

Module Optionnel Médecine Moléculaire

Morts cellulaires et Cancer

Morgane Le Bras

morgane.le_bras@univ-paris-diderot.fr

Hôpital Saint Louis

INSERM U944-CNRS UMR 7212

Cancer

- Maladie génétique/épigénétique
- Terme général: développement et prolifération incontrôlées des cellules transformées
- Anomalies acquises (qui n'existent pas au cours du développement)

Facteurs de promotion et d'initiation tumorale

- *Facteurs endogènes:*

- genetic factors (heredity, chromosomal alterations)
- hormonal factors (hormone-dependent tumors)
- immune factors (immunodepressed patients)
- oncogene activation
- loss of tumor suppressor genes
- age

- *Facteurs exogènes :*

- ionising radiations (X rays)
- accidental irradiations (Tchernobyl...)
- chemical carcinogens (metals, benzol, tobacco)
- oncogenic viruses

Un processus multi-étapes

Premières anomalies génétiques



Avantage sélectif par rapport aux cellules normales



Expansion clonale



Instabilité génétique



Accroissement du potentiel agressif

Qu'est-ce qu'une cellule cancéreuse?

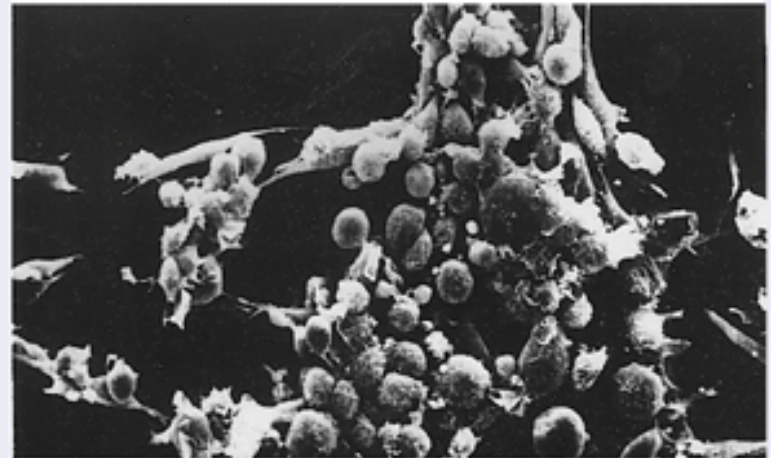
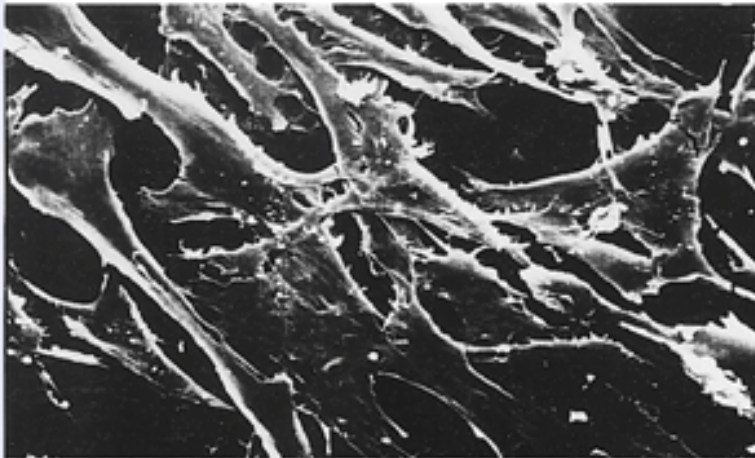
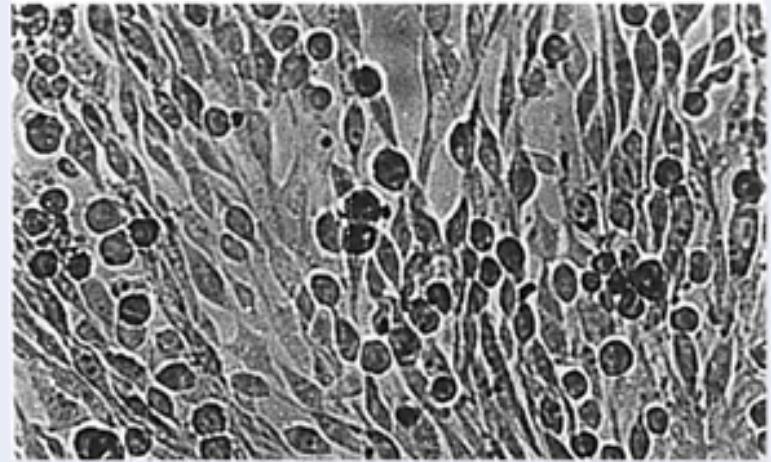
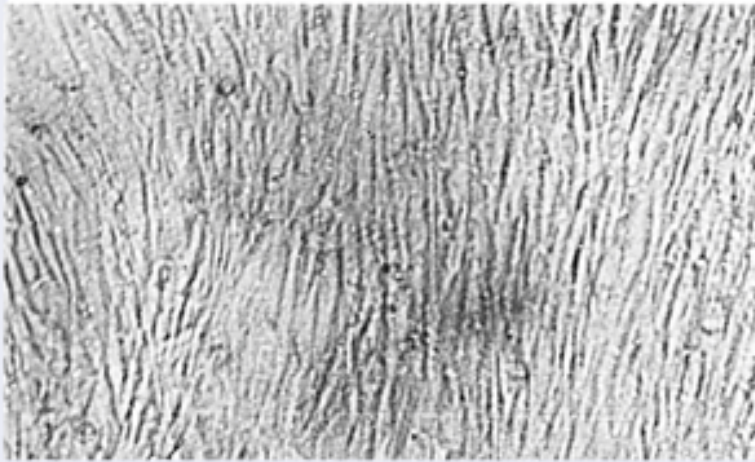
- **Immortalisation**

- Phénomène irréversible
- Prolifération « infinie »
- Réactivation télomerase
- Implication virale
- Accumulation d'anomalies génétiques

Qu'est-ce qu'une cellule cancéreuse?

- **Immortalisation**
 - **Transformation**
 - Perte d'équilibre entre molécules pro/anti-prolifération
 - Foyers/monocouches
 - Rôle des oncogènes & suppresseur de tumeurs
- **Cellules tumorales**

Figure 28.2 Normal fibroblasts grow as a layer of flat, spread-out cells, whereas transformed fibroblasts are rounded up and grow in cell masses. The cultures on the left contain normal cells, those on the right contain transformed cells. The top views are by conventional microscopy, the bottom by scanning electron microscopy. Photographs kindly provided by Hidesaburo Hanafusa and J. Michael Bishop.

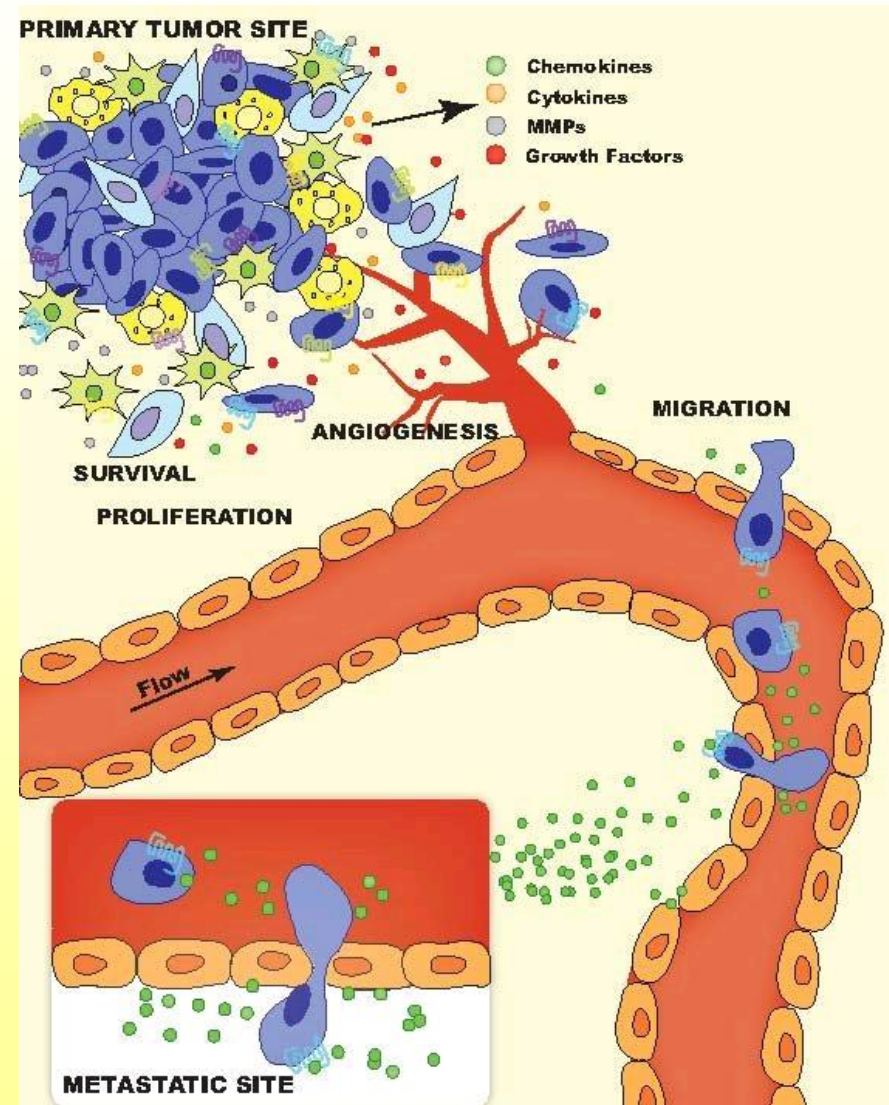


Qu'est-ce qu'une cellule cancéreuse?

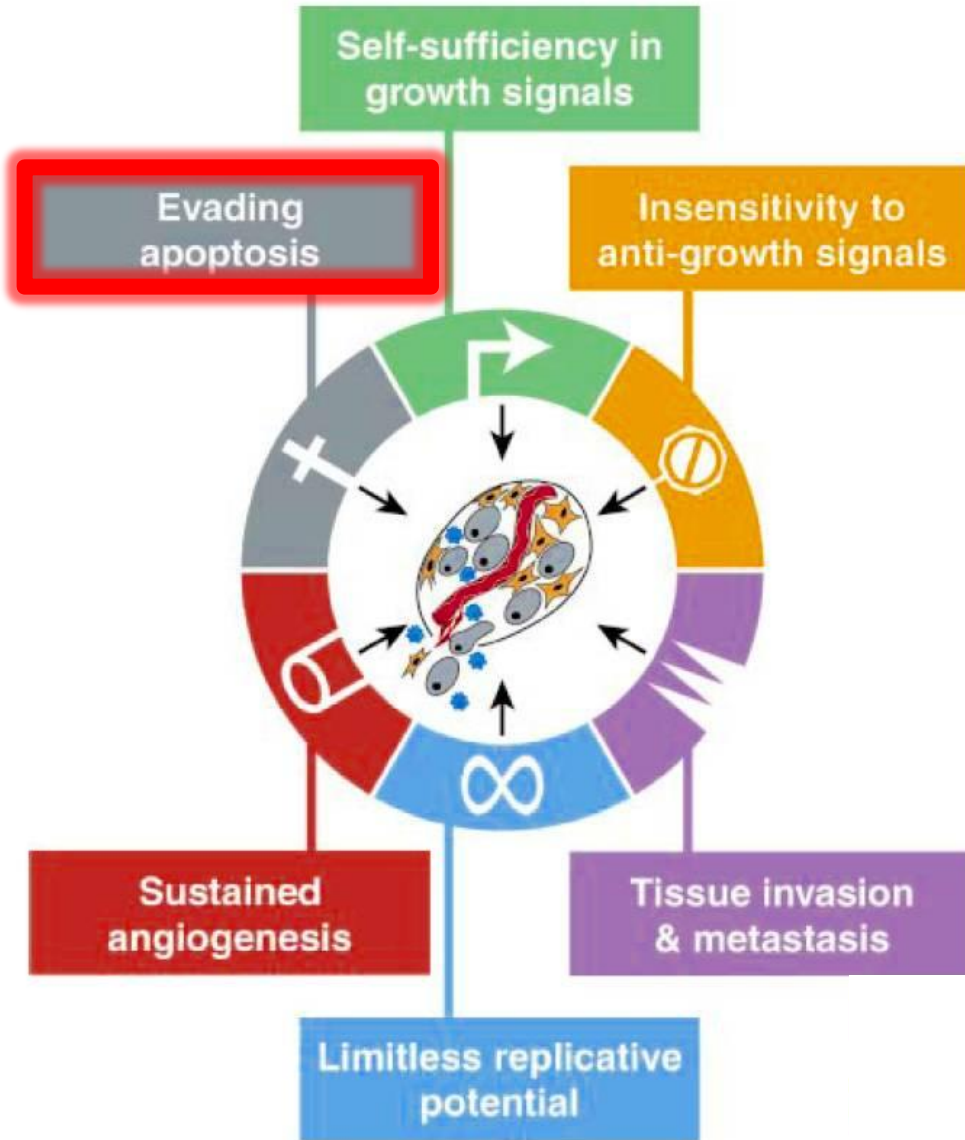
- Immortalisation
- Transformation
- Progression
- Promotion tumorale → expression phénotypique des modifications génotypiques
- Agents génotoxiques augmentent la progression tumorale
- Aberrations chromosomiques & aneuploïdie

