control programmed cell death through a complex network of interactions within and outside of this family, that are modulated by post-translational modifications (PTM). Bcl-x_L, an anti-apoptotic member of this family, is overexpressed in a number of cancers, plays an important role in tumorigenesis and is correlated with drug resistance. Bcl-x_L is susceptible to a number of different PTMs. Here, we focus on deamidation. We will first provide an overview of protein deamidation. We will then review how the apoptotic and autophagic functions of Bcl-x_L are modified by this PTM, and how this impacts on its oncogenic properties. Possible therapeutic outcomes will also be discussed. Finally, we will highlight how the specific case of Bcl-x_L deamidation provides groundings to revisit some concepts related to protein deamidation in general.

1. Introduction

Post-translational modification (PTM) is a major mechanism cells make use of to modulate the structure, activity, localization and lifespan of proteins. PTMs allow to control and modulate, on the cellular level, a variety of functions (e.g. proliferation, protein synthesis, glucose metabolism, angiogenesis and apoptosis...). Addition of new functional groups (e.g. phosphorylation, acetylation, nitrosylation, glycosylation...), hydrophobic groups (e.g. prenylation, palmitoylation...) or peptides (e.g. ubiquitination, SUMOylation...) are certainly the most commonly studied. However, deamidation affects a remarkably large percentage of proteins across species (a list of experimentally observed deamidation in biological peptides and proteins can be found in [1,2], and the deamidation rates of the entire Brookhaven 3D protein database have been scored in [3]). Deamidation degrades asparaginyl and glutaminyl residues within proteins by removing the amino group of their side chain, to produce aspartyl and glutamyl residues respectively. To provide a comparison between phosphorylation and deamidation, assuming ~10,000 different proteins in a typical eukaryotic cell, with an average length of 400 residues, the occurrence given by the *Biological Magnetic Resonance Data Bank* of Ser (6.8%) Thr (5.9%) and Tyr (3.2%) allows one to calculate ~640,000 potential sites of phosphorylation [4]; the same calculation for Asn (4.3%) and Gln (4.2%)

predicts ~400,000 deamidation sites.

1.1. Chemistry of deamidation

Fig. 1A shows the deamidation reaction of asparaginyl residues, which generates a succinimide ring intermediate, the hydrolysis of which produces a mixture of aspartyl and isoaspartyl residues in a 1:3 ratio. Aspartyl residues can subsequently undergo isomerisation, leading again to the same succinimide intermediate producing the same mixture of Asp and IsoAsp products; this explains the ultimate preponderance of isoaspartyl residues [5]. Isoaspartyl residues are potent structural modifiers because the main chain of the protein has been rerouted to incorporate the C_β of the Asp side chain, thus increasing the length of the protein backbone by one carbon atom (Fig. 1A). Experiments carried out in mice showed that immunization with the isoaspartyl form of a peptide from murine cytochrome c resulted in strong B and T cell autoimmune responses, indicating that the structural modification due to isoAsp is potent enough to brake the tolerance of the immune system for self-proteins and trigger autoimmune responses [6]. However, ubiquitous repair enzymes, which are called Protein Carboxyl Methyl Transferases or Protein Isoaspartate Methyl Transferases (PCMT/PIMT), exist and regenerate normal L-aspartyl from L-isoaspartyl residues (Fig. 1B). These enzymes eliminate the isopeptide

* Corresponding author at: CNRS, Institut de Biochimie et de Génétique Cellulaires, UMR5095, 1 Rue Camille Saint-Saëns, 33077 Bordeaux, France.

E-mail address: muriel.priault@ibgc.cnrs.fr (M. Priault).

¹ Equal contribution.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamer.2017.06.012>

Received 8 December 2016; Received in revised form 14 June 2017; Accepted 18 June 2017

Available online 21 June 2017

0167-4889/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

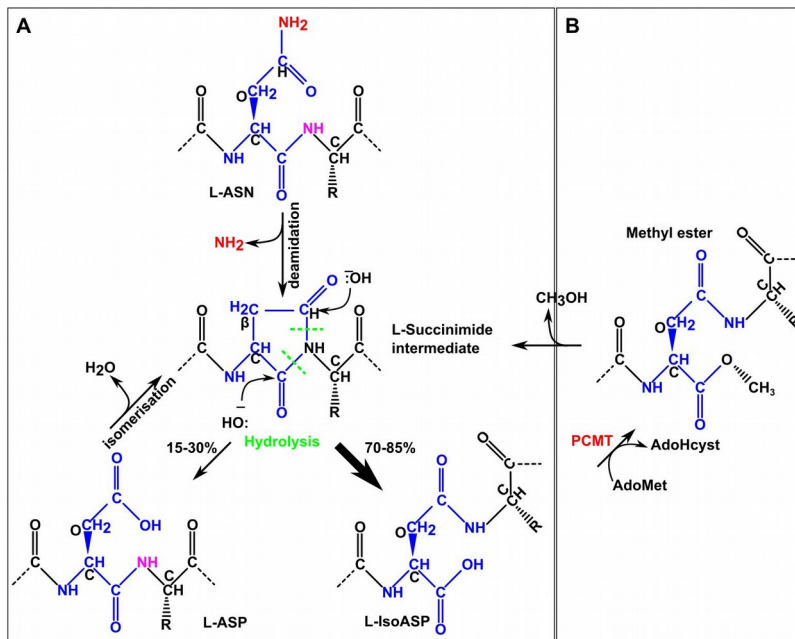


Fig. 1. Mechanism of deamidation of asparaginyl residues in peptides. A - When the flexibility of the polypeptide chain in the vicinity of the asparaginyl residue allows, the peptide bond nitrogen atom of the following residue (in magenta) can rotate to attack the side chain carbonyl (C_7) in a nucleophilic attack. A succinimide ring intermediate can form, which is unstable and can decompose in two ways (dashed green lines) upon hydrolysis to form a mixture of aspartyl and isoaspartyl residues (L-isoAsp is the main byproduct). The succinimide is also prone to racemisation, generating the D-succinimidyl, D-aspartyl and D-isoaspartyl residues. B - PCMT catalyzes the transfer of the methyl group of S-adenosyl-L-methionine onto the alpha-carboxyl group of an L-isoAsp residue, which initiates the conversion of this residue to an L-aspartyl residue.

bond and mitigate the impact of the structural remodeling caused by isoAsp. Knockout mice for PCMT/PIMT die at a younger age and accumulate 4–8 times more isomerized proteins than wild-type mice [7], suggesting that the restoration of isoAsp into Asp residues helps increase the useful lifetime of deamidated proteins.

In fine, Asn deamidation into Asp and isoAsp results in an irreversible edition of the information that was initially genetically encoded and translated into proteins at the time of their synthesis: it alters the primary structure of the protein, introduces a negative charge, and may modify the secondary and tertiary structures of proteins.

1.2. Rates of deamidation

Deamidation is a peculiar PTM in that it can either occur spontaneously *in vitro* and *in cellulo*, as a result of a chemical reaction, or be catalyzed by deamidases. Enzymatically catalyzed deamidation in infected eukaryotic cells has been documented in studies investigating innate immune signaling triggered by certain viruses or bacteria. Deamidation of host proteins, in these cases, is catalyzed by microbial enzymes. However, such enzymes or pseudo-enzymes have yet to be identified in higher eukaryotes, and deamidation in metazoans is still considered a spontaneous, non-catalyzed chemical reaction.

1.2.1. Virus deamidases

Recent studies from the Fen lab reviewed elsewhere [8,9] have identified founding members of the protein deamidase family used by gamma herpes viruses (γ HV) [10] and alpha herpes viruses (α HV) [11] to deflect cellular surveillance and facilitate their infection. γ HV (human KSHV and murine γ HV68) and α HV (HSV-1) have evolved different deamidation-based mechanisms to target RIG-I, a cellular RNA sensor that triggers antiviral cytokine production when it detects double-stranded RNA in the cytoplasm.

γ HV deploy a pseudoenzyme called vGAT (Glutamine Amido Transferase) that lacks intrinsic enzymatic activity, but recruits a cellular homolog called PFAS (phosphoribosylformylglycinamide synthetase) to form a complex which is able to bind and deamidate two Asn

residues and one Gln residue of RIG-1 [10]. Deamidation, in this case, results in a constitutive but “harnessed” activation of RIG-I which blunts the antiviral signaling pathway. It is still unclear whether PFAS can deamidate cellular proteins in the absence of gamma-herpes vGAT protein, since RIG-1 deamidation is not observed in cells infected with a deficient counterpart of the virus [8].

α HV, on the other hand, deploy a proper viral protein deamidase called UL37, that has no sequence homology with vGAT. UL37 originates from the viral matrix (or tegument) and deamidates *in vitro* and in cells two Asn residues of RIG-I that reside in a domain specialized in duplex RNA recognition [11]. UL37-catalyzed deamidation blunts the ability of RIG-I to sense viral dsRNA. Notably, in contrast to vGAT, UL37 deamidase activity toward RIG-I occurs exclusively on Asn residues, and results in RIG-I inhibition.

Hence two herpesviruses use different tegument proteins with opposite deamidation-based strategies to suppress RIG-I-mediated antiviral cytokine production.

1.2.2. Bacterial deamidases

Pathogenic bacteria like certain strains of *Escherichia coli* [12,13], the closely related *Shigella flexneri* [14] or *Bordetella bronchiseptica* [13] were shown to produce virulence factors with intrinsic deamidase activity toward Gln residues of host signaling molecules. In all cases, deamidation was instrumental in subversion of immune responses by the bacteria.

In the case of *E. coli* two toxins called Cytotoxic Necrotizing Factors CNF1 and CNF2 share the same catalytic activity but have distinct substrate specificity toward three host Rho GTPases: RhoA, Rac1 and Cdc42 [12,13,15,16]. Deamidation invariably leads to the constitutive activation of these Rho GTPases which regulate the cell cytoskeleton architecture and dynamics. The consequences are not only to affect host cell motility but also to confer higher invasive properties to bacteria [17,18].

In the case of *Shigella flexneri*, the virulence factor OspI deamidates Gln100 of UBC13 in infected cells, and thereby impairs the E2 ubiquitin-conjugating activity required for TRAF6 activation.

Consequently, TNF- α mediated acute inflammatory response is blunted during bacterial invasion [14].

Information about catalyzed deamidation rates could be culled from the literature: Flatau and colleagues report that CNF1-catalyzed Rho deamidation *in vitro* is relatively slow, with only 60% of Gln63 being converted after 1 h [13]. Sanada and colleagues report that OspI-mediated deamidation of UBC13 occurs 10 min after infection by *Shigella flexneri* [14]. Finally, Schmidt and colleagues measured a rate constant of $0.32 \pm 0.07/\text{min}$ for CNF1 mediated deamidation of RhoA [19]. Structural studies have determined that CNF1 shares a catalytic dyad of cysteine and histidine residues with eukaryotic transglutaminases and cysteine proteases [19] while a putative catalytic triad of cysteine, histidine and aspartate was identified in OspI [14].

These examples of the use of deamidation by microbes highlight that this PTM functions as an active process used to regulate signal transduction in fundamental biological processes such as innate immune response.

