

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

INSERM U1113

*Mécanismes moléculaires de la réponse au stress
et pathologies du système digestif*

THÈSE

 présentée par :

Orphée BLANCHARD

soutenue le : 04 novembre 2014

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE**

**Régulation post-traductionnelle de p73
par les calcium calmoduline dépendantes kinases dans le
système neuronal**

THÈSE dirigée par :

GAIDDON Christian

Directeur de thèse (U1113, Strasbourg)

MELLITZER Georg

Co-directeur de thèse (U1113, Strasbourg)

MEMBRES DU JURY :

Dr. ALVES DA COSTA Christine

Rapporteur externe (UMR6097, Valbonne)

Dr. VALLETTE FRANCOIS

Rapporteur externe (UMR892, Nantes)

Dr. WASYLYK BOHDAN

Rapporteur interne (IGBMC, Illkirch)

Dr. TOMASINI RICHARD

Invité-membre (U1068, Marseille)

Résumé

Le facteur de transcription p73 est impliqué dans des pathologies du système neuronal (maladie d'Alzheimer, neuroblastome...) en régulant le cycle cellulaire, l'apoptose et la différenciation neuronale.

Identifier les modifications post-traductionnelles de p73 permettrait de mieux comprendre les fonctions biologiques des isoformes p73 et leurs régulations. Notre analyse bio-informatique prédit entre autres, trois sites sur p73 potentiellement phosphorylés par la calcium-calmoduline dépendante kinase 2 (CamKII), qui est aussi impliquée dans le cycle cellulaire, l'apoptose et la différenciation neuronale. Après avoir confirmé la phosphorylation de p73 par cette kinase *in vitro*, nous avons démontré que la CamKII favorise l'activité transcriptionnelle de p73 et modifie le niveau de protéique des isoformes de p73. L'étude de la caractérisation des sites impliqués dans cette régulation suggère que les effets de la CamKII sur p73 résultent davantage de la coopération de l'ensemble des sites que d'un seul site précis. Par ailleurs, cette étude moléculaire s'inscrit dans un contexte physiologique précis où l'apoptose neuronale induit par le déséquilibre de l'homéostasie calcique s'expliquerait en partie par la signalisation p73-CamKII.

Mots-clés : Mort neuronale, Neuroblastome, Maladie d'Alzheimer, p73, régulation post-traductionnelle et CamK.

Summary

The transcription factor p73 is implicated in neurodegenerative diseases (Alzheimer disease, neuroblastoma...) by regulating cell cycle, neuronal apoptosis and differentiation.

Identifying the post-translational modifications on p73 would allow to better understand the p73 biological functions and regulations. Bioinformatic analyses predict amongst others, three potential phosphorylation sites on p73 for the calcium-calmodulin dependent kinase 2 (CamKII), which is also implicated in cell cycle, neuronal apoptosis and differentiation. After showing the p73 phosphorylation by CamKII *in vitro*, we demonstrated that CamKII favors the p73 transcriptional activity and modulates the proteic expression of the p73 isoforms. The study to identify the sites implicated in these CamKII effects highlights cooperation between the sites instead of the prevalence of a specific site.. Besides this molecular approach, we also investigate the implication of this regulation in a physiologic context. Our results reveal that the neuronal death triggered by a calcium homeostasis alteration could be mediated by the p73-CamKII signalization.

Key-words: Neuronal death, Neuroblastoma, Alzheimer disease, p73, Post-translational regulation and CamK.

A mon grand-père, Helmuth Sagert

RESUME DE MA THESE...

POUR MES AMIS NON-SCIENTIFIQUES

Depuis que je suis passionnée des Sciences de la Vie, j'ai toujours eu à cœur de faire partager au plus grand nombre, mes découvertes, mes étonnements vécus au cours de mes lectures, de mes cours et des rencontres scientifiques. Extraterrestre scientifique au sein de mes proches et amis, je me suis prise au jeu de la vulgarisation scientifique...Exercice essentiel pour ne pas finir en bout de table à chaque repas et s'interroger seule sur le mécanisme moléculaire, qui se cache derrière l'alvéole du pain ! Alors, impensable, de ne pas réitérer cet exercice pour mon propre travail de recherche, aujourd'hui (...mon premier petit grain de sable scientifique!).

Imaginez... être devant un ascenseur, les portes s'ouvrent sur un groupe de personnes, vous entrez, vous hésitez sur quels boutons appuyer, vous vous regardez dans le miroir, vous regardez autour de vous, et finalement vous allez décider d'appuyer sur l'un des boutons qui vous permettra de Survivre, vous Transformer ou Mourir!

La cellule est comme un ascenseur...Constamment elle va prendre une décision sur son destin: *étage 1 Survivre, étage 2 se Transformer, étage 3 Mourir*. Dans un ascenseur, il y a des personnes qui appuient sur les boutons pour le contrôler... Dans une cellule, ce sont les protéines qui vont être responsables du destin cellulaire en appuyant sur les mécanismes. J'étudie l'une de ces protéines: la protéine p73.

P73, qui pèse 73 kdaltons... (l'unité de la balance pour les protéines c'est le dalton, rien avoir avec Lucky Luke) a le pouvoir de contrôler le destin de la cellule, en lui signalant de mourir ou de survivre. Grosse responsabilité...alors quand p73 fait sa crise en désertant ou au contraire en se démultipliant de colère ...cela provoque une catastrophe cellulaire et même plus, un problème de santé publique...les cancers ou encore des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Alors, première question...pourquoi p73 fait-elle cette crise ? Pourquoi va-t-elle à un moment précis être obnubilée par le bouton mourir et entraîner la mort de neurones, pourtant si précieux pour la mémoire ?...Ou au contraire désert le poste en laissant les cellules se multiplier anarchiquement pour former des tumeurs ?

Je me suis penchée sur cette question pendant ma thèse, quitte à même, me mettre dans le subconscient de cette protéine, p73, pour comprendre sa crise existentielle. Lors de notre petit voyage cellulaire un peu plus haut, je vous ai invité à vous regarder dans le miroir de l'ascenseur. Sachez que l'apparence et le style de la protéine p73 détermine son choix, d'appuyer sur tel ou tel bouton, entraînant la mort cellulaire ou pas. Comme il est impensable de se présenter en maillot de bain à un entretien professionnel, il est aussi impensable pour p73 de faire son travail dans une tenue incorrecte. L'enjeu de ma thèse a été de caractériser justement une tenue, parmi tant d'autres dans son dressing,

qui va la motiver d'appuyer sur le bouton mourir. Scientifiquement, la tenue est définie comme une modification post-traductionnelle, propos barbare mais passionnant pour nous, les scientifiques. Durant ma thèse, j'ai pu montrer que suite à un stress, une augmentation de calcium anarchique dans la cellule, la protéine p73 revêt sa tenue d'assassin. Cette tenue, une phosphorylation, est apportée par une autre protéine, la calcium calmoduline dépendante kinase 2. Vêtue de cette phosphorylation, p73 va tout faire pour interrompre l'aventure et appuyer frénétiquement sur le bouton mourir, entraînant la mort des neurones.

J'ai également montré durant ma thèse, qu'un autre personal shopper, appelée la calcium calmoduline dépendante kinase 4 peut également habiller p73. A contrario de la précédente, celle-ci a su charmer p73, qui dans cette tenue, va au contraire s'extasier dans le miroir et oublier d'appuyer sur le bouton mourir. Vous l'aurez noté, cette crise existentielle de p73, une intrigue vestimentaire, repose sur le taux de calcium et sur les protéines partenaires, les calcium calmoduline dépendante kinases. Mais pourquoi savoir tout ça ?

En comprenant pourquoi et comment p73 choisit le bouton de cet ascenseur, on pourra davantage appréhender les conséquences qui occasionnent in fine de réels problèmes de santé publique. Cette compréhension sera également utile pour développer des stratégies thérapeutiques contre ces maladies...mais comment ? Question actuelle pour les scientifiques, réponse grandement attendue par la société...Toutes les hypothèses sont encore possibles...cacher le miroir, bloquer l'accès aux boutons d'ascenseur, empêcher p73 de porter cette tenue meurtrière...

Bref je ne suis pas prête de me taire lors des prochains repas et espère que mon grain de sable fera partie d'un beau château salvateur pour les patients atteints des maladies où sévit p73 !

REMERCIEMENTS

Jamais je n'oublierai le bonheur que j'ai ressenti, lorsque j'ai su que j'avais décroché une bourse de thèse à l'Université de Strasbourg, il y a trois ans. Je pressentais déjà que je me lançais dans un marathon, et aujourd'hui, je profite de « cette prise de micro » pour remercier toutes les personnes qui ont humanisé cette aventure scientifique, pleine de rebondissements!

En premier lieu, une course n'existe pas sans un arbitrage, un jury, qui au-delà de prendre le chrono, me fait l'honneur de me consacrer du temps pour m'évaluer, analyser « les arrêts sur images » me permettant ainsi d'avoir un précieux regard externe pour le franchissement de cette fameuse ligne d'arrivée. Mme Dr Alves Da Costa, Mr Dr Vallette, Mr Dr Wasylyk, Mr Dr Tomasini, je vous remercie chaleureusement et espère qu'à travers la lecture de mon manuscrit vous apprécierez mon travail autant que ma personnalité et ma passion que j'ai voulu partager.

Qui dit marathon...dit coachs ! Athlète que je suis, Dr Gaiddon...Christian a été plus qu'un directeur de thèse, un entraîneur, qui m'a d'abord fait confiance pour courir avec le maillot de l'équipe, qui m'a suivi en vélo dans les côtes comme dans les descentes, m'indiquant le chemin ou me laissant aussi la liberté d'explorer. Au-delà de l'apprentissage scientifique, il a également su me distiller une qualité essentielle pour ma vie future : la patience et la prise de distance qu'elle nécessite. Friande de citations, je crois que celle-ci, illustre parfaitement nos nombreux échanges : « ***Le courage ne rugit pas toujours. Parfois, le courage est cette petite voix intérieure qui nous dit: j'essaierai encore demain*** ». Figurez-vous, que c'est un vélo spécial qui roulait à côté de moi...un tandem franco-autrichien ! Après avoir choisi les couleurs du laboratoire ensemble, un fameux été 2011, c'est avec le mégaphone et tout l'attirail du coach que Dr Mellitzer...Georg, m'a observé, conseillé et corrigé dans cette course, où j'ai eu l'opportunité de découvrir de nouvelles techniques, faire de nouvelles expériences de management, d'enseignements...Merci à vous, Christian & Georg, pour cette formidable expérience.

Qui dit marathon...dit athlètes ! Tout au long de la thèse, j'ai eu le plaisir de rencontrer des athlètes, venant de partout ! Les premiers ont formé très vite une bande d'équipiers hauts en couleurs : Cynthia, Marie-Elodie, Vania, Louiza, Paula, Yannick, Shawn, Christophe... Que ce soit autour d'un barbecue qui finissait à la casserole, autour des pizzas au laboratoire, dans la réalisation de vidéos, dans nos expériences scientifiques plus ou moins délurées, aux pauses sponsorisées haribo ou senseo, vous avez été là avec vos sourires, vos blagues et vos encouragements...Merci à vous, je vous souhaite pleins de réussites dans le futur and keep your crazyness ! Plus qu'une équipière, qu'une maman scientifique, à veiller lorsque j'allais au laboratoire la nuit, à réfréner mes ambitions folles de faire 6-8 western blots en même temps, à partager mon amour pour les neurones, à trouver les mots justes, Véronique, tu es devenue une fabuleuse amie, un réel soleil. Je te remercie de tout mon cœur pour nos instants partagés et les nombreux que l'on partagera dans le futur, j'en suis sûre ! J'ai eu aussi le plaisir tout au long de ce marathon, de rencontrer d'autres athlètes et coachs, qui ont rendu la course encore plus enrichissante par un regard, une main tendue, un conseil avisé... Merci à Jean-Noel, Isabelle G, Isabelle D, Elisabeth, Marie, Claire, Dominique,

Leonore, Isabelle H, Camille, Christelle, Pierre, Caroline, Thomas, Benoît, Damien, Tristan...Merci à mes « colocs » de salle de culture, Lionel, Justine, Alexia, Nadège, Laurent, Luc, Gérard et aux playlists géniales pour mon moral et mes cellules.

Mon doctorat m'a aussi offert un beau cadeau personnel, renforcer le lien avec mon second pays, l'Allemagne. Avec ma curiosité sur les cellules neuronales, j'ai voulu explorer un champ passionnant, le second cerveau du corps humain, « l'intelligence du ventre » ! J'ai passé une semaine scientifique passionnante, épanouissante au sein de l'équipe du Pr Schäfer à Zweibrücken avec Eva, Caterina, Denise, David et tous les autres membres. Je profite encore ici pour vous remercier pour votre accueil, votre soutien et ma tristesse de ne pas avoir eu le financement pour développer notre collaboration, qui m'aurait tellement plu. Tout au long de mon marathon, j'ai eu aussi l'honneur de tenir la main à des jeunes coureurs, en les accompagnant de différentes façons dans leurs propres aventures. Je vous remercie « mes petits stagiaires » pour m'avoir fait confiance dans mon enseignement, la façon de partager ma passion, vos sourires et vos yeux émerveillés ont été mes récompenses. Je vous souhaite, Hélène, Clothilde, Marion, JB, Thomas...de beaux succès dans vos formations universitaires.

« Le bonheur ne se trouve pas au sommet de la montagne, mais dans la façon de la gravir », Confucius.

Qui dit marathon...dit supporters ! Et là, je dois l'avouer, j'ai été sacrément gatée ! Impensable de ne pas commencer par remercier mes deux meilleures amies que Strasbourg m'a offert, Cécilia (mon colibri des îles) et Gaëlle (ma folle blondie) qui ont été là pour chaque ravitaillement de soutien, de gâteaux délicieux, d'écoute, de rires, de complicité, jour et nuit...Merci d'être vous, merci d'être là ! Pour mes dernières foulées, j'ai eu la joie d'être escortée par un biker alsacien au grand coeur, merci Bruno pour ta tendresse. L'amitié a été mon carburant essentiel...avec des amis de jeunesse, avec Steve, Poussin, Benoît, la bande du « Croque Bedaine », la MEONC Team, Justine, les amis de mon laboratoire de master, Anthony, Matthieu, Monique, Jean-Claude, Flo et Jean-Jacques...merci, vous avez chacun contribué à cette fabuleuse aventure. Parce qu'aimant le challenge, j'ai voulu donner une autre dimension dans mon marathon scientifique, en partageant mes expériences mais aussi en écoutant mes aînés. Neila, Aida, Elise, Milena, Pilar, Elena, Julia, Marie, Radhia, Emilie, Inès, Anis, Simon, Ramzi, Kenneth et tous les autres membres de l'association des doctorants et docteurs d'Alsace et de l'équipe du forum Biotechno, je vous remercie pour la confiance que vous m'avez donné à être votre amie, à être votre présidente, pour les défis que l'on a relevé ensemble et pour les précieux conseils. Ce double challenge m'a fait énormément évoluer en élargissant le champ des possibles scientifiques grâce aux nombreuses personnes que j'ai appris à connaître comme Pr Béretz, Pr Florentz, Dr Potier, Hélène (coach doctoriales), Hafida, Mélanie, Marie-Ange, Jean-Marc, Richard, Damien...Merci à Daniel d'avoir été témoin des moments où l'effort était plus intense et qui m'ont fait grandir. Je souhaite également faire un petit clin d'œil à un professeur de biochimie, devenu un ami de l'Ouest, merci Emmanuel, grâce à vous j'ai conquis la Science de l'Est et apprécié mes années de licence ! J'ai d'ailleurs fait honneur au surnom de sufragette que vous m'aviez donné en appartenant à la belle association Femmes & Sciences, au côté du Pr Cadeville, Virginie, Isabelle, Patrick et tous les autres membres, où j'ai pu à mon tour planter des petites graines de scientifiques dans les collèges et lycées alsaciens !

Qui dit marathon...dit courir avec le cœur ! En ce qui concerne le mien, j'ai toujours couru avec le cœur tourné vers mes petits frères et sœurs. Mon dieu, les 800 kms qui nous séparent ont été une réelle torture ! Alexander, Enora, Claire et Victor, j'espère qu'à travers ce doctorat, je vous aurai montré qu'il ne faut jamais abandonner ses rêves et qu'accessoirement les Sciences c'est beaucoup plus qu'un manuel scolaire. Malgré que je sois l'aînée, vous m'avez donné la plus grande leçon existentielle...la force de l'amour fraternel...merci « mes petits », je vous aime fort. Je vous souhaite plein de réussites et compte bien évidemment fêter vos diplômes futurs sur notre plage préféré bauloise. Je dédie aujourd'hui mon doctorat à mon grand-père, qui a toujours cru en moi, qui m'a encouragé, donné les conseils les plus sages, partagé mes joies lorsque j'avais réussi une expérience au laboratoire, échangé sur mon projet doctoral, m'a fait briller plus que je le méritais et qui me manque tous les jours depuis qu'il nous a quitté, il y a moins d'un an. Merci Opa et Oma pour votre amour. Et enfin, un énorme merci à mes parents. M'accompagnant dans mes premiers pas scientifiques, en m'emmenant au palais de la découverte, m'abonnant à Sciences et Vie Junior, m'offrant un microscope, m'enregistrant mes épisodes d'Il était une fois la vie...mais aussi dans mes pas sportifs, essentiels pour travailler l'endurance et tenir pour n'importe quel marathon...vous m'avez appris la persévérance, le dépassement de soi...j'espère qu'aujourd'hui, vous êtes fiers de mon parcours, de l'adulte que je suis devenue et que nous resterons unis très longtemps dans la santé et le bonheur.

SOMMAIRE

<i>Résumé de ma thèse... pour mes amis non-scientifiques</i>	4
<i>Remerciements</i>	6
<i>Table des illustrations</i>	10
<i>Abbréviations</i>	12
<i>Introduction</i>	15
I-P73, le cadet d'une famille aux multiples facettes !	16
I-1. Généralités sur la famille p53	16
I-2. Une structure bien orchestrée	17
I-3. Fonctions des isoformes p73 et les pathologies associées	22
I-4. Régulations de la protéine p73	34
II- Les calcium-calmoduline dépendante kinases	40
II-1 Une nécessité lactée !	40
II-2 Structure	41
II-3. Fonctions et pathologies associées	44
II-4. Régulations	50
III- Analogies entre p73 et les CamK dans le système neuronal	57
III-1. Expressions et fonctions dans la neurogénèse	58
III-2. Pathologies du système neuronal impliquant p73 et les CamK	61
IV- Projet doctoral	70
<i>Résultats</i>	72
<i>Discussion</i>	102
I- La régulation de p73 par les CamK dans le système neuronal	102
I-1. Caractérisation moléculaire de la régulation de p73 par les CamK	102
I-2. InSCRIPTION de cette régulation dans un contexte physiologique neuronal	111
II- Perspectives	114
II-1. La régulation de p73 par les CamK, pertinente dans le système digestif ?	114
II-2. Quelques travaux préliminaires pour ouvrir la voie !	119
<i>Bibliographie</i>	128

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 Structures des gènes et protéines des membres de la famille p53	18
Figure 2 Phénotypes des souris déficientes des membres de la famille p53	24
Figure 3 Profil d'expressions des isoformes TA/ Δ N de p73 dans les tissus.....	26
Figure 4 Profil d'expressions des isoformes TA et Δ N de p73 dans les lignées cancéreuses	27
Figure 5 Profil d'expressions des isoformes Δ N de p73 dans les cancers	28
Figure 6 Régulation du cycle cellulaire par p73.....	30
Figure 7 Régulation de l'apoptose.....	31
Figure 8 Fonctions et leurs gènes cibles de la famille p53.....	33
Figure 9 Régulation transcriptionnelle des isoformes p73.....	34
Figure 10 Modifications post-traductionnelles connues de p53.....	35
Figure 11 Modifications post-traductionnelles connues de p73.....	38
Figure 12 Complexe calcium-calmoduline et influx calcique cellulaire.....	40
Figure 13 Familles des CamK, structure génomique et protéique.....	42
Figure 14 Régulation du cycle cellulaire par les CamK.	46
Figure 15 Fonctions principales des CamKs.....	48
Figure 16 Cascade d'activation de la CamKII	50
Figure 17 Activation de la cascade CamKK.....	53
Figure 18 Modifications post-traductionnelles de CamK.....	54
Figure 19 Phénotype neuronal et digestif pour les souris p73 déficientes.....	56
Figure 20 Fonctions neuronales de p73 et des CamK.....	60
Figure 21 Impact de p73 et des CamK dans la maladie d'Alzheimer	63
Figure 22 Tableau récapitulatif des fonctions de p73 et des CamK dans la neurogénèse.....	68

Figure 23 Effet de la CamKII sur la stabilité de $\Delta Np73$	78
Figure 24 Activité transcriptionnelle de TAp73 en fonction de la CamKIV	80
Figure 25 Effets de la CamKIV sur la stabilité des isoformes p73	81
Figure 26 Phénotype digestif pour les souris p73 déficientes	84
Figure 27 Analyse immunohistologique de p73 dans le tractus digestif murin.....	90
Figure 28 Expression de p53, p63 et p73 dans le système entérique	92
Figure 29 Expression de p63 dans les cellules neuronales et gliales entériques	93
Figure 30 Survie des cellules cancéreuses coliques sensibles à l'homéostasie calcique et à la CamKII.	94

ABBREVIATIONS

ADN	Acide desoxyribonucléique
AIF	Facteur inducteur apoptotique
AMPK	Kinase de la protéine adénosine monophosphate
ANO1	Protéine Anoctamine 1
AOM	Azoxyméthane
APAF1	Facteur activateur de la peptidase apoptotique
APC	Protéine adematous polyposis coli
ARNm	Acide ribonucléique messager
ASPP	Protéine stimulatrice apoptotique
ATG	Protéine de l'autophagosome
ATP	Adénosine triphosphate
Bal-1	Protéine B du lymphôme agressif
BAX	Protéine X associée au Bcl-2
BPAG	Protéine bullous pemphigoid antigène
c-Abl	Oncogène viral de la leucémie abelson murine
CaM	Calmoduline
CamK	Calcium-calmoduline dépendante kinase
CamKK	Calcium-calmoduline dépendante kinase kinase
cd95	Protéine apoptotique FAS associée
cdc 2	Protéine de la division du cycle cellulaire 2
cdk	Protéine Cycline dépendante kinase
CDL4A	Protéine ligase Cullin4A dépendante
ChK	Protéine Checkpoint kinase
chrom	Chromosome
c-MYB	Protéine C du myéloblastose
c-MYC	Protéine oncogénique myélocytomateuse
CREB	Protéine de liaison pour l'élément de réponse c-AMP
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DICER1	Endoribonucléase 1
DRAM	Protéine autophagie modulatrice

DSS	Dextrane sodium sulfate
E1A	Early adenovirus protéine
E2F	Facteur associé à la région E2 adénovirale
E6	Protéine 6 du virus du papillome humain
ECC	Escgerichia Coli Protéine
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermal
FAS	Fragment apoptose stimulant
Gadd45	Protéine de l'arrêt du cycle cellulaire et dommages à l'ADN
GATA3	Protéine de liaison GATA motif
GD-AIF	Variant du facteur inducteur apoptotique
GLUT-4	Transporteur du glucose 4
HES1	Facteur de transcription Hairy and enhancer of split-1
HIC1	Protéine hyperméthylée 1 du cancer
IP3R	Récepteur de l'inositol 1,4,5-triphosphate
Itch	Protéine ligase E3 ubiquitine Itchy
JNK	Protéine kinase c-Jun N terminal
KD	Constance de dissociation
KiF4	Kinésine 4A associée au chromosome
LKB1	Kinase hépatique B1
M-3M3FBS	2,4,6-triméthyl-N-[3-(trifluorométhyl)phényl]benzenesulfonamide
MAP2	Protéine associée au microtubule 2
MDM2	Protéine E3 ubiquitine ligase
MEF-2	Facteur de transcription 2 myocytaire
Mir-130B	Précurseur micro-ARN 130b
M-Tor	Cible de la rapamycin chez les mammifères
MUTYH	Protéine homologue MUTY
NCAM	Molécule d'adhésion des cellules neurales
NCX	Exchangeur sodium-calcium
NEDL2	Protéine ubiquitine ligase associée à NEDD4
NES	Signal d'exportation nucléaire
NF1	Protéine neurofibromatose 1
NLS	Signal de localisation nucléaire
NOXA	Protéine Phorbol-12-myristate-13-acetate

P21	Kinase inhibitrice cycline dépendante 1
p53 AIP	Protéine apoptotique 1 induite par p53
p53 R2	p53-inducible ribonucleotide reductase 2
p53 RE	Element de réponse reconnu par p53
p57	Cycline dépendante kinase inhibitrice 1C
PERP	Protéine résistante au peroxyde
PIG3	Quinone oxidoreductase-gène 3 induit par p53
Pirh2	Unibiquitine ligase RING-H2 induit par p53
PUMA	Modulateur apoptotique induit par p53
RAS	Retrovirus associé à l'ADN séquence
RB	Protéine rétinoblastomique
RE	Reticulum endoplasmique
ROS	Radicaux oxygènes libres
RYR	Récepteur à la ryanodine
SAM	Stérile alpha motif
SCO2	Protéine oxydase 2 associée au cytochrome c
SERCA	Transporteur calcique du reticulum sarcoplasmique
Sirt1	Protéine sirtuine 1
SMUG1	Simple brin monofonctionnel uracil-ADN glycosylase
STO-609	7-Oxo-7H-benzimidazol[2,1-a]benz[de]isoquinoline-3-carboxylic acétique acide
T286	Thréonine en position 286
TA	Isoforme comportant le domaine de transactivation
Tau	Unité protéique associée au tubuline
TAX	Protéine transactivatrice de pX
TGF-β	facteur de croissance de transformation bêta
TIGAR	Régulateur apoptotique et glycolitique induit par TP53
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TRAIL	Ligand induit par l'apoptose reliée au facteur de nécrose tumoral
TYR99	Tyrosine en position 99
UVRAG	Protéine associée à la résistance aux radiations ultra-violet
XPC	Protéine de réparation de l'ADN des cellules XP
YAP1	Protéine 1 associée à Yes
ΔN	Isoforme ne comportant pas le domaine de transactivation

INTRODUCTION

A chaque instant, la cellule peut s'engager vers quatre états cellulaires majeurs : la survie, la quiescence, la différenciation et la mort cellulaire. C'est l'équilibre de ce destin cellulaire qui coordonne dans l'ensemble tissulaire, le développement de celui-ci et son homéostasie. Plus qu'une simple balance à deux plateaux, l'intégrité tissulaire est régit par une multitude de signaux cellulaires provenant de la cellule elle-même, mais aussi de son environnement. Ces divers signaux impactent sur le destin de la cellule, en partie, grâce à une catégorie de protéines essentielles à l'intégration des informations cellulaires, les facteurs de transcription. Tel des interrupteurs, ils sont responsables de la réponse cellulaire qui entraînera l'un de ces quatre évènements cellulaires majeurs. D'ailleurs, ces facteurs de transcription, de par leurs rôles primordiaux dans l'homéostasie, peuvent être responsables de nombreuses pathologies, lorsque ceux-ci sont dérégulés. Ainsi, comprendre comment ces facteurs de transcription fonctionnent, quels sont leurs rôles précis, à quels signaux ils répondent, nous permet d'appréhender les mécanismes dérégulés dans les pathologies et investiguer les diverses stratégies thérapeutiques potentielles.

Notre équipe, dirigée par Dr Gaidon, a pour objectif d'élucider les mécanismes moléculaires de la réponse au stress cellulaire en focalisant sur une famille de facteurs de transcription, la famille p53. L'un des objectifs a été d'identifier la régulation d'une de ces protéines de cette famille, p73, dans divers contextes pathologiques ou celle-ci est impliquée. Ma thèse consistait à répondre à cet enjeu scientifique. Dans ce manuscrit, vous allez ainsi mesurer l'importance de la protéine p73 dans deux systèmes biologiques, le système neuronal et le système digestif, et suivre l'identification d'une régulation au niveau post-traductionnel de p73.

I-P73, le cadet d'une famille aux multiples facettes !

I-1. Généralités sur la famille p53

Le gène p73 appartient à une famille composée de trois gènes codant pour trois facteurs de transcription p53, p63 et p73. Le premier gène décrit et donnant son nom à la famille, est p53. Premièrement définie comme une protéine nucléaire interagissant avec l'antigène oncogénique du virus simien SV40 (*Friedman et al., 1990*), ce n'est que plus tard qu'elle a été identifiée comme un facteur de transcription primordial (*Farmer et al., 1992*). Impliqué dans un large spectre de fonctions (prolifération cellulaire, différenciation, métabolisme, angiogenèse, réparation de l'ADN, arrêt cellulaire, apoptose...), il est toutefois défini tout d'abord comme un suppresseur de tumeur et par la suite, comme le « Guardian of the Genome » (*Lane et al., 1992*).

Noblement titré, de nombreuses équipes de recherche ont dédié leurs travaux sur p53 et ont souligné l'importance de p53 dans l'homéostasie tissulaire. Par exemple, le phénotype des souris déficientes de p53 présente un développement, à priori normal, mais à l'âge de 6 mois, 75% de ces souris ont développé spontanément des tumeurs (*Donehower et al., 1992*). Ceci suggère que p53, bien que n'étant pas irremplaçable pour le développement, joue un rôle important dans l'homéostasie, en protégeant l'organisme de la prolifération cellulaire anarchique, dont découle la tumorigénèse. D'ailleurs, p53 est largement connue dans la cancérologie, étant impliquée dans plus de 50% des cancers, dû à divers mutations identifiées, causant le dysfonctionnement de ce suppresseur de tumeur essentiel (*Prives et al., 1999*).

Sept années après la découverte de p53, deux équipes ont identifiées deux homologues du gène de p53, p73 (*Kahgad et al., 1997*) et p63 (*Yang et al., 1998*), qui sont eux aussi des facteurs de transcription. Nous verrons par la suite que leurs structures sont similaires à p53, néanmoins les phénotypes des souris déficientes de ces deux protéines respectives démontrent des différences dans leurs fonctions. Alors que p53 ne joue pas un rôle primordial dans le développement, la courte viabilité des souris p63 déficientes et les défauts du développement des membres, des épithéliums confèrent à celle-ci une forte implication dans le développement tissulaire (*Mills et al., 1999; Yang et al., 1999; Rouleau et al., 2011*). Il en est de même pour p73, qui est très largement identifiée comme importante dans la neuro-génèse. Les souris p73 déficientes sont

viables mais présentent toutefois de sévères altérations dans le système neuronal (l'hydrocéphalie, une altération dans le développement de l'hippocampe) mais aussi dans le système digestif (inflammation chronique, épithélium digestif érodé) (Yang et al., 2000).

Nous verrons par la suite, que p73, en plus d'avoir des fonctions spécifiques partagent avec les deux autres membres de la famille, des fonctions communes. Cette analogie repose sur leurs homologies structurelles que nous allons dès à présent analysées.

I-2. Une structure bien orchestrée

A partir du moment où ces stars cellulaires ont été découvertes, très vite, la communauté scientifique s'est penchée à définir précisément leurs structures afin de comprendre leurs fonctionnements. A travers de nombreuses publications scientifiques, on peut esquisser de réelles cartes d'identité de ces trois gènes.

En effet, la protéine p73 est devenue l'un des gènes les plus étudiés, ayant la particularité de compenser la perte de fonction de p53 par sa remarquable homologie. L'étude de ce facteur de transcription est un réel challenge de par le nombre d'isoformes différents, « scandaleusement extravagant » (Coates et al., 2006 ; De Laurenzi et al., 1998) ! La combinaison des deux promoteurs différents et l'épissage alternatif procurent une diversité d'une quarantaine d'isoformes pour p73 (Kaelin, 1999). Les autres membres de la famille p53 renforcent la complexité de cette famille, en possédant respectivement 9 isoformes possibles pour p53 et six pour p63. Néanmoins, de récentes publications suggèrent que la partie immergée de l'iceberg des différentes isoformes n'est pas encore totalement décrite (Costanzo et al., 2014 ; Romano et al., 2014 ; Candi et al., 2014).

Quoiqu'il en soit, l'architecture de ces trois gènes se compose de domaines bien distincts, dont leurs rôles semblent bien orchestrés.

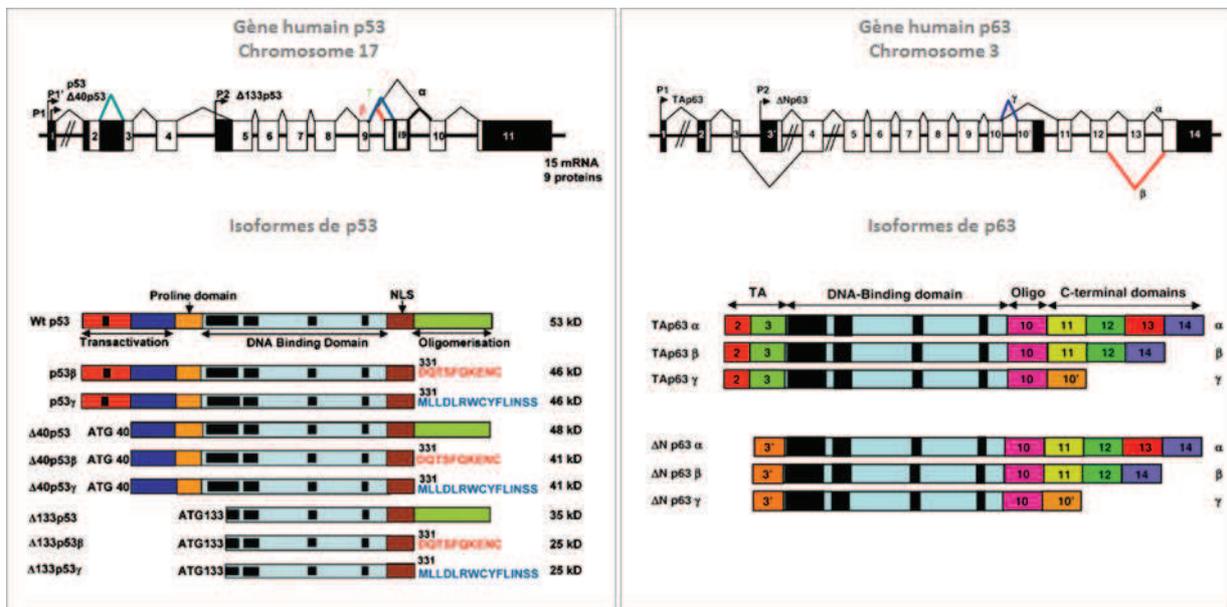
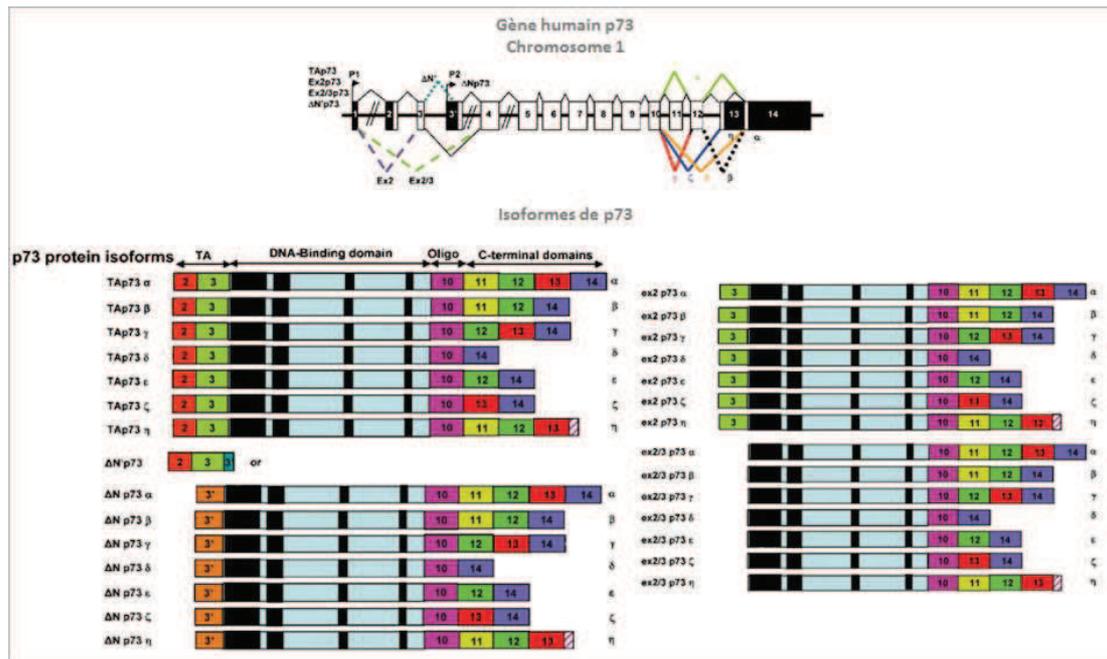


Figure 1|Structures des gènes et protéines des membres de la famille p53

Les membres de la famille p53 contiennent un domaine de liaison à l'ADN et un domaine d'oligomérisation. La présence ou l'absence du domaine de transactivation confère deux sous-groupes, ayant des capacités transcriptionnelles différentes. La présence des promoteurs et l'épissage alternatif génèrent des isoformes différentes. Nous verrons par la suite, que leurs activités peuvent être parfois isoformes spécifiques. Schéma tiré de l'article publié dans le journal Cell. Death Differ (Murray-Zmijewski et al, 2006

I-2.1 Domaine de liaison à l'ADN (DBD)

Outre d'être hautement conservée entre les espèces, ce domaine est celui qui renferme le plus d'homologie entre les trois membres de la famille p53 (60% entre p73 et p53 et

80% entre p73 et p63). Structure central dans le gène, elle reconnaît et se lie sous forme tétramérique aux séquences ADN des gènes cibles, appelés communément éléments de réponse (p53 REs) (Joerger et al., 2009). La haute homologie de cette séquence entre les membres suggère qu'ils reconnaissent des gènes cibles similaires, généralement catégorisés dans la classe I et impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN et à l'apoptose (p21, Bax, PUMA, NOXA...) (Harms et al., 2004; Bernassola et al., 2005). Toutefois, les phénotypes des souris déficientes soulignent que certaines fonctions ne sont pas compensées par les autres membres, révélant ainsi des gènes cibles spécifiques pour chaque membre de la famille p53 (classe II). La complexité de cette famille s'élève d'autant plus, que les membres peuvent s'attacher aux promoteurs des membres de la famille. Par exemple, il a été démontré qu'une des isoformes de p73, $\Delta Np73$ avait la capacité de reconnaître le promoteur de p53 et d'empêcher sa transcription (Stiewe et al., 2002).

I-2.2 Domaine de transactivation (TA)

Nécessaire au recrutement de la machinerie transcriptionnelle, ce domaine renferme l'activité même du facteur de transcription. Positionnés en N-terminal, deux promoteurs génèrent deux grands groupes d'isoformes, les isoformes TA (possédant le domaine de transactivation) et les isoformes ΔN (ne possédant pas ce domaine) (Fillippovich et al., 2001; Stiewe and Putzer, 2002). Ces deux groupes furent longtemps la signature particulière de la structure de p73 et p63. Néanmoins, depuis une dizaine d'années, une étude a identifié l'existence d'un second promoteur P1' sur la séquence de p53, présent dans certaines espèces (l'homme, la souris) mais pas dans d'autres (poisson zèbre, drosophile). P53 a également la particularité de posséder une région riche en proline dans le domaine de transactivation, qui comprend également un troisième promoteur conduisant à un troisième groupe d'isoformes, appelé également $\Delta 133p53$, $\Delta 160p53$ (Baptiste et al., 2002; Venot et al., 1998).

Depuis la découverte des structures de ces trois gènes, il y avait été établi que le groupe d'isoformes TA (respectivement appelé p53 isoformes, TAp63 isoformes et TAp73 isoformes) se comportait comme un effecteur transcriptionnelle. A contrario, se liant toujours aux éléments de réponse des gènes cibles, les isoformes ΔN ($\Delta p53$, $\Delta Np63$ et $\Delta Np73$) étaient réduites à réprimer la transcription des gènes cibles, en empêchant leurs accès aux isoformes TA et par son incapacité à recruter la machinerie transcriptionnelle

(Grob et al., 2001; Benard et al., 2003). Toutefois la répartition fonctionnelle entre les isoformes n'est pas aussi stricte et évidente à déterminer. Une équipe a récemment démontré que les isoformes $\Delta Np63$ et $\Delta Np73$ possédaient une petite séquence de transactivation en N-terminal, différente du domaine TA décrit auparavant et pourraient ainsi être aussi activatrices (Lin et al., 2009).

En plus de l'existence de ces promoteurs, p73 a la spécificité de subir un épissage alternatif en N-terminal produisant ainsi une multitude d'isoformes différentes, appelées *ex2*, *ex2/3*, se différenciant dans la structure des deux domaines suivants, le domaine d'oligomérisation et le domaine SAM.

I-2.3 Domaine d'oligomérisation (OD)

Le domaine d'oligomérisation est responsable de la tétramérisation des membres de la famille, état structurel essentiel pour la transactivation des gènes cibles (Coutandin et al., 2009). La haute conservation de ce domaine suggère que les membres de cette famille forment autant des hétéro-oligomères que des homo-oligomères. Cependant, les expériences doubles hybrides et d'immuno-précipitations ont montré que le domaine d'oligomérisation de chaque membre de la famille tend à générer plus d'homo-oligomères que d'hétéro-oligomères (De Laurenzi et al., 1998 ; Di Como et al., 1999). Alors qu'il a été démontré que le variant p53 sauvage ne peut pas se lier à p73, certains mutants de p53 (p53-R175H et p53-R248H) peuvent s'associer à p73 et inhiber son activité transcriptionnelle (Gaiddon et al., 2001 ; Di Como et al., 1999). De par la pléthore d'isoformes différentes entre les membres, la question des possibilités d'associations entre les membres restent toujours d'actualité et continue à être étudié.

I-2.4 Signaux de transport nucléaire

Missionnés en tant que facteur de transcription, p73 et les autres membres, sont localisés principalement dans le noyau. Ils contiennent tous, deux séquences consensus pour leurs transports nucléaires : le signal de localisation nucléaire (NLS) et le signal d'export nucléaire (NES) (Inoue et al., 2002). Ces séquences permettent respectivement l'adressage vers le noyau, la localisation subcellulaire pour son activité ou son expulsion extranucléaire pour la dégradation protéosomique. Nous verrons, ultérieurement que de nombreuses protéines sont mobilisées pour permettre une régulation très fine de la stabilité de ces facteurs de transcription.

I-2.5 Domaine de motifs stérile alpha (SAM)

p73 et p63, contrairement à p53, contiennent une extrémité carboxy-terminale variable, en fonction de l'épissage alternatif. En effet, l'évolution a favorisé l'extension de cette famille aux nombreux variants, par de multiples combinaisons d'épissage alternatif en 3'. Ceci produit différents transcrits, traduits en protéines ayant une composition et une longueur différentes (Bourdon et al., 2005; Hofstetter et al., 2010). Concernant la nomenclature, la variabilité entre ces isoformes se définit par la dénomination en lettres grecques (α , β , δ , ϵ ...). La diversité de l'extrémité carboxy-terminale atteint la complexité de cette famille à son paroxysme, pour le plus grand plaisir des adeptes de cette famille ! A ce jour, l'étude de cette famille concerne essentiellement les isoformes α , β , δ . Récemment caractérisées, les fonctions et régulations des autres isoformes restent encore à être déterminer.

La détermination de la structure tri-dimensionnelle de l'extrémité carboxy-terminale de p73 a démontré que la région contenait un motif stérile alpha (SAM), qui favorise l'interaction protéine-protéine (Chi et al., 1999). L'étude comparative des séquences et les modélisations informatiques ont révélé que la structure est aussi présente dans la séquence p63. Le motif SAM est un domaine globulaire composé de 4 hélices alpha. La majorité des protéines possédant ce motif sont impliqués dans la régulation du développement. Ceci apporte un indice supplémentaire sur le rôle que jouent p73 et p63, dans la différenciation. Contrairement aux autres domaines SAM, ceux présents dans la séquence de p73 et p63 n'induisent pas d'homo ou hétéro-dimérisation (Chi et al., 1999), suscitant ainsi l'hypothèse qu'ils pourraient être importants dans l'interaction avec d'autres protéines « SAM positif », encore non identifiées.

En se penchant simplement sur la structure de p73 et de ses homologues ont peu déjà aisément appréhendé la complexité de cette famille. De nombreux garde-fous ont été échafaudés par la nature, tels que la compensation entre les membres, le vertigineux nombre de combinaisons tétramériques entre les multiples isoformes et les localisations chromosomiques différentes (chrom1 pour p73, chrom17 pour p53 et chrom3 pour p63) préservant en partie les fonctions de possibles mutations. Cela laisse fortement présager l'importance de cette famille dans les mécanismes moléculaires impliqués dans des fonctions essentielles pour le développement et l'homéostasie tissulaire entre autres.

Concentrée essentiellement sur l'un des membres de la famille, permettez-moi de vous présenter maintenant, les enjeux cellulaires remarquables que relève le facteur de transcription p73 et les pathologies qui y sont associées.

I-3. Fonctions des isoformes p73 et les pathologies associées

I-3.1 Etonnante démonstration par les souris transgéniques

La création des différentes souris transgéniques des isoformes p73 a divulgué d'étonnantes informations sur les fonctions de ce facteur de transcription. Globalement, p73 est impliqué dans le système neuronal, le système de reproduction, le système digestif, le système immunitaire et le système voméro-nasal (*Yang et al., 2000 ; Holembowski et al., 2014 ; Inoue et al., 2014 ; Tomasini et al., 2013*). En effet, les souris p73^{-/-} présentent des défauts neurologiques, comportementales, de fertilité, inflammatoires et de détection voméro-nasal. Néanmoins, la contribution de chaque isoforme de p73 dans ces différents systèmes reste encore un réel challenge à relever. Encore aujourd'hui, les outils techniques ne sont pas assez suffisantes pour discriminer chaque isoforme, dont leur différences peut reposer sur quelques acides-aminés. Néanmoins, de précieuses études ont tout de même éclairci quelques zones d'ombre.

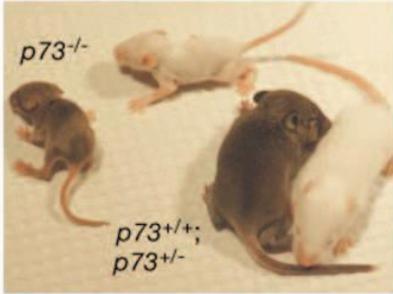
Concernant le rôle de p73 dans le système neuronal, les souris déficientes p73, TAp73 et Δ Np73 présentent toutes des troubles neuronaux tels que la dysgénésie hippocampique, l'élargissement des ventricules, la perte neuronale ... (*Yang et al., 2000 ; Pozniak et al., 2002 ; Tomasini et al., 2008 ; Wilhelm et al., 2008*). Alors que l'isoforme TAp73 est associée au développement hippocampique, Δ Np73 joue un rôle essentiel dans la maintenance des cellules souches présageant d'un potentiel statut oncogénique (*Wilhelm et al., 2010*). Toutefois l'altération dans la détection voméro-nasal décrite dans les souris p73 déficiente, n'est pas retrouvé dans les souris TAp73 et Δ Np73 déficientes. Ceci laisse penser que ces deux isoformes pourraient être tous les deux dans ce système et se compenser l'une et l'autre.