Qu'est-ce qu'une cellule cancéreuse?

- Immortalisation
- Transformation
- Progression
- Migration



Un processus multi-étapes



Component

Example of Mechanism



Activate H-Ras oncogene



Lose retinoblastoma suppressor



Produce IGF survival factors



Turn on telomerase



Produce VEGF inducer



Inactivate E-cadherin

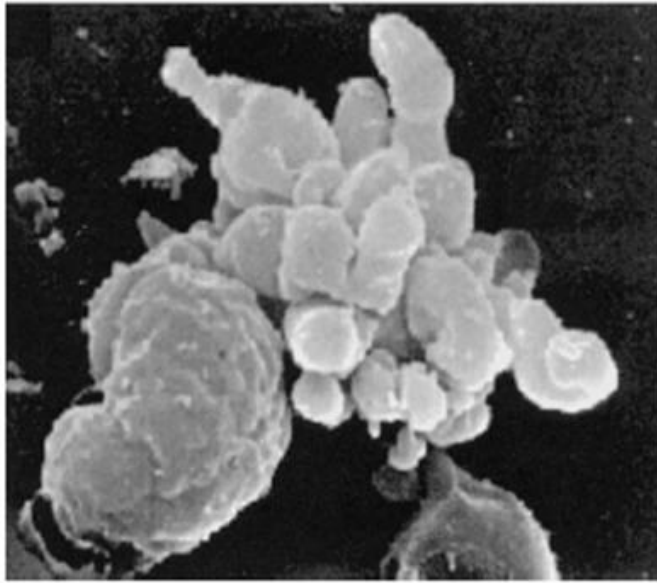
Morts cellulaires et cancer

- Introduction:
 - Les différents types de mort cellulaire
 - L'apoptose
 - L'autophagie
 - La nécrose
 - Et toutes les autres...

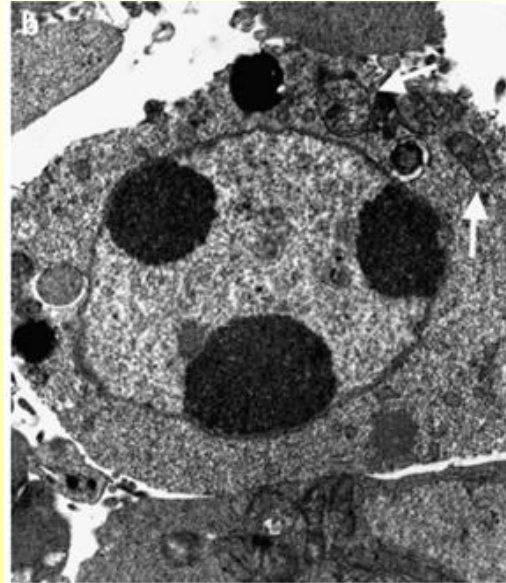
Les différents types de mort cellulaire

Apoptose (type I): Kerr et al, 1972

- Critères morphologiques



Bourgeonnement



Condensation
nucléaire

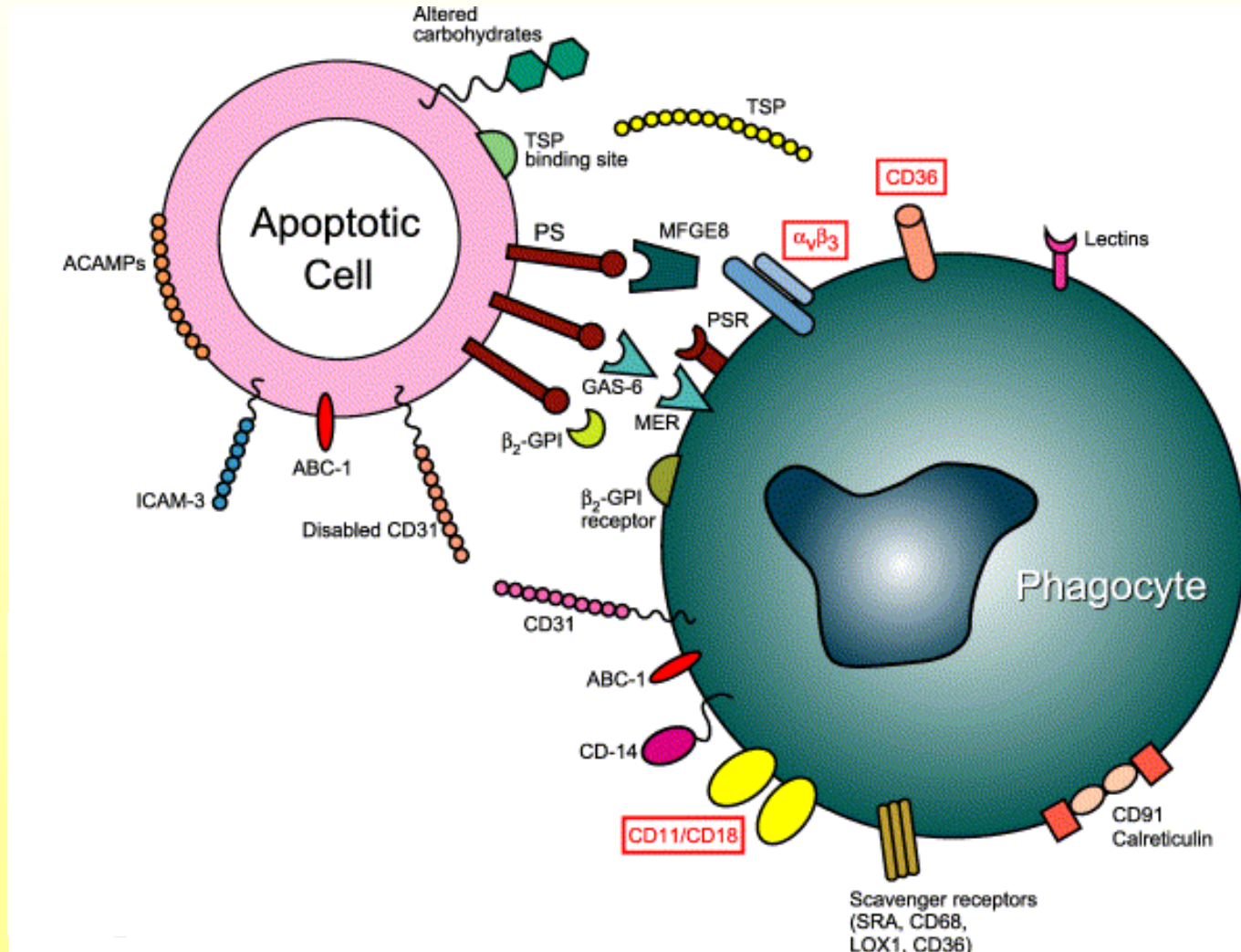


Fragmentation
ADN

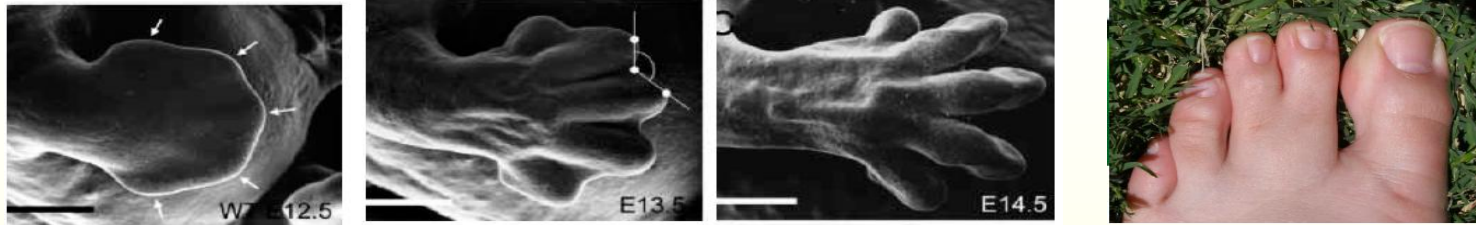
Les différents types de mort cellulaire

Apoptose (type I):

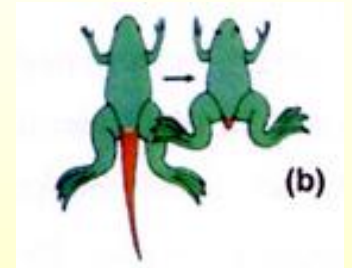
- Critères morphologiques



Apoptosis (Programmed Cell Death)



- Mort génétiquement contrôlée
- Processus conservé au cours de l'évolution
- Indispensable au cours du développement
 - Au cours du développement chez *Caenorhabditis elegans* (131 cellules sur 1089 meurent)
 - durant la métamorphose chez les insectes (*Drosophila melanogaster*) et les amphibiens
- Indispensable pour l'homéostasie cellulaire
 - post-natal: rôle important dans le système nerveux et le système immunitaire
 - Cellules surnuméraires ou endommagées (dommages génotoxiques, infection virale...)