1.2.3. Deamidation in eukaryotes

In higher eukaryotes, enzymatic deamidation of free glutamine and of glutamyl residues in proteins exists. Free glutamine deamidation is catalyzed by glutaminase, an enzyme responsible for the production of glutamate as the main source for the neurotransmitter GABA in the brain [20]. Deamidation of glutamyl residues in proteins is possible and can, in principle, be catalyzed by transglutaminases when primary amines are not available and water reacts as acyl acceptor, which is a rare situation [21].

When it comes to asparaginyl residues, the field still awaits the discovery of naturally existing enzymes that deamidate Asn within peptides or proteins in eukaryotes.

Demonstrating that something does not exist is virtually impossible. This is why, pending the discovery and characterization of functional protein deamidases in eukaryotes, deamidation is still considered nowadays to essentially proceed from a spontaneous chemical reaction, at much slower rates than those enzymatically catalyzed reactions in cells infected by pathogens.

The Robinson lab has released a substantial body of data on the spontaneous chemical deamidation of Asn and Gln in proteins from higher eukaryotes. Their work helped to determine that deamidation rates of Asn and Gln residues depend on the primary sequence of a given peptide or protein, its three-dimensional structure, and also on the pH, temperature, ionic strength, and buffer ions of the solution used. Half-times of spontaneous deamidation at neutral pH and 37 °C are in the range of < 1–500 days for Asn, and > 100–500 days for Gln [22]. However, calculated or measured half-times of deamidation must be considered in relation to the biological half-life of proteins within cells and tissues. Deamidation is a slow process accompanying cellular and molecular aging, but it can be noticeably accelerated by chemical stresses applied *in cellulo* and *in vitro*.

In the end, cells can resort to a wide array of PTMs to modify and control protein functions. Some PTMs, like phosphorylation for example, are best suited to respond to highly dynamic commands because they occur in a matter of seconds, and they can be finely tuned by the reverse reaction catalyzed by phosphatases. Deamidation on the other hand is a much slower process (even when it is catalyzed), and the reaction is irreversible. The only mechanism cells can resort to, to mitigate its action on protein structure/function, is the neosynthesis of native proteins. In this respect, deamidation really stand apart from other PTMs, and can be looked at as a very different way of modifying proteins with time.

1.3. Biological functions of protein deamidation: the concept of molecular clock and beyond

Initially, the concept of molecular clock was put forward in 1962 by Linus Pauling and Emile Zuckerkandl, to report on the rate of

evolutionary change that genetic mutations account for, and how it can be used to estimate the time of divergence of life forms throughout evolution. In the 70's, the concept was transposed to deamidation, on the premise that evolution might have distributed Asn and Gln in proteins to modify their structure and function with time. Once again, with respect to the half-time of protein deamidation and the lifespan of proteins in cells/tissues, essentially Asn deamidation status changes with time in proteins, meaning that Asn are unstable residues under physiological conditions. Deamidation has been conjectured to be a prominent factor limiting the useful lifetime of proteins because of the following observations: (1) deamidation sometimes leads to protein degradation [18,23]; (2) deamidated proteins build up with age not only because the chemical reaction takes time, but also because (3) the PCMT/PIMT repair system decreases with age [24,25] and IsoAsp accumulation modifies the structure of proteins. It is conceivable that such structural modifications are more likely to hamper former functions than to unveil new ones, simply because age is associated with the decay of cellular functions. If a molecular clock does tell time, then deamidation could be used as a tool to calculate the decay of protein activity/function in cells and tissues. Accordingly, to name but a few examples, calmodulin deamidation was shown to impair its ability to activate a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase from rat brain: the IsoAsp and Asp deamidated forms only retained 10% and 40% respectively of the activity of native calmodulin [26]. Deamidation was also shown to cause a 50% decrease in the enzyme activity of muscle aldolase in old mice compared to young mice [27,28]. Lastly, deamidation of human triosephosphate isomerase was shown to significantly affect substrate binding and catalytic activity of the enzyme [29].

Milestones that completely overhauled the vision of deamidation as an unregulated, spontaneous process that only disrupts the function of proteins with time, through the nonspecific alteration of their structure, were the original works by the Weintraub and the Alexander labs. Indeed, they unraveled that deamidation could be triggered in living cells as an integrated response to DNA damage. By altering the survival function of an oncogene, namely Bcl-x_L, deamidation became a *bona fide* part of the arsenal of mechanisms cells can deploy to regulate apoptosis execution.

1.4. The specific case of Bcl-x_L

Bcl-x_L is an oncogene that was characterized in 1993 as a member of the Bcl-2 family (for B-cell lymphoma 2) [30]. This family of proteins regulates apoptosis and more precisely the implementation of the mitochondrial step, which culminates in the permeabilization of the organelle's outer membrane and the release of apoptogenic factors into the cytosol [31]. From the functional point of view, this family is divided into pro- and anti-apoptotic proteins. The latter neutralize the former through interfaces that have been relatively well characterized, and breaking of this interaction to allow cells to reacquire the ability to execute apoptosis has been a therapeutic target in several diseases including cancer [32]. From the structural perspective, Bcl-2 family proteins are small globular proteins essentially composed of alpha helices, which share sequence homology that define the "BH domains" (for Bcl-2 Homology domains) engaged in interactions within the family (Fig. 2A). Anti-apoptotic members like Bcl-2 and Bcl-x_L partition between the cytoplasm and the nuclear-ER-mitochondria membrane continuum, owing to a remodeling that exposes the C-terminal hydrophobic helix [33]. Within this family, Bcl-2 and Bcl-x_L display the remarkable feature of a flexible and natively disordered loop (aa 35–89 in human Bcl-2 and aa 21–85 in human Bcl-x_L) that bridges helices $\alpha 1$ – $\alpha 2$, which respectively define the BH4 and BH3 domains [34,35] (Fig. 2B). This loop is a hotspot for PTMs, but Bcl-x_L harbors some unique features. Table 1 recapitulates the sites of known PTMs (phosphorylation, caspase cleavage, ubiquitylation, as well as deamidation). Of note, the sequence of the disordered loop in Bcl-2 does not contain any Asn residue, making deamidation an exclusive characteristic of Bcl-x_L.

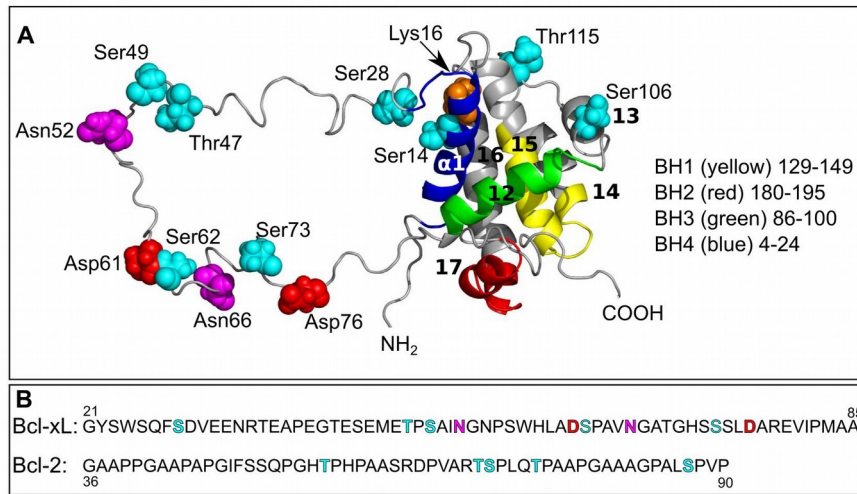


Fig. 2. A - Ribbons representation of human Bcl-x_L structure (PDB 1LXL). Residues modified in the human sequence, or modified in other species but conserved in the human sequence are shown (Cf Table 1 for details). Residues eligible for phosphorylation (cyan), deamidation (magenta), cleavage (red) and ubiquitylation (orange); BH motifs are colored: BH1 = yellow (residues 129–149), BH2 = red (residues 180–195), BH3 = green (residues 86–100), BH4 = blue (residues 4–24). The molecular visualization system PyMOL was used. B - Sequences of the disordered loop in Bcl-x_L (UniProtKB/Swiss-Prot Q07817) and Bcl-2 (UniProtKB/Swiss-Prot P10415).

(Fig. 2B).

All the PTMs targeting this loop are reported to weaken Bcl-x_L binding to pro-apoptotic Bcl-2 proteins, and consequently affect its anti-apoptotic function (Table 1): this fact is all the more intriguing that the loop does not define the BH3-binding site of the protein, and that its deletion rather increases Bcl-x_L anti-apoptotic function [36]. How could PTM of this region alter Bcl-x_L anti-apoptotic functions? (1) Could modified Bcl-x_L undergo a dramatic subcellular relocation?

However, neither deamidation (our unpublished data) nor phosphorylation [37] alter Bcl-x_L cellular distribution. (2) Modified Bcl-x_L could perhaps undergo massive structural remodeling? This is unlikely because, although procedures for protein purification and structural analysis are known to increase the rate of protein deamidation, structural comparisons between Bcl-2 (which does not undergo deamidation) and Bcl-x_L show remarkable similarities [34,38], indicating that deamidation does not induce a massive conformational change in Bcl-

Table 1
Post-translational modifications of Bcl-x_L.

Type of PTM	Residue	Reference
Phosphorylation	Ser14 (mouse)	[63, 64]
	Ser28	[65]*
	Thr47 (human)	[66–68]
	Ser49 (human)	[69, 70]
	Ser62 (human, mouse, rat)	[63, 67–79]
	Ser73 (mouse)	[80]
	Ser106 (rat)	[76]
	Thr115 (human)	[66, 68]
	Ser228 (rat)	[76]
Ubiquitylation	Lys16 (human)	[81–84]*
	Lys87	[81–84]*
Cleavage	Asp61	[85]
	Asp76	[85–88]
Deamidation	Asn52	[38, 39, 41]
	Asn66	[38, 39, 41]

Legend: * modification site was assigned using only proteomic discovery-mode mass spectrometry Color code: grey background: PTM in the “unstructured loop” (aa 21–85 in human Bcl xL). PTM include phosphorylation [63–80], ubiquitylation [81–84], cleavage [85–88] and deamidation [38,39,41].

x_L . (3) Could modified Bcl- x_L exhibit altered life-span? Deamidation has indeed been proposed to be instrumental in the control of the cellular amount of Bcl- x_L [23], even though, as discussed later, this seems to be dependent on the experimental paradigm. (4) Another explanation to account for the decreased anti-apoptotic function is that the PTMs reveal new binding partners, for which Bcl- x_L exhibits a greater affinity as compared to BH3-containing proteins. Interaction with these partners would divert Bcl- x_L from binding Bcl-2 pro-apoptotic proteins.