Mais ce qui est particulièrement surprenant dans l'étude de ces souris transgéniques, c'est le potentiel statut tumeur-suppresseur de p73. En effet, le caractère tumeur-suppresseur n'était pas évident à établir pour plusieurs raisons. Premièrement, aucune délétion du gène p73 a été associée aux cancers (*Kaghad et al., 1997*). Deuxièmement, au contraire de p53, p73 est faiblement muté (1-2%) dans les différentes tumeurs humaines étudiées

(Irwin et al, 2001 ; Melino et al., 2002). Troisièmement, les souris p73 déficientes ne développent pas de tumeurs spontanément, à contrario des souris p53 déficientes (Pozniak et al., 2000 ; Yang et al., 2000).

Pourtant les premiers modèles murins qui ont permis de mettre en évidence l'implication de p73 dans le réseau tumo-suppresseur de p53 furent les souris transgéniques hétérozygotes (p73^{+/-}) et les souris spécifiquement déficientes des isoformes TAp73 et ΔNp73. En effet, alors que les souris p73^{-/-} ne développent pas de tumeurs, la perte d'un seul allèle p73 avec ou sans une perte allélique de p53 suffissent à déclencher la tumorigénèse (Flores et al, 2005). De plus, les souris TAp73 déficientes souligne le caractère tumo-suppresseur de TAp73 par le développement spontané de tumeurs, notamment des adénocarcinomes pulmonaires. Des études ont démontré que TAp73 prévient de l'instabilité génomique en contrôlant la mitose (Vernole et al. 2009) et l'aneuploïdie, mais de façon tissu spécifique (cellules pulmonaires dérégulées, mais les cellules du thymus se divisent correctement) (Tomasini et al, 2008). Additionnellement, les souris ΔNp73 déficientes présagent également d'un profil oncogénique pour l'isoforme ΔNp73 (Wilhelm et al., 2010). Elles ne développent pas de tumeurs spontanément mais d'autres études *in vitro* ont révélé toutefois que ΔNp73 participe au développement tumoral. Ce caractère oncogénique est relié à l'activité transcriptionnelle de p53. En effet, il a été observé que lorsque l'on réprime l'expression de ΔNp73 dans des cellules cancéreuses, la transcription des gènes apoptotiques faite par p53 est augmentée. Il a été démontré qu'en fait, ΔNp73 contrecarre par compétition, l'activité transcriptionnelle de p53.

Par l'analyse de ces différentes souris transgéniques on peut d'ores et déjà anticiper que l'impact de p73 dans les mécanismes cellulaires résulteront de l'expression combinée des deux isoformes TAp73 et ΔNp73, qui semblent jouer des rôles opposés. Avant d'établir dans quelles fonctions le facteur de transcription p73 est impliquée, il semble intéressant d'étudier le profil d'expression de ses isoformes afin d'obtenir une vision globale de l'importance de ce membre dans la physiologie humaine.

		
P73 -/-	TAP73 -/-	Δ NP73 -/-
<ul style="list-style-type: none"> • Dysgénèse hippocampique • Ventricules latérales élargies • Perte des neurones sympathiques • Défaut de détection aux phéromones • Infection chronique et inflammation 	<ul style="list-style-type: none"> • Défaut de méiose • Infertilité • Dysgénèse hippocampique • Développement tumoral 	<ul style="list-style-type: none"> • Ventricules élargis • Perte neuronale • Réponse aux dommages de l'ADN augmentée
Yang et al., 2000 Pozniak et al., 2002	Tomasini et al., 2008	Wilhelm et al., 2008

	P53 -/-
	<ul style="list-style-type: none"> • Phénotype d'apparence normal et viable • Développement spontané de tumeurs à 6 mois
	Donehower et al., 1992 Jacks et al., 1994

	P63 -/-
	<ul style="list-style-type: none"> • Courte viabilité, mort autour de 1-2 mois • Défauts majeurs du développement des membres, épithéliums • Absence de cellules épithéliales et les organes dérivés (glandes mammaires, salivaires et lacrymales)
	Yang et al., 1999 Mills et al., 1999

Figure 2 |Phénotypes des souris déficientes des membres de la famille p53

La création des souris transgéniques pour les membres de la famille p53 traduisent des fonctions spécifiques pour chaque protéine. Le facteur p53 est fondamental pour empêcher l'échappement des cellules au cycle cellulaire. P63 joue un rôle essentiel sur le développement épithélial et des membres. P73, quant à elle, a clairement une spécificité dans le développement neuronal. Néanmoins, les fonctions de chaque membre peuvent être beaucoup plus larges, mais elles sont compensées par les autres membres

I-3.2 Expression des isoformes p73 dans les contextes physiologiques et pathologiques

Comme soulevé auparavant par l'étude des souris transgéniques, p73 joue clairement un rôle essentiel dans le développement neuronal. Parce que mon projet doctoral consistait à étudier p73 dans ce système précis entre autre, je développerai plus en détails dans un autre chapitre l'implication du facteur de transcription dans ce système. Toutefois, plusieurs études ont démontré que p73 ne se cantonne pas de participer que dans les mécanismes de neuro-genèse. Le recouvrement des fonctions entre les membres peuvent en effet dissimuler d'autres implications de p73 dans les autres systèmes. En effet, l'absence des isoformes de p73 dans les différentes souris transgéniques peut être compensée par les autres membres homologues. Néanmoins, l'établissement du profil d'expression des isoformes de p73 dans les tissus physiopathologiques pourrait être un premier pas instructif dans la compréhension fonctionnelle de celles-ci.

I-3.2.a Balance TAp73/ Δ Np73 fine dans les tissus

Cette question qui semble bien élémentaire est sans doute une des causes principales des calvities précoces des chercheurs dans ce domaine (moi y compris) ! Pour apprécier l'expression ARN et protéique des isoformes de p73, l'utilisation d'anticorps et de primers spécifiques seraient des outils précieux. Malheureusement, seulement peu d'anticorps spécifiques semblent être fonctionnels, et dirigé contre toutes les isoformes p73, ne permettant pas de discriminer les variants entre eux. Ceci explique pourquoi, il y a encore peu de résultats sur le profil d'expression de p73 pour l'approche immunohistologique. Toutefois, le design de primers spécifiques aux deux groupes d'isofomes TA et Δ N permet déjà d'apprécier le profil d'expression tissulaire via l'approche de rtPCR. L'étude de ce profil TA/ Δ N tissulaire confirme que l'isoforme pro-apoptotique TAp73 semble plus exprimée dans la majorité des tissus. De manière intéressante, l'équilibre entre les deux isoformes semble importante pour l'homéostasie du système neuronal, digestif, de la peau et de l'appareil reproducteur (*Conforti et al., 2012*).

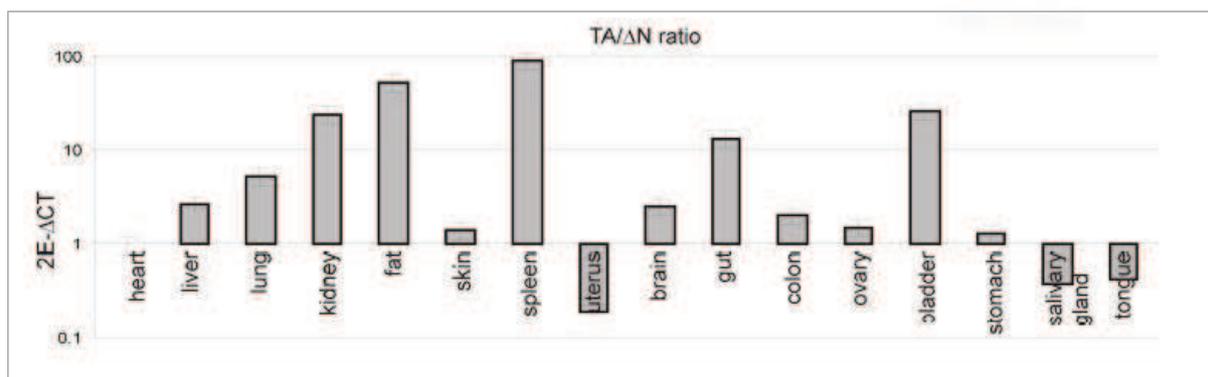


Figure 3|Profil d'expressions des isoformes TA/ΔN de p73 dans les tissus
L'ARN total fut isolé à partir de différents tissus murins et l'expression de TAp73 et de ΔNp73 fut évalués par RT-PCR. On distingue trois catégories de profil : la forme TA est prédominante (rate, rein...), la forme ΔN est majoritaire (utérus, glande salivaire) et l'absence d'une prédominance élevée (peau, cerveau, colon...). Données exportés d'un article paru dans le journal Aging (Conforti et al., 2012).

Noté que ce profil d'expression est extrêmement global car derrière la définition des deux groupes TA et ΔN se cache une multitude d'isoformes (α , β , ϵ , δ ...) qui pourraient jouer des fonctions différentes et être distribuer spécifiquement dans les tissus. Malheureusement, les différences entre les séquences sont parfois tellement faibles, qu'elles ne permettent pas d'être discriminées par rtPCR.

1-3.2.b Déséquilibre des isoformes p73 dans les cancers

Beaucoup de publications ont démontré que le déséquilibre du profil d'expression de p73 est corrélé avec de graves pathologies. Appartenant à la famille du « Guardian of the genome », les investigations sur ce profil concernent majoritairement les cancers. Plusieurs approches ont été explorées pour définir le rôle de p73 dans la tumorigénèse. L'une d'elle a été d'établir le ratio d'expression entre les deux groupes d'isoformes de p73 dans des lignées cellulaires cancéreuses par rtPCR et par western blot (*Conforti et al., 2012*). Il est à noter le déséquilibre en faveur de TAp73 (niveau 100 fois plus élevé) dans les lignées cellulaires cancéreuses humaines SW480 (adénocarcinome colique), MCF7 (cancer du sein). L'analyse protéique a confirmé les observations par rtPCR et montre également que c'est majoritairement l'isoforme TAp73 α la plus abondante dans les cellules cancéreuses. Additionnellement, les études d'expression dans les tumeurs des différents types de cancers humain ont permis d'établir une corrélation entre p73 et la tumorigénèse. Cette approche a l'avantage de contrecarrer les possibles biais du profil

engendrés par la mise en culture prolongée *in vitro*. Il a été démontré que l'isoforme oncogénique $\Delta Np73$ est surexprimée dans de nombreuses tumeurs primaires humaines dans les cancers du sein, du colon, des poumons... (Cuixia et al, 2013).

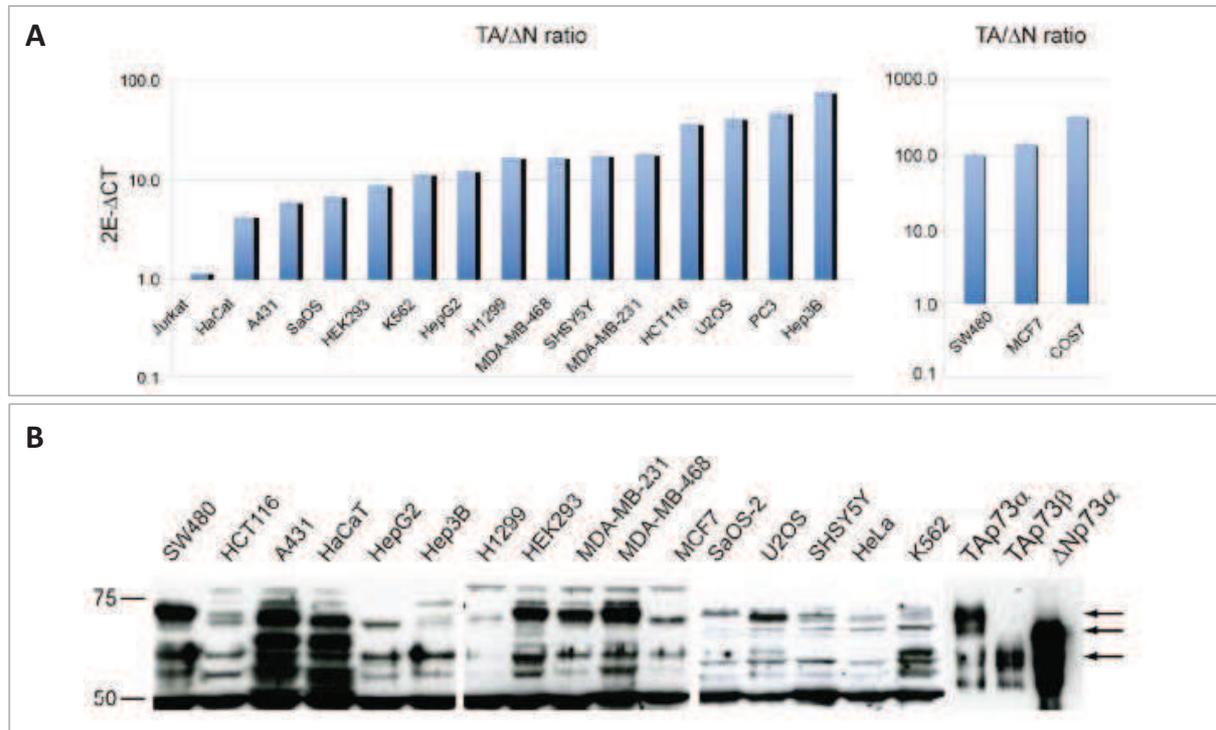


Figure 4|Profil d'expressions des isoformes TA et ΔN de p73 dans les lignées cancéreuses
A. L'ARN total fut isolé à partir des différentes lignées cancéreuses et l'expression de TAp73 et de $\Delta Np73$ fut évalués par RT-PCR. B. Etude d'expression protéique des isoformes p73 sur différentes lignées cellulaires cancéreuses. Données exportés d'un article paru dans le journal Aging (Conforti et al., 2012).

Une récente recherche a récemment décrit comment l'augmentation d'expression de $\Delta Np73$ pouvait contribuer à la tumorigénèse. En effet, $\Delta Np73$ stimulerait les protéines cibles de TGF- β , qui est une protéine favorisant la carcinogénèse, l'invasion tumorale et métastatique (Niemantsverdriet et al., 2012). Il a également été observé que la surexpression de cette isoforme était associée au pronostic vital du patient en diminuant celui-ci, dans les cancers gastriques (Vilgelm et al., 2010) mais aussi pulmonaires (Uramoto et al., 2004).

Ces évidences nombreuses laissent même « le luxe » d'espérer que l'expression de cette isoforme pourrait être un marqueur pertinent pour évaluer la sévérité tumorale. Néanmoins, il est intéressant de remarquer qu'une publication assume que la

surexpression de $\Delta Np73$ n'est pas suffisante pour expliquer, à elle seule, la croissance tumorale (*Sabatino et al., 2007*).

Organ/tissue/cell line	Isoform expression	Method of analysis
Ovarian cancer	$\Delta Np73_1$	IHC; RT-PCR
	$\Delta Np73_1; \Delta Np73_1$ only in small number of tumors	Real-time PCR
Lung cancer	$\Delta Np73_1$	RT-PCR
	$\Delta Np73_1$	RT-PCR; IHC; Antisense Oligonucleotide (ASO)
Non-small cell lung carcinomas (NSCLCs)	$\Delta Np73_1$	RT-PCR; IHC
Cervix carcinoma	$\Delta Np73_1$	IHC; RT-PCR
Thyroid carcinoma	$\Delta Np73_1$	RT-PCR; IHC
Breast cancer	$\Delta Ex2/3p73_1; \Delta Np73_1; \Delta Ex2p73_1$	Transfection
	$\Delta Ex2p73_1$	RT-PCR, IHC
Hepatocellular carcinoma (HCC)	$p73\Delta ex2_1; p73\Delta ex2/3_1; \Delta Np73_1$	Real-time PCR
	$\Delta Ex2p73_1$	
	$\Delta Np73_1$	Western blot analysis; IHC
	$\Delta Np73_1$	RT-PCR; western blotting
Neuroblastoma	$\Delta Np73_1$	Transfection
	$\Delta Np73_1$	RT-PCR; Immunoblotting
Colon cancer	$\Delta Np73_1$	Antisense
	$\Delta Ex2/3p73_1; \Delta Np73_1; \Delta Ex2p73_1$	RT-PCR, IHC
Gynecological cancer	$\Delta Ex2/3p73_1; \Delta Np73_1$	Real-time RT-PCR
	$\Delta Np73_1; \Delta Np73_1$	Real-time RT-PCR
Prostate carcinoma	$\Delta Np73_1$	RT-PCR
	$\Delta Ex2p73_1$	RT-PCR
Acute myeloid leukemia	$\Delta Np73_1$	RT-PCR; western blotting
Non-Hodgkin's lymphomas	$\Delta Np73_1$	Real-time PCR
Glioma	$p73\Delta ex2/3_1; \Delta Ex2p73_1$	Real-time PCR
Medulloblastoma	$\Delta Np73_1$	IF; IHC; Real-time PCR western blotting
	$\Delta Ex2/3p73_1; \Delta Np73_1; \Delta Ex2p73_1$	RT-PCR
Ameloblastoma	$\Delta Np73_1$	RT-PCR; IHC
Osteogenic Sarcoma	$\Delta Np73_1$	RT-PCR; Western blotting
Chronic B-cell lymphocytic leukemia	$\Delta Np73_1$	RT-PCR; western blotting
Head and neck squamous cell cancer (HNSCC)	$\Delta Np73_1$	RT-PCR; Real-time PCR
Rhabdomyosarcoma	$\Delta Ex2p73_1; \Delta Np73_1$	RT-PCR
Gastric and esophageal tumors	$\Delta Np73_1$	RT-PCR; western blotting

Figure 5| Profil d'expressions des isoformes ΔN de p73 dans les cancers

De nombreuses études ont focalisées sur l'expression ARNm et protéique des différentes isoformes de $\Delta Np73$ dans différents cancers. Elles ont toutes révélées une augmentation de cette isoforme oncogénique dans les cellules cancéreuses.

En effet, l'augmentation de la survie cellulaire s'expliquerait par des mutations et du statut cellulaire de p53 (Deyoung et al., 2006 ; Rocco et al., 2006) ou encore de la

mutation du gène Ras, associées à la surexpression de $\Delta Np73$. Toutefois, c'est surtout la notion de ratio entre les deux grands groupes d'isoformes de p73 qui y jouerait un rôle. Ainsi, la diminution de l'expression de TAp73 participerait également au développement tumoral. Ainsi, il est déjà opportun de mentionner que la compréhension de la régulation (transcriptionnelle et post-traductionnelle) des deux isoformes sera pertinente pour comprendre leurs implications dans la tumorigénèse.

I-3.3 P73, un régulateur dans l'arrêt du cycle cellulaire

Homologue de p53, P73 régule également le cycle cellulaire à différents stades. En effet, TAp73 en déclenchant la transcription de p21 et p57 induit l'arrêt du cycle en phase G1 en inhibant les cyclines D/E. Mais, la transcription de ces mêmes promoteurs est inhibée par l'autre isoforme $\Delta Np73$, favorisant ainsi la progression du cycle cellulaire. On apprécie d'autant plus l'importance du ratio de l'expression de ces isoformes évoquées plus haut, où la régulation du cycle dépend du type cellulaire (*Holcakova et al., 2008*).

Additionnellement, TAp73 agit également comme répresseur sur des régulateurs mitotiques de la phase G2/M (Cycline B1, Cycline B2, cdc2). De manière surprenante, il a été observé que l'isoforme $\Delta Np73$ avait le même effet que l'isoforme TA sur les promoteurs de la cycline B2. Les différentes études ont démontré que les modifications post-traductionnelles de p73 étaient importantes dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, la phosphorylation sur la T86 par la cycline kinase B favorise la transition M-G1, d'autant plus que la forme non-phosphorylée de p73 empêche la cellule d'entrer dans un nouveau cycle cellulaire en G1 (*Gaiddon et al., 2003 ; Merlo et al., 2005*).

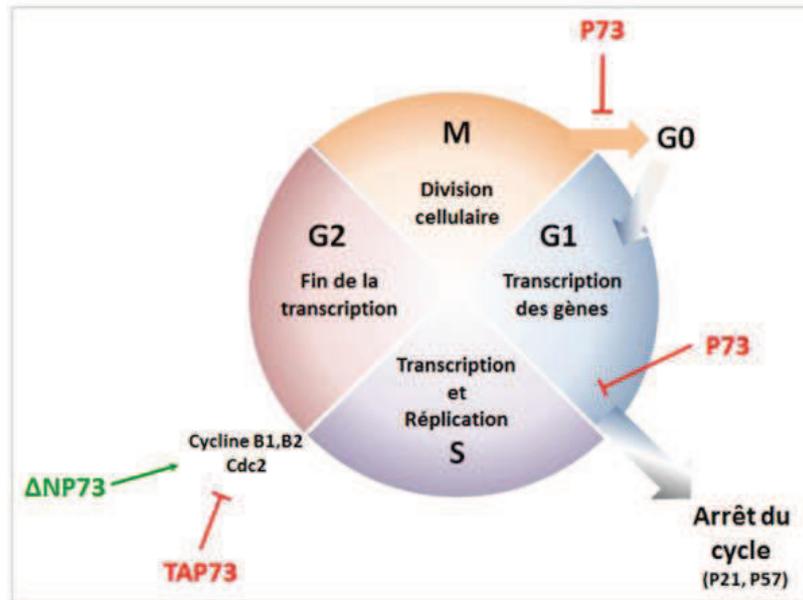


Figure 6|Régulation du cycle cellulaire par p73

Le cycle cellulaire composé de 4 stades est ponctuée de points de contrôle entre elles. Les isoformes p73 en déclenchant ou en inhibant la transcription des gènes nécessaire pour les évènements de chaque étape vont contrôler l'arrêt du cycle cellulaire.

I-3.4 P73, un effecteur apoptotique

Après avoir découvert comment p73 pouvait réguler le cycle cellulaire, celui-ci est également largement connu pour contrôler et initier l'apoptose cellulaire. Encore une fois, dans ce mécanisme cellulaire, les deux isoformes semblent jouer des rôles contradictoires. Alors que TAp73 initie l'apoptose par la transcription de facteurs apoptotiques tels que BAX, NOXA, Caspase 1 et PUMA (*Costanzo et al., 2002 ; Jain et al., 2005*), Δ Np73 contrecarre le mécanisme apoptotique pouvant être initié par p53 après des dommages à l'ADN (*Vossio et al., 2002*). Néanmoins, certaines publications nuancent le caractère non apoptotique attribué à Δ Np73. Par exemple, les lignées cellulaires cancéreuses présentant une surexpression de cette isoforme, n'apparaissent pas être avantager dans la progression cellulaire et une quelconque inhibition apoptotique (*Marazzo et al., 2006*). Mesurer l'implication de p73 exclusivement dans les mécanismes apoptotiques a été un réel challenge, car en plus de cibler les mêmes gènes cibles que p53, p73 transcrit spécifiquement d'autres inducteurs apoptotiques tels que CD95, PERP ou encore P53 AIP (*Vousden et al., 2006 ; Levine et al., 2006*).

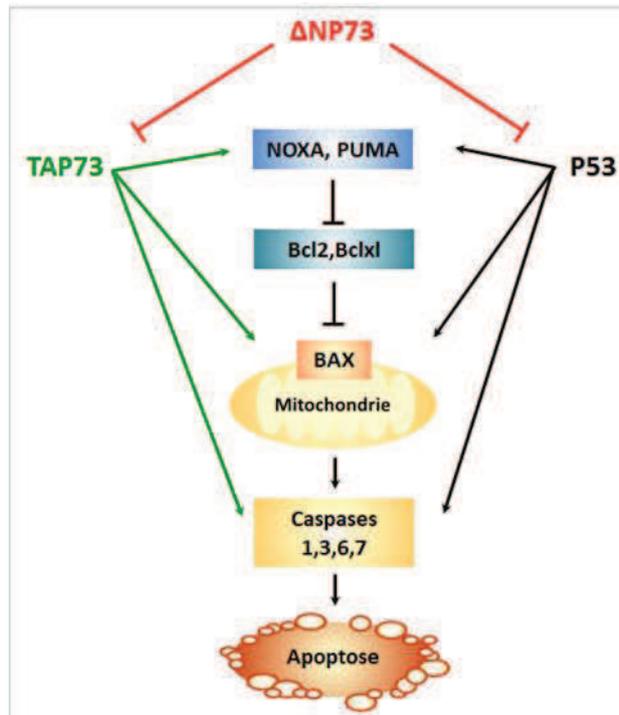


Figure 7 | Régulation de l'apoptose

En activant la transcription de facteurs apoptotiques tels que NOXA, BAX et les caspases, l'isoforme TAp73 et p53 induisent la mort cellulaire. Parallèlement par compétition sur les sites de liaisons des promoteurs de gènes cibles, Δ Np73 inhibe l'effet pro-apoptotique de TAp73 et p53.

I-3.5 P73, promoteur de la différenciation

Nous verrons plus tard l'importance de p73 dans la différenciation neuronale, que vous pouvez déjà grandement imaginer de par le phénotype des souris p73 déficientes. Cependant p73 participe également à la différenciation d'autres types cellulaires. En effet, p73 participerait à la myogénèse, en induisant la formation de myotubes, structures issues de la fusion de myoblastes qui vont continuer à se différencier en fibres musculaires. P73 régule directement la myogénèse en ciblant directement les gènes des protéines rétinoblastomiques (RB). P73 serait également recruter dans la différenciation des cellule simmunitaires, en ciblant le gène Staf50, un interferon responsable de la différenciation des lymphocytes T (*Obad et al., 2004*). P73 serait également un acteur important dans le fonctionnement rénal en déclenchant la transcription de gènes codant pour des transporteurs d'eau et de glycérol, les aquaporines (*Zheng et al., 2001 ; Saifudeen et al., 2005*).

I-3.6 Nouvelles fonctions émergentes

Outre les précédentes fonctions, certaines récentes publications dégagent de nouvelles activités de p73 dans la cellule, telles que l'autophagie, le métabolisme et la maintenance de cellules souches. Il faut savoir que ses homologues, p53 et p63 ont déjà été reconnu comme impliqués dans ces processus.

Concernant l'autophagie, mécanisme catabolique cellulaire par les lysosomes, p73, tout comme p53, commence à être décrit comme inducteur. Le mécanisme précis reste encore inconnu. Toutefois, des protéines régulant la formation d'autophagosome, telles que ATG5, ATG7, UVRAG ont été caractérisées comme étant des gènes cibles de p73 (*Z.He et al., 2013*). D'ailleurs, l'impact de p73 dans l'autophagie serait régulé par une kinase inducteur du statut énergétique et oxydo-réducteur, M-TOR, qui inhiberait p73 (*Rosenbluth et al., 2009*). Une autre étude a montré que contrairement à p53, p73 n'induit pas l'autophagie via la transcription d'une protéine importante au lysosome, DRAM (*Crighton et al., 2007 ; Crighton et al., 2006*). Ces premiers résultats révèlent ainsi que p73 serait impliqué dans les mêmes mécanismes cellulaires que p53 mais en ayant des gènes cibles différents.

Des analyses transcriptomiques ont également montré l'implication de p73 dans le métabolisme. P73 encouragerait l'activité mitochondrial en favorisant l'accumulation des intermédiaires métaboliques du cycle de Krebs, en boostant l'homéostasie du glutathion (protégeant la cellule des radicaux libres). De plus, cette même équipe a montré que p73 modulerait le métabolisme lipidique en aidant à l'accumulation des chaînes longues d'acides gras (*D'alessandro et al., 2013*).

Additionnellement, p73 serait aussi recrutée dans la maintenance des cellules souches. Par exemple, il a été récemment démontré que p73 est important dans la spermatogénèse en régulant des gènes cruciaux des cellules progénitrices tel que CDKN2B. Ce travail a été confirmé aussi *in vivo* chez les souris p73 déficientes qui présentent aussi une altération dans la fertilité (*Inoue et al., 2014 ; Holembowski et al., 2014*).

Les phénotypes des souris transgéniques et l'implication de p73 dans le développement tumoral affirment l'importance des fonctions qu'assume ce facteur de transcription. Nous

avons ici constaté que les fonctions sont multiples en définissant par la même, p73 comme un facteur incontournable dans le destin cellulaire.

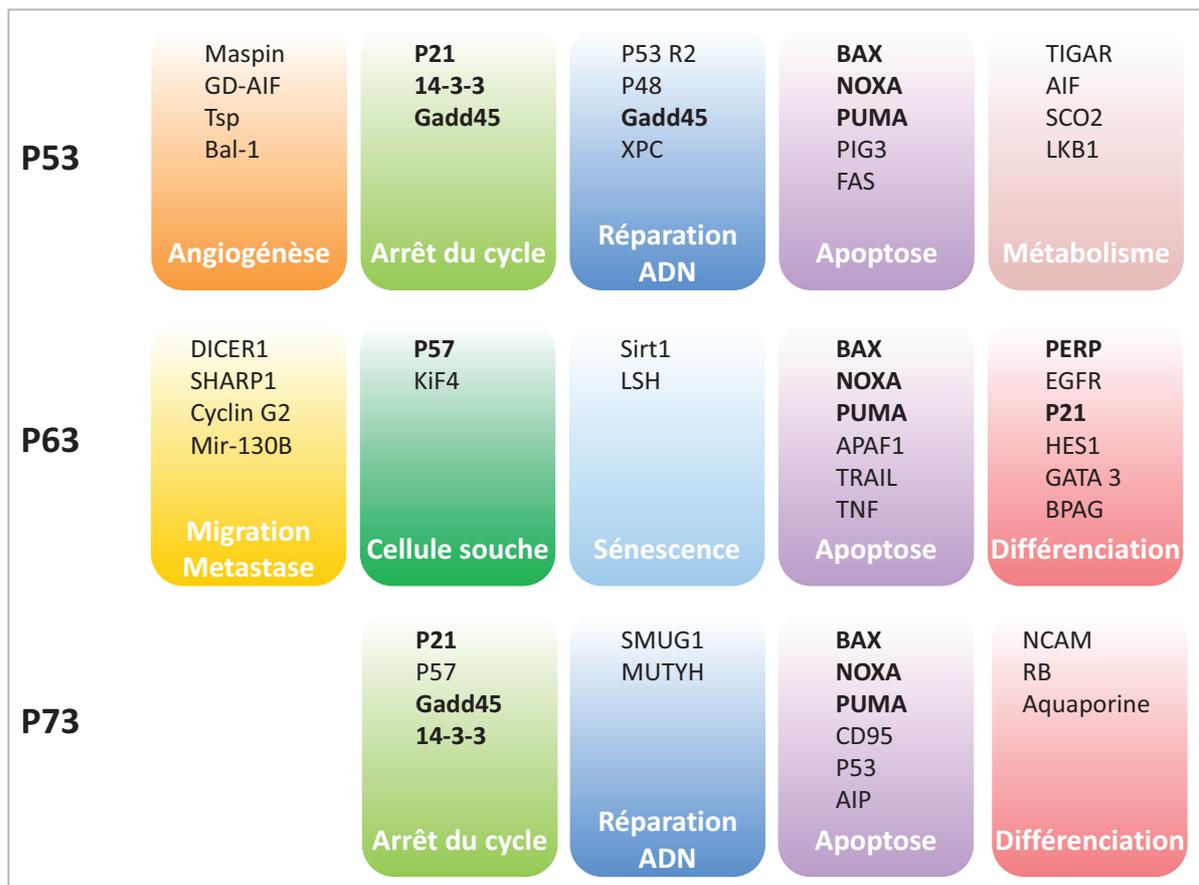


Figure 8|Fonctions et leurs gènes cibles de la famille p53

Les membres de la famille p53 sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires en activant la transcription de nombreux gènes cibles. Certains gènes (en gras) sont communs entre les membres (Classe 1) et d'autres sont spécifiques (Classe 2). Néanmoins, cette liste de gènes et les fonctions relevées pour la famille p53 sera amenée à se modifier et à évoluer (El-Deiry et al., 1992; Tokino & Nakamura, 2000 Vogelstein et al., 2000; Melino et al., 2002; Vousden & Lu, 2002; Vousden & Lu, 2002; Levine et al., 2006, Vousden et al, 2000).

Sous la houlette des deux groupes d'isoformes TA et ΔN , le cycle cellulaire, l'apoptose et la différenciation cellulaire sont subtilement contrôlés. Néanmoins, les études fonctionnelles de p53, l'homologue de la famille le plus étudié à ce jour, démontrent que le champ d'action est beaucoup plus vaste. En effet, le mécanisme d'angiogénèse (Bid, 2013), la régulation métabolique (Zhou et al., 2014), la maintenance des cellules souches (Hahn, 2014; Wirsching et al., 2014), la dissémination de métastases (Van den Top et al., 2014) ont été corrélés avec le niveau d'expression de p53. Parce que les précédentes études ont démontré un fort croisement entre les membres de la famille p53, je présage que le tableau

fonctionnel de p73 s'enrichisse dans l'avenir.

La régulation des mécanismes cellulaires repose sur une intéressante balance du niveau d'expression des différentes isoformes de p73. Au contraire de p53, le gène p73 est faiblement muté (1-2%) ce qui suggère que la dérégulation d'expression des isoformes réside dans une altération de la régulation du gène. Il est dorénavant intéressant de comprendre comment le gène p73 est régulé et identifier comment le ratio des isoformes TA et ΔN est contrôlé via les deux niveaux de régulation, transcriptionnelle et post-traductionnelle.

I-4. Régulations de la protéine p73

I-4.1 Régulation de p73 au niveau transcriptionnel

Alors que p53 est très peu régulé au niveau transcriptionnel, quelques études ont montré que p73 répond, quant à lui, à une régulation au niveau transcriptionnel par des oncogènes. La plupart des tumeurs humaines présentent une dérégulation de la famille des facteurs de transcription *E2F*. En effet, il a été démontré que la dérégulation de *E2F* entraînait la diminution de p73 (*Ozaki et al., 2009*). L'un des effets de l'altération d'*E2F* est la progression anormale du cycle cellulaire, contribuant à la progression tumorale. Le caractère apoptotique d'*E2F* réside dans sa capacité à activer p53 et p73 directement (*Stiewe et al., 2000*).

C-Myc et *E1A* ont été aussi identifiés comme inducteurs de la transcription de p73 et plus particulièrement de *TAp73*, *in vivo*, en déclenchant la mort des cellules tumorales par l'activation d'*E2F* (*Leone et al., 2001*). Néanmoins, l'interaction entre *C-Myc* et p73 est toujours controversée. L'équipe de Zaïka a montré que *C-Myc* induit et active p73 (*Zaïka et al., 2001*) alors qu'une autre publication (*Wanatabe et al., 2002*) démontre que *C-Myc* interagit avec p73 physiquement, mais inhibe son activité transcriptionnelle.

De manière surprenante, p53 et *TAp73* induisent tous les deux, $\Delta Np73$, créant ainsi une boucle auto-régulatrice et témoignant encore une fois des relations inter-membres complexes (*Fillopovich et al., 2001*).

En plus d'oncoprotéines, il a été montré que des protéines virales pouvaient également induire p73. La protéine adénovirale *E1A* et les protéines *TAX* des virus lymphotropiques des cellules T se lient au promoteur de p73 et l'inactivent. Toutefois d'autres protéines virales semblent activer p73, telles que l'antigène du virus simien SV40, la protéine *E6*

du papillomavirus et l'adénovirus E1B55 (*Dobbelstein et al., 1999; Roth et al., 1998; Higashino et al., 1998*).

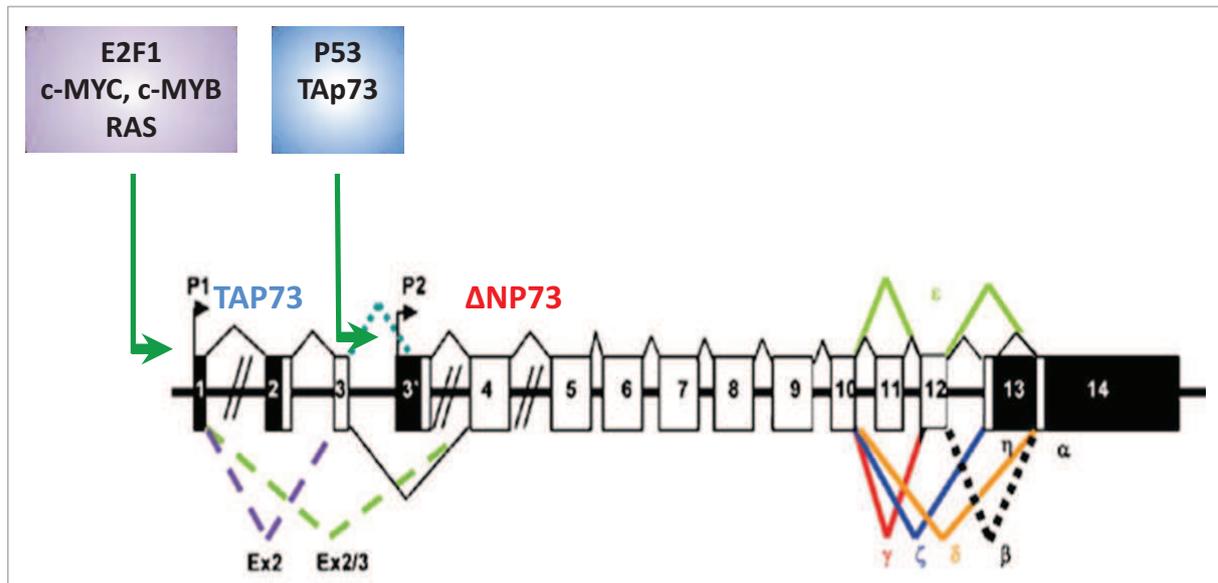


Figure 9 | Régulation transcriptionnelle des isoformes p73

TAp73 est transcrit par différents signaux, notamment E2F1, le signal le plus connu pour réguler l'expression de p73. Une boucle transcriptionnelle est présente sur ΔNp73, qui est positivement régulé par TAp73 et p53, qui sont décrits comme ayant des fonctions opposées à ΔNp73.

Bien que la régulation transcriptionnelle de p73 est existante, les nombreuses études concernant la régulation fonctionnelle de p73 ont montré que l'expression, la stabilité et la localisation subcellulaire de p73 sont régis par l'interaction avec d'autres protéines.

I-4.2 Régulation au niveau post-traductionnelle de p73

Comme p53, les activités de p73 sont aussi régulées par les modifications post-traductionnelles qu'elle subit. Alors que les recherches ont révélées un nombre de modifications colossal pour p53 (phosphorylation, ubiquitination, sumoylation, méthylation...) (*Kruse and Gu, 2008*), environs une centaine de sites de modifications, la régulation de p73 est peu connue.

L'activation et la stabilisation de p73, médiées par les stress génotoxiques sont en effet associées avec des modifications post-traductionnelles sur les sites N et C terminal de la séquence p73.

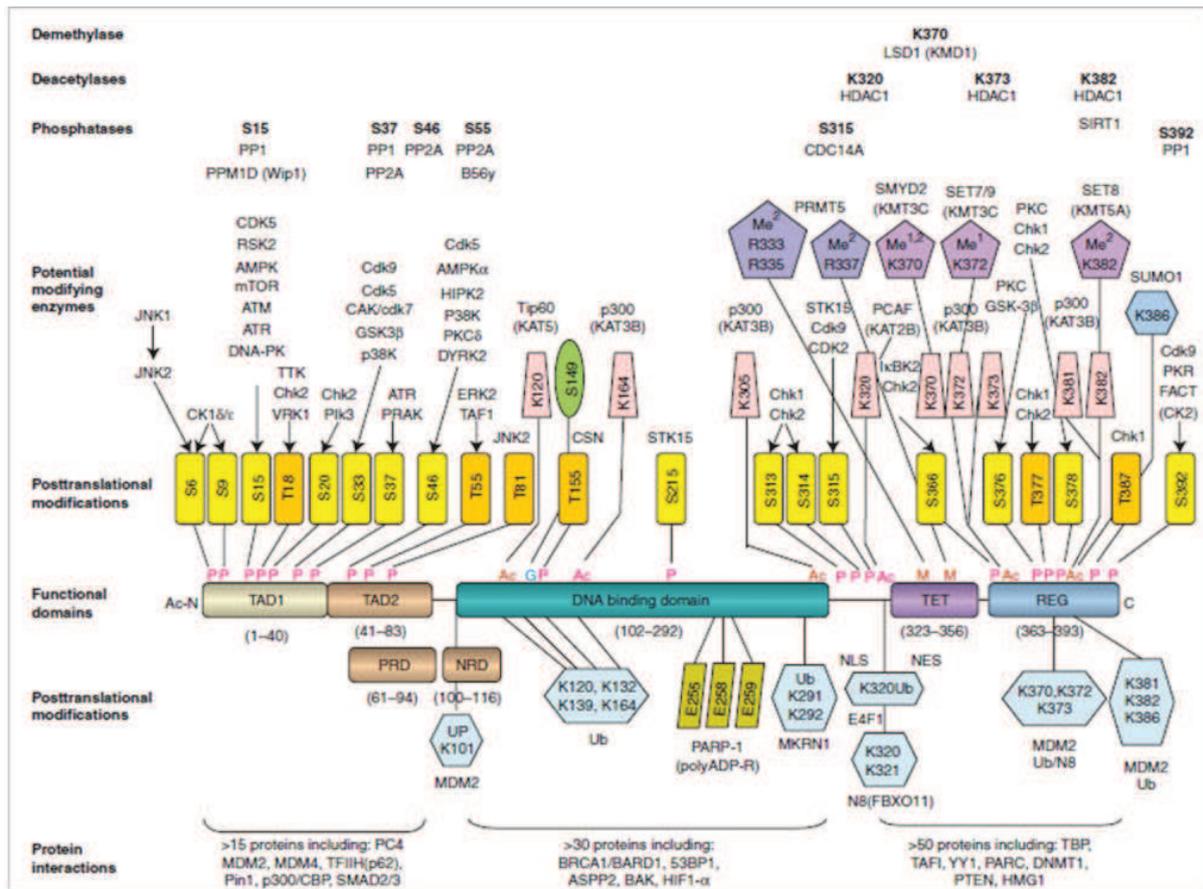


Figure 10 |Modifications post-traductionnelles connues de p53

Une centaine de modifications post-traductionnelles ont été caractérisées pour p53. Différents types de régulations existent : phosphorylation, méthylation, acétylation, neddylation... Elles ont des répercussions variées sur l'activation, la stabilité, la localisation, l'affinité avec des co-facteurs pour p53. Ces co-facteurs sont répertoriés en bas de la figure (Figure issue de la revue Cold Spring Harbor, Meek et al., 2009).

1-4.2.a Régulation du niveau protéique de p73

Le protéasome, lieu où se désagrège les protéines, assure en partie le turnover de p73 parce que les inhibiteurs de ce complexe stabilise les isoformes N et C terminales diffère modérément. Contrairement à p53, la dégradation de p73 n'est pas médiée par *MDM2*, protéine largement connue dans la régulation de la famille. En effet, la région conférant à la dégradation par *MDM2* (située 92-112 de p53) est absente sur p73 (*Gu et al., 2000*). Le signal par excellence pour la dégradation de protéine est la liaison d'une série d'une molécule, l'ubiquitine. L'ajout de l'ubiquitine est assuré par une famille de protéine, les ubiquitine ligases. La dégradation de p73 est médiée par la travail de ces ubiquitine ligases, tel que *Itch* qui s'y lie (*Rossi et al., 2005*). Un autre facteur rentre en scène, *Yap1*, concurrence la liaison d'*Itch* sur p73 et va ainsi prévenir la dégradation *Itch*

dépendante de p73. Mais d'autres molécules ont la capacité de favoriser la dégradation de p73. En effet, la protéine F-BOX est recrutée pour la dégradation protéasome dépendante. F-BOX a été identifiée comme se liant sur le motif SAM de p73 en encourageant son ubiquitinylation et sa dégradation *in vitro* et *in vivo*. FBOX se lie autant à TAp73 qu'à Δ Np73, ne discriminant pas les deux isoformes, contrairement à Itch (*Peschiaroli et al., 2009*).

Il est à noter que le niveau protéique peut être aussi régulé indépendamment de l'ubiquitinylation. La principale modification décrite pour p73 est la phosphorylation en TYR99 par la kinase c-Abl, qui augmente la demi-vie de p73 (*Gong et al., 1999 ; Yuan et al., 1999*). Cette phosphorylation va provoquer un changement de localisation subcellulaire de p73, l'adressant au noyau et ainsi se préservant de la dégradation par le protéasome.

I-4.2.b Régulation de l'activité transcriptionnelle de p73

Des précédents travaux de notre laboratoire ont démontré que la phosphorylation par les complexes cyclin/cdk sur p73 inhibe l'activité proapoptotique de p73 (*Gaiddon et al., 2003*). A l'opposé, la phosphorylation par les kinases ChK augmente son activité transcriptionnelle (*Gonzales et al., 2003*).

En plus des phosphorylations, il a été aussi prouvé que p73 est régulé via des acétylations. Les acétylations sur les résidus 321, 327 et 331 confèrent à celle-ci une spécificité dans les promoteurs des gènes cibles. En effet, p73 non acétylée est transcriptionnellement inactive pour les gènes pro-apoptotique (bax, p53 AIP1...) mais reste inductrice pour les gènes cibles du cycle cellulaire (p21) (*Zeng et al., 2000 ; Zeng et al., 2001*).

La liaison de molécules sur p73 peut également modifier l'activité transcriptionnelle de P73. En se liant au domaine de liaison de l'ADN (DBD), ASPP1 et ASPP2 stimule la fonction apoptotique de p73. En effet, cette interaction améliore la transcription sur les promoteurs de Bax, PIG3 et PUMA. La famille ASPP a été le premier activateur identifié pour p73 mais aussi pour les autres membres (*Bergamaschi et al., 2003*). Sa fonction régulatrice est telle que l'inhibiteur de cette famille (iASPP) fait partie des candidats sérieux pour le traitement contre les cancers.

Mentionné auparavant, p53 est aussi un régulateur de Δ Np73 au niveau transcriptionnel.

Néanmoins, il a été démontré que p53 ne peut pas se lier à p73, mais c'est la forme muté de p53 qui a la capacité d'interagir avec p73 et d'abolir sa fonction. L'hétérodimère p73-p53 muté bloque le processus apoptotique et celui-ci est responsable de la diminution observée sur la sensibilité à la chimiothérapie. (Di Como et al., 1999; Gaiddon et al., 2001).

