

THÈSE

Pour obtenir le grade de:
Docteur de l'Université Louis Pasteur (Strasbourg1)
Discipline: Sciences du Vivant

**Rôle de l'ICBP90 dans
les Mécanismes de Régulation
des Lymphocytes T**

Présentée le 29 septembre par:

Abdul-Qader Abbady

Jury de thèse:

Dr. M.Mousli, directeur de thèse (Faculté de Médecine, Strasbourg)
Pr. J-L. Connat, rapporteur externe (Faculté des Sciences de la Vie, Dijon)
Pr. E. Tschirhart, rapporteur externe (Faculté des Sciences, Luxembourg)
Pr. Y. Landry, rapporteur interne (Faculté de Pharmacie, Illkirch)
Pr. E. Candolfi, membre du jury (Faculté de Médecine, Strasbourg)

A

*Maman
et Papa,
Je vous dois tout,*

A

*Kinda,
Merci pour ton soutien,
ta patience et surtout pour mes deux petits anges,
Ward et Lyne*

A

mon Directeur de Thèse

Monsieur le Docteur Marc Mousli,

*Je voudrais vous assurer de ma profonde
reconnaissance et vous remercier pour la gentillesse avec
laquelle vous avez accueilli mon travail.*

Aux
membres du Jury

Monsieur le Professeur Yves Landry,
Je suis heureux de pouvoir soumettre ce travail à votre jugement.

Monsieur le Professeur Eric Tschirhart,
Merci d'avoir accepté de siéger dans mon Jury de Thèse..

Monsieur le Professeur Jean-Louis Connat,
Merci d'avoir accepté d'être membre de ce Jury.

Monsieur le Professeur Ermanno Candolfi,
Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et
d'avoir bien voulu participer à mon Jury.

Vous m'avez fait le grand honneur,
Veillez trouver ici, l'expression de ma sincère gratitude.

Je tiens également à remercier,

*Monsieur le Docteur Jean-Paul Klein,
directeur de l'unité Inserm U392,
de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour le travail de
Thèse.*

*Docteur Christian Bronner et Docteur Marie Schuller,
Leur support technique et leur compétence ont été une aide
précieuse pour la réalisation de ce travail.*

*Mes collègues Lili, Michaël, Kawtar, Eric, Pierre, Cécile et
Valérie ainsi que tous ceux qui ont participé de près ou de loin
à ce travail par leurs connaissances et leur apport technique.*

Toute l'équipe de l'Institut de Parasitologie pour leur amitié.

*Enfin, merci à toute ma famille et à tous mes amis, Votre
confiance, vos encouragements et votre soutien trouvent ici
tout le témoignage de ma profonde reconnaissance.*

SOMMAIRE

<u>SOMMAIRE</u>	1
<u>Liste des abréviations</u>	5
<u>INTRODUCTION</u>	7
I. Les mécanismes de régulation des lymphocytes T	
A) L'activation des lymphocytes T par le TCR	9
<u>Le TCR et le déclenchement du signal</u>	9
- <u>La structure du TCR</u>	9
- <u>Le corécepteur CD28</u>	11
<u>La signalisation intracellulaire du TCR</u>	12
- <u>La stimulation du TCR</u>	12
B) La régulation fonctionnelle des lymphocytes T	16
<u>L'expansion clonale : une implication de la prolifération cellulaire</u>	16
- <u>Les éléments régulateurs du cycle cellulaire</u>	16
- <u>La régulation du cycle cellulaire dans les lymphocytes T</u>	20
<u>La délétion clonale : une implication de l'apoptose</u>	23
- <u>Les mécanismes actifs de l'apoptose</u>	24
- <u>Les mécanismes passifs de l'apoptose</u>	27
II. L'ICBP90 et son rôle dans la régulation du cycle cellulaire	
<u>L'ICBP90 : Régulateur du gène TopoIIa</u>	32
<u>Les caractéristiques structurales de l'ICBP90</u>	35
- <u>Le gène de l'ICBP90</u>	35
- <u>La protéine ICBP90</u>	36
<u>Les caractéristiques fonctionnelles de l'ICBP90</u>	38
- <u>La localisation subcellulaire de l'ICBP90</u>	38
- <u>L'expression de l'ICBP90</u>	38
- <u>Les domaines fonctionnels de l'ICBP90</u>	38
<u>HYPOTHESE et OBJECTIFS</u>	41
<u>RESULTATS</u>	44
<u>Publication I</u>	45
<u>Mousli, M., Hofner, R., Abbadv, A. O., Monte, D., Jeanblanc, M., Oudet, P., Louis, B., and Bronner, C. ICBP90 belongs to a new family of proteins with an expression that is deregulated in cancer cells. Br J Cancer (2003) 89, 120-127</u>	

<i>Publication II :</i>	54
<u>Abbadv. A. O., Bronner. C., Trotzler. M. A., Hofner. R., Bathami. K., Muller. C. D., Jeanblanc. M., and Mousli. M. ICBP90 expression is downregulated in apoptosis-induced Jurkat cells. Ann N Y Acad Sci (2003) 1010. 300-303</u>	
<i>Publication III :</i>	59
<u>Trotzler. M. A., Bronner. C., Bathami. K., Mathieu. E., Abbadv. A. O., Jeanblanc. M., Muller. C. D., Rochette-Egliv. C., and Mousli. M. Phosphorylation of ICBP90 by PKA enhances topoisomerase IIα expression. Biochem Biophys Res Commun (2004) 319. 590-595</u>	
<i>Publication IV :</i>	66
<u>Jeanblanc. M., Mousli. M., Hofner. R., Bathami. K., Martinet. N., Abbadv. A. O., Siffert. J. C., Mathieu. E., Muller. C., and Bronner. C. The retinoblastoma gene and its product are targeted by ICBP90: a key mechanism in the G1/S transition during the cell cycle. Oncogene (2005). 1-9</u>	
<i>Publication V :</i>	76
<u>Abbadv. A. O., Bronner. C., Bathami. K., Muller. C. D., Jeanblanc. M., Mathieu. E., Klein. J. P., Candolfi. E., and Mousli. M. TCR pathway involves ICBP90 gene down-regulation via E2F binding sites. Biochem Pharmacol (2005) 70(40). 570-579</u>	

DISCUSSION ET PERSPECTIVES87

I. La famille ICBP90 : nouveaux régulateurs du cycle cellulaire88

<u>Le contrôle du cycle cellulaire par la famille ICBP90</u>	88
- <u>Par le contrôle de l'enzyme TopoIIα</u>	89
- <u>Par l'interaction avec la voie pRb/E2F</u>	90
<u>La dérégulation de l'expression de la famille ICBP90 dans les lignées cellulaires cancéreuses.</u>	92
<u>La famille ICBP90: un élément clé dans la cancérogenèse.</u>	93

II. La régulation de l'expression de l'ICBP90 dans les lymphocytes T94

<u>La stimulation du TCR contrôle l'expression de l'ICBP90</u>	94
<u>Le rôle de la voie pRb/E2F dans la répression de l'ICBP90 par le TCR</u>	96
<u>Le rôle des voies de signalisation du TCR</u>	96
- <u>La voie dépendante du Ca²⁺</u>	97
- <u>La voie dépendante de la PKC</u>	97
- <u>La coopération entre les voies du TCR</u>	98

III. Les rôles potentiels de l'ICBP90 dans l'activation des lymphocytes T.....99

<u>Par son activité E3 ligase</u>	99
<u>Par son rôle de facteur de transcription</u>	99
<u>Par son interaction dans le système HDAC7/Nur77</u>	100
<u>Par la liaison aux séquences CpG méthylées de l'ADN</u>	101

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....103

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ISSUS DE CE TRAVAIL113

***LISTE DES
ABREVIATIONS***

Abréviation	Signification
AICD	<i>Activation-Induced Cell Death</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
Caspase	<i>Cystein aspartate protease</i>
cdk	<i>Cyclin dependent kinase</i>
Fas-L	<i>Fas Ligand</i>
HAT	<i>Histone Acetyltransferase</i>
HDAC	<i>Histone Deacetylase</i>
ICBP90	<i>Inverted CCAAT-box Binding Protein of 90 kDa</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
MEF2	<i>Myocyte Enhancer Factor</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NIRF	<i>Np95/ICBP90 Ring Finger</i>
PHD	<i>Plant Homeo Domain</i>
PKA ou C	<i>Protein Kinase A ou C</i>
PMA	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>
pRb	<i>Protein of Retinoblastoma</i>
Ring	<i>Really Interesting Gene</i>
Sp1	<i>Stress Protein 1</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TopoII α	<i>Topoisomerase IIα</i>

INTRODUCTION

Préface

L'immunité cellulaire est l'ensemble des mécanismes permettant à l'organisme de développer des lymphocytes T effecteurs capables de le défendre contre les agressions, particulièrement celles représentées par les micro-organismes pathogènes. La production des lymphocytes T fonctionnels nécessite leur activation par le biais de leur récepteur à l'antigène (TCR).

La première partie de l'introduction abordera la fonction, la structure et la signalisation intracellulaire du TCR qui sont indispensables pour la compréhension de la fonction et l'activation des lymphocytes T. Ainsi, les différents mécanismes de régulation des lymphocytes T au cours de leur développement y compris l'expansion clonale, qui implique la prolifération cellulaire, et la délétion clonale, qui implique des processus apoptotiques. Bien que ces deux phénomènes impliquent des mécanismes régulateurs différents, ils partagent une caractéristique principale : leur déclenchement, suite à la stimulation du TCR, est dépendant de la régulation du cycle cellulaire.

L'ICBP90 (*Inverted CCAAT box Binding Protein of 90 kDa*) appartient à une nouvelle famille de protéines nucléaires impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et en particulier la transition G1/S. Cette transition est une étape obligatoire à l'entrée des lymphocytes T en phase de prolifération (expansion clonale). S'ils ne parviennent pas à la franchir, ils seront éliminés par des mécanismes apoptotiques (délétion clonale). Dans la deuxième partie de l'introduction, la découverte et les caractéristiques de l'ICBP90 ainsi que ses rôles présumés dans la régulation du cycle cellulaire seront détaillés.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons tenté d'élucider de nouveaux mécanismes de régulation des lymphocytes T impliquant l'ICBP90 comme élément de contrôle au cours du cycle cellulaire. Les objectifs de ces travaux sont de trois ordres : ❶ Mieux comprendre les rôles potentiels de l'ICBP90 au cours du cycle cellulaire et en particulier pendant la transition G1/S. ❷ Etudier la régulation de l'expression de l'ICBP90 dans les lymphocytes T activés par la stimulation du TCR. ❸ Envisager un modèle de régulation impliquant l'ICBP90 dans les lymphocytes T.

L'ensemble de ces études contribue à l'acquisition de nouvelles connaissances concernant les mécanismes de régulation des lymphocytes T.

I. Les mécanismes de régulation des lymphocytes T

Les lymphocytes T sont des cellules effectrices de l'immunité spécifique, leur fonction dépend de la synthèse d'un récepteur membranaire capable de reconnaître spécifiquement un antigène étranger. Leur récepteur pour l'antigène est appelé le TCR (*T Cell Receptor*). Au cours d'une réponse immunitaire, les antigènes stimulent les lymphocytes T en se fixant sur leur TCR. Cette liaison va déclencher une cascade d'événements intracellulaires, appelée activation des lymphocytes T, qui aboutit à la réalisation des programmes cellulaires de transcription des gènes ou de sécrétion de molécules solubles comme les interleukines (*IL*) (Favero et Lafont, 1998; He *et al.*, 2005; Huang et Wange, 2004).

A) L'activation des lymphocytes T par le TCR

Le TCR ne reconnaît que des antigènes protéiques associés à des molécules MHC sur les cellules présentatrices d'antigène (*APC: Antigen Presenting Cell*). Les APC sont des cellules diverses qui ont en commun la capacité d'exprimer les molécules du MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de classe I ou II (**Figure 1**). Les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B sont des APC qui portent les molécules MHC de classe II. Ces cellules peuvent endocyter les antigènes protéiques exogènes, les découper en peptides afin de les associer aux molécules MHC. L'ensemble migre vers la membrane cytoplasmique pour être présenté aux lymphocytes T. Toutes les cellules nucléées de l'organisme expriment les molécules MHC classe I et sont capables de présenter l'antigène étranger lors d'une infection ou lors de la cancérogenèse. Elles sont des cellules cibles pour les lymphocytes T cytotoxiques qui prennent en charge leur destruction (Janeway et Travers, 1997).

Le TCR et le déclenchement du signal

- La structure du TCR

Chaque molécule TCR est un hétérodimère associant deux chaînes (α et β) ou (γ et δ). Les deux chaînes, réunies par un pont disulfure, participent à la formation du site de reconnaissance du complexe MHC-antigène (**Figure 1**). De l'extrémité N-terminale vers la membrane cytoplasmique on décrit : un domaine variable renfermant 3 régions hypervariables (CDR1, CDR2 et CDR3) analogues à celles retrouvées dans le domaine V des chaînes des immunoglobulines, un domaine constant et une très courte région charnière où se

fait la liaison covalente entre les deux chaînes (**Figure 1**) (Huang et Wange, 2004; Janeway et Travers, 1997).

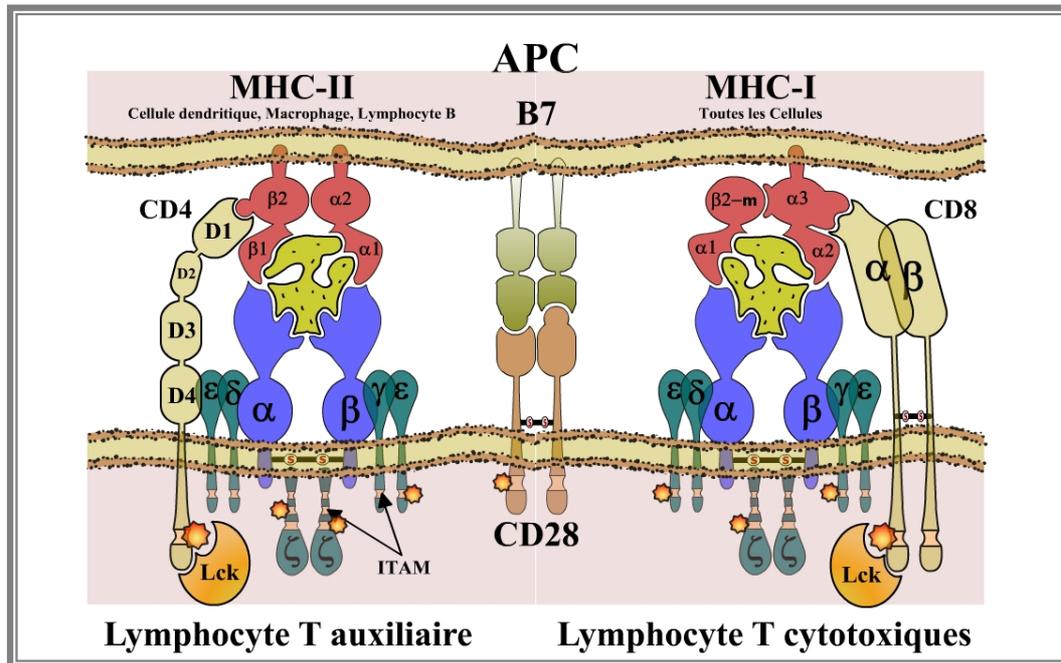


Figure 1. Le complexe TCR et ses co-récepteurs

Le TCR est une glycoprotéine de la membrane cytoplasmique des lymphocytes T, composé de deux unités (α et β). Le complexe CD3 est associé à ce récepteur et ses sous-unités sont organisées en deux hétérodimères ($\delta\epsilon$ et $\gamma\epsilon$) et un homodimère ($\zeta\zeta$). Elles portent toutes le motif ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) nécessaire à la transmission du signal du TCR. De plus, dans ce complexe il y a la molécule CD4 (dans le lymphocyte T auxiliaire) ou CD8 (dans le lymphocyte T cytotoxique). La molécule CD4 est un monomère qui contient quatre domaines de type immunoglobulinique (D1-4). La molécule CD8 est un hétérodimère formé d'une chaîne α et d'une chaîne β , chacune a un seul domaine variable, associées de manière covalente par un pont disulfure. Le CD4 et le CD8 sont nécessaires pour reconnaître la classe de MHC (*Major Histocompatibility Complex*) porté sur l'APC (*Antigen Presenting Cell*). Ces deux récepteurs sont associés à une protéine kinase, la Lck, nécessaire à la signalisation du TCR. L'activation des lymphocytes T nécessite un second signal, le signal costimulateur qui est délivré par la liaison du CD28 au B7. Le CD28 et B7 appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Le B7 est un homodimère dont chacune des chaînes a deux domaines (variable et constant). Le CD28 est un homodimère ayant un pont disulfure, dans lequel les chaînes ne possèdent qu'un seul domaine variable. (D'après (Janeway et Travers, 1997))

• La molécule CD3

La portion cytoplasmique du TCR ne compte que 5 acides aminés. Elle est trop courte pour transmettre le signal d'activation. De ce fait, les chaînes du TCR sont associées à la molécule CD3 qui a pour fonction de transmettre l'information perçue par le TCR à l'intérieur du lymphocyte T (Razzaq *et al.*, 2004). En effet, la molécule CD3 est un assemblage de 4 chaînes (γ , δ , ζ et η) (**Figure 1**) qui portent un nombre variable d'ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) dans leurs domaines cytoplasmiques. Un tel motif est nécessaire pour activer les protein tyrosine kinases (Huang et Wange, 2004; Razzaq *et al.*, 2004).

- **Les molécules coréceptrices CD4 et CD8**

La particularité de la reconnaissance, par le lymphocyte T, du peptide antigénique en association avec une des deux classes de MHC impose l'existence de corécepteurs. Associés au complexe TCR-CD3, ces corécepteurs sont les molécules CD4 et CD8 capables de distinguer les deux classes du MHC (**Figure 1**) (Janeway et Travers, 1997). Grâce à elles on distingue deux populations principales de lymphocytes T:

- * Les lymphocytes T *auxiliaires* exposant la molécule CD4 qui est une glycoprotéine monocaténaire transmembranaire de 54 kDa dont la portion extracellulaire comporte 4 domaines. La molécule CD4 est capable de se lier à la partie invariante du MHC de classe II. Les antigènes présentés sont des antigènes exogènes qui ont été endocytés par les APCs (**Figure 1**).

- * Les lymphocytes T cytotoxiques exposant la molécule CD8 qui est un hétérodimère constitué de deux chaînes (α et β) liées de manière covalente. Ces sont des glycoprotéines transmembranaires distinctes mais de poids moléculaire identique (32 kDa) possédant un seul domaine extracellulaire. Ce domaine reconnaît la partie invariante des MHC de classe I (**Figure 1**). Les antigènes présentés sont des antigènes endogènes, produits par toutes les cellules nucléées de l'organisme. Cette reconnaissance est le premier signal d'activation et un deuxième signal permet la destruction de ces cellules lors d'une infection ou de cancérogenèse (Janeway et Travers, 1997).

- **Le corécepteur CD28**

Les signaux du récepteur CD28 sont nécessaires pour l'activation complète et la prolifération des lymphocytes T (June *et al.*, 1990). Sans ces signaux, la stimulation du TCR provoque l'anergie et la mort cellulaire par apoptose (Appleman et Boussiotis, 2003). CD28 est un hétérodimère glycoprotéique capable d'interagir avec des ligands (B7.1 et B7.2), exprimés sur les APCs. Cette interaction augmente la synthèse de l'IL-2 et par conséquent active la prolifération des lymphocytes T (**Figure 1**) (Chambers, 2001). Par ailleurs, ce corécepteur ne montre aucune activité enzymatique intrinsèque évidente. Cependant il peut être phosphorylé sur des résidus tyrosines dans sa portion cytoplasmique, permettant ainsi la fixation des différentes molécules impliquées dans la transduction du signal (Chambers, 2001).

La signalisation intracellulaire du TCR

La stimulation du TCR va déclencher une cascade d'évènements intracellulaires appelée activation cellulaire. La transmission de l'information de la membrane au noyau se fait en cascade au moyen de phosphorylation des protéines cytoplasmique et implique des messagers secondaires (Favero et Lafont, 1998). La conséquence finale de cette activation est la génération de protéines capables de se lier à l'ADN, les facteurs de transcription (Huang et Wange, 2004; Razzaq *et al.*, 2004).

- La stimulation du TCR

Le déclenchement de la signalisation du TCR nécessite la fixation de l'antigène et l'agrégation des sous-unités du TCR. Seuls des antigènes multivalents sont capables de délivrer un message d'activation. Cette agrégation des TCR est assurée artificiellement et de façon non spécifique soit par des anticorps visant les domaines non variables du complexe TCR comme les anti-CD3 soit par des lectines comme la phytohémagglutinine (PHA) (**Figure 2**). Les lectines sont des glycoprotéines capables de se lier spécifiquement à des chaînes oligosaccharidiques du TCR. Ces stimuli sont capable de provoquer *in vitro* certains phénomènes ressemblant à des réactions immunitaires provoquées par la stimulation du TCR (prolifération et apoptose) (Boonen *et al.*, 1999b; Ruiz-Ruiz *et al.*, 1995).

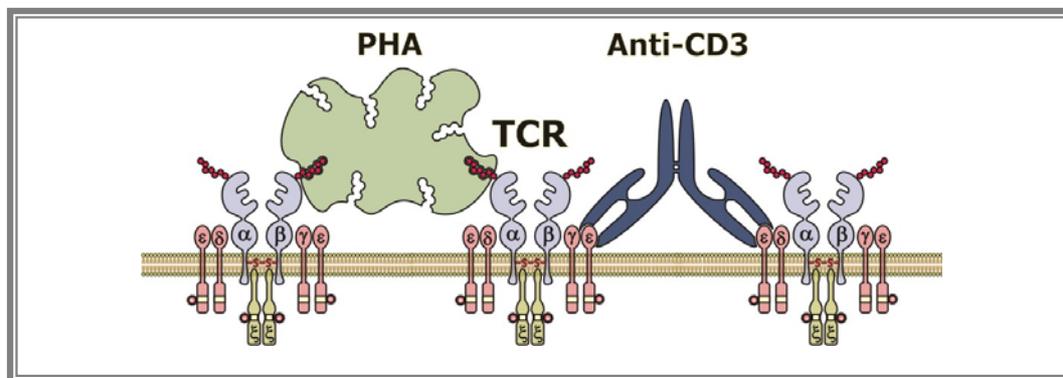


Figure 2. L'agrégation artificielle du TCR

L'agrégation des molécules du TCR est induite artificiellement par la phytohémagglutinine (PHA) qui reconnaît les groupements oligosaccharidiques du récepteur, ou par de l'anti-CD3 qui reconnaît les sous-unités (ϵ) du CD3.

L'agrégation des domaines extracellulaires des sous-unités de reconnaissance du TCR, entraîne l'agrégation des sous-unités du CD3 qui sont impliquées dans la signalisation. Par la suite, la transduction des signaux du TCR se fait en trois étapes :

• Etape 1 : La phosphorylation des ITAMs

Les tyrosines des ITAMs des sous-unités de CD3 agrégées sont d'abord phosphorylées par des kinases de la famille Src, comme Fyn et Lck. Les kinases Src sont des protéines tyrosine kinases capables de phosphoryler des protéines sur des résidus tyrosine. Les lymphocytes T expriment principalement Lck qui se lie à l'extrémité cytoplasmique du récepteur CD4 ou CD8, selon le type de lymphocyte T (**Figure 1, page 10**) (Favero et Lafont, 1998). Suite à la stimulation du TCR, cette kinase est dirigée, par son récepteur porteur, vers des structures particulières de la membrane riches en cholestérol et en glycosphingolipides, qu'on appelle les microdomaines (He *et al.*, 2005).

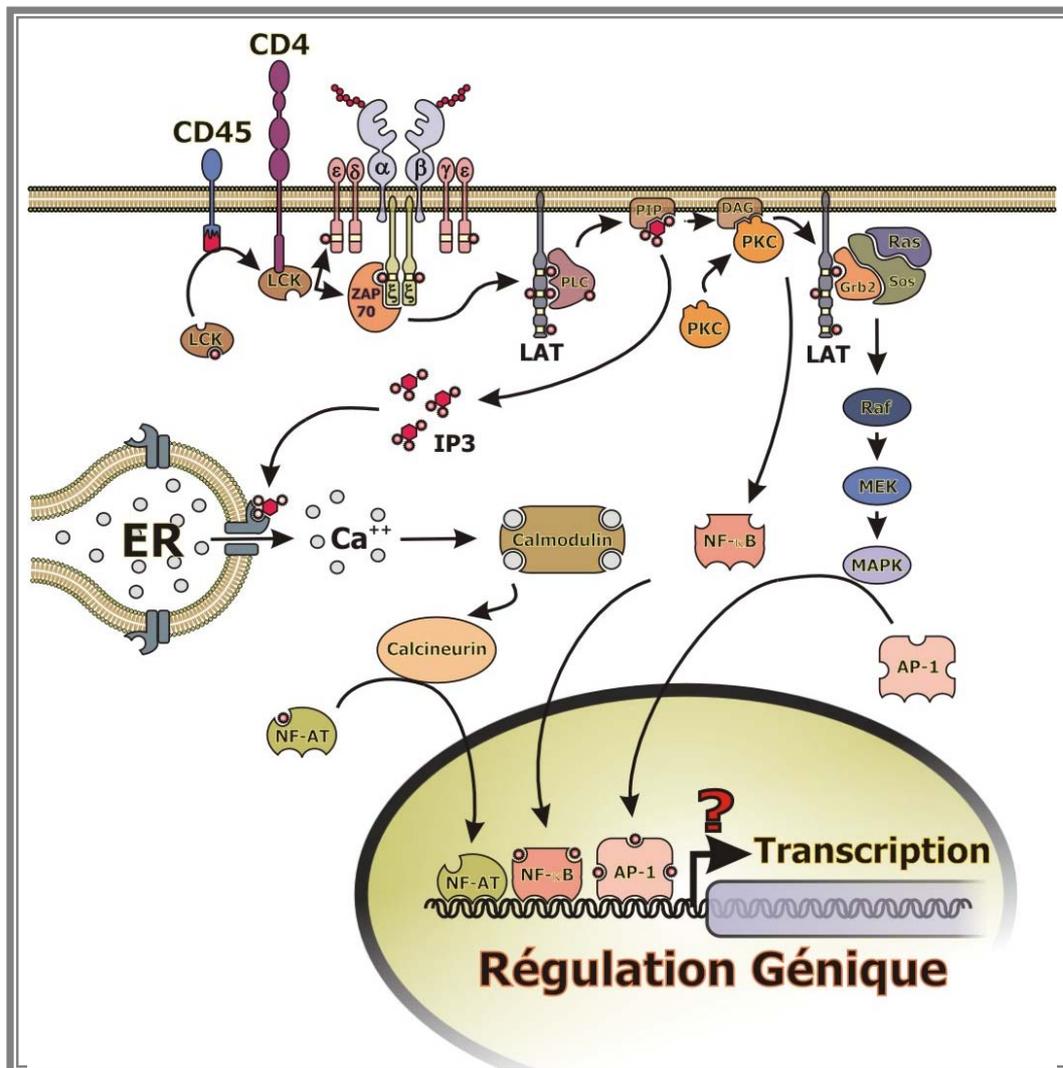


Figure 3. Les voies de signalisation du TCR

Le premier événement biochimique suivant la stimulation du TCR est l'activation des protéines tyrosine kinases des familles Src (Lck) et Syk (Zap-70). Le résultat de cette cascade de phosphorylation est l'activation de la PLC γ 1 (*Phospholipase C* γ 1) qui catalyse l'hydrolyse de PIP2 (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) produisant le DAG (*Diacylglycerol*) et IP3 (*Inositol 1,4,5-triphosphate*). Le DAG active la PKC qui transmet le signal d'activation à la voie MAPK. En parallèle, l'IP3 libère du Ca²⁺ du réticulum endoplasmique (*RE*) en se liant à son récepteur canal.