The rate of Asn deamidation is predicted to be higher when the residue is located in a poorly structured environment, and when the $n + 1$ residue is small (e.g. a glycine). In human Bcl- x_L , out of 11 Asn residues, 4 are located in the unstructured loop (Asn33, Asn52, Asn54 and Asn66), and 3 are followed by a glycine residue (Asn52, 66 and 185) but only Asn52 and Asn66 are predicted to exhibit the highest susceptibility to deamidation. Although Asn deamidation confers a mass increase of 1 Da, and an additional negative charge, it is noteworthy that Bcl- x_L deamidation states can be resolved and discriminated by SDS-PAGE thanks to differences in the electrophoretic mobility of the different species [39,40]. Evolution has maintained these deamidation sites remarkably conserved throughout species [23,39], which could be an indication of a conserved function as a result of a selection pressure.

Various PTMs of Bcl- x_L have been characterized since its discovery, and deamidation is the most recent. A whole body of literature has been devoted to characterizing how Bcl- x_L deamidation modifies its functions. The present paper is intended to highlight how deamidation is connected to cancer through the specific case of Bcl- x_L . We will review how deamidation modifies Bcl- x_L functions in apoptosis and autophagy; we will examine the state-of-the-art of signaling pathways known to regulate Bcl- x_L deamidation, and how they might open new therapeutic avenues. Finally, we will discuss how data about Bcl- x_L deamidation overhauled some concepts related to protein deamidation in general, and how it has widened the current knowledge on Bcl- x_L oncogenic properties. We will conclude with the questions that are still unanswered and deserve to be further investigated.

2. State of the art on BCL- X_L deamidation

2.1. Bcl- x_L undergoes deamidation *in vitro*

The first report mentioning the susceptibility of Bcl- x_L to deamidation was by Aritomi et al. [38] in 1997 with their description of the crystal structure of rat Bcl- x_L . Bacterial synthesis of rat Bcl- x_L yielded two forms of the protein that could be separated by anion exchange chromatography: one that was not deamidated, and the other which contained Asp/IsoAsp residues (it was unsure whether Asn52 and/or 66 had undergone deamidation). Comparison of the electrophoretic profiles of the recombinant protein and Bcl- x_L from tissue samples led the authors to surmise that different degrees of deamidation might occur *in vivo*. In light of what was known about deamidated proteins losing their functions and/or being degraded, the authors concluded that it was worth exploring how Bcl- x_L deamidation relates to apoptosis regulation. This remark paved the way for the subsequent research led by the Weintraub and Alexander labs.

2.2. Bcl- x_L double deamidation on Asn52 and Asn66 occurs in response to DNA-damage in cultured cells

In 2002, the Weintraub lab conducted the pioneering experiment providing indirect evidence that Bcl- x_L was susceptible to deamidation at residues Asn52 and Asn66, in response to various DNA-damaging agents (Table 2). Modified Bcl- x_L showed a retardation in SDS-PAGE migration, and co-migrated with Asp deamidation mimetic mutants (N52D/N66A, N52D/N66D) while the faster band (likely corresponding to native Bcl- x_L) co-migrated with the non deamidable mutant (N52AN66A). Exposure of cell extracts to alkaline pH accelerated Bcl- x_L

double deamidation, and tandem mass spectrometry analysis of peptide 64–68 exposed to alkaline pH confirmed deamidation of Asn66. Using the formula developed by Robinson [3] to compute the data from Bcl- x_L X-ray structure determined by Muchmore et al. [36], deamidation half-lives of 9 Asn residues in Bcl- x_L were predicted: N52 and N66 were calculated to have the same half-life, indicating equal probability to undergo deamidation. The evidence that deamidation of Bcl- x_L produced mainly Iso-Asp deamidated species after DNA damage was brought by Zhao et al. [41]. Recombinant His-tagged Bcl- x_L exposed to alkaline pH separated into 3 peaks after anion-exchange chromatography, and optimized LC-MS analysis showed a 1 Da increase between each peak, the difference expected in the case of deamidation. Consistent with the well-established biochemistry of Asn deamidation, the ratio of Iso-Asp/Asp was 10:1 for Asn52 and 5:1 for Asn66. These ratios were determined on samples that had been exposed to accelerated deamidation *in vitro*, and it is worth underscoring that *in vivo*, these ratios will necessarily depend on the activity of the PCMT/PIMT repair enzyme.

2.3. Doubly deamidated Bcl- x_L exhibits decreased anti-apoptotic functions

Both the Weintraub and the Alexander labs concur on the fact that deamidation decreases Bcl- x_L pro-survival activity in cells exposed to DNA damage. The Weintraub lab showed that Bcl- x_L double deamidation mimetic N52D/N66D lost the ability to sequester pro-apoptotic BH3-containing partners like Bim, while undeamidable Bcl- x_L N52A/N66A retained binding. However, a doubt was cast by the erratum mentioning that the ectopic Bcl- x_L N52D/N66D carried an additional unwanted mutation, the reversion of which restored interaction with Bim [42]. Further work allowed this same lab to later propose that Bcl- x_L deamidation in fact exposed a PEST sequence that targeted Bcl- x_L for calpain-mediated degradation; deamidation was no longer proposed to alter Bcl- x_L binding to pro-apoptotic Bcl-2 family proteins, but to directly decrease Bcl- x_L cellular amount. Bcl- x_L deamidation was presented as an integral component of the rheostat that controls the ratio between pro- and anti-apoptotic Bcl-2 proteins. Of note, the decreased life-span of deamidated Bcl- x_L is not consistently reported in the literature: despite using the same cell line (mainly osteosarcoma SAOS-2 cells) exposed to the same treatments, the seminal paper by Deverman et al. does not show the degradation of deamidated Bcl- x_L that was later reported in the Dho et al. paper (Table 2). Neither was this degradation observed in studies run by other labs, monitoring Bcl- x_L deamidation in lymphocytes [41,43] in response to other DNA-damaging drugs, or in hepatoma cell lines exposed to GSH-DXR [44]. In the absence of stress [40], the stability of Bcl- x_L and its deamidation mimetic mutants also remained constant. One article investigating Bcl- x_L deamidation in myeloid cells actually showed a decrease in deamidated Bcl- x_L in response to etoposide, but not with other DNA-damaging drugs [45]. Therefore, calpain-mediated degradation of deamidated Bcl- x_L might be context dependent, and might hypothetically be a trait restricted to cells with high calpain activity. Hence, the control of Bcl- x_L stability by deamidation would not be a general feature shared by all cells.

The Alexander lab proposed a whole different explanation for the loss of the anti-apoptotic function of deamidated Bcl- x_L based on the following rationale: 1) IP experiments on thymocytes exposed to DNA damage showed that Bcl- x_L binding to Bim or Puma was ablated, 2) the prevalent species generated *in vitro* by alkaline treatment of purified Bcl- x_L are N52 and N66 IsoAsp species, and 3) the N52N66 IsoAsp species completely lost interaction *in vitro* with Bim or Puma while undeamidable Bcl- x_L retained binding. These observations were correlated together, and the Alexander lab proposed that the major Bcl- x_L species generated by deamidation *in situ* is not Asp52/Asp66 but Iso-Asp52/IsoAsp66, the inability of which to sequester pro-apoptotic Bcl-2 proteins explained the decreased pro-survival activity of deamidated Bcl- x_L [41]. The ability of ectopically expressed Bcl- x_L N52DN66D to interact with Bim was a further confirmation that the Asp deamidation

Table 2
Treatments and cell lines used for the monitoring of DNA-damage induced deamidation of Bcl-x_L.

DNA damaging agent	Reference	Cell type
Cisplatin, etoposide, gamma irradiation	[39]	p53 null with inducible RB paradigm, osteosarcoma SAOS-2, Ovarian cancer cells C33A, primary ovarian cells, bladder cancer cells HTB-9
GSH conjugated to doxorubicin	[44]	Human hepatoma HepG2
Etoposide, doxycycline, minocycline	[45]	Chronic myeloid K562, human myeloid HL-60, lymphoblastic Jurkat
Etoposide	[58]	Human erythroleukemia cells (HEL), JAK2V617F knock-in mice, MPN patients with essential thrombocythemia or polycythemia vera
Etoposide, cisplatin, gamma irradiation	[23]	SAOS-2, HTB-9, C33a, MEFs
Etoposide, gamma irradiation	[41]	Murine CD45 ^{-/-} p56lck ^{FS05Y} T cell lymphoma, Murine C57BL/6 normal thymocytes
	[43]	Human primary human B lineage CLL
	[48,58]	Murine CD45 ^{-/-} p56lck ^{FS05Y} T cell lymphoma, Murine C57BL/6 normal thymocytes
		Primary cells from patients with Chronic Myeloid Leukemia or polycythemia vera
		Human hematopoietic cancer-cell lines K562, HEL, Daudi, DU528, Jum2, T lymphoma Karpas299, OPM2, and DOHH2
		Murine BaF3 cells
H ₂ O ₂	[56]	Human umbilical vein endothelial cells
Camptothecin	[67]	Human Namalwa Burkitt lymphoma cell line, U937 lymphoma cell line
Cisplatin	[46]	Ovarian carcinoma cell line SKOV3.ip1

mimetic did not recapitulate the deamidated form (inferred to be IsoAsp) produced in thymocytes exposed to DNA damage. It is, however, puzzling that thymocytes exposed to DNA damage produce so little Asp deamidated forms of Bcl-x_L that IPs with Bim or Puma completely fail to pull down the slightest amount of Asp-deamidated Bcl-x_L. This result can only be explained by an extremely low activity of PCMT/PIMT in these cells.

The absence of a consensus to explain how deamidation causes a loss of anti-apoptotic activity in cells only underlines how multifaceted Bcl-x_L deamidation might be; it is very possible that different cues and different experimental paradigms resort to different mechanisms, and that both calpain and PCMT/PIMT activity might be important parameters for cells to implement Bcl-x_L deamidation.