De manière surprenante, l'ubiquitylation peut également modifier le potentiel transcriptionnel de p73. En effet, plutôt que d'aider à la dégradation de p73, l'ubiquitylation par NEDL2, une ubiquitine ligase, améliore son activité transcriptionnelle et apoptotique (Miyazaki et al., 2003). A contrario, d'autres ubiquitine ligases ont la capacité de diminuer l'activité transcriptionnelle tels que la protéine Pirh2 (Wu et al., 2011) et CDL4A. D'ailleurs, la CDL4A est impliquée dans de nombreux processus biologiques tel que la progression du cycle cellulaire. P73 interagit avec le complexe CDL4A entraînant une monoubiquitination. Cette modification n'affecte pas non plus la stabilité de p73 mais régule négativement l'activité transcriptionnelle de notre protéine d'intérêt. (Malatesta et al., 2013). Additionnellement, la protéine MDM2 régule aussi négativement l'activité transcriptionnelle de p73. Si celui-ci n'induit pas sa dégradation, il a tout de même la capacité à inhiber l'activité de p73 (Zeng et al., 1999).

A travers ce premier chapitre qui présente la structure, les fonctions et les régulations de p73, nous pouvons dès lors apprécier la place primordiale qu'occupe p73 dans les mécanismes régissant le destin cellulaire dans les contextes physiopathologiques. A contrario de p53, la régulation de p73 est encore peu connue. Nous allons voir plus en détails que p73 joue un rôle important dans le développement neuronal. C'est d'ailleurs dans ce contexte précis que nous avons voulu comprendre comment p73 s'intègre dans les signalisations fonctionnelles ou quels sont les mécanismes conduisant à l'altération de son expression dans les pathologies neuronales.

Pour identifier une nouvelle modification post-traductionnelle de p73, j'ai réalisé une étude bio-informatique via le site Scan site. Ce site prédit les modifications post-traductionnelles potentielles en fonction de la structure et la conformation spatiale de la protéine. Cette analyse a révélé de nombreuses modifications post-traductionnelles potentielles. Toutefois, dans notre contexte d'étude, qui concerne le système neuronal, nous nous sommes intéressés particulièrement à un effecteur, la calcium-calmoduline dépendante kinase

(CamK). Avant d'exposer nos résultats, permettez-moi de présenter d'abord cette kinase et de souligner les points communs entre p73 et la CamK.

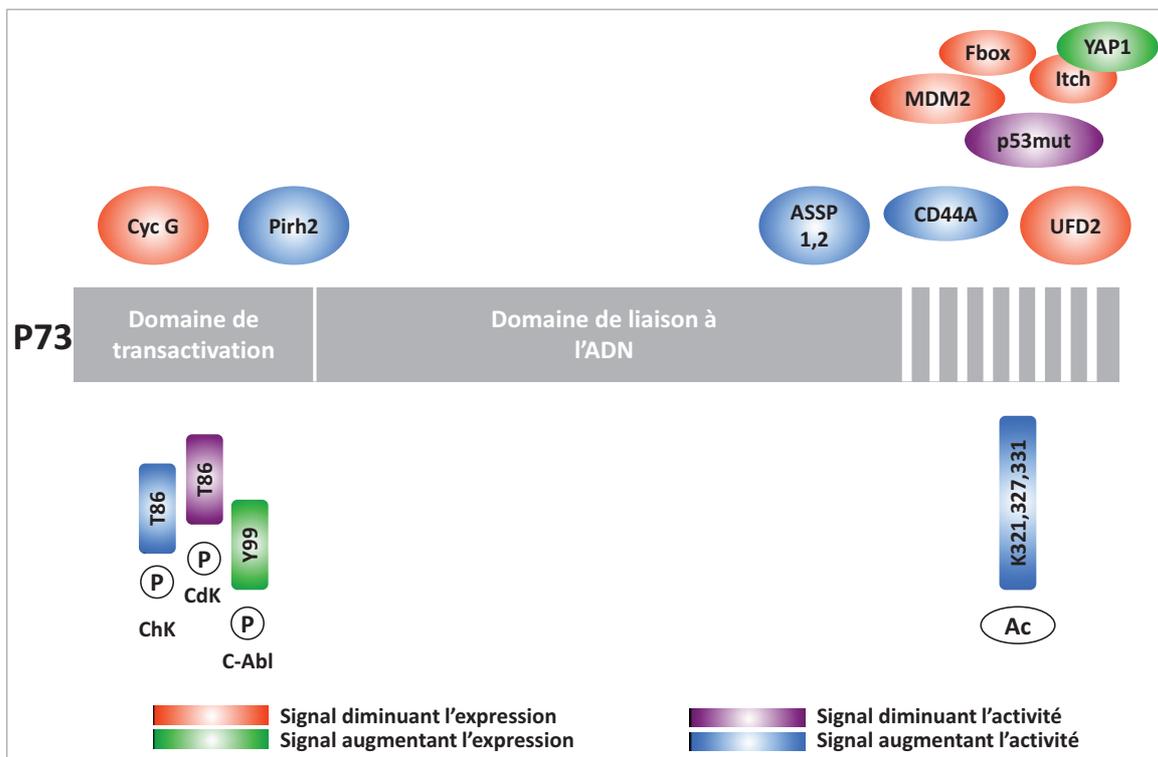


Figure 11|Modifications post-traductionnelles connues de p73.

Différentes modifications post-traductionnelles (figurant au bas) ont été caractérisées comme ayant des répercussions sur l'expression et l'activité de p73. Additionnellement, des protéines partenaires (figurant en haut) ont été identifiées comme régulateurs également de la stabilité et des fonctions de p73.

II- Les calcium-calmoduline dépendante kinases

II-1 Une nécessité lactée !

La concentration calcique intracellulaire est un substrat déterminant dans la régulation des événements cellulaires. En effet, l'ion calcium est le métal le plus abondant dans le corps humain (2% du poids total). Il joue un rôle dans la coagulation du sang, la contraction musculaire, la libération des neurotransmetteurs, la mobilité du cytosquelette ... (Tiens, on le regarde autrement ce verre de lait, qui nous attend au coin du bureau !) Même si le calcium est une vraie star dans l'histoire de la biologie, l'objet de ma thèse et ce manuscrit ne me permette pas d'en faire son apologie trop longuement, mais juste de prendre conscience qu'il est l'un des ligands importants pour l'activation du groupe de kinases qui nous intéresse : les Calcium calmodulines dépendantes kinases.

Le taux calcique, dont la valeur basal atteint 50nM, est finement régulé par une pléthore de pompes, canaux, échangeurs et peut augmenter jusqu'à 10uM pour stimuler de nombreuses voies de signalisations. Le calcium est également stocké dans certains organites cellulaires comme la mitochondrie ou le reticulum endoplasmique, conférant ainsi une régulation extrêmement pointue dans la cellule. Alors que l'augmentation prolongée du taux calcique entraîne la mort cellulaire, l'élévation calcique transitoire (de la milliseconde à la minute) déclenche de nombreux signaux différents, variants selon l'amplitude, la fréquence et la localisation du « putsch calcique ». (*Berridge and al., 2000*). Le signal calcique peut être intégré par de nombreuses protéines, notamment la calmoduline (CaM), une protéine ubiquitaire, ayant une structure particulière appelée EF Hand motif, qui va capter 4 ions calciques et moduler ainsi l'activité de nombreuses protéines (*Means and Dedman, 1980*). La calmoduline a une haute affinité et spécificité avec le calcium (Constante de dissociation $K_D \sim 0,5-5\mu\text{M}$).

Ce complexe calcium-calmoduline se lie à de nombreuses cibles, notamment la famille des SER/THR protéines kinases (CamKs), et régule ainsi leurs fonctions. La famille CamK, ubiquitaire mais particulièrement abondante dans le cerveau, est activée par le complexe calcium-calmoduline et module l'activité d'autres protéines en les phosphorylant. Elles renferment plusieurs kinases : CamKI, CamKII, CamKIII, CamKIV, CamKK et la kinase de la chaîne légère Myosine. (*Ryazanov and al., 1997 ; Mitsui et al., 1993*).

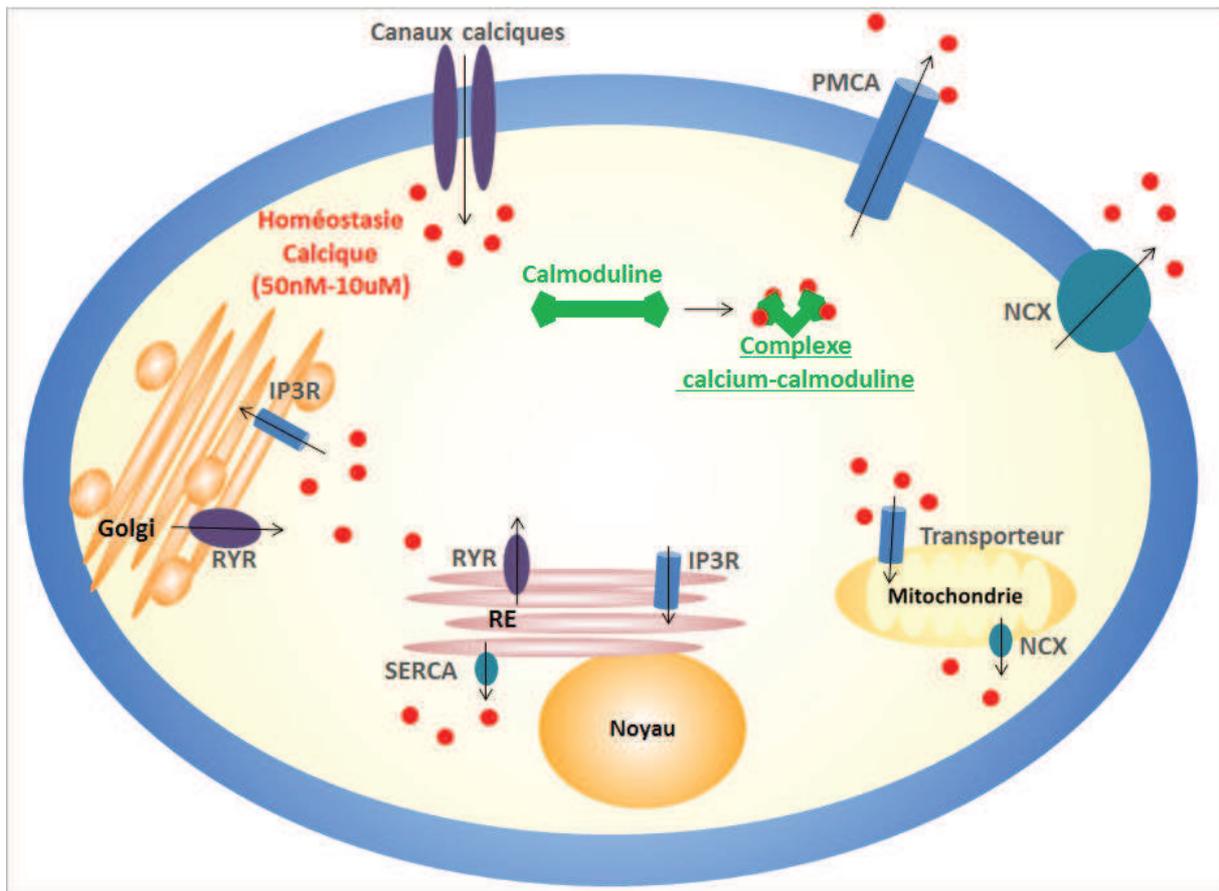


Figure 12|Complexe calcium-calmoduline et influx calcique cellulaire.

L'homéostasie calcique est contrôlée par de nombreuses pompes, canaux calciques, présentes sur différents organites tels que l'appareil de Golgi, le reticulum endoplasmique (RE) et la mitochondrie, mais aussi sur la membrane cytoplasmique. Les canaux IP3R, activés par l'IP3, les transporteurs, les pompes NCX, PMCA induisent la diminution calcique intracellulaire. A contrario, la concentration calcique est augmentée par l'influx via les récepteurs Ryanodine (RyR), la pompe SERCA, NCX et les canaux calciques membranaires. La concentration de calcium est libre est également contrôlé par des protéines pouvant lier le calcium, tel que la calmoduline. En liant 4 molécules calciques, elle va activer des protéines dépendantes de ce complexe (CamK).

II-2 Structure

La famille des CamK est divisée en deux groupes : les kinases qui ont un groupe de cible restreint, souvent unique (groupe kinase restrictif) et les kinases qui ont un panel de cibles très élargi (groupe kinase multifonctionnelle) (*Chow and Means, 2006*).

Le groupe de kinases restrictif est composé de deux kinases, la CamKIII et la kinase de la chaîne légère myosine. La CamKIII phosphorylerait à ce jour spécifiquement la kinase du facteur d'élongation 2 (eEF-2K), qui est impliqué dans la synthèse protéique (*Nairn et al., 1986 ; Palfrey et al., 1998*). L'autre kinase phosphoryle spécifiquement la chaîne

légère de la myosine II et participe ainsi à la contraction musculaire des muscles striés (*Kamm et al., 2001*).

Dans l'optique d'identifier de nouvelles modifications post-traductionnelles de p73, le groupe des kinases multifonctionnelles de la famille des CamK, nous intéresse davantage. Il se compose de la CamKI, la CamKII, la CamKIV et la CamKK. Nous avons vu que le nombre d'isoformes de p73 était vertigineux, mais ce n'est rien à côté de la famille des CamK ! Outre le fait que chaque kinase est codée par un gène différent, la complexité atteint son paroxysme lorsque l'on constate que chaque isoforme α , β , δ , γ ... sont codés par un gène différent (*Karls et al., 1992 ; Nghien et al., 1993*) dont les locus sont situés sur différents chromosomes ! Prenons pour exemple la CamKII, qui est composée de 4 groupes d'isoformes α , β , δ et γ , qui eux-mêmes renferment une dizaine d'izozymes (1,2 3...). Plus d'une quarantaine isoformes seraient à ce jour identifiées pour le CamKII. Le nombre d'isoformes possibles pour la CamKII et le fait que l'évolution multiplie les locus de ses gènes en empêchant au maximum sa délétion ou des mutations silencieuses présage que cette kinase joue des fonctions importantes dans la cellule.

Même si les gènes des différentes kinases et variants sont situés à différents endroits, leurs structures protéiques présentent des similitudes, excepté la CamKIII. En effet, leur sous unités de 50-60 kD sont organisées avec des domaines semblables et l'étude cristallographique de CamKI et CamKII soulignent leurs homologies structurelles (*Soderling and Stull, 2001; Rosenberg et al., 2005 ; Lisman et al., 2002*).

Leurs structures se composent de plusieurs domaines essentiels à leurs fonctions et régulations.

II-2.1 Domaine catalytique

Le domaine catalytique N-terminal contient des sites de liaison à l'ATP et au substrat (site s) ainsi que des sites d'interaction avec les protéines d'ancrage. Ce domaine garanti à lui seul l'activité de la kinase. En effet, les variants tronqués en C-terminale, ne possédant pas la domaine d'auto-inhibition, sont constitutivement active (*Hudmon et al., 2002*).

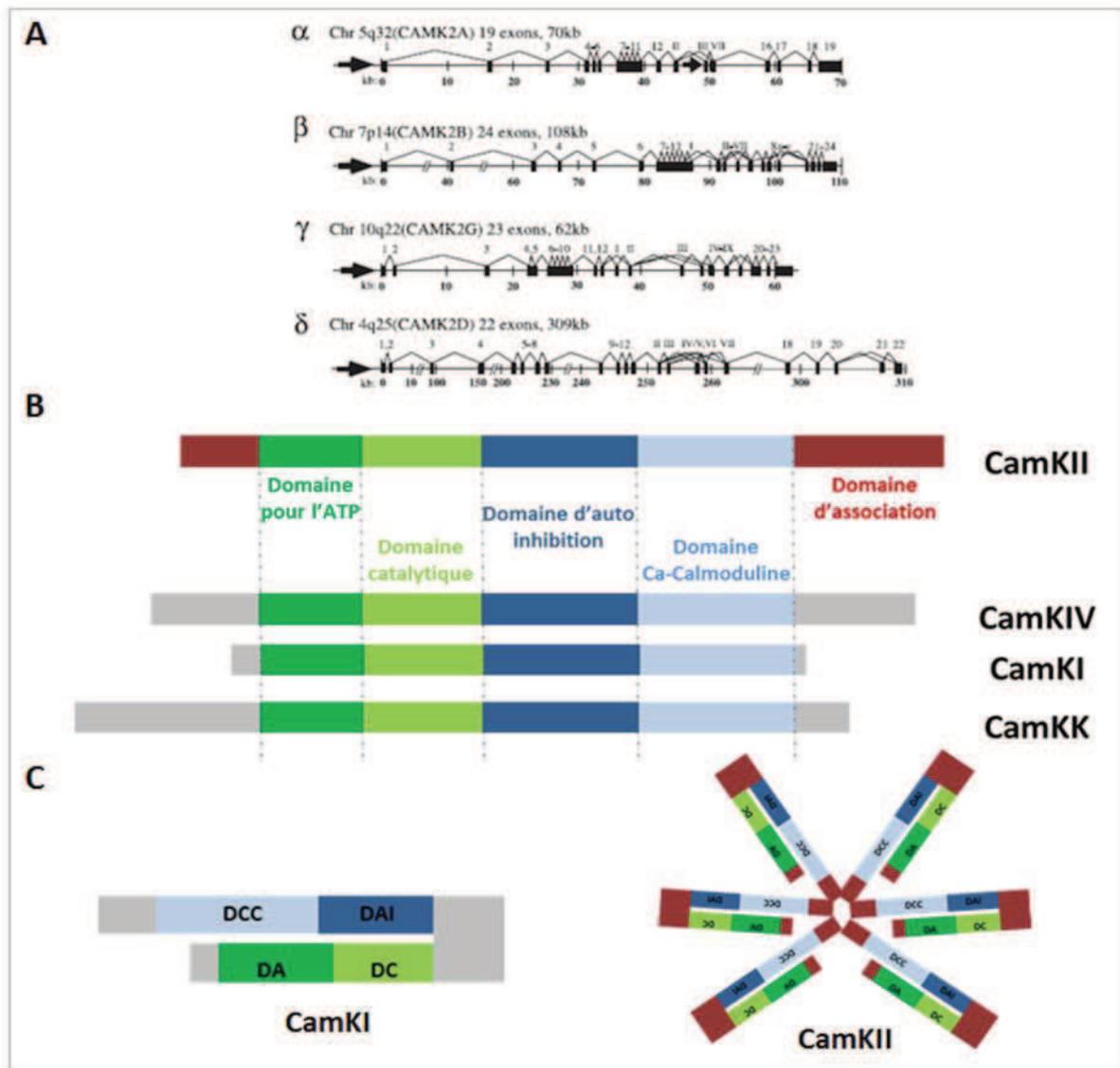


Figure 13|Familles des CamK, structure génomique et protéique.

A. Structure des gènes humains des isoformes de la CamKII avec les différents variants possibles par épissage alternatif.

B. La structure protéique des CamK contient des domaines communs important pour l'activation et l'association (CamKII) des CamK.

C. La CamKII a la particularité de former des complexes doubles hexamériques alors que les autres kinases sont monomériques

II-2.2 Domaine d'auto-inhibition

Ce domaine est composé de deux parties : le sous domaine d'inhibition et le sous domaine de liaison au complexe calcium-calmoduline. Par la conformation structurelle de la protéine, le sous-domaine d'inhibition est positionné en face du domaine catalytique empêchant son activité et se lie au site s. Cette liaison peut-être rompue par l'intervention du complexe calcium-calmoduline, qui s'attache au sous domaine

correspondant. Cette liaison entraîne la trans-conformation de la protéine, et libère ainsi le domaine catalytique, notamment des acides aminés qui vont être phosphorylés pour activer la CamK. On constate d'ores et déjà que par la simple structure, la régulation de l'activité de ces kinases est fine et appelle à de nombreux mécanismes moléculaires (*Yang et al., 1999 ; Miller et al., 1986*).

II-2.3 Domaine d'association

La CamKII a pour particularité de posséder un autre domaine dans sa structure : le domaine d'association. Celui-ci confère à la protéine la possibilité de s'agréger avec d'autres holoenzymes, sous forme de douze unités. Cette région C-terminale est séparée par les deux autres domaines par un domaine variable, qui est grandement responsable de la différence structurale entre les isoformes. Cette séquence entre 9-120 acides aminés varie par l'épissage alternatif. Elle peut influencer directement l'affinité avec la protéine cible de la kinase et modifier la sensibilité de la kinase au complexe calcium-calmoduline (*Lisman et al., 2002, Hoch et al., 1998 ; Schworer et al., 1993*).

Après avoir découvert la grande variété d'enzymes de la famille des CamK, il est dorénavant intéressant de comprendre dans quels mécanismes cellulaires ces kinases sont impliquées. La variabilité présage tout de même que l'évolution encourage leurs activités et limite la dérégulation de celles-ci par les différents gènes et mécanismes de régulations.

II-3. Fonctions et pathologies associées

Un nombre considérable de pathologies (des cancers, aux dysfonctionnements neuronaux en passant par des désordres immunologiques) sont causés par le changement du taux calcique intracellulaire perturbant ainsi les voies de signalisations associées. Par conséquent, comme le calcium est le substrat permettant l'activité de la CamK, on peut s'interroger sur l'implication des kinases multifonctionnelles de la famille CamK, dans les fonctions physiologiques et les pathologies associées. Il est ainsi déjà pertinent de connaître le profil d'expression des CamK multifonctionnelles.

II-3.1 Profil d'expression des CamK multifonctionnelles

Ces kinases multifonctionnelles sont répertoriés en deux sous-groupes, en rapport à leurs fonctions et leurs régulations : la sous-famille CamKK (CamKK1, CamKK2, CamKI

et CamKIV) et la CamKII. Leurs expressions diffèrent en fonction des variants.

Concernant la sous famille CamKK, les kinases sont principalement cytoplasmiques mais peuvent se retrouver dans le noyau de certaines cellules grâce à la présence d'un signal d'adressage vers le noyau (*Sakagami et al., 2000*). Au niveau systémique, les CamKK ont été détectés dans le cerveau (dont l'expression varie en fonction des régions), le thymus, la rate et les poumons (*Tokumitsu et al., 1995 ; Vinet et al., 2003*). La CamKI est quant à elle, exprimée dans l'hippocampe, le cortex frontal, l'hypothalamus mais aussi dans d'autres organes tels que le muscle strié et lisse, le pancréas, le foie et la rate (*Piciotto et al., 1995 ; Gardner et al., 2000*). La CamKIV a été pour l'instant détectée aussi dans le cerveau et les organes génitaux (*Sakagami et al., 1999*).

Concernant la CamKII, beaucoup d'études ont été faites sur cette kinase. De par la multitude d'isoformes (une quarantaine), on peut aisément imaginer la richesse bibliographique ! Succinctement, la CamKII est exprimée dans différentes régions corticales (cervelet, striatum, cortex frontal, hippocampe, hypothalamus) (*Miller and Kennedy, 1985 ; Takeuchi et al., 2002 ; Takeuchi et al., 2000*), dans le muscle squelettique et cardiaque (*Bayer et al., 1996, 1998 ; Takeuchi and Fujisawa, 1997*), dans le petit intestin (*Tobimatsu and Fujisawa, 1989*) et les cellules endocrines (*Rochlitz et al., 2000*). Elle est localisée au niveau du cytoplasme mais peut également être adressé dans le noyau pour moduler d'ailleurs la transcription de certains gènes.

Ces études de profil d'expressions reposent principalement sur l'étude d'expression des ARNm des différents variants. Il y a très peu d'approches immunohistologiques qui ont été réalisées car les anticorps ne couvrent pas toutes les isoformes et la question de leur spécificité reste en suspens.

II-3.2 Fonctions des CamK

Les CamK sont extrêmement bien connus dans le domaine des neurosciences. En effet, beaucoup d'études ont révélés que les CamK jouaient un rôle important dans le développement et la physiologie du système neuronal. Ce point commun avec p73 sera développé plus précisément à la troisième partie de l'introduction. Mais à côté de ces fonctions neuronales, les CamK sont impliquées dans d'autres mécanismes et associées à de nombreuses pathologies.

II-3.2.a CamK, Cycle cellulaire et cancers

Il y a une compilation de preuves qui montre que les CamK sont importants dans la régulation du cycle cellulaire (*Kahl and Means, 2003*), notamment la régulation de la transition G2/M par la CamKII. En effet, en surexprimant la CamKII constitutivement active, les cellules murines étaient bloquées en G2. Cette observation a été également répétée sur les cellules HeLa (*Planas-Silva and Means, 1992 ; Beaman et al., 2003*). Additionnellement, la sous-famille CamKK a été également identifiée comme importante pour le cycle cellulaire et impliquée pour le passage en G1 des cellules. Le mécanisme précis n'est pas encore élucidé mais il est déjà connu que la CamKI est nécessaire pour activer l'assemblage du complexe cyclineD/cdk4 (*Kahl and Means, 2004*). La dérégulation du cycle cellulaire est l'un des mécanismes responsable de la tumorigénèse. Une autre caractéristique des cellules cancéreuses est la diminution de la susceptibilité des cellules à déclencher les mécanismes apoptotiques. Il y a quelques études qui ont montré l'implication des CamK à l'activation des signaux apoptotiques. Les souris déficientes CamKIV présentent un nombre diminué de cellules souches hématopoïétiques et les cellules granulaires du cervelet, due à l'augmentation de l'activité apoptotique (*Kitsos et al., 2005*). Ainsi la CamKIV favorise la survie cellulaire. D'ailleurs de nombreuses études ont pu caractériser la régulation de l'apoptose par les CamK. En effet, l'équipe de Greenberg ont démontré que la CamKII est pro apoptotique alors que la CamKIV favorise la survie cellulaire (*Finkbeiner et al., 1997 ; Miranti et al., 1995*).

De par leur étroite relation avec la régulation du cycle cellulaire, les CamK ont été vite associés aux cancers. Par exemple, l'activation de la signalisation des CamK par l'entrée massive de calcique via un canal calcique spécifique *ANO1* encourage la progression tumorale dans le cancer du sein (*Britschgi et al., 2013*). D'autres chercheurs vont même plus loin en présentant les CamK comme une cible thérapeutique intéressante pour diminuer la progression tumorale des carcinomes de l'endomètre (*Takai et al., 2009*). L'équipe de Krystal aurait même identifié des variants de CamKII spécifiques aux cellules neuronales cancéreuses et souligné l'absence d'autres variants de la CamKII, qui pourraient participer à la croissance cellulaire et au phénotype tumorale (*Tombes et al., 1997*).

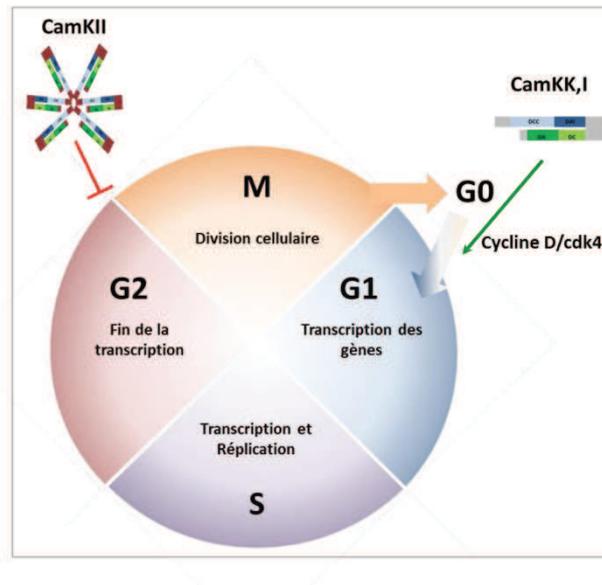


Figure 14|Régulation du cycle cellulaire par les CamK.

La CamKII serait connue comme bloqueur pour les cellules en phase G2. A contrario, l'autre sous-famille des CamKK favoriserait l'entrée des cellules en G1 en stabilisant le complexe cycline D/cdk4.

II-3.2.b CamK et le système immunitaire

Les études *in vitro* et *in vivo* des souris transgéniques ont montré que les CamK étaient importantes dans le système immunitaire notamment dans le développement embryonnaire du thymus, lieu de production des cellules lymphocytes T (Krebs et al., 1997). Il a été également montré que les CamK, notamment la CamKIV participait à la réponse inflammatoire en activant des facteurs de transcription importants pour la différenciation hématopoïétique tels que CREB et MEF-2, générant la production d'interleukines (Blaeser et al., 2000 ; Ho et al., 1996). Cela fait qu'une vingtaine d'années que les CamK sont associées à la différenciation des cellules immunitaires, et très peu de choses sont encore connues. Personnellement, au vue des nombreux articles soulignant l'importance du calcium et de la calmoduline dans le développement immunitaire et des fines corrélations faites entre différentes maladies immunitaires (leucémies lymphatiques, agranulocytoses et autres maladies auto-immunes...), il serait intéressant de rechercher si les CamK pourraient jouer un rôle dans les dérégulations de ces maladies.

II-3.2.c CamK et contraction musculaire

Parce que le calcium est un second messager essentiel pour la contraction musculaire, il était intéressant d'identifier si les CamK étaient recrutées dans le processus couplé excitation-contraction (ECC). Les CamK ont été vite associées aux maladies cardiaques. En effet, la CamKII, isoforme prédominante dans le muscle cardiaque, phosphoryle des canaux calciques, induisant ainsi la libération calcique des stocks intracellulaires du reticulum sarcoplasmique, qui entraîne le glissement des fibres actine-myosine (Maier et al., 2002 ; Hook et al., 2001). Par ailleurs, il a été observé dans le myocarde de patients ayant eu un accident cardiaque présente une expression et une activité de la CamKII proportionnelle à la sévérité du problème cardiaque. Il semblerait que la CamKII jouerait un rôle compensatoire (Kirchhefer et al., 1999 ; Hoch et al., 1999). D'ailleurs, les souris déficiente d'une isoforme de la CamKII présente de sévères dysfonctionnement contractils et des problèmes cardiaques (Zhang et al., 2004). Au-delà de la contraction cardiaque, certaines évidences ont montré l'implication des CamK dans la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires et joueraient un rôle dans l'hypertension (Bouallegue et al., 2007 ; McKinsey et al., 2007). D'autres chercheurs ont également montré l'implication des CamK dans un autre type de muscle, les cellules musculaires squelettiques. En effet, il a été démontré que les CamKII et CamKIV jouent un rôle dans la biogénèse mitochondriale et l'expression des protéines myofibrillaire. D'ailleurs il a été observé que l'expression de ces deux kinases diminuaient lors de l'atrophie musculaire, associée à différentes pathologies (Zuloaga et al., 2013).

II-3.2.d CamK, et le métabolisme

Ces dernières années, une autre corde à l'arc des fonctions des CamK s'est rajoutée. Parce que la CamKII et la CamKIV régulent deux protéines importantes dans le méabolisme énergétique, notamment l'assimilation des acides gras, l'AMPK (protéine kinase activé par l'AMP) et le transporteur de glucose 4, GLUT-4. Il semblerait que les CamK auraient la capacité d'augmenter la conversion des acides gras saturés en acides gras mono insaturés. Certaines études vont même plus loin, en présageant que ces kinases seraient des cibles intéressantes pour traiter le diabète, où l'assimilation des acides gras saturés est dérégulée (Mukwevho et al., 2014 ; Persaud et al., 2011). Néanmoins, cet aspect fonctionnel pour les CamK reste encore à être précisément

identifier même si une étude a déjà révélée que ces kinases réguleraient en partie une hormone décisif dans le métabolisme énergétique, l'insuline (Melloul et al., 2002).

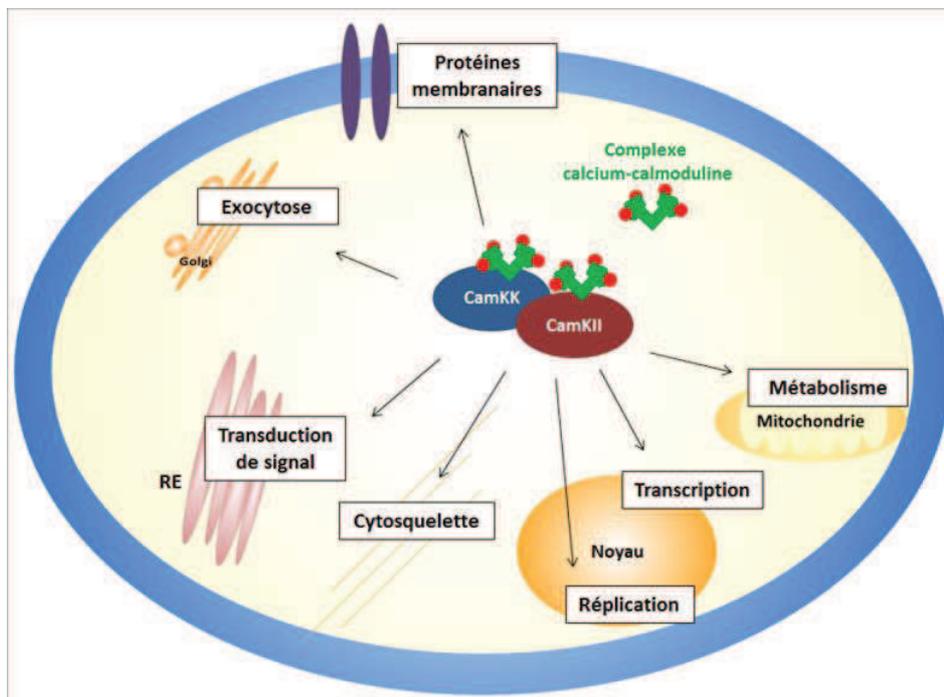


Figure 15|Fonctions principales des CamKs.

Les CamK, activées par le complexe calcium-calmoduline sont impliquées dans de nombreux évènements cellulaires différents (la survie/apoptose, la différenciation) en phosphorylant des protéines recrutées dans la réplication, métabolisme, exocytose...

Du fait que les CamK sont activées par le calcium, on pouvait aisément imaginer qu'elles pouvaient être assimilées à de nombreux évènements cellulaires physiologiques et être corrélées à un large spectre de pathologies. Toutefois, il est à considérer que l'étude de ces kinases est loin d'être une chose aisée, pour plusieurs raisons.

Premièrement, nous avons identifié la famille des isoformes de p73 comme un casse-tête chinois...mais après la brève description de la grande complexité de la famille des CamK, on peut positionner les CamK comme la championne de toute catégorie !

Deuxièmement, les outils permettant d'élucider les fonctions des CamK ne sont pas nombreuses et sont encore sujet à discussion et font même l'objet de revue (Wayman et al., 2011). Les approches utilisant des inhibiteurs pharmacologiques, des transfections des constructions active ou négatives de ces kinases...ont leurs limites et poussent les chercheurs à combiner plusieurs approches afin d'élucider les rôles de ces kinases. Sans compter que la spécificité des anticorps des CamK reste une énigme et qui a développé

un certain agacement personnel en cherchant en vain, le nom des anticorps utilisés dans des westerns blots publiés montrant l'expression de ces kinases.

Néanmoins, cela n'a pas entravé à comprendre le mécanisme d'activation des CamK et la régulation de son activité, que nous allons évoquer dès à présent.

II-4. Régulations

Nous allons voir ici que les CamK ont plusieurs niveaux de régulation. Outre les régulations dites classiques, transcriptionnelle et post-traductionnelle, les CamK présentent une fine régulation dans leurs activations propres. Nous avons d'ores et déjà apprécié la structure de ces kinases et évoqué un domaine d'auto-inhibition et d'association présageant une activation coordonnée.

II-4.1. Activation

Au sein des CamK multifonctionnelles, deux sous catégories ont été identifiées : la CamKII et la cascade des CamKK. Ses deux groupes présentent une activation spécifique.

II-4.1.a Activation de la CamKII

La CamKII, de par son domaine d'association, est arrangée sous forme hexamérique, formée par 6-8 couples de monomères auto-inhibées. L'activation de la CamKII par le complexe calcium-calmoduline dépend de la fréquence de libération du calcium intracellulaire (*De Koninck et al., 1998*).

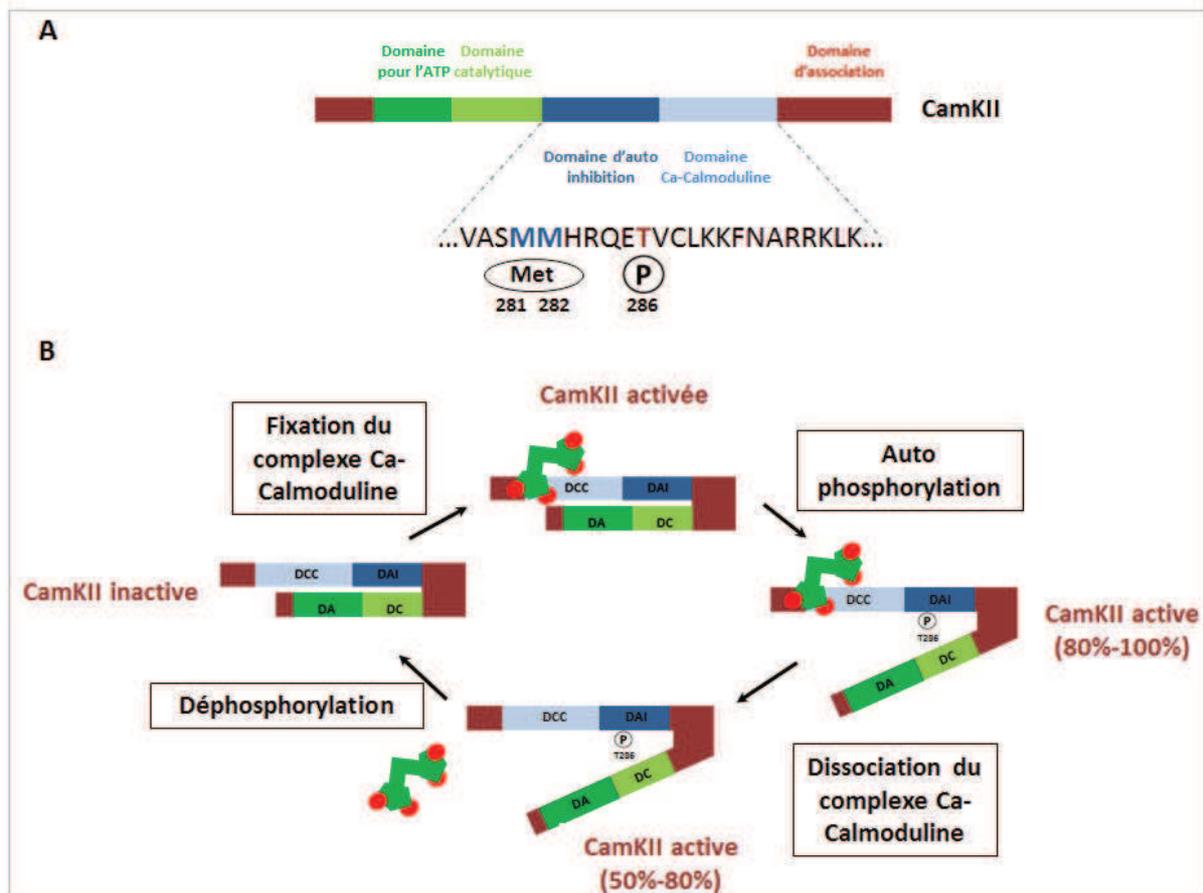


Figure 16|Cascade d'activation de la CamKII

A. Le domaine de régulation (auto-inhibition et liaison au complexe calcium-calmoduline) contient 3 sites importants, T286 pour l'autophosphorylation et les M281 et M282 qui méthylées vont permettre une activation de la CamKII indépendamment du complexe. B. La liaison du complexe à la CamKII déclenche l'autophosphorylation, qui va activer pleinement la CamKII. La CamKII reste active tant que T286 est phosphorylée indépendamment de la dissociation du complexe.

La fixation du couple calcium-calmoduline sur le domaine d'auto-inhibition va entraîner le changement de conformation de la kinase, qui va libérer la Thréonine 286 et permettre son autophosphorylation ou d'être phosphorylée par une sous unité voisine. La phosphorylation de T286 a deux effets importants : l'augmentation de l'affinité du complexe calcium-calmoduline avec la CamKII de 1000 fois (*Meyer et al., 1992*) et la libération du domaine catalytique de la kinase (*Lai et al., 1987*). A ce stade, la kinase est pleinement active, par la liaison du complexe calcium-calmoduline et de la phosphorylation de T286, qui lève l'auto inhibition.

Des expériences biochimiques ont révélées que la kinase est toujours active, lorsque le couple calcium-calmoduline se dissocie. L'activation calcium-calmoduline indépendante

de la CamKII permet ainsi une longévité d'action plus grande de la kinase dans les évènements cellulaires. C'est l'hydrolyse du groupement phosphate du domaine d'auto-inhibition par la protéine phosphatase 1 qui inactivera de nouveau la CamKII et entraînera son changement de conformation (*Stack et al., 1997*).

Cependant, d'après l'équipe de K. Bayer, cette inactivation n'est pas immédiate dans les neurones. Ils ont montré que la CamKII reste active de manière autonome sans phosphorylation de la T286 (25%) (*Coultrap et al., 2010*). Par cette caractéristique, la CamKII se voit attribuer le surnom de « molécule de mémoire » (*Hudmon et al., 2002 ; Coultrap et Bayer, 2012*).

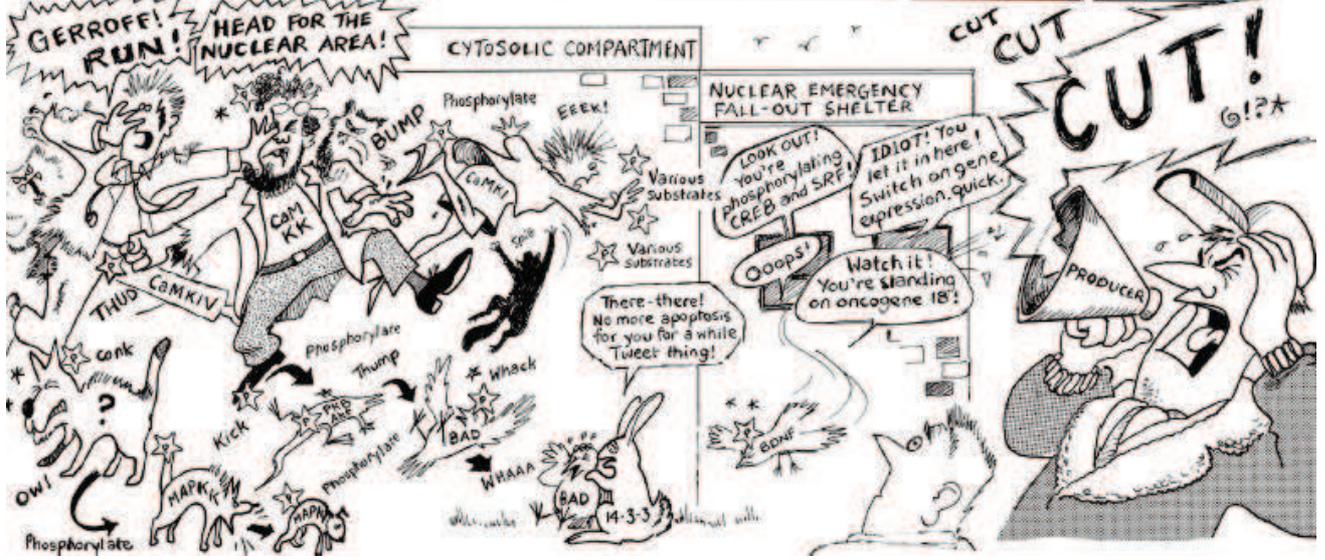
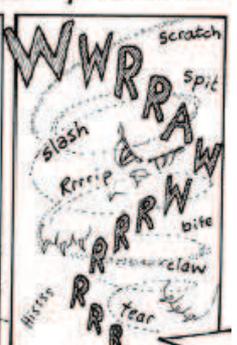
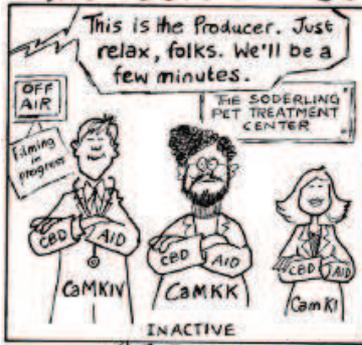
Néanmoins, il est à noter que deux acides aminés ont été identifiées comme ayant la possibilité de contrecarrer ce type d'activation (*Erickson et al., 2008 ; Rellos et al., 2010*). En effet, lorsque les deux méthionines 281 et 282 sont oxydées, la CamKII s'active de manière autonome, sans la nécessité du complexe calcium-calmoduline et l'autophosphorylation de la T286.

L'activation de la CamKII reste encore une question ouverte, et de nombreuses publications démontrent que cette molécule de mémoire renferme plusieurs interrupteurs ! On comprend ainsi plus largement les limites des outils pharmacologiques dits inhibiteurs de la CamKII. Par exemple, l'inhibiteur KN-93 rentre en compétition avec la fixation de la calmoduline sur la CamKII (*Hudmon et al., 2002*). Mais, nous venons de voir que la CamKII peut-être active sans ce complexe, ce qui limite ainsi l'effet inhibiteur de KN-93. De plus, des modèles d'études basées sur la cristallographie prédisent que la phosphorylation entre les sous unités de l'hexamère n'est pas faite de manière hasardeuse, mais coïnciderait avec des modifications post-traductionnelles des sous-unités voisines (*Chao et al., 2010*). Ceci suggère que l'activité de chaque monomère dépend également des modifications de toute la structure hexamérique...le casse-tête chinois CamKII se dessine de plus en plus...

II-4.1.b Activation de la CAMKK cascade

Après cet exercice cognitif aux nombreux rebondissements, place à une petite récréation...Il était impossible de ne pas vous faire partager une découverte bibliographique, (qui m'a beaucoup amusé) illustrant l'activation de la sous-famille CamKK : la bande dessinée de Thomas Soderling (*Soderling, 1999*) !