Le Ca^{2+} libre lie et active la calmoduline qui, à son tour, active la calcineurine. L'effet final de ces deux voies est l'activation des facteurs de transcription, comme NF-AT, NF- κ B et AP-1, qui sont responsables de la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans l'activation du lymphocyte T. (D'après (Favero et Lafont, 1998; Razzaq *et al.*, 2004))

L'agrégation des TCR par l'antigène les concentre aussi dans les microdomaines, riches en Lck et en molécules impliquées dans les premières étapes de la signalisation (He *et al.*, 2005). Après avoir été activée par le récepteur CD45, Lck déclenche les premiers événements de la cascade de signalisation en phosphorylant les ITAMs de la molécule CD3 (**Figure 3**) (Hivroze, 2005; Huang et Wange, 2004).

• Etape 2 : L'activation des kinases de la famille Syk

Dans un deuxième temps, les tyrosines phosphorylées des ITAMs offrent des sites de recrutement pour d'autres kinases comme celles de la famille Syk qui comprend deux membres, Syk et ZAP-70 (*Zeta-chain-Associated Protein of 70 kDa*) (**Figure 3**). ZAP-70, exprimée essentiellement dans les lymphocytes T et les cellules NK, est une protéine clé de signalisation du TCR (Chu *et al.*, 1998; Hivroze, 2005).

• Etape 3 : L'activation des voies de signalisation

Dans un troisième temps, ZAP-70 activée phosphoryle à son tour des molécules dépourvues d'activité catalytique qu'on appelle les molécules adaptatrices comme LAT (*Linker for Activation of T cells*), Grb2 (*Growth Receptors Binding protein 2*) et SLP-76 (*SH2 domain-containing Leukocyte Protein of 76 kDa*). Ces molécules adaptatrices ont pour fonction d'assembler les complexes moléculaires responsables de la signalisation (**Figure 3**) (Hivroze, 2005; Huang et Wange, 2004). Fixée sur LAT, la PLC γ 1 (*Phospholipase C γ 1*) est alors activée par phosphorylation, ce qui lui permet de cliver le PIP₂ (*Phosphatidylinositol 4,5-bisPhosphate*) en DAG (*Diacylglycerol*) et l'IP3 (*Inositol 1,4,5-triPhosphate*) (**Figure 3**) (He *et al.*, 2005).

* La voie dépendante du Ca^{2+}

Après liaison à ces récepteurs sur la membrane du réticulum endoplasmique, l'IP3 stimule la sortie transitoire du Ca^{2+} hors du réticulum. Dans le cytoplasme, l'augmentation de la concentration du Ca^{2+} stimule, entre autres, l'activité de la calmoduline et la calcineurine. L'activité phosphatase de la calcineurine est alors stimulée, ce qui lui permet de déphosphoryler le facteur de transcription NF-AT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) qui peut ainsi passer la membrane nucléaire et activer la transcription des gènes de cytokines (**Figure 3**) (Favero et Lafont, 1998).

* La voie dépendante de la protéine kinase C

Le DAG est responsable de la phosphorylation et de l'activation des PKCs (*Protein Kinase C*). C'est une famille de sérine/thréonine kinases jouant un rôle critique dans la régulation de la différenciation et de la prolifération de plusieurs types cellulaires (Das *et al.*, 2000; Traore *et al.*, 2005). Deux types de PKC sont identifiés: Ca^{2+} dépendant et indépendant. La PKC θ , une nouvelle isoforme indépendante du Ca^{2+} , est exprimée sélectivement dans les lymphocytes T. C'est le seul membre de cette famille qui se colocalise avec le complexe TCR/CD3 stimulé (Isakov et Altman, 2002). En effet, après la stimulation du TCR, la PKC θ subit une translocation du cytoplasme vers les microdomaines de la membrane cellulaire, contenant les complexes TCR/CD3 stimulés, où elle sera activée par le DAG (**Figure 3**) (Altman et Villalba, 2003). Cette étape est reproductible dans les lymphocytes T activés par le PMA (*Phorbol Myristate Acetate*) qui est un homologue structural du DAG (Baier *et al.*, 1994). La translocation de la PKC θ est l'évènement clé dans l'activation de NF- κ B (*Nuclear Factor κ B*) qui nécessite également l'activation de la calcineurine (Trushin *et al.*, 1999). Cette coopération synergétique entre la PKC θ et la calcineurine est un phénomène général dans l'activation des lymphocytes T (Villalba *et al.*, 1999; Werlen *et al.*, 1998). Cependant, l'activation de la PKC θ induit aussi la transcription du gène de l'IL-2 par l'intermédiaire du complexe AP-1 (*Activating Protein 1*) (Isakov et Altman, 2002). Ceci suggère une relation entre la PKC θ et la voie MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), puisque AP-1 est la cible majeure de cette voie (Baier-Bitterlich *et al.*, 1996). En effet, la voie MAPK, activée également par le DAG, implique les protéines Ras qui font partie des petites GTP-ases intracellulaires de 21 kDa (**Figure 3**). Elles existent sous deux formes : une forme inactive, liée au GDP et une forme active liée au GTP (Pearson *et al.*, 2001). La molécule adaptatrice Grb2 joue un rôle essentiel dans l'activation de la voie Ras (Favero et Lafont, 1998). Une fois fixée à la membrane et phosphorylée par ZAP-70, Grb2 permet le recrutement d'un facteur d'échange appelé Sos (*Son Of Sevenless*) (Huang et Wange, 2004). Sos active ensuite les protéines Ras qui déclenchent l'activation en cascade de kinases dont les substrats finaux sont les MAPK. Celles-ci peuvent alors entrer dans le noyau où elles activent des facteurs de transcription comme AP-1 (**Figure 3**) (Pearson *et al.*, 2001).

Les facteurs de transcription activés par les voies de signalisation du TCR ont pour rôle d'activer ou d'inhiber la transcription de plusieurs gènes, parmi lesquels ceux responsables de la synthèse des protéines (cytokines, récepteurs de cytokines, kinases et cyclines) intervenant dans la réponse finale du lymphocyte T. Cependant, l'engagement du TCR par l'antigène va pouvoir activer des réponses à première vue contradictoires : progression ou arrêt de cycle cellulaire, différenciation, prolifération, anergie lymphocytaire (état actif de non-réponse) ou même mort cellulaire par l'apoptose (Green *et al.*, 2003).

B) La régulation fonctionnelle des lymphocytes T

L'expansion clonale et la délétion clonale, ces deux phénomènes contradictoires sont les plus importants non seulement dans la régulation des lymphocytes T mais aussi dans la régulation de tout le système immunitaire (Van Parijs et Abbas, 1998).

L'expansion clonale : une implication de la prolifération cellulaire

Les pro-lymphocytes T qui quittent le thymus et entrent en circulation sont des lymphocytes T inactifs, dits au repos c'est à dire en phase G0 du cycle cellulaire. Ces lymphocytes T naïfs, qui n'ont pas encore rencontré d'antigène étranger, repartent dans le « pool » de lymphocytes circulant continuellement entre le sang et la lymphe (Green *et al.*, 2003; Van Parijs et Abbas, 1998; van Parijs *et al.*, 1998). Suite à la rencontre avec l'antigène étranger, le lymphocyte T naïf commence son expansion clonale, en d'autres termes la prolifération cellulaire. Ainsi, il sort de la phase G0 et entre dans le cycle cellulaire afin de se multiplier et produire suffisamment de lymphocytes T spécifiques à l'agent pathogène et capables de mener à bien la réponse immunitaire contre lui. Cependant, et en l'absence d'activation par un antigène, un lymphocyte T naïf a une durée de vie relativement courte et meurt au bout de 5 à 7 semaines par des phénomènes apoptotiques (Van Parijs et Abbas, 1998). En raison de son rôle dans la régulation fonctionnelle des lymphocytes T et en particulier dans le phénomène de l'expansion clonale, le cycle cellulaire ainsi que ses mécanismes de régulation, en général ou dans le lymphocyte T, seront abordés en détail.

- Les éléments régulateurs du cycle cellulaire

D'une manière générale, pour qu'une cellule progresse dans le cycle cellulaire, elle doit franchir les phases G1 (Gap1), S (synthèse de l'ADN) et G2 (Gap 2) qui précède la phase M (mitose) (*Figure 4*).

• Les Complexes cycline-cdk

La régulation du cycle cellulaire nécessite l'action coordonnée de complexes protéiques constitués de cyclines et de leurs partenaires, les cdk (*Cyclin-Dependent protein Kinase*). Au niveau moléculaire, le passage du point de contrôle G1/S nécessite l'activation d'au moins deux types de complexes cycline-cdk, cycline D-cdk4/6 et cycline E/A-cdk2 qui engagent les

cellules à passer de la phase G1 à la phase S (**Figure 4**) (Hengstschlager *et al.*, 1999). Cependant, un autre point de contrôle en G2/M est sous le contrôle du complexe cycline B-cdk1 (Muller, 1995). Par ailleurs, les cdks sont activées par phosphorylation par les CAKs (*Cyclin Activated Kinases*) et par déphosphorylation par la famille de phosphatases Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B et Cdc25C) (Muller, 1995).

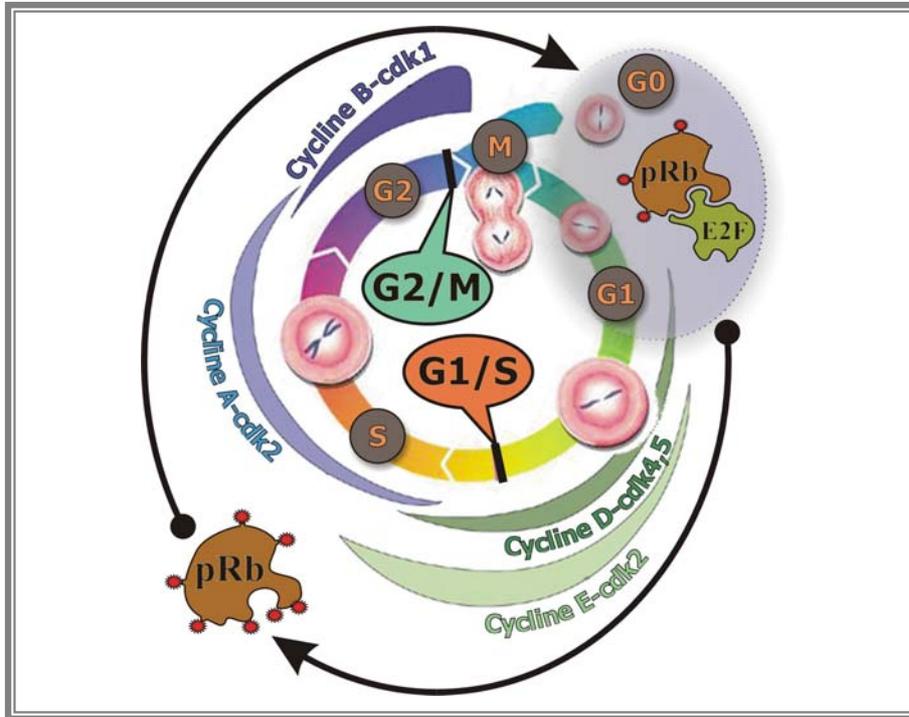


Figure 4. La régulation du cycle cellulaire

Durant la phase S, une copie du matériel génétique est synthétisée et durant la phase M, les composants cellulaires se répartissent dans deux cellules filles identiques. Les deux autres phases, G1 et G2 sont des périodes pendant lesquelles la cellule se prépare à accomplir les phases S et M. Les complexes cycline-cdk sont responsables de la progression dans le cycle cellulaire. Le domaine d'activité pour chacun des complexes cycline-cdk est indiqué par des arcs. Un des substrats majeurs des complexes cycline-cdk est pRb. Dans les phases G0 et G1, pRb sous forme hypophosphorylée se lie au facteur E2F afin de former le complexe inhibiteur pRb/E2F. A la fin de la phase G1, la phosphorylation de pRb par les complexes cycline-cdk libère le facteur E2F et active la transcription des gènes contrôlés par le facteur E2F, dont les produits sont nécessaires à l'entrée dans le cycle cellulaire. La position des deux points de contrôle (G1/S) et (G2/M) est indiquée. Dans ces deux points, des mécanismes de surveillance arrêtent la progression du cycle cellulaire en cas d'anomalie et activent des processus de réparation de l'ADN ou de mort cellulaire par apoptose.

• Les inhibiteurs du cycle cellulaire

Les complexes cycline-cdk sont sous le contrôle de leurs inhibiteurs physiologiques, les CKIs (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors*) appartenant aux familles INK4 (comme p16^{INK4a} et p14^{ARF}) et Cip/Kip (comme p21^{Waf1/Cip1} et p27^{Kip1}) (Muller, 1995). La protéine p16^{INK4a} se lie spécifiquement aux kinases cdk4 et cdk6, qu'il inhibe en empêchant leur liaison à la cycline

D (Ortega *et al.*, 2002). La protéine p27^{Kip1} empêche la progression du cycle cellulaire en phase S en bloquant les complexes cycline E/A-cdk2 (Muller, 1995). De plus, cet inhibiteur est un régulateur essentiel dans la prolifération des lymphocytes T (Mohapatra *et al.*, 2001; Shen et Kaplan, 2002). La protéine p21^{Waf1/Cip1}, possède une spécificité plus large et inhibe aussi l'activité du complexe cycline B-cdk1. C'est l'un des principaux médiateurs de l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à divers stress cellulaires et son promoteur est en particulier activé par la famille p53 (Zhu *et al.*, 1998).

• La voie pRb/E2F

Le contrôle de la transition G1/S qui engage irréversiblement la cellule dans le cycle cellulaire est sous la dépendance de la voie pRb/E2F (**Figure 5**) (*pRb* : *protein of Retinoblastoma*) (Nevins, 2001).

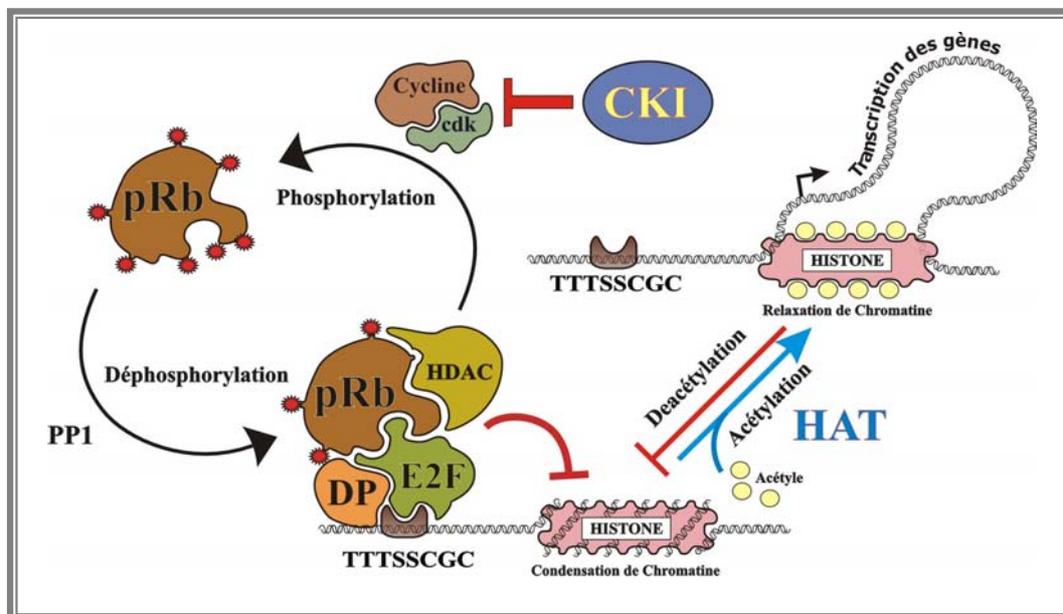


Figure 5. La voie pRb/E2F

Les histones sont des protéines qui forment une sorte de « bobine » autour de laquelle s'enroule l'ADN cellulaire. La modification de ces protéines par acétylation (ajout de groupements acétyles CH_3CO), par les enzymes HAT (*Histone Acetyltransferase*) convertit la chromatine condensée en une structure plus relâchée, et module par conséquent l'expression des gènes en permettant l'accès aux régulateurs transcriptionnels. En revanche, la désacétylation (enlèvement des groupements acétyles) des histones par les enzymes HDAC se traduit par un enroulement trop serré de l'ADN réduisant l'accès des facteurs de transcription à leurs sites de fixation et ainsi inhibant l'expression des gènes concernés. Le complexe pRb (hypophosphorylée)/E2F recrute l'enzyme HDAC (*Histone Deacetylase*) au niveau des gènes possédant les sites de liaison au facteur E2F (TTTSSCGC, S = C ou G) dans leurs promoteurs causant ainsi l'inhibition de leur expression. Avec l'entrée dans le cycle cellulaire, la phosphorylation de la pRb, par les complexes cycline-cdk, entraîne la dissociation du complexe pRb/E2F et la transcription de ces gènes. Par ailleurs, les complexes cycline-cdk sont sous le contrôle de leurs inhibiteurs physiologiques, les CKI (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors*).

La famille E2F est composée de six protéines activées par hétérodimérisation avec les protéines DP (DP1 ou DP2). Les facteurs E2F contrôlent l'expression des enzymes de la synthèse, la réplication et la réparation de l'ADN ainsi que les différents effecteurs des points de surveillance et plusieurs protéines pro-apoptotiques (Ren *et al.*, 2002). En outre, les protéines de la famille pRb (pRb, p130 et p107), en se fixant aux facteurs E2F, bloquent d'une façon générale leur activité transcriptionnelle dans les cellules quiescentes ou en début de la phase G1. Cette inhibition de la transcription s'exerce également par recrutement de HDAC (*Histone Deacetylase*) qui a pour effet de compacter la chromatine et de la rendre inaccessible aux facteurs de transcription (**Figure 5**) (Harbour et Dean, 2000). Dans les cellules quiescentes en phase G0, les complexes E2F-DP sont inactivés par leur liaison à p130, celle-ci se trouvant substituée par pRb en phase G1 (Harbour et Dean, 2000). Pour assurer la transition G1/S, les complexes cycline D-cdk4/6 et cycline E-cdk2 phosphorylent pRb, ce qui entraîne le blocage de l'interaction pRb/E2F et permet à E2F d'activer l'expression des gènes codant pour des protéines essentielles à l'entrée en phase S et à la réplication de l'ADN (Ren *et al.*, 2002). Par ailleurs, pendant les phases S et G2, les complexes cycline A-cdk2 et cycline B-cdk1 maintiennent la phosphorylation et l'inactivation de pRb, jusqu'au moment où les cellules sortent de la mitose (**Figure 4, page 17**). A l'inverse, les CKI, comme p16^{INK4a}, p27^{Kip1} et p21^{Waf1/Cip1}, maintiennent pRb dans son état répresseur hypophosphorylé en bloquant l'activité kinase des complexes cycline-cdk. Par ailleurs, les niveaux des cyclines ou de leurs inhibiteurs sont contrôlés négativement, à des points précis du cycle cellulaire, par une dégradation qui implique l'ubiquitinylation et la protéolyse par le protéasome (Muller, 1995).

• Rôle de l'ubiquitinylation dans le cycle cellulaire

La dégradation des protéines par le système ubiquitine/protéasome apparaît essentielle pour la régulation du catabolisme de nombreuses protéines impliquées dans le cycle cellulaire. Pour résumer, l'ubiquitinylation d'une protéine nécessite généralement l'intervention successive de deux, voire dans certains cas, de trois étapes enzymatiques impliquant les enzymes E1, E2 et E3, qui aboutissent à la formation d'une liaison peptidique entre l'ubiquitine et une lysine du substrat (**Figure 6**) (Di Fiore *et al.*, 2003).

Le premier type d'ubiquitinylation et le mieux caractérisé est la poly-ubiquitinylation qui induit la dégradation des protéines cibles par le protéasome par un processus appelé le plus souvent « voie ubiquitine protéasome ». Les protéines cibles sont liées à une chaîne d'ubiquitines et ce complexe est reconnu puis hydrolysé par le protéasome (**Figure 6**). Cette voie joue un rôle important dans diverses fonctions cellulaires telles que la transduction du

signal, la progression du cycle cellulaire et l'apoptose du lymphocyte T (Mueller, 2004). Le second type, la mono-ubiquitinylation, est impliquée dans l'endocytose, la réparation de l'ADN et l'activation des kinases et des facteurs de transcription (Di Fiore *et al.*, 2003).

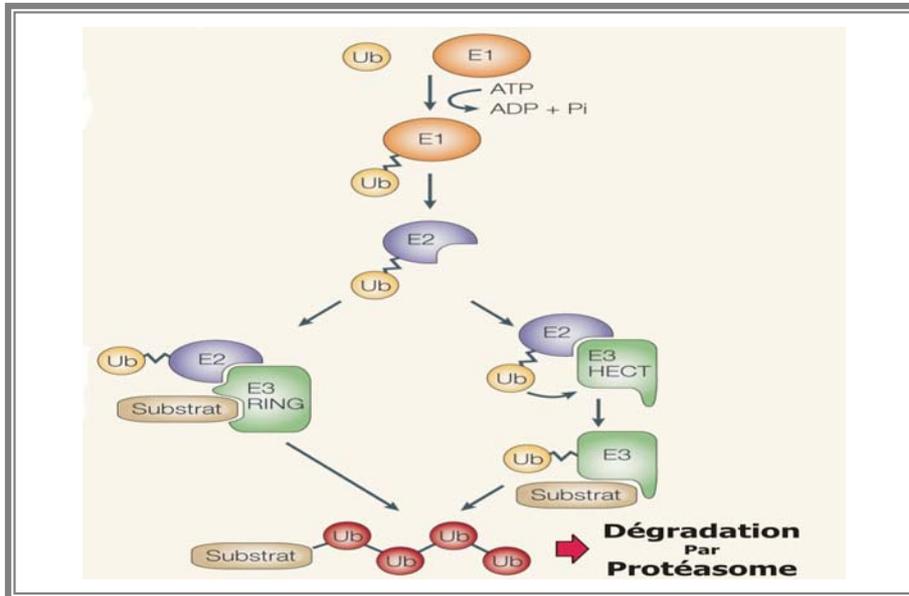


Figure 6. Les mécanismes de l'ubiquitinylation

L'ubiquitine est un polypeptide de 76 acides aminés, qui se lie de manière covalente à une protéine cible destinée à être dégradée par une cascade enzymatique complexe ; Étape 1: activation de l'ubiquitine par liaison covalente à l'enzyme d'activation E1 en présence d'ATP. Étape 2: transfert de l'ubiquitine sur l'enzyme de conjugaison E2. Ensuite, une ubiquitine ligase E3 transfère l'ubiquitine au substrat. Il existe deux types distincts d'enzyme ubiquitine ligase E3. L'enzyme E3 avec un domaine HECT (*Homologous to E6AP C-Terminus*) qui reçoit l'ubiquitine transférée de E2, le transmettant après au substrat, et l'enzyme E3 à domaine RING qui catalyse directement le transfert de l'ubiquitine liée à E2 au substrat. Les substrats ainsi marqués par l'ubiquitine seront dégradés par le protéasome. (D'après (Di Fiore *et al.*, 2003))

- La régulation du cycle cellulaire dans les lymphocytes T

Dans les lymphocytes T, la progression du cycle cellulaire de la phase G1 vers la phase S nécessite une forte expression des cyclines D (Boonen *et al.*, 1999b). Au repos, ces cyclines ne sont pas exprimées, mais leur expression est activée à la suite de la stimulation du TCR (**Figure 7**). Il existe trois cyclines de cette famille (D1, D2 et D3) capables de former des complexes actifs avec cdk4 et cdk6. Les lymphocytes T expriment principalement la cycline D3 et de façon moins importante la cycline D2, mais sont dépourvus de cycline D1. Après la stimulation du TCR et selon l'état d'activation du lymphocyte T, deux mécanismes de régulation du cycle cellulaire sont distingués:

• La régulation du cycle cellulaire dans les lymphocytes T au repos

Dans ce contexte, la stimulation du TCR active les gènes codant les cyclines D2 et D3. Ce phénomène se déroule du début au milieu de la phase G1 (*Figure 7*).

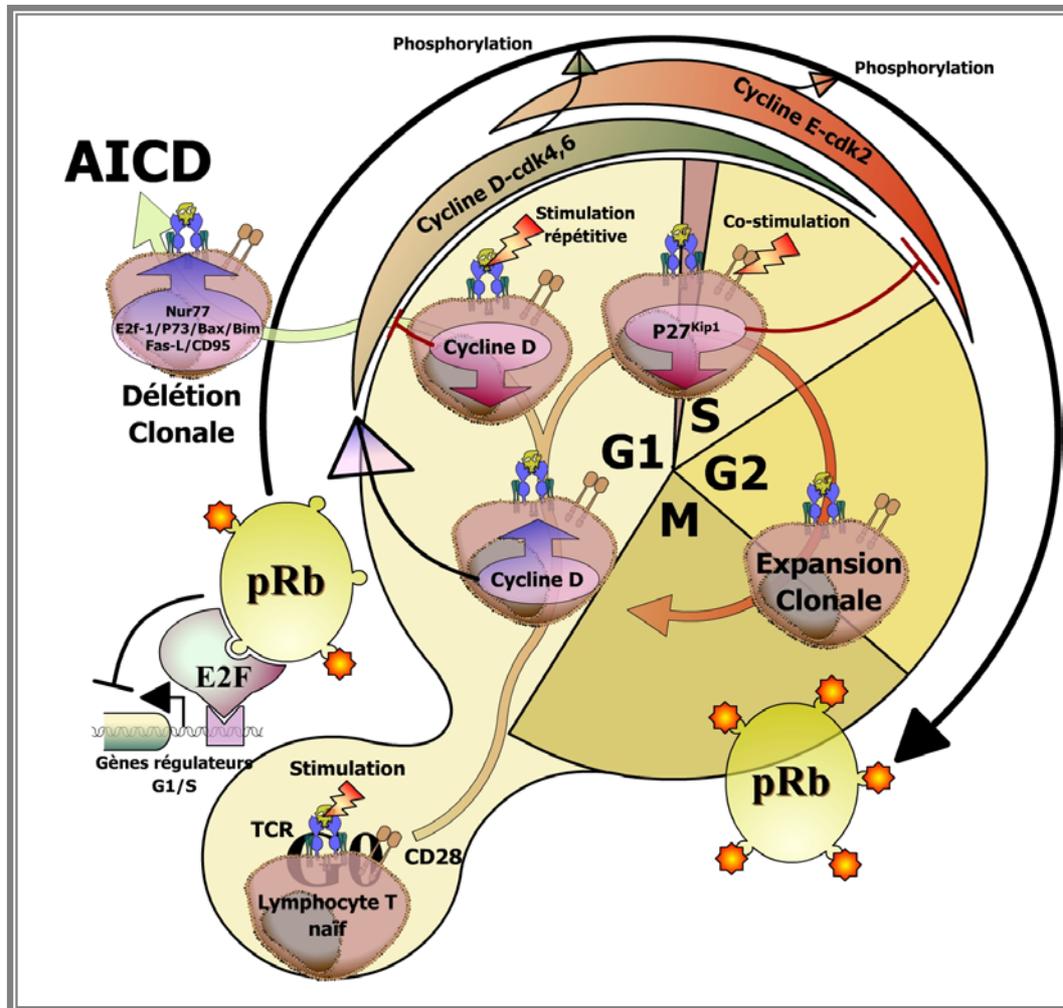


Figure 7. La régulation du cycle cellulaire des lymphocytes T

Les lymphocytes T naifs sont au stade G0 du cycle cellulaire. Lorsqu'ils rencontrent un antigène étranger, ils entrent en phase G1 et commencent à exprimer les cyclines D nécessaires à la formation des complexes cycline D-cdk4/6. Ces complexes phosphorylent la pRb et dissocient son complexe inhibiteur permettant ainsi l'expression des gènes régulateurs du cycle cellulaire. Pour franchir le point de contrôle et passer vers la phase S, le lymphocyte T reçoit un deuxième signal transmis par la stimulation de co-récepteur CD28. Celle-ci mène à la diminution du niveau de p27^{Kip1} et par conséquent active le complexe cycline E-cdk2 qui assure la transition G1/S et l'entrée en phase de prolifération. Ainsi, le lymphocyte T activé se multiplie afin de produire suffisamment de cellules spécifiques à cet antigène étranger et capables de mener à bien la réponse immunitaire contre lui (Expansion Clonale). En revanche, sans la costimulation par CD28 et en présence d'une stimulation inappropriée du TCR, stimulation répétitive, le niveau des cyclines D diminue ce qui entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 suivi par l'AICD (Délétion Clonale). Cette dernière est la conséquence de l'accumulation dans la cellule des protéines pro-apoptotiques telles que Fas-L, p73, Nur77, Bim et Bax. (D'après les résultats de (Boonen *et al.*,

1999b; Bouillet et Strasser, 2002; Cao *et al.*, 2004; Green *et al.*, 2003; Lissy *et al.*, 2000; Lissy *et al.*, 1998; van Oirschot *et al.*, 2001))

De plus, l'expression des cyclines D dans les lymphocytes T augmente considérablement de façon dose et temps dépendant suite à une costimulation par l'IL-2 (Turner, 1993). Cependant, les signaux du TCR ne sont pas suffisants à eux seuls pour activer tous les complexes cycline-cdk nécessaires à la transition G1/S. Ceci s'explique principalement par le taux élevé de p27^{Kip1} qui se lie au complexe cycline E-cdk2 et cause son inactivation dans le lymphocyte T quiescent. Pour cette raison, un deuxième signal comme celui fourni par CD28 ou l'IL-2 est requis pour bloquer cet inhibiteur, permettant ainsi la progression dans le cycle cellulaire (**Figure 7**) (Firpo *et al.*, 1994).