L'apoptose dans les pathologies humaines

**Augmentation de
l'apoptose**

**SIDA
Maladies neurodégénératives**

Diminution de l'apoptose

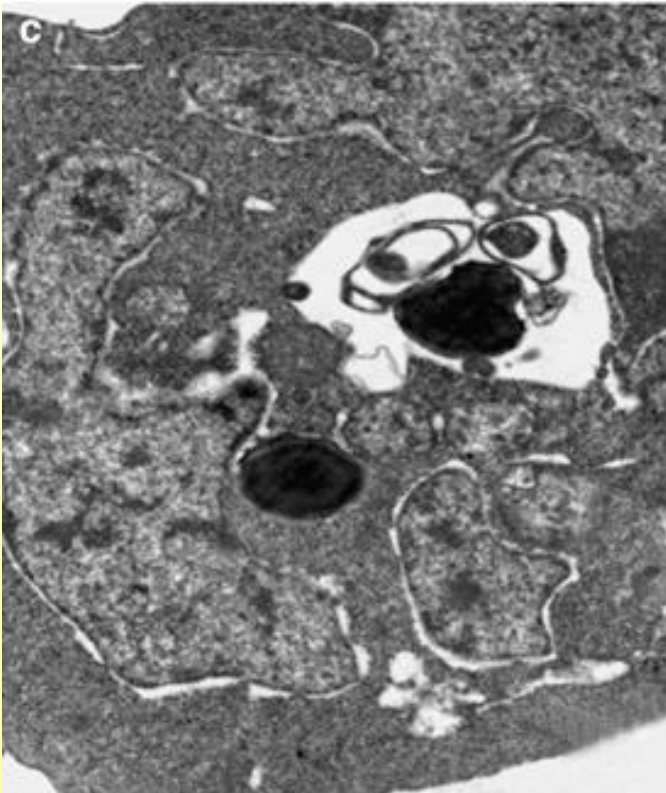
**Maladies autoimmunes
Cancer**

**Développement de stratégies thérapeutiques pour moduler
l'apoptose**

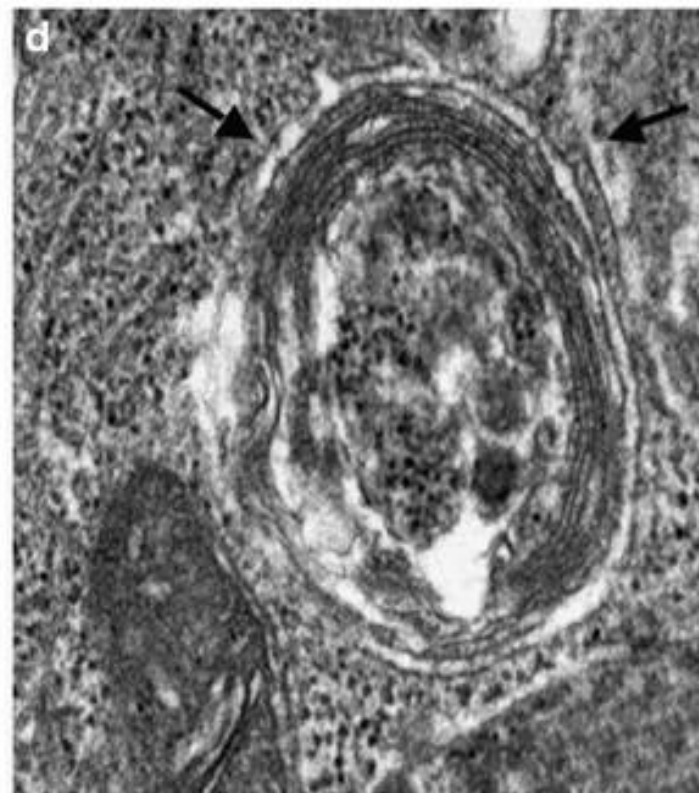
Les différents types de mort cellulaire

- Autophagie (type II):

- Critères morphologiques:



Chromatine non
modifiée



Vacuoles
d'autophagie

Les différents types de mort cellulaire

•Autophagie (type II):

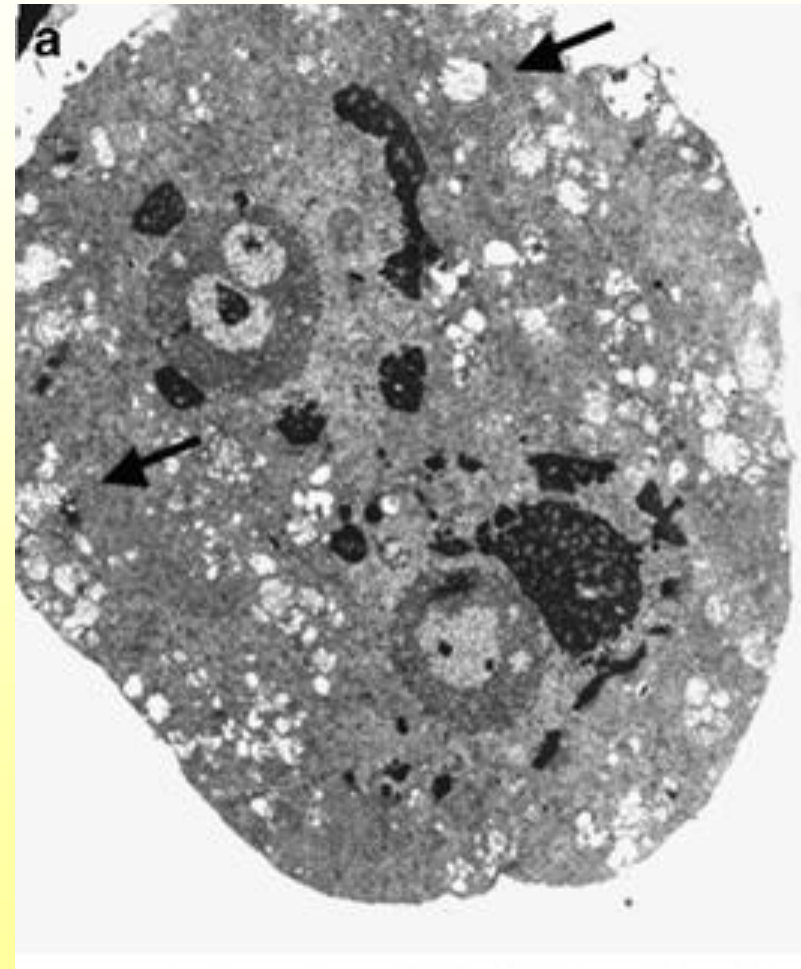
- Dépend de la susceptibilité à l'apoptose
- Implique un gène suppresseur de tumeur, beclin 1, délété dans 40-75% des cancers ovaire et sein
- ?? In vivo sur le rôle des gènes Atg/Becn1??
??Extinction entraîne une réduction de la mort cellulaire??
- L'induction de l'autophagie est parfois réversible
- Lien avec la protéolyse (= hydrolyse ou dégradation des protéines par coupure enzymatique)

Les différents types de mort cellulaire

•Nécrose (type III):

•Critères morphologiques:

- Rupture de la membrane plasmique
- Vésicules intracellulaires
- Dilatation mitochondriale

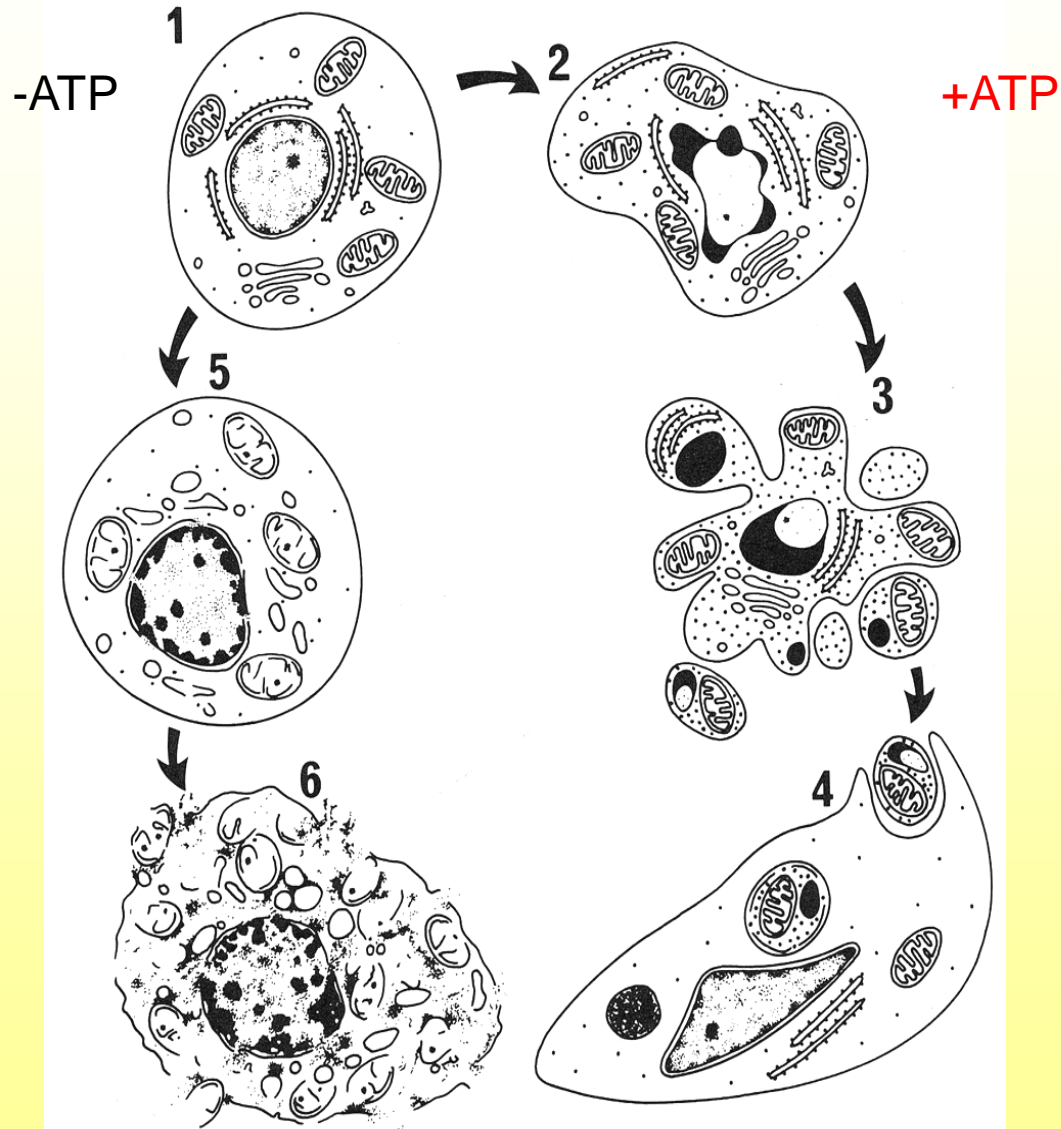


Les différents types de mort cellulaire

•Nécrose (type III):

- En général, caractérisation de la nécrose par l'absence d'apoptose ou d'autophagie classiques = définition par défaut
- Dans les tumeurs solides, l'hypoxie (déplétion en ATP) ou la privation de glucose réduit la progression tumorale par nécrose (anaérobiose, production de lactate)
- La nécrose s'accompagne d'une réponse inflammatoire importante

Nécrose vs Apoptose



Les différents types de mort cellulaire

•Et les autres mécanismes, plus atypiques....