The Calcium-Calmodulin Catscade - A Soderling-TIBS-TAB coproduction



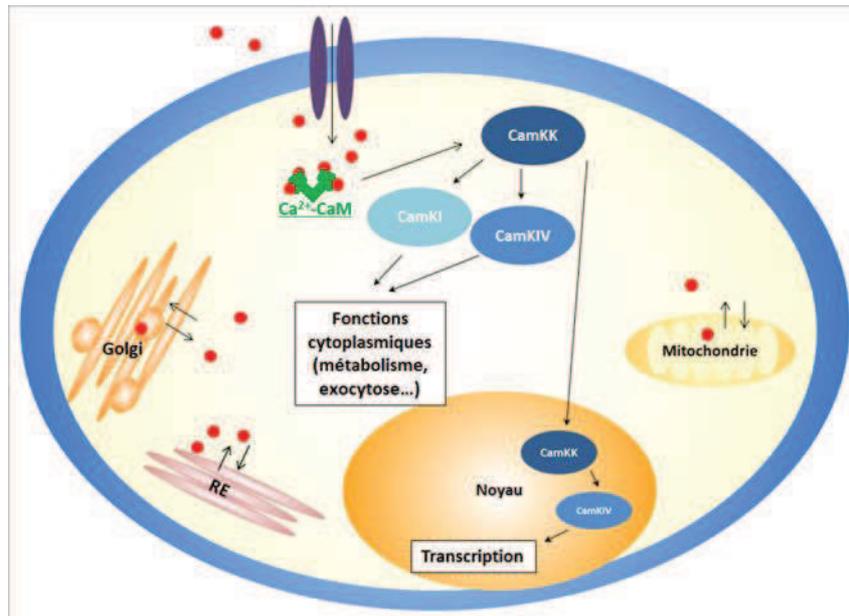


Figure 17|Activation de la cascade CamKK

Le sous-groupe CamKK se compose de CamKK qui va activer les CamKI et CamKIV dans le cytoplasme et le noyau, induisant la phosphorylation des protéines cibles impliquées dans le métabolisme, l'exocytose, la motilité du cytosquelette, la transcription de gènes.

Les membres de la cascade CamKK (CamKKs, CamKI et CamKIV) sont monomériques et mise à part l'activation par le complexe calcium-calmoduline, elles montrent une régulation de phosphorylation très différente par rapport à la CamKII. Ces kinases ont une boucle d'activation, absente pour la CamKII. La liaison du complexe calcium-calmoduline sur CamKI et CamKIV expose le site d'activation pour la CamKK, qui est elle-même activée par le complexe calcium-calmoduline. La phosphorylation par la CamKK accroît l'activation de la CamKI et CamKIV (T196) par le complexe calcique. Dans les neurones, l'activation de CamKIV par la CamKK est extrêmement transitoire, de l'ordre de quelques minutes (*Kasahara et al., 2001 ; Uezu et al. 2002*), alors que pour la CamKI, elle peut persister plusieurs heures (*Schmitt et al., 2005*).

II-4.2. Régulation post-traductionnelle

Comme évoqué un peu plus haut, les CamK subissent également des modifications post-traductionnelles, qui vont régir leurs activités kinase. La plus célèbre est la phosphorylation concernant le site d'auto-inhibition, qui va entraîner un changement de

conformation et l'activation du domaine catalytique. Néanmoins d'autres types de modifications post-traductionnelles ont été identifiés et d'ailleurs corrélées avec différentes pathologies.

Par exemple, l'hyperglycémie présente dans le diabète entraîne la glycosylation de la CamKII, qui va lever l'inhibition du domaine catalytique (Zou et al., 2012 ; Erickson et al., 2013). Par ailleurs, le stress oxydatif suite à des perturbations cardiaques entraîne dans les cellules musculaires cardiaques une oxydation de la CamKII par les ROS, qui va compenser la contraction irrégulière (Luczak et al., 2014 ; Guo et al., 2014). Durant ces dix dernières années, d'autres types de modifications ont été identifiées, mais j'imagine aisément que beaucoup de choses restent à découvrir dans la régulation de ces kinases. Toutefois d'autres évidences ont montré l'importance de la régulation post-traductionnelle de la CamKIV dans le développement de pathologie. La glycoNacylation de la CamKIV, a été également caractérisée comme importante pour réguler l'activité de celle-ci. La maladie d'Alzheimer a pour caractéristique métabolique de présenter un défaut d'assimilation du glucose. Ce défaut, dans les neurones, va diminuer la glycoNacylation de la CamKIV, qui voit alors son effet neuro-protecteur diminué, en ne phosphorylant plus les gènes cibles concernés. Ce mécanisme semblerait participer à l'apoptose neuronale observée dans la maladie d'Alzheimer (Dias et al., 2009).

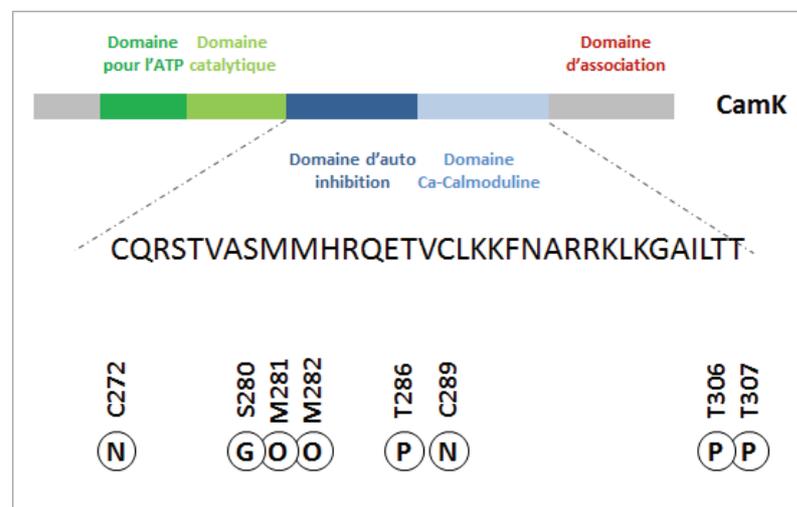


Figure 18|Modifications post-traductionnelles de CamK

Plusieurs types de modifications post-traductionnelles (N pour Nacétylation, G pour glycosylation, O pour oxydation, P pour phosphorylation) ont été caractérisés sur les domaines d'auto-inhibition et de liaison au complexe calcium-calmoduline. Celles-ci entraînent soit un changement d'affinité du complexe soit dans l'activité kinase.

Par ce chapitre, nous avons constaté que la famille des Camk jouent des rôles diverses mais importants dans la cellule. Leurs activités varient selon la fréquence et le taux calcique intracellulaire, « second messenger phare » de la cellule pour de nombreux mécanismes tels que la survie, la différenciation, le métabolisme, l'apoptose... Bien que tous les membres de la famille des CamK sont des SER/THR kinases, leurs régulations et leurs protéines cibles sont différentes. L'étude de cette famille est complexe et cette introduction n'aura présenté que succinctement les connaissances et esquissé les enjeux actuels. Il va sans dire, que ce domaine a encore beaucoup de part d'ombres mais on pressent aisément dans les récentes publications, que ces kinases joueraient des rôles importants dans différentes pathologies cardiaques, métaboliques et neuronales. La compréhension de leurs activations et de leurs régulations est un « défi princier » pour pouvoir déterminer si ces kinases sont une cible thérapeutique pertinente.

III- Analogies entre p73 et les CamK dans le système neuronal

Mon projet de recherche, qui consiste à identifier une nouvelle modification post-traductionnelle de p73, nous a conduits, par l'analyse bio-informatique, à étudier les fonctions et régulations d'une famille de kinase, les CamK. En effet, l'analyse bio-informatique prédit trois potentielles phosphorylations de p73 par la CamKII. Néanmoins, pour saisir pleinement les raisons de mon intérêt sur cette kinase, il était nécessaire d'octroyer un chapitre entier sur les concordances biologiques entre p73 et les CamK.

Comme évoqué précédemment, les souris p73 déficientes présentent une altération spécifique, une perturbation du développement de l'hippocampe (*Yang et al., 2000*).

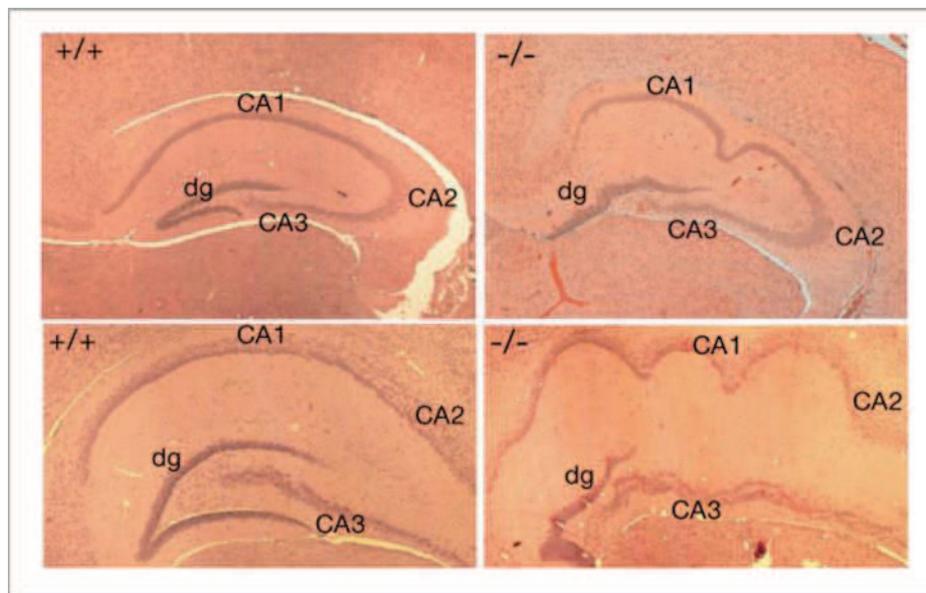


Figure 19|Phénotype neuronal et digestif pour les souris p73 déficientes

Comparaison du développement hippocampique de la souris sauvage (+/+) et de la souris p73 déficiente (-/-).

Parallèlement, l'étude des phénotypes des différentes souris CamKII et CamKIV déficientes présentent également des altérations au niveau du système neuronal, notamment au niveau du cervelet, avec une déficience du nombre de cellules de Purkinje, de l'hippocampe avec une altération de l'activité synaptique...(*Silva et al., 1994 ; Ribar et al., 2000 ; Frankland et al., 2001 ; Wei et al., 2002*). Ces deux constats révèlent que ces deux acteurs sont impliqués dans le développement et l'homéostasie du système neuronal. La question est de savoir si leurs actions sont synergiques entre elles

et si nous pouvons établir une corrélation entre leurs fonctions respectives voir même une signalisation moléculaire commune, dans ce processus biologique bien particulier.

III-1. Expressions et fonctions dans la neurogénèse

La neurogénèse débute par le développement du tube neural, feuillet embryonnaire neuro-ectodermique à l'origine du système nerveux central et périphérique. Néanmoins les souris déficientes p73 sont toujours dotées de ces deux systèmes nerveux, montrant que ces étapes précoces ne sont pas perturbées par l'absence de p73. Durant le développement neuronal à des stades plus avancées, la surproduction des cellules souches neuronales et des neurones post mitotiques différenciées conduit le système neuronal à éliminer certaines connexions établies. La sélection des cellules neuronales se fait à deux moments bien distincts du développement.

La première se situe entre les zones ventriculaire et sous ventriculaire du cortex, au moment où les cellules souches se différencient en neurones ou en cellules gliales et migrent dans le cerveau ou la moelle épinière. Ce processus d'apoptose permet l'élimination des cellules mal différenciées et assure le nombre approprié de cellules. C'est un moment critique pour toutes les zones du cerveau, notamment de l'hippocampe.

La seconde période se situe lorsque les cellules différenciées ont migrées et ont établis des connexions par extension dendritiques et axoniques. Cette période élimine la moitié des cellules neuronales produites. L'imprégnation de facteurs neurotrophiques permet la sélection des cellules et l'aboutissement de la différenciation et de la survie des cellules sélectionnées.

Nous allons voir qu'en fait les deux acteurs, p73 et les CamK jouent un rôle dans la neurogénèse, notamment dans ces étapes de sélection neuronale.

III-1.1. Impact de p73 dans le développement du système neuronal

Les membres de la famille p53 jouent des rôles importants dans différents processus biologiques comme nous l'avons constaté. Néanmoins, la fonction la plus soulignée aujourd'hui pour p73 est son implication dans le développement neuronal. Nous allons voir que les membres de la famille et plus particulièrement p73, membre prédominant dans le système nerveux, jouent un rôle dans les deux processus apoptotiques du développement neuronal.

Le premier indice, nous conduisant à penser à l'implication de p73 dans le système neuronal réside dans les phénotypes des souris transgéniques. En effet, les souris déficientes des deux isoformes p73, TA et ΔN , présentent des malformations neurologiques, incluant l'hydrocéphalie, un défaut de développement hippocampique (*Yand et al., 2000 ; Pozniac et al., 2002*). La distorsion de l'hippocampe chez les souris déficientes p73 démontrent que p73 joue un rôle important dans la sélection neuronale, période critique où les connections inutiles ou défailtantes sont éliminées. Deuxièmement, l'isoforme prédominante dans les cellules souches neuronales est TAp73. Il a été montré que la surexpression de TAp73 dans les neurones est corrélée au processus de différenciation. D'autres recherches ont montré que les cellules souches neuronales des souris TAp73 déficientes présentent un défaut d'arborisation dendritique et une altération dans les connexions physiologiques (*Agostini et al., 2010*). D'ailleurs, à contrario, une expression ectopique de TAp73 entraîne une croissance des neurites (dendrites, axone) et une expression des marqueurs neuronaux dans les lignées cellulaires de neuroblastomes et dans les cellules souches. Ces différentes observations révèlent que TAp73, en plus d'être déterminant pour la sélection neuronale est également important dans l'aboutissement de la différenciation neuronale. Troisièmement, au contraire de TAp73, $\Delta Np73$ encouragerait la survie des neurones. En effet, l'épaisseur corticale est réduite dans le cerveau des souris déficientes de cette isoforme (*Wilhelm et al., 2010 ; Yankner et al., 2008 ; Tissir et al., 2009*). Cette observation montre que cette isoforme est impliquée positivement dans la sélection neuronale. Une autre caractéristique a été observée dans ces souris âgés de 10mois, où leurs cortex moteurs seraient drastiquement réduits et subirait une neurodégénérescence importante (*Yankner et al., 2008*). Cette information témoigne que cette isoforme garde sa fonction neuro-protectrice tout au long du développement neuronale et n'est pas limité au développement embryonnaire.

Ces premières observations soulignent les différentes fonctions des isoformes de p73 dans la neurogénèse. Nous verrons par la suite que ces fonctions moléculaires neuronales retentissent dans la physiologie neuronale. En effet, de nombreuses publications ont révélées que p73 a été associée à de multiples pathologies neurodégénératives, soulignant ainsi le rôle important de p73 dans la balance survie/apoptose neuronale et sa différenciation.

III-1.2. Rôle des CamK dans le développement du système neuronal

A l'instar du calcium, activateur des CamK, qui est largement associé à la plasticité et à la polarisation-dépolarisation des neurones, certaines études ont montré que les CamK jouaient un rôle dans la sélection neuronale.

Premièrement, au niveau de l'expression de ces kinases dans ce système, il a été montré que la CamKII et la CamKIV sont les CamK prédominantes dans le système nerveux central (*Hook & Means, 2001 ; Soderling et Stull, 2001 ; Hudmon & Schulman 2002*). Nous avons vu que ces deux kinases appartiennent à deux sous-groupes différents, ayant des mécanismes d'activations distincts et des fonctions différentes. Qu'en est-il dans le développement neuronal ?

L'utilisation d'inhibiteurs de CamKII sur les cellules neuronales et les cellules gliales ont démontré que les CamK participent à la différenciation neuronale, notamment dans la croissance des neurites (*Kuhn et al., 1998 ; Vaillant et al., 2002 ; Wen et al., 2004 ; Tang & Kalil, 2005*). Cependant, même si ces études dictent une implication spécifique et directe de la CamKII dans la croissance des neurites, cette définition doit être nuancée. En effet, une autre étude (*Konur et Ghosh, 2005*) a montré que la CamKII n'a aucun effet dans la croissance des neurites. La nuance de ces propos repose sur l'utilisation des différentes isoformes de CamKII, alpha et bêta. Ces deux isoformes jouent des rôles bien distincts dans d'autres systèmes, donc cela me porte à croire qu'il en irait de même pour la différenciation neuronale. Des travaux parallèles ont également montré que la CamKIV, majoritairement nucléaire, jouerait un rôle dans la formation dendritique, par la phosphorylation directe de CREB, un facteur de transcription important dans la différenciation et la survie neuronale (*Redmond et al., 2002*). Ces premières observations indiquent que ces calcium-calmodulines dépendantes kinases participent à la différenciation neuronale, tout comme p73.

Nous avons vu que p73 était également impliquée dans la survie neuronale, serait-ce également le cas pour les CamK ? Cette question a été examinée de façon précise par différentes études d'une équipe de recherche. En effet, l'équipe de Greenberg, a montré que la CamKII et la CamKIV phosphorylent directement CREB, sur différentes sérines. Ces différentes phosphorylations ont des répercussions différentes dans la survie neuronale. En effet, la CamKII favorise la mort neuronale alors que la CamKIV a un effet neuro-protecteur (*Kornhauser et al., 2002 ; Matthews et al., 1994 ; Bito et al., 1996 ; Enslin et al., 1994 ; Sun et al., 1994*).

Par ces différentes études, nous constatons ainsi des concordances fonctionnelles entre les deux groupes de protéines, p73 (TA et ΔN) et les CamK (CAMKII et CAMKIV). La sélection neuronale et la différenciation neuronale (formation des neurites, plasticité...) sont les deux mécanismes de neurogénèse rassemblant ces protéines. Dès lors ces deux étapes sont cruciales dans le neuro-développement, on peut également s'interroger si cette corrélation peut s'établir dans les pathologies du système nerveux ayant des perturbations dans la survie et la différenciation neuronales. Ceci soulignerait ainsi l'importance de ces protéines dans la physiologie neuronale.

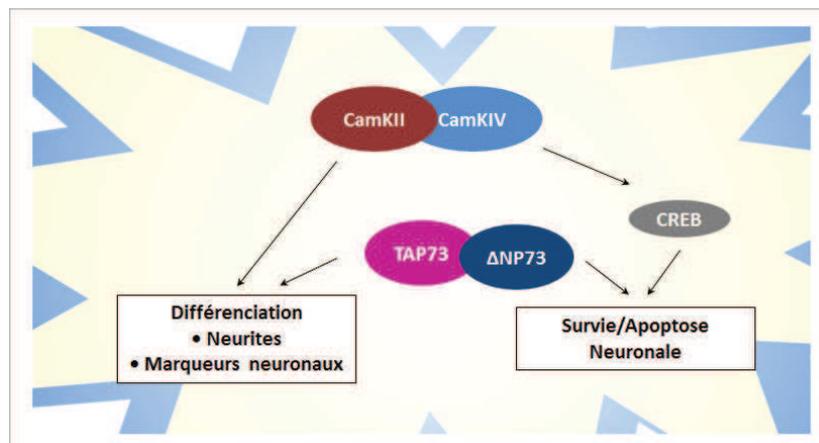


Figure 20|Fonctions neuronales de p73 et des CamK

Les protéines p73 et CamK participent à l'homéostasie en régulant la différenciation notamment la croissance des neurites, participant aux connexions neuronales et à l'apparition des marqueurs neuronaux tels que des protéines du cytosquelette, des protéines d'ancrages membranaires...P73 et les CamK régulent également la survie et l'apoptose neuronale.

III-2. Pathologies du système neuronal impliquant p73 et les CamK

Durant les vingt dernières années, le rôle important de la famille p53 dans les sévères maladies neurodégénératives a émergé. De nombreuses publications démontrent l'importance du facteur de transcription p53 comme un signal apoptotique fort dans les neurones. De nombreuses revues listent en détails son impact (Miller et al., 2000 ; Morrison et al., 2003 ; Culmsee and Mattson, 2005). Il a été montré que p53 est surexprimé dans les neurones périphériques apoptotiques après une ischémie cérébrale (Chopp et al., 1992), un traumatisme crânien (Napieralski et al., 1999), un traumatisme du système nerveux périphérique (Martin and Liu, 2002)... En plus de ces traumatismes neuronaux, il a également été observé que p53 est impliqué dans la maladie d'Alzheimer,

la maladie d'Huntington et la sclérose latérale amyotrophique (*De la Monte et al., 1997 ; Martin et al., 2000*). Nous avons également souligné le fait que p53 était muté dans 50% des cancers. De manière surprenante, p53 est très rarement muté dans les neuroblastomes. Mais si elle est intacte, la protéine reste non fonctionnelle du fait de localisation cytoplasmique ou de sa conformation inappropriée due aux perturbations des modifications post traductionnelles (*Moll et al., 1995 ; Wolff et al., 2001*).

De même que p53, le facteur de transcription p73 se voit également incriminer dans la dérégulation de l'homéostasie neuronale dans les traumatismes, les cancers et les maladies neurodégénératives. Pour illustrer ce constat, deux pathologies seront ici décrites plus en détails, qui touchent deux âges différents, montrant ainsi l'implication de p73 au cours du développement neuronal: une des maladies neurodégénératives la plus prévalente, la maladie d'Alzheimer et le cancer le plus fréquent chez l'enfant, le neuroblastome. Nous allons également voir que ces deux pathologies ont fait l'objet de recherche sur les CamK, esquissant ainsi une analogie pathologique de ces deux protéines.

III-2.1. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est devenue avec les cancers, le mal du siècle dans notre société. Elle se caractérise par la dégénérescence progressive des neurones, débutant au niveau de l'hippocampe et s'étendant au reste du cerveau. Elle survient généralement à partir de 65 ans. Les conséquences tragiques incarnent nos plus grandes frayeurs existentielles...la perte des facultés cognitives, troubles de la mémoire, des fonctions d'exécutions, d'orientation, d'autonomie...

Environ 900 000 français sont touchés par cette maladie, et d'après l'association *France Alzheimer*, 200 000 nouveaux cas par an sont diagnostiqués. Compte tenu de l'augmentation de l'espérance de vie, ces chiffres vertigineux ne vont malheureusement qu'augmenter.

L'évolution irréversible de la maladie suit généralement des étapes, catégorisées par les cliniciens en 7 stades, reflétant l'aggravation des symptômes. L'affection est assez hétérogène dans les symptômes, leurs apparitions et leurs durées. Dans la plupart des cas, la maladie progresse lentement sur une dizaine d'années. A ce jour, ce trouble cognitif est incurable mais certains traitements ralentissent significativement l'évolution de la maladie.

Les différentes études ont identifiées deux types de lésions causant l'apoptose neuronale: les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires. Deux composés ont été reconnus respectivement, comme responsables de ces lésions : l'accumulation du peptide bêta amyloïde et la phosphorylation de la protéine Tau. Les études sur les causes, l'épidémiologie, les conséquences de la maladie d'Alzheimer ne manquent pas (environs 80.000 articles référencés sur Pubmed). Bien que d'étudier ces différents aspects soient très intéressants, permettez-moi d'aller directement au point qui nous réunit aujourd'hui, la place de p73 et des CamK dans cette pathologie.

III-2.1.a Implication de p73 dans les symptômes de la maladie d'Alzheimer

La première évidence établie fut la démonstration de l'accumulation de p73 dans le noyau des cellules pyramidales hippocampiques des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, qui devrait physiologiquement se trouver dans le cytoplasme. Il a été également noté que l'accumulation est prédominante dans les neurones subissant une dystrophie des neurites et une altération du cytosquelette (*Wilson et al., 2004*).

Deux années plus tard, une autre équipe précisera plus en détails l'impact de la surexpression de p73 sur les marqueurs moléculaires de la maladie d'Alzheimer dans les neurones. En effet, l'accumulation de TAp73, mais pas de Δ Np73, induit l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, qui déclenche l'apoptose neuronale (*Hooper et al., 2006*). A contrario de TAp73, qui est responsable de l'apoptose neuronale, Δ Np73 favorise la survie en induisant l'accumulation de différentes protéines neuro-protectrices, p21 et Apaf-1. Parallèlement, Δ Np73 inhibe une kinase responsable de la phosphorylation de Tau, la JNK (*Wetsel et al., 2008*). Le rôle neuro-protecteur de Δ Np73 fut « enfin sous les projecteurs » et reconnu, avec un titre évocateur d'une première revue « No more tangles with Δ Np73 » (*Mattson and Ashery, 2009*). D'ailleurs, les souris Δ Np73 déficientes présentent des défauts cognitifs associés à l'augmentation et à l'hyperphosphorylation de Tau. Ceci confirme que Δ Np73 a un rôle préventif sur le caractère apoptotique de Tau. Toutefois, il a été également démontré que Δ Np73 n'a aucun effet protecteur contre la cascade bêta-amyloïde, qui entraîne aussi la mort neuronale. Si la cascade amyloïde ne semble pas être initiée par p73, notre équipe a démontré que celle-ci aurait par contre un impact sur l'expression des isoformes de p73 (*Benosman et al., 2011*). Ce profil modifié favorise l'apoptose neuronale pour TAp73 et

entraîne l'inhibition de l'effet neuro-protecteur de $\Delta Np73$ par différentes modifications post-traductionnelles.

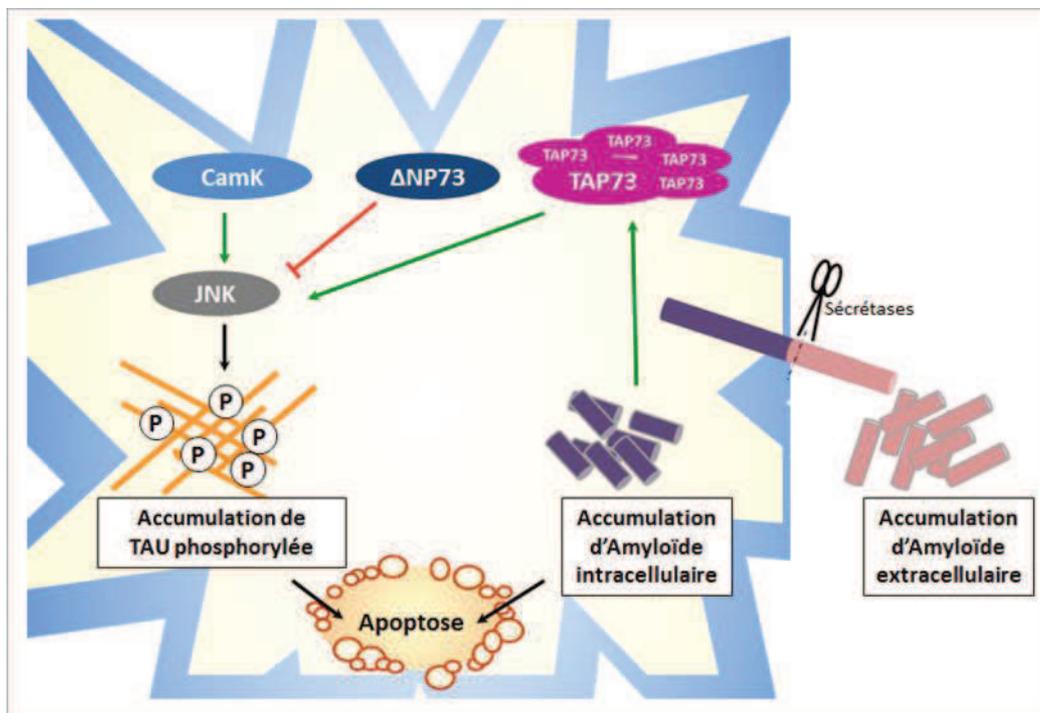


Figure 21|Impact de p73 et des CamK dans la maladie d'Alzheimer

L'apoptose neuronale, dans la maladie d'Alzheimer, résulte de l'accumulation de la protéine Tau phosphorylée par les JNK. Les CamK et les isoformes p73 régulent l'activité de cette kinase et donc de l'apoptose Tau dépendante. L'accumulation de la protéine amyloïde, autre signal moléculaire de la maladie d'Alzheimer augmente l'expression de TAp73. Ainsi cette isoforme peut être considérée comme un « booster » dans les symptômes de la maladie d'Alzheimer.

Toutefois, même si on connaît l'implication de p73 dans les symptômes « moléculaires » de la maladie d'Alzheimer, la dérégulation de l'expression de p73 dans cette pathologie reste encore à être expliquée. Nous avons constaté que les isoformes de p73 ont des rôles opposés dans la survie neuronale. Ainsi l'expression des isoformes est une composante importante dans l'évolution de la maladie. Néanmoins, aucune régulation des isoformes p73 a été spécifiquement caractérisée dans les neurones, et qui aurait pu être explorée dans la maladie d'Alzheimer. Et nous pouvons maintenant comprendre davantage l'intérêt clinique à identifier les mécanismes de régulations de p73 dans les neurones. Après avoir décrit l'implication de p73 dans la maladie d'Alzheimer, il est également intéressant de rechercher si les CamK joueraient un rôle dans le développement de cette maladie.

III-2.1.b Quelques indices cachés de l'activité des CamK dans la maladie d'Alzheimer

Quatre altérations sont reconnues par les chercheurs pour participer au dysfonctionnement synaptique et à la neuro-dégénération, causée par l'âge et la maladie d'Alzheimer : l'altération de l'activité synaptique, l'augmentation du stress oxydatif, la perturbation du métabolisme énergétique et l'altération de l'homéostasie calcique (*Mattson et al., 2004*). Ce constat est extrêmement intéressant et devrait vous replonger sur certains propos que j'ai tenus sur les CamK.

Premièrement, comme je l'ai mentionné auparavant les CamK sont fortement identifiées comme acteur de l'apprentissage et de la mémoire en participant à l'activité synaptique notamment la LTP (Long Term potentiation). Ce mécanisme débute par la libération d'un neurotransmetteur, le glutamate dans la fenêtre synaptique. Ce neurotransmetteur va se lier aux différents récepteurs tels que NMDAR (N-Methyl D-Aspartate récepteur) qui vont entraîner l'entrée calcique présynaptique. L'augmentation de la concentration calcique va activer les CamK, qui vont renforcer l'activité synaptique via l'augmentation de la conductance glutamatergique (*Lisman et al., 2012 ; Sanhueza et al., 2011*). Plusieurs études ont démontré que ce mécanisme synaptique et plus particulièrement les CamK pourraient être une cible thérapeutique pour la maladie d'Alzheimer. En effet que ce soit dans les modèles *in vitro* ou *in vivo* de cette maladie, il a été observé que l'activité des CamK était altérée, due à la diminution de l'expression des canaux calciques et du calcium présynaptique (*Min et al., 2013 ; Ly et al., 2011*). D'ailleurs, la rivastigmine, traitement actuelle de cette maladie et ayant un effet favorable sur les déficits cognitifs, est efficace seulement si la CamKII est fonctionnelle (*Moriquichi et al., 2014*). Outre le fait que la LTP soit un processus de polarisation/dépolarisation neuronale, il a été observé qu'elle participait à la survie et à la plasticité neuronale (*Cho et al., 2013*). Il a été montré que la LTP favorisait la prolifération, la survie et la différenciation des cellules souches neuronales. Comme la CamKII est un acteur clé de la LTP, on peut envisager que la CamKII pourrait être un inducteur clé dans la transcription des gènes de la neurogénèse. En ce sens, une autre équipe a constaté qu'un composé active d'une herbe médicinale chinoise, le β -Asarone inhibe l'apoptose neuronale dans les modèles *in vivo* et *in vitro* de la maladie d'Alzheimer via l'activation de la signalisation CamKII/CREB/Bcl-2 (*Wei et al., 2013*). Même si tout reste à éclaircir, l'ensemble de ces études suggèrent fortement l'implication des CamK dans la dérégulation de la balance survie/apoptose neuronale

dans cette maladie.

Deuxièmement, nous avons vu que les CamK sont régulées par l'homéostasie calcique mais aussi par le niveau du stress oxydatif, qui induit l'activation autonome de la CamKII. L'augmentation du stress oxydatif a été observée dans les modèles de la maladie d'Alzheimer. Ceci suggère déjà que la régulation de l'activité de la CamKII pourrait être encore grandement perturbée dans les neurones apoptotique. L'activation de la CamKII potentiellement amplifiée pourrait participer à l'apoptose neuronale induite par l'accumulation de Tau et de la protéine amyloïde.

Additionnellement, nous avons également observé que les CamK étaient associées à la régulation du métabolisme. Ainsi, on peut s'interroger si les CamK pourraient participer à la dérégulation métabolique des neurones, favorisant la neuro-dégénération dans la maladie d'Alzheimer.

De manière anecdotique, une unique étude a relié le niveau d'hyper-phosphorylation de Tau avec l'activité des CamK (*Steiner et al., 1990*). Néanmoins, ces différents indices restent encore à consolider par l'étude moléculaire des effets des CamK sur les effecteurs apoptotiques neuronaux tels que p73.

Imagination oblige...n'y aurait-il pas un lien entre les CamK et l'accumulation de TAp73 et l'absence de l'effet protecteur de $\Delta Np73$ observées dans la maladie d'Alzheimer ? La modification de l'activité des CamK n'auraient-elles pas un impact sur les fonctions de p73 ? Ne pourraient-elles pas être les responsables directes de l'altération des activités de p73 ? L'ensemble de ces observations troublantes m'autorisent à penser qu'il pourrait y avoir une interaction moléculaire et une corrélation fonctionnelle entre l'expression et l'activité de p73 et l'activité des CamK. Après avoir vu l'impact de p73 et des CamK dans un trouble cognitif se produisant en fin de vie, j'ai trouvé intéressant de vous exposer une autre pathologie neuronale associée à p73 et aux CamK, qui elle, se développe aux prémices du développement neuronal, le neuroblastome.

III-2.2 Le cancer du cerveau, le neuroblastome

Le neuroblastome est une tumeur maligne solide extra-crânienne, dérivée des cellules embryonnaires du tissu, donnant naissance au système nerveux sympathique. De ce fait, elle peut se retrouver sur toute la longueur de la colonne vertébrale et dans la partie des glandes surrénales. Le terme « neuro » se réfère aux cellules neuronales et le terme « blastome » souligne que ce cancer affecte des cellules immatures.

C'est le cancer le plus fréquent chez le nourrisson, avec 130 nouveaux cas chaque année, en France et 700 nouveaux cas aux Etats-Unis, d'après l'étude épidémiologique parue en mai 2014 par Orphanet. L'évolution de cette maladie est très variable, dépendant de l'âge du patient, de l'extension tumorale et du facteur génétique. En effet, chez les nourrissons, certaines tumeurs et métastases peuvent régresser spontanément alors que d'autres échappent au traitement, malgré l'utilisation de combinaisons très agressives. Malheureusement, chez 60% des enfants, il existe des métastases, hépatiques par exemple, dès le diagnostic. Si la chirurgie n'est pas possible pour supprimer la tumeur et les métastases, on a recours à la chimiothérapie associée à la greffe de cellules souches. La radiothérapie est réservée aux tumorigénèses les plus agressives.

Dans la majorité des cas, la cause du neuroblastome, n'est pas totalement identifiée. Toutefois, certaines recherches ont pu dégager des marqueurs intéressants pour le diagnostic, notamment l'amplification de l'oncogène *N-Myc* et une perte d'hétérozygotie en 1p36-33, locus du gène *p73* (Stiewe et al., 2002).

III-2.2.a Corrélation entre les neuroblastomes et la balance d'expression de TA/ Δ Np73

Quelques évidences ont indiquées que l'expression des isoformes p73 dans les neuroblastomes était altérée. En effet, une équipe française a montré que l'isoforme Δ Np73 est surexprimée dans les tumeurs de neuroblastomes (Douc-Rasy et al., 2004) et que les deux isoformes de p73 sont majoritairement localisés dans les noyaux des cellules des tumeurs neuroblastomes indifférenciés. A contrario, dans les tumeurs neuroblastomes les plus différenciées, qui sont bénignes, les deux isoformes sont périnucléaires voire cytoplasmiques. Ces observations suggèrent une altération de la localisation et du transport nucléocytoplasmique de p73 comme élément important lors du blocage de la différenciation sympathique. Il y aurait également un lien entre l'accumulation de Δ Np73 et l'exclusion nucléaire de p53, qui est connu pour être

inducteur de l'apoptose neuronale.

Parallèlement, les recherches passées laissent penser que TAp73 tend vers un profil de pro-différenciateur neuronal alors que l'isoforme $\Delta Np73$ semblerait ne pas participer voire même freiner le processus. Néanmoins, cette question de répartition fonctionnelle entre les isoformes reste difficile à élucider de par les interactions entre les isoformes possibles, les mêmes mécanismes cellulaires partagés entre les membres de la famille qui peuvent être restaurés et le manque d'outils de recherche. Toutefois certains modèles peuvent donner quelques indices. En effet, l'étude de la différenciation d'une lignée de neuroblastome murin a permis de montrer que la surexpression de l'isoforme TAp73 favorise le processus. Par ailleurs, cette différenciation est stoppée lorsque TAp73 et $\Delta Np73$ sont surexprimées conjointement (*Zaika et al., 2002 ; De Laurenzi et al., 2000*). Cette observation pourrait présager que l'effet de $\Delta Np73$ sur la différenciation est plus fort que celui de TAp73.

Dans cette pathologie, la différenciation des neurones est un aspect important dans la sévérité de la pathologie. On constate que les isoformes jouent un rôle dans ce processus et donc par extension peuvent être corrélées au pronostic des patients. Les isoformes de p73 jouent des rôles opposés, ce qui renforce l'importance du niveau d'expression de chacune d'elle dans les neurones. Comprendre alors la régulation d'expression et d'activité de p73 est une question intéressante pour pouvoir appréhender les mécanismes moléculaires pathologiques mis en place dans les tumeurs neuroblastomiques.

III-2.2.b Participation des CamK dans les neuroblastomes

Concernant, l'autre famille de protéines, les CamK, il y a quelques données qui soulignent des dysfonctionnements intéressants ou des caractéristiques d'expressions propres au neuroblastome. Il y a une vingtaine d'années, une équipe a défini le profil d'expression de toutes les isozymes de CamKII dans les cellules neuronales versus les cellules de neuroblastomes (*Tombes and Krystal, 1997*). Ils ont identifié 8 isozymes de CamKII caractéristiques au neuroblastomes du gène β , γ et ϵ alors que l'isoforme α ne semble pas présente dans les différentes tumeurs analysées. Les rôles de ces isozymes ne sont pas encore bien caractérisés mais seraient impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire et la différenciation. Une année plus tard, une autre équipe démontre que l'activité de la CamKIV est altérée dans les cellules de neuroblastomes, *SH-SY5Y (MCGinnis*

et al., 1998). En plus d'être connu pour jouer un rôle dans la survie, la CamKIV serait impliquée dans la différenciation notamment dans la croissance des neurites, dans une lignée de neuroblastome humaine, les N2A (*Takemura et al., 2009*).

Par l'ensemble de ces informations, on peut constater des analogies entre p73 et les CamK dans ces pathologies neuronales, à différents stades de développement, de l'embryogénèse au vieillissement.

	p73	CamK
Survie neuronale	✘	✘
Prolifération des précurseurs neuronaux	✘	✘
Différenciation neuronale		
- Marqueurs neuronaux	✘	?
- Arborisation des neurites	✘	✘
- Connexion synaptique	✘	✘
Polarisation/dépolarisation (LTP-LTD)	?	✘

Figure 22| Tableau récapitulatif des fonctions de p73 et des CamK dans la neurogénèse. L'ensemble des études menées sur p73 et les CamK dans les différents processus moléculaires du système neuronal met en lumière d'intéressantes analogies. Plusieurs évènements de neurogénèse rassemblent ces deux acteurs, et leur possible coopération pourrait expliquer la dérégulation mécanistique observée dans des pathologies neuro-dégénératives.

La balance d'expression entre les deux isoformes de p73 joue un rôle crucial dans la survie/apoptose mais aussi dans la différenciation neuronale. La régulation de l'expression de p73 dans le système neuronale reste encore un mystère. En parallèle, les CamK sont également dérégulées dans leurs expressions ou leurs activités dans ces pathologies. De manière intéressante, ces altérations sont corrélées également à l'homéostasie et à la différenciation neuronale. Alors qu'il a été déjà démontré que les CamK réguleraient l'homéostasie neuronale en phosphorylant un autre facteur de transcription CREB, il serait donc intéressant si les CamK pourraient également jouer un rôle dans la régulation de p73 et ainsi comprendre les dérégulations dans les contextes neuropathologiques.

IV- Projet doctoral

Le gène p73 appartient à une famille composée de trois gènes codant pour trois facteurs de transcription p53, p63 et p73 régulant plusieurs fonctions cellulaires tels que le cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose dans différents tissus. Des promoteurs alternatifs des gènes p63 et p73 produisent deux groupes d'isoformes : les isoformes TA qui possèdent le domaine de transactivation et les isoformes ΔN n'ayant pas ce domaine. Ces deux groupes d'isoformes sont en compétition lorsqu'ils se lient à l'ADN pour la transcription de leurs gènes cibles. Les isoformes TAp73 étaient initialement considérées comme pro-apoptotiques et les isoformes $\Delta Np73$ comme étant anti-apoptotiques mais de récentes études ont démontré que cette définition n'est plus entièrement exacte. La complexité et l'importance de cette famille sont soulignées par les phénotypes divergents entre des souris déficientes pour chacun des gènes ou pour chaque isoforme, ainsi que par l'existence de gènes cibles communs et spécifiques à chacun de ces facteurs de transcription. En particulier, le phénotype des souris p73 déficientes révèle l'importance de p73 dans le développement neuronal et l'homéostasie intestinale. De plus, plusieurs études ont démontré que l'expression de p73 est dérégulée dans des pathologies, tels que les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer) et les cancers (neuroblastome et gastrique).

Il existe actuellement relativement peu d'informations permettant de comprendre comment p73 s'intègre dans les signalisations conduisant à l'établissement d'un système nerveux ou digestif fonctionnels ou quel sont les mécanismes conduisant à l'altération de son expression dans des pathologies. C'est pourquoi, l'un des projets de recherche de notre équipe concerne la régulation post-traductionnelle de p73. Ainsi, l'équipe a déjà démontré qu'en réponse à des stress neurotoxiques, p73 est phosphorylée par les CDK et les JNK entraînant la dégradation de p73.

Dans ce contexte, mon objectif de doctorat était d'identifier une nouvelle modification post-traductionnelle de p73 et de caractériser son rôle dans un contexte physiologique

pertinent. Les résultats que j'ai obtenu nous ont conduits à adresser trois points spécifiques :

I- Caractériser au niveau moléculaire la régulation des protéines p73 par les calmoduline kinases (CamK).

II- Déterminer l'implication de cette régulation pour les fonctions de p73 dans les neurones dans lesquels les CamK jouent un rôle essentiel.

III- Etablir si cette régulation joue également un rôle dans d'autres contextes biologiques mettant en jeu p73, mais pour lesquelles les fonctions des CamK sont moins connues. Dans cette partie plus prospective, je me suis intéressé à des processus physiopathologiques du système digestif.

RESULTATS

Au cours de ma thèse, les résultats obtenus dans l'étude sur la caractérisation au niveau moléculaire de la régulation de p73 par la CamKII et la détermination de l'implication de celle-ci dans la physiologie neuronale font l'objet d'un manuscrit scientifique (présenté ci-après) :

Regulation of TAp73 activity by CamKII in neuronal cell death.

Orphée Blanchard, Véronique Devignot, Georg Mellitzer, Christian Gaiddon.

Par ailleurs, j'ai fait le choix d'intégrer dans la partie discussion-perspectives, les travaux supplémentaires à cette étude. Ces travaux supplémentaires enrichissent d'une part, la première partie des résultats obtenus en commençant à caractériser la régulation de p73 par la CamKIV qui est un autre membre de la famille des CamK aussi impliqué dans la physiologie neuronale. D'autre part, ces travaux supplémentaires ont permis d'obtenir des premiers résultats permettant d'envisager une implication de la régulation p73-CamK dans un autre contexte, le système digestif. Ces résultats préliminaires feront (je l'espère) un bon « starter » pour un futur projet doctoral.

REGULATION OF TAP73 ACTIVITY BY CAMKII IN NEURONAL CELL DEATH

Orphée Blanchard^{1,2}, Véronique Devignot^{1,2}, Georg Mellitzer^{1,2}, Christian Gaiddon^{1,2}

¹INSERM U1113, 3 av. Molière, Strasbourg, France

²Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Université de Strasbourg

ABSTRACT

The development and the maintenance of the nervous system involve several cellular processes that include neuronal differentiation, plasticity and survival. These processes have been shown to be under the control of multiple mechanisms, some of them depending on the intracellular calcium homeostasis and the transcription factors of the p53 family (p53, p63 and p73). In this study, we describe a novel signaling pathway that controls neuronal fate through a regulation of TAp73 by the calcium calmoduline kinase 2 (CamKII). We identified three potential phosphorylation sites (S81, S134, S374) for CamKII located in three different domains of TAp73: the transactivation domain, the DNA binding domain, and the oligomerization domain. *In vitro* phosphorylation using purified proteins indicated that CamKII phosphorylates p73. Overexpression of a constitutively active form of CamKII led to an increase in TAp73-dependant transcriptional activity and TAp73 target gene induction. The elevated activity correlated with an increase in TAp73 protein levels and protein stability in presence of CamKII. Site-directed mutagenesis showed that each site participates in a complex regulation of TAp73 activity and stability. Strikingly, the TAp73 triple mutant (S81,S134,S374A) displayed a 40% decrease in transcriptional activity. In addition, we investigated the physiological significance of this regulation and showed that intracellular calcium modulators and inducers of neuronal death (i.e. high glutamate) induced an increase in the activity and protein level of TAp73. Altogether, these results indicate the participation of a CamKII-TAp73 pathway in the control of neuronal survival upon alteration of the intracellular calcium homeostasis.

INTRODUCTION

The molecular mechanisms governing the development and the maintenance of the nervous system (NS) are multiple and complex. These mechanisms translate the various extracellular signals and the variations in intracellular metabolisms into an appropriated cellular response by displacing the equilibrium between quiescence/proliferation/differentiation in the neuronal progenitor and survival/death in mature neurons.

p73, a p53 homologue, plays a crucial role in these processes. The p53 family of transcription factors is a central regulator of many cellular processes, such as apoptosis, cell cycle arrest, metabolism or differentiation through the regulation of homologue-specific or common target genes (*p21*, *p57*, *gadd45a*, *puma*...)(Arrowsmith, 1999; Menendez et al., 2009). All three members encode for TA and Δ N isoforms that vary in their N-terminus due to alternate promoter usage where TA isoforms have a canonical transactivation domain. Δ N isoforms lack such N-terminal domain and can act as dominant negatives towards the TA isoforms, but are also capable of transactivating certain genes (Casciano et al., 1999; De Laurenzi et al., 1998; Murray-Zmijewski et al., 2006). Through their cellular activities, p53 proteins are involved in a broad variety of physiological functions that include tumor suppression and organ development (Arrowsmith, 1999).