• La régulation du cycle cellulaire dans les lymphocytes T activés

Contrairement aux lymphocytes T au repos, dans les lymphocytes T activés et en prolifération, comme dans les lymphocytes T leucémiques qui ne dépendent plus du TCR pour leur prolifération, l'effet de la stimulation du TCR induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1, suivi d'une sorte d'apoptose appelée AICD (*Activation-Induced Cell Death*) (**Figure 7**). Des études récentes ont montré que cette mort cellulaire se déroule à la fin de la phase G1 et de façon dépendante de pRb (Lissy *et al.*, 1998). Contrairement aux cyclines D1 et D2, qui ne sont pas exprimées dans les lymphocytes T leucémiques tels que les cellules Jurkat, la cycline D3 est impliquée principalement dans ce phénomène. Cette cycline est exprimée en permanence et de façon très abondante dans les lymphocytes T en prolifération. Ceci s'explique par son rôle dans la régulation du cycle cellulaire, en particulier dans la transition G1/S. Lorsque le TCR est stimulé de manière inappropriée, cas d'une stimulation répétitive par exemple, l'expression de la cycline D3 diminue rapidement causant une réelle chute de l'activité kinase des complexes cycline D3-cdk4/6 (**Figure 7**). En conséquence, en l'absence de ces complexes, pRb reste dans sa forme inhibitrice hypophosphorylée et les cellules restent piégées en phase G1. Le lymphocyte T, perdant ainsi toute chance d'entrer dans le cycle cellulaire, subit la mort cellulaire par AICD. Par ailleurs, cette effet est obtenu par la stimulation de la voie de la PKC dans les cellules Jurkat en utilisant le PMA (Boonen *et al.*, 1999b).

L'activation des lymphocytes T est également inhibée par les agents qui activent la voie dépendante de la PKA (*Protein Kinase A*), telle que la prostaglandine E (*PGE*) (van Oirschot *et al.*, 2001). En effet, dans les cellules eucaryotes, le second messenger AMPc (*3', 5'-Adenosine Monophosphate*) (AMPc) et la PKA représentent un système majeur de transduction du signal.

L'AMPc est produit par l'adénylate cyclase en réponse à une variété de signaux extracellulaires comme des facteurs de croissance, des hormones (comme PGE) et des neurotransmetteurs. La voie de signalisation dépendante de l'AMPc régule diverses fonctions cellulaires comme la prolifération cellulaire et l'apoptose (Lalli et Sassone-Corsi, 1994). Dans les cellules Jurkat, la stimulation de la PKA induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 similaire à celui obtenu par la stimulation du TCR. En effet, cet arrêt se produit par une inhibition de l'expression de la cycline D3 et une augmentation de niveau de p27^{kip1} (van Oirschot *et al.*, 2001). Dans ce contexte, les travaux du groupe de Medema ont montré que la surexpression de la cycline D3 exogène dans les lymphocytes T activés, par la stimulation du TCR, de la PKC ou même de la PKA, s'oppose non seulement au blocage en phase G1 mais protège aussi les cellules de l'apoptose (Boonen *et al.*, 1999b; van Oirschot *et al.*, 2001).

• L'effet de la costimulation par le CD28 sur le cycle cellulaire

Dans les lymphocytes T naïfs, bien que la stimulation unique du TCR conduise à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1, la costimulation du corécepteur CD28 permet aux cellules de traverser la transition G1/S et d'entrer dans le cycle cellulaire (Boonen *et al.*, 1999a). Deux voies sont engagées dans cette activation : la première est l'amélioration de l'expression de la cycline D3 activée par le TCR. La deuxième est la diminution de l'expression de l'inhibiteur p27^{Kip1}. Ces deux voies aboutissent à la phosphorylation de pRb et donc à l'inactivation du complexe inhibiteur du cycle cellulaire pRb/E2F (**Figure 7**) (Boonen *et al.*, 1999a).

La délétion clonale : une implication de l'apoptose

Contrairement à l'expansion clonale, la délétion clonale est le phénomène qui permet d'éliminer les pro-lymphocytes T porteurs des TCR reconnaissant les antigènes du soi (tolérance au soi) pendant la maturation des lymphocytes T dans le thymus. De la même façon, une fois l'attaque infectieuse neutralisée, le système immunitaire élimine l'excès de lymphocytes T activés afin de restaurer le « pool » de lymphocytes T. Ce processus homéostatique est connu sous le nom de « délétion clonale périphérique » (van Parijs *et al.*, 1998). Dans ces deux cas de régulation négative, l'élimination des lymphocytes T se fait par AICD (Bouillet et Strasser, 2002; Green *et al.*, 2003; Opferman et Korsmeyer, 2003). Dans ce phénomène, la stimulation du TCR est l'événement clé qui déclenche la signalisation menant à l'arrêt en phase G1 suivi d'une apoptose (**Figure 7**). Donc l'AICD peut protéger d'une part de l'auto-immunité causée par les lymphocytes T reconnaissant des antigènes du soi et d'autre part de

l'immunopathologie causée par la présence inutile de lymphocytes T activés en excès (Janeway et Travers, 1997). Pour cette raison la défaillance de l'AICD entraîne des maladies auto-immunes chez l'homme et chez la souris (Green *et al.*, 2003). Pour ces raisons la régulation des mécanismes apoptotiques dans le lymphocyte T sera explorée.

Par ailleurs, quels que soient les signaux inducteurs de l'apoptose, toutes les cellules engagées dans le processus apoptotique montrent de façon spectaculaire des modifications morphologiques similaires (**Figure 8**) (Hacker, 2000). Plusieurs mécanismes impliqués dans l'AICD ont été décrits récemment (Green *et al.*, 2003). Deux processus principaux contrôlés par un jeu complexe de facteurs pro-apoptotiques et anti-apoptotiques convergent vers l'exécution de l'AICD. Le premier, dit actif, implique des ligands, comme Fas-L (*Fas Ligand*) qui induit l'apoptose en se liant à son récepteur de mort, le récepteur Fas (CD95) présent sur la membrane plasmique. Le second, dit passif, est initié au niveau de la mitochondrie, en raison du manque de facteurs de survie cellulaire (Bouillet et Strasser, 2002; Cao *et al.*, 2004).

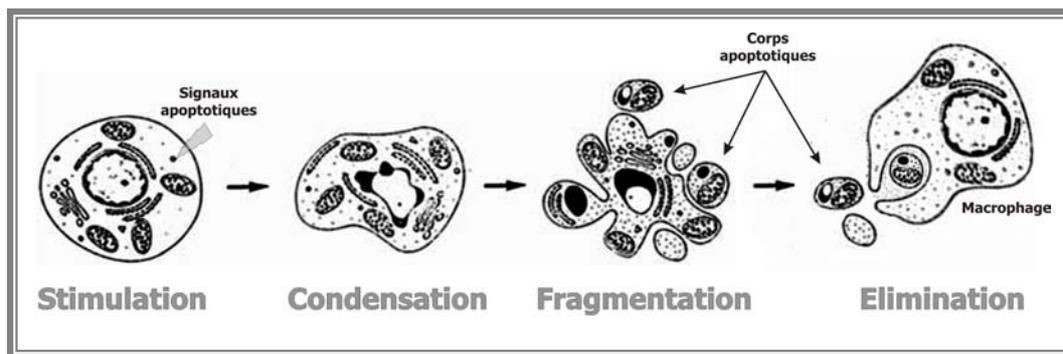


Figure 8. La morphologie cellulaire de l'apoptose

On observe tout d'abord, la déformation de la membrane plasmique sans qu'elle perde son intégrité, puis la chromatine s'agrège à la membrane nucléaire. Celle-ci commence à rétrécir et le noyau se condense. Finalement, la cellule se fragmente en petits morceaux pour former des vésicules membranaires (corps apoptotiques) qui sont rapidement identifiées et phagocytées par des macrophages. (D'après (Hacker, 2000))

- Les mécanismes actifs de l'apoptose

• L'interaction Fas-L/CD95

L'AICD est dépendant de la voie de Fas qui est contrôlée soit au niveau de la transcription du gène de Fas-L, soit au niveau de la cascade de signalisation de son récepteur CD95 (Brunner *et al.*, 2000; Green *et al.*, 2003). De plus, l'interaction Fas-L/CD95 joue aussi un rôle important dans la cytotoxicité des lymphocytes T. Ainsi, les maladies autoimmunes lymphoprolifératives sont caractérisées par un Fas-L souvent muté (Fleisher *et al.*, 2001). La liaison de Fas-L à son récepteur conduit à l'agrégation de ce récepteur et au

recrutement et à la liaison de protéines adaptatrices comme FADD (*Fas-Associated Death Domain Protein*) à son domaine cytosolique DD (*Death Domain*), conduisant à la formation du complexe DISC (*Death-Induced Signaling Complex*) (**Figure 9**).

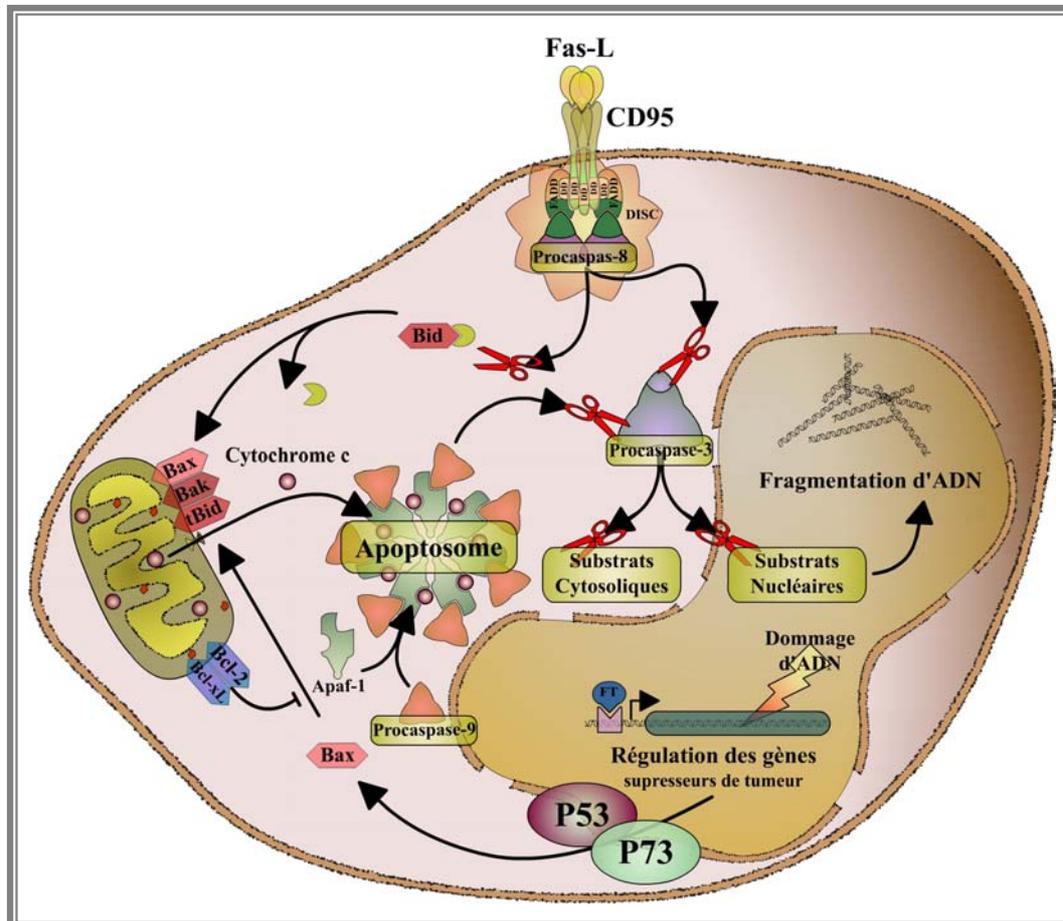


Figure 9. La signalisation de l'apoptose

Le mécanisme actif de l'apoptose implique la liaison du Fas-L à son récepteur CD95. Cette interaction induit la trimérisation du récepteur et la formation du complexe DISC. Ce complexe recrute, via la molécule adaptatrice FADD, plusieurs procaspases-8, ce qui conduit à leur activation. Cependant, le mécanisme passif de l'apoptose implique la voie de mort mitochondriale qui est contrôlée par les membres de la famille de protéines Bcl-2. Cette famille, comprenant les facteurs pro-apoptotiques Bax, Bak et Bid et les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L, gouverne la libération du cytochrome c. En effet, l'expression de ces protéines, en particulier Bax, est contrôlée par les gènes suppresseurs de tumeurs, tels que p53 et p73 qui sont induits lors des dommages irréparables à l'ADN afin d'éliminer la cellule défectueuse. Un stimulus de mort induit la libération du cytochrome c qui s'associe à Apaf-1 et à la procaspase-9 pour former un complexe appelé apoptosome. La voie mitochondriale et celle du récepteur CD95 convergent au niveau du clivage et de l'activation de la procaspase-3 par l'apoptosome et la caspase-8, respectivement. La caspase-3 active d'autres caspases en aval, ce qui conduit au clivage des substrats cellulaires et nucléaires et à l'apoptose. Le facteur pro-apoptotique Bid permet à ces deux voies de se croiser. En effet, le clivage de Bid par la caspase-8 conduit à sa translocation dans la mitochondrie où il va permettre la libération du cytochrome c dans le cytoplasme.

En second lieu, le recrutement et l'oligomérisation de la procaspase-8 dans le complexe DISC conduit à son activation pour induire directement le clivage de procaspase-3 exécutive en quantité suffisante pour procéder à l'apoptose. La caspase-8 activée clive ensuite Bid, une protéine pro-apoptotique cytosolique et génère le fragment actif tBid qui est transloqué dans la mitochondrie afin de stimuler la perméabilisation membranaire libérant les facteurs nécessaires pour accomplir l'apoptose (Cao *et al.*, 2004; Li *et al.*, 1998).

• **La voie apoptotique impliquant le récepteur nucléaire Nur77**

Nur77 a été identifié comme étant un gène précoce (immediate early gene) nécessaire à l'apoptose en réponse à une stimulation du TCR (Woronicz *et al.*, 1995) et impliqué dans le processus de la sélection négative des lymphocytes T (Rajpal *et al.*, 2003; Winoto et Littman, 2002). Nur77 appartient à la superfamille de NGFI-B (*Nerve Growth Factor Induced gene B*), une famille de récepteurs nucléaires stéroïdes pour lesquels aucun ligand n'a encore été défini (récepteurs orphelins) (Winoto et Littman, 2002). La mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire est le phénomène clé dans la signalisation du TCR conduisant à l'expression massive et immédiate de Nur77 ainsi qu'à l'apoptose des lymphocytes T (**Figure 10**).

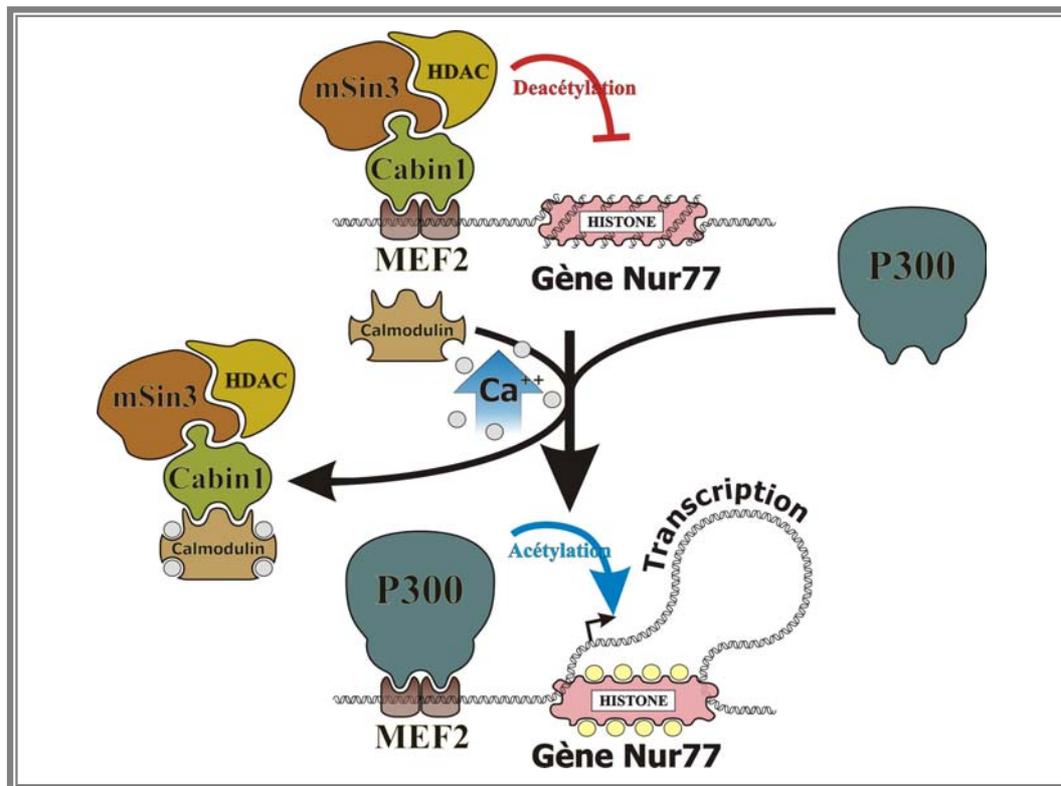


Figure 10. La régulation du gène Nur77

Dans les lymphocytes T en prolifération, le gène Nur77 est sous le contrôle du complexe Cabin-1/mSin3 fixé sur les sites MEF2 dans son promoteur. Ce complexe est capable de recruter HDAC au gène Nur77 causant son inhibition par des mécanismes de remodelage de la chromatine. En revanche, dans le phénomène de la sélection négative, la transcription du gène Nur77 est activée.

En effet, la voie du Ca^{2+} , déclenchée par la stimulation du TCR, conduit à la libération du complexe Cabin-1 /mSin3/HDAC par liaison compétitive à la calmoduline. Cependant, la libération de MEF2 de son complexe inhibiteur n'est pas suffisante pour activer le gène Nur77. Un recrutement de p300, un coactivateur compétiteur de Cabin-1, au niveau des sites MEF2 est également nécessaire pour activer la transcription. (D'après (Youn et Liu, 2000))

Par ailleurs, les éléments critiques du promoteur de Nur77 répondant à cette stimulation sont les sites de liaison pour MEF2 (*Myocyte Enhancer Factor-2*) (Woronicz *et al.*, 1995). En effet, MEF2 se lie à un co-répresseur, nommé Cabin-1, capable de recruter HDAC(1,2) (Youn et Liu, 2000). En revanche, la voie du Ca^{2+} conduit à la libération du complexe Cabin-1/HDAC(1,2) par liaison compétitive à la calmoduline (**Figure 10**) (Youn et Liu, 2000). Cependant, la libération de MEF2 de son complexe inhibiteur n'est pas suffisante pour son activation. Le recrutement de p300, un coactivateur compétiteur de Cabin-1, au niveau des sites MEF2 est également nécessaire pour activer la transcription de Nur77 (Youn et Liu, 2000). Ceci suggère que la voie dépendante du Ca^{2+} est impliquée non seulement dans l'activation, mais aussi dans l'apoptose des lymphocytes T.

La surexpression de Nur77 induit une apoptose massive tandis que la surexpression *in vitro* d'une mutation dominante négative de Nur77 inhibe la mort cellulaire induite par le TCR. Dans ce contexte, le groupe de Winoto a montré que l'apoptose induite par Nur77, qui n'est pas inhibée par la surexpression de Bcl-2, n'implique pas la libération du cytochrome c. Pour cette raison, il suppose que le facteur Nur77 régule l'apoptose des lymphocytes T au niveau de l'ADN en contrôlant l'expression des gènes apoptotiques comme celui du Fas-L (Rajpal *et al.*, 2003).

- Les mécanismes passifs de l'apoptose

• La régulation par la famille Bcl-2

Ce mécanisme apoptotique qui agit par la voie endogène mitochondriale déclenche l'expression et/ou l'activation des protéines membres de la famille Bcl-2. Cette famille comprend plus de 30 membres classés en trois groupes fonctionnels (Cory et Adams, 2002; Tsujimoto, 2003). Les membres du groupe I (comme Bcl-X_L, Mcl-1 et Bfl-1) présentent une activité anti-apoptotique et protègent la cellule de la mort. A l'inverse, les membres du groupe II (comme Bax et Bak) et les membres du groupe III (comme Bad, Bid et Bim) possèdent une activité pro-apoptotique. Concernant les lymphocytes T, Bim a été identifié comme un initiateur essentiel de l'apoptose lors de la sélection négative et son expression est sous le contrôle direct du TCR. D'ailleurs, les lymphocytes T dépourvus de Bim sont réfractaires à l'apoptose induite par TCR (Bouillet *et al.*, 2002). La famille Bcl-2 joue un rôle

central dans le contrôle de la voie mitochondriale de l'apoptose. La balance entre les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 aboutit soit à l'inhibition, soit à l'induction de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. Suite à cette perméabilisation, le cytochrome c présent dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie est libéré dans le cytoplasme (**Figure 9, page 25**). Ensuite, le cytochrome c induit l'oligomérisation de la protéine Apaf-1 et la procaspase-9 initiateur dans un complexe appelé apoptosome. Dans ce dernier la procaspase-9 est activée en caspase-9 mature qui active à son tour la procaspase-3 effectrice. Là encore, cette caspase effectrice exécute le programme apoptotique et signe la plupart des caractéristiques morphologiques de l'apoptose (**Figure 9, page 25**).

- **La régulation par la famille p53:**

Le produit du gène p53 a été étudié de manière approfondie en raison de son importance en cancérologie. En effet, cette protéine est impliquée dans des fonctions cellulaires diverses comme la transcription génique, la synthèse d'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et l'apoptose (**Figure 11**) (Moll et Petrenko, 2003; Vogelstein *et al.*, 2000).

Dans la cellule, p53 est maintenue à une concentration faible du fait de sa demi-vie courte contrôlée par MDM2 (HDM2 chez l'homme). Autrement dit, la liaison de MDM2 à p53 a plusieurs conséquences fonctionnelles négatives: d'une part l'activité transcriptionnelle de p53 est bloquée, d'autre part l'activité ubiquitine ligase E3 de MDM2 lui permet de cibler p53 pour être dégradée par le protéasome (**Figure 11**). Etant donné que l'expression de MDM2 est stimulée par p53, il existe donc une boucle de rétro-contrôle auto-régulatrice qui permet d'éviter l'accumulation inopportune de p53 (Moll et Petrenko, 2003). L'inhibiteur de cdks p21^{Waf1/Cip1} est le gène cible le mieux connu de p53. Parmi les gènes cibles pro-apoptotiques renfermant des éléments de réponse à p53 figurent Bax et Apaf1 (**Figure 11**) (Moroni *et al.*, 2001).

L'AICD est indépendante de p53, puisque les lymphocytes T dérivés de souris déficientes en gène de p53 sont sensibles à l'apoptose induite par le TCR au même degré que les lymphocytes T des souris sauvages (Boehme et Lenardo, 1996). De plus, dans ces deux types cellulaires, la stimulation du TCR active l'expression des gènes Bax et p21^{Waf1/Cip1} (Boehme et Lenardo, 1996). Suite aux observations précédentes, le groupe de Dowdy a proposé l'intervention d'un autre élément dans cette chaîne de régulation, la protéine p73, un homologue structural et fonctionnel de p53 et qui représente un nouveau médiateur de l'apoptose (Irwin *et al.*, 2000; Lissy *et al.*, 2000). Contrairement à p53, l'introduction d'une forme

dominante négative de p73 dans les lymphocytes T les protège de l'AICD. De la même manière, les lymphocytes T primaires, qui ne possèdent pas de p73, ne subissent plus la mort cellulaire induite par la stimulation du TCR (Lissy *et al.*, 2000). L'ensemble de ces résultats confirme le rôle essentiel de p73 dans la signalisation mortelle du TCR. Cependant, p73 partage des caractéristiques fonctionnelles avec p53, comme la capacité à induire l'apoptose lorsqu'elle est surexprimée *in vitro* (Lissy *et al.*, 2000). La protéine p73 peut également réguler des gènes sensibles à p53 impliqués dans le cycle cellulaire et l'apoptose comme p21^{Waf1/Cip1} et Bax, respectivement (**Figure 11**) (Moroni *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1998).