2.4. Mechanisms regulating Bcl-x_L deamidation in the context of DNA-damage

At least two different pathways have been proposed to regulate Bcl-x_L deamidation in cells in the context of DNA damage. The Weintraub lab described that Bcl-x_L deamidation was negatively controlled by the retinoblastoma protein (Rb), which is essentially known as a tumor suppressor. This activity of Rb resides mainly in its ability to restrict growth by blocking the G1-S transition until cells are ready to divide. Rb function is regulated by its phosphorylation state: when a cell is ready to divide, Rb is phosphorylated and loses its ability to sequester (and suppress) the E2F transcription factor, thus allowing cell cycle progression. Expression of Rb was reported to suppress both Bcl-x_L deamidation and its calpain-mediated degradation in response to DNA damage. Inhibition of Bcl-x_L deamidation was dependent on the phosphorylation status of Rb: inhibition of Rb phosphorylation by olomoucine, a cyclin-dependent kinase inhibitor, suppressed Bcl-x_L deamidation (Fig. 3). Chang et al. reinforced this concept in an article where the role of the adenoviral E1A protein, an Rb inhibitor, was studied [46]: in ovarian cancer cells containing normal Rb activity, E1A expression was shown to stimulate Bcl-x_L deamidation upon exposure to cisplatin. Conversely, expression of E1A mutant lacking Rb-binding domain suppressed Bcl-x_L deamidation. The precise mechanism by which Rb suppresses Bcl-x_L deamidation has not been further elucidated. Of note, Rb was shown to be ineffective in inhibiting Bcl-x_L deamidation in the thymocyte model used by the Alexander lab [43]. It is thus reasonable to assume that Rb-regulated Bcl-x_L deamidation is probably cell-type dependent. Besides cell cycle arrest, Rb performs many other functions including regulation of apoptosis, differentiation, chromosomal stability, and senescence [47]. Rb-mediated regulation of Bcl-x_L

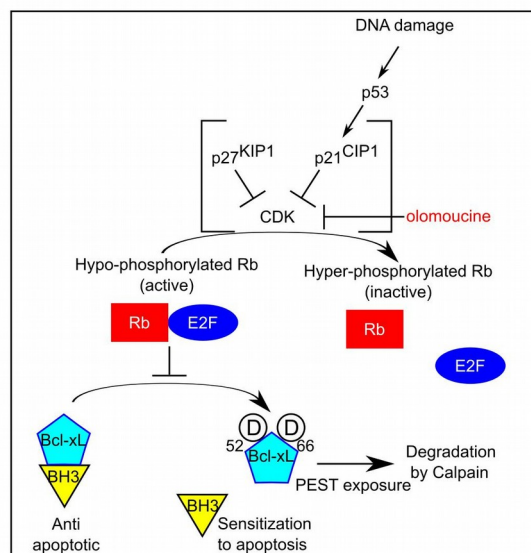


Fig. 3. Pathway regulating Bcl-x_L double deamidation according to the Weintraub lab. Upon DNA damage, p53 expression is induced, leading to CDK inhibition, and keeping Rb under an hypo-phosphorylated form able to sequester the transcription factor E2F away from the promoters of its target genes. Conditions where Rb is hypo-phosphorylated are conducive to Bcl-x_L deamidation on Asn52 and 66 [39], which leads to the exposure of a PEST sequence that targets doubly deamidated Bcl-x_L for degradation by calpains [23]. The subsequent decrease in the anti-apoptotic defenses of the cell shifts the balance in favor of free pro-apoptotic BH3-containing Bcl-2 family members. DNA damage-exposed cells are thus sensitized to apoptosis induction. While Rb overexpression successfully suppresses Bcl-x_L deamidation, two CDK inhibitors p21^{CIP1} and p27^{KIP1} fail to recapitulate this effect (pathway between brackets) [39], opening the question that the levels at which Rb is expressed might be an important component in its anti-apoptotic function.

deamidation was reported in SAOS-2 cells exposed to DNA damage, a very peculiar paradigm in which Rb displays antiapoptotic functions. However, fathoming the exact conditions and signaling pathways linking Rb, Bcl-x_L deamidation and the coupling between proliferation and apoptosis will be a long term endeavor, given the diversity of post-translational modifications Rb can undergo in response to environmental cues [47].

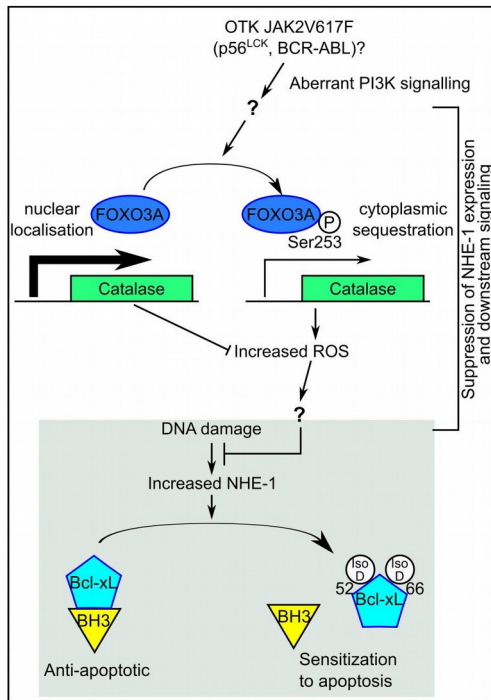


Fig. 4. Pathway regulating Bcl-x_L double deamidation according to the Alexander and Green labs in the specific context of hematological malignancies. A subset of activated oncogenic tyrosine kinases (resulting from JAK2V617F mutation, or p56^{lck}-Y505F mutation in a CD45^{-/-} context or BCR-ABL fusion) qualify to suppress NHE-1 expression and downstream signaling, but the dependence on aberrant PI3K signaling was only shown for the JAK2V617F pathway. Unknown events further lead to the cytoplasmic sequestration of the transcription factor FOXO3 and the subsequent decrease in catalase expression, which allows a build up of intracellular ROS. By unknown molecular mechanisms, this results in inhibition of the NHE-1 driven Bcl-x_L double deamidation, and cells survive despite increased DNA damage. Enforced NHE-1 expression bypasses the upstream inhibitory events and restores Bcl-x_L deamidation. The Alexander and Green labs propose that essentially IsoAsp-containing Bcl-x_L is produced by NHE-1-driven deamidation; the inability of Iso-Asp Bcl-x_L to sequester BH3-containing partners contributes to restore an operational apoptotic program.

The Alexander lab showed that a subset of oncogenic tyrosine kinases (OTK) inhibited Bcl-x_L deamidation in response to DNA damage. A comprehensive investigation led to the characterization of the underlying mechanism. A first series of articles relied on a mouse model of T-cell lymphoma producing hyperactive p56^{lck}-Y505F tyrosine kinase in a CD45^{-/-} context to explore inhibition of Bcl-x_L deamidation (Fig. 4). Mouse thymocytes harboring the p56^{lck}-Y505F mutation displayed intermediate, but not tumorigenic tyrosine kinase activity due to the mutation of inhibitory Tyr505 into Phe. Importation of this active tyrosine kinase in a CD45^{-/-} context further enhanced its activity to an oncogenic level, potentially because the absence of the phosphatase CD45 prevents inhibitory dephosphorylation of Tyr394 in p56. CD45^{-/-} p56^{lck}-Y505F thymocytes thus harbor oncogenic tyrosine kinase activity: they display inhibited DNA damage repair leading to genomic instability, and stimulate a survival pathway that prevents DNA-damage-induced apoptosis (inhibition of Bcl-x_L deamidation preserves Bim sequestering and thus prevents Bax activation) [43]. In WT thymocytes, DNA damage was shown to result in a 2–3 fold increased expression of the plasma membrane NHE-1 Na⁺/H⁺ antiporter, which proved both necessary and sufficient to induce an intracellular alkalinization (pH increases from 7.1 to 7.55) conducive to Bcl-x_L

deamidation and apoptosis; this OTK was shown to suppress NHE-1 expression and all further signaling events in pre-tumorigenic thymocytes. Thus, in pre-tumorigenic thymocytes, the p56 OTK reduced the cancer protection pathway that normally eliminates cells with damaged DNA, due to both inhibition of DNA repair and protection from DNA-damage-induced apoptosis [41].

In a second series of articles, the Alexander and the Green labs broadened the question of the relevance of Bcl-x_L deamidation to myeloproliferative disorders with other activated TKs: BCR-ABL fusion kinase (in Chronic Myeloid Leukemia patients) and activated JAK2V617F (in polycythemia vera patients) were found to efficiently inhibit the NHE-1/Bcl-x_L deamidation pathway and the apoptotic response to DNA damage [48] (Fig. 4). The activated JAK2 signaling pathway was further elucidated by the Green lab: as a result of aberrant PI3K signaling, JAK2V617F was found to increase FOXO3A inhibitory phosphorylation on Ser253, thus leading to the cytoplasmic sequestration of the transcription factor. Catalase being a transcriptional target of FOXO proteins, JAK2V617F decreased catalase expression, and increased intracellular ROS levels. How this contributes to the inhibition of the NHE-1/Bcl-x_L pathway remains unknown.

It is noteworthy that inhibition of the Bcl-x_L deamidation pathway is not a general feature of hematological cancers because other types of OTK (namely NPM-ALK and FGFR3 TK) appeared ineffective in repressing this pathway. Thus, only a subgroup of tyrosine kinases qualifies for inhibition of the NHE-1/Bcl-x_L pathway. More generally, although inactivation of FOXO proteins and high intracellular ROS are a common trait in many cancers, it is unlikely that inhibition of the NHE-1/Bcl-x_L pathway is a general feature of cancer, since Bcl-x_L deamidation is efficiently induced by DNA damage in osteosarcoma and cervical, bladder and ovarian cancer [39,46]. The sound amount of data collected in the context of myeloproliferative disorders has significantly contributed to the characterization of DNA-damage-induced Bcl-x_L deamidation, and the therapeutic applications will be discussed later. Nevertheless, further work is needed to explore Bcl-x_L deamidation outside the context of hematological malignancies.

2.5. Monodeamidation of Bcl-x_L: evidence and consequences

It is intriguing that studies investigating Bcl-x_L deamidation have essentially focused on the double deamidation of Asn52 and Asn66 residues, although the data collected indicate that several levels of deamidation exist in most of the cell lines tested, either grown under normal conditions or exposed to DNA damage. Deverman et al. noted that the slower migrating form of Bcl-x_L detected in untreated SAOS-2 cells co-migrated with the monodeamidation mimetic mutant Bcl-x_L N52DN66A [39], but they neglected the existence of this monodeamidated form. Zhao et al. found that Bcl-x_L in untreated mouse thymocytes migrated as a doublet, and Bcl-x_L from cells exposed to DNA-damage showed a third and even slower migrating band. They also showed *in vitro* the existence of a monodeamidated species [41], but no further exploration was made. Finally, Zhao et al. observed (mono)deamidated Bcl-x_L in granulocytes from control patients as well as in granulocytes from patients with CML and polycythemia vera [48] but did not pursue its characterization. Several reasons might account for the lack of study of monodeamidated Bcl-x_L species: 1) insufficient resolution in the SDS-PAGE analyses precluded the identification of monodeamidated Bcl-x_L in many publications, and 2) the founding paper by Deverman et al. probably unintentionally swayed subsequent analyses with the statement that Asn52 and Asn66 display equal probability to undergo deamidation [39].

Only recently was published a study of Bcl-x_L deamidation in the absence of DNA damage, where consistent monodeamidation of Bcl-x_L Asn52 was observed while leaving Asn66 intact in an array of cancer and normal cell lines, as well as in mouse tissues [40]. This study provided the first evidence that Asn52 and Asn66 are not equally prone to deamidation. The fact that Asn66 is refractory to deamidation

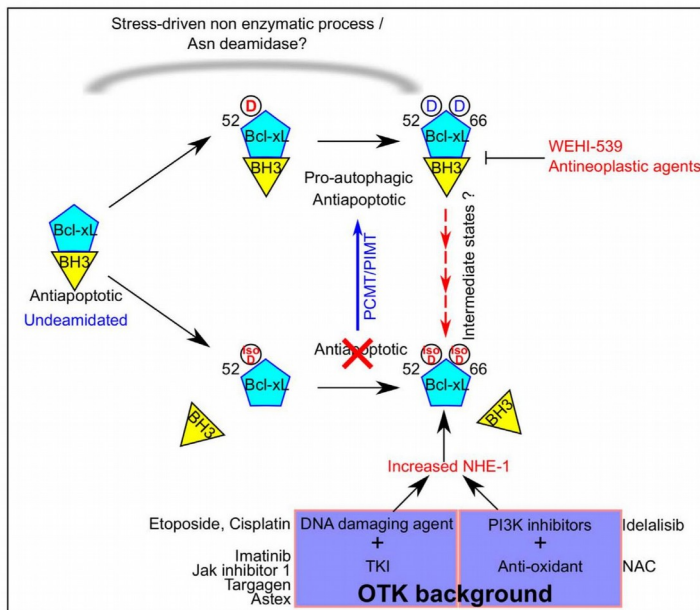


Fig. 5. Therapeutic approaches to manipulate Bcl-x_L survival functions depending on its deamidation state: prosurvival pathways are labeled in blue, while pro-death pathways are in red. Deamidation of residue N52 of Bcl-x_L occurs readily in cultured cells, in the absence of external stress, and produces D52 and IsoD52 Bcl-x_L. Whether monodeamidation is catalyzed by a deamidase or is a spontaneous process, is still an open question. Asp monodeamidation limits Bcl-x_L tumorigenic activity (52D is thus labeled in red).