In particular, both types of p73 isoforms, TAp73 and Δ Np73 play a role in neuronal development and maintenance. *p73*^{-/-} and *TAp73*^{-/-} mice exhibit defects in the nervous system, notably in the hippocampus, the olfactory bulbs and the sympathetic neurons (Yang et al., 2000) (Pozniak et al., 2002) (Pozniak et al., 2000). Specific *Δ Np73*^{-/-} mice have alteration in neuronal survival leading to a reduced number of neurons, such as in the choroid plexus (Tissir et al., 2009). However, a wider function of the p73 isoforms during the nervous system development cannot be excluded, as the existence of multiple isoforms and possible compensation mechanisms by other family members harden *in vivo* analyses of the exact contribution of *p73* to neuronal fate. In this context, *in vitro* experiments provide precious additional information. For instance, TAp73 has been described to induce neuronal differentiation in neuroblastoma SH SY5Y cells (De Laurenzi et al., 2000) and to participate in oligodendrocyte differentiation (Billon et al., 2004). This activity seems to be mediated by antagonizing Notch signaling (Hooper et al., 2006b). Δ Np73 isoforms favor neuronal survival in different types of neurons (i.e. sympathetic, cortical) (Lee et al., 2004; Pozniak et al., 2002) (Benosman et al., 2011).

In addition to its participation in the NS development, p73 isoforms have been shown to play a role in pathologies affecting neuron precursors or terminally differentiated neurons. For example, p73 was initially characterized as a tumor suppressor candidate for neuroblastoma due to its localization in the 1p36-33 locus susceptible to loss of heterozygosity in this cancer (Kaghad et al., 1997; Romani et al., 2003). In this context, an overexpression of

Δ Np73 in neuroblastoma cells, with an accumulation in the nucleus preferentially in the more aggressive form of cancer cells, has also been shown. p73 participates also to DNA damages and anticancer treatment responses in neuroblastoma cells (Million et al., 2006). Furthermore, p73 proteins have been associated with neuronal degenerative processes. In cortical neurons following ischemia a down-regulation of TAp73 was observed (Bui et al., 2009). Activation of TAp73 in cerebellar neuronal cell death has also been associated with Niemann–Pick type C neurodegenerative disease (Klein et al., 2011). But most information available concerns Alzheimer’s disease. There is an accumulation of p73 proteins in the nucleus of pyramidal hippocampic cells of Alzheimer patients (Wilson et al., 2004) and in neurons cultured in presence of amyloid β peptide (Li et al., 2004). However, the role of p73 in Alzheimer seems complex as accumulation of TAp73 induced Tau hyperphosphorylation, which is one of the causes for Alzheimer-induced neuronal death (Hooper et al., 2006a). Inversely, Δ Np73 decreases Tau phosphorylation by repressing JNK (Wetzel et al., 2008). Finally, we showed that alteration of the pathway of the amyloid β peptide precursor (APP) led to a deregulation of the relative protein levels of TAp73 and Δ Np73 that favor apoptosis (Benosman et al., 2011).

Although the function of TAp73 and Δ Np73 isoforms in the nervous system has been documented, it remains to be understood how these proteins are regulated in this context. More generally, the mechanisms that control the overall activity of p73 proteins, at the transcriptional and post-translational levels, are less well characterized compared to p53. We previously described two mechanisms that participate in the regulation of p73 during neuronal cell death. One is the loss of MDM2 and MDMX following DNA damage or cytotoxic high glutamate treatment (Benosman et al., 2007). The second is Δ Np73 protein degradation via a JNK-dependent phosphorylation (Benosman et al., 2011). To further understand the post-translational regulations of p73 we analyzed the protein sequence via the bioinformatics tool Scan site (Obenauer and Yaffe, 2004). This analysis revealed three potential phosphorylation sites for calcium-dependent calmodulin kinase II (CamKII). CamKII is a key kinase in the nervous system through its role in synaptic activity, as well as neuronal differentiation and death (Hell, 2014) (Soderling, 1999) (Racioppi and Means, 2012). CamKII belongs to the CaMK serine/threonine kinase family (CaMKI, CamKII, CamKIII, CaMKIV and CaMKK). CamKII has multiple targets and its activity is dependent on the interaction with a calcium-calmodulin complex. Hence the activity of CamKII is dependent on intracellular calcium concentrations, which is known to play a critical role in neuronal fate and function (Soderling, 1999). Based on these correlations between CamKII and p73 functions in neuronal fate, we further investigated the possible physical and functional interaction between them, supported by the potential CamKII phosphorylation sites in p73.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bioinformatic analysis assay— Based on the human TAp73 α sequence, (identifier uniprot: O15350-1) the potential post-translational modifications were identified through a bioinformatic software, Scan Site motif scanner, <http://scansite.mit.edu/>.

Cell Culture and Treatments— Cerebellar neurons were dissected from 7 days post-natal mice, as described previously (Gaiddon et al., 1999b). Briefly, after enzymatic and mechanical dissociation, cells were plated at a density of 800 cells/mm² on 0.1 mg/ml polyornithine precoated culture dishes and were grown at 37 °C in a humidified atmosphere (5% CO₂, 95% air). Plating culture medium contained Neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with 2% B27 complement (Invitrogen) and 1% Glutamax (Invitrogen) and 25mM potassium (Sigma) and 50mg/ml gentamycin. Neurons were used after 12 days of culture. HEK cells were obtained from the ATCC and grown in DMEM with 10% fetal bovine serum and 1% of penicillin-streptavidin (Invitrogen). For specific experiments they were treated with cycloheximide 150 μ g/mL (Sigma) or with MG132 10 μ M/mL during 6 hours (Sigma).

Colorimetric MTT Assay— Cells were cultured in 96-well culture dishes (Costar). A modified procedure of the original method (Mosmann, 1983) was used to measure mitochondrial activity (MTT assay) as described previously (Gaiddon et al., 1996). Briefly, cultures were rinsed with DMEM and incubated for 1h at 37°C in freshly prepared culture medium containing 0,5mg/ml of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma). Medium was then removed, and the dark blue crystals formed during reaction were dissolved by adding 100 μ l/well of 0.04 M HCl in isopropyl alcohol. Plates were stirred at room temperature to ensure that all crystals were dissolved and read on a plate reader (Tristar multimode reader of Berthold Technologies), using a test wavelength of 490 nm and a nonspecific wavelength of 650 nm for background absorbency. Results are given as percentage of survival, taking cultures grown in HK medium as 100%.

Expression Vectors, Reporter Genes— Vectors expressing HA-tagged dominant active (DA) forms of CaMKIV and CamKII were previously described (Antoine et al., 1996). Expression vectors encoding human HA-TAp73 β and HA- Δ Np73 β cDNA from the CMV promoter were previously described (Laurenzi et al., 1999). The reporter constructs Bax-min-Luc, CMV-luc were previously described (DiComo et al., 1999). Plasmids were amplified in DH5 α E. Coli and purified using Qiagen maxi purification kit (Qiagen, USA). DNA was then quantified and verified on agarose gel.

In Vitro Phosphorylation Assay— Immunopurified mouse TAp73 β proteins (100 ng) obtained through immunoprecipitation assay as previously described (Lokshin et al., 2007) were incubated with immunopurified CamKII (100 ng, Biochem) and immune-purified calmodulin (100 ng, Sigma) in 20 μ l of kinase buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM

EDTA, 1 mM DTT, 100 μ M ATP, 15 μ Ci of [γ - 32 P]ATP) for 30 min at 37 °C. After the addition of 10 μ l of 3X buffer, the proteins were separated on 10 % SDS-PAGE. The gels were dried and analyzed by autoradiography. The purity and the quantity of the proteins used in the assay were also verified by SDS-PAGE and Comassiss Blue staining.

Preparation of Cell Extracts and Immunoblotting— Cells were grown in 12-well culture dishes. After treatments, cells were washed with PBS and proteins were extracted with Laemmli Buffer (60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, NP40 0.5%, 0.01% bromophenol blue) supplemented with protease inhibitors (1/100, Sigma) and DTT (100mM, Sigma). Protein extracts were boiled and separated on a 12% SDS-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose (Biorad). HA-tagged TAp73 β , HA-tagged Δ Np73 β , HA-tagged CaMK were detected by Western blotting using an anti-HA antibody (1:1000, SC-7392, Santa Cruz Biotechnology), the endogenous TAp73 and Δ Np73 expression were detected with anti-p73 antibody (1:1000, Cat1636-1, Epitomics), the GFP expression by anti-GFP antibody (1:1000, ab1218, Abcam) and actin with an anti-actin antibody (1/1000, A2066, Sigma). Primary antibodies were detected with a mouse or rabbit horseradish peroxidase-conjugated antibody (1/10000, Jackson). Blots were then incubated for 2 minutes with ECL reagent (Pierce) before detection using an imager (Biorad).

Site directed Mutagenesis— Site-directed mutagenesis was performed using the Quick-change Site-directed Mutagenesis kit (Stratagene) as recommended. The expression plasmids encoding the wild-type protein TAp73 β was used as template with a pair of oligonucleotides (Eurogentec) harboring the S81A, S134A, S374A mutations (Serine to Alanine: tcg \rightarrow gcg or tcc \rightarrow gcc). The sequences of the different oligonucleotides were for S81A (forward: 5 AGC AGC CGC GCG GCC GCG GCC AGC CCC TAC ACC 3 /reverse 5 GGT GTA GGG GCT GGC CGC GGC CGC GCG GCT GCT 3) and for S134A (forward: 5 GTC ACT TTC CAG CAG GCC AGC ACG GCC AAG TCA 3 /reverse 5 TGA CTT GGC CGT GCT GGC CTG CTG GAA AGT GAC 3) and for S374A (forward : 5 ATG AAG CTG AAA GAG GCC CTG GAG CTG ATG GAG 3 /reverse 5 CTC CAT CAG CTC CAG GGC CTC TTT CAG CTT CAT 3).For the double and triple mutants, the mutagenesis assay were performed with the appropriate simple mutants.

Transfection and Luciferase Assay—Cells were cultured in 12 or 24-well poly-ornithine coated dishes and grown for 2 days prior to transfection experiments. Gene transfer was performed using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) as DNA carrier (1 μ g DNA: 2 μ L reagent) or with jetprime reagent (Polyplus, Strasbourg, France) as previously described (Gaiddon et al., 1999a). Cells were incubated with a mix of DNA and the appropriate tranfection reagent for 12 hours and then refed with the fresh appropriate medium. Transfection efficiency was checked by co-transfection of a plasmid encoding GFP (Green Fluorescent Protein: 0.2 μ g/well of a 24-well size) and examining the GFP expression at the microscope and by Western blot. GFP expression estimated by Western blot was used to

standardize p73 proteins expression in the various experimental conditions. For luciferase assay, cells were lysed 12h after transfection using the luciferase assay lysis buffer (Promega) and cell extracts were mixed with reagents of a homemade luciferase assay (luciferin 470 μ M, ATP 530 μ M, Coenzyme A 200 μ g/mL). Luciferase activity was measured by a microplate reader (Berthold systems). Normalization of luciferase activity was performed by replacing the reporter construct of interest by a CMV or RSV luciferase reporter vector.

Transfection and apoptosis assay- Neurons were grown on coverslips coated with poly-ornithine in 24-wells plates. Cells were co-transfected with the expression vectors (200 ng/well), siRNA (40 nM) and the GFP-expression vector (50 ng/well) as previously described. Cells were treated or not for 16 h with the neurotoxic agents. Then, cells were washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min. After two washes, cells were incubated for 10 min with the DAPI nuclei staining agent (1 μ g/ml). GFP positive cells were then observed with a microscope to assess the morphology of the nuclei and the neurites. Stealth siRNA annealed duplexes were obtained from Invitrogen and targeted the following 5' to 3' DNA sequences: siTAp73#1, GCCATCCGAAACACCAATGAGTACA; siTAp73#2, GCAGGAAAGGACTCATGAAATCATA; siCt, sequence control GC 50% (Invitrogen).

Quantitative PCR— Cells were grown in 6-well plates. After treatment, cells were harvested, and total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen). Reverse transcriptions were performed with 1 μ g of RNA using the IScript kit (Bio-Rad). The IQ SYBR Green supermix kit (Bio-Rad) was used for real time PCRs. For each gene analyzed, a standard curve (from 2 to 0.032 μ l) was done with a mix of all RT reactions. Based on this curve, 0.5 μ l of RT reaction was analyzed for each condition with all sets of oligonucleotides (250 nm). Real time PCR protocol included in all experiments a melting curve that assessed the specificity of the products. Real time PCRs and analysis were performed on an ICycler (Bio-Rad). The following primers were used: mouse *TBP* (forward, CTTCGTGCAAGAAATGCTGA; reverse, CCCACC ATGTTCTGGATCTT); *p21* (Hs01121172_m1) and *p57* (Hs00175938_m1)

RESULTS

CamKII phosphorylates TAp73 and enhances its activity

Protein sequence analysis using a bioinformatics tool (SCAN site motif scanner) identified three potential phosphorylation sites for CamKII in TAp73 protein. The three sites, S81, S134, and S374, are located in the transactivation-PXXP region, the DNA binding domain, and the oligomerization domain, respectively (Figure 1A, B). Confidence scores vary amongst the three sites, with S81 showing a homology with the canonical CamKII phosphorylation site (RXXT/S). To validate the hypothesis that CamKII can phosphorylate TAp73, *in vitro* phosphorylation experiments were carried out using immuno-purified CamKII, calmodulin, TAp73 β proteins and ATP γ ³²P. As expected, CamKII got auto-phosphorylated in

presence of calmodulin and Ca^{2+} (Figure 1C, middle lane). Immuno-purified TAp73 β alone did not show any integration of ^{32}P . In contrast, co-incubation of TAp73 β with CamKII and calmodulin led to the appearance of a band at the size of TAp73 β , indicating the phosphorylation of TAp73 β by CamKII.

To understand the possible consequences of TAp73 phosphorylation by CamKII, we followed the expression of two p73 target genes, *p21* and *p57*, in presence of a constitutively active form of CamKII lacking the regulatory domain (Antoine et al., 1996). As expected, overexpression of TAp73 β led to induction of *p21* and *p57* expression (Figure 1D). Interestingly, expression of the constitutively active form of CamKII further increased the mRNA levels of *p21* and *p57* induced by TAp73. We then used a p53/p73 reporter gene assay to ascertain that a p73-dependent transactivation process mediated the effect of CamKII. The reporter gene contains a 6 fold repeat p53/p73 binding site located in front of the minimal TATA box of the *c-fos* promoter (Figure 1E). Over-expression of TAp73 β induced the activity of the promoter by about 10 fold (data not shown). In presence of TAp73 β , the transcriptional activity of the reporter gene was increased progressively with the amount of co-transfected CamKII expression vector (Figure 1E). Altogether these results indicate that CamKII can phosphorylate TAp73 β and enhance its activity.

CamKII increases TAp73 protein levels via protein stabilization

One of the described mechanisms to regulate overall TAp73 activity is through its stabilization (Bernassola et al., 2004; Sayan et al., 2010). Therefore, to further understand the consequence of CamKII-mediated TAp73 phosphorylation, we analyzed TAp73 protein level upon CamKII activation. Treatment of the cells with the proteasome inhibitor MG132 increased of TAp73 β protein levels (Figure 2A). Expression of the constitutively active CamKII led also to a substantial increase in TAp73 β protein levels, which seemed to be slightly further increased upon MG132 treatment. Quantification following normalization to GFP expression confirmed that the CamKII increased TAp73 β in control condition, but caused only a slight effect in presence of MG132 (Figure 2B). We then evaluated TAp73 protein stability in presence of CamKII using a pulse chase experiment. After transfection with TAp73 and CamKII expression vectors, cells were incubated with cycloheximide to block protein *de novo* synthesis and proteins were extracted at various time points. As observed in Figure 2A, expression of CamKII increased TAp73 β protein level (Figure 2C). Following treatment with cycloheximide, TAp73 protein levels declined progressively. Quantification of TAp73 β protein level relative to t0 indicated that CamKII increased the stability of the protein (Figure 2D). These data indicate that activation of CamKII led to an increase of TAp73 protein level, likely through a stabilization of the protein.

Importance of S81, S134 and S374 in TAp73 protein levels

As CamKII may target three phosphorylation sites in TAp73, we performed directed mutagenesis of these sites, individually or in various combinations. Mutations consisted into the replacement of the serine with the non-phosphorylatable and neutral alanine, generating 6 variants: S81A, S134A, S374A, “S81,134A”, “S81,374A”, “S134,374A” and “S81,134,374A”. Then, we explored how these mutations affected TAp73 β properties compared to the wild type protein.

First, we followed by Western blot protein levels in control condition and in presence of the proteasome inhibitor MG132 (Figure 3A). Quantification indicated that among the single mutants, only the S374A variant showed a decrease in protein levels in absence of MG132 (Figure 3A, B). The protein levels of all three single mutants were significantly increased by MG132, although with different intensity compared to wild type TAp73. Strikingly, the variant S81A was less sensitive to MG132 in contrast to the variant S134A whose protein level was strongly increased by MG132. Of the variants with multiple mutations, “S134,374A” displayed a significant reduced protein level in contrast to variants “S81,134A” and S81,374A” that presented increased protein levels (Figure 3C, D). The triple mutant did not show any significant difference compared to wild type TAp73 β (Figure 3E, F). These results indicate that all the mutated sites affected in a way TAp73 β protein levels. Interestingly, some of the variants (S81A, S374A, “S81,374A”, “S134,374A”) displayed reduced protein level in absence or in presence of MG132, which what would be to expect if they were involved in CamKII directed stabilization of TAp73. However, some of the variants showed also an increased in protein level in control or upon treatment with MG132.

We then measured the stability of the single mutation variants using a pulse chase experiments. TAp73 β protein levels of the variants were detected by Western blot from extracts prepared at various time points after incubation with cycloheximide (Figure 4A). Quantification of the blot and standardization indicated that the variant S134A presented an improved half-life compared to wild type TAp73 β protein, which was consistent with the observation that its protein accumulates more in cells (Figure 3A, B). Inversely, variants S81A and S374A showed a decreased stability. Altogether, it seems that the three site are involved in a complex control of TAp73 protein level.

To further understand the contribution of the three sites in CamKII-directed TAp73 stabilization we co-expressed in cells the constitutively active CamKII with the TAp73 β variants. Interestingly, the protein levels of the variant mutated in S81 (Figure 5A, B) and of the variant mutated in S374 (Figure 4C, D) were less increased by CamKII. In contrast, CamKII further increased the protein level of the variant mutated in S134 (Figure 5C, D). We then assessed the protein levels of the triple mutant “S81,134,374A” in presence of CamKII. We observed that CamKII was not able to increase significantly the protein level of the triple

mutant. There was only a slight increase of protein level in presence of CamKII and MG132 compared to MG132 alone.

Altogether, these results indicated that the three potential phosphorylation sites for CamKII are involved in the control of the protein stability of TAp73 β by CamKII. Importantly, the triple mutant was insensitive to CamKII-driven TAp73 β stabilization. However, each site contributes differently. One, S134, appears to favor protein stability, while S81 and S374 tend to reduce it. Therefore, these data show that the role of these three sites in CamKII-mediated regulation of TAp73 β protein level is complex.

Importance of S81, S134, S374 in TAp73 transcriptional activity

We observed that the three putative CamKII phosphorylation sites participated in the control of TAp73 β protein stability. We then decided to evaluate how mutations in these sites were affecting TAp73 transcriptional activity. Indeed, we could expect that changes in protein levels would directly impact on the transcriptional activity of TAp73. In addition, S81, S134, and S374 are located in the transactivation-PXXP domain, the DNA binding domain and the oligomerization domain, respectively, which might also impact directly on the ability of how TAp73 can drive transcription.

Hence, the transactivation activity of the variants was measured with the p53/p73 reporter gene used in Figure 1. Increasing amounts of TAp73 β variants were tested (0.05, 0.1, 0.3 μ g). All single TAp73 β variants displayed a reduced transcriptional activity (Figure 6A). This was especially surprising for the S134A variant that presented an increased accumulation in cells. Next, variants with multiple point mutations in the putative phosphorylation sites were tested. All variants with two mutations or the triple mutant showed a further decrease in their transcriptional ability compared to the single mutants (Figure 6B). In particular, the triple mutant displayed a reduction of more than 50% of its activity.

We then tested whether these mutants were still responsive to the expression of the dominant active CamKII. Progressively increased quantities of CamKII expression vector were co-transfected. All single mutants showed a significant increase in their activity upon CamKII expression (Figure 6C). Variant S81A was first more enhanced by CamKII compared to wild type TAp73 β , but then reached a plateau with increased quantity of CamKII. However, the variant S374A had a reduced sensitivity toward the expression of CamKII, while the variant S134 did not show significant differences toward wild type TAp73. Interestingly, all the variants with multiple point mutations were significantly less induced by the expression of CamKII (Figure 6D). In particular, the triple mutant was almost not activated by CamKII expression.

These results indicate that the three sites participate in a complex control of TAp73 activity, likely through a cooperative mechanism involving in part the regulation of TAp73 protein stability. However, the change in protein stability alone cannot account by itself to the regulation of the transcriptional activity.

Protein levels of TAp73 and TAp73 target genes are induced in neurons upon intracellular Ca²⁺ level changes

Multiple functions have been described for CamKII in cells. However, its role in the control of cell survival and death is still controversial. Some studies described that CamKII favors cell survival (Bok et al., 2007; Borodinsky et al., 2002). Inversely, more recent studies showed that CamKII could trigger cell death (Ashpole et al., 2013; Erickson et al., 2008; Goebel, 2009; Liu and Templeton, 2008).

To investigate the physiological relevance of the regulation of TAp73 by CamKII, we decided to focus on the nervous system in which CamKII has been well studied. We decided to use primary cultures of cerebellar granular neurons, in which survival is controlled by intracellular Ca²⁺ concentrations and CamKII (Borodinsky et al., 2002). Indeed, the survival of these neurons in culture requires an elevated extracellular concentration of K⁺ (HK) that maintains a slightly elevated intracellular concentration of Ca²⁺. Inversely, treatment with high doses of glutamate, often associated with pathological situation, lead to neuronal cell death *via* the rise of intracellular Ca²⁺ concentration released from intracellular stores (Lau and Tymianski, 2010; Mody and MacDonald, 1995). The exact molecular mechanisms of glutamate toxicity are still being elucidated, but it was also shown that inhibition of CamKII activity reduces glutamate neurotoxicity (Ashpole et al., 2013; Goebel, 2009).

Neurons were isolated from 7 day-old mice and after dissociation grown in defined medium for 12 days to allow terminal differentiation (Gaiddon et al., 1999b). We first used a MTT assay to establish the survival response of the granular neurons in our conditions following treatment with high concentrations of glutamate (Glu; 250mM) and a low concentration of K⁺ in the extracellular medium (LK) (Figure 7A). LK and high glutamate (Glu) led to a reduced neuronal survival at 48h and 72h after treatment. We established also the expression of TAp73 under these conditions. RT-qPCR analysis showed that both treatments induced moderately (up to 1.8 fold) TAp73 expression (Figure 7B). However, protein levels for TAp73 were strongly up-regulated after glutamate and LK treatments (Figure 7C). The induction of TAp73 protein level correlated with the expression of the p73 target gene *puma* (Figure 7D). These results indicate that treatment affecting intracellular concentration of Ca²⁺ impact on TAp73 protein levels and target gene expression.

We then analyzed the contribution of CamKII to these processes. We first followed neuronal survival after co-treatment with high concentration of glutamate and an inhibitor of CamKII

(KN62, 50 nM). The CamKII inhibitor partially restored neuronal survival (Figure 8A). We then assessed the respective role of TAp73 and CamKII in neuronal cell death using TAp73 siRNA silencing and the CamKII inhibitor. TAp73 siRNA were co-transfected with a GFP expression vector. After 16 hours of treatment with glutamate and CamKII inhibitor, transfected cells were fixed and nuclei were labeled with DAPI. Cells were then visualized under the microscope to analyze the morphologies of nuclei and neurites in GFP positive cells (Figure 8B). Neurons undergoing death presented a condensed or fragmented nucleus associated with punctuated neurites. Dying neurons were quantified in the different conditions. We observed that inhibition of TAp73 expression or CamKII activity reduced significantly glutamate neurotoxicity (Figure 8C).

We then assessed the consequence of CamKII inhibition on TAp73 protein level in neurons by Western blot. CamKII inhibition reduced TAp73 protein induced by high concentration of glutamate (Figure 8D). This effect correlated with a reduction of *puma* expression following CamKII inhibition (Figure 8E). To further establish the functional interaction between CamKII activity and TAp73 function in neurons, we used a reporter gene assay in the cerebellar granules. Overexpression of CamKII induced the transcriptional activity of TAp73 β (Figure 8F). High glutamate concentration also induced significantly TAp73 β -dependent transcription. Importantly, we observed that CamKII inhibition reduced drastically TAp73 β -dependent transcription both in control conditions and in presence of high glutamate.

Altogether, these results indicate that there is a functional interaction between CamKII and TAp73 that participate in neuronal cell death induced by high concentration of glutamate.

DISCUSSION

P73 proteins are involved in diverse biological processes such as neuronal differentiation and survival (Killick et al., 2011). The precise signaling pathways linking p73 proteins to their pathophysiological roles are much less characterized compared to its homologue p53 and are still intensely investigated. To get insight on these pathways, we analyzed the protein sequence of p73 and identified putative phosphorylation sites for known kinases. We identified 3 phosphorylation sites (S81, S134, S374) for the calcium-calmodulin dependent kinase 2 (CamKII). The study presented here demonstrates that CamKII phosphorylates TAp73 proteins and regulates its activity. In addition, we identified a CamKII-TAp73 pathway that participates in neuronal apoptosis induced by regulators of the intracellular Ca²⁺.

CamKII phosphorylates and regulates TAp73 protein activity

CamKII has been shown to be mostly activated through a calcium-calmodulin kinase dependent process in which the regulatory domain of CamKII opens to allow the active site

to phosphorylate its target proteins (Hell, 2014). For instance, purified CamKII phosphorylated purified TAp73 β when incubated in presence of Ca²⁺ and calmodulin (Figure 1). This result combined with the presence of potential CamKII phosphorylation sites detected by the Scan site bioinformatics tool strongly suggests that CamKII directly phosphorylates TAp73 protein. *In vitro*, the phosphorylation of TAp73 β by CamKII seemed to be in the same range than the well-described auto-phosphorylation process of CamKII (Hudmon and Schulman, 2002). Hence, this suggests that TAp73 proteins might represent a good target for CamKII. Unfortunately, our attempt to co-immunoprecipitate TAp73 β with CamKII *in vivo* and to develop a TAp73 phospho-specific antibody failed. Therefore, it is yet difficult to establish *in vivo* the efficiency of this process compared to other known CamKII targets.

Interestingly, the expression of a constitutively active form of CamKII in cells stimulated the TAp73-dependent transcription (Figure 1), both on an exogenous artificial reporter gene and on endogenous TAp73 target genes (*p21*, *p57*). Based on the existence of the three putative CamKII phosphorylation sites and the *in vitro* phosphorylation of TAp73 β by CamKII, we concluded that the stimulation of TAp73 activity is mediated by the phosphorylation. This hypothesis is supported by the observation that replacement of the three serines by alanines in the three putative phosphorylation sites annihilated the effect of CamKII on TAp73 β transcriptional activity (Figure 6).

The stimulation of the transcriptional activity might implicate different molecular processes, as the three CamKII sites are located in three different domains of TAp73 β : S81 in the transactivation-PXXP domain, S134 in the DNA binding domain, and S374 in the oligomerization domain. Hence, a modification at each of these sites might regulate TAp73 activity differently, either by changing the interaction with the transcription machinery, the binding to response elements in promoters, or the formation of oligomers. In addition, post-translational modifications in the transactivation domain of p53 or p73 have been shown to affect protein stability (Maisse et al., 2003) (Benosman et al., 2011). In the case of CamKII, the protein expression profiles of TAp73 β indicated that CamKII induces accumulation of TAp73 β and slightly increases its stability (Figure 2). Expression of CamKII further favors the stabilization of exogenously expressed TAp73 β when the proteasome machinery is blocked. This observation might suggest that the inhibition of the proteasome machinery was not complete in our conditions, or that the phosphorylation of TAp73 β by CamKII could also impact on another mechanism of degradation of TAp73. We previously described such complex mechanism of degradation of Δ Np73 following phosphorylation at T86 by JNK (Benosman et al., 2011). Additional studies using protease inhibitors for other proteases might clarify this point. It remains also to understand how the phosphorylation event might lead to TAp73 stabilization. One possibility would be through a diminution of the interaction with known TAp73 ubiquitin ligases, such as Itch (Rossi et al., 2005). Alternatively, it might

favor the interaction with deubiquitinases, although none have been yet identified for TAp73. Co-immunoprecipitation studies will help to better understand how CamKII favors TAp73 stabilization.

The detailed analysis of the variants of TAp73 β mutated in the three phosphorylation sites indicates also that there is no perfect correlation between the transcriptional activity of the variants and their accumulation in cells (Figure 3, 5, 6). Hence, it is likely that in addition to stabilization other molecular mechanisms are involved in how CamKII regulates the activity of TAp73. One hypothesis could be that phosphorylation in S134 might change DNA affinity or selectivity. Alternatively, phosphorylation in S81 could modify the affinity for CBP, or other transcription factors of the basic transcription machinery (Zeng et al., 2000). Finally, the phosphorylation in S374 could also change the composition of the oligomers (Gaiddon et al., 2001). Evidently, all these mechanisms are not mutually exclusive and might as well co-exist.

Properties of the TAp73 variants mutated in the S81, S134 and S374 CamKII sites

The general impression our results point to is the existence of a complex regulation of TAp73 involving the CamKII serine phosphorylation sites. Indeed, each variant presenting alanines instead of serines in one or a combination of the putative phosphorylation sites displayed an activity and a protein accumulation pattern slightly or profoundly different from the wild-type TAp73 β protein. In addition, some of the mutations had an effect inverse to what we expected. For example, mutation in S134 tended to stabilize TAp73, although the transcriptional activity of this variant seemed unaffected. Similarly, mutation in S81 tends to improve the CamKII-directed stimulation of the transcriptional activity of this variant at low dose of CamKII. It is yet difficult to understand these apparent contradictions. One possible explanation would be that CamKII does not target all of these sites *in vivo*. However, the fact that the combination of two of these mutations, and even more with all three mutations, further diminished the transcriptional activity of TAp73 β and its activation by CamKII supports that all three serines might be targeted by this kinase and might play distinctive functions. For instance, the fact that S134 accumulated well in cells but is poorly inducing the reporter gene used might reflect that this mutant interacts less with DNA. It might also suggest that this variant might display a different selectivity for binding sequences in promoters. Hence, a better understanding would be gained by an additional characterization of the properties of these mutants by using CHIP-seq analyzes and by looking at the activation of different TAp73 target genes.

Several variants with single and multiple mutations displayed a difference in protein accumulation and stability. Interestingly, the fact that MG132, in presence of CamKII, did not significantly further stabilize the triple mutant and in a lesser extent the variant S81 indicates that the proteasome pathway plays a role in CamKII-mediated stabilization of TAp73. As

pointed out above, the differences of stability between the variants might be caused by differences in their interaction with ubiquitin ligases, deubiquitinases, or specific proteases (i.e. calpains). Such changes in the interaction with ubiquitin ligases might also be triggered by a modification of TAp73 subcellular localization. Interestingly, TAp73 variants mutated in the CamKII phosphorylation sites displayed different pattern in term of subcellular localization (data not shown). Co-immunoprecipitation and cellular fractionation studies using the mutants might clarify the role of each mutation in CamKII-mediated TAp73 stabilization.

Although the general scheme remains complex, the analyses performed with the single and multiple mutants indicate that all three sites participate in the regulation of TAp73 accumulation and activity by CamKII. This collaborative mechanism is well illustrated by the fact that the triple mutant is the only one that loses almost completely the sensitivity toward CamKII activation.

Pathophysiological functions of a CamKII-TAp73 signaling

P73 and CamKII have been investigated for their role in the development, the maintenance and the function of the nervous system (Killick et al., 2011). More precisely, TAp73 has been described to favor neuronal differentiation, to be important for progenitor maintenance, and to be involved in neuronal apoptosis in the context of Alzheimer. CamKII has also a role in neuronal differentiation and in the control of neuronal survival (Hell, 2014) (Soderling, 1999) (Racioppi and Means, 2012). For the later, the subject is still a controversy as some studies indicated that CamKII might protect neurons while more recent studies indicate the reverse (Ashpole et al., 2013; Bok et al., 2007; Borodinsky et al., 2002; Erickson et al., 2008; Goebel, 2009; Liu and Templeton, 2008). However, based on their potentially crucial role in neuronal survival, we investigated the functional interaction of CamKII and TAp73 in this context. The data we collected using primary culture of neurons strongly support that a CamKII-TAp73 axis is indeed involved, at least in part, in the regulation of neuronal cell death. Indeed, we showed that inactivation of CamKII or TAp73 reduced significantly neuronal cell death induced by high and neurotoxic doses of glutamate. The role of TAp73 in glutamate neurotoxicity is further supported by its positive regulation at the transcriptional and at the protein level in response to glutamate treatment. In addition, the transcriptional activity of TAp73, observed both on a reporter gene and the TAp73 target gene *puma*, is induced by glutamate. Importantly, the accumulation of TAp73 proteins and the TAp73-dependent transcriptional activity are significantly reduced by a CamKII inhibitor KN62, suggesting a functional interaction between the two proteins. Similar results were obtained with other CamKII inhibitors (i.e. KN93). Interestingly, we observed that another treatment, a reduced extracellular concentration of K⁺ (LK), also regulates the protein level of TAp73. Both

treatments, glutamate and LK, are described as regulators of the intracellular Ca^{2+} levels, which themselves are controlling the activity of CamKII.

Therefore, if we take together the different data described in this publication, it is tempting to hypothesize that in neurons there is a signaling pathway responsive to alteration of intracellular Ca^{2+} levels that trigger the activation of CamKII, which in turn might phosphorylate TAp73 on three different sites, S81, S134, and S374, favoring TAp73 protein accumulation and activity. In the case of a high dose of glutamate, this might lead to neuronal cell death. As post-synaptic high glutamate concentrations have been described to play a role in neurodegenerative syndromes, such as Alzheimer and neuroAIDS, it is tempting to imagine a possible participation of the CamKII-TAp73 signaling pathway in the neurodegenerative processes associated with these diseases (Lau and Tymianski, 2010).

However, we cannot exclude that under other physiological conditions this pathway might control different functions of TAp73 in neurons, such as neuronal differentiation or precursor maintenance. In addition, it remains also to establish whether TAp73 is a target of all CamKII isoforms or only of a subset of them. Finally, CamKII activation, although classically seen as being triggered exclusively by Ca^{2+} , has recently also been linked to other events. Indeed, heavy metals, and more interestingly changes in the oxidative intracellular environment, can activate CamKII, causing cell death in cardiac muscle (Erickson et al., 2008; Liu and Templeton, 2008). Hence, a CamKII-TAp73 signaling pathway might be involved in a broader scheme than just the homeostatic response of Ca^{2+} in neurons.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: CamKII phosphorylates TAp73 and induces its activity. **A.** Table indicating the localization of three putative phosphorylation sites for CamKII in TAp73 proteins. Confidence scores are indicated. **B.** Schematic representation of TAp73a with principal known functional domains: TAD, Transactivation domain; PXXP, PXXP rich region; DBD, DNA binding domain; OD, oligomerization domain; SAM, SAM domain. **C.** Immuno-purified TAp73 β (100 ng), calmodulin (100 ng) and CamKII (100 ng) were co-incubated in presence of $\text{ATP}\gamma^{32}\text{P}$. Proteins were then separated on SDS-PAGE and radioactivity incorporation was visualized by autoradiography. **D.** HEK 293 cells were transfected with expression vectors encoding TAp73 β and a constitutively active form of CamKII. Total mRNAs were extracted and *p21* and *p57* transcripts were quantified by RT-qPCR. * Indicates statistically significant differences tested by a one way analysis of variance followed by a Tuckey test by pairs ($p < 0.05$). **E.** HEK 293 cells were co-transfected with a TAp73 β expression vector (TAp73 β), increasing quantities of an expression vector encoding the constitutively active form of CamKII (CamKII), and a p53/p73 reporter gene containing 6 p53 responsive elements from the *bax* gene upstream of the minimal *c-fos* TATA box and the luciferase cDNA (p53RE min

luc). A reporter gene containing a luciferase cDNA driven by the promoter of the cytomegalovirus (CMV) was used to normalize transfection efficiency. * indicates statistically significant differences tested by a one way analysis of variance followed by a Neuman-Keuls test by pairs ($p < 0.05$).

Figure 2: CamKII stabilizes TAp73 protein. **A.** HEK 293 cells were transfected with expression vectors encoding TAp73 β and the dominant active form of CamKII. For normalization, a GFP expressing vector was used. MG132 (10 μ M) was used to block proteasome activity when indicated. Protein were extracted, quantified and separated (50 μ g of proteins) by SDS PAGE. TAp73 and CamKII were detected by Western blot using an anti-HA antibody revealed by ECL and visualized by CCD camera imaging (PXi, Syngene). **B.** Quantification of the bands was realized by the PXi software and normalized with GFP signals. Bars represent average of multiple measures relative to the control condition (Ct). Bars are standard deviations. * indicates statistically significant differences tested by a one way analysis of variance followed by a Neuman-Keuls test by pairs ($p < 0.05$). **C.** Pulse chase experiment on TAp73 β protein levels. TAp73 β and CamKII expression vectors were co-transfected in HEK 293 cells for 24h. Then cells were treated with cycloheximide (150 μ M) for the indicated time. Proteins were extracted, separated (50 μ g of proteins) on SDS-PAGE, and TAp73 β proteins were detected by Western blot using the anti-HA antibody. Actin was used to control protein quantities and charge. **D.** Quantification of the bands obtained in C was realized by the PXi software and normalized with GFP signals. Results are presented relative to t0.

Figure 3: Role of S81, S134, and S374 in TAp73 protein accumulation. **A, C, E.** HEK 293 cells were transfected with the indicated expression vectors encoding for TAp73 β variants harboring single point mutation into alanine at serine 81 (S81A), 134 (S134A) or 374 (S374A), or combinations of these mutations (S81,134A; S81,374A; S134,374A). Cells were treated with MG132 (10 μ M) for 6 h before harvesting when indicated. Protein were extracted and separated (50 μ g of proteins) on SDS PAGE. TAp73 β proteins were detected using anti-HA antibody. GFP and actin were used as transfection and loading controls. **B, D, F.** Quantification of blots using PXi software (Syngene). Bars indicate the intensity of the bands on the blots relative to wild type TAp73 β in absence of MG132. GFP was used for normalization.

Figure 4: Impact of phosphorylation site mutation on TAp73 protein stability. **A.** Pulse chase experiment on protein levels for single mutation variants. TAp73 β single mutation variants and CamKII expression vectors were co-transfected in HEK 293 cells for 24h. Then cells were treated with cycloheximide (150 μ M) for the indicated time. Proteins were extracted,

separated (50 µg of proteins) on SDS-PAGE, and TAp73β proteins were detected by Western blot using the anti-HA tag antibody. Actin was used to control protein quantity and charge. **B**. Quantification of the bands obtained in A was realized by the PXi software and normalized with GFP signal. Results are presented relative to t0.

Figure 5: Loss of putative TAp73 phosphorylation sites impacts on CamKII-directed changes in TAp73 accumulation. A, C, E. HEK293 cells were co-transfected with the indicated expression vectors encoding TAp73β variants harboring single point mutation into alanine at serine 81 (S81A), 134 (S134A) or 374 (S374A), or combinations of these mutations (S81,134A; S81,374A; S134,374A) and the expression vector encoding for the constitutively active CamKII (CamKII). Cells were treated with MG132 (10µM) for 6 h before harvesting when indicated. Protein were extracted and separated (50 µg of proteins) on SDS PAGE. TAp73β proteins were detected using anti-HA antibody. GFP and actin were used as transfection and loading controls. **B, D, F.** Quantification of blots using PXi software (Syngene). Bars indicate the intensity of the bands on the blots relative to wild type TAp73β in absence of MG132. GFP was used for normalization.

Figure 6: Transcriptional properties of the TAp73β variants mutated in the putative phosphorylation sites. HEK 293 cells were co-transfected with a TAp73β expression vector encoding for the variants mutated in the putative phosphorylation sites alone (**A, B**) and increasing quantities of an expression vector encoding for the constitutively active form of CamKII (CamKII) (**C, D**), and a the p53RE min luc reporter gene described above. A reporter gene containing a luciferase cDNA driven by the promoter of the cytomegalovirus (CMV) was used to normalize transfection efficiency. * Indicates statistically significant differences tested by a one way analysis of variance followed by a Tuckey test by pairs ($p < 0.05$). Data are the means of three independent experiments.

Figure 7: Regulation of TAp73 in neuronal cell death caused by inducers of intracellular Ca²⁺ alterations. A. Neurons were cultured from 7 day-old mice in defined medium for 12 days before treatment for 48h and 72h with glutamate (Glu; 250 mM) or with a medium with reduced K⁺ (LK; 5 mM) compared to control (Ct; 25 mM K⁺). Neuronal survival was evaluated using a MTT test. Results are presented in % compared to the control condition (Ct). Bars represent means with standard deviation of 8 wells from one experiment out of four independent experiments. * Indicates statistically significant differences tested by a one way analysis of variance followed by a Tuckey test by pairs ($p < 0.05$). **B, D.** Neurons were treated for the indicated time with glutamate or a medium with reduced K⁺. Cells were lysed and total RNA were extracted and reverse transcribed (1 µg). qPCRs for TAp73 and puma

were performed. Bars correspond to means of normalized (TBP) and calibrated (Ct = 100) values with standard deviation of triplicates from one experiment out of three independent experiments. * Indicates statistically significant differences tested by a one way analysis of variance followed by a Tuckey test by pairs ($p < 0.05$). **C.** Neurons were treated for the indicated times with glutamate or a medium with reduced K^+ . Cells were lysed and proteins (75 μ g) were separated on a 10 % SDS-PAGE and immunoblotted with the p73 and actin antibodies.

Figure 8: Role of TAp73 and CamKII in neuronal cell death caused by inducers of intracellular Ca^{2+} alteration. **A.** Neurons were cultured from 7 day-old mice in defined medium for 12 days before treatment for 48h and 72h with glutamate (Glu; 250 mM) compared to control (Ct; 25 mM K^+). CamKII inhibitor (CamKII i., KN62 100 nM) was added when indicated. Neuronal survival was evaluated using a MTT test. Results are presented in % compared to the control condition (Ct). Bars represent means with standard deviation of 8 wells from one experiment out of four independent experiments. * Indicates statistically significant differences tested by a one way analysis of variance followed by a Tuckey test by pairs ($p < 0.05$). **B. C.** Neurons were transfected with a GFP expression vector and either with TAp73 siRNA duplexes. After 24h, cells were left untreated (Ct) or treated with glutamate or/and CamKII inhibitor (CamKII i.) for 24h. Cells were then fixed, stained with DAPI and observed with a fluorescence microscope. Upper panel **D** shows a GFP-positive neuron in glutamate condition. Lower panel **B** shows the nucleus of the same neuron being altered. The graph (**C**) represents the percentage of dead cells among the GFP-positive cells counted. Bars correspond to means of three wells of a representative experiment with SD out of three independent experiments. * Indicates statistically significant difference tested by a one way analysis of variance followed by a Tuckey posttest by pairs ($p < 0.05$). **D.** Neurons were treated for the 18h with glutamate. CamKII inhibitor (CamKII i., KN62 100 nM) and MG132 (10 mM) were added when indicated. Cells were lysed and proteins (75 μ g) were separated on a 10 % SDS-PAGE and immunoblotted with the p73 and actin antibodies. **E.** Neurons were transfected with scramble siRNA (Ct and CamKII i. conditions) or siRNA against TAp73 (40nM, siTAp73). As indicated, neurons were treated with CamKII inhibitor (CamKII i.) and glutamate (Glu). Cells were lysed and total RNA were extracted and reverse transcribed (1 μ g). qPCRs for *puma* were performed. Bars correspond to means of normalized (TBP) and calibrated (Ct = 100) values with standard deviation of triplicates from one experiment out of three independent experiments. * Indicates statistically significant differences tested by a one way analysis of variance followed by a Tuckey test by pairs ($p < 0.05$). **F.** Neurons were co-transfected with a TAp73 β expression vector and the p53RE min luc reporter gene described above. As indicated, neurons were also transfected with an expression vector encoding the dominant active CamKII (CamKII), or treated with glutamate (Glu) or/and with

the CamKII inhibitor (CamKII i.). A reporter gene containing a luciferase cDNA driven by the promoter of the cytomegalovirus (CMV) was used to normalize transfection efficiency. Data are the means of three independent experiments. * indicates statistically significant differences tested by a one way analysis of variance followed by a Neuman-Keuls test by pairs ($p < 0.05$).