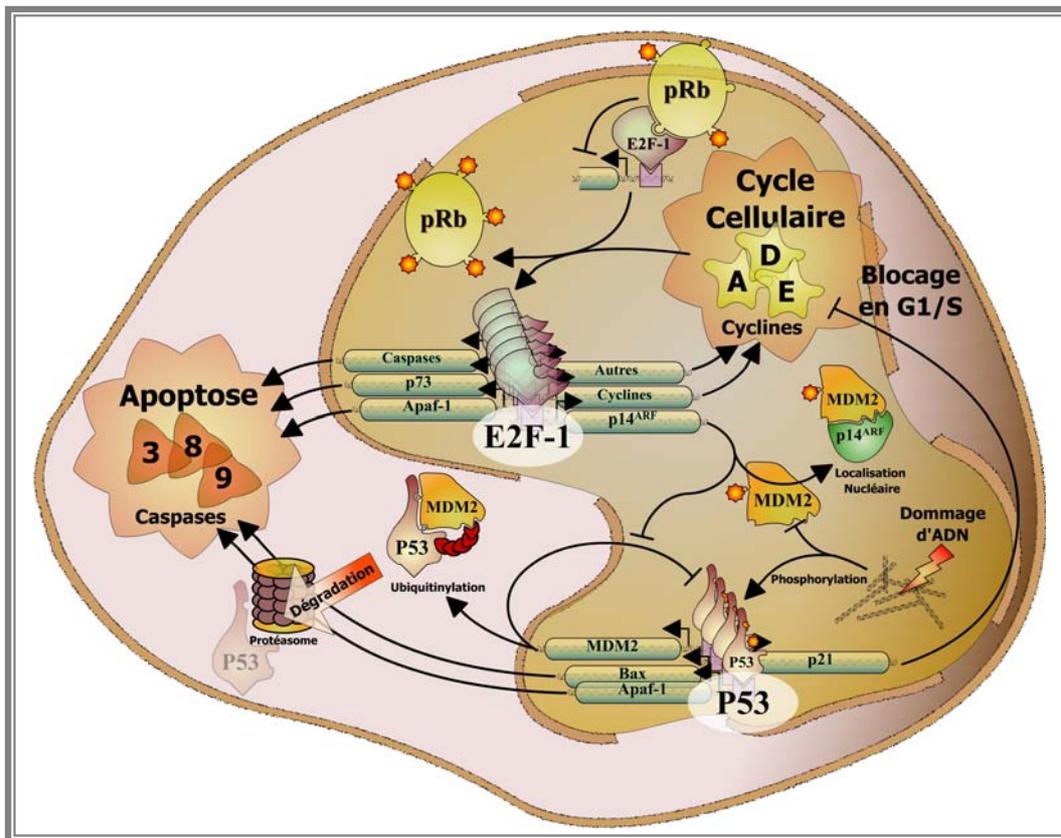


Figure 11. Les mécanismes de régulation de p53 et E2F-1

Le facteur E2F-1 agit soit comme un oncogène, soit comme un gène suppresseur de tumeur. Débarrassé de son partenaire pRb hypophosphorylée, le facteur E2F-1 est capable de stimuler la prolifération cellulaire en activant l'expression des cyclines ou d'induire l'apoptose en activant l'expression de p73, d'Apaf-1 et des caspases. La protéine p53 contrôle l'action du facteur E2F-1. En effet, elle empêche la formation de tumeurs en activant la transcription de gènes induisant l'arrêt du cycle cellulaire (p21^{Waf1/Cip1}), ou la mort cellulaire (Apaf-1 et Bax). L'activité de p53 est contrôlée par une boucle de rétroaction négative impliquant un autre gène cible de p53, MDM2. MDM2 interagit avec p53 et inhibe son activité transcriptionnelle. De plus, MDM2 est une ligase d'ubiquitine qui marque p53 avec l'ubiquitine afin de la dégrader dans le cytoplasme par le protéasome. Le signal activant p53, l'ADN ayant subi des dommages par exemple, induit une phosphorylation de p53, empêchant ainsi son interaction avec MDM2. Par ailleurs, p14^{ARF}, une cible du facteur E2F-1, est connue pour stimuler les fonctions antiproliférative de p53. Elle séquestre MDM2 dans le nucléole, l'empêchant ainsi d'ubiquitiner p53 (d'après (Moll et Petrenko, 2003; Sharpless et Chin, 2003) et les résultats de (Cao *et al.*, 2004; Lissy *et al.*, 2000; Moroni *et al.*, 2001)).

• Le rôle particulier du facteur E2F-1 dans l'apoptose

La surexpression du facteur E2F-1 induit la progression du cycle cellulaire, et dans certains cas, provoque l'apoptose (**Figure 11**) (Adams et Kaelin, 1996). Pour induire cette dernière, E2F-1 active des voies dépendantes et indépendantes de p53 (Irwin *et al.*, 2000). La première voie implique l'activation du gène de p14^{ARF}, membre de la famille INK4 des protéines inhibitrices du cycle cellulaire. Cette famille de gènes suppresseurs de tumeur joue un rôle important à la fois dans la régulation du cycle cellulaire et dans l'induction de l'apoptose. La protéine p14^{ARF} exprimée induit à son tour l'apoptose en neutralisant MDM2, causant la stabilisation « activatrice » de p53 (**Figure 11**) (Sharpless et Chin, 2003). En revanche, dans la voie indépendante de p53, E2F-1 active p73 (Irwin *et al.*, 2000). Pour cette raison, l'absence de p73 fonctionnelle est suffisante pour inhiber l'apoptose induite par E2F-1 dans des cellules tumorales déficientes en p53 (Irwin *et al.*, 2000).

Dans les lymphocytes T, E2F-1 participe à l'AICD en activant l'expression de plusieurs gènes pro-apoptotiques comme ceux de p73, de la caspase-8, de Bid et d'Apaf-1. Ces protéines augmentent la sensibilité des lymphocytes T à l'apoptose induite par Fas-L/CD95 (Cao *et al.*, 2004; Irwin *et al.*, 2000; Lissy *et al.*, 2000; Moroni *et al.*, 2001; Stiewe et Putzer, 2000). Par exemple, E2F-1 augmente l'activité de la voie apoptotique du TCR en contrôlant Bid, soit directement au niveau transcriptionnel soit par contrôle de la transcription de la caspase-8 qui à son tour active Bid (**Figure 9, page 25**) (Cao *et al.*, 2004).

Etant donné que l'AICD se produit à la fin de la phase G1 et que E2F-1 joue un rôle majeur dans la transition de la phase G1 vers la phase S, il a été proposé que E2F-1 fasse le lien entre la progression du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose dans les lymphocytes T. En effet, dans les lymphocytes T dépourvus de E2F-1, à la suite de la stimulation du TCR et au lieu de subir la mort cellulaire par AICD, ces cellules parviennent à franchir la transition G1/S et entrent ensuite dans le cycle cellulaire (Cao *et al.*, 2004). Ainsi, un modèle de régulation des lymphocytes T a été proposé par le groupe de DeGregori. Dans ce modèle, un équilibre s'établit entre les signaux qui favorisent l'entrée dans le cycle cellulaire et ceux qui provoquent l'apoptose. La voie pRb/E2F régulant le cycle cellulaire est opposée à p73 qui mène à l'apoptose par l'AICD. Lors de la stimulation du TCR, ces deux voies sont activées mais avec un avantage pour la voie mortelle de l'AICD. Au contraire, en présence des signaux costimulateurs fournis par le corécepteur CD28, la voie apoptotique de p73 est bloquée assurant ainsi la survie et la prolifération des lymphocytes T (Wan et DeGregori, 2003). En effet, ce corécepteur est capable de participer à la survie des lymphocytes T en contrôlant

l'expression des protéines anti-apoptotiques telles que NF- κ B et Bcl-X_L (Noel *et al.*, 1996; Wan et DeGregori, 2003).

II. L'ICBP90 et son rôle dans la régulation du cycle cellulaire

L'ICBP90 est une protéine nucléaire membre d'une nouvelle famille de protéines manifestant à la fois des propriétés anti-apoptotiques et régulatrices du cycle cellulaire.

L'ICBP90 : Régulateur du gène *TopoIIa*

L'ICBP90 a été découverte comme facteur de transcription impliqué dans la régulation transcriptionnelle du gène de la Topoisomérase II α (TopoII α). En effet, la TopoII α est une enzyme nucléaire capable de cliver l'ADN double brin et de promouvoir le passage d'un second double brin d'ADN à travers cette coupure en présence d'ATP (*Figure 12*).

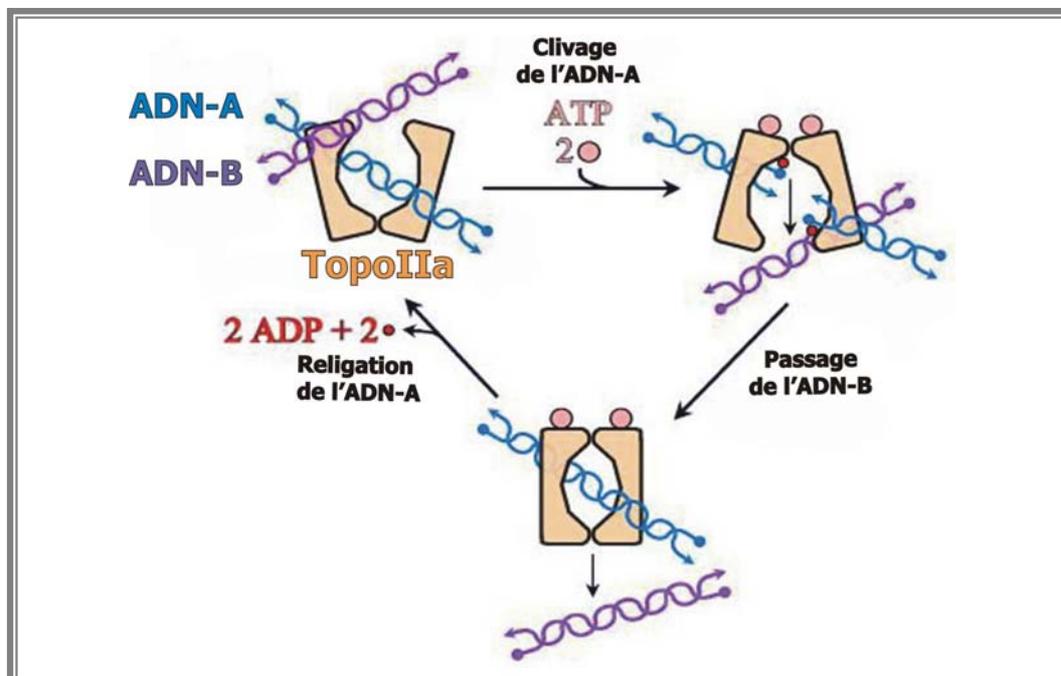


Figure 12. Le mécanisme d'action de la TopoII α

La TopoII α est schématisée par l'association de deux monomères. Chacun renferme un domaine de liaison et d'hydrolyse de l'ATP, un domaine de liaison à l'ADN et une interface de dimérisation. La TopoII α débute le cycle catalytique en liant une hélice d'ADN double brin (ADN-A) et forme un complexe de clivage. Ensuite une deuxième hélice d'ADN (ADN-B) pénètre entre les deux monomères de l'enzyme, puis elle est transportée après hydrolyse d'une première molécule d'ATP à travers la brèche créée dans l'ADN-A. Après la religation de l'hélice d'ADN-A et l'hydrolyse de la deuxième molécule d'ATP, la TopoII α retourne à l'état initial. (D'après (Cuvier et Hirano, 2003))

Pour cette raison, l'activité catalytique de la TopoII α lui permet de résoudre les problèmes topologiques de l'ADN dans la réplication, la transcription, la recombinaison et la condensation des chromosomes (Cuvier et Hirano, 2003). Ainsi, la TopoII α est une des cibles

principales des drogues les plus actives pour le traitement des cancers utilisées pour la chimiothérapie (Hande, 1998). De plus, ces drogues sont appelées poisons car elles exercent leurs effets cytotoxiques en bloquant la TopoII α dans une conformation appelée « complexe de clivage » ayant pour conséquence de produire des coupures permanentes dans les molécules d'ADN. L'accumulation de ces complexes dans les cellules traitées déclenche l'apoptose (Sordet *et al.*, 2003). De par ses fonctions biologiques, la TopoII α est exprimée essentiellement dans les cellules normales en prolifération et demeure presque indétectable dans les cellules confluentes (Turley *et al.*, 1997). Son expression est plus élevée dans les tissus cancéreux que dans les tissus sains (Lohri *et al.*, 1997). En outre, plusieurs études mettent en évidence que le niveau de la TopoII α est déterminant dans la sensibilité des lignées cellulaires tumorales aux drogues anticancéreuses comme l'étoposide (Kubo *et al.*, 1995).

Les mécanismes de contrôle de la transcription du gène *TopoII α* ne sont pas complètement élucidés. Le promoteur du gène *TopoII α* comporte deux boîtes « GC » ainsi que des sites de liaison consensus pour plusieurs facteurs de transcription : ATF, p53, b-myb et c-myc/max (**Figure 13**) (Bronner *et al.*, 2002). De plus, il convient de noter la présence de cinq boîtes « CCAAT » en position inversée ou ICB (*Inverted CCAAT Box*), nommées ICB1 à ICB5.

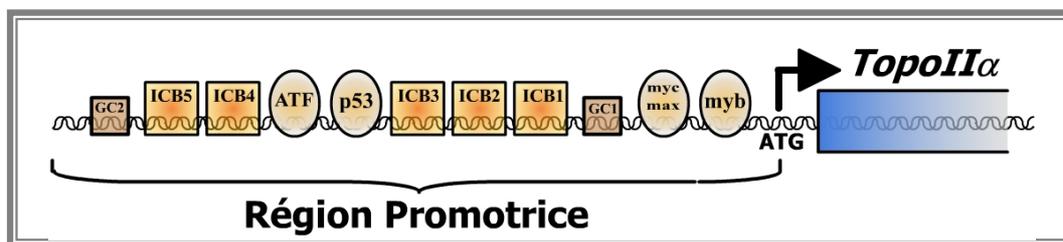


Figure 13. Le promoteur du gène *TopoII α*

On observe sur le promoteur du gène *TopoII α* les boîtes GC (GC1 et GC2) et CCAAT inversées (ICB1 à ICB5) ainsi que les sites putatifs pour les facteurs de transcription ATF, p53, c-myc/max et b-myb. Le site d'initiation de la transcription est repéré par une flèche alors que l'extrémité 5' du gène *TopoII α* est symbolisée par un rectangle bleu. (D'après (Bronner *et al.*, 2002))

Cependant, il est surprenant de constater l'absence de tout site de liaison pour le facteur E2F, dont la présence est courante dans les gènes activés au cours du cycle cellulaire (Muller, 1995). Par ailleurs, toutes les boîtes ICBs du gène *TopoII α* sont fonctionnelles et jouent le rôle d'activateur ou de répresseur suivant les phases du cycle cellulaire, le type cellulaire, les stimuli externes et le statut de prolifération des cellules (Bronner *et al.*, 2002).

Divers facteurs de transcription sont proposés comme activateurs et/ou inhibiteurs de la transcription du gène *TopoII α* . Parmi les activateurs, on trouve les facteurs ATF (*Activating Transcription Factor*), c-myc, b-myb, tandis que le facteur p53 fait partie des inhibiteurs.

L'intervention des protéines NF-Y (*Nuclear Factor Y*) et de la famille Sp1 est évidente mais plus complexe. En effet, un rôle tantôt activateur tantôt inhibiteur est proposé pour ces facteurs. Dans ce contexte, une étude récente indique que l'inhibition de l'expression du gène *TopoII α* dans les cellules est corrélée à une diminution de la liaison de NF-Y aux boîtes ICB1, ICB2, ICB3 et ICB4 de son promoteur (Joshi *et al.*, 2003). Si l'affinité de NF-Y est moindre pour ICB2 (Magan *et al.*, 2003), la séquence ICB2 n'est pas moins importante dans la régulation de l'expression de la *TopoII α* . Au contraire, la liaison de NF-Y à l'ICB2 joue un rôle important dans la répression de la transcription du gène *TopoII α* dans les cellules Swiss 3T3 à confluence (Isaacs *et al.*, 1996). Afin de mettre en évidence un ou plusieurs facteurs capable(s) de réguler la transcription du gène *TopoII α* et donc de progresser dans la compréhension de la régulation du cycle cellulaire, notre équipe a utilisé la technique du « simple hybride » (**Figure 14**).

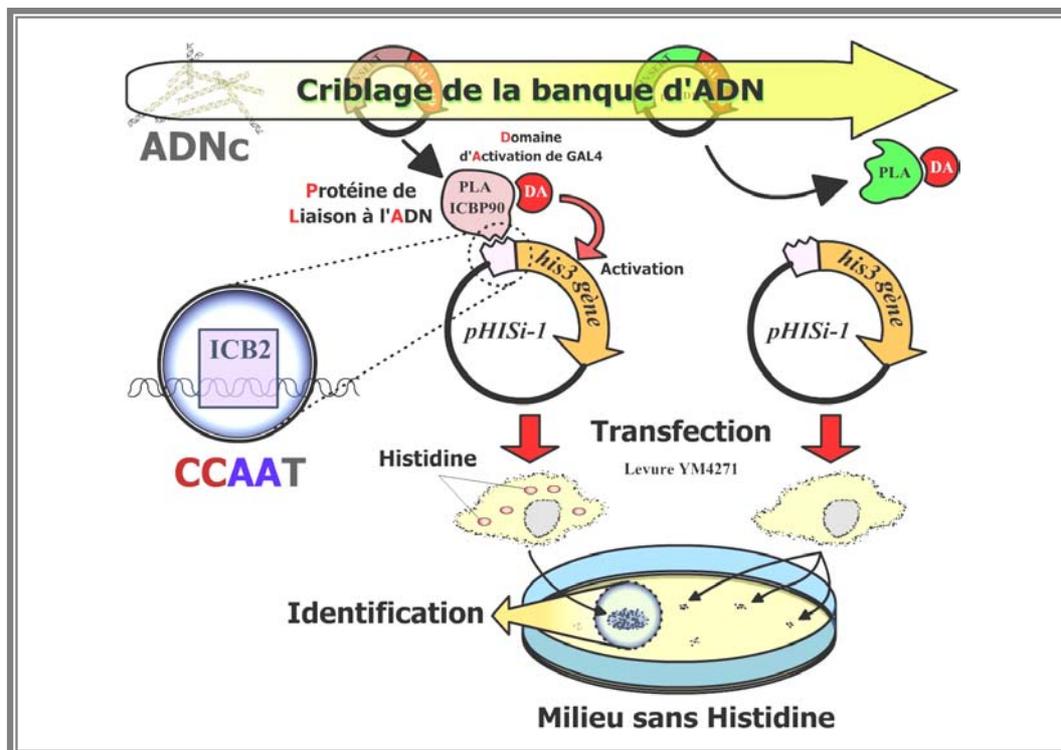


Figure 14. Principe du système simple hybride

La séquence d'ADN cible, la boîte ICB2 (CCAAT), est clonée en amont d'un gène rapporteur. Celui-ci est capable, en cas d'activation, de rendre sa capacité de synthétiser l'histidine à une souche de levure mutée (YM4271). Une fois cette construction plasmidique intégrée au génome, cette souche permet le criblage d'une banque d'ADNc fusionnée au domaine d'activation du facteur GAL4 de levure (DA). Lorsqu'une protéine de fusion, issue de la banque, peut interagir avec la séquence d'ADN cible, il y a alors activation du gène rapporteur via le domaine DA de la protéine chimère. Les clones positifs de levure, qui poussent sur le milieu sans histidine, sont isolés afin d'identifier la séquence de l'ADN ainsi que son produit protéique.

Cette technique permet d'identifier des protéines susceptibles de réagir avec l'ADN cible comme la séquence ICB2 du gène *TopoII α* . Cette technologie permet d'identifier des protéines ayant la capacité de se lier à des séquences d'ADN spécifiques. L'avantage principal du système du simple hybride est de permettre l'accès direct aux ADNc codant pour les protéines d'intérêt. Parmi les ADNc isolés grâce à cette technique, l'un comportait une séquence jusqu'alors non répertoriée dans les bases de données et codant pour une protéine de 793 acides aminés avec poids moléculaire théorique de 89,758 kDa (Hopfner *et al.*, 2000). Cette protéine a été appelée ICBP90 (*Inverted CCAAT box Binding Protein of 90 kDa*).

Les caractéristiques structurales de l'ICBP90

- Le gène de l'ICBP90

Le gène codant l'ICBP90 est localisé dans la région chromosomique 19p13.3 et couvre une portion d'ADN génomique d'au moins 35,8 kb et comporte six exons codants nommés A, B, C, D, E et F (**Figure 15**) (Hopfner *et al.*, 2001). Dans la région 5', on trouve notamment deux exons non codants nommés I et II. De plus, une région promotrice a été mise en évidence entre les exons I et A. Dans cette région sont localisés trois sites d'initiation de la transcription. C'est pourquoi, deux formes d'ARNm de 4,3 et 5,1 kb ont été observées en fonction des lignées cellulaires étudiées suggérant l'existence de sites alternatifs d'initiation de la transcription (Hopfner *et al.*, 2001).

L'expression génique de l'ICBP90 pourrait être l'objet d'une régulation complexe puisque dans la région 5' du gène, une séquence de 1114 pb située entre les exons I et A présente une activité promotrice (Hopfner *et al.*, 2001). Par ailleurs, le promoteur du gène de l'ICBP90 ne renferme pas de boîte TATA mais plusieurs boîtes GC qui sont des sites potentiels de liaison au facteur Sp1, et trois boîtes CCAAT qui pourraient être la cible de «CCAAT-binding proteins», comme C/EBP β (*CCAAT Enhancer Binding Protein*), et de l'ICBP90 elle-même pour auto-réguler son expression.

Le facteur E2F-1 régule l'expression de la TopoII α (Ren *et al.*, 2002). Cependant, le promoteur du gène *TopoII α* ne possède pas de site de liaison pour ce facteur de transcription. Ceci suggère l'implication d'un facteur intermédiaire dans cette régulation, qui pourrait être l'ICBP90. En effet, le gène de l'ICBP90 est une cible pour le facteur E2F-1 (Unoki *et al.*, 2004). Son promoteur renferme trois sites de liaison au facteur E2F qui présentent un score élevé d'homologie avec le site consensus de E2F (TTTSSCGC, S=C/G) (**Figure 15**).

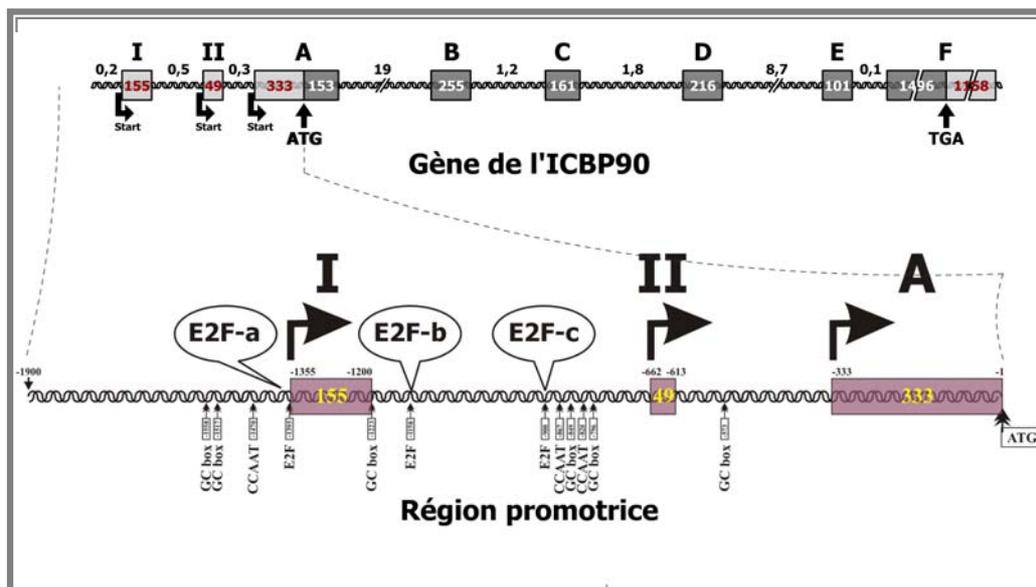


Figure 15. Le gène de l'ICBP90

Dans le gène ICBP90 les exons sont représentés par des boîtes: les boîtes noires indiquent les exons codant, les boîtes blanches indiquent les exons non-codant. Les lignes entre les boîtes symbolisent les introns, leurs tailles sont indiquées en kpb. Les noms des exons sont indiqués au-dessus de chaque boîte, leurs tailles sont indiquées en pb. ATG est le site d'initiation, TGA est le site de terminaison. Dans la région promotrice du gène de l'ICBP90 trois sites d'initiation de la transcription sont indiqués par des flèches. Les positions des boîtes GC (sites de liaison au facteur Sp1), des boîtes « CCAAT » ainsi que les trois sites potentiels de liaison au facteur E2F sont indiqués. (D'après (Hopfner *et al.*, 2001))

De plus, un motif particulier liant le facteur de transcription E2F est hautement conservé dans les promoteurs des gènes codant pour plusieurs protéines régulatrices de la prolifération et du cycle cellulaire, comme *c-myc*, *DHFR* et *PCNA* (Rotheneder *et al.*, 1999). Parmi ces gènes importants, les sites E2F coexistent fréquemment avec les boîtes GC (Wade *et al.*, 1995). En effet, le même motif, 5'-TTTCGCGGGAAA-3' (E2F-a, de -1403 à -1392), a été identifié dans le promoteur du gène de l'ICBP90 entouré par les boîtes GC (**Figure 15**). Selon le groupe d'Azizkhan, la structure de ce motif, composé de deux sites E2F opposés et en chevauchement, offre une meilleure stabilité et fonctionnalité au complexe pRb/E2F qu'un simple site consensus pour E2F (Wade *et al.*, 1995). Ces arguments renforcent l'hypothèse de l'implication de la voie pRb/E2F dans la régulation transcriptionnelle du gène de l'ICBP90.

- La protéine ICBP90

La protéine ICBP90 est constituée d'un domaine « ubiquitin-like » partiellement recouvert par une glissière à leucine à l'extrémité NH₂-terminale, d'un domaine en doigt de zinc de type C4HC3 (le domaine PHD : *Plant Homeo Domain*) dans la partie centrale, d'un

domaine G9a et d'un domaine en doigt de zinc de type C3HC4 (le domaine RING : *Really Interesting Gene*) à l'extrémité COOH-terminale (**Figure 16**) (Hopfner *et al.*, 2000). On trouve également dans la structure primaire de l'ICBP90 deux séquences consensus (LXCXE) de liaison à pRb.

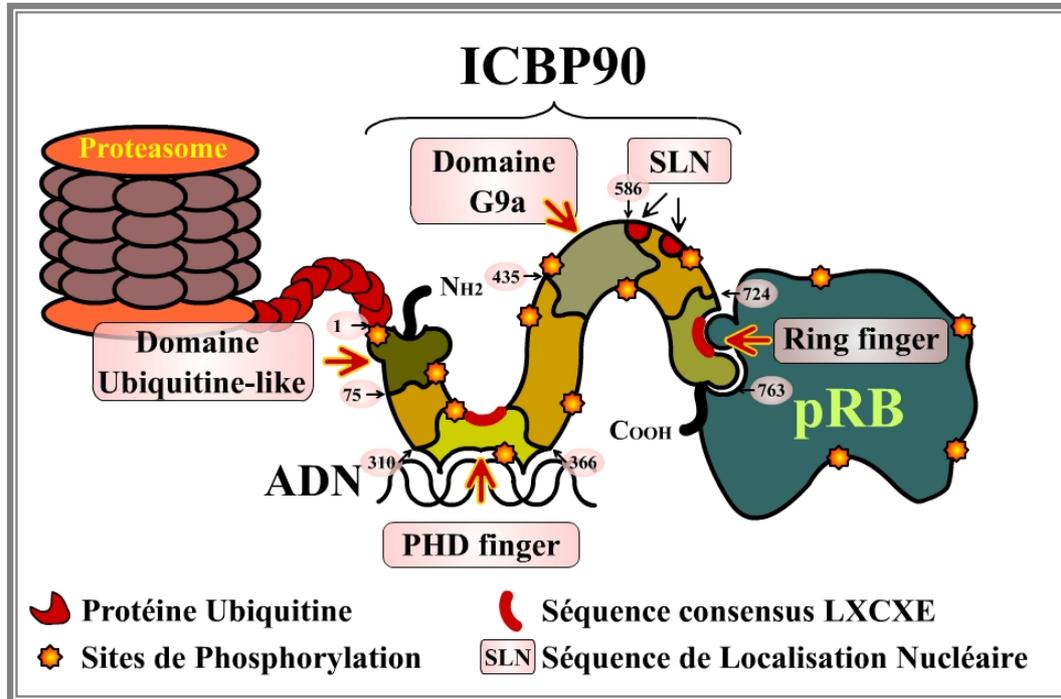


Figure 16. La protéine ICBP90

La protéine ICBP90 est constituée de 793 acides aminés. La taille des domaines de l'ICBP90 est indiquée par la position des acides aminés les délimitant. De l'extrémité NH₂ vers la COOH terminale, on observe la présence d'un domaine ubiquitine-like connu pour son implication dans la dégradation sélective de protéines par la voie ubiquitine/protéasome. Ensuite, un « PHD finger » qui pourrait jouer le rôle de domaine de liaison à l'ADN. Puis, un domaine G9a/SRA et deux séquences de localisation nucléaire (SLN). Finalement, un « Ring finger » connu pour être impliqué dans l'interaction protéine-protéine. La protéine du rétinoblastome (pRb) est susceptible de se lier, par l'intermédiaire de sa séquence de liaison consensus LXCXE, au niveau des domaines PHD finger et Ring finger. (D'après (Hopfner *et al.*, 2000))

D'après sa structure primaire, l'ICBP90 n'appartient *a priori* à aucune famille de protéines connue. Cependant d'autres nouvelles protéines possèdent certains de ces domaines structuraux. En effet, elle partage le domaine « ubiquitin-like », le domaine G9a et les deux domaines en doigt de zinc avec la protéine nucléaire de souris Np95 (Mori *et al.*, 2002), la protéine humaine NIRF (*Np95 / ICBP90 RING Finger*) et la protéine Np97 qui sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Bonapace *et al.*, 2002; Fujimori *et al.*, 1998; Mori *et al.*, 2002).