- Catastrophe mitotique:

- Erreurs de mitoses, micro- et multi-nucléation
- Dérive vers l'apoptose ou la nécrose

- Anoikis:

- Perte d'ancrage cellulaire

- Excitotoxicity:

- Spécifiques des neurones

Mêmes mécanismes
d'induction que l'apoptose

- Necroptosis:

- Nécrose génétique contrôlée
- Dépendante de l'activité sérine/thréonine kinase RIP1
- Inhibée par nouveaux agents protecteurs: les nécrostatines

Morts cellulaires et cancer

- Introduction:
 - Les différents types de mort cellulaire
- L'apoptose:

Deux voies principales induisent l'apoptose

Voie extrinsèque (type I)

Via récepteurs membranaires:
Récepteurs de la famille TNF et Fas

Voie intrinsèque (type II)

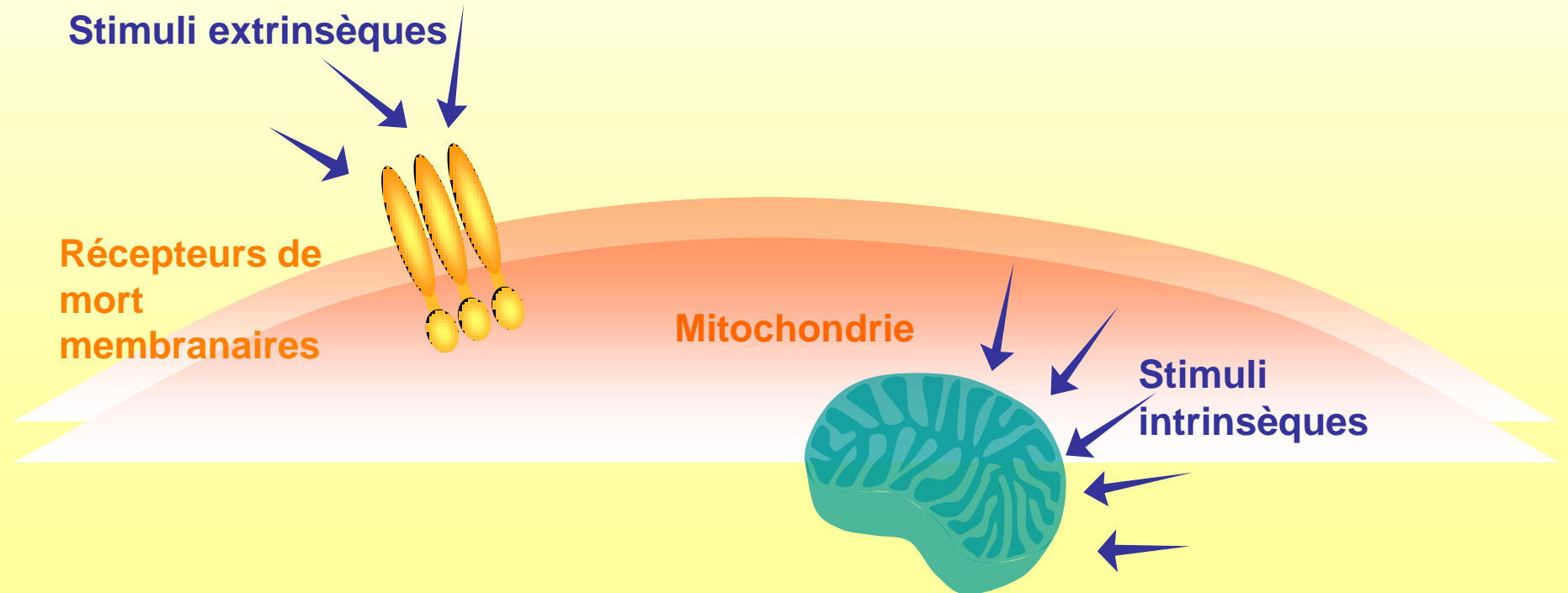
Via organites cellulaires:
Réticulum endoplasmique,
mitochondrie, lysosomes

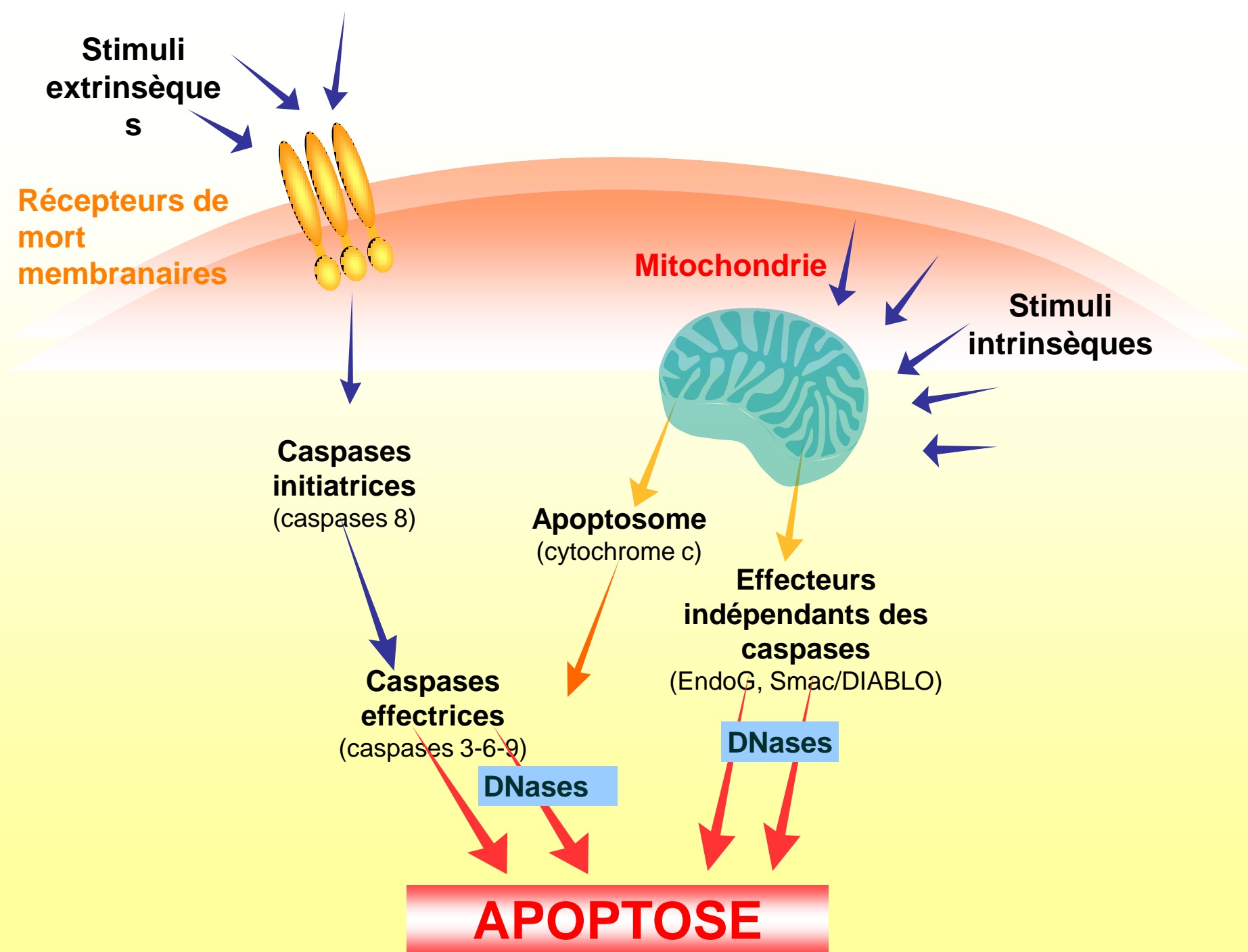
Stimuli extrinsèques

Récepteurs de
mort
membranaires

Mitochondrie

Stimuli
intrinsèques





La famille des caspases (1)

Des procaryotes aux eucaryotes (plantes, levure, nematodes, arthropodes et vertebres)

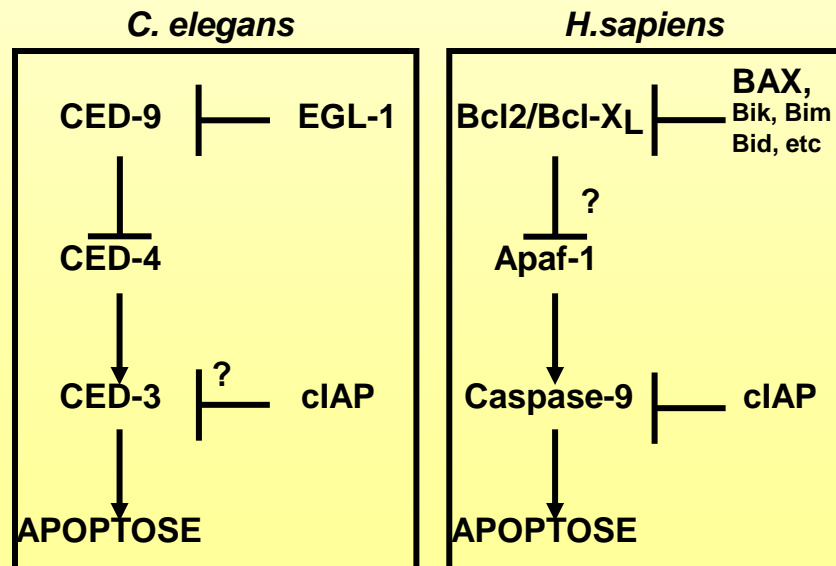
Cysteine **AS**partate **P**rotein**ASES** (DEVD motif)

zymogènes → activation → maturation → **protéolyse**

1992-1994: Horvitz et al, ced3, ced4 et ced9 genes du nématode



machinerie bien conservée phylogénétiquement



La famille des caspases (4)

Caspases à prodomaine long



Caspases initiatrices

Pro-domain= DED
(Death Effector Domain)

Caspases 8 & 10

Pro-domain= CARD
(Caspase Activating Recruitment Domain)

Caspases 1, 2, 4, 5, 9, 11 & 12

Caspases à prodomaine court



Caspases effectrices

Caspases 3, 6 & 7



APOPTOSE

Caspase 14

Activation des caspases

Activation des caspases initiatrices (one step)

Caspases 8, 9 & 10

Complexe d'activation

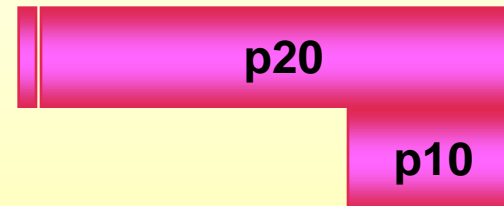
-caspases 8 & 10 = **DISC**
(voie extrinsèque)

-caspase 9 = **Apoptosome**
(voie intrinsèque)

Activation des caspases effectrices (two steps)

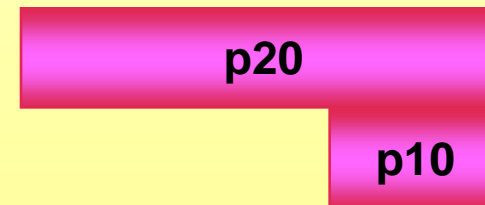
Caspases 3, 6 & 7

Clivage protéolytique



Auto-catalyse

IAPs
XIAP/Survivin



Substrats des caspases

Table 2 Caspase substrates

Category	Substrate	Site (caspase)	Functional result	Proposed effect in apoptosis
Structural	Nuclear lamin A	VEID (6)	Degraded	Disassembly of nuclear matrix, required for chromosome condensation and nuclear shrinkage
	Nuclear lamin B	VEID	Degraded	Disassembly of nuclear matrix, required for chromosome condensation and nuclear shrinkage
	Nuclear lamin C	VEID		Disassembly of nuclear matrix
	Gas2	SRVD	Activated	Disassembly of actin filaments
	α -Spectrin	DETD, DSLD (3)	Degraded	Disassemble cytoskeleton-membrane contacts
	Focal adhesion kinase	DQTD (7) VSWD (6)	Inactivated	Disassembly of focal adhesions
	Gelsolin	DQTD (3)	Activated	Disassembly of actin filaments, required for rapid blebbing and DNA cleavage
	Keratin 18	VEVD (6, 3, 7)	Degraded	Disassembly of intermediate filaments
	Actin	ELPD (3) LVVD (1)	Degraded	Disassembly of actin filaments
	β -Catenin	NYQDD, LLNDED (3)	Degraded	Disassemble cytoskeleton at cell-cell contacts
	NuMA	3, 4, 6, 7	Degraded	Disassemble chromatin/nuclear matrix contacts

Table 2 (Continued)