Subsequent deamidation of N66 occurs under stress conditions (mainly DNA damage), and produces Asp and Iso-Asp doubly deamidated forms. Asp deamidated Bcl-x_L retains the ability to sequester BH3-containing pro-apoptotic partners; anti-neoplastic agents that drive Bcl-x_L phosphorylation and thereby impair its anti-apoptotic function, or BH3-mimetics that abolish the sequestration of pro-apoptotic partners by Bcl-x_L, are of potential interest to antagonize the Asp deamidated forms that are restored by PCMT/PIMT.

IsoAsp deamidated forms of Bcl-x_L lose the ability to bind BH3-containing pro-apoptotic partners and addition of BH3-mimetics is not necessary to restore functional apoptosis; in hematological malignancies, two therapeutic routes have been suggested to reactivate Bcl-x_L deamidation, which occur to stimulate the NHE-1 pathway: both the use of tyrosine kinase inhibitors (TKI) and the reversion of ROS increase restores the response of NHE-1/Bcl-x_L pathway to DNA damage.

suggests that its structural environment may differ from that of Asn52, and therefore portends that the loop X-ray crystallography and NMR data qualify as disordered, could well adopt a defined structure in cells due to potential interaction with a binding partner. This study also emphasized that Bcl-x_L deamidation is not restricted to the DNA-damage paradigm, and showed that monodeamidation of Bcl-x_L differed significantly from double deamidation with regards to both its occurrence and functional outcomes. Monodeamidated Bcl-x_L displayed intact anti-apoptotic properties and improved cellular stress tolerance by further stimulating autophagy after nutrient starvation. Moreover, monodeamidated Bcl-x_L cellular level was not controlled by calpain degradation. Finally, *ex vivo*, Bcl-x_L monodeamidation impaired oncogenic and tumorigenic potential [40]. Deamidation was proposed to provide a regulation of Bcl-x_L that uncouples oncogenic and anti-apoptotic properties of the protein. As monodeamidation appears to be ubiquitous and to affect an important proportion of the protein, these data might be particularly important from a therapeutic point of view. In keeping with this, an interesting observation was that deamidated Bcl-x_L can still undergo phosphorylation, meaning that anti-neoplastic agents targeting microtubules (which inhibit Bcl-x_L by phosphorylation) might be combined with treatments inducing deamidation, to achieve a more efficient inhibition of Bcl-x_L survival functions.

3. Therapeutic applications

Bcl-x_L has been known to play a crucial role in tumorigenesis and drug resistance since the anti-drug screen performed on 60 cell lines of the National Cancer Institute (NCI-ADS). This study aimed at delineating a correlation between the expression of a number of cancer-related genes and resistance to a panel of standard chemotherapy agents [49], and Bcl-x_L showed the strongest score. Targeting Bcl-x_L therefore appeared a logical strategy for therapeutic approaches, especially in cases of cancers in which Bcl-x_L plays an important role in genotoxic resistance. Bcl-2/Bcl-x_L inhibitors called “BH3-mimetics” have been developed: navitoclax (ABT-263) inhibits both Bcl-2 and Bcl-x_L while venetoclax (ABT-199) inhibits selectively Bcl-2, and WEHI-539 is specific for Bcl-x_L inhibition. These inhibitors efficiently prevent

sequestration of BH3-containing pro-apoptotic Bcl-2 family members by Bcl-2 or Bcl-x_L [50–52]. ABT-199 and ABT-263 have been used as single agents in clinical trials, with promising anti-tumor activity on a few cancers [53,54]. However, platelets rely on Bcl-x_L for their survival and the clinical use of ABT-263 has been limited by the occurrence of severe thrombocytopenia in patients. The challenge is now to determine if the on-target Bcl-x_L-dependent toxicity can be alleviated by the design of proper therapeutic combinations. Alternatively, identifying survival pathways controlled by Bcl-x_L independent of its BH3-binding activity might help identify new therapeutic targets. In this regard, future studies on Bcl-x_L deamidation might open promising avenues: as mentioned previously, deamidated Bcl-x_L is reported to lose its interaction with BH3-binding partners, although these data lack molecular grounding because Asn52 and Asn66 do not line the BH3-interacting zone. More work is definitely needed to tackle this conundrum.

The first indirect observation linking deamidation, Bcl-2 proteins and apoptosis was the paper by Huebscher et al. in 1999, showing that PCMT/PIMT overexpression protected from Bax-induced apoptosis in cells deprived of trophic factors (PCMT/PIMT was proposed to operate not through Bcl-x_L, but through its ability to repair tubulin and therefore preserve the polymerization state of microtubules) [55]. It took a few more years to learn that Bcl-x_L could be deamidated [39] and that a Caspase-3 cleaved form of Bcl-x_L deprived of its 75 first residues (aa 76–233) was a substrate for PCMT/PIMT [56], providing a more complete explanation in retrospect. Takehara et al. later reported that tumor cells repress Bcl-x_L deamidation as a mean to maintain high anti-apoptotic activity [57]. Reactivation of Bcl-x_L deamidation could therefore be instrumental to restore the ability of cancer cells to undergo apoptosis.

3.1. The PCMT/PIMT axis

Bcl-x_L deamidated into Asp was consistently found to retain anti-apoptotic activity [40–42] while deamidation into isoAsp species erodes its ability to sequester BH3-containing binding partners [41]. Therefore, the repair enzyme PCMT/PIMT can be envisaged as a critical checkpoint in the balance between Asp/Iso-Asp Bcl-x_L species (Fig. 5). Two studies showed that PCMT/PIMT indeed restored Bcl-x_L anti-

apoptotic functions and helped cells reacquire protection against stress-induced apoptosis [55,56]. Therefore, PCMT/PIMT inhibition would lock deamidated Bcl-x_L in a form that releases pro-apoptotic partners and would sensitize cancer cells to apoptosis. The main caveat of this strategy is that 1) the pathway leading to Bcl-x_L deamidation into Asp must be operative, and 2) that inhibiting the repair enzyme might generate a general build up of structurally altered proteins, and it is not clear what type of death would entail.

3.2. The Rb axis

Rb and p53 stand among the relatively small number of essential alterations that are shared by most, and perhaps all tumors. Mutations in the Rb pathway are so frequent that its disruption was speculated to be essential for the formation of cancer. Therefore, Rb is considered mostly as a tumor suppressor gene. Yet, as discussed previously, Rb can also display anti-apoptotic properties as part of the differentiation program of certain cell types (during development, lens cells lacking Rb fail to exit cell cycle for differentiation, and exhibit increased apoptosis). Rb was found to suppress Bcl-x_L deamidation as a means to repress apoptosis in response to DNA damage in SAOS-2 osteosarcoma cells that lack p53. In that specific context, Rb inactivation was proposed to increase susceptibility of tumor cells to DNA damage because Rb inactivation is permissive for Bcl-x_L deamidation. Cyclin dependent kinases (CDK) mediate Rb inactivation by promoting its hyper-phosphorylation (Fig. 3). Interestingly, Deverman et al. found that in SAOS-2 cells exposed to cisplatin, two upstream inhibitors of cdk (p27KIP1 and p21CIP1) were ineffective in blocking Bcl-x_L deamidation, while CDK inhibition by olomoucine efficiently prevented Bcl-x_L deamidation in p53 null MEFs [39].

It thus seems that, depending on the cellular context, CDK inhibition does not trigger a unanimous effect on Bcl-x_L deamidation. Since the signaling pathway(s) leading to the tumor suppressive or anti-apoptotic role of Rb are still not well defined, additional work is needed to gain insight into the regulation of Bcl-x_L by Rb, in order to envisage potential therapeutic applications.

3.3. The OTK axis

Cytoplasmic tyrosine kinases such as Abl, JAK2 and Lck can lead to oncogenic activation through diverse mechanisms, but one noticeable common outcome is how cells expressing OTK are rendered exquisitely resistant to DNA damage. From a clinical standpoint, the related cancers are typically resistant to administration of conventional treatments with antineoplastic agents. Therefore, elucidating the mechanisms used by OTK to promote oncogenesis is essential to identify new combinatorial therapies.

The discovery that the suppression of Bcl-x_L deamidation was a downstream target of OTK activation (specifically BCR-ABL, p56lck and JAK2V617F) (Fig. 4) opened new therapeutic strategies: Zhao et al. reported that CD34+ cells from patients with CML reacquired the ability to induce Bcl-x_L deamidation upon DNA damage when they were exposed to imatinib or to three different JAK2 inhibitors: Jak inhibitor 1, Targagen and Astex; in addition, PBMCs isolated from a patient who had become resistant to imatinib as a consequence of an E255V mutation in the BCR-ABL kinase domain, triggered efficient apoptosis in response to imatinib and etoposide following expression of NHE-1, which restored Bcl-x_L deamidation [48]. These data showed that reactivating the Bcl-x_L deamidation pathway in CML cells was sufficient to bypass imatinib resistance. Work by Zhao et al. hence provided the molecular basis for the effectiveness in increasing apoptosis when anti-leukemic chemotherapy was combined with imatinib in patients with BCR-ABL: restoration of Bcl-x_L deamidation minimized sequestration of pro-apoptotic BH3 proteins and maximized apoptosis in response to DNA-damaging agents.

These studies highlight how promising the use of tyrosine kinase

inhibitors (TKI) can be (Fig. 5). However, TKI are notorious for having two main drawbacks, that will need to be circumvented for efficient cancer therapy: 1) further mutation of the kinase domain of BCR-ABL triggers acquired resistance to imatinib and leads to relapse of the disease, and 2), persistence of residual disease is commonly observed in CML patients treated with TKI, and the current hypothesis is that TKI-resistant quiescent BCR-ABL-positive stem cells are responsible.