Les caractéristiques fonctionnelles de l'ICBP90

- La localisation subcellulaire de l'ICBP90

L'analyse immunocytochimique des lignées cellulaires HeLa et COS-1 montre que l'ICBP90 endogène ou surexprimée est localisée exclusivement dans le noyau (Hopfner *et al.*, 2000). En effet, le transport d'une protéine dans le noyau est un mécanisme actif dépendant d'un ou de plusieurs signaux de localisation nucléaire (SLN), comme ceux présents dans la structure de l'ICBP90 (*Figure 16*).

- L'expression de l'ICBP90

L'ICBP90 est détectée dans les cellules normales en prolifération mais pas dans les cellules à confluence. En revanche, l'expression de l'ICBP90 est dérégulée dans les cellules cancéreuses étudiées (Hela, Jurkat, MOLT-4 et HL-60) où elle est exprimée en permanence et à un taux plus élevé que dans les cellules normales (Hopfner *et al.*, 2000). De plus, l'ARNm de l'ICBP90 est fortement exprimé dans le foie foetal, les poumons, les testicules et le coeur qui sont des tissus peu différenciés ou en prolifération, alors qu'il n'est pas exprimé dans les tissus bien différenciés comme le système nerveux central. Par ailleurs, sur des coupes d'appendice humain normal, le marquage de la protéine ICBP90 est limité aux zones de prolifération (Hopfner *et al.*, 2000).

- Les domaines fonctionnels de l'ICBP90

Les études réalisées sur l'ICBP90 et sur les autres membres de sa famille (Np95 et NIRF) permettent d'émettre des hypothèses sur les fonctions remplies par les différents domaines de l'ICBP90 :

• Effet de la phosphorylation sur l'activité de l'ICBP90

L'ICBP90 présente de nombreux sites de phosphorylation potentiels pour différentes protéines kinases comme la PKA, la PKC et aussi la CKII (*Casein kinase II*) (*Figure 16*). La phosphorylation par une ou plusieurs de ces protéines kinases pourrait donc jouer un rôle capital dans la modulation de l'activité biologique de l'ICBP90. En effet, l'ICBP90 est un substrat de la CKII, suggérant que cette kinase joue un rôle dans le contrôle de ses activités transcriptionnelles et anti-apoptotiques (Bronner *et al.*, 2004). D'autant, la CKII est une protéine serine/thréonine kinase impliquée dans la prolifération cellulaire (Lebrin *et al.*, 2001).

• Le domaine PHD

Le domaine PHD en doigt de zinc a été identifié dans plus de 300 protéines eucaryotes et la plupart d'entre elles sont localisées dans le noyau et jouent un rôle dans la régulation

transcriptionnelle (Aasland *et al.*, 1995). En effet, les motifs PHD renferment 50 à 100 acides aminés et partagent une séquence consensus C4HC3 impliquée dans la liaison au zinc. Ce domaine participe à la régulation transcriptionnelle impliquant le remodelage de la chromatine (Aasland *et al.*, 1995). Dans le cas de l'ICBP90, il pourrait s'agir du domaine de liaison à l'ADN (**Figure 16**).

- **La séquence LXCXE**

La séquence protéique de l'ICBP90 renferme deux motifs (LXCXE) consensus jouant un rôle très important pour la liaison et la régulation de pRb (**Figure 16**). En effet, plusieurs oncoprotéines virales, comme E1a de l'adénovirus, possèdent ce motif. Elles l'utilisent afin de fixer et neutraliser l'activité de pRb au cours de la transformation de la cellule hôte (Dahiya *et al.*, 2000). Sans ce motif, les oncoprotéines virales échouent dans ce processus. Par ailleurs, il est présent également dans des protéines impliquées dans la régulation de la progression du cycle cellulaire, comme HDAC. En effet, HDAC1/2 possèdent des motif LXCXE à l'extrémité C et sont importants pour la liaison et la fonction de pRb car leur mutation est suffisante pour inhiber la répression transcriptionnelle des gènes cycline A et E exercée par pRb (Dahiya *et al.*, 2000). Par ce motif, l'ICBP90, en tant que nouvelle protéine régulatrice du cycle cellulaire, pourrait interagir avec pRb et influencer son activité.

- **Le domaine RING et son rôle potentiel dans l'ubiquitinylation**

Le domaine RING a été décrit pour la première fois en 1993 (Freemont, 1993). Depuis, plus de 200 protéines renfermant ce motif en doigt de zinc de type C3HC4 ont été répertoriées. Ces protéines sont nucléaires ou cytoplasmiques et jouent un rôle dans des processus variés tels que la signalisation, la transcription et l'ubiquitinylation (Tyers et Willems, 1999). D'un point de vue moléculaire, il est établi que le domaine RING est impliqué dans les interactions protéine/protéine et qu'il est particulièrement important dans la formation de complexes macromoléculaires (**Figure 16**) (Borden, 2000).

Dans l'ubiquitinylation, il existe deux types distincts d'enzyme ubiquitine ligase E3 : les E3 à domaine HECT (*Homologous to E6AP C-Terminus*) et les E3 à domaine RING (**Figure 6, page 20**). Dans ce contexte, la protéine NIRF est capable de s'auto-ubiquitiner, ce qui est caractéristique des ubiquitines ligases E3 et d'ubiquitiner la protéine PCNP (*Pest-Containing Nuclear Protein*) (Mori *et al.*, 2004). De plus, Np95 est capable d'interagir avec les histones *in vitro* et *in vivo* et de fonctionner comme une ubiquitine ligase E3 dont le substrat *in vivo* est l'histone H3 (Citterio *et al.*, 2004). Par ces propriétés, Np95 pourrait être impliquée dans la régulation de la transcription, comme cela a déjà été démontré pour d'autres ubiquitine

ligases (Muratani et Tansey, 2003). De plus, dans les cellules cancéreuses HCT116, la diminution du niveau d'expression de l'ICBP90 est d'une part corrélée à une protéolyse en réponse à des dommages d'ADN et d'autre part à la poly-ubiquitinylation de l'ICBP90 observée dans ces cellules (Arima *et al.*, 2004). Ces observations suggèrent que l'ICBP90 serait une ubiquitine ligase (E3) dont le domaine RING serait le motif fonctionnel.

- **Le domaine G9a**

Le domaine G9a (aussi appelé SRA) composé de 150 à 170 acides aminés est contenu dans toutes les protéines de la famille ICBP90 et sa fonction est encore indéterminée (**Figure 16**). Cependant, les travaux de Citterio et de ses collaborateurs suggèrent qu'il pourrait être le domaine de liaison aux histones dans la protéine Np95 (Citterio *et al.*, 2004). En outre, le travail récent du groupe de Nakamura a montré que ce domaine est important pour l'ICBP90, d'une part pour recruter HDAC et d'autre part pour se fixer sur les séquences méthylées de certains gènes (Unoki *et al.*, 2004). La méthylation de l'ADN est la modification épigénétique la plus courante dans le génome des vertébrés, généralement associée à une répression de la transcription.

Les enzymes HDAC sont recrutées sur des gènes cibles par plusieurs mécanismes: soit par le complexe répresseur pRb/E2F au niveau des gènes possédant des sites de liaison pour le facteur E2F (**Figure 5, page 18**) (Ferreira *et al.*, 2001); soit par le complexe Cabin-1/mSin3 qui réprime le gène Nur77 (**Figure 10, page 26**) (Youn et Liu, 2000). D'une façon similaire, l'ICBP90 pourrait lui aussi recruter HDAC au niveau des régions méthylées des gènes causant leur répression (Unoki *et al.*, 2004). Par ailleurs, parmi les protéines interagissant avec l'ICBP90 et isolées grâce à la technique du double hybride figurent Tip60 (*Tat Interactive Protein 60 kDa*) (Bronner *et al.*, 2002). C'est une HAT (*Histone Acetyltransferase*) impliquée principalement dans l'activation de la transcription des gènes (**Figure 5, page 18**) (Halkidou *et al.*, 2003). Ainsi nous pouvons proposer l'hypothèse que les complexes co-activateurs de la transcription et les complexes inhibiteurs, impliquant le remodelage de la chromatine, pourraient coopérer avec l'ICBP90 lié à sa séquence spécifique ICB2 et/ou les séquences méthylées pour aider la machinerie de transcription basale à accéder aux promoteurs cibles de l'ICBP90.

***HYPOTHESE et
OBJECTIFS***

Hypothèse :

L'ICBP90 est une protéine nucléaire impliquée dans la prolifération cellulaire et son expression est élevée et constante dans les cellules cancéreuses (Hopfner *et al.*, 2000). Cette expression diminue significativement dans les cellules ovariennes cancéreuses après surexpression de p21^{Waf1/Cip1} (Wu *et al.*, 2002). De façon similaire, l'expression de l'ICBP90 est inhibée lorsque les mécanismes de surveillance de la transition G1/S du cycle cellulaire, impliquant p53 et l'inhibiteur du cycle cellulaire p21^{Waf1/Cip1}, sont activés. Le résultat final de cette activation est l'arrêt de la progression du cycle cellulaire en phase G1 et l'apoptose (Arima *et al.*, 2004). De plus, le gène de l'ICBP90 semble être une cible pour le facteur de transcription E2F-1 qui est principalement impliqué, avec son partenaire pRb, dans la régulation de la transition G1/S du cycle cellulaire (Unoki *et al.*, 2004).

Ces données suggèrent que l'ICBP90 pourrait jouer un rôle dans la régulation du cycle cellulaire et en particulier dans le contrôle de la transition G1/S nécessaire à l'activation, à la prolifération et à l'apoptose des lymphocytes T. Cette hypothèse est confortée par les résultats d'études effectuées sur Np95. En effet, l'expression de cette protéine varie au cours du cycle cellulaire avec une expression élevée pendant la transition G1/S, alors qu'elle est indétectable en phases G0 et G1. De plus, des études fonctionnelles ont montré que Np95 est nécessaire pour la transition G1/S (Bonapace *et al.*, 2002; Fujimori *et al.*, 1998; Miura *et al.*, 2001). En relation avec cette hypothèse, nous pensons que l'ICBP90 pourrait faire partie des protéines multifonctionnelles, tels que E2F-1, c-Myc, p53 et NF-κB qui influencent à la fois le cycle cellulaire et l'apoptose.

Objectifs :

La première étape est d'étudier le rôle de l'ICBP90 dans le contrôle du cycle cellulaire, en particulier lors de la transition G1/S. Dans ce contexte, le profil d'expression de l'ICBP90 sera étudié dans les différentes phases du cycle cellulaire ainsi que dans les cellules et les tissus normaux et cancéreux (**Publication I**).

La surexpression de l'ICBP90 dans les cellules et les tissus cancéreux suggère sa contribution à la cancérogenèse. Par ailleurs, la déplétion de l'ICBP90 dans les cellules cancéreuses comme les cellules HCT116 empêche la transition G1/S en réponse à un signal d'apoptose induit par des dommages dans l'ADN (Arima *et al.*, 2004). En effet, la répression de l'ICBP90 semble être essentielle pour éviter la réplication de l'ADN endommagé qui peut

conduire au développement du cancer. Cette nouvelle caractéristique anti-apoptotique de l'ICBP90 sera étudiée (**Publication II**).

La TopoII α est une enzyme essentielle à la régulation du cycle cellulaire. Pour cette raison, le contrôle de son gène par l'ICBP90 revêt un intérêt dans le but de comprendre les mécanismes de régulation du cycle cellulaire. La PKA qui est impliquée dans la prolifération cellulaire, est susceptible de phosphoryler l'ICBP90. L'effet de cette voie sur le cycle cellulaire ainsi que son rôle dans la régulation l'expression de la TopoII α par l'ICBP90 seront explorés (**Publication III**).

La dérégulation du gène suppresseur de tumeur *RBI* codant pour pRb dans de nombreux types de cancers reflète son rôle primordial dans le contrôle du cycle cellulaire et en particulier dans la transition G1/S (Sellers et Kaelin, 1997). Plusieurs signes structuraux dans le gène et la protéine de pRb suggèrent des interactions possibles avec l'ICBP90. Dans ce domaine, nous allons faire le point sur ces interactions entre l'ICBP90 et pRb, au niveau génique et protéique (**Publication IV**).

La transition G1/S est une balance entre la vie et la mort du lymphocyte T activé et qui pourrait impliquer l'ICBP90. En relation avec cette notion, un travail plus ancien mentionnait que le thymus adulte et fœtal ainsi que la moelle osseuse sont parmi les tissus les plus riches en ICBP90, ce qui suggère un rôle important pour cette protéine dans la régulation fonctionnelle des lymphocytes T du système immunitaire (Hopfner *et al.*, 2000). Notre objectif final sera d'explorer une nouvelle stratégie de régulation de la transition G1/S, impliquant l'ICBP90, dans des lymphocytes T activés par la stimulation du TCR, et d'évaluer ainsi l'implication de la voie pRb/E2F dans cette régulation (**Publication V**).

RESULTATS

Publication 1 :Mousli, M., Hopfner, R., Abbady, A. Q., Monte, D., Jeanblanc, M., Oudet, P., Louis, B., and Bronner, C. ICBP90 belongs to a new family of proteins with an expression that is deregulated in cancer cells. *Br J Cancer* (2003) 89, 120-127**L'ICBP90: membre d'une nouvelle famille de protéines dont l'expression est dérégulée dans les cellules cancéreuses.**

L'ICBP90 partage avec d'autres protéines la même organisation structurale, non assimilable à une famille de protéines déjà connue, ce qui suggère l'émergence d'une nouvelle famille de protéines nucléaires (Fujimori *et al.*, 1998; Hopfner *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2004).

Au cours de ce travail visant à mieux comprendre la fonction et la régulation de ces protéines, nous avons constaté que les cellules cancéreuses exprimaient un taux d'ICBP90 et de la TopoII α beaucoup plus élevés que les cellules non cancéreuses. En outre, l'expression de ces deux protéines est fortement corrélée suggérant une forte contribution de l'ICBP90 dans l'augmentation de l'expression de la TopoII α dans les lignées cancéreuses. De plus, l'ICBP90 est exprimée, dans des cellules normales, tout au long du cycle cellulaire avec deux pics d'expression au cours des transitions G1/S et G2/M. Par contre, l'expression de l'ICBP90 est dérégulée dans les cellules cancéreuses où elle est à la fois constante et élevée au cours du cycle cellulaire.

Le facteur de transcription E2F-1 joue un rôle important dans les mécanismes d'induction de la prolifération cellulaire et en particulier dans la transition G1/S (Ren *et al.*, 2002). Afin de mettre en évidence si l'ICBP90 fait partie des gènes potentiellement régulés par E2F-1, nous avons déterminé les effets de la surexpression de l'E2F-1 sur l'expression des protéines ICBP90 et TopoII α . Nous avons observé que la surexpression d'E2F-1 aboutit à une élévation plus importante des niveaux de l'ICBP90 et de la TopoII α dans les cellules normales par rapport aux cellules cancéreuses. Nos résultats suggèrent que, dans le cycle cellulaire, la régulation de l'ICBP90 est contrôlée par le complexe pRb/E2F-1.

Nous avons montré également que l'expression de l'ICBP90 augmente avec le grade de cancer du sein alors qu'elle est très faible dans les tissus normaux. L'ICBP90 pourrait donc se comporter comme un bon marqueur de prolifération avec une indication possible sur le grade de ce type de cancer.

[Signallement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

ICBP90 belongs to a new family of proteins with an expression that is deregulated in cancer cells

M Mousli, R Hopfner, **A-Q Abbady**, D Monté, M Jeanblanc, P Oudet, B Louis and C Bronner

British Journal of Cancer, 2003, Vol. 89, Pages 120–127

Pages 120–127 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://www.nature.com/bjc/journal/v89/n1/full/6601068a.html>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Publication I – Page 3

Publication I - Figure 1. Structure des protéines de la famille ICBP90.

Publication I – Page 4

Publication I - Figure 2. Expression de l'ICBP90, de pRb et de la TopoIIa dans les cellules normales et cancéreuses.

Publication I - Figure 3. Effet de la surexpression de E2F-1 sur la TopoIIa et l'ICBP90 dans différentes lignées cellulaires.

Publication I – Page 5

Publication I - Figure 4. Expression de l'ICBP90 au cours du cycle cellulaire dans les fibroblastes.

Publication I – Page 6

Publication I - Figure 5. L'expression de l'ICBP90 est régulée au cours du cycle cellulaire dans les fibroblastes (cellules non cancéreuses) et non pas dans les cellules HeLa (cellules cancéreuses).

Publication I - Figure 6. Expression de l'ICBP90 dans les tissus normaux et cancéreux du sein.

Publication II :

Abbadly, A. Q., Bronner, C., Trotzier, M. A., Hopfner, R., Bathami, K., Muller, C. D., Jeanblanc, M., and Mousli, M. ICBP90 expression is downregulated in apoptosis-induced Jurkat cells. *Ann N Y Acad Sci* (2003) 1010, 300-303

**Inhibition de l'expression de l'ICBP90 dans les cellules Jurkat
apoptotiques**

L'expression de l'ICBP90 est permanente et élevée dans les cellules cancéreuses, suggérant une corrélation entre l'expression de cette protéine et l'inhibition de l'apoptose dans les cellules cancéreuses (Hopfner *et al.*, 2000). En effet, l'inhibition de l'apoptose est un processus fondamental de l'oncogenèse. La famille de protéines Bcl-2 joue un rôle majeur dans le contrôle de la voie mitochondriale de l'apoptose (Cory et Adams, 2002). La surexpression des membres anti-apoptotiques et la diminution des membres pro-apoptotiques de cette famille de protéines font partie des divers mécanismes participant à l'oncogenèse fréquemment observés dans les tumeurs (Kaufmann et Gores, 2000). L'identification de facteurs de transcription responsables de la dérégulation de l'expression de ces facteurs permettrait de mieux comprendre la manière dont l'apoptose est inhibée dans le cancer.

Dans ce contexte, nous avons voulu savoir si l'ICBP90 pouvait exercer une partie de ses effets sur la prolifération cellulaire en influençant l'apoptose. L'utilisation des cellules Jurkat exprimant fortement l'ICBP90 est un bon outil pour montrer la contribution de l'ICBP90 en cas d'apoptose. Pour induire l'apoptose dans les cellules Jurkat, deux agents pharmacologiques ont été utilisés: la phytohématoglutinine (PHA) et l'ionophore de calcium (A23187) (Ruiz-Ruiz *et al.*, 1995). Dans les cellules Jurkat activées, nous avons observé une forte corrélation entre l'inhibition de la prolifération cellulaire causée par l'apoptose et la diminution de l'expression de l'ICBP90. Cet effet est perdu dans les cellules THP-1 utilisées comme contrôle négatif. Dans ces cellules la stimulation par ces deux drogues ne change pas l'expression de l'ICBP90 puisqu'elles n'ont pas d'effet mortel sur ces cellules.

Ces résultats suggèrent que l'absence de l'ICBP90 est une étape nécessaire pour déclencher l'apoptose dans les cellules Jurkat. Etant donné que l'ICBP90 est fortement exprimée dans les cellules cancéreuses, son activité anti-apoptotique peut donc jouer un rôle important dans la cancérogenèse.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

ICBP90 expression is downregulated in apoptosis-induced Jurkat cells.

Abbady, A. Q., Bronner, C., Troztier, M. A., Hopfner, R., Bathami, K., Muller, C. D., Jeanblanc, M., and Mousli, M.

Ann N Y Acad Sci (2003) 1010, 300-303

Pages 300-303 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Publication II – Page 2

Publication II - Figure 1. Effet de la PHA sur le nombre de cellules vivantes et sur l'expression de l'ICBP90 dans les cellules Jurkat et THP-1.

Publication II – Page 3

Publication II - Figure 2. Effet de la PHA et de l'ionophore de Ca²⁺ (A23187) sur le nombre de cellules vivantes et sur l'expression de l'ICBP90 dans les cellules Jurkat et THP-1.

Publication III :

Trotzier, M. A., Bronner, C., Bathami, K., Mathieu, E., Abbady, A. Q., Jeanblanc, M., Muller, C. D., Rochette-Egly, C., and Mousli, M. Phosphorylation of ICBP90 by PKA enhances topoisomerase II α expression. *Biochem Biophys Res Commun* (2004) 319, 590-595

La phosphorylation de l'ICBP90 par la PKA augmente l'expression de la Topoisomérase II α

L'ICBP90 a été précédemment décrit comme un régulateur de la transcription du gène *TopoII α* via l'interaction avec la séquence ICB2 présente dans son promoteur (Hopfner *et al.*, 2000). La surexpression de l'ICBP90 induit une augmentation de l'expression de la TopoII α et force les fibroblastes à confluence à proliférer (Hopfner *et al.*, 2002). L'ICBP90 exerce ainsi une influence non négligeable sur la prolifération cellulaire, peut-être via un rôle dans la transition G1/S.

Les voies de signalisation impliquant l'ICBP90 ne sont pas connues. La voie de la PKA joue un rôle majeur dans l'activation ou l'inhibition de la prolifération cellulaire (Lalli et Sassone-Corsi, 1994). Comme la structure primaire de l'ICBP90 révèle la présence des sites potentiels de phosphorylation pour la PKA (Hopfner *et al.*, 2000), nous avons voulu savoir si la prolifération cellulaire et la régulation transcriptionnelle, contrôlées par la voie de la PKA, impliquent l'ICBP90. Le traitement des cellules COS-1 par la forskoline, stimule la sortie des cellules des phases G0/G1 et la progression vers les phases G2/M. Cet effet est associé à une augmentation dose dépendante de l'expression de la TopoII α . Dans cette condition, la liaison entre la séquence ICB2 et l'ICBP90 augmente dans les cellules traitées par rapport aux celles non traitées. De plus, l'exposition à des concentrations croissantes de forskoline induit une nette augmentation de la phosphorylation de l'ICBP90 de manière dose dépendante. Cette phosphorylation met en jeu des résidus sérine et en particulier la sérine 298 située en amont du domaine PHD, nécessaire à liaison de l'ICBP90 à l'ADN.

Ces résultats montrent que l'ICBP90 est une phosphoprotéine ciblée par la PKA *in vitro*. De plus, les données de cette étude établissent une relation entre la voie de signalisation de l'AMPC et la régulation de l'expression du gène *TopoII α* via un mécanisme dépendant de la phosphorylation de l'ICBP90. Pour conclure, nous pouvons suggérer que cette relation peut être déterminante dans la transition G1/S.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Phosphorylation of ICBP90 by protein kinase A enhances topoisomerase II α expression

Marie-Aline Trotzler, Christian Bronner, Kawtar Bathami, Eric Mathieu, **Abdul-Qader Abbady**, Michaël Jeanblanc, Christian D. Muller, Cécile Rochette-Egly and Marc Mousli

Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, Volume 319, N°2 , Pages 590-595

Pages 590-595 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.028>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Publication III – Page 3

Publication III - Figure 1. Effet de la forskoline sur la progression du cycle cellulaire et l'expression de l'ICBP90 et de la TopoII α .

Publication III - Figure 2. La forskoline favorise la fixation de l'ICBP90 sur la boîte ICB2 dans le promoteur du gène TopoII α .

Publication III - Figure 3. La forskoline induit la phosphorylation de l'ICBP90 *in vivo*.

Publication III – Page 3

Publication III - Figure 4. Analyse in vitro de l'ICBP90 phosphorylée.

Publication III - Figure 5. Cinétique de la phosphorylation de l'ICBP90 par la PKA in vitro.

Publication III – Page 5

Publication III - Figure 6. Identification de la sérine S298 de l'ICBP90 comme cible pour la PKA.

Publication IV :

Jeanblanc, M., Mousli, M., Hopfner, R., Bathami, K., Martinet, N., Abbady, A. Q., Siffert, J. C., Mathieu, E., Muller, C., and Bronner, C. The retinoblastoma gene and its product are targeted by ICBP90: a key mechanism in the G1/S transition during the cell cycle. *Oncogene* (2005), 1-9

Le gène *RB1* ainsi que son produit sont des cibles pour l'ICBP90 : un mécanisme essentiel pour la transition G1/S au cours du cycle cellulaire

La dérégulation des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, et en particulier de ceux intervenant au cours de la transition G1/S, est un événement fréquent dans de nombreux types de cancers (Sellers et Kaelin, 1997). Parmi ces gènes, le gène suppresseur de tumeur *RBI* codant la protéine pRb s'avère d'une importance cruciale. En raison de la présence de deux sites consensus de liaison à pRb au sein de la séquence primaire de l'ICBP90, nous avons voulu savoir au cours de cette étude s'il existait une interaction entre ces deux protéines.

Nous avons observé que l'ICBP90 interagissait avec pRb sous sa forme hypophosphorylée dans les fibroblastes pulmonaires humains ainsi que dans les cellules leucémiques Jurkat. Dans cette interaction, le site consensus de liaison à pRb, présent au niveau du domaine PHD, n'était pas concerné. Le rôle joué par l'ICBP90 au cours de la prolifération cellulaire pourrait donc être lié à l'inactivation de pRb, peut être par ubiquitinylation, du fait de l'activité E3 ligase potentielle de l'ICBP90. L'existence de boîtes CCAAT en position inversée au niveau du promoteur du gène *RBI* nous a conduit à déterminer si l'ICBP90 pouvait réguler le gène *RBI*. Nos expériences ont révélé que l'ICBP90 se fixe *in vivo* sur le promoteur de ce gène à la fin de la phase G1 du cycle cellulaire. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de la méthylase de ADN à pour effet d'empêcher l'interaction de l'ICBP90 avec le promoteur de *RBI*. Cela suggère que la fixation de l'ICBP90 sur le promoteur du gène *RBI* est dépendante de sa méthylation. Par ailleurs, La surexpression de l'ICBP90 conduit à une inhibition transcriptionnelle du gène *RBI* qui induit en l'absence de sérum le passage des cellules synchronisées en G0/G1 vers la phase S.

Nos résultats suggèrent donc que l'ICBP90 serait capable de réprimer aussi bien au niveau protéique que transcriptionnel pRb. La répression de *RBI* par l'ICBP90 suppose l'intervention de cette protéine dans les mécanismes d'induction de la transition G1/S et par conséquence dans la prolifération cellulaire.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

The retinoblastoma gene and its product are targeted by ICBP90: a key mechanism in the G1/S transition during the cell cycle

Jeanblanc, M., Mousli, M., Hopfner, R., Bathami, K., Martinet, N., **Abbadly, A. Q.**, Siffert, J. C., Mathieu, E., Muller, C., and Bronner, C.

Oncogene (2005) 00, 1-9

Pages 1 à 9 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Publication IV – Page 2

Publication IV - Figure 1. Représentation schématique du gène RB1 et les domaines structuraux de l'ICBP90 et de NIRF.

Publication IV – Page 3

Publication IV - Figure 2. Co-immunoprécipitation de l'ICBP90 et de pRb dans les fibroblastes et les cellules Jurkat.

Publication IV – Page 4

Publication IV - Figure 3. Expression de pRb et de l'ICBP90 dans les fibroblastes synchronisés.

Publication IV - Figure 4. Co-localisation de pRb et de l'ICBP90 dans les fibroblastes synchronisés en fin de la phase G1 par la mimesine.

Publication IV – Page 5

Publication IV - Figure 5. Analyse de l'expression de pRb après la surexpression de l'ICBP90 dans les fibroblastes.

Publication IV - Figure 6. Liaison de l'ICBP90 au promoteur du gène RB1.

Publication IV – Page 6

Publication IV - Figure 7. Effet de la surexpression de l'ICBP90 sur les fibroblastes privés de sérum.