Category	Substrate	Site (caspase)	Functional result	Proposed effect in apoptosis
	Vimentin	3	Degraded	Disassembly of intermediate filaments
Signaling	MEKK1	DTVD (3)	Activated	Activate SAPK
	cPLA2	DELD (3)	Activated	Generate arachidonic acid
	Stat1	MELD	Inactivated	Inhibit IFN signaling
	PKC δ	DMQD (3)	Activated	Nuclear condensation
	PKC θ	DEVD (3)	Activated	Nuclear fragmentation
	D4-GDI	DELD (3) LLGD (1)	Inactivated	Deregulate Rho GTPase function
	PAK2	DSHVD (3)	Activated	Required for morphological changes
	RasGAP	DTVD? (3)	Inactivated	
	Raf1		Inactivated	Inhibit ERK activation
	Akt-1		Inactivated	Inhibit survival pathway
	Cbl		Inactivated	
	Cbl-b		Inactivated	
	PP2a	DEQD (3)	Activated	Decrease active ERK
	NF- κ B p65	ASVD, DTDD, DCRD (3)	Inactivated	Inhibit survival gene induction
	NF- κ B p50	DVSD (3)	Inactivated	Inhibit survival gene induction
Cell cycle	DNA replication complex C large subunit	DEVD, DLVD, IETD (3)	Inactivated	Inhibit DNA replication
	mdm2	DVPD (3)	Altered	Inhibit p53?
	DNA topoisomerase I/II			
	p110 PITSLRE kinase	YVPD (1, 3)		

Substrats des caspases

Table 2 (Continued)

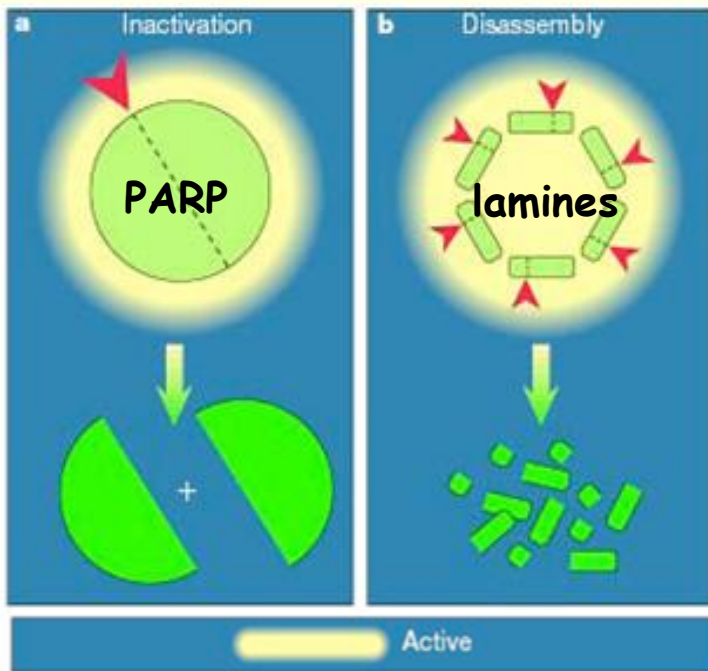
Category	Substrate	Site (caspase)	Functional result	Proposed effect in apoptosis
	Rb	DEAD (3)	Inactivated	Release E2F-1
	Wee1			Increase cdc2 and cdk2 activity
	CDC27			
DNA repair	PARP	DEVD (3)	Inactivated	DNA nicks unrecognized
	DNA-PK	DEVD, DDVD, DWVD, DFND (3)	Inactivated	Inhibit repair of DNA strand breaks
	hsRAD51		Inactivated	Inhibit repair of DNA strand breaks
Other	Interleukin 1 β	YVAD (1)	Activated	Inflammation
	Interleukin 16	SSTD (3)	Activated	Inflammation
	Interleukin 18	LESD (1)	Activated	Inflammation, induce interferon- γ
	Presenilin 1 and 2	AQRD, DSYD (3)		
	Huntingtin	1, 3		
	Androgen receptor	1, 3, 7, 8		
	Atrophia-1	1, 3, 7, 8		
	Ataxin-3	1, 3		
	Rabaptin-5	DESD, VGAD	Inactivated	Inhibit endosome fusion
	hnRNP C1 and C2	7, 3, 6	Inactivated	Inhibit RNA splicing
	U1-70 kDa	DGPD (3)	Inactivated	Inhibit RNA splicing
	ICAD/DFP-45	DEPD, DAVD (3)	Inactivated	Required to allow CAD/CPAN to degrade DNA
	Bcl-2	DAGD (3)	Altered	Function similar to Bax to promote death
	Bcl-x _L		Altered	Function similar to Bax to promote death
	Bid	LQTD (8)	Inactivated	Inactivated Bcl-2 and Bcl-x _L

Table 2 (Continued)

Category	Substrate	Site (caspase)	Functional result	Proposed effect in apoptosis
	Sp1	2?, 3?	Inactivated	Inhibit transcription
	SREBP-1,2	3	Activated	Promote cholesterol synthesis and LDL uptake?
	UBF NOR-90		Inactivated	Inhibit transcription, nucleolar organization
	p28 Bap31	8, 1		
	Nedd4	DQPD (1, 3, 6, 7)		Regulate ubiquitination
	Caspases	Caspases and Granzyme B	Activated	Required to elicit downstream effects in apoptosis

Substrats des caspases

Activité protéolytique des caspases:
site de clivage spécifique



a) = inactivation d'un substrat
ex: **PARP** (poly ADP ribose polymerase)
inactivée par coupure au site $DEVD_{213}G$
par les **caspases 3** et **7**

b) = dégradation d'un substrat
ex: réseau des **lamines** coupé
par la **caspase 6** (éléments de la
membrane nucléaire)

The CASBAH

The CAspase Substrate dataBAse Homepage

Search the CASBAH

Enter your protein of interest and hit the submit button

For a list of all known proteins leave the box empty and hit submit

See our accompanying paper at

Cell Death and Differentiation

[Luthi and Martin \(2007\) *Cell Death Differ* 14, 641-650](#)

Database constructed by

Alexander Luthi within

[The Martin Laboratory](#)

Trinity College,

Dublin 2,

Ireland

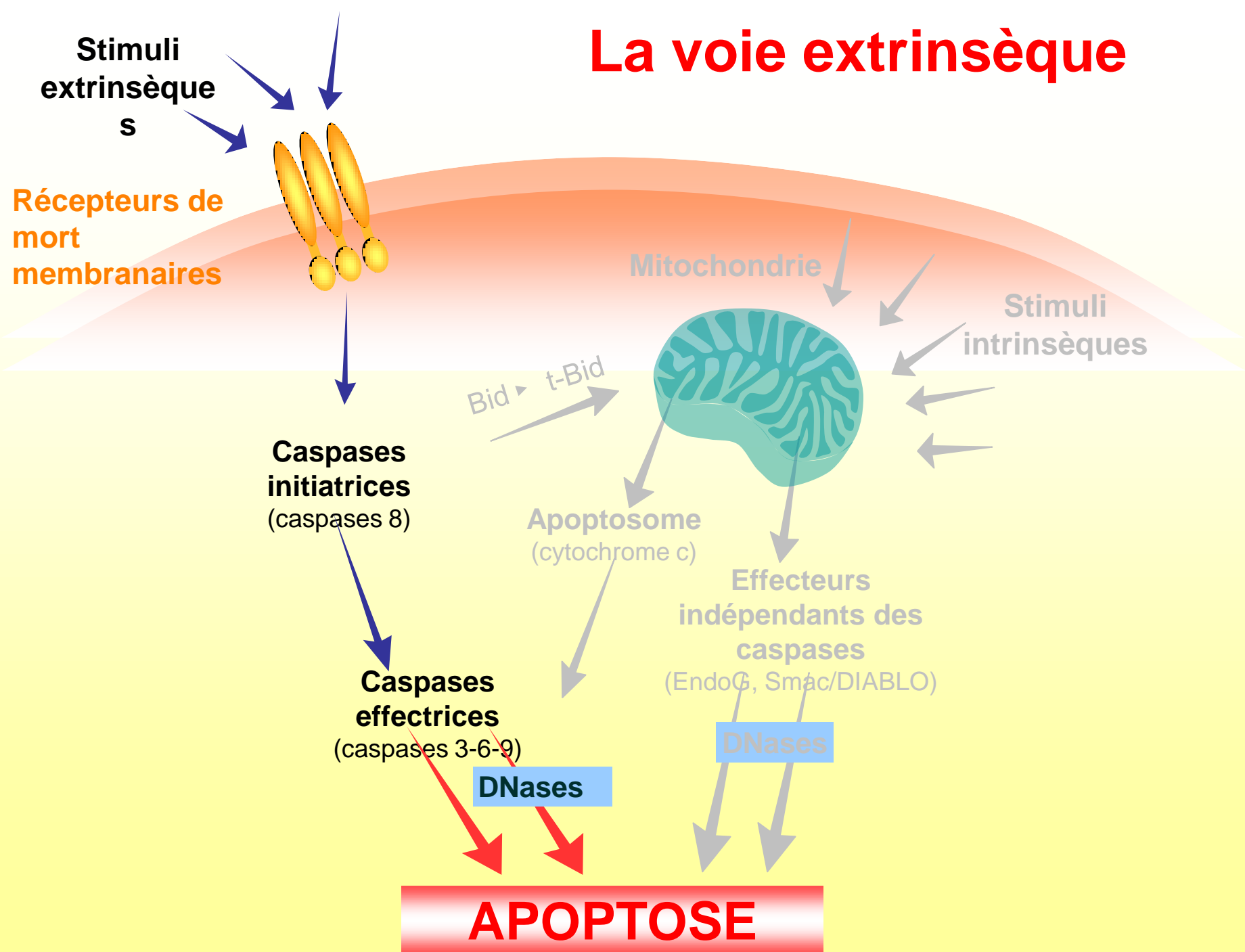
[Contact the Casbah](#)

Links

[BCL2 Family Database](#)

<http://bioinf.gen.tcd.ie/casbah/>

La voie extrinsèque



La voie extrinsèque

Récepteurs:

TNF superfamily of ligands and receptors with cytosolic signaling domain:

Death Domain (DD)

Fas

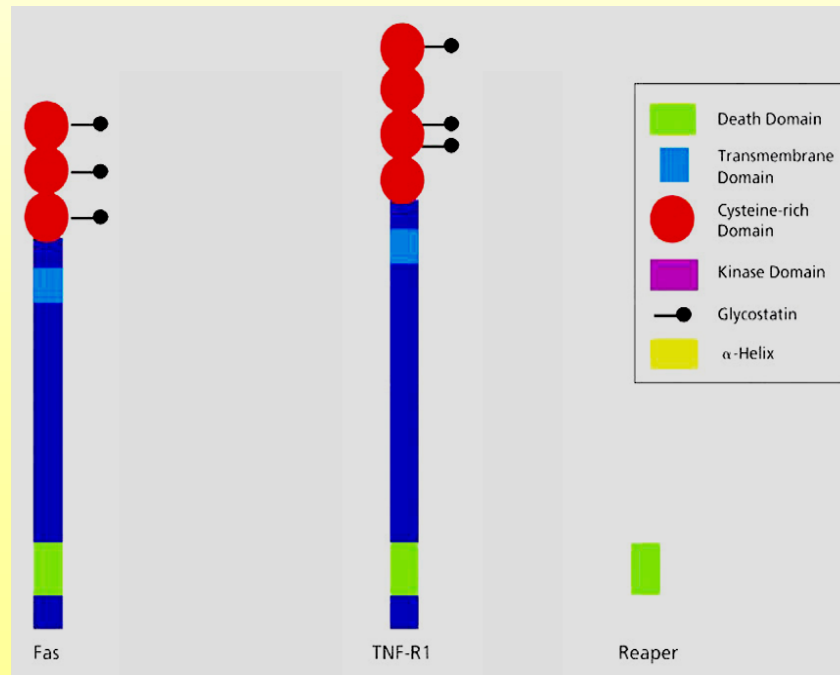
TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-R1, (TRAIL)-R2 and TNFR1