Remarkably, Ahn et al. provided insights into this specific point while investigating mutant JAK2-FOXO3A signaling in patients with myeloproliferative neoplasms that were JAK2V617F-positive. Comparison of FOXO3 localization in HSC-enriched population (Lin – CD34 + CD38 – CD45RA – CD90 +) and more mature progenitors (Lin – CD34 + CD38 +) revealed that the JAK2-FOXO3A signaling was different in stem cells when compared to the progenitors: while FOXO3A was sequestered in the cytoplasm of the hematopoietic progenitors, FOXO3A nuclear localization was not altered in the nuclei of primitive HSCs [58]. The fact that a 2–3 fold increase in NHE-1 expression is sufficient to markedly enhance the level of apoptosis in imatinib-resistant CML cells, implicates that stimulation of Bcl-x_L deamidation as a potential route for eradicating leukemic stem cells.

3.4. The NHE-1 axis

The NHE is a family of Na⁺/H⁺ antiporters that distribute in Golgi and post-Golgi membranes and function to maintain acidic pH. Ten isoforms have been identified, and NHE-1 is the ubiquitous subtype [59]. NHE-1 is a large protein with 12 transmembrane-spanning segments that mediate proton extrusion, and a hydrophilic cytoplasmic carboxy-terminal domain which contains regulatory sites. Its regulation is complex and involves variations in its expression level, as well as phosphorylation and binding to regulatory proteins.

Bcl-x_L deamidation requires the activation of NHE-1. From a therapeutic standpoint, it is very appealing to know that the activation of the NHE-1/Bcl-x_L signaling pathway successfully bypasses resistance to apoptosis in patients with CML and polycythemia vera. However, the possibility of targeting NHE-1 will require circumventing one main drawback: NHE proteins are known to be instrumental in cardiac pathology, and NHE-1 inhibitors have been developed to protect myocardium against heart failure. Logically, agonists have not been developed.

Tuning of NHE-1 activity (either directly through agonists or indirectly through its regulators) will require very careful and calculated monitoring to prevent any undesirable cardiotoxic effects.

3.5. The PI3K axis

The PI3K pathway is critical for maintaining resistance to apoptosis in malignant cells. A number of PI3K inhibitors are under clinical investigation: some are pan-PI3K inhibitors targeting all four isoforms of class I PI3K, others are isoform-selective inhibitors [60]. Idelalisib was the first PI3K inhibitor licensed for the treatment of cancer; it is a selective PI3K δ inhibitor and was approved in the USA for treatment of various hematologic malignancies (chronic lymphocytic leukemia, relapsed follicular B-cell non-Hodgkin's lymphoma, and relapsed small lymphocytic lymphoma).

The report by Ahn et al. [58] suggests that PI3K inhibitors could be used in combination with an antioxidant to effectively kill drug-resistant tumors. N-Acetyl-cysteine is the most commonly used antioxidant, and its combination with chemotherapeutic agents has already proven effective in killing lymphoblastoma (Fig. 5).

4. Conclusion and future prospects

4.1. Deamidation is not just a deleterious process that sets an expiry date on proteins

Bcl-x_L proved particularly instrumental in the demonstration that deamidation is not a passive modification that alters protein functions with age. Indeed, Bcl-x_L stands as a perfect example of a protein harboring two sites of (alleged) spontaneous deamidation with 2 different susceptibilities, and the fact that deamidation on Asn52 is readily observed at steady state whatever the age [40] while Asn66 undergoes deamidation in response to DNA damage or in aged tissues is a strong argument in favor of a controlled mechanism.

The notion that deamidation might generate altered proteins with useful function emerged in 2003 by Reissner and Aswad [61] when they discussed a report mentioning that deamidation of PKA modified its intracellular distribution thereby introducing additional heterogeneity into the protein. Here again, Bcl-x_L elegantly illustrated that deamidation is not idiosyncratic of a loss of function: Beaumatin et al. showed that ectopic expression of a monodeamidated mimetic of Bcl-x_L improved autophagy-mediated stress tolerance of starved cells [40], which was in marked contrast to the inhibitory effect previously documented for shRNA-mediated downregulation of Bcl-x_L on the autophagic response [62]. Therefore, monodeamidated Bcl-x_L did not phenocopy the loss of Bcl-x_L in cells, but rather enhanced the properties of the native protein. These data shed new light on the array of cellular functions that are potentially affected by deamidation, given the amount of proteins susceptible to this process.

What makes the study of deamidation particularly challenging is the production of IsoAsp residues, which cannot be recapitulated by site directed mutagenesis, and considerably restricts their analysis to *in vitro* experiments on isolated proteins. Although a significant body of data has been accumulated since the discovery of Bcl-x_L deamidation, a lot more work is still needed to complete the analyses of the mechanism of this reaction, and functional aftermaths of this post-translational modification.

4.2. Open question: is there a eukaryotic Asn deamidase?

The existence of a monodeamidated form of Bcl-x_L has been overlooked for almost 15 years, and its occurrence raises an interesting question (Fig. 5): could the fact that the amount of endogenous monodeamidated Bcl-x_L varies in cells at steady state be a telltale sign of a eukaryotic deamidase operating at various rates, or does it simply reflect the tissue specific expression of partners that bind the disorganized loop of Bcl-x_L, providing a different structural environment for N52 and N66? Answering this question requires identification of the partners that specifically bind monodeamidated Bcl-x_L. Only these data will help characterize the specific pathways controlled by monodeamidated Bcl-x_L and understand how this PTM controls the oncogenic function of the protein independently of its anti-apoptotic activity.

4.3. Deamidation adds a weapon in the armamentarium against cancer

The fact that Bcl-x_L deamidation can be regulated by different signaling pathways underlines how versatile yet controlled the process is. And the demonstration that reacquisition of apoptosis execution is allowed by restoring Bcl-x_L deamidation in patients cells is a proof of concept that the process is tractable. There is an exciting avenue now open to include the therapeutic manipulation of Bcl-x_L deamidation in clinical trials. Only the IsoAsp deamidated forms of Bcl-x_L were shown to lose their anti-apoptotic activity, but the Asp deamidated forms that are restored by PCMT/PIMT can still be antagonized by BH3-mimetics or anti-neoplastic agents that drive Bcl-x_L phosphorylation (Fig. 5). In specific contexts (exemplified by certain OTK) where the balance is largely in favor of IsoAsp species, therapeutic treatments will not

include BH3-mimetics, but rather TKIs and DNA damaging agents, or PI3K inhibitors combined with anti-oxidants.

Funding sources

This work was supported by the CNRS, Université de Bordeaux (to UMR 5095). M.P. is supported by Ligue Régionale Contre le Cancer. F.B. received a PhD grant from the Ministère de la Recherche. MED is supported by the Lebanese Association for Scientific Research.

Declaration of interest

The authors declare no conflict of interest.

Transparency document

The <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.06.012> associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgements

We would like to express our deep gratitude to Jaclyn Long and James O'Prey for proofreading the manuscript. We are also very thankful to Alain Dautant for sharing his skills with PyMOL.

References

- [1] N.E. Robinson, A.B. Robinson, *Molecular Clocks: Deamidation of Asparaginyl and Glutamyl Residues in Peptides and Proteins*, Althouse Press, 2004.
- [2] H.T. Wright, Sequence and structure determinants of the nonenzymatic deamidation of asparagine and glutamine residues in proteins, *Protein Eng.* 4 (1991) 283–294, <http://dx.doi.org/10.1093/protein/4.3.283>.
- [3] N.E. Robinson, Protein deamidation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 5283–5288, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.082102799>.
- [4] J.A. Ubersax, J.E. Ferrell Jr., Mechanisms of specificity in protein phosphorylation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 530–541, <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2203>.
- [5] T. Geiger, S. Clarke, Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 785–794.
- [6] M.J. Mamula, R.J. Gee, J.I. Elliott, A. Sette, S. Southwood, P.-J. Jones, P.R. Blier, Isoaspartyl post-translational modification triggers autoimmune responses to self-proteins, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 22321–22327, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.32.22321>.
- [7] E. Kim, J.D. Lowenson, D.C. MacLaren, S. Clarke, S.G. Young, Deficiency of a protein-repair enzyme results in the accumulation of altered proteins, retardation of growth, and fatal seizures in mice, *PNAS* 94 (1997) 6132–6137.
- [8] J. Zhao, J. Li, S. Xu, P. Feng, Emerging roles of protein deamidation in innate immune signaling, *J. Virol.* 90 (2016) 4262–4268, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01980-15>.
- [9] D. Garcin, HSV1 pulls the deamidation tRIGger, *Cell Host Microbe* 20 (2016) 698–700, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.11.011>.
- [10] S. He, J. Zhao, S. Song, X. He, A. Minassian, Y. Zhou, J. Zhang, K. Brulois, Y. Wang, J. Cabo, E. Zandi, C. Liang, J.U. Jung, X. Zhang, P. Feng, Viral pseudo-enzymes activate RIG-I via deamidation to evade cytokine production, *Mol. Cell* 58 (2015) 134–146, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.036>.
- [11] J. Zhao, Y. Zeng, S. Xu, J. Chen, G. Shen, C. Yu, D. Knipe, W. Yuan, J. Peng, W. Xu, C. Zhang, Z. Xia, P. Feng, A viral deamidase targets the helicase domain of RIG-I to block RNA-induced activation, *Cell Host Microbe* 20 (2016) 770–784, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.10.011>.
- [12] G. Schmidt, P. Sehr, M. Wilm, J. Selzer, M. Mann, K. Aktories, Gln 63 of rho is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1, *Nature* 387 (1997) 725–729, <http://dx.doi.org/10.1038/42735>.
- [13] G. Flatau, E. Lemichez, M. Gauthier, P. Chardin, S. Paris, C. Fiorentini, P. Boquet, Toxin-induced activation of the G protein p21 rho by deamidation of glutamine, *Nature* 387 (1997) 729–733, <http://dx.doi.org/10.1038/42743>.
- [14] T. Sanada, M. Kim, H. Mimuro, M. Suzuki, M. Ogawa, A. Oyama, H. Ashida, T. Kobayashi, T. Koyama, S. Nagai, Y. Shibata, J. Gohda, J. Inoue, T. Mizushima, C. Sasakawa, The *Shigella flexneri* effector OspI deamidates UBC13 to dampen the inflammatory response, *Nature* 483 (2012) 623–626, <http://dx.doi.org/10.1038/nature10894>.
- [15] M. Lerm, J. Selzer, A. Hoffmeyer, U.R. Rapp, K. Aktories, G. Schmidt, Deamidation of Cdc42 and Rac by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1: activation of c-Jun N-terminal kinase in HeLa cells, *Infect. Immun.* 67 (1999) 496–503.
- [16] M. Sugai, K. Hatazaki, A. Mogami, H. Ohta, S.Y. Pérès, F. Héralut, Y. Horiguchi, M. Masuda, Y. Ueno, H. Komatsuzawa, H. Suginaka, E. Oswald, Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by pathogenic *Escherichia coli* deamidates a Gln residue in the conserved G-3 domain of the rho family and preferentially inhibits the