Publication V :Abbadly, A. Q., Bronner, C., Bathami, K., Muller, C. D., Jeanblanc, M., Mathieu, E., Klein, J. P., Candolfi, E., and Mousli, M. TCR pathway involves ICBP90 gene down-regulation via E2F binding sites. *Biochem Pharmacol* (2005) 70(40), 570-579**La voie de signalisation du TCR implique la régulation négative du gène de l'ICBP90 via des sites de liaison pour le facteur E2F**

La stimulation du récepteur TCR aboutit à des programmes génétiques capables à la fois d'activer ou de réprimer les diverses fonctions du lymphocyte T (Green *et al.*, 2003). Dans les lymphocytes T préalablement activés et en prolifération, comme les cellules Jurkat, la stimulation du TCR arrête le cycle cellulaire en phase G1 et conduit les cellules à l'AICD (Boonen *et al.*, 1999b). Ce phénomène est fondamental pour le système immunitaire. L'ICBP90 est impliquée dans la régulation de la transition G1/S du cycle cellulaire, passage obligatoire aux lymphocytes T pour entrer en prolifération (Arima *et al.*, 2004).

Notre objectif est d'étudier le mécanisme de régulation de l'ICBP90 dans les lymphocytes T suite à la stimulation du TCR. Nos résultats montrent que dans les cellules Jurkat, la stimulation du TCR ou de ses voies de signalisation entraîne une inhibition de l'expression de l'ICBP90. Comme attendu, la stimulation du TCR dans ces cellules se traduit par une inhibition de la croissance cellulaire, dont l'apoptose serait l'origine. Nous avons ensuite étudié le promoteur du gène de l'ICBP90 afin de mieux comprendre son mécanisme de régulation par le TCR. Les résultats obtenus en utilisant le système du gène rapporteur de la luciférase, montrent que le promoteur de l'ICBP90 possède une activité promotrice très importante. Ce promoteur est inhibé significativement après la stimulation du TCR ou de ses voies de signalisation. L'analyse de la séquence de ce promoteur montre la présence de trois sites de liaison pour le facteur de transcription E2F dont le rôle dans la régulation des lymphocytes T a été démontré (Boonen *et al.*, 1999b). Nos résultats de la mutagenèse montrent que les sites E2F-a (-1403 et -1392) et E2F-c (-902 et -895) régulent négativement l'expression du gène de l'ICBP90 suite à la stimulation du TCR. Au contraire, le site E2F-b (-1161 et -1154) n'a aucun effet dans la régulation du promoteur du gène de l'ICBP90 dans notre modèle expérimental.

L'ensemble de ces études devrait permettre d'apporter de nouvelles connaissances concernant le rôle de l'ICBP90 dans les mécanismes de la prolifération cellulaire et de l'apoptose des lymphocytes T suite à la stimulation du TCR.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

TCR pathway involves ICBP90 gene down-regulation via E2F binding sites

Abdul-Qader Abbady, Christian Bronner, Kawtar Bathami, Christian D. Muller, Michaël Jeanblanc, Eric Mathieu, Jean Paul Klein, Ermanno Candolfi and Marc Mousli

Biochemical Pharmacology, 2005, Volume 70, N° 4 , Pages 570-579

Pages 570-579 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2005.05.012>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Publication V – Page 2

Publication V – Page 3

Publication V – Page 4

Publication V – Page 5

Publication V - Figure 1. Profil d'expression de plusieurs protéines régulatrices du cycle cellulaire.

Publication V - Figure 2. Inhibition de l'expression de l'ICBP90 dans les cellules Jurkat activées par l'anti-CD3.

Publication V – Page 6

Publication V - Figure 3. Effet du PMA et de l'ionophore A23187 sur l'expression de l'ICBP90 dans les cellules Jurkat.

Publication V - Figure 4. Régulation du promoteur du gène de l'ICBP90 par la stimulation du TCR.

Publication V – Page 7

Publication V - Figure 5. Rôle du facteur E2F dans la régulation du gène de l'ICBP90.

Publication V – Page 8

Publication V – Page 9

***DISCUSSION ET
PERSPECTIVES***

I. La famille ICBP90 : nouveaux régulateurs du cycle cellulaire

L'ICBP90 et ses autres homologues (NIRF et Np95) appartiennent à une nouvelle famille de protéines nucléaires (**Publication I - Figure 1, page 48**). Ces protéines sont impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire. En effet, la fonction exacte de ces protéines n'est pas encore connue, excepté pour l'ICBP90 qui est un régulateur putatif de l'expression du gène *TopoIIa* (Hopfner *et al.*, 2000; Hopfner *et al.*, 2002). La protéine Np95 semble participer à la stabilité du génome (Muto *et al.*, 2002) et elle peut jouer également le rôle d'un facteur de transcription impliqué dans la régulation du cycle cellulaire (Bonapace *et al.*, 2002).

Le contrôle du cycle cellulaire par la famille ICBP90.

Récemment, notre équipe a montré que la répression de l'ICBP90 dans les cellules HCT116 est un événement critique pour l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. De plus, cette répression de l'ICBP90 bloque l'entrée des cellules en phase S (Arima *et al.*, 2004). Ces observations suggèrent un rôle capital de l'ICBP90 au cours de la transition G1/S. En outre, Bonapace et collaborateurs ont montré la dépendance de la transition G1/S sur l'expression de Np95. Puisque la déplétion de Np95 inhibe la progression du cycle cellulaire en phase S. De plus, la surexpression de Np95 et du complexe cycline E-cdk2 induite par l'oncogène E1A force les cellules en différenciation à entrer dans le cycle cellulaire (Bonapace *et al.*, 2002; Muto *et al.*, 2002). En revanche, la surexpression de NIRF bloque le cycle cellulaire en phase S (Li *et al.*, 2004). L'expression de l'ICBP90 présente un pic à la fin de la phase G1 et pendant la transition G2/M dans les fibroblastes pulmonaires humains (**Figure 17**).

Dans les cellules COS-1, l'activation de la PKA par la forskoline induit une diminution du nombre de cellules en phase G1 et une augmentation en phases G2/M (**Publication III - Figure 1, page 62**). De plus, ce traitement induit la phosphorylation de l'ICBP90 (**Publication III - Figure 3, page 62**). Puisque l'augmentation de l'expression de l'ICBP90 est maximale à la fin de la phase G1, notre hypothèse est que l'ICBP90 serait un élément important pour franchir la barrière de G1/S et cette étape peut impliquer la phosphorylation de l'ICBP90 par la PKA. Plusieurs mécanismes sont envisagés pour l'intervention possible de l'ICBP90 dans la régulation du cycle cellulaire :

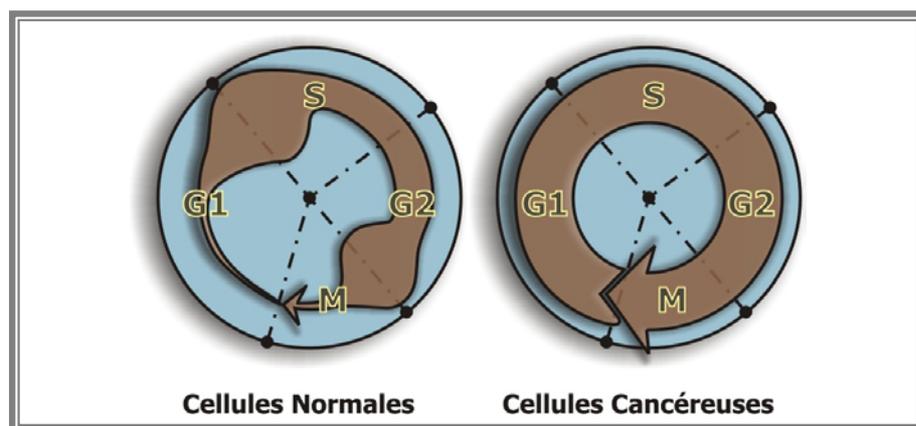


Figure 17. L'expression de l'ICBP90 au cours du cycle cellulaire

Dans le cycle cellulaire normal, l'ICBP90 est absente au début de la phase G1 et son expression commence avec l'entrée dans le cycle cellulaire où deux pics d'expression sont constatés pendant les transitions G1/S et G2/M. Cette régulation de l'expression de l'ICBP90 semble être perdue dans les cellules cancéreuses. (D'après (**Publication I - Figure 4, page 50**))

- Par le contrôle de l'enzyme TopoII α

Nos résultats montrent que le traitement des cellules COS-1 avec la forskoline augmente la liaison de l'ICBP90 phosphorylée à l'élément ICB2 dans le promoteur du gène *TopoII α* , induisant ainsi sa transcription et par conséquent la surexpression de la TopoII α (**Publication III - Figure 2, page 62**). L'activité de liaison à l'ADN est influencée par la phosphorylation de différents facteurs de transcription (Ray *et al.*, 2003). A l'heure actuelle, nous ne disposons d'aucune information pour expliquer la manière dont la phosphorylation augmente l'activité de liaison de l'ICBP90 à l'ADN. Cependant, un changement de la conformation de la protéine phosphorylée induisant une augmentation de la liaison ADN a été observé pour divers facteurs de transcription (Ray *et al.*, 2003). La régulation positive de plusieurs gènes, comprenant le gène *TopoII α* , impliqués dans la régulation du cycle cellulaire ainsi que dans la réplication et la modification de l'ADN, a été décrite dans les cellules de Schwann en réponse à l'action combinée de la héréguline et de la forskoline (Schworer *et al.*, 2003). Nous pensons que la régulation positive dépendante de l'AMPC sur la TopoII α dans ces cellules se produit grâce à la phosphorylation de l'ICBP90 et que cette régulation peut influencer le contrôle du cycle cellulaire.

Nous avons pu mettre en évidence que l'ICBP90 est potentiellement régulée par la phosphorylation. Une perspective serait de déterminer si la phosphorylation de l'ICBP90 a une implication dans la régulation de l'interaction de l'ICBP90 avec des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, dans l'apoptose ou encore dans la

régulation transcriptionnelle de l'ICBP90. En effet, l'expression de la TopoII α se corrèle bien avec l'expression de l'ICBP90 après la surexpression de E2F-1 (**Publication I - Figure 3, page 49**). Etant donné que le promoteur du gène *TopoII α* manque de sites de liaison pour ce facteur de transcription, nous suggérons que l'ICBP90 serait l'intermédiaire dans la régulation transcriptionnelle du gène *TopoII α* par E2F-1 (Ren *et al.*, 2002).

- Par l'interaction avec la voie pRb/E2F

Les études récentes ont montré que la voie de pRb/E2F contrôle au moins 10% de tous les gènes exprimés pendant le cycle cellulaire. Les protéines codées par ces gènes sont celles de la réparation et de la réplication d'ADN ainsi que celles des points de contrôle du cycle cellulaire (Harbour et Dean, 2000; Ren *et al.*, 2002). De plus, la voie pRb/E2F est impliquée également dans la prolifération, l'anergie et l'apoptose des lymphocytes T (Arbogast *et al.*, 1999; Lissy *et al.*, 1998). Selon nos résultats, l'interaction entre l'ICBP90 et cette voie peut se produire à différents niveaux :

• La régulation du gène de l'ICBP90 par E2F-1

Trois sites potentiels pour le facteur de transcription E2F (a, b et c) ont été identifiés dans la région promotrice du gène de l'ICBP90. Le facteur de transcription E2F-1 joue un rôle capital dans la transition G1/S en activant l'expression de nombreux gènes essentiels à la régulation de la phase S. Nos résultats suggèrent que ce facteur est impliqué dans la régulation de l'expression de l'ICBP90. D'une part, la surexpression de E2F-1 augmente significativement l'expression de l'ICBP90 et de la TopoII α dans plusieurs lignées cellulaires normales et cancéreuses (**Publication I - Figure 3, page 49**). D'autre part, son expression est corrélée à celle de l'ICBP90 et de la TopoII α dans diverses lignées de cellules cancéreuses (Unoki *et al.*, 2004). Enfin, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré que E2F-1 se lie au promoteur du gène de l'ICBP90 (Unoki *et al.*, 2004). De même, des travaux récents suggèrent qu'en réponse à un dommage dans l'ADN, l'inactivation du complexe inhibiteur pRb/E2F par p21^{Waf1/Cip1} est responsable de la répression du gène de l'ICBP90 (Arima *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2002).

• La régulation post-transcriptionnelle de pRb par l'ICBP90

Les protéines ICBP90, Np95 et NIRF (murine ou humaine) partagent le motif de liaison à pRb (LXCXE) situé dans le PHD finger, mais le même motif situé dans le RING finger est présent seulement dans l'ICBP90 et Np95 (**Publication I - Figure 1, page 48**). Ceci suggère que NIRF aurait un mécanisme différent de régulation. De plus, la corrélation d'expression entre l'ICBP90 et pRb au cours du cycle cellulaire, avec un niveau maximal

d'expression à la fin de la phase G1 (**Publication IV - Figure 3, page 70**), ainsi que leur colocalisation nucléaire dans les fibroblastes synchronisés dans cette phase (**Publication IV - Figure 4, page 70**), suggèrent qu'une interaction entre pRb/ICBP90 pourrait participer à la régulation de la transition G1/S. La présente étude nous a permis de démontrer que, dans les fibroblastes pulmonaires normaux et dans les cellules Jurkat, l'ICBP90 interagit avec la forme hypophosphorylée de pRb. Sous cette forme, pRb interagit également avec des facteurs de transcription, comme E2F-1, et de cette manière inhibe leur activité transcriptionnelle. De manière intéressante, nous avons observé que l'interaction la plus prononcée survenait dans les cellules Jurkat en phase G1 (**Publication IV - Figure 2, page 69**). Ainsi, l'interaction entre ICBP90 et pRb dans les cellules en confluence peut être un événement physiopathologique important se produisant dans les lymphocytes T activés et bloqués en phase G1.

Si nous ne savons pas encore si le motif consensus de LXCXE du domaine RING finger est impliqué, en revanche, celui du domaine PHD ne l'est pas puisque la protéine ICBP52, dépourvue de ce domaine, ne peut pas lier pRb (**Publication IV - Figure 3, page 70**). En effet, ce motif consensus n'est pas nécessaire pour l'interaction entre BRCA1 et pRb, tandis que le domaine RING finger l'est (Fan *et al.*, 2001a). Selon ce modèle, pRb peut également interagir avec NIRF, bien que le motif de liaison dans le domaine RING finger n'existe pas. Physiologiquement, l'interaction pRb/ICBP90 peut aboutir à la diminution du niveau de pRb puisque les cellules entrent en phase S. En effet, le niveau de pRb est plus bas dans les cellules traitées avec l'aphidicoline que dans les cellules bloquées avec la mimosine (**Publication IV - Figure 3, page 70**). Par conséquent, l'ICBP90 pourrait être impliquée dans la dégradation de pRb par l'intermédiaire de la voie du protéasome puisqu'elle appartient à une famille de E3 ligases (Citterio *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2004).

• La régulation transcriptionnelle du gène RB1 par l'ICBP90

Plusieurs raisons nous ont amenés à considérer que l'ICBP90 peut cibler pRb au niveau transcriptionnel comme au niveau protéique. Cette régulation à deux niveaux de pRb a déjà été montrée pour la E3-ligase BRCA1 (Fan *et al.*, 2001b). Concernant cette régulation génique, nous avons observé dans les fibroblastes pulmonaires humains que la surexpression de l'ICBP90 induisant une régulation négative de la transcription de l'ARNm de pRb accompagnée d'une diminution de l'expression de pRb (**Publication IV - Figure 5, page 71**). En conformité avec nos résultats, il a été montré que la surexpression de BRCA1 induisait une répression de pRb mais sans induire d'arrêt de la croissance cellulaire (Fan *et al.*, 2001a). La

liaison d'ICBP90 au promoteur du gène *RBI*, qui nécessite un statut de méthylation (**Publication IV - Figure 6, page 71**), se produit dans la phase G1 et favorise l'entrée en phase S (**Publication IV - Figure 7, page 72**). La détermination des sites fonctionnels d'interaction pour l'ICBP90 sur le promoteur du gène *RBI* et de l'ampleur de la méthylation nécessaire serait intéressante à étudier.

En conclusion, le contrôle de la barrière G1/S par la voie pRb/E2F impliquerait l'ICBP90 et peut-être des autres protéines de la même famille. En effet, les cellules tumorales parviennent à échapper aux processus de surveillance de cette barrière, ce qui explique pourquoi la voie pRb/E2F est fréquemment dérégulée dans les cancers (Harbour et Dean, 2000). Dans ce contexte, la dérégulation de la famille de l'ICBP90 pourrait également être un nouveau mécanisme pour la cancérogenèse.

La dérégulation de l'expression de la famille ICBP90 dans les lignées cellulaires cancéreuses.

L'expression la plus élevée de l'ICBP90 a été observée dans des lignées cellulaires cancéreuses (SaOs, MCF-7, U2OSS, HeLa, MDA468) par rapport aux lignées normales (WI38, IMR90). De plus, l'expression de l'ICBP90 se corrèle avec les niveaux élevés de la TopoII α (**Publication I - Figure 2, page 49**). L'origine de cette forte expression peut résulter d'une absence de régulation négative dans les cellules à confluence et/ou pendant certaines phases du cycle cellulaire comme la phase G1, régulée par la voie pRb/E2F (Harbour et Dean, 2000). En effet, notre équipe avait précédemment montré que l'ICBP90 est exprimée dans les cellules HeLa à confluence, tandis qu'elle ne l'est plus dans les fibroblastes confluent (Hopfner *et al.*, 2000). Ces variations d'expression sont restreintes aux cellules non cancéreuses en prolifération. En revanche, les lignées de cellules cancéreuses comme les cellules HeLa sont le siège d'une expression constante et élevée de l'ICBP90 durant le cycle cellulaire (**Publication I - Figure 5, page 51**). De plus, il a été montré que l'expression de Np95 est régulée positivement dans la phase S et négativement dans les phases G2 et M dans les lymphocytes T normaux de souris. Mais cette variation est absente dans les lymphocytes T tumoraux murins (Muto *et al.*, 1995). La protéine NIRF est toujours exprimée dans les lignées cellulaires cancéreuses à confluence mais pas dans les fibroblastes normaux tels que WI38 (Mori *et al.*, 2002). En outre, dans les lignées des cellules cancéreuses à confluence sensibles à l'inhibition de contact, l'expression de l'ICBP90 ainsi que celle de la TopoII α diminuent. A l'inverse, dans les lignées cellulaires cancéreuses à confluence insensibles à l'inhibition de

contact, le niveau d'expression de ces deux protéines reste inchangé (Hopfner *et al.*, 2002). Par conséquent, nous pensons que l'expression régulée par le cycle cellulaire de tous les membres de cette famille de protéines est un nouveau marqueur de malignité pour l'identification des cellules cancéreuses. De façon intéressante, nous avons constaté que le tissu normal de sein était presque négatif pour le marquage à l'ICBP90, tandis que dans un tissu tumoral, une relation semble se dessiner entre le nombre de cellules positives au marquage à l'ICBP90 et le grade de cancer du sein (**Publication I - Figure 6, page 51**). Ces résultats ouvrent des perspectives de recherche clinique intéressantes en terme d'amélioration du diagnostic du cancer.

La famille ICBP90: un élément clé dans la cancérogenèse.

L'échappement aux processus apoptotiques d'élimination des cellules tumorales est la première stratégie dans la cancérogenèse. Ces processus interviennent aussi lors de la transition G1/S (Seville *et al.*, 2005). Un processus similaire existe dans le système immunitaire afin d'éliminer les lymphocytes T non désirés et de les empêcher de proliférer (Green *et al.*, 2003). Pour déterminer si l'ICBP90 est impliquée dans ce phénomène, nous avons étudié le profil de l'expression de l'ICBP90 dans une lignée cellulaire de lymphocytes T cancéreux, les cellules Jurkat, dans des conditions apoptotiques diverses. Dans les cellules Jurkat stimulées par la PHA, nous avons observé une forte corrélation dose-dépendante entre l'inhibition de l'expression de l'ICBP90 et la diminution du nombre de cellules vivantes (**Publication II - Figure 1, page 56**). Dans une autre condition apoptotique, réalisée par la stimulation avec l'ionophore du calcium A23187 (Ruiz-Ruiz *et al.*, 1995), la régulation négative de l'ICBP90 se produit à la suite de la mobilisation des ions du Ca^{2+} (**Publication II - Figure 2, page 57**). De façon intéressante, dans les mêmes conditions de traitement, les cellules THP-1 ne manifestent ni diminution de l'expression de l'ICBP90 ni inhibition de la prolifération cellulaire. Ceci suggère une relation entre la diminution de l'expression de l'ICBP90 et l'induction de l'apoptose.

Les deux autres protéines de la famille ICBP90, Np90 et NIRF, sont également surexprimées dans les cellules cancéreuses (Mori *et al.*, 2002; Muto *et al.*, 1995). Nous proposons un rôle de cette famille soit dans une nouvelle voie de signalisation montrant des caractéristiques anti-apoptotiques dans la cancérogenèse. Cette hypothèse peut ouvrir un nouvel horizon dans les domaines de recherche des médicaments anticancéreux.

II. La régulation de l'expression de l'ICBP90 dans les lymphocytes T

La stimulation du TCR induit le programme d'activation des lymphocytes T qui comporte, non seulement l'induction des gènes régulateurs du cycle cellulaire, mais aussi ceux impliqués dans l'AICD. En effet, la régulation négative par l'apoptose est cruciale dans l'anergie des lymphocytes T (Appleman et Boussiotis, 2003). L'AICD permet l'élimination de l'excès de lymphocytes T activés après la réponse immunitaire et contrôle la sélection négative des lymphocytes T par délétion clonale des thymocytes autoréactifs (Green *et al.*, 2003). L'AICD se produit avant la transition G1/S, et dépend de E2F-1 et de p73 (**Figure 7, page 21**) (Lissy *et al.*, 2000; Lissy *et al.*, 1998). Etant donné que E2F-1 régule l'expression de l'ICBP90, cette voie est susceptible d'être impliquée dans les cellules Jurkat en terme de régulation de l'ICBP90 par le TCR. La progression du cycle cellulaire est un préalable à l'AICD ce qui suggère que les gènes impliqués dans la prolifération cellulaire doivent être contrôlés pendant ce processus apoptotique (Boonen *et al.*, 1999b; Green *et al.*, 2003). Par conséquent, notre hypothèse est que l'AICD, induit par la stimulation du TCR, nécessite la répression de l'ICBP90 comme préalable à l'apoptose.

La stimulation du TCR contrôle l'expression de l'ICBP90

La stimulation du TCR par un anticorps anti-CD3 induit une diminution de l'ARNm de l'ICBP90 dans les cellules Jurkat (**Publication V - Figure 2, page 81**). De plus, une forte corrélation entre la diminution du nombre de cellules vivantes et la diminution de l'ARNm de l'ICBP90 est constatée dans ces lymphocytes T activés. Cette corrélation suggère que l'absence de l'ICBP90 serait responsable de l'inhibition de la viabilité cellulaire. Par ailleurs, les cellules Jurkat ne sont pas dépendantes des signaux costimulateurs fournis par CD28 pour leur activation (Favero et Lafont, 1998). En corrélation avec cette notion, dans notre modèle cellulaire, la stimulation de CD28, qui nous servait de contrôle, n'entraîne pas d'effets significatifs ni au niveau de l'expression de l'ICBP90, ni au niveau de la prolifération de cellules (**Publication V - Figure 2, page 81**).

En utilisant le système de gène rapporteur de la luciférase (**Figure 18**), nous avons également montré que l'activité promotrice du gène de l'ICBP90 diminue dans les cellules Jurkat activées par la stimulation du TCR (**Publication V - Figure 4, page 82**). Ceci suggère que la diminution de l'expression de l'ICBP90 se produit au moins en partie au niveau du

gène de l'ICBP90. Cette inhibition de l'expression de l'ICBP90 serait, dans notre hypothèse, une étape fondamentale dans l'AICD et en particulier dans l'arrêt en phase G1.

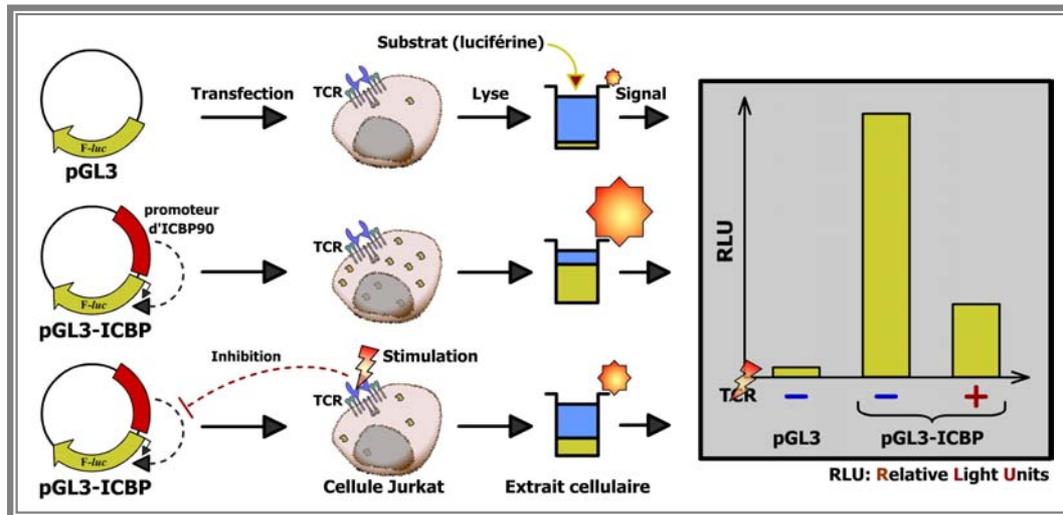


Figure 18. Le système du gène rapporteur de la luciférase.

Les études sur le promoteur du gène de l'ICBP90 sont réalisées grâce au système de gène rapporteur de la luciférase. C'est une nouvelle technique qui permet de suivre l'activité promotrice d'un gène. Pour cela le promoteur de ce gène est cloné dans un plasmide en amont du gène codant l'enzyme de la luciférase. Cette enzyme, dont l'expression dépend de l'activité du promoteur cloné, est détectée facilement grâce à sa capacité à produire de la lumière dans une réaction de luminescence. Dans notre exemple le promoteur du gène de l'ICBP90 est cloné dans le plasmide pGL3 avant le gène de la luciférase (*F-Luc*). Dans les cellules Jurkat transfectées par le pGL3, sans promoteur, l'enzyme de la luciférase est pratiquement absente. Au contraire, le promoteur du gène de l'ICBP90 active la transcription du gène rapporteur et par conséquent, augmente la quantité de l'enzyme dans les cellules transfectées par pGL3-ICBP. De plus, la stimulation du TCR dans ces conditions de transfections, inhibe l'activité luciférase en réprimant le promoteur du gène de l'ICBP90.

Pour comprendre l'effet négatif du TCR sur l'expression de l'ICBP90, nous avons étudié la séquence du promoteur du gène de l'ICBP90 afin de trouver des éléments potentiellement impliqués dans la régulation de ce gène. L'analyse de l'activité promotrice du gène de l'ICBP90 nous a permis de déterminer la partie fonctionnelle de ce promoteur qui se situe en amont du premier site d'initiation de transcription (entre -1887 et -1369) (**Publication V - Figure 5, page 83**). Dans ce fragment actif qui répond négativement au signal du TCR, la mutation du site E2F-a est suffisante non seulement pour inhiber son activité promotrice de 50 %, mais aussi pour empêcher la diminution de l'activité de ce promoteur suite à la stimulation du TCR (**Publication V - Figure 5, page 83**). En effet, ce site (5'-TTTCGCGGGAAA-3') est un motif spécial de liaison pour le facteur E2F. Il se compose de deux sites consensus opposés et en chevauchement permettant ainsi une meilleure stabilité de fixation pour le facteur E2F (Wade *et al.*, 1995). Ce résultat est en parfaite corrélation avec une étude précédente qui a montré le rôle de ce motif, hautement conservé et fonctionnel,

dans la régulation des promoteurs de plusieurs gènes contrôlés par la voie pRb/E2F comme DHFR et PCNA (Wade *et al.*, 1995).