Protéines adaptatrices:

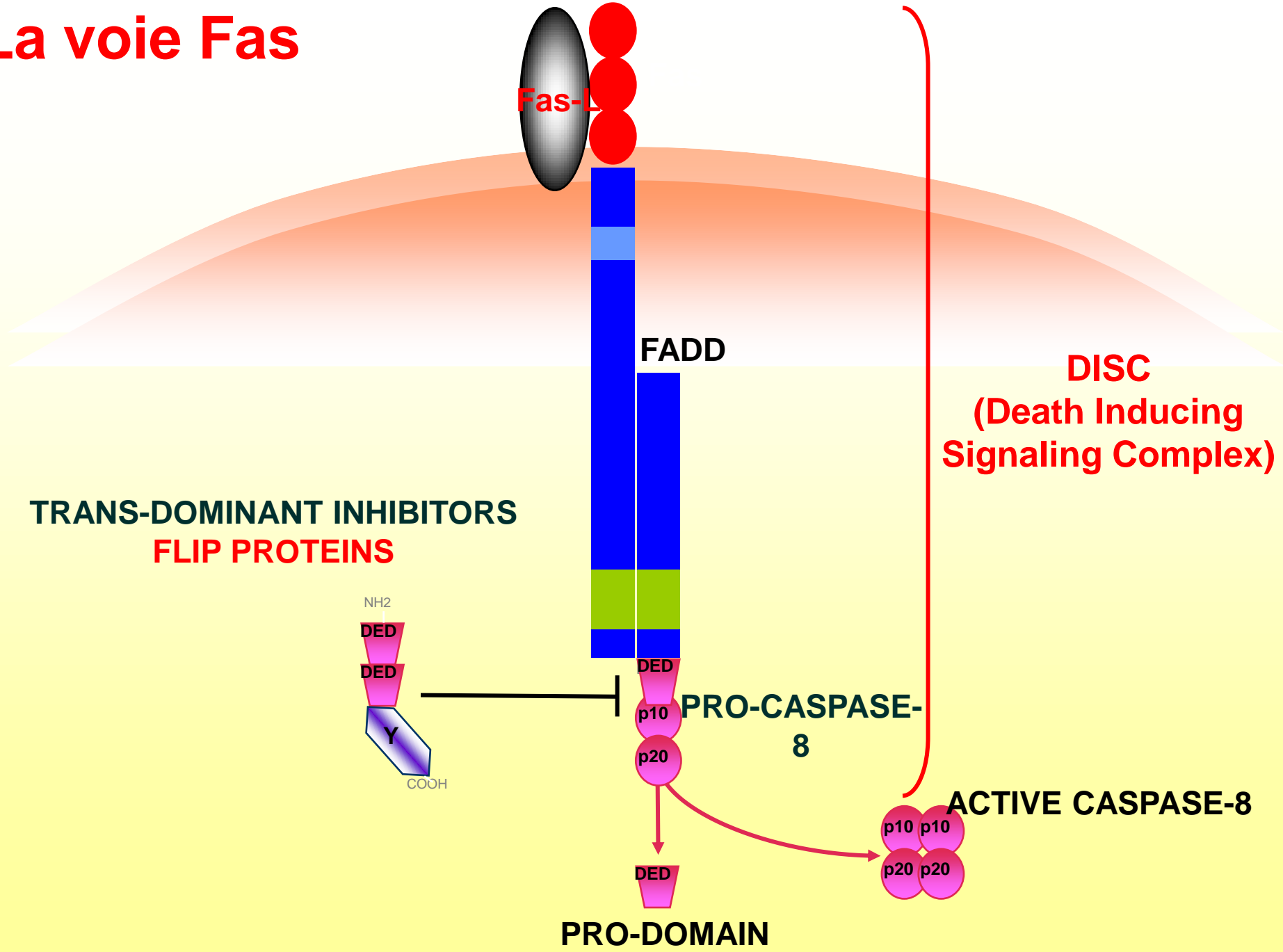
FADD

TRADD

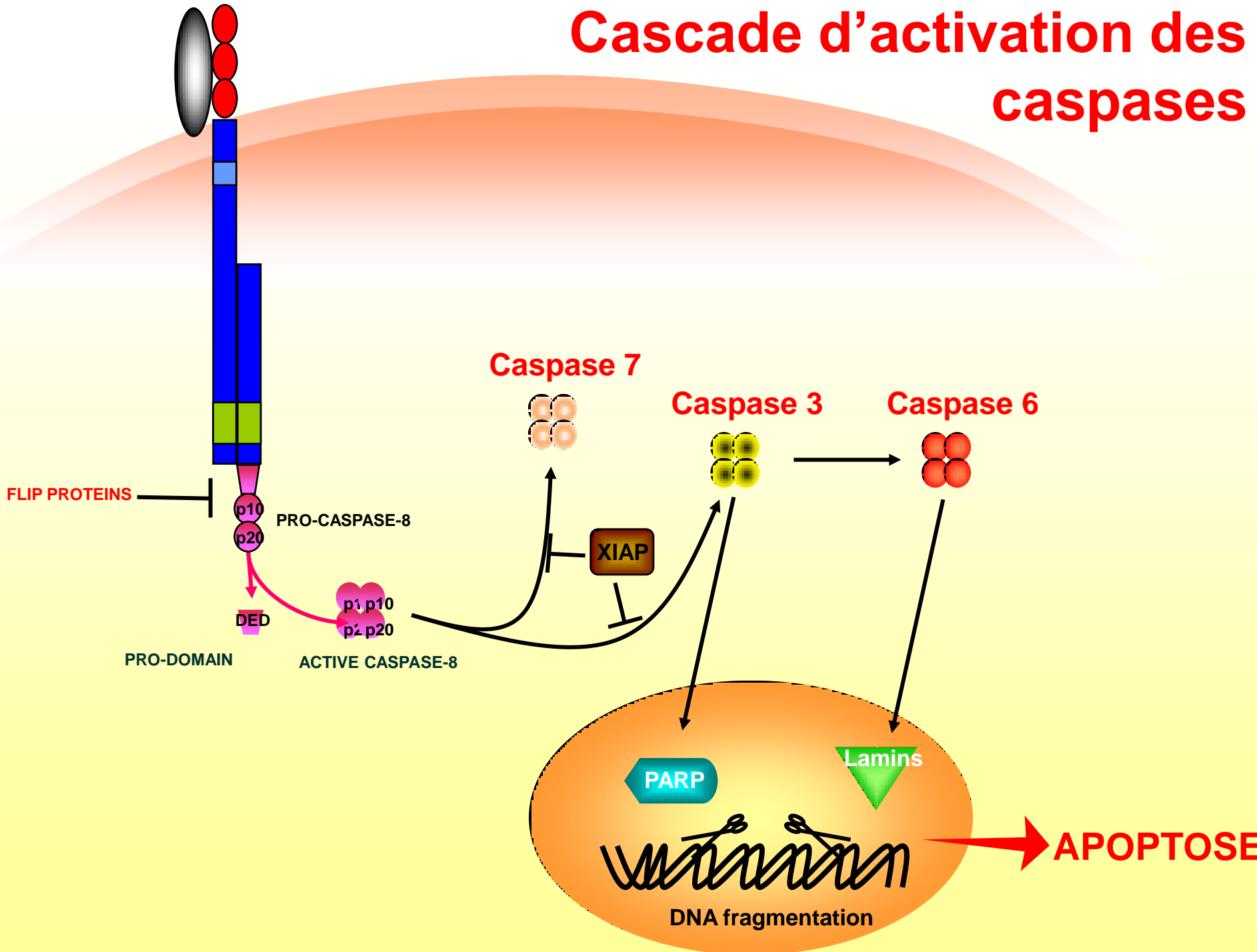
RIP



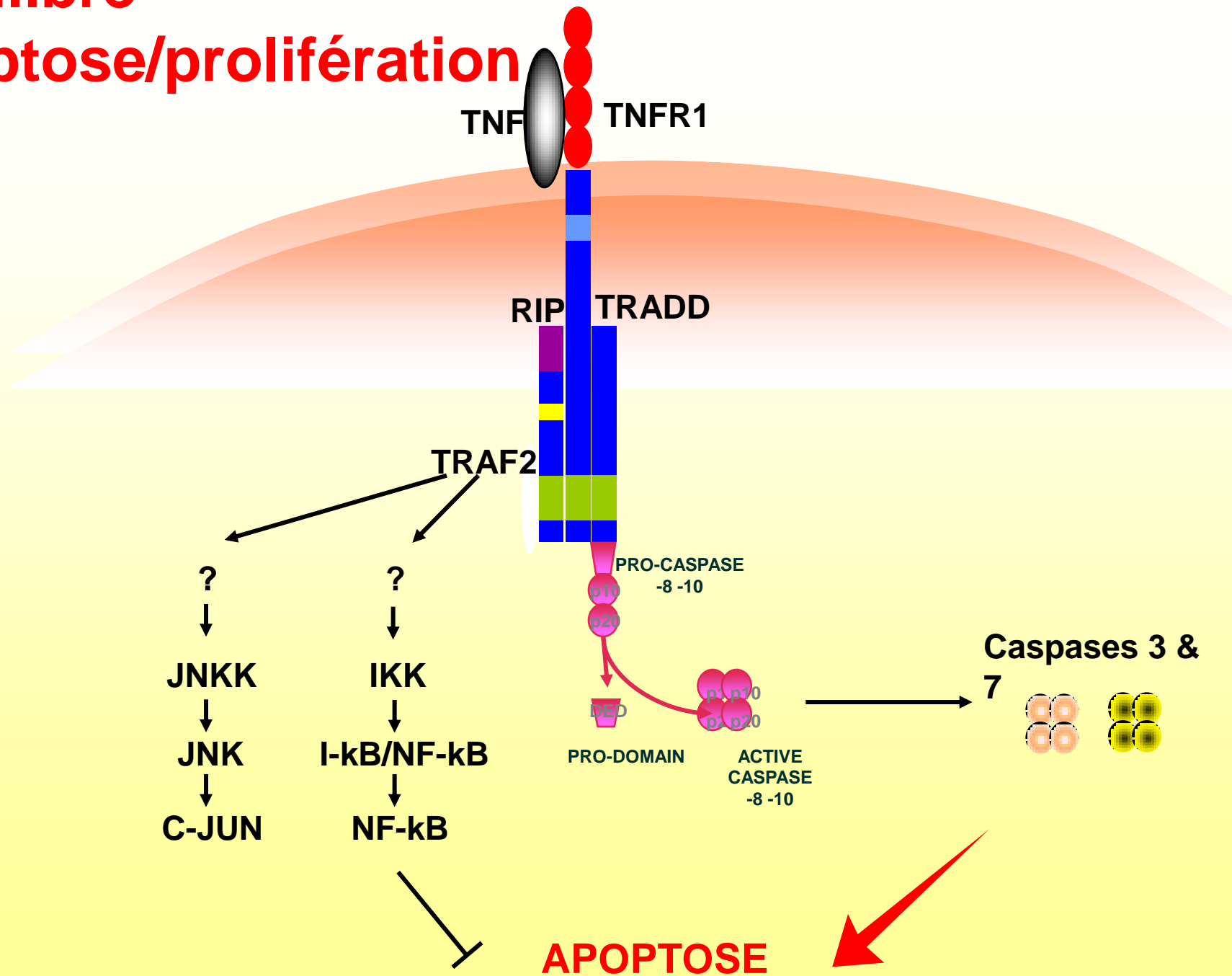
La voie Fas



Cascade d'activation des caspases

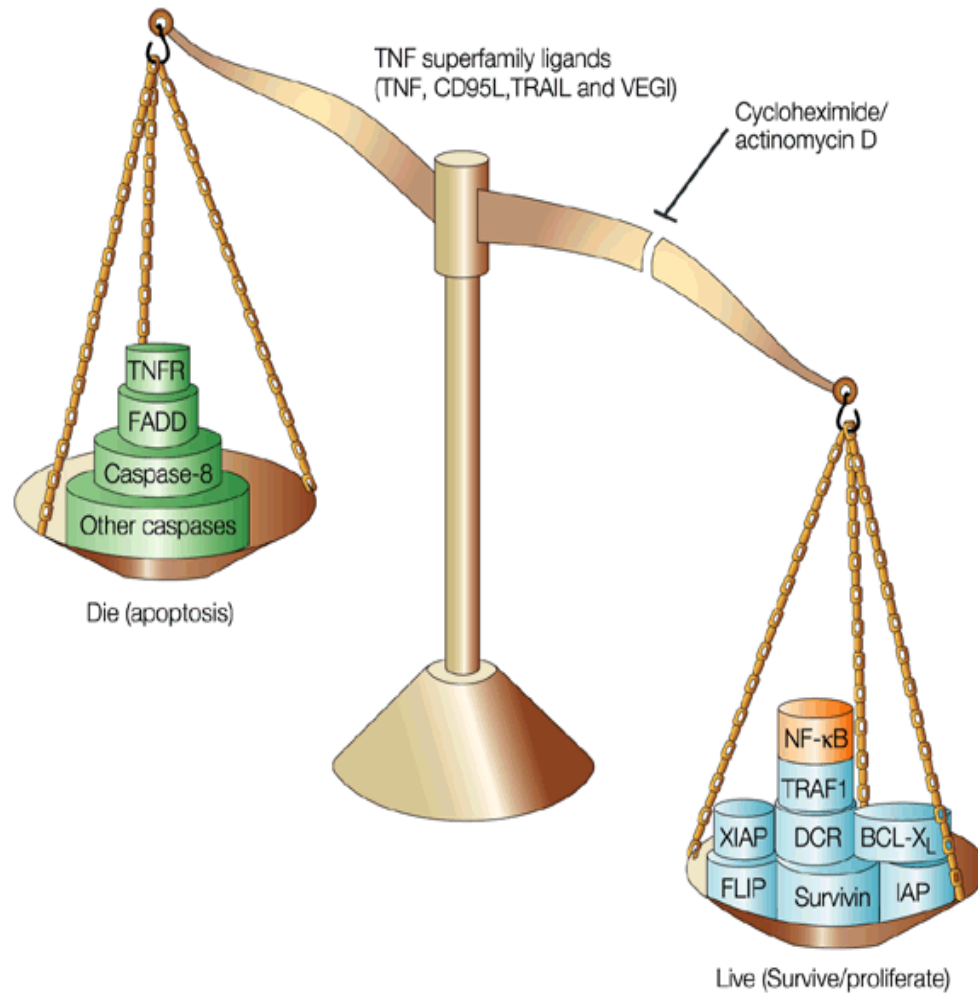


Equilibre apoptose/prolifération