- GTPase activity of RhoA and Rac1, *Infect. Immun.* 67 (1999) 6550–6557.
- [17] L. Landraud, C. Pulcini, P. Gounon, G. Flatau, P. Boquet, E. Lemichez, *E. coli* CNF1 toxin: a two-in-one system for host-cell invasion, *Int. J. Med. Microbiol.* 293 (2004) 513–518, <http://dx.doi.org/10.1078/1438-4221-00295>.
- [18] A. Doye, A. Mettouchi, G. Bossis, R. Clément, C. Buisson-Touati, G. Flatau, L. Gagnoux, M. Piechaczyk, P. Boquet, E. Lemichez, CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict rho GTPase activation for bacterial host cell invasion, *Cell* 111 (2002) 553–564, [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01132-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01132-7).
- [19] G. Schmidt, J. Selzer, M. Lerm, K. Aktories, The rho-deamidating cytotoxic necrotizing factor 1 from *Escherichia coli* possesses transglutaminase activity cysteine 866 and histidine 881 are essential for enzyme activity, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 13669–13674, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.22.13669>.
- [20] A. Schousboe, S. Scafdi, L.K. Bak, H.S. Waagepetersen, M.C. McKenna, Glutamate metabolism in the brain focusing on astrocytes, *Adv. Neurobiol.* 11 (2014) 13–30, http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-08894-5_2.
- [21] C.S. Greenberg, P.J. Birckbichler, R.H. Rice, Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues, *FASEB J.* 5 (1991) 3071–3077.
- [22] N.E. Robinson, A.B. Robinson, Molecular clocks, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 944.
- [23] S.H. Dho, B.E. Deverman, C. Lapid, S.R. Manson, L. Gan, J.J. Riehm, R. Aurora, K.-S. Kwon, S.J. Weintraub, Control of cellular Bcl-xL levels by deamidation-regulated degradation, *PLoS Biol.* 11 (2013) e1001588, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1001588>.
- [24] Z. Qin, J. Yang, H.J. Klassen, D.W. Aswad, Isoaspartyl protein damage and repair in mouse retina, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55 (2014) 1572, <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.13-13668>.
- [25] R.R. Devosiers, I. Fanélus, Damaged proteins bearing l-isoaspartyl residues and aging: a dynamic equilibrium between generation of isomerized forms and repair by PIMT, *Curr. Aging Sci.* 4 (2011) 8–18.
- [26] B.A. Johnson, E.L. Langmack, D.W. Aswad, Partial repair of deamidation-damaged calmodulin by protein carboxyl methyltransferase, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 12283–12287.
- [27] H. Gershon, D. Gershon, Inactive enzyme molecules in aging mice: liver aldolase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70 (1973) 909.
- [28] J.H. Mckerrow, A.B. Robinson, Primary sequence dependence of the deamidation of rabbit muscle aldolase, *Science* 183 (1974) 85.
- [29] I. de la Mora-de la Mora, A. Torres-Larios, S. Enríquez-Flores, S.-T. Méndez, A. Castillo-Villanueva, S. Gómez-Manzo, G. López-Velázquez, J. Marcial-Quino, A. Torres-Arroyo, I. García-Torres, H. Reyes-Vivas, J. Oria-Hernández, Structural effects of protein aging: terminal marking by deamidation in human triosephosphate isomerase, *PLoS One* 10 (2015), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0123379>.
- [30] L.H. Boise, M. González-García, C.E. Postema, L. Ding, T. Lindsten, L.A. Turka, X. Mao, G. Nuñez, C.B. Thompson, bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death, *Cell* 74 (1993) 597–608, [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90508-N](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(93)90508-N).
- [31] R. Elkholti, T.T. Renault, M.N. Serasinghe, J.E. Chipuk, Putting the pieces together: how is the mitochondrial pathway of apoptosis regulated in cancer and chemotherapy? *Cancer Metab.* 2 (2014) 16, <http://dx.doi.org/10.1186/2049-3002-2-16>.
- [32] P.E. Czabotar, G. Lessene, A. Strasser, J.M. Adams, Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 49–63, <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3722>.
- [33] J. Lindsay, M.D. Esposito, A.P. Gilmore, Bcl-2 proteins and mitochondria—specificity in membrane targeting for death, *Biochim. Biophys. Acta* 1813 (2011) 532–539, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.017>.
- [34] A.M. Petros, E.T. Olejniczak, S.W. Fesik, Structural biology of the Bcl-2 family of proteins, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Mol. Cell Res.* 1644 (2004) 83–94, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.08.012>.
- [35] M. Kvasnakul, M.G. Hinds, The Bcl-2 family: structures, interactions and targets for drug discovery, *Apoptosis* 20 (2014) 136–150, <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-014-1051-7>.
- [36] S.W. Muchmore, M. Sattler, H. Liang, R.P. Meadows, J.E. Harlan, H.S. Yoon, D. Nettlesheim, B.S. Chang, C.B. Thompson, S.L. Wong, S.L. Ng, S.W. Fesik, X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death, *Nature* 381 (1996) 335–341, <http://dx.doi.org/10.1038/381335a0>.
- [37] J.M. Eichhorn, N. Sakurikar, S.E. Alford, R. Chu, T.C. Chambers, Critical role of anti-apoptotic Bcl-2 protein phosphorylation in mitotic death, *Cell Death Dis.* 4 (2013) e834, <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2013.360>.
- [38] M. Arimoto, N. Kunishima, N. Inohara, Y. Ishibashi, S. Ohta, K. Morikawa, Crystal structure of rat Bcl-xL implications for the function of the Bcl-2 protein family, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 27886–27892, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.44.27886>.
- [39] B.E. Deverman, B.L. Cook, S.R. Manson, R.A. Niederhoff, E.M. Langer, I. Rosová, L.A. Kulans, X. Fu, J.S. Weinberg, J.W. Heinecke, K.A. Roth, S.J. Weintraub, Bcl-xL deamidation is a critical switch in the regulation of the response to DNA damage, *Cell* 111 (2002) 51–62, [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00972-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00972-8).
- [40] F. Beaumatin, M. El Dhaybi, J.-P. Lasserre, B. Salin, M.P. Moyer, M. Verdier, S. Manon, M. Priault, N52 monodeamidated Bcl-xL shows impaired oncogenic properties in vivo and in vitro, *Oncotarget* 7 (2016) 17129–17143, <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.7938>.
- [41] R. Zhao, D. Oxley, T.S. Smith, G.A. Follows, A.R. Green, D.R. Alexander, DNA damage-induced Bcl-xL deamidation is mediated by NHE-1 antiport regulated intracellular pH, *PLoS Biol.* 5 (2007) e1, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0050001>.
- [42] B.E. Deverman, B.L. Cook, S.R. Manson, R.A. Niederhoff, E.M. Langer, I. Rosová, L.A. Kulans, X. Fu, J.S. Weinberg, J.W. Heinecke, K.A. Roth, S.J. Weintraub, Bcl-xL deamidation is a critical switch in the regulation of the response to DNA damage, *Cell* 115 (2003) 503, [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00892-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00892-4).
- [43] R. Zhao, F.T. Yang, D.R. Alexander, An oncogenic tyrosine kinase inhibits DNA repair and DNA-damage-induced Bcl-xL deamidation in T cell transformation, *Cancer Cell* 5 (2004) 37–49, [http://dx.doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00333-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00333-7).
- [44] T. Asakura, The association of deamidation of Bcl-xL and translocation of Bax to the mitochondria through activation of JNK in the induction of apoptosis by treatment with GSH-conjugated DXR, *Int. J. Oncol.* (1992), <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.00000020>.
- [45] M. Fares, M. Abedi-Valgerdi, M. Hassan, Z. Potáčová, DNA damage, lysosomal degradation and Bcl-xL deamidation in doxycycline- and minocycline-induced cell death in the K562 leukemic cell line, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463 (2015) 268–274, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.05.043>.
- [46] C.-Y. Chang, Y.-M. Lin, W.-P. Lee, H.-H. Hsu, E.I.T. Chen, Involvement of Bcl-XL deamidation in E1A-mediated cisplatin sensitization of ovarian cancer cells, *Oncogene* 25 (2005) 2656–2665, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1209294>.
- [47] J.I. MacDonald, F.A. Dick, Posttranslational modifications of the retinoblastoma tumor suppressor protein as determinants of function, *Genes Cancer* 3 (2012) 619–633, <http://dx.doi.org/10.1177/1947601912473305>.
- [48] R. Zhao, G.A. Follows, P.A. Beer, L.M. Scott, B.J.P. Huntly, A.R. Green, D.R. Alexander, Inhibition of the Bcl-xL deamidation pathway in myeloproliferative disorders, *N. Engl. J. Med.* 359 (2008) 2778–2789, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0804953>.
- [49] S.A. Amundson, T.G. Myers, D. Scudiero, S. Kitada, J.C. Reed, A.J. Fornace, An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines, *Cancer Res.* 60 (2000) 6101–6110.
- [50] T. Oltersdorf, S.W. Elmore, A.R. Shoemaker, R.C. Armstrong, D.J. Augeri, B.A. Belli, M. Bruncko, T.L. Deckwerth, J. Dinges, P.J. Hajduk, M.K. Joseph, S. Kitada, S.J. Korsmeyer, A.R. Kunzer, A. Letai, C. Li, M.J. Mitten, D.G. Nettesheim, S. Ng, P.M. Nimmer, J.M. O'Connor, A. Oleksijew, A.M. Petros, J.C. Reed, W. Shen, S.K. Tahir, C.B. Thompson, K.J. Tomaselli, B. Wang, M.D. Wendt, H. Zhang, S.W. Fesik, S.H. Rosenberg, An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours, *Nature* 435 (2005) 677–681, <http://dx.doi.org/10.1038/nature03579>.
- [51] C.M. Rudin, C.L. Hann, E.B. Garon, M.R. de Oliveira, P.D. Bonomi, D.R. Camidge, Q. Chu, G. Giaccone, D. Khaira, S.S. Ramalingam, M.R.anson, C. Dive, E.M. McKeegan, B.J. Chyla, B.L. Dowell, A. Chakravarty, C.E. Nolan, N. Rudersdorf, T.A. Busman, M.H. Mabry, A.P. Krivosik, R.A. Humerickhouse, G.I. Shapiro, L. Gandhi, Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer, *Clin. Cancer Res.* 18 (2012) 3163–3169, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3090>.
- [52] G. Lessene, P.E. Czabotar, B.E. Sleeb, K. Zobel, K.N. Lowes, J.M. Adams, J.B. Baell, P.M. Colman, K. Deshayes, W.J. Fairbrother, J.A. Flygare, P. Gibbons, W.J.A. Kersten, S. Kulasegaram, R.M. Moss, J.P. Parisot, B.J. Smith, I.P. Street, H. Yang, D.C.S. Huang, K.G. Watson, Structure-guided design of a selective BCL-X(L) inhibitor, *Nat. Chem. Biol.* 9 (2013) 390–397, <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1246>.
- [53] W.H. Wilson, O.A. O'Connor, M.S. Czuczman, A.S. LaCase, J.F. Gerecitano, W.J. Leonard, A. Tulpule, K. Dunleavy, H. Xiong, Y.-L. Chiu, Y. Cui, T. Busman, S.W. Elmore, S.H. Rosenberg, A.P. Krivosik, S.H. Enschede, R.A. Humerickhouse, Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase I dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumor activity, *Lancet Oncol.* 11 (2010) 1149–1159, [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70261-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70261-8).
- [54] A.J. Souers, J.D. Levenson, E.R. Boghaert, S.L. Ackler, N.D. Catron, J. Chen, B.D. Dayton, H. Ding, S.H. Enschede, W.J. Fairbrother, D.C.S. Huang, S.G. Hymowitz, S. Jin, S.L. Khaw, P.J. Kovar, L.T. Lam, J. Lee, H.L. Maecker, K.C. Marsh, K.D. Mason, M.J. Mitten, P.M. Nimmer, A. Oleksijew, C.H. Park, C.-M. Park, D.C. Phillips, A.W. Roberts, D. Sampath, J.F. Seymour, M.L. Smith, G.M. Sullivan, S.K. Tahir, C. Tse, M.D. Wendt, Y. Xiao, J.C. Xue, H. Zhang, R.A. Humerickhouse, S.H. Rosenberg, S.W. Elmore, ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets, *Nat. Med.* 19 (2013) 202–208, <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3048>.
- [55] K.J. Huebscher, J. Lee, G. Rovelli, B. Ludin, A. Matus, D. Stauffer, P. Fürst, Protein isoaspartyl methyltransferase protects from Bax-induced apoptosis, *Gene* 240 (1999) 333–341, [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00443-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00443-6).
- [56] A. Gimmino, R. Capasso, F. Muller, I. Sambri, L. Masella, M. Raimo, M.L. De Bonis, S. D'Angelo, V. Zappia, P. Galletti, D. Ingrassio, Protein isoaspartate methyltransferase prevents apoptosis induced by oxidative stress in endothelial cells: role of Bcl-XL deamidation and methylation, *PLoS One* 3 (2008) e32558, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003258>.
- [57] T. Takehara, H. Takahashi, Suppression of Bcl-xL deamidation in human hepatocellular carcinomas, *Cancer Res.* 63 (2003) 3054–3057.
- [58] J.S. Ahn, J. Li, E. Chen, D.G. Kent, H.J. Park, A.R. Green, JAK2V617F mediates resistance to DNA damage-induced apoptosis by modulating FOXO3a localization and Bcl-xL deamidation, *Oncogene* 35 (2016) 2235–2246, <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2015.285>.
- [59] M. Karmazyn, NHE-1: still a viable therapeutic target, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 61 (2013) 77–82, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.02.006>.
- [60] C. Massaccesi, E. Di Tomaso, P. Urban, C. Germa, C. Quadt, L. Trandafir, P. Aimone, N. Fretault, B. Dharan, R. Tavorath, S. Hirawat, PI3K inhibitors as new cancer therapeutics: implications for clinical trial design, *Oncotargets Ther.* 9 (2016) 203–210, <http://dx.doi.org/10.2147/OTT.S89967>.
- [61] K.J. Reissner, D.W. Aswad, Deamidation and isoaspartate formation in proteins:

- unwanted alterations or surreptitious signals? *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (2003) 1281–1295, <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-003-2287-5>.
- [62] M. Priault, E. Hue, F. Marhuenda, P. Pilet, L. Oliver, F.M. Vallette, Differential dependence on beclin 1 for the regulation of pro-survival autophagy by Bcl-2 and Bcl-xL in HCT116 colorectal cancer cells, *PLoS One* 5 (2010) e8755, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0008755>.
- [63] D.P. Del Re, T. Matsuda, P. Zhai, Y. Maejima, M.R. Jain, T. Liu, H. Li, C.-P. Hsu, J. Sadoshima, Mst1 promotes cardiac myocyte apoptosis through phosphorylation and inhibition of Bcl-xL, *Mol. Cell* 54 (2014) 639–650, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.04.007>.
- [64] M. Nakamura, P. Zhai, D.P. Del Re, Y. Maejima, J. Sadoshima, Mst1-mediated phosphorylation of Bcl-xL is required for myocardial reperfusion injury, *JCI Insight* 1 (2016), <http://dx.doi.org/10.1172/jci.insight.86217>.
- [65] C.-F. Tsai, Y.-T. Wang, H.-Y. Yen, C.-C. Tsou, W.-C. Ku, P.-Y. Lin, H.-Y. Chen, A.I. Nesvizhskii, Y. Ishihama, Y.-J. Chen, Large-scale determination of absolute phosphorylation stoichiometries in human cells by motif-targeting quantitative proteomics, *Nat. Commun.* 6 (2015) 6622, <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms7622>.
- [66] S. Kharbada, S. Saxena, K. Yoshida, P. Pandey, M. Kaneki, Q. Wang, K. Cheng, Y.N. Chen, A. Campbell, T. Sudha, Z.M. Yuan, J. Narula, R. Weichselbaum, C. Nalin, D. Kufe, Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 322–327.
- [67] E. Schmitt, M. Beauchemin, R. Bertrand, Nuclear colocalization and interaction between bcl-xL and cdk1(cdc2) during G2/M cell-cycle checkpoint, *Oncogene* 26 (2007) 5851–5865, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210396>.
- [68] J. Wang, M. Beauchemin, R. Bertrand, Phospho-Bcl-x(L)(Ser62) plays a key role at DNA damage-induced (G2) checkpoint, *Cell Cycle* 11 (2012) 2159–2169, <http://dx.doi.org/10.4161/cc.20672>.
- [69] P.S. Baruah, M. Beauchemin, J. Hébert, R. Bertrand, Dynamic Bcl-xL (S49) and (S62) phosphorylation/dephosphorylation during mitosis prevents chromosome instability and aneuploidy in normal human diploid fibroblasts, *PLoS One* 11 (2016) e0159091, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0159091>.
- [70] J. Wang, M. Beauchemin, R. Bertrand, Bcl-xL phosphorylation at Ser49 by polo kinase 3 during cell cycle progression and checkpoints, *Cell. Signal.* 23 (2011) 2030–2038, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.07.017>.
- [71] R. Antony, W.J. Lukiw, N.G. Bazan, Neuroprotectin D1 induces dephosphorylation of Bcl-xL in a PP2A-dependent manner during oxidative stress and promotes retinal pigment epithelial cell survival, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 18301–18308, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.095232>.
- [72] A. Basu, S. Haldar, Identification of a novel Bcl-xL phosphorylation site regulating the sensitivity of taxol- or 2-methoxyestradiol-induced apoptosis, *FEBS Lett.* 538 (2003) 41–47.
- [73] N.T. Hertz, A. Berthet, M.L. Sos, K.S. Thorn, A.L. Burlingame, K. Nakamura, K.M. Shokat, A neo-substrate that amplifies catalytic activity of Parkinson's-disease-related kinase PINK1, *Cell* 154 (2013) 737–747, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.030>.
- [74] X. Song, S.-Y. Kim, Y.J. Lee, Evidence for two modes of synergistic induction of apoptosis by mapatumab and oxaliplatin in combination with hyperthermia in human colon cancer cells, *PLoS One* 8 (2013) e73654, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0073654>.
- [75] M. Upreti, E.N. Galitovskaya, R. Chu, A.J. Tackett, D.T. Terrano, S. Granell, T.C. Chambers, Identification of the major phosphorylation site in Bcl-xL induced by microtubule inhibitors and analysis of its functional significance, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 35517–35525, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M805019200>.
- [76] Z. Wei, J. Qi, Y. Dai, W.D. Bowen, D.D. Mousseau, Haloperidol disrupts Akt signalling to reveal a phosphorylation-dependent regulation of pro-apoptotic Bcl-XS function, *Cell. Signal.* 21 (2009) 161–168, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.10.005>.
- [77] D. Zhong, L. Xiong, T. Liu, X. Liu, X. Liu, J. Chen, S.-Y. Sun, F.R. Khuri, Y. Zong, Q. Zhou, W. Zhou, The glycolytic inhibitor 2-deoxyglucose activates multiple pro-survival pathways through IGF1R, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 23225–23233, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.005280>.
- [78] D. Zhong, X. Liu, F.R. Khuri, S.-Y. Sun, P.M. Vertino, W. Zhou, LKB1 is necessary for Akt-mediated phosphorylation of proapoptotic proteins, *Cancer Res.* 68 (2008) 7270–7277, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1484>.
- [79] W. Zhou, J. Xu, E. Gelston, X. Wu, Z. Zou, B. Wang, Y. Zeng, H. Wang, A. Liu, L. Xu, Q. Liu, Inhibition of Bcl-xL overcomes polyplody resistance and leads to apoptotic cell death in acute myeloid leukemia cells, *Oncotarget* 6 (2015) 21557–21571, <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.4306>.
- [80] N.S. Seng, J. Megyesi, A. Tarcsafalvi, P.M. Price, Mimicking Cdk2 phosphorylation of Bcl-xL at Ser73 results in caspase activation and Bcl-xL cleavage, *Cell Death Discov.* 2 (2016), <http://dx.doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.1>.
- [81] R. Kajihara, H. Sakamoto, K. Tanabe, K. Takemoto, M. Tasaki, Y. Ando, S. Inui, Protein phosphatase 6 controls BCR-induced apoptosis of WEHI-231 cells by regulating ubiquitination of Bcl-xL, *J. Immunol.* 192 (2014) 5720–5729, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1302643>.
- [82] K. Park, J.-H. Lee, Bcl-XL protein is markedly decreased in UVB-irradiated basal cell carcinoma cell lines through proteasome-mediated degradation, *Oncol. Rep.* 21 (2009) 689–692.
- [83] S.A. Wagner, P. Beli, B.T. Weinert, M.L. Nielsen, J. Cox, M. Mann, C. Choudhary, A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles, *Mol. Cell. Proteomics* 10 (2011), <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M111.013284> (M111.013284).
- [84] H. Ren, K. Fu, D. Wang, C. Mu, G. Wang, Oxidized DJ-1 interacts with the mitochondrial protein BCL-XL, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 35308–35317, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.207134>.
- [85] N. Fujita, A. Nagahashi, K. Nagashima, S. Rokudai, T. Tsuruo, Acceleration of apoptotic cell death after the cleavage of Bcl-XL protein by caspase-3-like proteases, *Oncogene* 17 (1998) 1295–1304, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1202065>.
- [86] G. Basañez, J. Zhang, B.N. Chau, G.I. Maksaev, V.A. Frolov, T.A. Brandt, J. Burch, J.M. Hardwick, J. Zimmerberg, Pro-apoptotic cleavage products of Bcl-xL form cytochrome c-conducting pores in pure lipid membranes, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 31083–31091, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M103879200>.
- [87] R.J. Clem, E.H. Cheng, C.L. Karp, D.G. Kirsch, K. Ueno, A. Takahashi, M.B. Kastan, D.E. Griffin, W.C. Earnshaw, M.A. Veluona, J.M. Hardwick, Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 554–559.
- [88] E.A. Jonas, J.A. Hickman, M. Chachar, B.M. Polster, T.A. Brandt, Y. Fannjiang, I. Ivanovska, G. Basañez, K.W. Kinnally, J. Zimmerberg, J.M. Hardwick, L.K. Kaczmarek, Proapoptotic N-truncated BCL-xL protein activates endogenous mitochondrial channels in living synaptic terminals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 13590–13595, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0401372101>.