Le rôle de la voie pRb/E2F dans la répression de l'ICBP90 par le TCR

De plus de la régulation négative de la cycline D3, la déphosphorylation de pRb est l'événement principal dans l'arrêt du cycle cellulaire en G1 causé par la stimulation du TCR (**Publication V - Figure 1, page 81**) (Boonen *et al.*, 1999b; Miyatake *et al.*, 1995; van Oirschot *et al.*, 2001). En effet, dans les lymphocytes T activés, pRb est sous sa forme active hypophosphorylée. Nous supposons que la régulation négative de la cycline D3 participe à la diminution de l'expression de l'ICBP90 après stimulation du TCR. En outre, nous pensons que le signal du TCR implique les événements suivants : ❶ la régulation négative de la cycline D3 par des mécanismes très mal connus, ❷ l'inhibition des complexes cycline D3-cdk(4/6), ❸ la prévention de la phosphorylation de pRb, ❹ la formation du complexe inhibiteur de pRb/E2F-1 qui se fixe sur le gène de l'ICBP90 causant ainsi sa répression. Par ailleurs, l'absence de l'ICBP90 est la cause de la diminution de l'expression de la TopoII α observée après la stimulation du TCR (**Publication V - Figure 1, page 81**). En conclusion, tous ces événements empêchent les cellules d'entrer en phase S et les orientent vers l'apoptose.

Notre équipe avait précédemment montré que la diminution de l'expression de l'ICBP90 est sous le contrôle de p53 (Arima *et al.*, 2004). De plus, il a été montré que E2F-1 induit l'apoptose par régulation positive de p53 après stimulation du TCR (Zhu *et al.*, 1999). Néanmoins, l'AICD semble être un mécanisme indépendant de p53 mais plutôt dépendant de son homologue p73 (Boehme et Lenardo, 1996) et nous n'excluons pas ainsi qu'avec p53, la régulation de l'ICBP90 pourrait être sous le contrôle de p73 dans les lymphocytes T activés par le TCR. Vu l'importance croissante de p73 dans les phénomènes apoptotiques des lymphocytes T activés, le rôle de p73 dans l'inhibition de l'ICBP90 dans ces cellules serait un sujet intéressant à explorer.

Le rôle des voies de signalisation du TCR

Les voies de signalisation du TCR peuvent être stimulées par l'ionophore de calcium A23187 et par le PMA (**Figure 3, page 13**). Avec l'utilisation de ces deux agents pharmacologiques, nous avons montré que la régulation négative de l'ICBP90 est induite par la mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire ainsi que par l'activation de la PKC (**Publication V - Figure 3, page 82**).

- La voie dépendante du Ca^{2+}

Une forte apoptose a été obtenue en incubant des cellules Jurkat sont incubées avec l'ionophore du calcium A23187 (**Publication V - Figure 3, page 82**). En effet, la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire est le phénomène clé dans la signalisation du TCR conduisant à l'apoptose des lymphocytes T. Cet effet est probablement lié au rôle du Ca^{2+} dans l'activation de l'expression massive et immédiate de Nur77 (Hsu *et al.*, 2004; Woronicz *et al.*, 1995). Pendant le développement des lymphocytes T, Nur77 est réprimée par l'effet inhibiteur du complexe Cabin-1/mSin3/HDAC(1,2) fixé sur les sites MEF2 dans le promoteur du gène Nur77 (**Figure 10, page 26**) (Youn et Liu, 2000). L'activation de ce gène lors de l'AICD nécessite le remplacement de ces éléments répresseurs par d'autres activateurs, comme p300 (Woronicz *et al.*, 1995). Des études récentes ont montré que les souris mutées exprimant une Cabin-1 tronquée (dépourvue du domaine de liaison à MEF2), ont un développement et une apoptose normaux de leurs lymphocytes T (Esau *et al.*, 2001). Ceci suggère qu'un autre facteur inhibiteur serait impliqué dans la répression du gène Nur77. L'ICBP90 serait, selon notre idée, ce facteur qui participe avec Cabin-1 à l'inhibition de la transcription du gène Nur77. L'apoptose induite par le Ca^{2+} impliquerait donc ces trois étapes : ① l'activation de la calmoduline qui neutralise Cabin-1 (Youn et Liu, 2000), ② la répression de l'expression de l'ICBP90 et ③ la fixation de p300 sur les sites MEF2 du gène Nur77 pour activer son expression et induire l'apoptose (Woronicz *et al.*, 1995). Le mécanisme par lequel le Ca^{2+} parvient à inhiber l'expression de l'ICBP90 ainsi que les interactions entre ces trois axes de régulation sont des nouvelles perspectives de recherche.

- La voie dépendante de la PKC

La voie de la PKC, particulièrement la PKC θ , prend en charge une grande partie de la signalisation du TCR. Cette notion est claire dans les résultats où le traitement par le PMA a induit une inhibition de la prolifération cellulaire et une diminution de l'expression de l'ICBP90 (**Publication V - Figure 3, page 82**). De plus, le PMA n'a aucun effet apoptotique significatif dans les cellules Jurkat. Ceci est en parfaite corrélation avec les résultats publiés par le groupe Lopez-Rivas montrant que la stimulation de la PKC induit une faible mort cellulaire ainsi qu'une très faible fragmentation d'ADN (Ruiz-Ruiz *et al.*, 1995). Ceci s'expliquerait par le fait que la voie de la PKC, contrairement à la voie du Ca^{2+} , n'active pas le gène Nur77 dans les lymphocytes T activés (Woronicz *et al.*, 1995). Le mécanisme utilisé par la PKC pour induire la régulation négative de la prolifération cellulaire et de l'expression de l'ICBP90 n'est pas encore déterminé mais pourrait par exemple impliquer la voie pRb/E2F.

En effet, le PMA, en activant la PKC, induit la différenciation de plusieurs lignées cellulaires comme les monocytes et les cellules HL-60 (Das *et al.*, 2000; Traore *et al.*, 2005). Cet effet est dû à la capacité du PMA à induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Le même effet est observé également dans les cellules Jurkat après 24h d'incubation avec le PMA (Boonen *et al.*, 1999b). L'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 par le PMA est le résultat de l'activation de l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21^{Waf1/Cip1}. Cet inhibiteur agit en désactivant les complexes cycline-cdk et en maintenant le complexe inhibiteur pRb/E2F sur les gènes des protéines régulatrices du cycle cellulaire. Ceci explique également l'inhibition de l'activité promotrice du gène de l'ICBP90 dans les cellules Jurkat activées par le PMA (**Publication V - Figure 4, page 82**).

- La coopération entre les voies du TCR

Nous avons constaté une sorte de coopération entre les deux voies de signalisation du TCR puisque leur stimulation simultanée aboutit à un effet maximal au niveau de l'induction de l'apoptose. Cet effet est observé également dans la répression de l'ICBP90 au niveau de son ARNm (**Publication V - Figure 3, page 82**) et de son gène (**Publication V - Figure 4, page 82**). L'interaction entre la voie du Ca²⁺ et celle de la PKC est un phénomène très répandu dans les lymphocytes T. Elle est constatée dans la régulation de plusieurs gènes comme celui de l'IL-2 et de Fas-L (Villalba *et al.*, 1999; Werlen *et al.*, 1998).

III. Les rôles potentiels de l'ICBP90 dans l'activation des lymphocytes T

Par son activité E3 ligase

La conséquence de la régulation négative de l'ICBP90 par le TCR est un arrêt en phase G1 en empêchant probablement des processus de remodelage de la chromatine. En effet, NIRF et NP95 manifestent une activité d'ubiquitine ligase (Citterio *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2004). Pour NP95 le substrat *in vitro* a été identifié comme étant l'histone H3 (Citterio *et al.*, 2004). Des modifications post-traductionnelles de l'histone H3 sont impliquées dans la régulation de l'expression des gènes gouvernés par la structure de la chromatine (Workman et Abmayr, 2004). Nous pensons que dans la phase G1 du cycle cellulaire, l'interaction de pRb hypophosphorylée avec l'ICBP90 pourrait moduler son activité ligase et par conséquent inhiber l'ubiquitinylation de l'histone H3 en causant la répression des gènes régulateurs du cycle cellulaire. Ainsi, la phosphorylation de pRb faciliterait l'ubiquitinylation de l'histone H3 par l'ICBP90, favorisant donc l'expression des gènes et l'entrée en phase S. Puisque les ubiquitines ligase E3 jouent des rôles divers dans les réponses des lymphocytes T (Heissmeyer et Rao, 2004), l'ubiquitinylation serait un processus indispensable pour la régulation des différentes molécules de signalisation du TCR (Liu, 2004). Nous émettons l'hypothèse que la régulation négative de l'ICBP90, par la stimulation du TCR, pourrait empêcher les modifications de H3 nécessaires à la progression dans le cycle cellulaire. De la même manière, l'ICBP90 pourrait être l'ubiquitine ligase de p27^{Kip1} qui est un régulateur critique de la prolifération des lymphocytes T (**Figure 7, page 21**) (Shen et Kaplan, 2002). La dégradation de cet inhibiteur dans les lymphocytes T en prolifération pourrait être expliquée par le taux élevé de l'ICBP90 dans ces cellules. L'activité ligase de l'ICBP90 ainsi que ces cibles potentielles à dégrader sont des nouveaux éléments intéressants dans l'activation des lymphocytes T et demandent à être éclaircie.

Par son rôle de facteur de transcription

D'autres gènes que TopoII α , potentiellement régulés par l'ICBP90 en tant que facteur de transcription, pourraient être impliqués dans la prolifération et l'apoptose. Ceci pourrait suggérer une implication de l'ICBP90 dans la régulation fonctionnelle des lymphocytes T par le TCR. Pour notre part, nous pensons que l'ICBP90 pourrait agir sur de nombreux

gènes cibles potentielles qui renfermeraient une boîte « CCAAT » similaire à ICB1 et ICB2 du gène *TopoII α* . Le futur travail sur l'ICBP90, pourrait cibler des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire ou de l'apoptose, ayant une structure du promoteur similaire à celle du gène *TopoII α* et présentant des variations d'expression en fonction de la régulation des lymphocytes T lors de la stimulation par le TCR. Les meilleurs candidats pour cette étude sont les protéines de la famille Bcl-2, comme Mcl-1, Bim et Bax, à cause de leurs rôles importants dans la régulation du lymphocyte T (Bouillet *et al.*, 2002; Bouillet et Strasser, 2002; Opferman *et al.*, 2003). De plus, dans les promoteurs de leurs gènes les sites CCAAT existent de manière très fréquente (observations personnelles). De plus, le membre anti-apoptotique de cette famille, Bcl-X_L, est régulé par C/EBP β , un autre facteur de transcription reconnaissant la séquence CCAAT (Mukherjee *et al.*, 2001). La régulation par l'ICBP90 pourrait atteindre les autres protéines impliquées dans l'apoptose comme la caspase-8 ou le CD95, puisque ces deux protéines sont régulées également par C/EBP β (Buck *et al.*, 2001; Wada *et al.*, 1995).

Si l'ICBP90 est un activateur du gène *TopoII α* , cela n'implique pas pour autant que ce facteur soit un activateur de tous ces gènes cibles. Logiquement, l'effet transcriptionnel de l'ICBP90 devrait être influencé par l'action de ses partenaires, comme pRb ou Tip60, et/ou par son état de phosphorylation. Le système de gène rapporteur de luciférase serait un moyen efficace pour ce genre d'étude. Dans ce système, le gène rapporteur fusionné aux promoteurs issus des gènes cibles potentiels de l'ICBP90 permettrait de répondre à des questions concernant les rôles, les partenaires ainsi que les voies d'activation de l'ICBP90.

Par son interaction dans le système HDAC7/Nur77

L'ICBP90 participe à la régulation positive de certains gènes puisque elle augmente la transcription du gène *TopoII α* et qu'elle agit également avec Tip60, un activateur de la transcription (Bronner *et al.*, 2002; Halkidou *et al.*, 2003). Cependant, un autre rôle putatif pour l'interaction d'ICBP90 avec pRb est la répression des gènes. Il a été rapporté que l'ICBP90 exerce ses effets de répression en recrutant également l'HDAC vers les promoteurs des gènes correspondants (Unoki *et al.*, 2004). En effet, il a été montré que l'ICBP90, NIRF et Np95, par leurs domaines G9a, peuvent recruter les HDAC vers les régions méthylées des promoteurs de différents gènes (Unoki *et al.*, 2004). Les HDAC peuvent agir comme régulatrices principales dans les lymphocytes T, en particulier l'HDAC7 qui est très fortement exprimée en réponse à la stimulation du TCR (Dequiedt *et al.*, 2003; Verdin *et al.*, 2004). L'HDAC7 contrôle le gène Nur77 dont le niveau d'acétylation de l'histone est un

déterminant important de l'activité transcriptionnelle (Dequiedt *et al.*, 2003). Nous proposons l'hypothèse que l'ICBP90 serait le recruteur de l'HDAC7 sur le promoteur du gène Nur77. Une fois le TCR stimulé, la disparition de l'ICBP90 ainsi que la phosphorylation de HDAC7 permettent la translocation de HDAC7 vers le cytoplasme afin de libérer l'expression de Nur77 (Dequiedt *et al.*, 2005; Parra *et al.*, 2005). La possibilité de la fixation de l'ICBP90 sur le gène Nur77 est une question intéressante qui réclame une investigation plus poussée.

Par la liaison aux séquences CpG méthylées de l'ADN

Récemment, les travaux de Unoki et collaborateurs ont montré que l'ICBP90 a la capacité, par son domaine G9a, de recruter HDAC1 sur les séquences CpG méthylées du locus $p16^{\text{INK4a}}/p14^{\text{ARF}}$, causant sa répression (Unoki *et al.*, 2004). Ce complexe génique, classé parmi les gènes suppresseurs de tumeurs, a acquis en quelques années un statut unique puisqu'il intervient dans deux voies contrôlant à la fois la prolifération cellulaire et l'apoptose (**Figure 19**) (Sharpless et Chin, 2003).

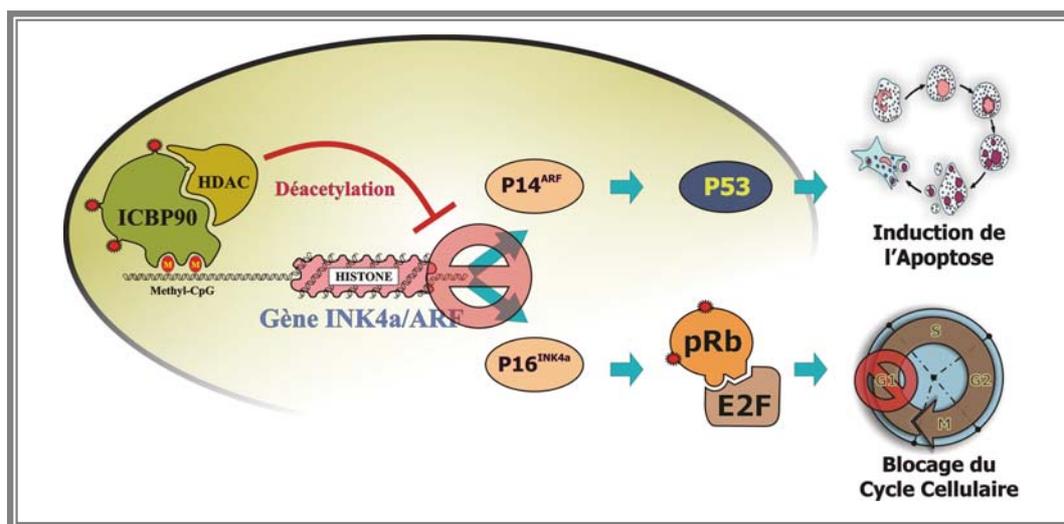


Figure 19. Le contrôle du gène *INK4a/ARF* par l'ICBP90

Ce complexe génique code deux protéines distinctes, $p16^{\text{INK4a}}$ et $p14^{\text{ARF}}$ ($p19^{\text{ARF}}$ chez l'homme). La $p16^{\text{INK4a}}$ est un inhibiteur spécifique de $cdk4/6$ qui contrôle la voie $pRb/E2F$, tandis que la $p14^{\text{ARF}}$ régule une voie apoptotique en ciblant $MDM2/p53$. L'ICBP90, en se fixant sur les régions hyperméthylées de ce gène et en recrutant HDAC au niveau de ce gène, pourrait participer à l'inhibition de l'expression de ces deux protéines. (D'après (Sharpless et Chin, 2003) et les résultats de (Unoki *et al.*, 2004))

Ce modèle de régulation est parfaitement adéquat pour un rôle important de l'ICBP90 dans les lymphocytes T, puisque son inhibition par le TCR signifierait à la fois l'arrêt du cycle cellulaire induit par $p16^{\text{INK4a}}$ et en même temps l'induction de l'apoptose activée par $p14^{\text{ARF}}$ (**Figure 19**).

Ce modèle de contrôle peut expliquer également l'augmentation de l'expression de p73 dans les lymphocytes T activés. En effet, la méthylation du gène de p73 jouer un rôle important dans sa régulation transcriptionnelle (Corn *et al.*, 1999). Pour cette raison, l'absence de l'ICBP90, le répresseur présumé de p73, peut induire l'activation du gène p73 par E2F-1 et par la suite l'augmentation de l'expression de p73 lors de l'AICD (Lissy *et al.*, 2000).

En conclusion, la stimulation du TCR induit une diminution de l'expression de l'ICBP90. L'absence de l'ICBP90 d'une part empêche l'expression des gènes impliqués dans la transition G1/S, et d'autre part active l'expression de ceux impliqués dans l'apoptose et donc conduit les cellules à des phénomènes apoptotiques (**Figure 20**). L'ensemble de ces études devrait permettre d'apporter de nouvelles connaissances concernant les mécanismes de régulation des lymphocytes T et en particulier les processus d'élimination des lymphocytes T lors de la délétion clonale qui semble être la clé des maladies autoimmunes.

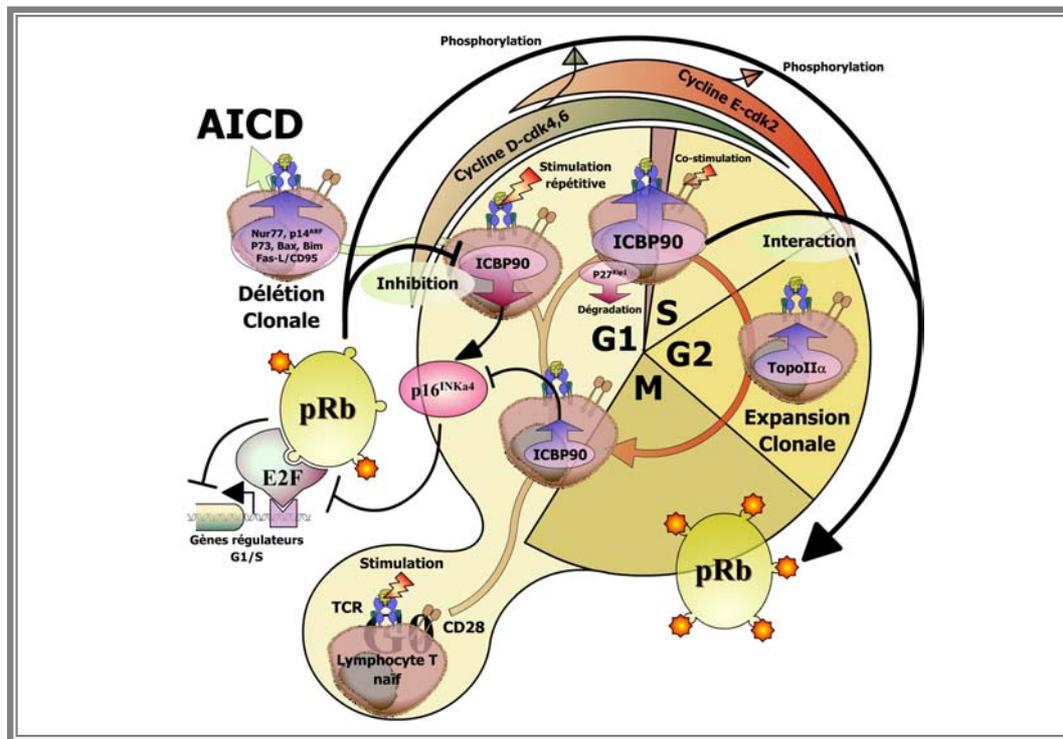


Figure 20. Le rôle présumé de l'ICBP90 dans le Lymphocyte T

Comme dans toutes les cellules quiescentes, l'ICBP90 est absente dans les lymphocytes T naïfs. Avec l'entrée en phase G1, lors d'une stimulation par l'antigène, elle commence à être exprimée et atteint un niveau maximal lors de la costimulation par CD28. L'ICBP90 participe avec les complexes cycline-cdks à la régulation de la transition G1/S. Elle intervient ensuite, dans la régulation du cycle cellulaire (expansion clonale) soit par la dégradation de l'inhibiteur p27^{Kip1} soit par l'interaction avec pRb soit par le contrôle de l'expression de la TopoII α . En revanche, la stimulation inappropriée du lymphocyte T, cas de stimulation répétitive du TCR dans les lymphocytes T pré-activés, réduit le niveau de l'ICBP90, par la voie pRb/E2F. L'absence de l'ICBP90 permettra à ses gènes cibles inhibés d'être exprimés afin de maintenir la cellule en phase G1 (p16^{INK4a}) et d'activer l'AICD (p14^{ARF}, Nur77, p73, Bax, Bim et Fas-L/CD95) et par conséquent d'éliminer le lymphocyte T (Délétion clonale).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Aasland, R., Gibson, T. J., and Stewart, A. F. (1995). The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* 20, 56-59.
- [2]. Adams, P. D., and Kaelin, W. G., Jr. (1996). The cellular effects of E2F overexpression. *Curr Top Microbiol Immunol* 208, 79-93.
- [3]. Altman, A., and Villalba, M. (2003). Protein kinase C-theta (PKCtheta): it's all about location, location, location. *Immunol Rev* 192, 53-63.
- [4]. Appleman, L. J., and Boussiotis, V. A. (2003). T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev* 192, 161-180.
- [5]. Arbogast, A., Boutet, S., Phelouzat, M. A., Plastre, O., Quadri, R., and Proust, J. J. (1999). Failure of T lymphocytes from elderly humans to enter the cell cycle is associated with low Cdk6 activity and impaired phosphorylation of Rb protein. *Cell Immunol* 197, 46-54.
- [6]. Arima, Y., Hirota, T., Bronner, C., Mousli, M., Fujiwara, T., Niwa, S., Ishikawa, H., and Saya, H. (2004). Down-regulation of nuclear protein ICBP90 by p53/p21Cip1/WAF1-dependent DNA-damage checkpoint signals contributes to cell cycle arrest at G1/S transition. *Genes Cells* 9, 131-142.
- [7]. Baier-Bitterlich, G., Uberall, F., Bauer, B., Fresser, F., Wachter, H., Grunicke, H., Utermann, G., Altman, A., and Baier, G. (1996). Protein kinase C-theta isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 16, 1842-1850.
- [8]. Baier, G., Baier-Bitterlich, G., Meller, N., Coggeshall, K. M., Giampa, L., Telford, D., Isakov, N., and Altman, A. (1994). Expression and biochemical characterization of human protein kinase C-theta. *Eur J Biochem* 225, 195-203.
- [9]. Boehme, S. A., and Lenardo, M. J. (1996). TCR-mediated death of mature T lymphocytes occurs in the absence of p53. *J Immunol* 156, 4075-4078.
- [10]. Bonapace, I. M., Latella, L., Papait, R., Nicassio, F., Sacco, A., Muto, M., Crescenzi, M., and Di Fiore, P. P. (2002). Np95 is regulated by E1A during mitotic reactivation of terminally differentiated cells and is essential for S phase entry. *J Cell Biol* 157, 909-914.
- [11]. Boonen, G. J., van Dijk, A. M., Verdonck, L. F., van Lier, R. A., Rijksen, G., and Medema, R. H. (1999a). CD28 induces cell cycle progression by IL-2-independent down-regulation of p27kip1 expression in human peripheral T lymphocytes. *Eur J Immunol* 29, 789-798.
- [12]. Boonen, G. J., van Oirschot, B. A., van Diepen, A., Mackus, W. J., Verdonck, L. F., Rijksen, G., and Medema, R. H. (1999b). Cyclin D3 regulates proliferation and apoptosis of leukemic T cell lines. *J Biol Chem* 274, 34676-34682.
- [13]. Borden, K. L. (2000). RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol Biol* 295, 1103-1112.
- [14]. Bouillet, P., Purton, J. F., Godfrey, D. I., Zhang, L. C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J. M., and Strasser, A. (2002). BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 415, 922-926.

- [15]. Bouillet, P., and Strasser, A. (2002). Bax and Bak: back-bone of T cell death. *Nat Immunol* 3, 893-894.
- [16]. Bronner, C., Hopfner, R., and Mousli, M. (2002). Transcriptional regulation of the human topoisomerase IIalpha gene. *Anticancer Res* 22, 605-612.
- [17]. Bronner, C., Trotzier, M. A., Filhol, O., Cochet, C., Rochette-Egly, C., Scholler-Guinard, M., Klein, J. P., and Mousli, M. (2004). The Antiapoptotic Protein ICBP90 Is a Target for Protein Kinase 2. *Ann N Y Acad Sci* 1030, 355-360.
- [18]. Brunner, T., Kasibhatla, S., Pinkoski, M. J., Frutschi, C., Yoo, N. J., Echeverri, F., Mahboubi, A., and Green, D. R. (2000). Expression of Fas ligand in activated T cells is regulated by c-Myc. *J Biol Chem* 275, 9767-9772.
- [19]. Buck, M., Poli, V., Hunter, T., and Chojkier, M. (2001). C/EBPbeta phosphorylation by RSK creates a functional XEXD caspase inhibitory box critical for cell survival. *Mol Cell* 8, 807-816.
- [20]. Cao, Q., Xia, Y., Azadiv, M., and Crispe, I. N. (2004). The E2F-1 transcription factor promotes caspase-8 and bid expression, and enhances Fas signaling in T cells. *J Immunol* 173, 1111-1117.
- [21]. Chambers, C. A. (2001). The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol* 22, 217-223.
- [22]. Chu, D. H., Morita, C. T., and Weiss, A. (1998). The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol Rev* 165, 167-180.
- [23]. Citterio, E., Papait, R., Nicassio, F., Vecchi, M., Gomiero, P., Mantovani, R., Di Fiore, P. P., and Bonapace, I. M. (2004). Np95 is a histone-binding protein endowed with ubiquitin ligase activity. *Mol Cell Biol* 24, 2526-2535.
- [24]. Corn, P. G., Kuerbitz, S. J., van Noesel, M. M., Esteller, M., Compitello, N., Baylin, S. B., and Herman, J. G. (1999). Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation. *Cancer Res* 59, 3352-3356.
- [25]. Cory, S., and Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.
- [26]. Cuvier, O., and Hirano, T. (2003). A role of topoisomerase II in linking DNA replication to chromosome condensation. *J Cell Biol* 160, 645-655.
- [27]. Dahiya, A., Gavin, M. R., Luo, R. X., and Dean, D. C. (2000). Role of the LXCXE binding site in Rb function. *Mol Cell Biol* 20, 6799-6805.
- [28]. Das, D., Pintucci, G., and Stern, A. (2000). MAPK-dependent expression of p21(WAF) and p27(kip1) in PMA-induced differentiation of HL60 cells. *FEBS Lett* 472, 50-52.
- [29]. Dequiedt, F., Kasler, H., Fischle, W., Kiermer, V., Weinstein, M., Herndier, B. G., and Verdin, E. (2003). HDAC7, a thymus-specific class II histone deacetylase, regulates Nur77 transcription and TCR-mediated apoptosis. *Immunity* 18, 687-698.