Rôle de la voie extrinsèque dans le devenir cellulaire

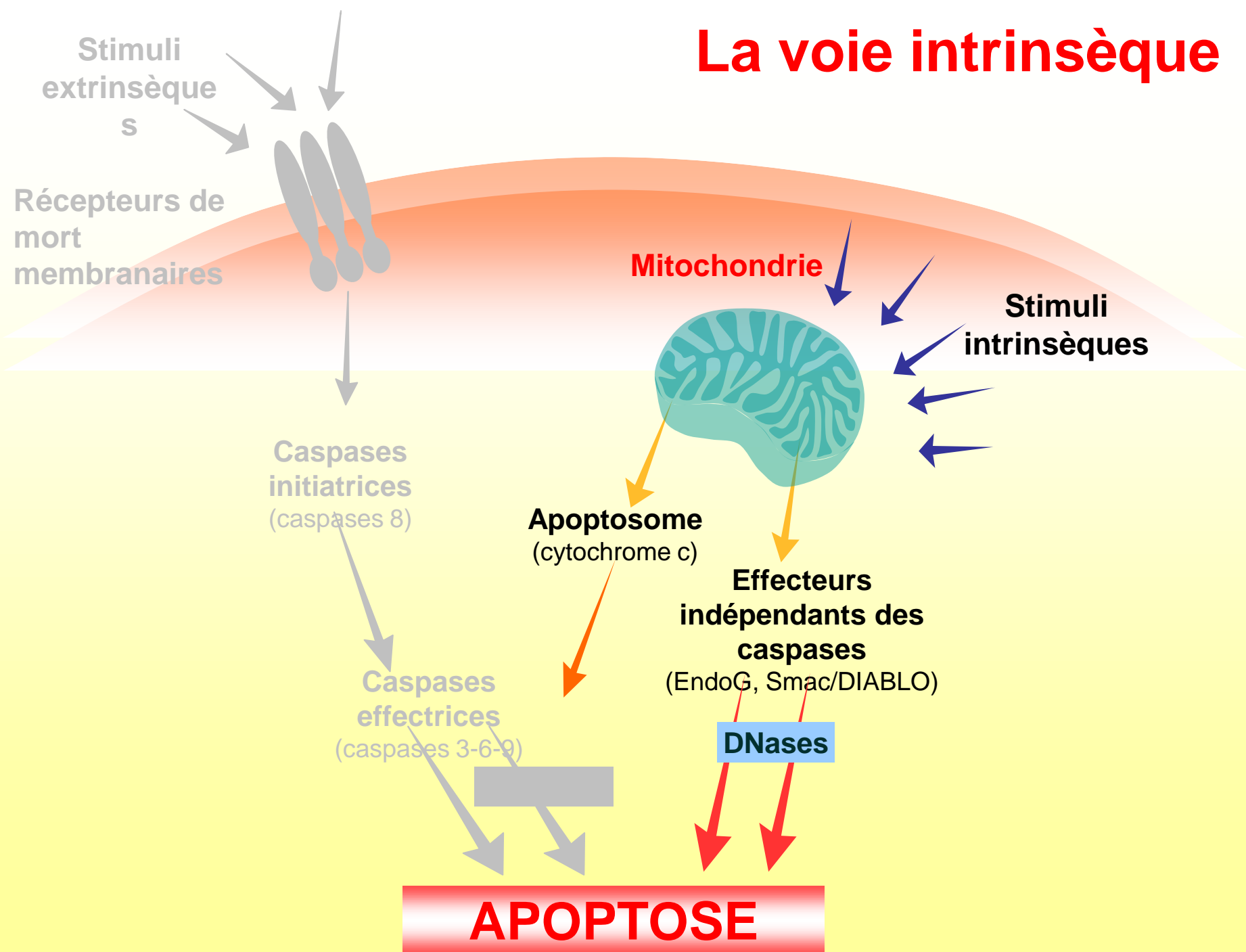
Balance between life and death



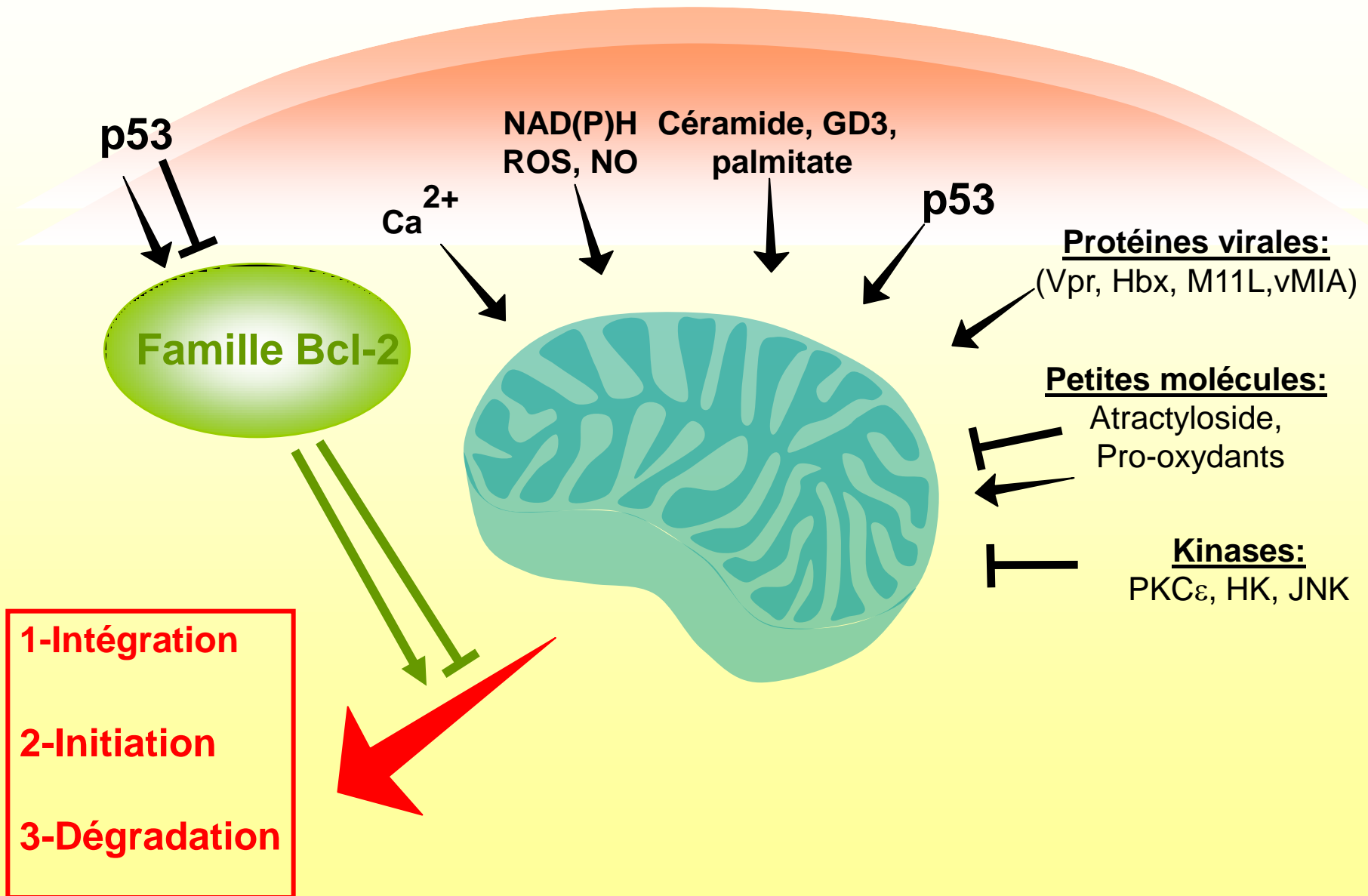
Apoptose et cancer

- Introduction:
 - Les différents types de mort cellulaire
 - Gènes et cancer
- L'apoptose:
 - La voie extrinsèque
 - La voie intrinsèque