REFERENCES

- Antoine M, Gaiddon C and Loeffler JP (1996) Ca²⁺/calmodulin kinase types II and IV regulate c-fos transcription in the AtT20 corticotroph cell line. *Mol Cell Endocrinol* **120**(1): 1-8.
- Arrowsmith CH (1999) Structure and function in the p53 family [see comments]. *Cell Death Differ* **6**(12): 1169-1173.
- Ashpole NM, Chawla AR, Martin MP, Brustovetsky T, Brustovetsky N and Hudmon A (2013) Loss of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in cortical astrocytes decreases glutamate uptake and induces neurotoxic release of ATP. *J Biol Chem* **288**(20): 14599-14611.
- Benosman S, Gross I, Clarke N, Jochemsen AG, Okamoto K, Loeffler JP and Gaiddon C (2007) Multiple neurotoxic stresses converge on MDMX proteolysis to cause neuronal apoptosis. *Cell Death Differ*.
- Benosman S, Meng X, Von Grabowiecki Y, Palamiuc L, Hritcu L, Gross I, Mellitzer G, Taya Y, Loeffler JP and Gaiddon C (2011) Complex regulation of p73 isoforms after alteration of amyloid precursor polypeptide (APP) function and DNA damage in neurons. *J Biol Chem* **286**(50): 43013-43025.
- Bernassola F, Salomoni P, Oberst A, Di Como CJ, Pagano M, Melino G and Pandolfi PP (2004) Ubiquitin-dependent degradation of p73 is inhibited by PML. *The Journal of experimental medicine* **199**(11): 1545-1557.
- Billon N, Terrinoni A, Jolicoeur C, McCarthy A, Richardson WD, Melino G and Raff M (2004) Roles for p53 and p73 during oligodendrocyte development. *Development* **131**(6): 1211-1220.
- Bok J, Wang Q, Huang J and Green SH (2007) CamKII and CaMKIV mediate distinct prosurvival signaling pathways in response to depolarization in neurons. *Mol Cell Neurosci* **36**(1): 13-26.
- Borodinsky LN, Coso OA and Fiszman ML (2002) Contribution of Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase II and mitogen-activated protein kinase kinase to neural activity-induced neurite outgrowth and survival of cerebellar granule cells. *J Neurochem* **80**(6): 1062-1070.
- Bui T, Sequeira J, Wen TC, Sola A, Higashi Y, Kondoh H and Genetta T (2009) ZEB1 links p63 and p73 in a novel neuronal survival pathway rapidly induced in response to cortical ischemia. *PLoS ONE* **4**(2): e4373.
- Casciano I, Ponzoni M, Cunsolo C, Tonini G and Romani M (1999) Different p73 splicing variants are expressed in distinct tumour areas of a multifocal neuroblastoma [In Process Citation]. *Cell Death Differ* **6**(5): 391-393.
- De Laurenzi V, Costanzo A, Barcaroli D, Terrinoni A, Falco M, Annicchiarico-Petruzzelli M, Levrero M and Melino G (1998) Two New p73 Splice Variants, gamma and delta, with Different Transcriptional Activity. *The Journal of experimental medicine* **188**(9): 1763-1768.
- De Laurenzi V, Raschella G, Barcaroli D, Annicchiarico-Petruzzelli M, Ranalli M, Catani MV, Tanno B, Costanzo A, Levrero M and Melino G (2000) Induction of neuronal differentiation by p73 in a neuroblastoma cell line. *J Biol Chem* **275**(20): 15226-15231.
- DiComo C, Gaiddon C and Prives C (1999) p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **19** (2): 1438-1449.
- Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AJ, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ and Anderson ME (2008) A dynamic pathway for calcium-independent activation of CamKII by methionine oxidation. *Cell* **133**(3): 462-474.
- Gaiddon C, de Tapia M and Loeffler JP (1999a) The tissue-specific transcription factor Pit-1/GHF-1 binds to the c-fos serum response element and activates c-fos transcription. *Mol Endocrinol* **13**(5): 742-751.
- Gaiddon C, Larmet Y, Trinh E, Boutillier AL, Sommer B and Loeffler JP (1999b) Brain-derived neurotrophic factor exerts opposing effects on beta2- adrenergic receptor according to depolarization status of cerebellar neurons. *J Neurochem* **73**(4): 1467-1476.
- Gaiddon C, Lokshin M, Ahn J, Zhang T and Prives C (2001) A Subset of Tumor-Derived Mutant Forms of p53 Down-Regulate p63 and p73 through a Direct Interaction with the p53 Core Domain. *Mol Cell Biol* **21**(5): 1874-1887.

- Gaiddon C, Tian J, Loeffler JP and Bancroft C (1996) Constitutively active G(S) alpha-subunits stimulate Pit-1 promoter activity via a protein kinase A-mediated pathway acting through deoxyribonucleic acid binding sites both for Pit-1 and for adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein. *Endocrinology* **137**(4): 1286-1291.
- Goebel DJ (2009) Selective blockade of CamKII-alpha inhibits NMDA-induced caspase-3-dependent cell death but does not arrest PARP-1 activation or loss of plasma membrane selectivity in rat retinal neurons. *Brain Res* **1256**: 190-204.
- Hell JW (2014) CamKII: claiming center stage in postsynaptic function and organization. *Neuron* **81**(2): 249-265.
- Hooper C, Killick R, Tavassoli M, Melino G and Lovestone S (2006a) TAp73alpha induces tau phosphorylation in HEK293a cells via a transcription-dependent mechanism. *Neurosci Lett* **401**(1-2): 30-34.
- Hooper C, Tavassoli M, Chapple JP, Uwanogho D, Goodyear R, Melino G, Lovestone S and Killick R (2006b) TAp73 isoforms antagonize Notch signalling in SH-SY5Y neuroblastomas and in primary neurones. *J Neurochem* **99**(3): 989-999.
- Hudmon A and Schulman H (2002) Neuronal CA2+/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annual review of biochemistry* **71**: 473-510.
- Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F and Caput D (1997) Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* **90**(4): 809-819.
- Killick R, Niklison-Chirou M, Tomasini R, Bano D, Rufini A, Grespi F, Velletri T, Tucci P, Sayan BS, Conforti F, Gallagher E, Nicotera P, Mak TW, Melino G, Knight RA and Agostini M (2011) p73: a multifunctional protein in neurobiology. *Molecular neurobiology* **43**(2): 139-146.
- Klein A, Maldonado C, Vargas LM, Gonzalez M, Robledo F, Perez de Arce K, Munoz FJ, Hetz C, Alvarez AR and Zanlungo S (2011) Oxidative stress activates the c-Abl/p73 proapoptotic pathway in Niemann-Pick type C neurons. *Neurobiology of disease* **41**(1): 209-218.
- Lau A and Tymianski M (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **460**(2): 525-542.
- Laurenzi VD, Catani M, Costanzo A, Terrinoni A, Corazzari M, Levrero M, Knight R and Melino G (1999) Additional complexity in p73: induction by mitogens in lymphoid cells and identification of two new splicing variants epsilon and zeta [In Process Citation]. *Cell Death Differ* **6**(5): 389-390.
- Lee AF, Ho DK, Zanassi P, Walsh GS, Kaplan DR and Miller FD (2004) Evidence that DeltaNp73 promotes neuronal survival by p53-dependent and p53-independent mechanisms. *J Neurosci* **24**(41): 9174-9184.
- Li Q, Athan ES, Wei M, Yuan E, Rice SL, Vonsattel JP, Mayeux RP and Tycko B (2004) TP73 allelic expression in human brain and allele frequencies in Alzheimer's disease. *BMC Med Genet* **5**: 14.
- Liu Y and Templeton DM (2008) Initiation of caspase-independent death in mouse mesangial cells by Cd2+: involvement of p38 kinase and CaMK-II. *Journal of cellular physiology* **217**(2): 307-318.
- Lokshin M, Li Y, Gaiddon C and Prives C (2007) p53 and p73 display common and distinct requirements for sequence specific binding to DNA. *Nucleic Acids Res* **35**(1): 340-352.
- Maisse C, Guerrieri P and Melino G (2003) p73 and p63 protein stability: the way to regulate function? *Biochem Pharmacol* **66**(8): 1555-1561.
- Menendez D, Inga A and Resnick MA (2009) The expanding universe of p53 targets. *Nat Rev Cancer* **9**(10): 724-737.
- Million K, Horvilleur E, Goldschneider D, Agina M, Raguenez G, Tournier F, Benard J and Douc-Rasy S (2006) Differential regulation of p73 variants in response to cisplatin treatment in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *International journal of oncology* **29**(1): 147-154.
- Mody I and MacDonald JF (1995) NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca2+ release. *Trends Pharmacol Sci* **16**(10): 356-359.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**(1-2): 55-63.
- Murray-Zmijewski F, Lane DP and Bourdon JC (2006) p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ* **13**(6): 962-972.
- Obenauer JC and Yaffe MB (2004) Computational prediction of protein-protein interactions. *Methods Mol Biol* **261**: 445-468.
- Pozniak CD, Barnabe-Heider F, Rymar VV, Lee AF, Sadikot AF and Miller FD (2002) p73 is required for survival and maintenance of CNS neurons. *J Neurosci* **22**(22): 9800-9809.
- Pozniak CD, Radinovic S, Yang A, McKeon F, Kaplan DR and Miller FD (2000) An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death [see comments]. *Science* **289**(5477): 304-306.
- Racioppi L and Means AR (2012) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: roles in signaling and pathophysiology. *J Biol Chem* **287**(38): 31658-31665.

- Romani M, Tonini GP, Banelli B, Allemanni G, Mazzocco K, Scaruffi P, Boni L, Ponzoni M, Pagnan G, Raffaghello L, Ferrini S, Croce M and Casciano I (2003) Biological and clinical role of p73 in neuroblastoma. *Cancer Lett* **197**(1-2): 111-117.
- Rossi M, De Laurenzi V, Munarriz E, Green DR, Liu YC, Vousden KH, Cesareni G and Melino G (2005) The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *EMBO J* **24**(4): 836-848.
- Sayan BS, Yang AL, Conforti F, Tucci P, Piro MC, Browne GJ, Agostini M, Bernardini S, Knight RA, Mak TW and Melino G (2010) Differential control of TAp73 and DeltaNp73 protein stability by the ring finger ubiquitin ligase PIR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(29): 12877-12882.
- Soderling TR (1999) The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends in biochemical sciences* **24**(6): 232-236.
- Tissir F, Ravni A, Achouri Y, Riethmacher D, Meyer G and Goffinet AM (2009) DeltaNp73 regulates neuronal survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(39): 16871-16876.
- Wetzel MK, Naska S, Laliberte CL, Rymar VV, Fujitani M, Biernaskie JA, Cole CJ, Lerch JP, Spring S, Wang SH, Frankland PW, Henkelman RM, Josselyn SA, Sadikot AF, Miller FD and Kaplan DR (2008) p73 regulates neurodegeneration and phospho-tau accumulation during aging and Alzheimer's disease. *Neuron* **59**(5): 708-721.
- Wilson C, Henry S, Smith MA and Bowser R (2004) The p53 homologue p73 accumulates in the nucleus and localizes to neurites and neurofibrillary tangles in Alzheimer disease brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* **30**(1): 19-29.
- Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, Vagner C, Bonnet H, Dikkes P, Sharpe A, McKeon F and Caput D (2000) p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* **404**: 99-103.
- Zeng X, Li X, Miller A, Yuan Z, Yuan W, Kwok RP, Goodman R and Lu H (2000) The N-terminal domain of p73 interacts with the CH1 domain of p300/CREB binding protein and mediates transcriptional activation and apoptosis. *Mol Cell Biol* **20**(4): 1299-1310.

Figure 1

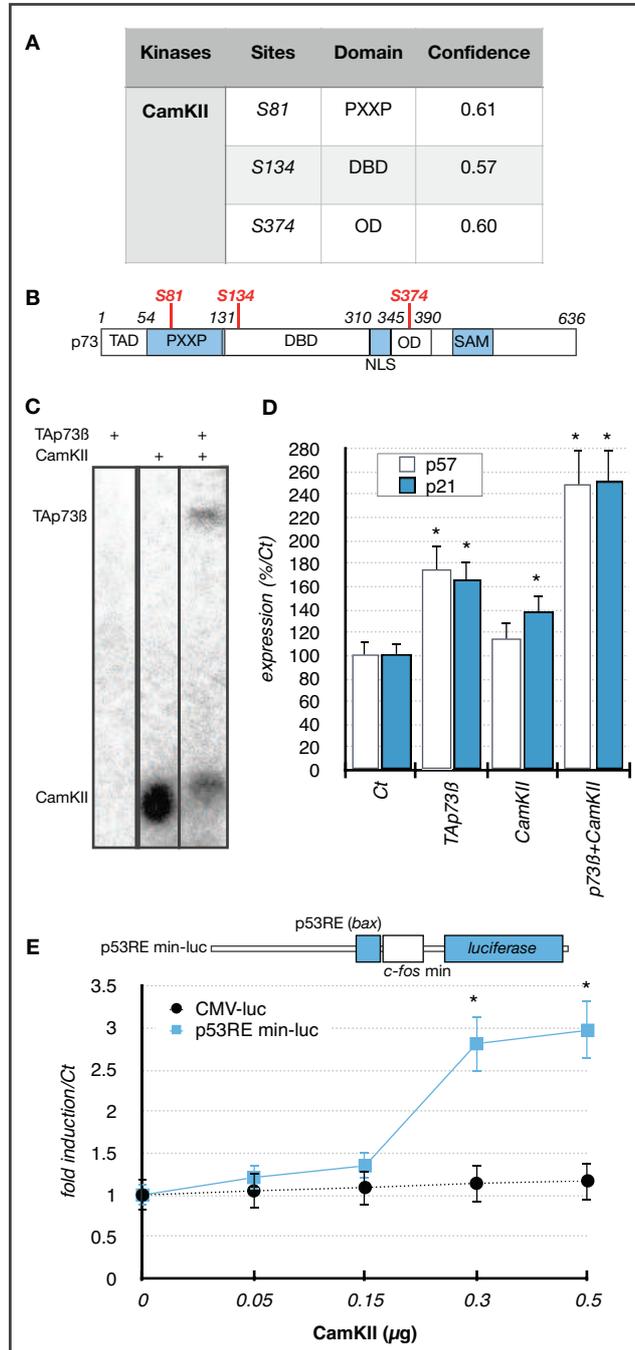


Figure 2

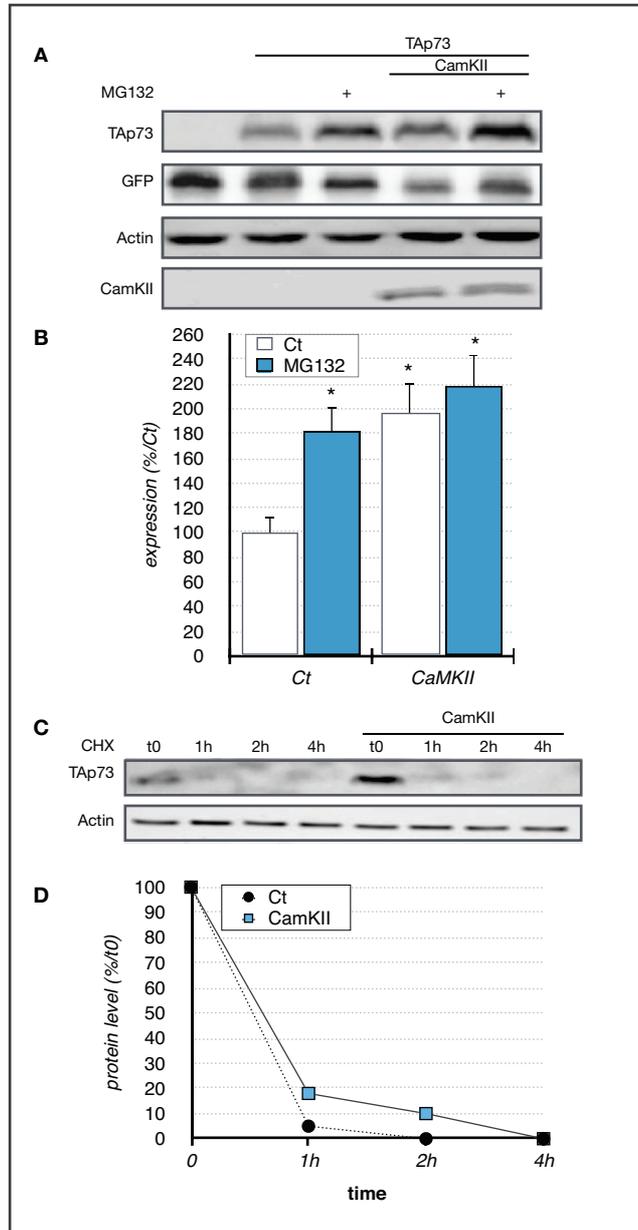


Figure 3

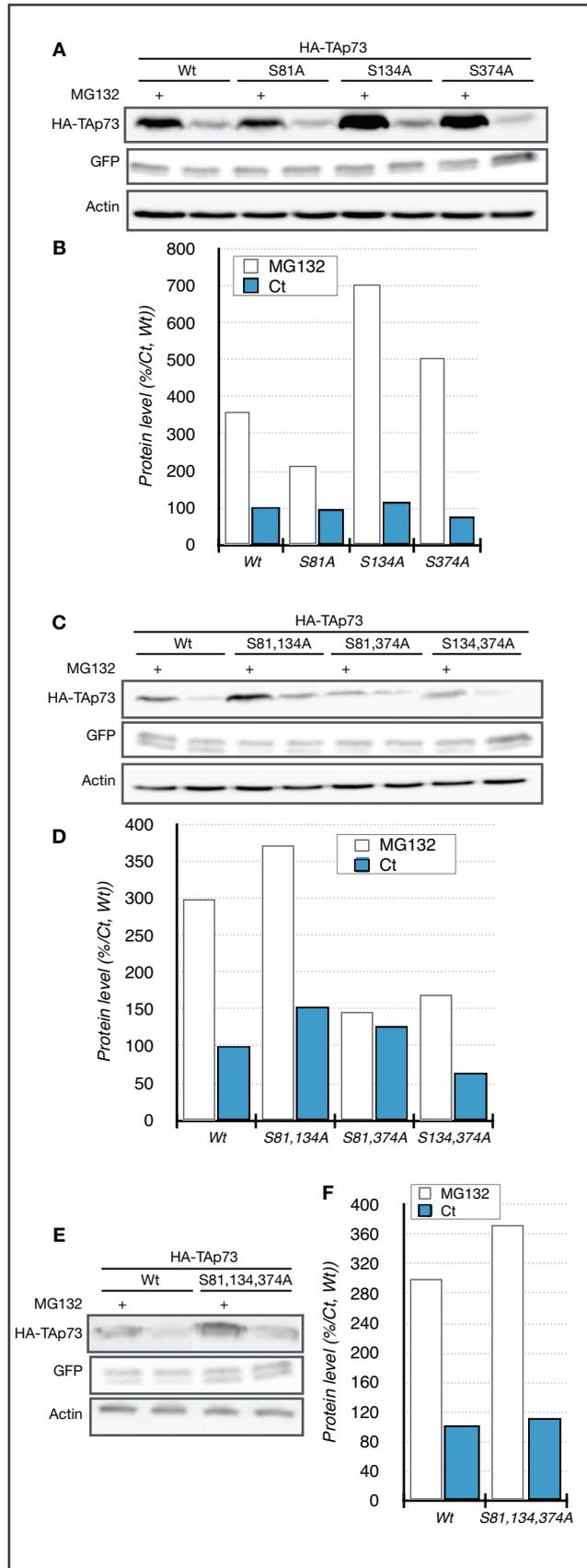


Figure 4

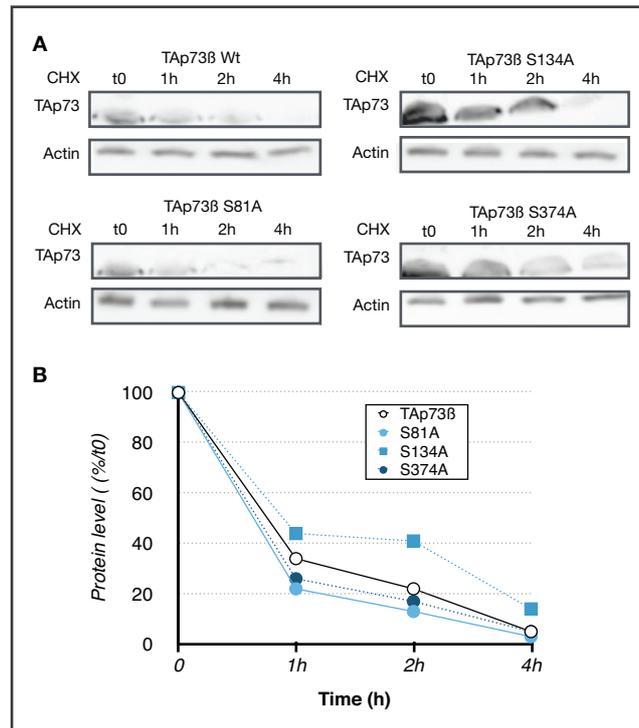


Figure 5

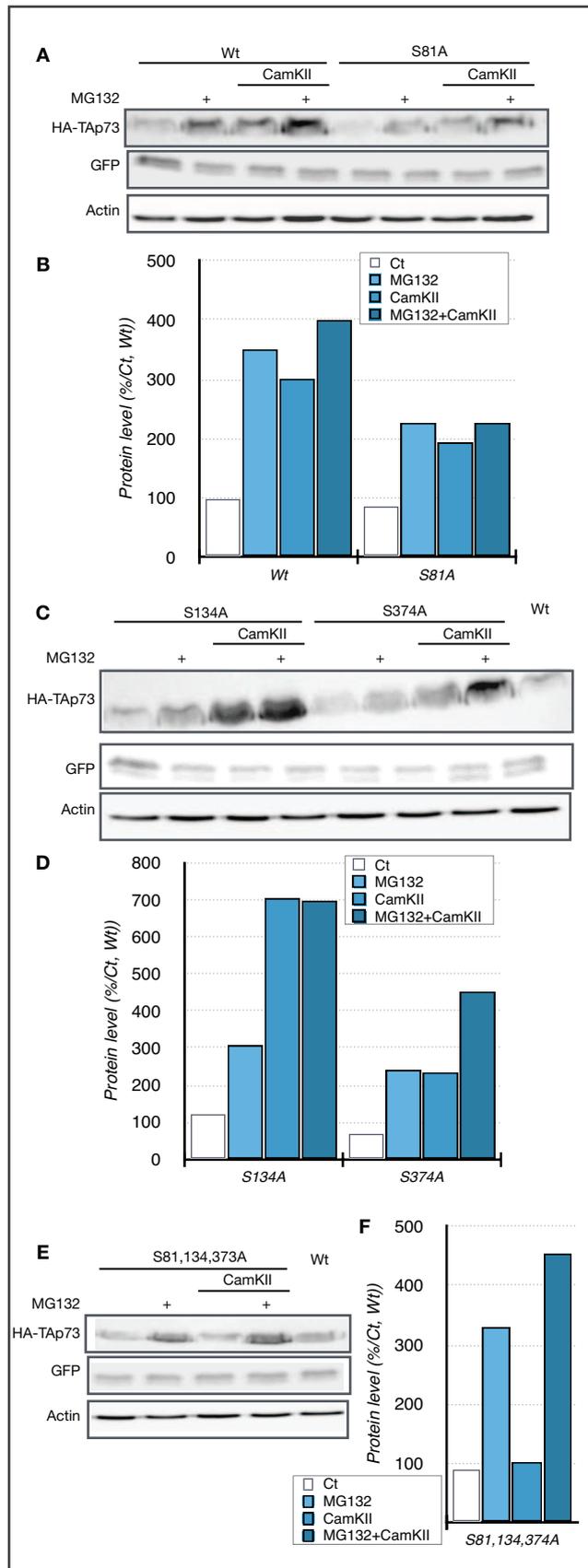


Figure 6

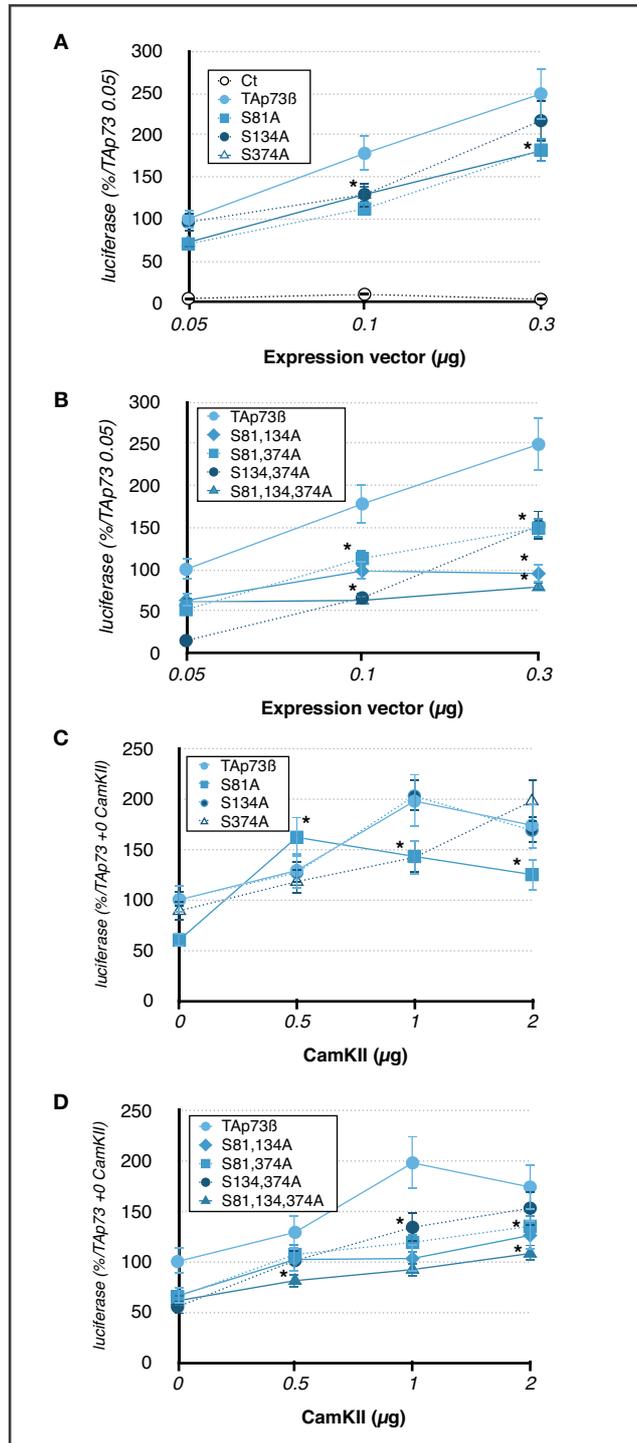


Figure 7

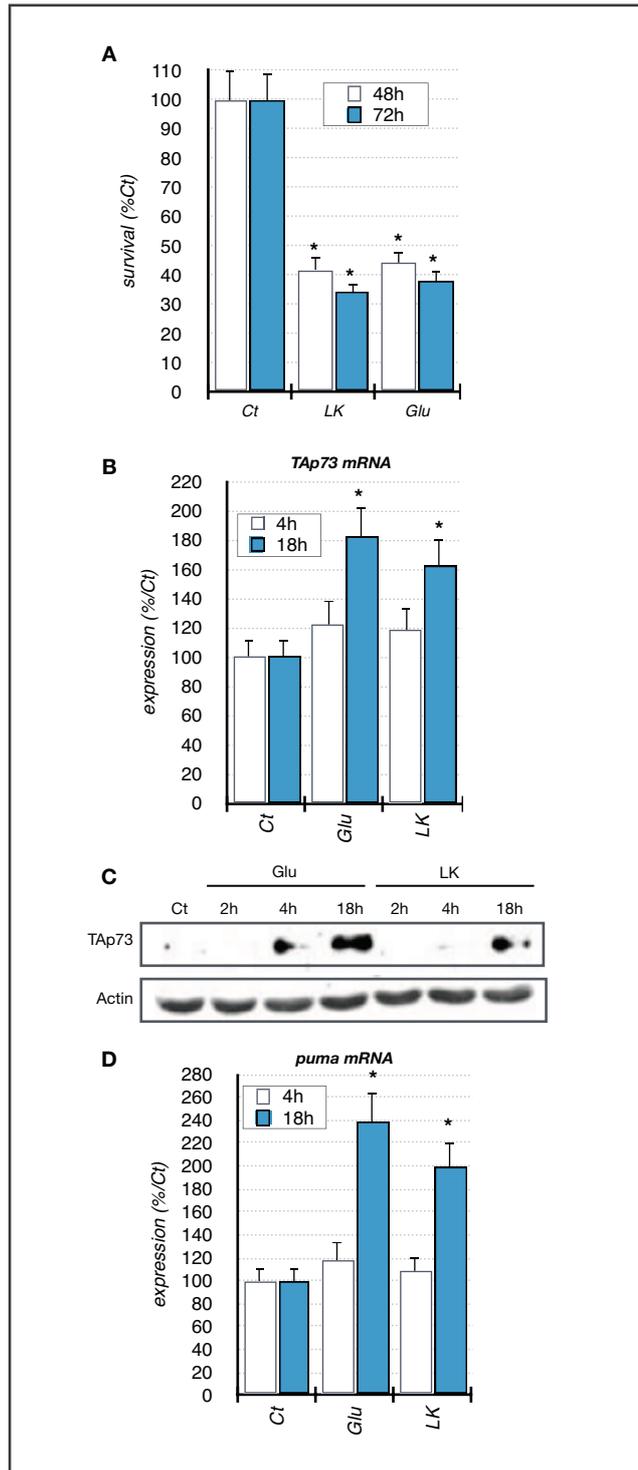
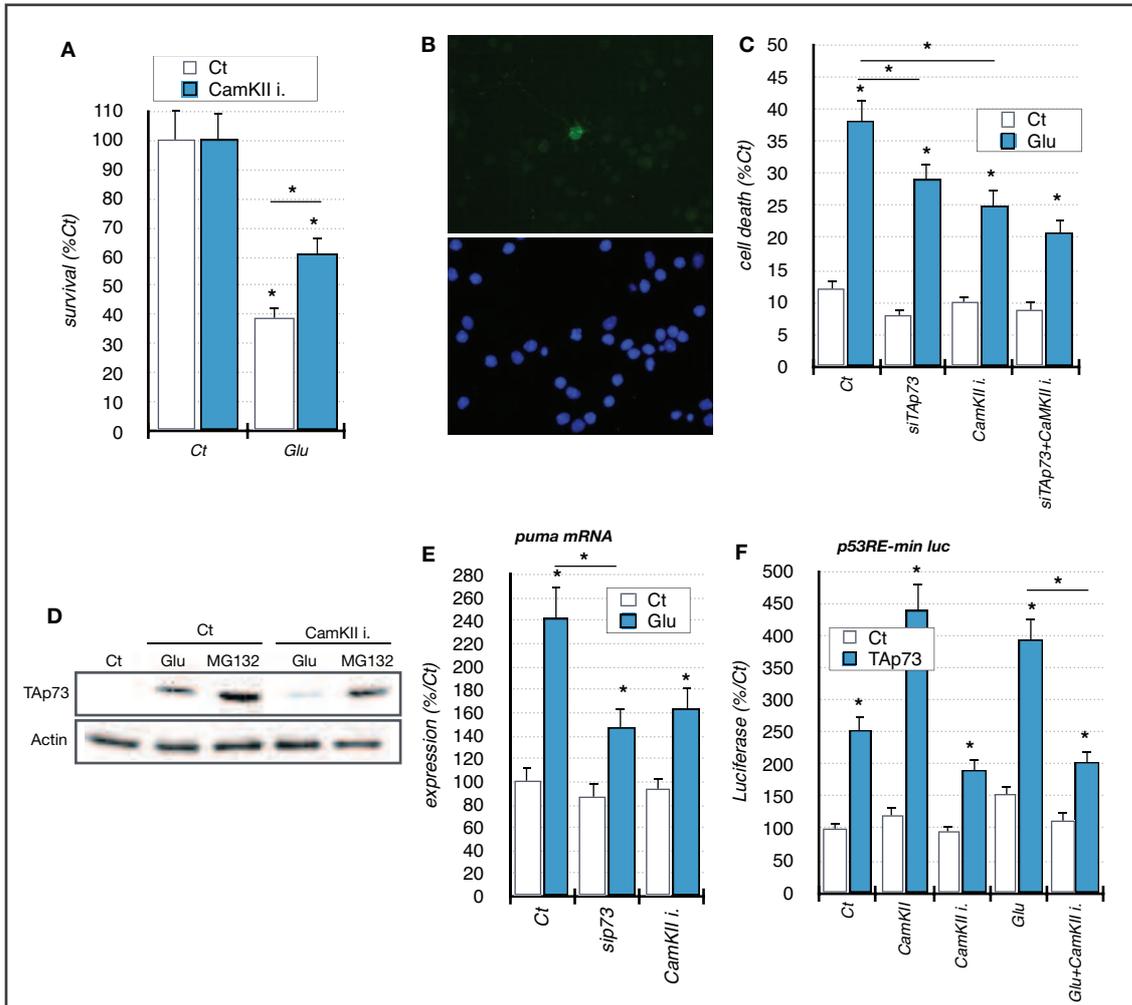


Figure 8



DISCUSSION

I- La régulation de p73 par les CamK dans le système neuronal

Le travail de thèse présenté ici avait pour objectif de comprendre davantage comment le facteur de transcription p73 est régulé au niveau post-traductionnel dans la cellule, mécanisme encore très peu connu. Ce projet s'est inscrit plus particulièrement dans le système neuronal, où p73 joue des rôles primordiaux et semble impliqué dans des pathologies neurodégénératives. Très rapidement, l'analyse bio-informatique nous a conduits à nous intéresser à un contexte encore plus précis : la régulation de p73 dans une cellule neuronale subissant des altérations calciques. Ainsi cette recherche s'est articulée en deux points, l'un adressait une question très moléculaire en identifiant la modification post-traductionnelle, l'autre reposait sur l'ambition d'inscrire cette régulation dans un contexte physiologique.

I-1. Caractérisation moléculaire de la régulation de p73 par les CamK

I-1.1 Identification de la phosphorylation de p73 par la CamKII

L'analyse bio-informatique a permis d'identifier des protéines susceptibles de réguler p73 au niveau post-traductionnel, dont la CamKII. Parce qu'elle partageait de nombreux points communs, exposés dans l'introduction et qu'aucune régulation a été encore démontré entre cette kinase et les membres de la famille p53, ce candidat a suscité notre intérêt. La phosphorylation *in vitro* a pu confirmer que la CamKII phosphoryle effectivement p73, avec des protéines purifiées. Trois sites présents sur les deux isoformes TA et ΔN seraient potentiellement phosphorylés par la CamKII : S81, S134 et S374. Positionnés sur différents domaines, la phosphorylation potentielle de ces sites pourrait entraîner des répercussions moléculaires différentes. En effet, le site S81A est situé dans le domaine de transactivation, le site S134 se trouve dans le domaine de liaison à l'ADN et le site S374 dans le domaine d'oligomérisation. Ainsi, cette régulation pourrait moduler l'activité du facteur de transcription, la capacité et l'affinité de celui-ci à se lier à l'ADN ou encore l'établissement des hétérocomplexes du facteur de transcription. D'ailleurs, la caractérisation des modifications post-traductionnelles de

p53, dans le passé, a déjà mis en lumière la pluralité des mécanismes de régulation. Ces études ont montrés que la régulation de ces membres peut s'effectuer sur leurs potentiels transcriptionnels, leurs sélectivités des gènes cibles, leurs stabilités, leurs localisations subcellulaires et leurs interactions avec des cofacteurs. Deuxièmement, ce qui est également intéressant de noter c'est que ces trois sérines sont conservées dans la séquence de p63 mais pas dans la séquence de p53 où l'on trouve une alanine ou une guanine à la place. Ainsi, cette régulation pourrait avoir été mise en place tout au long de l'évolution avec l'apparition de p73 et p63, conférant un caractère spécifique à ces deux protéines homologues dans la sensibilité de l'homéostasie calcique sur leurs fonctions. En ce sens, basé sur l'étude bio-informatique, il serait également intéressant dans le futur d'établir si cette régulation existe aussi au regard de p63.

I-1.2 Régulation de l'activité transcriptionnelle de p73 par la CamKII

L'enjeu suivant a été d'identifier les répercussions de cette phosphorylation par les CamK sur les fonctions de p73 *in cello*, notamment sur son activité transcriptionnelle. Premièrement, les expériences avec les gènes rapporteurs ont montré que l'activité de la CamKII amplifie proportionnellement la transcription des rapporteurs déclenchée par p73. Parce que la CamKII est connu pour être pro-apoptotique, nous avons choisi un rapporteur contenant l'élément de réponse d'un gène pro-apoptotique, BAX, afin d'évaluer si l'effet pro-apoptotique pouvait passer par un gène cible de p73. Deuxièmement, une autre approche expérimentale, la qPCR, nous a permis d'explorer si la CamKII pouvait également induire la transcription des gènes cibles non-apoptotiques de p73. Nous avons observé que la CamKII induisait moins fortement la transcription de ces gènes. Ceci n'écrase pas la possibilité que la CamKII pourrait affecter l'activité de p73 délectivement pour un sous-groupe de ses gènes-cibles. En effet, les précédentes études ont déjà illustré que la régulation de l'activité des membres de la famille p53 pouvait aussi jouer sur la spécificité des gènes cibles. Par exemple, à l'inverse de nos observations avec la CamKII, l'acétylation sur p73 réprimait la transcription des gènes cibles pro-apoptotiques mais induisait toujours la transcription des gènes cibles du cycle cellulaire (Zeng et al.,2000 ; Zeng et al., 2001). N'ayant eu l'opportunité de tester que l'effet inducteur de la CamKII sur la transcription d'un gène pro-apoptotique, il pourrait être intéressant d'explorer si la régulation de la CamK possède cet aspect sélectif en explorant la transcription de plusieurs types de gènes cibles, en utilisant d'autres gènes

rapporteurs et explorer la transcription d'un panel de gènes cibles par qPCR. Par ailleurs, une autre remarque est aussi très importante à considérer : certains gènes cibles sont communs entre les membres de la famille p53. D'ailleurs, l'élément de réponse utilisé dans l'expérience avec la luciférase est reconnu par p73 mais aussi par p53. Ainsi il ne faut pas non plus écarter la possibilité que la CamKII puisse également moduler p53 sur d'autres sites. Hypothèse d'autant plus légitime, lorsque l'on constate que le logiciel bioinformatique prédit 4 sites potentiellement phosphorylés par la CamKII sur p53 : T18, S376, T253 et T377. De plus, l'année dernière une équipe suédoise a également montré que l'activité de p53 était sensible à l'altération calcique et sans être scientifiquement prouvé, la CamKII serait selon eux, un candidat potentiel pour cette régulation (*Can G et al., 2013*). Il ne faut pas non plus oublier que la CamKII pourrait également réguler l'activité transcriptionnelle de p63 qui possède les mêmes sites de phosphorylations potentielles que p73. Ainsi, rechercher également l'impact de l'activité de la CamKII sur p53 et p63 serait aussi une piste future à explorer.

Basé justement sur l'analyse bioinformatique, nous voulions également identifier quel site pouvait être concerné par cette modulation transcriptionnelle. Différents mutants simples, doubles et triple de p73 ont été générés pour répondre à cette question en remplaçant les sérines par des alanines, empêchant ainsi la phosphorylation potentielle. Tout en conservant une activité transcriptionnelle dans les conditions physiologiques, le pool de variants de TAp73 répond différemment entre eux à l'augmentation de l'activité de la CamKII. Il est tout d'abord important de noter que l'activité des variants ne révèlent pas une régulation de type ON/OFF, où l'on aurait pu s'attendre à une perte totale de l'activité transcriptionnelle des variants. Lorsque l'on repense aux précédentes études qui ont montré que la régulation des membres de la famille p53 est extrêmement complexe et fine, on peut encore davantage comprendre ces observations (*Gu B et al., 2012 ; Finlanle et al., 2007 ; Collavin L et al., 2010*).

Premièrement, lorsque l'on analyse l'effet de la CamKII sur l'activité transcriptionnelle des mutants simples, on constate que l'activité transcriptionnelle du mutant S81A répond de manière intéressante en fonction de l'activité de la CamKII. Alors que l'activité augmente significativement lorsque la CamKII est faiblement activée, cette réponse tend légèrement à diminuer lorsque la CamKII est plus fortement exprimée. Cette observation

démontre une sensibilité intéressante de ce variant à l'activation de la CamKII, indiquant que le site S81 contribue à la régulation de l'activité de TAp73 observée avec la forme native. Même si après première réflexion, cela n'est pas surprenant si l'on se réfère au positionnement du site, localisé sur le domaine de transcription de la séquence p73, cela esquisse tout de même une régulation bien « sexy ». De plus, on constate que la mutation des autres sites n'entraîne pas de changement drastique dans la sensibilité de l'activité transcriptionnelle de p73 face à l'activité de la CamKII. De manière nuancée, les très légères modifications de transcription des variants S134 et S374, peuvent amorcer d'autres champs d'investigation : l'effet de la CamKII sur l'affinité de p73 pour l'ADN et les partenaires qui peuvent in fine moduler l'efficacité de la transcription. Il est évident que les approches les plus adéquates pour répondre à cette question sont l'expérience de chromatine-immunoprécipitation, qui va nous renseigner si les variants se lient aux mêmes gènes cibles ou non et la co-immunoprécipitation pour identifier si les partenaires sont différents. En ce sens, l'analyse de la sensibilité transcriptionnelle des variants doubles et triple pour la CamKII peut en partie confirmer l'intérêt d'explorer ces hypothèses. En effet, même si les mutations doubles et triple diminuent sensiblement l'effet inducteur de la CamKII sur l'activité de p73, elles ne la bloquent pas complètement. Ce qui est d'ailleurs d'autant plus surprenant pour les variants S81, 134A et S81,374A où l'on avait vu que la mutation S81 seule la réduisait. Cela pourrait laisser penser que les mutations de 134 et 374 restaurent l'effet inducteur de CamKII, perdu par la mutation du site 81. Par ailleurs, plus globalement, les diminutions d'activités transcriptionnelles des variants simples, doubles et triple en absence de l'expression de la CamKII constitutivement active peuvent s'expliquer par l'activité de la CamKII endogène, mais aussi par d'autres kinases ou co-facteurs qui pourraient cibler ces sites. Cette remarque est d'autant plus pertinente lorsque l'on découvre que l'analyse bio-informatique prédit également que le site S81 peut être phosphorylé par l'Akt-kinase, la caséine kinase et un autre groupe de phosphosérine-théronine kinase. Pour ce qui est des sites S134 et S374, ceux-ci sont potentiellement identifiés comme spécifiquement modifiés par la CamKII.

I-1.3 Régulation de la stabilité de p73 par la CamKII

I-1.3.a Effet de la CamKII sur l'isoforme TAP73

La deuxième grande question a été d'expliquer comment la CamKII favorise l'activité transcriptionnelle de p73. Nous avons vu dans l'introduction, que p73 peut être régulé au niveau protéique. Dans cet objectif, nous avons recherché si la CamKII modulait le niveau protéique de p73 en évaluant sa stabilité et déterminer quels sites pourraient être concernés par cette modification.

Nous avons tout d'abord démontré que la CamKII a un effet positif sur le niveau protéique de TAp73, comme pour l'activité transcriptionnelle. Ce qui pourrait déjà à première vue nous permettre d'établir un lien de cause à effet entre la stabilité et l'activité transcriptionnelle de p73 au regard de la CamKII. En second temps, nous avons voulu explorer quels sites prédits pourraient participer à cette régulation. L'étude de la stabilité des variants sous l'activation de la CamKII, nous apportent plusieurs informations. Premièrement, tous les sites représentent des éléments clés pour cette régulation. Les variants S81 et S374 perdent sensiblement l'effet inducteur de la CamKII sur leurs expressions. Concernant S374, situé dans le domaine d'oligomérisation, beaucoup d'hypothèses prennent naissance lorsque l'on sait que de nombreux partenaires modulent la stabilité de p73, tels que des ubiquitines ligases, p53 muté... Par exemple, il serait possible que la phosphorylation potentielle de S374 par la CamKII change la conformation protéique et modifie l'accès ou l'affinité des ces cofacteurs. Dans ce sens, deux approches seraient intéressante pour explorer cette idée, en effectuant des co-immunoprécipitations entre p73 et les partenaires et en comparant le niveau d'ubiquitylation de ces variants en réponse à la suractivité de la CamKII. De manière surprenante, on constate que le site 134 aurait un effet répresseur sur l'induction de la CamKII. En effet, l'expression du variant S134A est fortement augmentée par la CamKII, en comparaison avec le variant non muté. De plus, on constate que le niveau protéique du triple mutant n'est plus du tout sensible à la CamKII soulignant un caractère coopératif entre les sites sur cette régulation. Par ailleurs, l'expression de la CamKII favorise plus la stabilité de Tap73 exogène lorsque la machinerie protéosomique est bloquée par le MG132. Cette observation peut s'expliquer soit par une potentielle

inhibition incomplète du protéasome dans nos conditions, soit que la phosphorylation de TAp73 par la CamKII peut aussi être impliquée dans d'autres mécanismes de dégradation de p73. D'ailleurs, nous avons déjà décrit ce phénomène dans la régulation de la dégradation de Δ Np73 après la phosphorylation de T86 par les JNK (*Benosman et al., 2011*). L'utilisation d'inhibiteurs pour d'autres protéases dans ce contexte, serait utile pour clarifier ce point dans nos expériences futures. Additionnellement, la stabilité des variants non modifiée sans la surexpression de la CamKII activée en absence de MG132 suggère que ces sites pourraient être impliqués modérément dans la dégradation protéosomique de TAp73. Toutefois, en présence de MG132, on observe que ces sites ont aussi une répercussion sur le niveau d'expression de TAp73 indépendamment du protéasome. L'implication d'autres protéases, comme les calpaines, est à envisager puisque celles-ci ont été déjà décrites pour leur rôle dans la stabilité de p73 (ref, Benosman et al....).

Dans le but de comprendre mieux l'effet de la CamKII sur la stabilité de TAp73, le temps de demi-vie de la protéine a été évalué en présence ou non de la CamKII. De manière surprenante, celle-ci ne semble pas fortement modifier le temps de demi-vie de la protéine. Il y a une légère augmentation. Il reste donc à établir si celle-ci suffit à expliquer l'augmentation de l'accumulation de TAp73 induite par le CamKII, ou si d'autres mécanismes sont à envisager. Dans ce sens, il serait très pertinent dans le futur, d'évaluer l'effet de la CamKII sur l'adressage de ce facteur de transcription actif dans le noyau. Serait-il possible que la CamKII augmente l'activité transcriptionnelle de p73 en favorisant la localisation nucléaire de p73 ? Cette question fut délicate, car comme mentionné auparavant la régulation semble fine, trop fine pour être démontré par des observations immuno-cytochimiques, qui n'ont malheureusement pas prouvé cette hypothèse de manière claire. Des expériences de fractionnement cellulaire sont en cours de réalisation et pourraient être une alternative pour répondre à cette question. De plus, nous avons aussi vu que les protéines partenaires étaient une composante importante dans la régulation post-traductionnelle de p73 avec MDM2, Pirh2, p53 muté...il serait également intéressant d'explorer si les CamK pourraient moduler l'affinité des partenaires connus de p73, par co-immunoprécipitation.

I-1.3.b Effet de la CamKII sur l'isoforme Δ Np73

Parallèlement, d'autres résultats indiquent que la CamKII perd son effet inducteur sur le niveau protéique de l'autre isoforme Δ Np73, conférant une dimension encore plus passionnante dans ce projet de recherche. Néanmoins, nous avons pris la décision de commencer à caractériser la régulation plus précisément sur TAp73. Toutefois, ces résultats préliminaires ont le mérite de « toucher du doigt », un système complet de régulation entre la CamKII et les deux groupes d'isoformes de p73, qui ne demande qu'à être bien caractérisé.

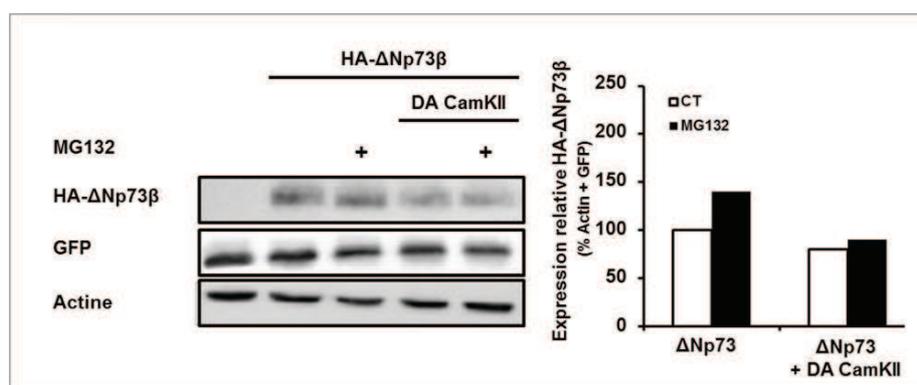


Figure 23|Effet de la CamKII sur la stabilité de Δ Np73

Absence de régulation de la CamKII active (DACamKII) sur la stabilité de l'isoforme courte Δ Np73.