- [30]. Dequiedt, F., Van Lint, J., Lecomte, E., Van Duppen, V., Seufferlein, T., Vandenneede, J. R., Wattiez, R., and Kettmann, R. (2005). Phosphorylation of histone deacetylase 7 by protein kinase D mediates T cell receptor-induced Nur77 expression and apoptosis. *J Exp Med* 201, 793-804.
- [31]. Di Fiore, P. P., Polo, S., and Hofmann, K. (2003). When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 491-497.
- [32]. Esau, C., Boes, M., Youn, H. D., Tatterson, L., Liu, J. O., and Chen, J. (2001). Deletion of calcineurin and myocyte enhancer factor 2 (MEF2) binding domain of Cabin1 results in enhanced cytokine gene expression in T cells. *J Exp Med* 194, 1449-1459.
- [33]. Fan, S., Yuan, R., Ma, Y. X., Meng, Q., Goldberg, I. D., and Rosen, E. M. (2001a). Mutant BRCA1 genes antagonize phenotype of wild-type BRCA1. *Oncogene* 20, 8215-8235.
- [34]. Fan, S., Yuan, R., Ma, Y. X., Xiong, J., Meng, Q., Erdos, M., Zhao, J. N., Goldberg, I. D., Pestell, R. G., and Rosen, E. M. (2001b). Disruption of BRCA1 LXCXE motif alters BRCA1 functional activity and regulation of RB family but not RB protein binding. *Oncogene* 20, 4827-4841.
- [35]. Favero, J., and Lafont, V. (1998). Effector pathways regulating T cell activation. *Biochem Pharmacol* 56, 1539-1547.
- [36]. Ferreira, R., Naguibneva, I., Mathieu, M., Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Pritchard, L. L., and Harel-Bellan, A. (2001). Cell cycle-dependent recruitment of HDAC-1 correlates with deacetylation of histone H4 on an Rb-E2F target promoter. *EMBO Rep* 2, 794-799.
- [37]. Firpo, E. J., Koff, A., Solomon, M. J., and Roberts, J. M. (1994). Inactivation of a Cdk2 inhibitor during interleukin 2-induced proliferation of human T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 14, 4889-4901.
- [38]. Fleisher, T. A., Puck, J. M., Strober, W., Dale, J. K., Lenardo, M. J., Siegel, R. M., Straus, S. E., and Bleesing, J. J. (2001). The autoimmune lymphoproliferative syndrome. A disorder of human lymphocyte apoptosis. *Clin Rev Allergy Immunol* 20, 109-120.
- [39]. Freemont, P. S. (1993). The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger. *Ann N Y Acad Sci* 684, 174-192.
- [40]. Fujimori, A., Matsuda, Y., Takemoto, Y., Hashimoto, Y., Kubo, E., Araki, R., Fukumura, R., Mita, K., Tatsumi, K., and Muto, M. (1998). Cloning and mapping of Np95 gene which encodes a novel nuclear protein associated with cell proliferation. *Mamm Genome* 9, 1032-1035.
- [41]. Green, D. R., Droin, N., and Pinkoski, M. (2003). Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 193, 70-81.
- [42]. Hacker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 301, 5-17.
- [43]. Halkidou, K., Gnanapragasam, V. J., Mehta, P. B., Logan, I. R., Brady, M. E., Cook, S., Leung, H. Y., Neal, D. E., and Robson, C. N. (2003). Expression of Tip60, an androgen receptor coactivator, and its role in prostate cancer development. *Oncogene* 22, 2466-2477.
- [44]. Hande, K. R. (1998). Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta* 1400, 173-184.

- [45]. Harbour, J. W., and Dean, D. C. (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 14, 2393-2409.
- [46]. He, H. T., Lellouch, A., and Marguet, D. (2005). Lipid rafts and the initiation of T cell receptor signaling. *Semin Immunol* 17, 23-33.
- [47]. Heissmeyer, V., and Rao, A. (2004). E3 ligases in T cell anergy--turning immune responses into tolerance. *Sci STKE* 241, pe29.
- [48]. Hengstschlager, M., Braun, K., Soucek, T., Miloloza, A., and Hengstschlager-Ottnd, E. (1999). Cyclin-dependent kinases at the G1-S transition of the mammalian cell cycle. *Mutat Res* 436, 1-9.
- [49]. Hivroze, C. (2005). Tout ce que vous avez toujours voulu savoir sur la protéine ZAP-70. *M/S* 21, 150-155.
- [50]. Hopfner, R., Mousli, M., Garnier, J. M., Redon, R., du Manoir, S., Chatton, B., Ghyselinck, N., Oudet, P., and Bronner, C. (2001). Genomic structure and chromosomal mapping of the gene coding for ICBP90, a protein involved in the regulation of the topoisomerase IIalpha gene expression. *Gene* 266, 15-23.
- [51]. Hopfner, R., Mousli, M., Jeltsch, J. M., Voulgaris, A., Lutz, Y., Marin, C., Bellocq, J. P., Oudet, P., and Bronner, C. (2000). ICBP90, a novel human CCAAT binding protein, involved in the regulation of topoisomerase IIalpha expression. *Cancer Res* 60, 121-128.
- [52]. Hopfner, R., Mousli, M., Oudet, P., and Bronner, C. (2002). Overexpression of ICBP90, a novel CCAAT-binding protein, overcomes cell contact inhibition by forcing topoisomerase II alpha expression. *Anticancer Res* 22, 3165-3170.
- [53]. Hsu, H. C., Zhou, T., and Mountz, J. D. (2004). Nur77 family of nuclear hormone receptors. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3, 413-423.
- [54]. Huang, Y., and Wange, R. L. (2004). T cell receptor signaling: beyond complex complexes. *J Biol Chem* 279, 28827-28830.
- [55]. Irwin, M., Marin, M. C., Phillips, A. C., Seelan, R. S., Smith, D. I., Liu, W., Flores, E. R., Tsai, K. Y., Jacks, T., Vousden, K. H., and Kaelin, W. G., Jr. (2000). Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* 407, 645-648.
- [56]. Isaacs, R. J., Harris, A. L., and Hickson, I. D. (1996). Regulation of the human topoisomerase IIalpha gene promoter in confluence-arrested cells. *J Biol Chem* 271, 16741-16747.
- [57]. Isakov, N., and Altman, A. (2002). Protein kinase C(theta) in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 20, 761-794.
- [58]. Janeway, C. A., and Travers, P. (1997). *Immunobiologie*. De Boeck & Larcier sa Second edition.
- [59]. Joshi, A. A., Wu, Z., Reed, R. F., and Suttle, D. P. (2003). Nuclear factor-Y binding to the topoisomerase IIalpha promoter is inhibited by both the p53 tumor suppressor and anticancer drugs. *Mol Pharmacol* 63, 359-367.

- [60]. June, C. H., Ledbetter, J. A., Linsley, P. S., and Thompson, C. B. (1990). Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today* 11, 211-216.
- [61]. Kaufmann, S. H., and Gores, G. J. (2000). Apoptosis in cancer: cause and cure. *Bioessays* 22, 1007-1017.
- [62]. Kubo, T., Kohno, K., Ohga, T., Taniguchi, K., Kawanami, K., Wada, M., and Kuwano, M. (1995). DNA topoisomerase II alpha gene expression under transcriptional control in etoposide/teniposide-resistant human cancer cells. *Cancer Res* 55, 3860-3864.
- [63]. Lalli, E., and Sassone-Corsi, P. (1994). Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *J Biol Chem* 269, 17359-17362.
- [64]. Lebrin, F., Chambaz, E. M., and Bianchini, L. (2001). A role for protein kinase CK2 in cell proliferation: evidence using a kinase-inactive mutant of CK2 catalytic subunit alpha. *Oncogene* 20, 2010-2022.
- [65]. Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- [66]. Li, Y., Mori, T., Hata, H., Homma, Y., and Kochi, H. (2004). NIRF induces G1 arrest and associates with Cdk2. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 464-468.
- [67]. Lissy, N. A., Davis, P. K., Irwin, M., Kaelin, W. G., and Dowdy, S. F. (2000). A common E2F-1 and p73 pathway mediates cell death induced by TCR activation. *Nature* 407, 642-645.
- [68]. Lissy, N. A., Van Dyk, L. F., Becker-Hapak, M., Vocero-Akbani, A., Mendler, J. H., and Dowdy, S. F. (1998). TCR antigen-induced cell death occurs from a late G1 phase cell cycle check point. *Immunity* 8, 57-65.
- [69]. Liu, Y. C. (2004). Ubiquitin ligases and the immune response. *Annu Rev Immunol* 22, 81-127.
- [70]. Lohri, A., Reuter, J., Gudat, F., and Herrmann, R. (1997). Topoisomerase II alpha mRNA and tumour cell proliferation in non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Pathol* 50, 22-26.
- [71]. Magan, N., Szremska, A. P., Isaacs, R. J., and Stowell, K. M. (2003). Modulation of DNA topoisomerase II alpha promoter activity by members of the Sp (specificity protein) and NF-Y (nuclear factor Y) families of transcription factors. *Biochem J* 374, 723-729.
- [72]. Miura, M., Watanabe, H., Sasaki, T., Tatsumi, K., and Muto, M. (2001). Dynamic changes in subnuclear NP95 location during the cell cycle and its spatial relationship with DNA replication foci. *Exp Cell Res* 263, 202-208.
- [73]. Miyatake, S., Nakano, H., Park, S. Y., Yamazaki, T., Takase, K., Matsushime, H., Kato, A., and Saito, T. (1995). Induction of G1 arrest by down-regulation of cyclin D3 in T cell hybridomas. *J Exp Med* 182, 401-408.
- [74]. Mohapatra, S., Agrawal, D., and Pledger, W. J. (2001). p27Kip1 regulates T cell proliferation. *J Biol Chem* 276, 21976-21983.
- [75]. Moll, U. M., and Petrenko, O. (2003). The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res* 1, 1001-1008.

- [76]. Mori, T., Li, Y., Hata, H., and Kochi, H. (2004). NIRF is a ubiquitin ligase that is capable of ubiquitinating PCNP, a PEST-containing nuclear protein. *FEBS Lett* 557, 209-214.
- [77]. Mori, T., Li, Y., Hata, H., Ono, K., and Kochi, H. (2002). NIRF, a novel RING finger protein, is involved in cell-cycle regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 530-536.
- [78]. Moroni, M. C., Hickman, E. S., Denchi, E. L., Caprara, G., Colli, E., Cecconi, F., Muller, H., and Helin, K. (2001). Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* 3, 552-558.
- [79]. Mueller, D. L. (2004). E3 ubiquitin ligases as T cell anergy factors. *Nat Immunol* 5, 883-890.
- [80]. Mukherjee, D., Kaestner, K. H., Kovalovich, K. K., and Greenbaum, L. E. (2001). Fas-induced apoptosis in mouse hepatocytes is dependent on C/EBPbeta. *Hepatology* 33, 1166-1172.
- [81]. Muller, R. (1995). Transcriptional regulation during the mammalian cell cycle. *Trends Genet* 11, 173-178.
- [82]. Muratani, M., and Tansey, W. P. (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 192-201.
- [83]. Muto, M., Kanari, Y., Kubo, E., Takabe, T., Kurihara, T., Fujimori, A., and Tatsumi, K. (2002). Targeted disruption of Np95 gene renders murine embryonic stem cells hypersensitive to DNA damaging agents and DNA replication blocks. *J Biol Chem* 277, 34549-34555.
- [84]. Muto, M., Utsuyama, M., Horiguchi, T., Kubo, E., Sado, T., and Hirokawa, K. (1995). The characterization of the monoclonal antibody Th-10a, specific for a nuclear protein appearing in the S phase of the cell cycle in normal thymocytes and its unregulated expression in lymphoma cell lines. *Cell Prolif* 28, 645-657.
- [85]. Nevins, J. R. (2001). The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet* 10, 699-703.
- [86]. Noel, P. J., Boise, L. H., Green, J. M., and Thompson, C. B. (1996). CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation. *J Immunol* 157, 636-642.
- [87]. Opferman, J. T., and Korsmeyer, S. J. (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol* 4, 410-415.
- [88]. Opferman, J. T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M. D., Ong, C. C., and Korsmeyer, S. J. (2003). Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* 426, 671-676.
- [89]. Ortega, S., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1602, 73-87.
- [90]. Parra, M., Kasler, H., McKinsey, T. A., Olson, E. N., and Verdin, E. (2005). Protein kinase D1 phosphorylates HDAC7 and induces its nuclear export after T-cell receptor activation. *J Biol Chem* 280, 13762-13770.

- [91]. Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.
- [92]. Rajpal, A., Cho, Y. A., Yelent, B., Koza-Taylor, P. H., Li, D., Chen, E., Whang, M., Kang, C., Turi, T. G., and Winoto, A. (2003). Transcriptional activation of known and novel apoptotic pathways by Nur77 orphan steroid receptor. *EMBO J* 22, 6526-6536.
- [93]. Ray, A., Ray, P., Guthrie, N., Shakya, A., Kumar, D., and Ray, B. K. (2003). Protein kinase A signaling pathway regulates transcriptional activity of SAF-1 by unmasking its DNA-binding domains. *J Biol Chem* 278, 22586-22595.
- [94]. Razzaq, T. M., Ozegbe, P., Jury, E. C., Sembi, P., Blackwell, N. M., and Kabouridis, P. S. (2004). Regulation of T-cell receptor signalling by membrane microdomains. *Immunology* 113, 413-426.
- [95]. Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R. A., and Dynlacht, B. D. (2002). E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev* 16, 245-256.
- [96]. Rotheneder, H., Geymayer, S., and Haidweger, E. (1999). Transcription factors of the Sp1 family: interaction with E2F and regulation of the murine thymidine kinase promoter. *J Mol Biol* 293, 1005-1015.
- [97]. Ruiz-Ruiz, M. C., Oliver, F. J., Izquierdo, M., and Lopez-Rivas, A. (1995). Activation-induced apoptosis in Jurkat cells through a myc-independent mechanism. *Mol Immunol* 32, 947-955.
- [98]. Schworer, C. M., Masker, K. K., Wood, G. C., and Carey, D. J. (2003). Microarray analysis of gene expression in proliferating Schwann cells: synergistic response of a specific subset of genes to the mitogenic action of heregulin plus forskolin. *J Neurosci Res* 73, 456-464.
- [99]. Sellers, W. R., and Kaelin, W. G., Jr. (1997). Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 15, 3301-3312.
- [100]. Seville, L. L., Shah, N., Westwell, A. D., and Chan, W. C. (2005). Modulation of pRB/E2F functions in the regulation of cell cycle and in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 5, 159-170.
- [101]. Sharpless, E., and Chin, L. (2003). The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene* 22, 3092-3098.
- [102]. Shen, R., and Kaplan, M. H. (2002). The homeostasis but not the differentiation of T cells is regulated by p27(Kip1). *J Immunol* 169, 714-721.
- [103]. Sordet, O., Khan, Q. A., Kohn, K. W., and Pommier, Y. (2003). Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 3, 271-290.
- [104]. Stiewe, T., and Putzer, B. M. (2000). Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat Genet* 26, 464-469.
- [105]. Traore, K., Trush, M. A., George, M., Jr., Spannhake, E. W., Anderson, W., and Asseffa, A. (2005). Signal transduction of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced growth inhibition of human monocytic leukemia THP-1 cells is reactive oxygen dependent. *Leuk Res* 29, 863-879.

- [106]. Trushin, S. A., Pennington, K. N., Algeciras-Schimnich, A., and Paya, C. V. (1999). Protein kinase C and calcineurin synergize to activate I κ B kinase and NF- κ B in T lymphocytes. *J Biol Chem* 274, 22923-22931.
- [107]. Tsujimoto, Y. (2003). Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol* 195, 158-167.
- [108]. Turley, H., Comley, M., Houlbrook, S., Nozaki, N., Kikuchi, A., Hickson, I. D., Gatter, K., and Harris, A. L. (1997). The distribution and expression of the two isoforms of DNA topoisomerase II in normal and neoplastic human tissues. *Br J Cancer* 75, 1340-1346.
- [109]. Turner, J. M. (1993). IL-2-dependent induction of G1 cyclins in primary T cells is not blocked by rapamycin or cyclosporin A. *Int Immunol* 5, 1199-1209.
- [110]. Tyers, M., and Willems, A. R. (1999). One ring to rule a superfamily of E3 ubiquitin ligases. *Science* 284, 601, 603-604.
- [111]. Unoki, M., Nishidate, T., and Nakamura, Y. (2004). ICBP90, an E2F-1 target, recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain. *Oncogene* 23, 7601-7610.
- [112]. van Oirschot, B. A., Stahl, M., Lens, S. M., and Medema, R. H. (2001). Protein kinase A regulates expression of p27(kip1) and cyclin D3 to suppress proliferation of leukemic T cell lines. *J Biol Chem* 276, 33854-33860.
- [113]. Van Parijs, L., and Abbas, A. K. (1998). Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280, 243-248.
- [114]. van Parijs, L., Perez, V. L., and Abbas, A. K. (1998). Mechanisms of peripheral T cell tolerance. *Novartis Found Symp* 215, 5-14; discussion 14-20, 33-40.
- [115]. Verdin, E., Dequiedt, F., and Kasler, H. (2004). HDAC7 regulates apoptosis in developing thymocytes. *Novartis Found Symp* 259, 115-129; discussion 129-131, 163-119.
- [116]. Villalba, M., Kasibhatla, S., Genestier, L., Mahboubi, A., Green, D. R., and Altman, A. (1999). Protein kinase c θ cooperates with calcineurin to induce Fas ligand expression during activation-induced T cell death. *J Immunol* 163, 5813-5819.
- [117]. Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
- [118]. Wada, N., Matsumura, M., Ohba, Y., Kobayashi, N., Takizawa, T., and Nakanishi, Y. (1995). Transcription stimulation of the Fas-encoding gene by nuclear factor for interleukin-6 expression upon influenza virus infection. *J Biol Chem* 270, 18007-18012.
- [119]. Wade, M., Blake, M. C., Jambou, R. C., Helin, K., Harlow, E., and Azizkhan, J. C. (1995). An Inverted Repeat Motif Stabilizes Binding of E2F and Enhances Transcription of the Dihydrofolate Reductase Gene. *J Biol Chem* 270, 9783-9791.
- [120]. Wan, Y. Y., and DeGregori, J. (2003). The survival of antigen-stimulated T cells requires NF κ B-mediated inhibition of p73 expression. *Immunity* 18, 331-342.

- [121]. Werlen, G., Jacinto, E., Xia, Y., and Karin, M. (1998). Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes. *EMBO J* 17, 3101-3111.
- [122]. Winoto, A., and Littman, D. R. (2002). Nuclear hormone receptors in T lymphocytes. *Cell* 109 Suppl, S57-66.
- [123]. Workman, J. L., and Abmayr, S. M. (2004). Histone H3 variants and modifications on transcribed genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1429-1430.
- [124]. Woronicz, J. D., Lina, A., Calnan, B. J., Szychowski, S., Cheng, L., and Winoto, A. (1995). Regulation of the Nur77 orphan steroid receptor in activation-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 15, 6364-6376.
- [125]. Wu, Q., Kirschmeier, P., Hockenberry, T., Yang, T. Y., Brassard, D. L., Wang, L., McClanahan, T., Black, S., Rizzi, G., Musco, M. L., et al. (2002). Transcriptional regulation during p21WAF1/CIP1-induced apoptosis in human ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 277, 36329-36337.
- [126]. Youn, H. D., and Liu, J. O. (2000). Cabin1 represses MEF2-dependent Nur77 expression and T cell apoptosis by controlling association of histone deacetylases and acetylases with MEF2. *Immunity* 13, 85-94.
- [127]. Zhu, J., Jiang, J., Zhou, W., and Chen, X. (1998). The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res* 58, 5061-5065.
- [128]. Zhu, J. W., DeRyckere, D., Li, F. X., Wan, Y. Y., and DeGregori, J. (1999). A role for E2F1 in the induction of ARF, p53, and apoptosis during thymic negative selection. *Cell Growth Differ* 10, 829-838.

***PUBLICATIONS ET
COMMUNICATIONS
ISSUS DE CE
TRAVAIL***

Publications:

- 2003 Mousli, M., Hopfner, R., **Abbady, A. Q.**, Monte, D., Jeanblanc, M., Oudet, P., Louis, B., and Bronner, C. ICBP90 belongs to a new family of proteins with an expression that is deregulated in cancer cells. *Br J Cancer* 89, 120-127
- 2003 **Abbady, A. Q.**, Bronner, C., Trotzier, M. A., Hopfner, R., Bathami, K., Muller, C. D., Jeanblanc, M., and Mousli, M. ICBP90 expression is downregulated in apoptosis-induced Jurkat cells. *Ann N Y Acad Sci* 1010, 300-303
- 2004 Trotzier, M. A., Bronner, C., Bathami, K., Mathieu, E., **Abbady, A. Q.**, Jeanblanc, M., Muller, C. D., Rochette-Egly, C., and Mousli, M. Phosphorylation of ICBP90 by PKA enhances topoisomerase II α expression. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 590-595
- 2005 Jeanblanc, M., Mousli, M., Hopfner, R., Bathami, K., Martinet, N., **Abbady, A. Q.**, Siffert, J. C., Mathieu, E., Muller, C., and Bronner, C. The retinoblastoma gene and its product are targeted by ICBP90: a key mechanism in the G1/S transition during the cell cycle. *Oncogene* 1-9
- 2005 **Abbady, A. Q.**, Bronner, C., Bathami, K., Muller, C. D., Jeanblanc, M., Mathieu, E., Klein, J. P., Candolfi, E., and Mousli, M. TCR pathway involves ICBP90 gene down-regulation via E2F binding sites. *Biochem Pharmacol* 70(40), 570-579

Communications:

- 2003 **Abbady, A. Q.**, Bronner, C., Trotzier, M. A., Bathami, K., Hopfner, R., Muller, C. D., and Mousli, M. Does down regulation of ICBP90 expression contribute to apoptosis in Jurkat cells ? Apoptosis: from signaling pathways to therapeutic tools Luxembourg, Luxembourg
- 2004 Jeanblanc, M., Mousli, M., Bathami, K., Mathieu, E., **Abbady, A. Q.**, et Bronner, C. Effet suppresseur du facteur de transcription ICBP90 sur l'activité et l'expression de la protéine régulatrice pRB : implication dans le contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire. Eurocancer, Paris

Figures:

<u>Figure 1. Le complexe TCR et ses co-récepteurs</u>	10
<u>Figure 2. L'agrégation artificielle du TCR</u>	12
<u>Figure 3. Les voies de signalisation du TCR</u>	13
<u>Figure 4. La régulation du cycle cellulaire</u>	17
<u>Figure 5. La voie pRb/E2F</u>	18
<u>Figure 6. Les mécanismes de l'ubiquitinylation</u>	20
<u>Figure 7. La régulation du cycle cellulaire des lymphocytes T</u>	21
<u>Figure 8. La morphologie cellulaire de l'apoptose</u>	24
<u>Figure 9. La signalisation de l'apoptose</u>	25
<u>Figure 10. La régulation du gène Nur77</u>	26
<u>Figure 11. Les mécanismes de régulation de p53 et E2F-1</u>	29
<u>Figure 12. Le mécanisme d'action de la TopoIIa</u>	32
<u>Figure 13. Le promoteur du gène TopoIIa</u>	33
<u>Figure 14. Principe du système simple hybride</u>	34
<u>Figure 15. Le gène de l'ICBP90</u>	36
<u>Figure 16. La protéine ICBP90</u>	37
<u>Figure 17. L'expression de l'ICBP90 au cours du cycle cellulaire</u>	89
<u>Figure 18. Le système du gène rapporteur de la luciférase</u>	95
<u>Figure 19. Le contrôle du gène INK4a/ARF par l'ICBP90</u>	101
<u>Figure 20. Le rôle présumé de l'ICBP90 dans le Lymphocyte T</u>	102

9;11;12;16-17;19-20;24-25;28;30-32;34-35;87;93;99-100

1-43;52;57;64;74;85-112

1-8;10;13-15;18;21-23;26-27;29;33;36-43;52;57;64;74;85-86;88-92;94-98;101-112

Rôle de l'ICBP90 dans les mécanismes de régulation des lymphocytes T

La stimulation du récepteur TCR (*T Cell Receptor*) aboutit à des programmes génétiques capables à la fois d'activer ou de réprimer diverses fonctions du lymphocyte T. Dans les lymphocytes T pré-activés, la stimulation du TCR arrête le cycle cellulaire en phase G1 et conduit les cellules à une apoptose nommée AICD (*Activation-Induced Cell Death*). Ce phénomène est fondamental dans la régulation du système immunitaire. L'ICBP90 (*Inverted CCAAT box Binding Protein of 90 kDa*) appartient à une nouvelle famille de protéines nucléaires impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et en particulier la transition G1/S. Cette transition est une étape obligatoire à l'entrée des lymphocytes T en phase de prolifération. S'ils ne parviennent pas à la franchir, ils seront « condamnés à mort ».

Dans ce travail, nous avons confirmé d'abord le rôle régulateur de l'ICBP90 dans la transition G1/S au cours du cycle cellulaire des cellules normales. Cette régulation, faisant intervenir la phosphorylation de l'ICBP90 par la PKA (*Protein Kinase A*), est défaillante dans le cycle cellulaire des cellules tumorales. De plus, l'ICBP90 est une protéine anti-apoptotique dont l'expression est inhibée lors de l'apoptose, sa surproduction pourrait être une stratégie utilisée par les cellules tumorales pour échapper aux processus apoptotiques de contrôle avant le passage en G1/S.

La voie pRb (*Protein of Retinoblastoma*)/E2F est le véritable allié de l'ICBP90 pour la régulation du cycle cellulaire. En effet, l'interaction entre l'ICBP90 et cette voie est observée à différents niveaux. De plus, cette voie est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 observé dans les lymphocytes T après stimulation du TCR. Cette stimulation induit également une diminution de l'expression de l'ICBP90 faisant intervenir le complexe inhibiteur pRb/E2F. L'absence de l'ICBP90, d'une part empêche l'expression des gènes impliqués dans la transition G1/S, et d'autre part favorise l'expression des gènes pro-apoptotiques. Ceci est probablement lié à l'intervention des processus du remodelage de la chromatine. Finalement, les lymphocytes T sont conduits à un arrêt en phase G1 suivi par des phénomènes apoptotiques. L'ensemble de ces études devrait permettre d'apporter de nouvelles connaissances concernant les mécanismes de régulation des lymphocytes T.

Mots Clés

ICBP90, lymphocyte T, TCR, AICD, apoptose, cycle cellulaire, cancer, chromatine.

The role of ICBP90 in T cell regulating mechanisms

TCR (*T Cell Receptor*) engagement leads to genetic programs that both activate and inhibit T cell functions. In pre-activated T cells, TCR stimulation induces cell cycle arrest in G1 phase and leads cells to apoptosis, called AICD (*Activation-Induced Cell Death*). This phenomenon is fundamental in the immune system regulation. ICBP90 (*Inverted CCAAT box Binding Protein of 90 kDa*) is a member of a new family of nuclear proteins implicated in the cell cycle regulation, particularly during the G1/S transition. This barrier is the obligatory gate that T cells should traverse to enter proliferation. If they do not, they will be condemned to death.

In this work, we started by confirming the regulatory role of ICBP90 during the transition G1/S in normal cell cycle. This role which seems to be controlled in part through ICBP90 phosphorylation by PKA (*Protein Kinase A*), is missing in cancer cell cycle. Moreover, ICBP90 is an anti-apoptotic protein that is inhibited in apoptosis and its overexpression could be a strategy for cancer cells to escape from elimination by apoptotic processes before the passage G1/S.

The pRb (*Protein of Retinoblastoma*)/E2F pathway appears to be a partner of ICBP90 during the cell cycle regulation. Interaction between ICBP90 and this pathway can be observed at various levels. This pathway can be the explanation for G1 phase arrest of the cell cycle observed after TCR stimulation in pre-activated T cells. This stimulation also induces down regulation of ICBP90 expression in which the inhibitory pRb/E2F complex is the main actor. The absence of ICBP90 in activated T cells prevents the expression of the G1/S regulating genes and, at the same time, enhances the expression of pro-apoptotic genes. This is probably by implicating chromatin remodelling processes. Finally, T cells are forced to undergo a G1 phase arrest followed by AICD. The

present study should bring promising knowledge concerning T cell regulating mechanisms.

Key Words

ICBP90, T cell, TCR, AICD, apoptosis, cell cycle, cancer, chromatin.