I-1.2. Caractérisation des sites de phosphorylation de p73 pour la CamKII

La dernière question concerne le type d'interaction entre p73 et les CamKs. « Quel niveau d'intimité ont ces protéines pour expliquer les modifications d'activité et de niveau protéique de p73 » ? Est-ce exclusivement le résultat d'une modification post-traductionnelle comme prédit par l'analyse bio-informatique sur les trois sites ?

Pour admettre que la CamKII pouvait être un sérieux candidat dans la régulation de p73, la capacité conformationnelle de p73 à se lier et être phosphorylé par la CamKII est un élément essentiel. Pour cela nous avons adressé cette question, dans un premier temps, sur une des isoformes de p73, TAp73. En ce sens, la phosphorylation *in vitro* a pu nous conforter que dans une condition *in vitro*, avec des protéines purifiées, la CamKII phosphoryle TAp73. La question suivante a été de savoir si dans les conditions cellulaires, la CamKII a toujours la capacité d'accéder à p73 et de la phosphoryler. Pour cela, plusieurs expériences, qui ont nécessité de développer des nouveaux outils, ont été

réalisées. Le premier objectif a été de montrer l'interaction de p73 et de la CamKII par une expérience de co-immunoprécipitation. Malheureusement, elle s'est avérée infructueuse, sans pour autant nous confirmer que la CamKII ne se liait pas à p73. En effet, l'absence du résultat positif ne révèle pas que la CamKII ne se lie pas à p73. Il est bien établi dans la communauté scientifique que la liaison de la CamKII sur les protéines est loin d'être stable et sa dynamique est plutôt comparée à un « bisou protéique » qu'à une « longue étreinte » ! Malheureusement la limite expérimentale des expériences de co-immunoprécipitation demande une interaction stable et de parvenir à déterminer les bonnes conditions expérimentales où les protéines interagissent pour être pleinement démontrée.

Il est également à envisager que l'interaction soit indirecte et donc d'identifier à quel niveau les CamK jouent un rôle dans la régulation de p73. Est-ce la phosphorylation d'une protéine partenaire de p73 par les CamK? En effet, quelques évidences peuvent également rendre cette hypothèse pertinente. Par exemple, il a été montré que Pirh2, cofacteur commun entre p53 et p73 est inhibé par la phosphorylation de la CamKII et réprimerait l'ubiquitinylation de p53 (*Duan et al., 2007*). Une autre question subsiste également : une possible régulation de p73 par la CamKII au niveau transcriptionnel. Est-ce que la CamKII augmente la transcription de p73 en régulant l'activité d'E2F, MYC, p53 ? D'ailleurs, une étude a montré que la CamKII augmentait la transcription d'E2F dans des cellules cancéreuses osseuses (*Yuan et al., 2007*). Cette possibilité est aussi à prendre en considération puisque j'ai montré que le glutamate augmente les niveaux d'ARNm de TAp73 dans les neurones en culture primaires.

Le deuxième point à cette dernière question moléculaire est d'explorer les trois sites de phosphorylations prédits par l'analyse bioinformatiques : S81, S134 et S374. Positionnés sur des domaines différents : de transcription, de liaison à l'ADN et d'oligomérisation, nous avons déjà vu que les répercussions étaient multiples. La génération des mutants simples, doubles et triple est une première étape. Observer si le niveau de phosphorylation *in vitro* est modifié avec ces variants sera une étape cruciale et possible depuis que l'on a obtenu dernièrement l'autorisation de la radioactivité pour confirmer les sites. Dans ce sens, nous avons également essayé durant ma thèse une alternative à la radioactivité en développant un premier anticorps phospho-spécifique dirigé contre le site S134, hautement conservé entre les espèces et positionné sur le domaine de

liaison à l'ADN. Malheureusement, les nombreux essais n'ont pas été concluants pour valider cet anticorps, sans pour autant donner d'information sur le site S134.

I-1.3. Régulation potentielle de p73 par la CamKIV

Parallèlement, j'ai également commencé à explorer si un autre membre de la famille de la CamKII, important aussi dans l'homéostasie neuronale, la CamKIV. Les expériences avec le plasmide rapporteur, ont révélé un effet opposé entre les CamK sur l'activité de p73. Alors que la CamKII est inducteur, la CamKIV réprime l'activité transcriptionnelle de p73.

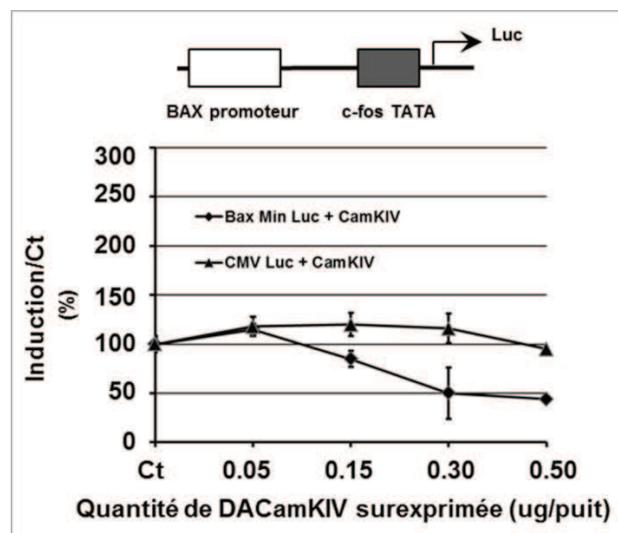


Figure 24|Activité transcriptionnelle de TAp73 en fonction de la CamKIV
L'activité luciférase permet de visualiser l'effet répresseur de la CamKIV, surexprimée sous la forme active (DA) sur l'activité transcriptionnelle de TAp73.

Cette première observation démontre qu'un même type de modification post-traductionnelle peut déclencher des répercussions moléculaires opposées. Comme mentionné dans l'introduction, la phosphorylation des CDK et des Chk avaient un impact contraire sur l'activité de p73 (Gaiddon *et al.*, 2003 ; Gonzales *et al.*, 2003). Cela peut, sembler étonnant que des membres d'une même famille de kinases aient des effets opposés sur une même protéine. Néanmoins des précédents travaux sur les CamK ont montré que même si elles sont activées par le même complexe calcium-calmoduline, leurs mécanismes d'action sont différents et déclenchent des signalisations opposées. D'ailleurs, le facteur de transcription CREB peut illustrer ce même phénomène, où celui-ci

est phosphorylé par la CamKII et la CamKIV et dont les effets sont contraires. Alors que la CamKII induit l'apoptose neuronale, la CamKIV est neuroprotectrice. Ces observations s'expliquaient par la différence des sites phosphorylés par ces kinases (Jinwoong Bok et al., 2008 ; Kornhauser JM et al., 2002 ; Ghosh A et al., 1994 ; Sheng M et al., 1991) . Par ailleurs, nous avons commencé à étudier l'impact de la CamKIV sur la stabilité de p73. Et de manière intéressante, la CamKIV semble moduler de manière inverse et plus modéré par rapport à la CamKII, les niveaux protéiques de TAp73 et ΔNp73. L'enjeu futur sera d'identifier plus en détails les répercussions moléculaires de cette régulation potentielle de p73 par la CamKIV et d'établir son importance dans l'homéostasie neuronale.

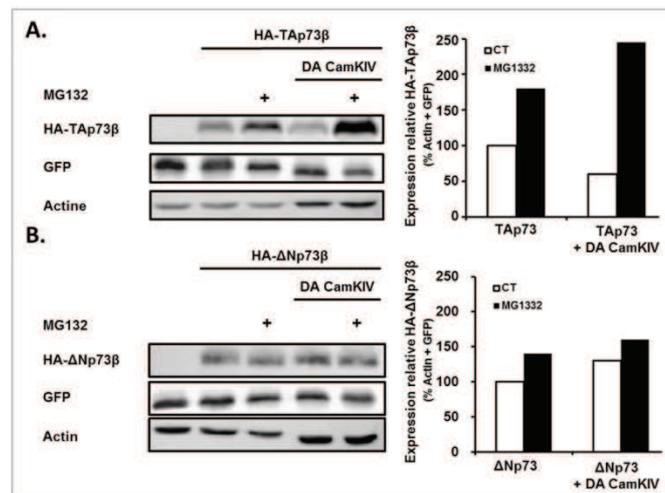


Figure 25||Effets de la CamKIV sur la stabilité des isoformes p73

La CamKIV a un effet répressur sur l'expression protéique de TAp73 et plus modérément inducteur pour l'isoforme ΔNp73.

Ainsi d'un point de vue moléculaire, bien qu'ils restent certains points à éclaircir, mes travaux ont montré que les CamK régulent p73. Le second aspect, qui fut intéressant à considérer, était d'identifier l'implication de cette régulation dans un contexte physiologique où ces deux groupes de protéines exercent des fonctions importantes, le système neuronal.

I-2. Inscription de cette régulation dans un contexte physiologique neuronal

Comme évoqué dans l'introduction, les protéines p73, comme les CamK, sont importantes dans l'homéostasie du système neuronal, notamment dans le cycle cellulaire, la survie et la différenciation. D'ailleurs dans les pathologies

neurodégénératives, tels que la maladie d'Alzheimer et le neuroblastome, nous avons constaté que ces deux protéines participaient à la dérégulation neuronale.

Par exemple, notre équipe a montré auparavant que l'expression de p73 est régulée par une altération de la voie amyloïde, responsable de la maladie d'Alzheimer, pouvant ainsi participer à un contrôle de la balance survie/mort neuronale. Ici, les travaux faits sur les cultures primaires neuronales nous ont permis tout d'abord de corroborer les observations faites sur l'étude moléculaire. En effet, la dérégulation calcique (augmentation ou diminution) entraînant l'apoptose neuronale passerait par l'augmentation de l'expression de TAp73 via en partie par la CamKII. Additionnellement, l'étude de l'activité transcriptionnelle de p73 sur ces cellules primaires a révélé que la CamKII est responsable de l'effet apoptotique du neurotransmetteur glutamatergique. L'implication de la CamKII est en effet majeure car l'utilisation de son inhibiteur annule tout l'effet inducteur du glutamate sur l'activité de TAp73. L'ensemble de ces résultats nous permet d'établir une nouvelle voie de signalisation pour p73 régulant la survie neuronale via le couple glutamate/CamKII.

Toutefois, il est à propos d'émettre l'hypothèse que cette régulation pourrait également participer à d'autres processus neuronaux où l'implication de p73 et des CamK ont déjà été démontrées. En effet, la différenciation neuronale avec la croissance des neurites et l'expression des marqueurs neuronaux engagent l'activité de p73 et des CamK. En ce sens, il serait intéressant d'étudier l'impact de cette régulation dans la différenciation neuronale en traitant des lignées de neuroblastomes avec des facteurs trophiques (l'acide rétinoïque) en perturbant ou non l'homéostasie calcique, l'activité des CamK et p73 pour évaluer l'accroissement des neurites et l'expression des protéines neuronales telles que MAP2 ou NF1. Les données évoquées sur le neuroblastome portent à croire que l'altération calcique pourrait être une raison au déséquilibre de l'expression des isoformes de p73 induisant la tumorigénèse.

Plus globalement, mes travaux font écho à une question actuelle plus générale et challenging : l'impact du calcium via p73 dans l'homéostasie neuronale. Beaucoup de données existent sur le rôle du calcium dans la neurogénèse. Il a été montré que le calcium est déjà un substrat important dès les premiers stades de l'induction neurale, lors de l'établissement de la couche neuroectodermique embryonnaire mais aussi dans les stades plus tardifs lors de la différenciation des progéniteurs neuronaux en neurones

(Leclerc et al, 2011). Même si les canaux, pompes et échangeurs calciques sont très bien répertoriés au cours de ces stades de neurogénèse, les signaux moléculaires régis par le changement calcique sont encore loin d'être élucidés. Toutefois, des gènes de différenciation neuronales tels que Hes1, NeuroD, Mash... ont été identifiés comme des facteurs expliquant le pouvoir neurogénique du calcium. Ces gènes représentent justement le lien possible entre le calcium et p73 car certains d'entre eux sont des gènes cibles de p73. D'ailleurs la dysplasie de l'hippocampe des souris p73 déficientes renforce bien le caractère important du facteur p73 pour ces stades de développement neuronal. Concernant les CamK, malheureusement, il manque des démonstrations scientifiques pour observer l'implication potentielle de ces kinases dans ces stades de neurogénèse. Etudier la réponse de p73 à l'homéostasie calcique lors de ces stades de neurogénèse pourrait être une opportunité intéressante pour apprécier les CamK comme senseur calcique déterminant dans le développement neuronal. A fortiori, les études sur p73, les CamK et plus largement le calcium dans les pathologies du cerveau présentent d'ores et déjà des indices probants sur l'importance de ce tryptique moléculaire dans l'homéostasie neuronale. Si dans le futur, nous arrivons à asseoir précisément la cascade de signalisation neuro-apoptotique entre le calcium, p73 et les CamK, nous pourrions envisager de définir les CamK comme une cible thérapeutique chez les patients souffrant de neuro-dégénération. Fantasme scientifique...pas totalement lorsque l'on découvre que les CamK sont déjà considérées comme des cibles thérapeutiques dans les pathologies cardiaques, avec l'utilisation de différents inhibiteurs de CamK, de chélateurs de calcium ou d'inhibiteurs de calmoduline *(Currie et al., 2011)*.

Après avoir vu les corrélations entre l'homéostasie neuronale et les deux protéines d'intérêt p73 et CamK, il serait tout aussi intéressant d'explorer l'hypothèse que cette régulation ne soit pas seulement présente dans les cellules neuronales mais aussi impliquée dans d'autres systèmes. Le système digestif est un contexte où l'on pourrait retrouver potentiellement cette régulation. Nous allons voir dans cette prochaine partie les arguments de cette supposition et les travaux préliminaires menés dans cette optique.

II- Perspectives

II-1. La régulation de p73 par les CamK, pertinente dans le système digestif ?

Rechercher cette régulation potentielle dans le système digestive n'est pas une question aussi évidente à poser que dans le système neuronal. Car même si les souris p73 déficientes présentent en plus des altérations neuronales, une érosion de l'épithélium digestif (Yang et al., 2000), l'implication de p73 dans le développement du système digestif n'a pas été encore bien explorée.

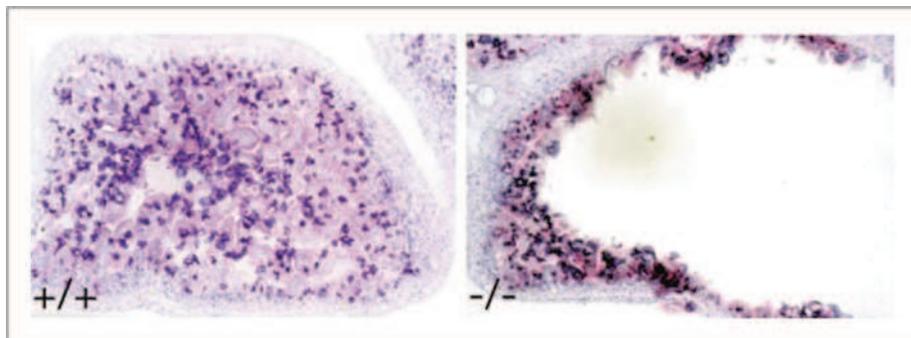


Figure 26|Phénotype digestif pour les souris p73 déficientes
Coupe transversale de l'épithélium de l'iléon de la souris sauvage (+/+) et de la souris p73 déficiente (-/-).

En fait, l'étude de cette question n'a débuté qu'il y a quelques années, expliquant ainsi le peu d'informations à notre portée aujourd'hui. C'est pourquoi nous allons aborder cette question directement à travers les pathologies digestives, qui ont d'ores et déjà été associées à p73 et les CamK. Les cancers du système digestifs notamment de l'estomac et du colon ont été rapidement le « terrain » d'étude pour ces deux protéines. Durant cette introduction, j'en profiterai pour « distiller » les quelques informations physiologiques de ces deux familles.

II-1.1. Cancers du colon et de l'estomac

Les cancers du colon et de l'estomac occupent respectivement le 4^{ème} et 3^{ème} rang de prévalence des cancers, avec plus de 50.000 nouveaux cas par an en France avec une incidence qui augmentera dans le futur. Les facteurs génétiques ont été déjà identifiés pour ces deux pathologies notamment la mutation du gène APC responsable du

développement tumoral colique. Outre les facteurs génétiques, les infections bactériennes gastriques (*Helicobacter pylori*) (Caruso et al., 1990 ; Guerre et al., 1991 ; Forman, 1991 ; Yang et al., 2000), une alimentation riche en sel et pauvre en légumes et fruits, les pathologies inflammatoires (Maladie de Crohn...), le tabagisme, et la présence de polypes dans le tube digestif (tumeurs bénignes) sont autant de facteurs de risque pour ces cancers.

L'évolution de la maladie est hétérogène en fonction des patients, des causes du développement tumoral et du stade de cancer lors du diagnostic. Le seul traitement curatif est chirurgical et consiste à retirer la partie digestive colonisée par la tumeur, qui peut s'accompagner de la radiothérapie et de la chimiothérapie. Des nouveaux traitements comme les anti-angiogéniques constituent un progrès notable dans la chimiothérapie.

II-1.2. Implication de p73 et des CamK dans le cancer gastrique

Très peu de choses sont connues sur l'implication de p73 dans le cancer de l'estomac mais certaines observations immunohistochimiques sur les tumeurs gastriques laissent penser que ce sujet réserve de belles découvertes. En effet, une équipe allemande a démontré au niveau de l'ARNm et protéique, une apparition de l'expression de la protéine p73 dans les cellules cancéreuses gastriques à travers l'étude de 62 carcinomes (Tannapfel et al., 2001). Elle a pu ainsi confirmer les premières évidences qui suggéraient que la protéine p73 est très peu exprimée dans la muqueuse gastrique (Kanget al., 2000). Plus tardivement, une autre étude a prouvé que l'interaction d'*Helicobacter pylori* avec les cellules épithéliales gastriques entraîne une surexpression massive de TAp73 et une diminution d'expression de $\Delta Np73$, qui entraîneraient l'apoptose par la transcription de gènes cibles (*NOXA*, *PUMA*, *FAS*) (Weiet al., 2008). La phosphorylation par *c-Abl* kinase serait un des facteurs activé par l'infection qui augmente l'expression de l'isoforme TAp73 et diminue celle de $\Delta Np73$. La régulation n'a pas été clairement décrite mais on peut s'autoriser à imaginer que le site S81 pourrait être un candidat parfait, vu l'analyse bioinformatique que l'on a faite. Toutefois, il est illusoire de penser que la tumorigénèse dans l'estomac peut s'expliquer stricto sensu par une simple augmentation de TAp73 et une diminution de $\Delta Np73$. En effet, une autre étude plus récente démontre la complexité des effets de la balance TA/ ΔN dans les tumeurs gastriques. En effet, de manière opposée, une augmentation nucléaire et cytoplasmique, de l'isoforme dit anti-

apoptotique, $\Delta Np73$ (ARNm et protéine) est observée dans 185 tumeurs gastriques. Elle serait même associée au pronostic du patient et à la sévérité de la tumeur (Vilgelm et al., 2010).

Ces observations opposées, pourrait s'expliquer à mon sens, sur les différentes causes qui entraînent la tumorigénèse gastrique. Dans le premier cas, la tumorigénèse est déclenchée par l'infection bactérienne alors que dans la seconde étude, l'origine des tumeurs n'est pas spécifiée. Nous pourrions envisager qu'en fonction des facteurs oncogéniques, la signalisation envers p73 est différente et expliquerait également l'hétérogénéité de profil d'expression de p73 entre les patients.

Quoiqu'il en soit, le mystère reste entier mais on peut accepter sans conteste que le profil d'expression de p73 est modifié dans les cellules cancéreuses gastriques. A travers d'autres types de cancers, il a été établi que ce déséquilibre participait au développement tumoral. Ainsi, le fantasme d'une répercussion de p73 dans les cancers gastriques n'est plus aussi déraisonné !

Concernant l'implication des CamK dans les cancers gastriques, peu d'études ont encore été menées. Néanmoins, quelques indices encourageraient à explorer cette piste. En effet, l'homéostasie calcique des cellules gastriques cancéreuses aurait un impact sur la balance survie/apoptose de ces cellules. L'acide cafféique affecte la viabilité d'une lignée cancéreuse gastrique, SCM1, en modifiant le niveau calcique cytoplasmique (Chang et al., 2013). Une autre molécule, M-3M3FBS, déclenchant une entrée massive de calcium dans les cellules cancéreuses gastriques humaines, entraînerait l'apoptose (Chen et al., 2014). Par ailleurs, la CamKII contribuerait à la réponse inflammatoire de l'estomac suite à l'infection d'*Helicobacter pylori*, et pourrait potentiellement être un biomarqueur pour le diagnostic de l'inflammation gastrique survenant dans les cancers de l'estomac (Maubach et al., 2013).

Par conséquent, même si les corrélations entre p73, CamK et les cancers de l'estomac sont plus fragiles que dans le système neuronal, il serait intéressant d'explorer ce champ d'investigations. Additionnellement au cancer de l'estomac, il serait également intéressant d'analyser si cette potentielle liaison peut s'établir avec le cancer digestif le plus meurtrier, le cancer du colon.

II-1.3. Implication de p73 et des CamK dans le cancer colique

Alors que l'impact de p53 est bien établi dans l'évolution du cancer du colon, celui de p73 est encore à caractériser. Les premières études ont montré que l'expression de p73 est significativement plus importante dans les carcinomes que dans la muqueuse normale et serait également corrélée à la vascularisation de la tumeur (*Guan et al., 2003*). Plus tardivement, comme les isoformes de p73 sont connues comme ayant des effets opposés (apoptotique et oncogénique), l'analyse du profil d'expression de ces deux isoformes dans 115 tumeurs a montré qu'elles étaient toutes deux surexprimées et corrélées au pronostic du patient (*Dominguez et al., 2006*).

Néanmoins, de manière surprenante, et contrairement à d'autres études, une équipe, par des expériences sur une lignée cancéreuse du colon humaine, *HCT116*, affirme que l'isoforme $\Delta Np73$ n'affecte pas la croissance tumorale, l'efficacité des traitements anti-tumoraux et les fonctions apoptotiques de p53 (*Sabatino et al., 2007*). Personnellement, cette apparente controverse s'explique par le type d'isoforme qu'ils ont utilisé. En effet, ils ont étudié l'effet oncogénique de l'isoforme $\Delta Np73\alpha$. Par nos précédentes observations dans le système neuronal mais aussi dans d'autres types de cancer notamment celui du cancer du sein, il a été déjà prouvé que dans le même sous-groupe, les isoformes ont des effets très différents sur la tumorigénèse et une relation plus ou moins croisée avec p53. C'est pourquoi il serait intéressant de différencier dans l'établissement du profil d'expression les nombreux sous-types d'isoformes dans la muqueuse et les tumeurs coliques. D'ailleurs, après ma première année de doctorat, une publication avait conforté l'idée que je me faisais du rôle différentielle de toutes les isoformes face à la tumorigénèse et à la sensibilité des traitements anti-tumoraux. Le laboratoire suédois a montré que l'isoforme $\Delta Np73\beta$ augmentait la viabilité des mêmes cellules utilisées par l'autre équipe, *HCT116*, mais que celle-ci n'avait pas d'impact sur la sensibilité du traitement au cisplatine (*Lööf et al., 2012*). L'effet était même inverse, car c'est le cisplatine qui induisait la diminution de $\Delta Np73\beta$. Ce qui n'est plus surprenant lorsque l'on constate que le cisplatine augmente également TAp73 et que celui-ci a un effet négatif sur la transcription de $\Delta Np73$. L'effet positif du cisplatine sur TAp73 est expliqué par la phosphorylation de *c-Abl* kinase sur p73 après son activation par le cisplatine (*Vayssade et al., 2005*).

Ce qui souligne encore une fois, l'importance des modifications post-traductionnelles du facteur de transcription p73 dans la réponse aux traitements anti-tumoraux et à la tumorigénèse. Cependant, encore peu de choses sont décrites dans ce domaine et des parts d'ombre subsistent.

En parlant de pénombre...l'impact des CamK dans le cancer colique est une réelle énigme ! Deux articles soulèvent cette question et exposent l'implication potentielle des CamK dans la réponse aux traitements anti-tumoraux. Le composé K, un métabolite du ginseng est connu dans les pays asiatiques pour induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses. En traitant une lignée cancéreuse de colon humaine, *HT-29*, avec le composé K, ils ont observé que l'AMPK était activée par la phosphorylation de la CamKIV, clivant ainsi les caspases et libérant des facteurs apoptotiques comme le cytochrome c. L'inhibiteur de la CamKIV, *STO-609*, atténuait l'effet apoptotique du composé K (*Kim do et al., 2009*). Ceci ne doit plus trop vous surprendre car nous avons déjà évoqué l'activation de l'AMPK par les CamK dans le système neuronal. Mais cette étude a le mérite de nous permettre de croire que des signalisations CamK dépendants sont également présentes dans le système digestif. D'ailleurs alors que cette hypothèse est encore bien « printanière », une équipe suédoise est allée plus loin dans l'implication des CamK et de la famille p53 dans le système digestif. En effet, ils ont montré que le 5-FU, un agent anti-tumoral couramment utilisé dans les cancers du colon, induit la mort des *HCT116*, via une série de phosphorylations sur p53, qui active les facteurs apoptotiques, les caspases. Par l'utilisation d'inhibiteurs et de chélateurs calciques, ils ont démontré que cet effet apoptotique est calcium et calmoduline dépendante. Bien qu'ils n'ont pas encore prouvé expérimentalement, la CamKII serait pour eux un candidat potentiel pour expliquer ces phosphorylations (*Can et al., 2013*).

Cette publication conforte l'idée que les CamK pourraient participer à la régulation des membres de la famille p53 dans un contexte digestif. Il reste cependant beaucoup d'investigations à effectuer pour élucider cette question.

L'ensemble de ces observations sur le système digestif pourrait représenter les prémisses d'une corrélation entre les membres de la famille p53 et les CamK dans le contexte digestif. Néanmoins, des données fondamentales manquent...tels que l'expression de ces deux familles à travers le tractus digestif dans les contextes physiopathologique. Nous avons vu auparavant que cette étude n'est aussi aisée à mener comme l'on pourrait

l'imaginer, de par la pléthore d'isoformes, la spécificité des anticorps qui progresse doucement et le casse-tête de développer des primers spécifiques. Néanmoins cette démarche serait pertinente pour pouvoir apprécier l'impact de ces familles dans l'homéostasie digestive et les pathologies qui commencent à être associées. D'ailleurs, les précédents travaux menés sur le système neuronal pourraient être un modèle intéressant pour débiter ces études.

II-2. Quelques travaux préliminaires pour ouvrir la voie !

II-2.1. Expression des membres de la famille p53 dans le système digestif sain et pathologique.

II-2.1.a Etude immunohistologique pour p73 et p63 dans l'épithélium digestif

Bien que moins bien caractérisé, p73 comme les calmoduline kinases semblent pouvoir jouer un rôle dans l'homéostasie du système digestif. Il apparaît donc pertinent de déterminer si la signalisation CaMKII-p73 que j'ai identifiée jouerait un rôle dans ce contexte, que ce soit dans une situation physiologique ou pathologique (inflammation, cancer, neurodégénérescence). Un prérequis à une telle étude est la bonne connaissance de l'expression de p73 dans le système digestif. Malheureusement, très peu d'informations existent sur le profil d'expression ARNm et protéique de la famille p53 en considérant toutes les isoformes (issus des promoteurs alternatifs et de l'épissage alternatif) au niveau du colon et de l'estomac, dans les contextes physiologiques et cancéreux. Ce profil permettrait pourtant de comprendre les fonctions et les interactions potentielles entre les membres de la famille p53. Mes travaux préliminaires consistaient donc à déterminer ce profil au niveau ARNm et protéique dans les organes digestifs murins et humains, sain et lors de cancers.

Profitant du développement de nouveaux anticorps dirigés contre p73 et p63, nous avons commencé l'étude immunohistologique de p63 et p73 dans les organes digestifs murins.

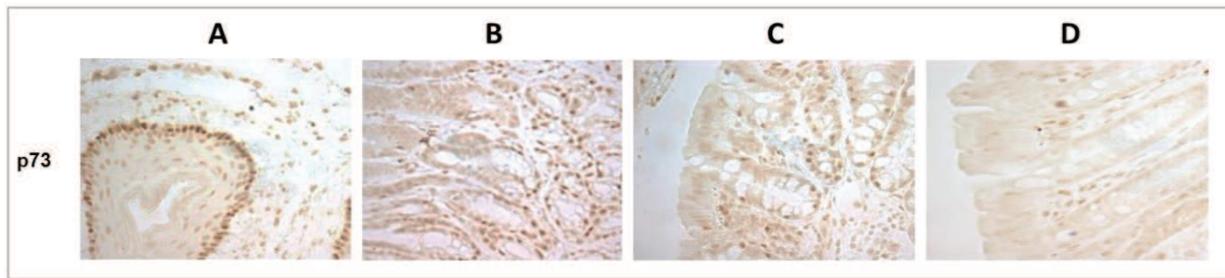


Figure 27| Analyse immunohistologique de p73 dans le tractus digestif murin
 Etude de l'expression protéique des facteurs de transcription p73 dans le tissu digestif murin, au niveau de l'oesophage (A), du duodénum(B), du colon proximal (C) et du colon distal (D).

Après avoir testé et optimisé les conditions expérimentales, nous avons retenu seulement deux anticorps polyclonaux fonctionnels dirigés contre p73 ou p63. Les premières observations révèlent que l'expression de p63 et p73 est organo-dépendant avec des localisations dans l'épithélium digestif, la couche musculaire mais aussi dans le système nerveux entérique. Dans un souci de synthèse, je ne montre pas toutes les figures prises pour cette étude, encore préliminaire.

Toutefois, nous avons constaté à travers ces premiers travaux que p63 semble être exprimé fortement que dans les cellules épithéliales progénitrices et les cellules kératinisées de l'oesophage. Concernant p73, le marquage a été localisé dans différentes parties du tube digestif notamment dans les cellules souches de l'épithélium oesophagien, les cellules kératinisées au bas des glandes gastriques, au niveau des glandes de Brünner duodénales et dans les glandes du colon proximal et distal.

Comme nous présentons que la régulation de p73 par les CamK peut être altérée dans les cancers du système digestif notamment celui de l'estomac et du colon, nous avons cherché un modèle murin nous permettant de mimer les premiers stades de tumorigénèse. Ceci nous permettrait d'explorer si les expressions de p63 et p73 sont modifiées dès les stades précoces de la dérégulation cellulaire de l'épithélium digestif. En ce sens, deux modèles murins sont utilisés pour explorer les réponses moléculaires de l'épithélium digestif face aux signaux tumorigéniques : les souris traitées avec des agents carcinogènes (Azoxyméthane, AOM), ou inflammatoire (Dextrane Sodium Sulfate, DSS). Ces agents entraînent l'érosion de l'épithélium digestif qui va forcer les cellules souches digestives à se multiplier pour restaurer la muqueuse. Ce processus entraîne majoritairement le développement de tumeurs au niveau du système digestif. En

analysant le profil d'expression de p73 et de p63 directement après le traitement abrasif, nous avons voulu explorer si ces protéines participaient à la tumorigénèse dès les premiers stades. Pour ces premières expériences, nous avons donc choisi de traiter les souris au DSS pendant 6 jours, temps nécessaire pour l'érosion de l'épithélium et période nécessaire pour développer dans quelques mois des tumeurs digestives. A première vue, la réponse de p63 ou de p73 face aux traitements au DSS n'est pas significativement probante. La fenêtre de réponse de ces facteurs de transcription est peut-être plus grande que les 6 jours que l'on a choisi pour cette étude préliminaire. Dans le futur, d'autres analyses immunohistologiques complémentaires et des expériences de western blot avec ces tissus murins traités au DSS ou à l'AOM pourront répondre à la question d'une potentielle réponse de la balance des isoformes p73, p63 face aux signaux carcinogènes. Cette étude au niveau protéique pourrait être également couplée par une analyse d'ARN. D'ailleurs, une première étude publiée récemment mentionne que les niveaux ARN des isoformes TA et ΔN sont modifiés dans les tumeurs digestives humaines (*Zaika et al., 2012*).

Comme après tous résultats préliminaires, beaucoup de questions et de recherches restent à explorer et à effectuer. La première question réside sur le contexte digestif choisi pour explorer la réponse moléculaire de p73 et des autres membres. Nous avons choisi de rechercher l'impact de ces membres dans le développement tumoral digestif. Dans un premier temps, le modèle murin traité au DSS ou à l'AOM sont des premières approches pour y répondre. Il serait tout aussi d'intéressant d'explorer cette question avec un autre modèle : l'utilisation de souris irradiés développant également des tumeurs digestives pour vérifier si les observations faites dans les premiers modèles s'y retrouvent. L'étape suivante sera de vérifier si ces observations faites sur les tissus murins corroborent avec des tissus humains. En ce sens, l'équipe développe une forte collaboration avec les cliniciens pour pouvoir approfondir les connaissances sur le profil d'expression de ces facteurs de transcription p53, p63 et p73, importants dans le cycle cellulaire, la survie/l'apoptose et la tumorigénèse. C'est un défi passionnant mais aussi complexe car à l'heure actuelle, nous ne possédons pas encore tous les outils pour construire un profil bien précis des différents isoformes de p73 dans le système digestif. Souvenez-vous, les isoformes de p73 induisent des mécanismes cellulaires parfois différentes entre elles, qui sont difficile à totalement caractériser !

II-2.1.b Etude de l'expression de p53, p63 et p73 dans le plexus entérique

Au cours de l'étude immunohistologique, grâce à la collaboration avec l'équipe du Pr Schäfer à Zweibrücken, j'ai observé que les membres de la famille p53 étaient également exprimés dans les cellules neuronales du système digestif, le système entérique. Composé de deux plexus, myentérique et sous muqueux, les marquages de p53, p63 et p73 se situaient dans les ganglions et les fibres nerveuses myentériques.

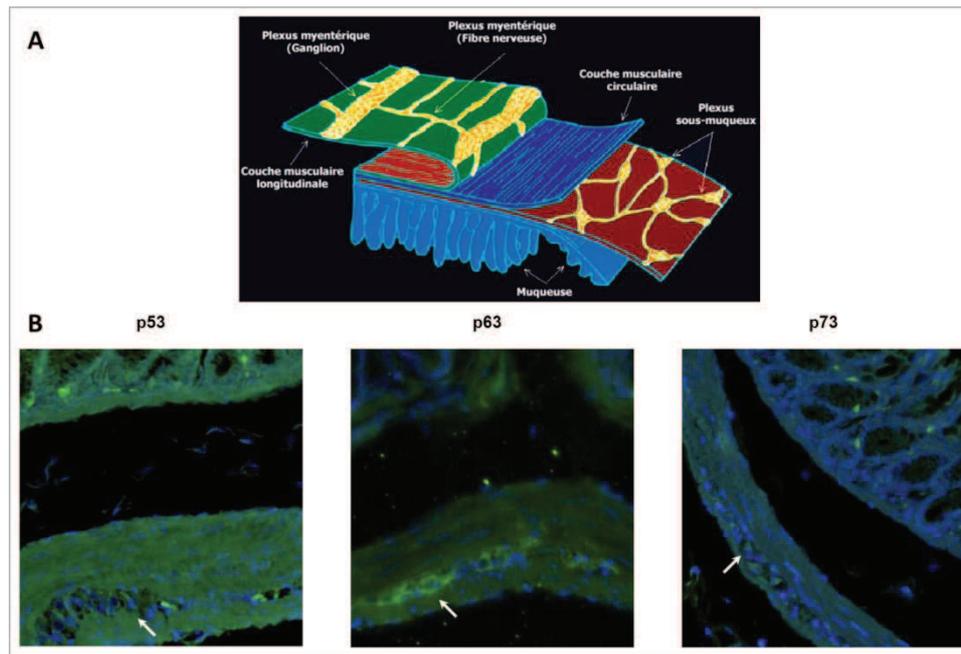


Figure 28|Expression de p53, p63 et p73 dans le système entérique
Représentation schématique du système entérique composé du plexus myentérique et sous muqueux. **B.** Analyse immunohistochemique de p53, p63 et p73 dans le plexus myentérique murin.

Le marquage est essentiellement cytoplasmique. Additionnellement, il faut savoir que le plexus est composé de cellules neuronales et gliales. Dans le but d'identifier si ce marquage est présent dans les deux types cellulaires, j'ai effectué une première série de co-marquage avec des anticorps dirigés contre des marqueurs neuronaux ou gliaux avec ceux contre un membre de la famille de p53. Pour cette première investigation, j'ai sélectionné p63, qui avait le marquage le plus fort. J'ai pu constater que l'expression p63 est localisée au niveau des cellules neuronales mais pas des cellules gliales. Les enjeux futurs seront d'établir si p73 et p53 sont également localisés majoritairement dans les cellules neuronales entériques, si les CamK sont également important dans

l'homéostasie du système entérique et si la régulation de p73 par les CamK est présente dans ce contexte.

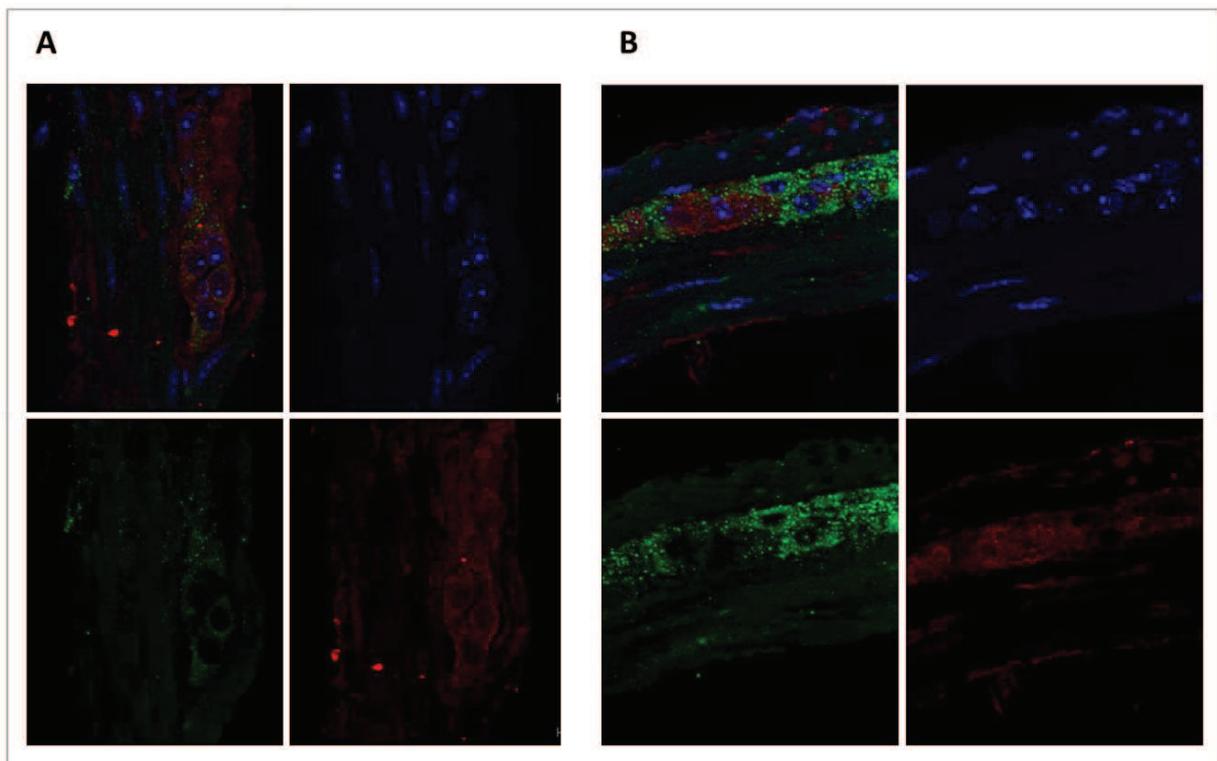


Figure 29|Expression de p63 dans les cellules neuronales et gliales entériques

Comarquage de p63 (vert) et du marqueur neuronal PGP9.5 (rouge) avec la coloration au DAPI (bleu). B. Comarquage de p63 (vert) et du marqueur glial S100 (rouge) avec la coloration au DAPI (bleu).

Afin d'inscrire la régulation de p73 par les CamK dans ce contexte digestif, il serait également utile d'analyser l'expression et l'activité des CamK dans ces différentes conditions expérimentales. Ce sera sans nul doute un grand challenge de répondre à l'implication de cette régulation dans le système digestif, qui nécessitera sans doute de passer par une approche *in cello* avec des outils bien connus dans le domaine : les inhibiteurs des CamK.

II-2.2. Exploration de l'existence de la régulation de p73 par les CamK dans le système digestif

Dans l'optique d'amorcer quelques pistes de recherche, j'ai réalisé quelques expériences préliminaires pour tester si effectivement la régulation p73 par les CamK pouvait s'inscrire dans un contexte digestif. Tout comme le système neuronal, la

première étape a été de rechercher si la survie des cellules cancéreuses coliques, les HCT116, est sensible à l'altération de l'homéostasie calcique.

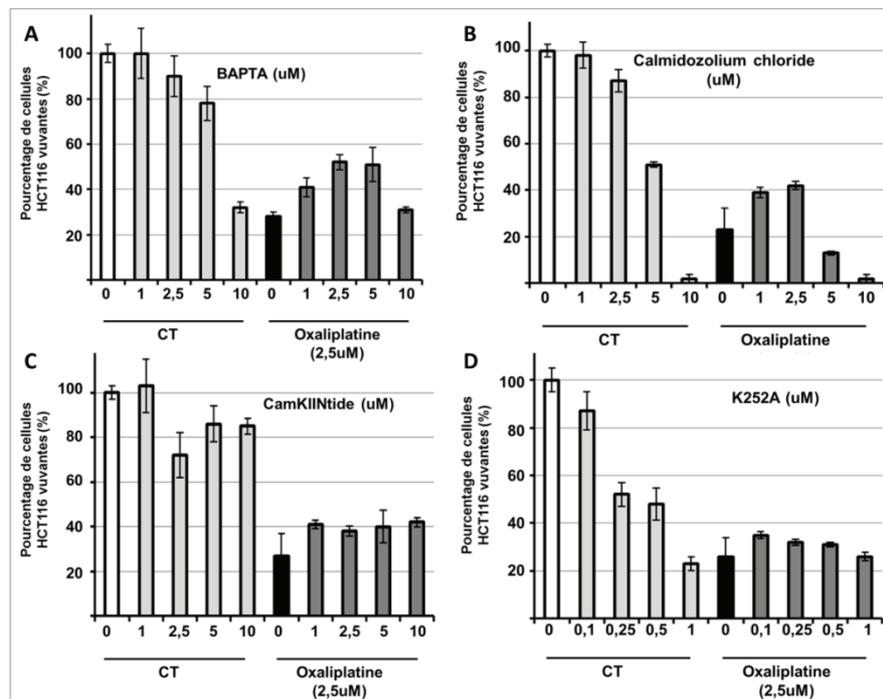


Figure 30|Survie des cellules cancéreuses coliques sensibles à l'homéostasie calcique et à la CamKII. Evaluation de la survie des cellules cancéreuses du côlon, HCT116, traitées au (A) BAPTA, chélateur de calcium ; au (B) calmidazolium chloride, inhibiteur de calmoduline ; au (C) CAMKIINTide et (D) à K252a, deux inhibiteurs de la CamKII, couplé ou non au traitement de l'oxaliplatine.

Pour se faire, le traitement par un chélateur de calcium, BAPTA, a révélé que ces cellules sont sensibles au calcium. Pour évaluer l'implication de la CamKII dans ce processus, j'ai également mesuré la survie des cellules traitées à des inhibiteurs de calmoduline ou de la CamKII : Calmidazolium chloride, CamKIINTide et K252a. Nous avons constaté aussi que la sensibilité calcique des cellules cancéreuses digestives passerait par la CamKII. Parallèlement, le traitement aux inhibiteurs couplé à l'oxiplatine, molécule utilisée pour le traitement des cancers coliques, suggère que l'efficacité de l'oxiplatine nécessite du calcium, de la calmoduline et de l'activité de la CamKII, l'ensemble de ces résultats préliminaires indique que la survie des cellules digestives repose sur l'homéostasie calcique, via en partie de la CamKII. La prochaine étape sera de déterminer comment p73 est impliqué dans cette nouvelle régulation, afin d'explorer si la régulation p73 par les CamK est aussi présente dans le système digestif.

L'ensemble des informations sur l'implication de p73 et des CamK dans le système digestif et les résultats de nos travaux préliminaires amorce donc un nouveau projet de recherche, qui je l'espère, sera mené par un futur collaborateur de l'équipe. Cette étude sera sans nul doute un challenge très intéressant pour comprendre davantage comment les membres de la famille p53, notamment p73 est aussi important dans de nombreux systèmes en plus du système neuronal.

BIBLIOGRAPHIE

Agostini M, Tucci P, Chen H, Knight RA, Bano D, Nicotera P, McKeon F, Melino G. p73 regulates maintenance of neural stem cell. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Dec 3;403(1):13-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.10.087. Epub 2010 Oct 25.

D'Alessandro A¹, Marrocco C, Rinalducci S, Peschiaroli A, Timperio AM, Bongiorno-Borbone L, Finazzi Agrò A, Melino G, Zolla L. Analysis of TAp73-dependent signaling via omics technologies. *J Proteome Res.* 2013 Sep 6;12(9):4207-20. doi: 10.1021/pr4005508. Epub 2013 Aug 22.

Bálint E¹, Bates S, Vousden KH. Mdm2 binds p73 alpha without targeting degradation. *Oncogene.* 1999 Jul 8;18(27):3923-9.

Baptiste N¹, Friedlander P, Chen X, Prives C. The proline-rich domain of p53 is required for cooperation with anti-neoplastic agents to promote apoptosis of tumor cells. *Oncogene.* 2002 Jan 3;21(1):9-21.

Bayer KU, Harbers K, Schulman H. alphaKAP is an anchoring protein for a novel CaM kinase II isoform in skeletal muscle. *EMBO J.* 1998 Oct 1;17(19):5598-605.

Beauman SR, Campos B, Kaetzel MA, Dedman JR. CyclinB1 expression is elevated and mitosis is delayed in HeLa cells expressing autonomous CaMKII. *Cell Signal.* 2003 Nov;15(11):1049-57.

Bénard J, Douc-Rasy S, Ahomadegbe JC. TP53 family members and human cancers. *Hum Mutat.* 2003 Mar;21(3):182-91. Review.

Benosman S, Meng X, Von Grabowiecki Y, Palamiuc L, Hritcu L, Gross I, Mellitzer G, Taya Y, Loeffler JP, Gaiddon C. Complex regulation of p73 isoforms after alteration of amyloid precursor polypeptide (APP) function and DNA damage in neurons. *J Biol Chem.* 2011 Dec 16;286(50):43013-25. doi: 10.1074/jbc.M111.261271. Epub 2011 Oct 14.

Bernassola F, Oberst A, Melino G, Pandolfi PP. The promyelocytic leukaemia protein tumour suppressor functions as a transcriptional regulator of p63. *Oncogene.* 2005 Oct 20;24(46):6982-6.

Bergamaschi D¹, Gasco M, Hiller L, Sullivan A, Syed N, Trigiante G, Yulug I, Merlano M, Numico G, Comino A, Attard M, Reelfs O, Gusterson B, Bell AK, Heath V, Tavassoli M, Farrell PJ, Smith P, Lu X, Crook T. p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell.* 2003 Apr;3(4):387-402.

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Oct;1(1):11-21. Review.

- Bid HK. Link between p53 isoforms and angiogenesis: Current prospects. *South Asian J Cancer*. 2013 Jul;2(3):108. doi: 10.4103/2278-330X.114097
- Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell*. 1996 Dec 27;87(7):1203-14.
- Blaeser F, Ho N, Prywes R, Chatila TA. Ca(2+)-dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors. *J Biol Chem*. 2000 Jan 7;275(1):197-209.
- Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, Saville MK, Lane DP. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev*. 2005 Sep 15;19(18):2122-37. Epub 2005 Aug 30.
- Britschgi A¹, Bill A, Brinkhaus H, Rothwell C, Clay I, Duss S, Rebhan M, Raman P, Guy CT, Wetzel K, George E, Popa MO, Lilley S, Choudhury H, Gosling M, Wang L, Fitzgerald S, Borawski J, Baffoe J, Labow M, Gaither LA, Bentires-Alj M. Calcium-activated chloride channel ANO1 promotes breast cancer progression by activating EGFR and CAMK signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Mar 12;110(11):E1026-34. doi: 10.1073/pnas.1217072110. Epub 2013 Feb 19.
- Can G¹, Akpınar B, Baran Y, Zhivotovsky B, Olsson M. 5-Fluorouracil signaling through a calcium-calmodulin-dependent pathway is required for p53 activation and apoptosis in colon carcinoma cells. *Oncogene*. 2013 Sep 19;32(38):4529-38. doi: 10.1038/onc.2012.467. Epub 2012 Oct 29.
- Candi E, Agostini M, Melino G, Bernassola F. How the TP53 family proteins TP63 and TP73 contribute to tumorigenesis: regulators and effectors. *Hum Mutat*. 2014 Jun;35(6):702-14. doi: 10.1002/humu.22523. Epub 2014 Mar 7.
- Chao LH, Pellicena P, Deindl S, Barclay LA, Schulman H, Kuriyan J. Intersubunit capture of regulatory segments is a component of cooperative CaMKII activation. *Nat Struct Mol Biol*. 2010 Mar;17(3):264-72. doi: 10.1038/nsmb.1751. Epub 2010 Feb 7.
- Chi SW, Ayed A, Arrowsmith CH. Solution structure of a conserved C-terminal domain of p73 with structural homology to the SAM domain. *EMBO J*. 1999 Aug 16;18(16):4438-45.
- Cho T¹, Ryu JK, Taghibiglou C, Ge Y, Chan AW, Liu L, Lu J, McLarnon JG, Wang YT. Long-term potentiation promotes proliferation/survival and neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells. *PLoS One*. 2013 Oct 17;8(10):e76860. doi: 10.1371/journal.pone.0076860. eCollection 2013.
- Chopp M, Li Y, Zhang ZG, Freytag SO. p53 expression in brain after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992 Feb 14;182(3):1201-7.

Coates PJ. Regulating p73 isoforms in human tumours. *J Pathol.* 2006 Dec;210(4):385-9.

Collavin L, Lunardi A, Del Sal G. p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression. *Cell Death Differ.* 2010 Jun;17(6):901-11. doi: 10.1038/cdd.2010.35. Epub 2010 Apr 9. Review.

Conforti F, Yang AL, Agostini M, Rufini A, Tucci P, Nicklison-Chirou MV, Grespi F, Velletri T, Knight RA, Melino G, Sayan BS. Relative expression of TAp73 and Δ Np73 isoforms. *Aging (Albany NY).* 2012 Mar;4(3):202-5.

Costanzo A¹, Pediconi N², Narcisi A¹, Guerrieri F³, Belloni L³, Fausti F¹, Botti E¹, Levrero M⁴. TP63 and TP73 in cancer, an unresolved "family" puzzle of complexity, redundancy and hierarchy. *FEBS Lett.* 2014 Aug 19;588(16):2590-2599. doi: 10.1016/j.febslet.2014.06.047. Epub 2014 Jun 28.

Costanzo A, Merlo P, Pediconi N, Fulco M, Sartorelli V, Cole PA, Fontemaggi G, Fanciulli M, Schiltz L, Blandino G, Balsano C, Levrero M. DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. *Mol Cell.* 2002 Jan;9(1):175-86.

Coultrap SJ, Buard I, Kulbe JR, Dell'Acqua ML, Bayer KU. CaMKII autonomy is substrate-dependent and further stimulated by Ca²⁺/calmodulin. *J Biol Chem.* 2010 Jun 4;285(23):17930-7. doi: 10.1074/jbc.M109.069351. Epub 2010 Mar 30.

Coultrap SJ, Barcomb K, Bayer KU. A significant but rather mild contribution of T286 autophosphorylation to Ca²⁺/CaM-stimulated CaMKII activity. *PLoS One.* 2012;7(5):e37176. doi: 10.1371/journal.pone.0037176. Epub 2012 May 16.

Coutandin D¹, Löhr F, Niesen FH, Ikeya T, Weber TA, Schäfer B, Zielonka EM, Bullock AN, Yang A, Güntert P, Knapp S, McKeon F, Ou HD, Dötsch V. Conformational stability and activity of p73 require a second helix in the tetramerization domain. *Cell Death Differ.* 2009 Dec;16(12):1582-9. doi: 10.1038/cdd.2009.139. Epub 2009 Sep 18.

Crighton D, O'Prey J, Bell HS, Ryan KM. p73 regulates DRAM-independent autophagy that does not contribute to programmed cell death. *Cell Death Differ.* 2007 Jun;14(6):1071-9. Epub 2007 Feb 16.

Crighton D¹, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell.* 2006 Jul 14;126(1):121-34.

Culmsee C¹, Mattson MP. p53 in neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jun 10;331(3):761-77.

Currie S, Elliott EB, Smith GL, Loughrey CM. Two candidates at the heart of dysfunction: The ryanodine receptor and calcium/calmodulin protein kinase II as potential targets for therapeutic intervention-An in vivo perspective. *Pharmacol Ther.* 2011 Aug;131(2):204-20.

De Laurenzi V¹, Costanzo A, Barcaroli D, Terrinoni A, Falco M, Annicchiarico-Petruzzelli M, Levrero M, Melino G. Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. *J Exp Med*. 1998 Nov 2;188(9):1763-8.

De Laurenzi V, Melino G. Apoptosis. The little devil of death. *Nature*. 2000 Jul 13;406(6792):135-6.

De Laurenzi V, Melino G. Evolution of functions within the p53/p63/p73 family. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;926:90-100. Review.

De Laurenzi V, Raschellá G, Barcaroli D, Annicchiarico-Petruzzelli M, Ranalli M, Catani MV, Tanno B, Costanzo A, Levrero M, Melino G. Induction of neuronal differentiation by p73 in a neuroblastoma cell line. *J Biol Chem*. 2000 May 19;275(20):15226-31.

DeYoung MP, Johannessen CM, Leong CO, Faquin W, Rocco JW, Ellisen LW. Tumor-specific p73 up-regulation mediates p63 dependence in squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2006 Oct 1;66(19):9362-8.

Di Como CJ¹, Gaiddon C, Prives C. p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 1999 Feb;19(2):1438-49.

Dias WB, Cheung WD, Wang Z, Hart GW. Regulation of calcium/calmodulin-dependent kinase IV by O-GlcNAc modification. *J Biol Chem*. 2009 Aug 7;284(32):21327-37. doi: 10.1074/jbc.M109.007310. Epub 2009 Jun 8.

Dobbelstein M, Wienzek S, König C, Roth J. Inactivation of the p53-homologue p73 by the mdm2-oncoprotein. *Oncogene*. 1999 Mar 25;18(12):2101-6.

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. 1992 Mar 19;356(6366):215-21.

Douc-Rasy S, Goldschneider D, Million K, Bénard J. Interrelations between p73 and p53: a model, neuroblastoma. *Med Sci (Paris)*. 2004 Mar;20(3):317-24. Review. French.

Duan S, Yao Z, Hou D, Wu Z, Zhu WG, Wu M. Phosphorylation of Pirh2 by calmodulin-dependent kinase II impairs its ability to ubiquitinate p53. *EMBO J*. 2007 Jul 11;26(13):3062-74. Epub 2007 Jun 14.

El-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet*. 1992 Apr;1(1):45-9.

Enslin H, Soderling TR. Roles of calmodulin-dependent protein kinases and phosphatase in calcium-dependent transcription of immediate early genes. *J Biol Chem*. 1994 Aug 19;269(33):20872-7.

Enslin H, Sun P, Brickey D, Soderling SH, Klamo E, Soderling TR. Characterization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. Role in transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 1994 Jun 3;269(22):15520-7.

Erickson JR, Anderson ME. CaMKII and its role in cardiac arrhythmia. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2008 Dec;19(12):1332-6. doi: 10.1111/j.1540-8167.2008.01295.x. Epub 2008 Sep 17.

Erickson JR, Pereira L, Wang L, Han G, Ferguson A, Dao K, Copeland RJ, Despa F, Hart GW, Ripplinger CM, Bers DM. Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature*. 2013 Oct 17;502(7471):372-6. doi: 10.1038/nature12537. Epub 2013 Sep 29.

Farmer G¹, Bargonetti J, Zhu H, Friedman P, Prywes R, Prives C. Wild-type p53 activates transcription in vitro. *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):83-6.

Fillippovich I¹, Sorokina N, Gatei M, Haupt Y, Hobson K, Moallem E, Spring K, Mould M, McGuckin MA, Lavin MF, Khanna KK. Transactivation-deficient p73alpha (p73Deltaexon2) inhibits apoptosis and competes with p53. *Oncogene*. 2001 Jan 25;20(4):514-22.

Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, Jacobs KM, Harris KM, Greenberg ME. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*. 1997 Nov;19(5):1031-47.

Finlan LE, Hupp TR. p63: the phantom of the tumor suppressor. *Cell Cycle*. 2007 May 2;6(9):1062-71. Epub 2007 May 19. Review.

Flores ER, Sengupta S, Miller JB, Newman JJ, Bronson R, Crowley D, Yang A, McKeon F, Jacks T. Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell*. 2005 Apr;7(4):363-73.

Frankland PW, O'Brien C, Ohno M, Kirkwood A, Silva AJ. Alpha-CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):309-13.

Friedman PN, Kern SE, Vogelstein B, Prives C. Wild-type, but not mutant, human p53 proteins inhibit the replication activities of simian virus 40 large tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Dec;87(23):9275-9.

Gaiddon C¹, Lokshin M, Ahn J, Zhang T, Prives C. A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol Cell Biol*. 2001 Mar;21(5):1874-87.

Gaiddon C¹, Lokshin M, Gross I, Levasseur D, Taya Y, Loeffler JP, Prives C. Cyclin-dependent kinases phosphorylate p73 at threonine 86 in a cell cycle-dependent manner and negatively regulate p73. *J Biol Chem*. 2003 Jul 25;278(30):27421-31. Epub 2003 Apr 3.

Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG Jr, Levrero M, Wang JY. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature*. 1999 Jun 24;399(6738):806-9.

Ghosh A¹, Ginty DD, Bading H, Greenberg ME. Calcium regulation of gene expression in neuronal cells. *J Neurobiol*. 1994 Mar;25(3):294-303.

Grob TJ, Novak U, Maisse C, Barcaroli D, Lüthi AU, Pirnia F, Hügli B, Graber HU, De Laurenzi V, Fey MF, Melino G, Tobler A. Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ*. 2001 Dec;8(12):1213-23.

Gu J¹, Chen D, Rosenblum J, Rubin RM, Yuan ZM. Identification of a sequence element from p53 that signals for Mdm2-targeted degradation. *Mol Cell Biol*. 2000 Feb;20(4):1243-53.

Gu B¹, Zhu WG. Surf the post-translational modification network of p53 regulation. *Int J Biol Sci*. 2012;8(5):672-84. doi: 10.7150/ijbs.4283. Epub 2012 May 10.

Guo X, Yuan S, Liu Z, Fang Q. Oxidation- and CaMKII-mediated sarcoplasmic reticulum Ca(2+) leak triggers atrial fibrillation in aging. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2014 Jun;25(6):645-52. doi: 10.1111/jce.12395. Epub 2014 May 2.

Hahn S, Hermeking H. ZNF281/ZBP-99: a new player in epithelial-mesenchymal transition, stemness, and cancer. *J Mol Med (Berl)*. 2014 Jun;92(6):571-81. doi: 10.1007/s00109-014-1160-3. Epub 2014 May 18.

Harms K, Nozell S, Chen X. The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell Mol Life Sci*. 2004 Apr;61(7-8):822-42. Review.

He Z, Liu H, Agostini M, Yousefi S, Perren A, Tschan MP, Mak TW, Melino G, Simon HU. p73 regulates autophagy and hepatocellular lipid metabolism through a transcriptional activation of the ATG5 gene. *Cell Death Differ*. 2013 Oct;20(10):1415-24. doi: 10.1038/cdd.2013.104. Epub 2013 Aug 2.

Higashino F¹, Pipas JM, Shenk T. Adenovirus E4orf6 oncoprotein modulates the function of the p53-related protein, p73. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 22;95(26):15683-7.

Hoch B, Haase H, Schulze W, Hagemann D, Morano I, Krause EG, Karczewski P. Differentiation-dependent expression of cardiac delta-CaMKII isoforms. *J Cell Biochem*. 1998 Feb 1;68(2):259-68.

Hofstetter G¹, Berger A, Fiegl H, Slade N, Zorić A, Holzer B, Schuster E, Mobus VJ, Reimer D, Daxenbichler G, Marth C, Zeimet AG, Concin N, Zeillinger R. Alternative splicing of p53 and p73: the novel p53 splice variant p53delta is an independent prognostic marker in ovarian cancer. *Oncogene*. 2010 Apr 1;29(13):1997-2004. doi: 10.1038/onc.2009.482. Epub 2010 Jan 18.

Holcakova J, Ceskova P, Hrstka R, Muller P, Dubska L, Coates PJ, Palecek E, Vojtesek B. The cell type-specific effect of TAp73 isoforms on the cell cycle and apoptosis. *Cell Mol Biol Lett*. 2008;13(3):404-20. doi: 10.2478/s11658-008-0011-z. Epub 2008 Mar 18.

Holembowski L, Kramer D, Riedel D, Sordella R, Nemajerova A, Dobbstein M, Moll UM. TAp73 is essential for germ cell adhesion and maturation in testis. *J Cell Biol*. 2014 Mar 31;204(7):1173-90. doi: 10.1083/jcb.201306066. Epub 2014 Mar 24.

Hook SS, Means AR. Ca(2+)/CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:471-505. Review.

Hooper C, Killick R, Tavassoli M, Melino G, Lovestone S. TAp73alpha induces tau phosphorylation in HEK293a cells via a transcription-dependent mechanism. *Neurosci Lett*. 2006 Jun 19;401(1-2):30-4. Epub 2006 Mar 31.

Hudmon A, Schulman H. Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J*. 2002 Jun 15;364(Pt 3):593-611. Review.

Hudmon A, Schulman H. Neuronal CA²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:473-510. Epub 2001 Nov 9. Review.

Inoue T, Stuart J, Leno R, Maki CG. Nuclear import and export signals in control of the p53-related protein p73. *J Biol Chem*. 2002 Apr 26;277(17):15053-60. Epub 2002 Feb 14.

Inoue S, Tomasini R, Rufini A, Elia AJ, Agostini M, Amelio I, Cescon D, Dinsdale D, Zhou L, Harris IS, Lac S, Silvester J, Li WY, Sasaki M, Haight J, Brüstle A, Wakeham A, McKerlie C, Jurisicova A, Melino G, Mak TW. TAp73 is required for spermatogenesis and the maintenance of male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Feb 4;111(5):1843-8. doi: 10.1073/pnas.1323416111. Epub 2014 Jan 21.

Irwin MS, Kaelin WG Jr. Role of the newer p53 family proteins in malignancy. *Apoptosis*. 2001 Feb-Apr;6(1-2):17-29. Review.

Jain N¹, Gupta S, Sudhakar Ch, Radha V, Swarup G. Role of p73 in regulating human caspase-1 gene transcription induced by interferon- γ and cisplatin. *J Biol Chem*. 2005 Nov 4;280(44):36664-73. Epub 2005 Aug 31.

Jinwoong Bok, Qiong Wang, Jie Huang, Steven H. Green. CaMKII and CaMKIV mediate distinct prosurvival signaling pathways in response to depolarization in neurons. *Mol Cell Neurosci*. Author manuscript; available in PMC 2008 September 1.

Joerger AC, Rajagopalan S, Natan E, Veprintsev DB, Robinson CV, Fersht AR. Structural evolution of p53, p63, and p73: implication for heterotetramer formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Oct 20;106(42):17705-10. doi: 10.1073/pnas.0905867106. Epub 2009 Oct 7.

- Kaelin WG Jr. The p53 gene family. *Oncogene*. 1999 Dec 13;18(53):7701-5. Review.
- Kaghad M¹, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*. 1997 Aug 22;90(4):809-19.
- Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*. 1997 Aug 22;90(4):809-19.
- Kahl CR, Means AR. Regulation of cyclin D1/Cdk4 complexes by calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *J Biol Chem*. 2004 Apr 9;279(15):15411-9. Epub 2004 Jan 30.
- Kahl CR¹, Means AR. Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr Rev*. 2003 Dec;24(6):719-36.
- Kamm KE, Stull JT. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem*. 2001 Feb 16;276(7):4527-30. Epub 2000 Nov 28. Review.
- Karls U, Müller U, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Harbers K. Structure, expression, and chromosome location of the gene for the beta subunit of brain-specific Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II identified by transgene integration in an embryonic lethal mouse mutant. *Mol Cell Biol*. 1992 Aug;12(8):3644-52.
- Kasahara J, Fukunaga K, Miyamoto E. Activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in long term potentiation in the rat hippocampal CA1 region. *J Biol Chem*. 2001 Jun 29;276(26):24044-50. Epub 2001 Apr 16.
- Kitsos CM¹, Sankar U, Illario M, Colomer-Font JM, Duncan AW, Ribar TJ, Reya T, Means AR. Calmodulin-dependent protein kinase IV regulates hematopoietic stem cell maintenance. *J Biol Chem*. 2005 Sep 30;280(39):33101-8. Epub 2005 Jul 14.
- De Koninck P, Schulman H. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. *Science*. 1998 Jan 9;279(5348):227-30.
- Konur S, Ghosh A. Calcium signaling and the control of dendritic development. *Neuron*. 2005 May 5;46(3):401-5. Review.
- Kornhauser JM, Cowan CW, Shaywitz AJ, Dolmetsch RE, Griffith EC, Hu LS, Haddad C, Xia Z, Greenberg ME. CREB transcriptional activity in neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events. *Neuron*. 2002 Apr 11;34(2):221-33.
- Krebs J¹, Wilson A, Kisielow P. Calmodulin-dependent protein kinase IV during T-cell development. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Dec 18;241(2):383-9.

- Kruse JP, Gu W. SnapShot: p53 posttranslational modifications. *Cell*. 2008 May 30;133(5):930-30.e1. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.020.
- Kuhn TB¹, Williams CV, Dou P, Kater SB. Laminin directs growth cone navigation via two temporally and functionally distinct calcium signals. *J Neurosci*. 1998 Jan 1;18(1):184-94.
- Lai Y, Nairn AC, Greengard P. Autophosphorylation reversibly regulates the Ca²⁺/calmodulin-dependence of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Jun;83(12):4253-7.
- Lai Y, Nairn AC, Gorelick F, Greengard P. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: identification of autophosphorylation sites responsible for generation of Ca²⁺/calmodulin-independence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Aug;84(16):5710-4.
- Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):15-6.
- Leclerc C, Néant I, Moreau M. Early neural development in vertebrates is also a matter of calcium. *Biochimie*. 2011 Dec;93(12):2102-11.
- Lin, Y.-L., Sengupta, S., Gurdziel, K., Bell, G.W., Jacks, T., and Flores, E.R. (2009). p63 and p73 Transcriptionally Regulate Genes Involved in DNA Repair. *PLoS Genetics* 5, e1000680.
- Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci*. 2012 Feb 15;13(3):169-82. doi: 10.1038/nrn3192.
- Lisman J, Schulman H, Cline H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Mar;3(3):175-90. Review.
- Lisman J, Schulman H, Cline H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Mar;3(3):175-90. Review.
- Luczak ED¹, Anderson ME². CaMKII oxidative activation and the pathogenesis of cardiac disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2014 Aug;73:112-6. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.02.004. Epub 2014 Feb 13.
- Ly PT, Song W. Loss of activated CaMKII at the synapse underlies Alzheimer's disease memory loss. *J Neurochem*. 2011 Nov;119(4):673-5. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07473.x.
- Malatesta M¹, Peschiaroli A, Memmi EM, Zhang J, Antonov A, Green DR, Barlev NA, Garabadiu AV, Zhou P, Melino G, Bernassola F. The Cul4A-DDB1 E3 ubiquitin ligase complex represses p73 transcriptional activity. *Oncogene*. 2013 Sep 26;32(39):4721-6. doi: 10.1038/onc.2012.463. Epub 2012 Oct 22.
- Marrazzo E¹, Marchini S, Previdi S, Brogгинi M. Questioning the oncogenic role of DeltaNp73alpha in different cell lines expressing p53 or not. *Cancer Biol Ther*. 2006 Jul;5(7):794-803. Epub 2006 Jul 28.

Martin LJ. p53 is abnormally elevated and active in the CNS of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis.* 2000 Dec;7(6 Pt B):613-22.

Martin LJ, Liu Z. Injury-induced spinal motor neuron apoptosis is preceded by DNA single-strand breaks and is p53- and Bax-dependent. *J Neurobiol.* 2002 Feb 15;50(3):181-97.

Mattson MP¹, Ashery U. No more brain tangles with DeltaNp73. *Trends Biochem Sci.* 2009 Jan;34(1):6-8. doi: 10.1016/j.tibs.2008.10.004. Epub 2008 Nov 13.

McKinsey TA. Derepression of pathological cardiac genes by members of the CaM kinase superfamily. *Cardiovasc Res.* 2007 Mar 1;73(4):667-77. Epub 2006 Dec 5.

Means AR, Dedman JR. Calmodulin in endocrine cells and its multiple roles in hormone action. *Mol Cell Endocrinol.* 1980 Sep;19(3):215-27. Review.

Meek DW, Anderson CW. Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Dec;1(6):a000950. doi: 10.1101/cshperspect.a000950. Epub 2009 Oct 28.

Melino G, De Laurenzi V, Vousden KH. p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2002 Aug;2(8):605-15. Review.

Melloul D, Marshak S, Cerasi E. Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia.* 2002 Mar;45(3):309-26. Review.

Merlo P¹, Fulco M, Costanzo A, Mangiacasale R, Strano S, Blandino G, Taya Y, Lavia P, Levrero M. A role of p73 in mitotic exit. *J Biol Chem.* 2005 Aug 26;280(34):30354-60. Epub 2005 Jun 28.

Meyer T, Hanson PI, Stryer L, Schulman H. Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science.* 1992 May 22;256(5060):1199-202.

Miller SG, Kennedy MB. Distinct forebrain and cerebellar isozymes of type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase associate differently with the postsynaptic density fraction. *J Biol Chem.* 1985 Jul 25;260(15):9039-46.

Mills, A.A., Zheng, B., Wang, X.J., Vogel, H., Roop, D.R., and Bradley, A. (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 398, 708–713.

Min D, Guo F, Zhu S, Xu X, Mao X, Cao Y, Lv X, Gao Q, Wang L, Chen T, Shaw C, Hao L, Cai J. The alterations of Ca²⁺/calmodulin/CaMKII/CaV1.2 signaling in experimental models of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurosci Lett.* 2013 Mar 22;538:60-5.

Miranti CK¹, Ginty DD, Huang G, Chatila T, Greenberg ME. Calcium activates serum response factor-dependent transcription by a Ras- and Elk-1-independent mechanism that involves a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase. *Mol Cell Biol.* 1995 Jul;15(7):3672-84.

Mitsui K, Brady M, Palfrey HC, Nairn AC. Purification and characterization of calmodulin-dependent protein kinase III from rabbit reticulocytes and rat pancreas. *J Biol Chem*. 1993 Jun 25;268(18):13422-33.

Moll UM, LaQuaglia M, Bénard J, Riou G. Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 May 9;92(10):4407-11.

de la Monte SM, Sohn YK, Wands JR. Correlates of p53- and Fas (CD95)-mediated apoptosis in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*. 1997 Nov 6;152(1):73-83.

Moriguchi S, Tagashira H, Sasaki Y, Yeh JZ, Sakagami H, Narahashi T, Fukunaga K. CaMKII activity is essential for improvement of memory-related behaviors by chronic rivastigmine treatment. *J Neurochem*. 2014 Mar;128(6):927-37.

Morrison RS, Kinoshita Y, Johnson MD, Guo W, Garden GA. p53-dependent cell death signaling in neurons. *Neurochem Res*. 2003 Jan;28(1):15-27. Review.

Mukwevho E¹, Joseph JS². Calmodulin dependent protein kinase II activation by exercise regulates saturated & unsaturated fatty acids and improves some metabolic syndrome markers. *Life Sci*. 2014 Aug 28;111(1-2):53-61. doi: 10.1016/j.lfs.2014.07.013. Epub 2014 Jul 19.

Napieralski JA, Raghupathi R, McIntosh TK. The tumor-suppressor gene, p53, is induced in injured brain regions following experimental traumatic brain injury. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999 Jul 23;71(1):78-86.

Nghiem P¹, Saati SM, Martens CL, Gardner P, Schulman H. Cloning and analysis of two new isoforms of multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. Expression in multiple human tissues. *J Biol Chem*. 1993 Mar 15;268(8):5471-9.

Niemantsverdriet M¹, Nagle P, Chiu RK, Langendijk JA, Kampinga HH, Coppes RP. Δ Np73 enhances promoter activity of TGF- β induced genes. *PLoS One*. 2012;7(12):e50815. doi: 10.1371/journal.pone.0050815. Epub 2012 Dec 7.

Obad S¹, Brunnström H, Vallon-Christersson J, Borg A, Drott K, Gullberg U. Staf50 is a novel p53 target gene conferring reduced clonogenic growth of leukemic U-937 cells. *Oncogene*. 2004 May 20;23(23):4050-9.

Ozaki T, Okoshi R, Sang M, Kubo N, Nakagawara A. Acetylation status of E2F-1 has an important role in the regulation of E2F-1-mediated transactivation of tumor suppressor p73. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Aug 14;386(1):207-11. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.06.035. Epub 2009 Jun 11.

Persaud SJ, Liu B, Sampaio HB, Jones PM, Muller DS. Calcium/calmodulin-dependent kinase IV controls glucose-induced Irs2 expression in mouse beta cells via activation of cAMP response element-binding protein. *Diabetologia*. 2011 May;54(5):1109-20. doi: 10.1007/s00125-011-2050-7. Epub 2011 Feb 8.

- Peschiaroli A¹, Scialpi F, Bernassola F, Pagano M, Melino G. The F-box protein FBXO45 promotes the proteasome-dependent degradation of p73. *Oncogene*. 2009 Sep 3;28(35):3157-66. doi: 10.1038/onc.2009.177. Epub 2009 Jul 6.
- Picciotto MR, Zoli M, Bertuzzi G, Nairn AC. Immunochemical localization of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *Synapse*. 1995 May;20(1):75-84.
- Planas-Silva MD¹, Means AR. Expression of a constitutive form of calcium/calmodulin dependent protein kinase II leads to arrest of the cell cycle in G2. *EMBO J*. 1992 Feb;11(2):507-17.
- Pozniak CD, Radinovic S, Yang A, McKeon F, Kaplan DR, Miller FD. An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science*. 2000 Jul 14;289(5477):304-6.
- Pozniak CD¹, Barnabé-Heider F, Rymar VV, Lee AF, Sadikot AF, Miller FD. p73 is required for survival and maintenance of CNS neurons. *J Neurosci*. 2002 Nov 15;22(22):9800-9.
- Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol*. 1999 Jan;187(1):112-26. Review.
- Redmond L¹, Kashani AH, Ghosh A. Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron*. 2002 Jun 13;34(6):999-1010.
- Rellos P, Pike AC, Niesen FH, Salah E, Lee WH, von Delft F, Knapp S. Structure of the CaMKIIdelta/calmodulin complex reveals the molecular mechanism of CaMKII kinase activation. *PLoS Biol*. 2010 Jul 27;8(7):e1000426. doi: 10.1371/journal.pbio.1000426.
- Ribar TJ, Rodriguiz RM, Khiroug L, Wetsel WC, Augustine GJ, Means AR. Cerebellar defects in Ca²⁺/calmodulin kinase IV-deficient mice. *J Neurosci*. 2000 Nov 15;20(22):RC107.
- Rocco JW, Ellisen LW. p63 and p73: life and death in squamous cell carcinoma. *Cell Cycle*. 2006 May;5(9):936-40. Epub 2006 May 1.
- Rochlitz H, Voigt A, Lankat-Buttgereit B, Göke B, Heimberg H, Nauck MA, Schiemann U, Schatz H, Pfeiffer AF. Cloning and quantitative determination of the human Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) isoforms in human beta cells. *Diabetologia*. 2000 Apr;43(4):465-73.
- Romano RA, Sinha S. Family matters: sibling rivalry and bonding between p53 and p63 in cancer. *Exp Dermatol*. 2014 Apr;23(4):238-9. doi: 10.1111/exd.12356. Epub 2014 Mar 16.
- Rosenberg OS, Deindl S, Sung RJ, Nairn AC, Kuriyan J. Structure of the autoinhibited kinase domain of CaMKII and SAXS analysis of the holoenzyme. *Cell*. 2005 Dec 2;123(5):849-60.

Rosenbluth JM¹, Pietsenpol JA. mTOR regulates autophagy-associated genes downstream of p73. *Autophagy*. 2009 Jan;5(1):114-6. Epub 2009 Jan 30.

Rossi M, De Laurenzi V, Munarriz E, Green DR, Liu YC, Vousden KH, Cesareni G, Melino G. The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *EMBO J*. 2005 Feb 23;24(4):836-48. Epub 2005 Jan 27.

Roth J, König C, Wienzek S, Weigel S, Ristea S, Dobbelstein M. Inactivation of p53 but not p73 by adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton and E4 34-kilodalton oncoproteins. *J Virol*. 1998 Nov;72(11):8510-6.

Rouleau, M., Medawar, A., Hamon, L., Shivtiel, S., Wolchinsky, Z., Zhou, H., De Rosa, L., Candi, E., de la Forest Divonne, S., Mikkola, M.L., et al. (2011). TAp63 is important for cardiac differentiation of embryonic stem cells and heart development. *Stem Cells* 29, 1672–1683.

Sabatino MA¹, Previdi S, Broggin M. In vivo evaluation of the role of DNp73alpha protein in regulating the p53-dependent apoptotic pathway after treatment with cytotoxic drugs. *Int J Cancer*. 2007 Feb 1;120(3):506-13.

Sakagami H, Umemiya M, Saito S, Kondo H. Distinct immunohistochemical localization of two isoforms of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases in the adult rat brain. *Eur J Neurosci*. 2000 Jan;12(1):89-99.

Sakagami H, Umemiya M, Kobayashi T, Saito S, Kondo H. Immunological evidence that the beta isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV is a cerebellar granule cell-specific product of the CaM kinase IV gene. *Eur J Neurosci*. 1999 Jul;11(7):2531-6.

Saifudeen Z¹, Diavolitsis V, Stefkova J, Dipp S, Fan H, El-Dahr SS. Spatiotemporal switch from DeltaNp73 to TAp73 isoforms during nephrogenesis: impact on differentiation gene expression. *J Biol Chem*. 2005 Jun 17;280(24):23094-102. Epub 2005 Apr 1.

Sanhueza M¹, Fernandez-Villalobos G, Stein IS, Kasumova G, Zhang P, Bayer KU, Otmakhov N, Hell JW, Lisman J. Role of the CaMKII/NMDA receptor complex in the maintenance of synaptic strength. *J Neurosci*. 2011 Jun 22;31(25):9170-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1250-11.2011.

Scholz WK, Palfrey HC. Activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by extracellular calcium in cultured hippocampal pyramidal neurons. *J Neurochem*. 1998 Aug;71(2):580-91.

Schworer CM, Rothblum LI, Thekkumkara TJ, Singer HA. Identification of novel isoforms of the delta subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. Differential expression in rat brain and aorta. *J Biol Chem*. 1993 Jul 5;268(19):14443-9.

Sheng M¹, Thompson MA, Greenberg ME. CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science*. 1991 Jun 7;252(5011):1427-30.

Soderling TR. The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends Biochem Sci.* 1999 Jun;24(6):232-6. Review.

Soderling TR¹, Stull JT. Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases. *Chem Rev.* 2001 Aug;101(8):2341-52.

Steiner B, Mandelkow EM, Biernat J, Gustke N, Meyer HE, Schmidt B, Mieskes G, Söling HD, Drechsel D, Kirschner MW, et al. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: identification of the site for Ca²⁺-calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles. *EMBO J.* 1990 Nov;9(11):3539-44.

Stiewe T, Theseling CC, Pützer BM. Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. *J Biol Chem.* 2002 Apr 19;277(16):14177-85. Epub 2002 Feb 13.

Stiewe T, Pützer BM. Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene? *Cell Death Differ.* 2002 Mar;9(3):237-45. Review.

Stiewe T, Zimmermann S, Frilling A, Esche H, Pützer BM. Transactivation-deficient DeltaTA-p73 acts as an oncogene. *Cancer Res.* 2002 Jul 1;62(13):3598-602.

Stiewe T¹, Pützer BM. Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat Genet.* 2000 Dec;26(4):464-9.

Takai N, Ueda T, Nasu K, Yamashita S, Toyofuku M, Narahara H. Targeting calcium/calmodulin-dependence kinase I and II as a potential anti-proliferation remedy for endometrial carcinomas. *Cancer Lett.* 2009 May 18;277(2):235-43. doi: 10.1016/j.canlet.2008.12.018. Epub 2009 Jan 24.

Takemura M, Mishima T, Wang Y, Kasahara J, Fukunaga K, Ohashi K, Mizuno K. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV-mediated LIM kinase activation is critical for calcium signal-induced neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 2009 Oct 16;284(42):28554-62. doi: 10.1074/jbc.M109.006296. Epub 2009 Aug 20.

Takeuchi Y, Fukumoto S, Nakayama K, Tamura Y, Yanagisawa A, Fujita T. Parathyroid hormone-related protein induced coupled increases in bone formation and resorption markers for 7 years in a patient with malignant islet cell tumors. *J Bone Miner Res.* 2002 May;17(5):753-7.

Takeuchi Y, Yamamoto H, Fukunaga K, Miyakawa T, Miyamoto E. Identification of the isoforms of Ca(2+)/Calmodulin-dependent protein kinase II in rat astrocytes and their subcellular localization. *J Neurochem.* 2000 Jun;74(6):2557-67.

Takeuchi M¹, Fujisawa H. Perinuclear membrane localization of alphaKAP, a protein produced from a gene within the gene of calmodulin-dependent protein kinase IIalpha. *J Biochem.* 1997 Sep;122(3):494-7.

Tang F¹, Kalil K. Netrin-1 induces axon branching in developing cortical neurons by frequency-dependent calcium signaling pathways. *J Neurosci*. 2005 Jul 13;25(28):6702-15.

Tissir F, Ravni A, Achouri Y, Riethmacher D, Meyer G, Goffinet AM. DeltaNp73 regulates neuronal survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 29;106(39):16871-6. doi: 10.1073/pnas.0903191106. Epub 2009 Sep 10.

Tobimatsu T¹, Fujisawa H. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem*. 1989 Oct 25;264(30):17907-12.

Tokino T, Nakamura Y. The role of p53-target genes in human cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2000 Jan;33(1):1-6. Review.

Tokumitsu H, Enslin H, Soderling TR. Characterization of a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning and expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase. *J Biol Chem*. 1995 Aug 18;270(33):19320-4.

Tomasini R¹, Secq V, Pouyet L, Thakur AK, Wilhelm M, Nigri J, Vasseur S, Berthezene P, Calvo E, Melino G, Mak TW, Iovanna JL. TAp73 is required for macrophage-mediated innate immunity and the resolution of inflammatory responses. *Cell Death Differ*. 2013 Feb;20(2):293-301. doi: 10.1038/cdd.2012.123. Epub 2012 Sep 14.

Tomasini R, Mak TW, Melino G. The impact of p53 and p73 on aneuploidy and cancer. *Trends Cell Biol*. 2008 May;18(5):244-52. doi: 10.1016/j.tcb.2008.03.003. Epub 2008 Apr 10. Review.

Tomasini R, Tsuchihara K, Wilhelm M, Fujitani M, Rufini A, Cheung CC, Khan F, Itie-Youten A, Wakeham A, Tsao MS, Iovanna JL, Squire J, Jurisica I, Kaplan D, Melino G, Jurisicova A, Mak TW. TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev*. 2008 Oct 1;22(19):2677-91. doi: 10.1101/gad.1695308. Epub 2008 Sep 19.

Tombes RM¹, Krystal GW. Identification of novel human tumor cell-specific CaMK-II variants. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Mar 1;1355(3):281-92.

Uezu A¹, Fukunaga K, Kasahara J, Miyamoto E. Activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurochem*. 2002 Aug;82(3):585-93.

Uramoto H, Sugio K, Oyama T, Nakata S, Ono K, Morita M, Funa K, Yasumoto K. Expression of deltaNp73 predicts poor prognosis in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 Oct 15;10(20):6905-11.

Vaillant AR¹, Zanassi P, Walsh GS, Aumont A, Alonso A, Miller FD. Signaling mechanisms underlying reversible, activity-dependent dendrite formation. *Neuron*. 2002 Jun 13;34(6):985-98.

Van den Top JG¹, Harkema L, Lange C, Ensink JM, van de Lest CH, Barneveld A, van Weeren PR, Gröne A, Martens A. Expression of p53, Ki67, EcPV2- and EcPV3 DNA, and viral genes in relation to metastasis and outcome in equine penile and preputial squamous cell carcinoma. *Equine Vet J.* 2014 Feb 21. doi: 10.1111/evj.12245.

Venot C, Maratrat M, Dureuil C, Conseiller E, Bracco L, Debussche L. The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *EMBO J.* 1998 Aug 17;17(16):4668-79.

Vernole P¹, Neale MH, Barcaroli D, Munarriz E, Knight RA, Tomasini R, Mak TW, Melino G, De Laurenzi V. TAp73alpha binds the kinetochore proteins Bub1 and Bub3 resulting in polyploidy. *Cell Cycle.* 2009 Feb 1;8(3):421-9. Epub 2009 Feb 12.

Vilgelm AE, Hong SM, Washington MK, Wei J, Chen H, El-Rifai W, Zaika A. Characterization of $\Delta Np73$ expression and regulation in gastric and esophageal tumors. *Oncogene.* 2010 Oct 28;29(43):5861-8. doi: 10.1038/onc.2010.319. Epub 2010 Aug 2.

Vilgelm AE, Washington MK, Wei J, Chen H, Prassolov VS, Zaika AI. Interactions of the p53 protein family in cellular stress response in gastrointestinal tumors. *Mol Cancer Ther.* 2010 Mar;9(3):693-705. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0912. Epub 2010 Mar 2.

Vinet J¹, Carra S, Blom JM, Harvey M, Brunello N, Barden N, Tascetta F. Cloning of mouse Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta (CaMKKbeta) and characterization of CaMKKbeta and CaMKKalpha distribution in the adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003 Mar 17;111(1-2):216-21.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000 Nov 16;408(6810):307-10.

Vossio S¹, Palescandolo E, Pediconi N, Moretti F, Balsano C, Levrero M, Costanzo A. DN-p73 is activated after DNA damage in a p53-dependent manner to regulate p53-induced cell cycle arrest. *Oncogene.* 2002 May 23;21(23):3796-803.

Wayman GA, Tokumitsu H, Davare MA, Soderling TR. Analysis of CaM-kinase signaling in cells. *Cell Calcium.* 2011 Jul;50(1):1-8. doi: 10.1016/j.ceca.2011.02.007. Epub 2011 Apr 29. Review.

Wei G¹, Chen YB, Chen DF, Lai XP, Liu DH, Deng RD, Zhou JH, Zhang SX, Li YW, Lii H, Liu LF, Wang Q, Nie H. β -Asarone inhibits neuronal apoptosis via the CaMKII/CREB/Bcl-2 signaling pathway in an in vitro model and A β PP/PS1 mice. *Alzheimers Dis.* 2013;33(3):863-80.

Wei J, Zaika E, Zaika A. p53 Family: Role of Protein Isoforms in Human Cancer. *J Nucleic Acids.* 2012;2012:687359. doi: 10.1155/2012/687359. Epub 2011 Oct 9.

- Wei F¹, Qiu CS, Liauw J, Robinson DA, Ho N, Chatila T, Zhuo M. Calcium calmodulin-dependent protein kinase IV is required for fear memory. *Nat Neurosci*. 2002 Jun;5(6):573-9.
- Wilhelm MT, Rufini A, Wetzel MK, Tsuchihara K, Inoue S, Tomasini R, Itie-Youten A, Wakeham A, Arsenian-Henriksson M, Melino G, Kaplan DR, Miller FD, Mak TW. Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes Dev*. 2010 Mar 15;24(6):549-60. doi: 10.1101/gad.1873910. Epub 2010 Mar 1.
- Wilson C, Henry S, Smith MA, Bowser R. The p53 homologue p73 accumulates in the nucleus and localizes to neurites and neurofibrillary tangles in Alzheimer disease brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2004 Feb;30(1):19-29.
- Wirsching HG¹, Krishnan S, Florea AM, Frei K, Krayenbühl N, Hasenbach K, Reifenberger G, Weller M, Tabatabai G. Thymosin β 4 gene silencing decreases stemness and invasiveness in glioblastoma. *Brain*. 2014 Feb;137(Pt 2):433-48. doi: 10.1093/brain/awt333. Epub 2013 Dec 18.
- Wolff A, Technau A, Ihling C, Technau-Ihling K, Erber R, Bosch FX, Brandner G. Evidence that wild-type p53 in neuroblastoma cells is in a conformation refractory to integration into the transcriptional complex. *Oncogene*. 2001 Mar 15;20(11):1307-17.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dötsch, V., Andrews, N.C., Caput, D., and McKeon, F. (1998). p63, a p53 Homolog at 3q27-29, Encodes Multiple Products with Transactivating, Death-Inducing, and Dominant-Negative Activities. *Molecular Cell* 2, 305-316.
- Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, C., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., et al. (2000). p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 404, 99-103.
- Yankner BA, Lu T, Loerch P. The aging brain. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:41-66. Review.
- Yuan K, Chung LW, Siegal GP, Zayzafoon M. alpha-CaMKII controls the growth of human osteosarcoma by regulating cell cycle progression. *Lab Invest*. 2007 Sep;87(9):938-50. Epub 2007 Jul 16.
- Yuan ZM, Shioya H, Ishiko T, Sun X, Gu J, Huang YY, Lu H, Kharbanda S, Weichselbaum R, Kufe D. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature*. 1999 Jun 24;399(6738):814-7. Erratum in: *Nature* 1999 Aug 19;400(6746):792.
- Zaika A, Irwin M, Sansome C, Moll UM. Oncogenes induce and activate endogenous p73 protein. *J Biol Chem*. 2001 Apr 6;276(14):11310-6. Epub 2000 Dec 13.

Zaika AI, Slade N, Erster SH, Sansome C, Joseph TW, Pearl M, Chalas E, Moll UM. DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J Exp Med*. 2002 Sep 16;196(6):765-80.

Zeng X, Li X, Miller A, Yuan Z, Yuan W, Kwok RP, Goodman R, Lu H. The N-terminal domain of p73 interacts with the CH1 domain of p300/CREB binding protein and mediates transcriptional activation and apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2000 Feb;20(4):1299-310.

Zeng X¹, Chen L, Jost CA, Maya R, Keller D, Wang X, Kaelin WG Jr, Oren M, Chen J, Lu H. MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation. *Mol Cell Biol*. 1999 May;19(5):3257-66.

Zeng X, Lee H, Zhang Q, Lu H. p300 does not require its acetylase activity to stimulate p73 function. *J Biol Chem*. 2001 Jan 5;276(1):48-52.

Zheng X, Chen X. Aquaporin 3, a glycerol and water transporter, is regulated by p73 of the p53 family. *FEBS Lett*. 2001 Jan 26;489(1):4-7.

Zhou G, Wang J, Zhao M, Xie TX, Tanaka N, Sano D, Patel AA, Ward AM, Sandulache VC, Jasser SA, Skinner HD, Fitzgerald AL, Osman AA, Wei Y, Xia X, Songyang Z, Mills GB, Hung MC, Caulin C, Liang J, Myers JN. Gain-of-function mutant p53 promotes cell growth and cancer cell metabolism via inhibition of AMPK activation. *Mol Cell*. 2014 Jun 19;54(6):960-74. doi: 10.1016/j.molcel.2014.04.024. Epub 2014 May 22.

Zou L, Zhu-Mauldin X, Marchase RB, Paterson AJ, Liu J, Yang Q, Chatham JC. Glucose deprivation-induced increase in protein O-GlcNAcylation in cardiomyocytes is calcium-dependent. *J Biol Chem*. 2012 Oct 5;287(41):34419-31. doi: 10.1074/jbc.M112.393207. Epub 2012 Aug 20.

Zuloaga R¹, Fuentes EN, Molina A, Valdés JA. The cAMP response element binding protein (CREB) is activated by insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and regulates myostatin gene expression in skeletal myoblast. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Oct 18;440(2):258-64. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.067. Epub 2013 Sep 21.