La voie intrinsèque

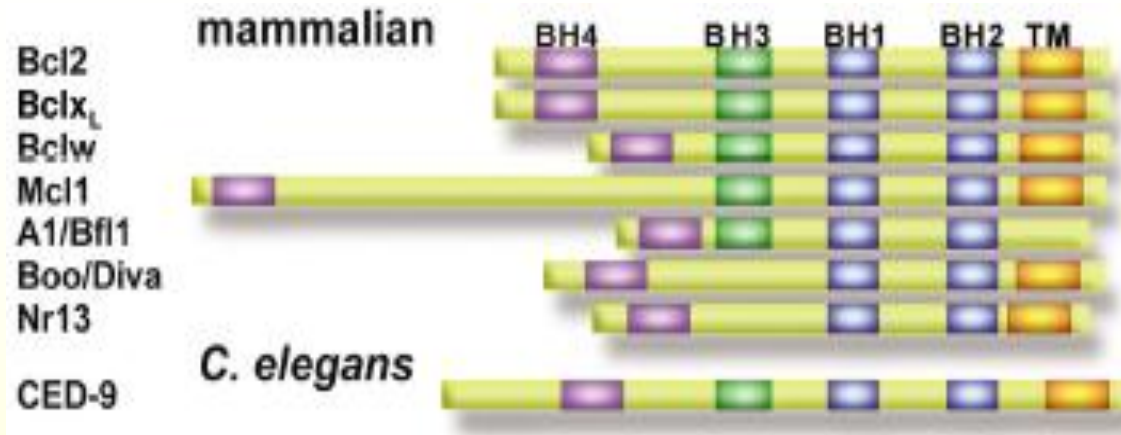


La mitochondrie: un intégrateur central

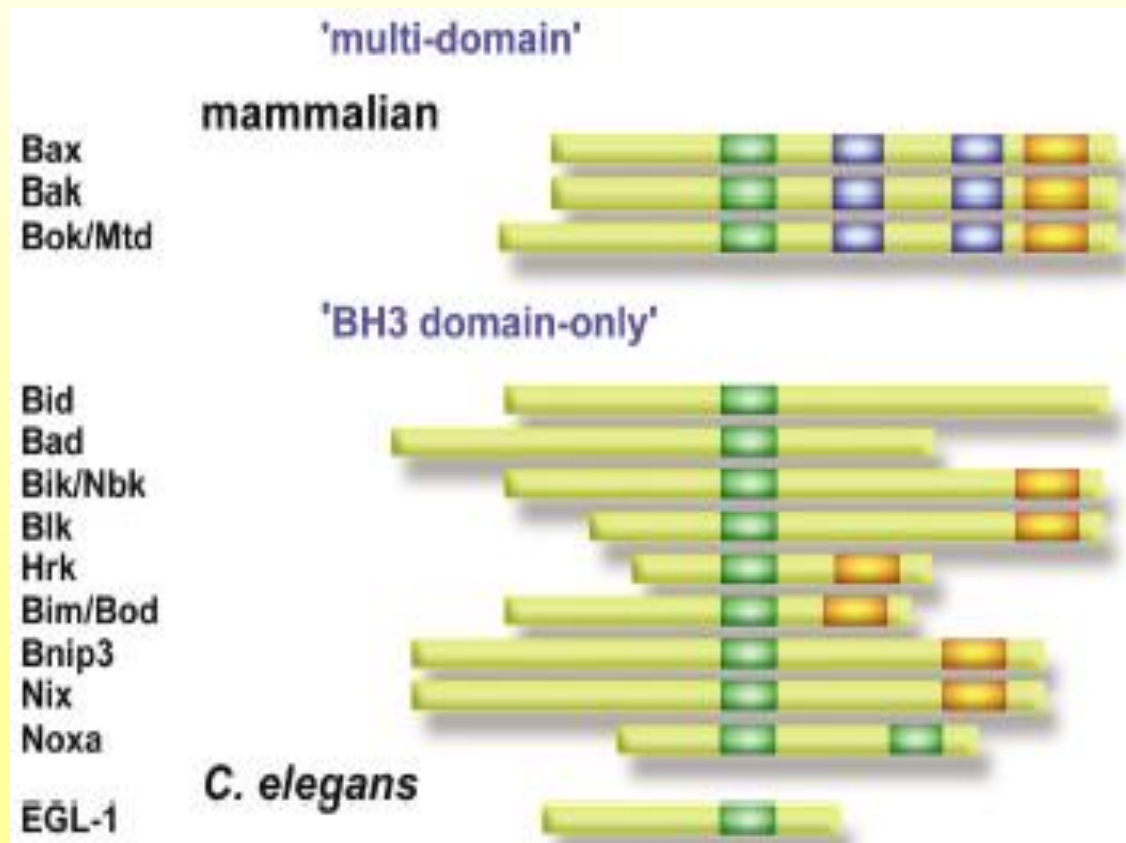


La famille Bcl-2

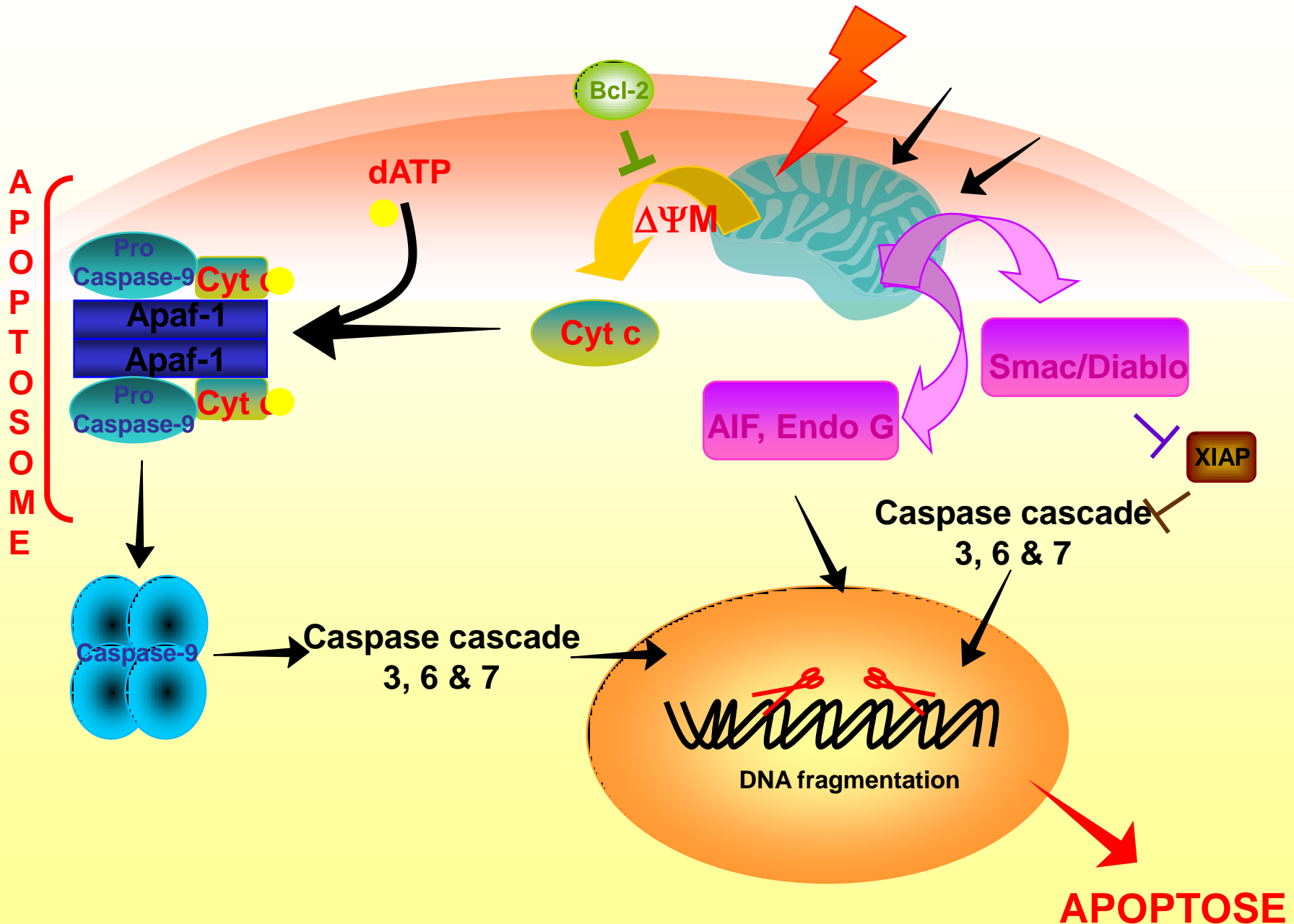
Membres anti-apoptotiques



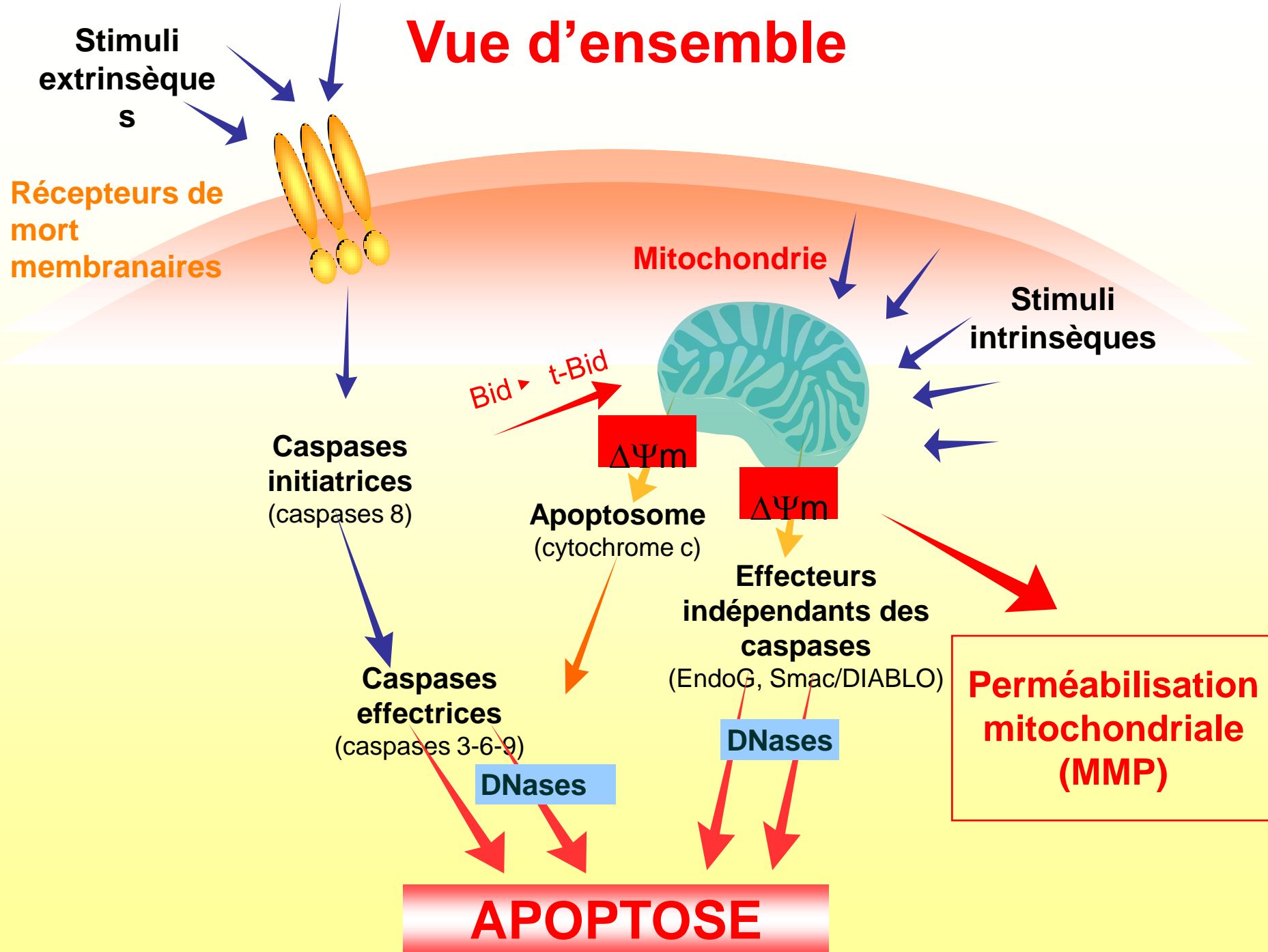
Membres pro-apoptotiques



Les facteurs apoptogéniques



Vue d'ensemble



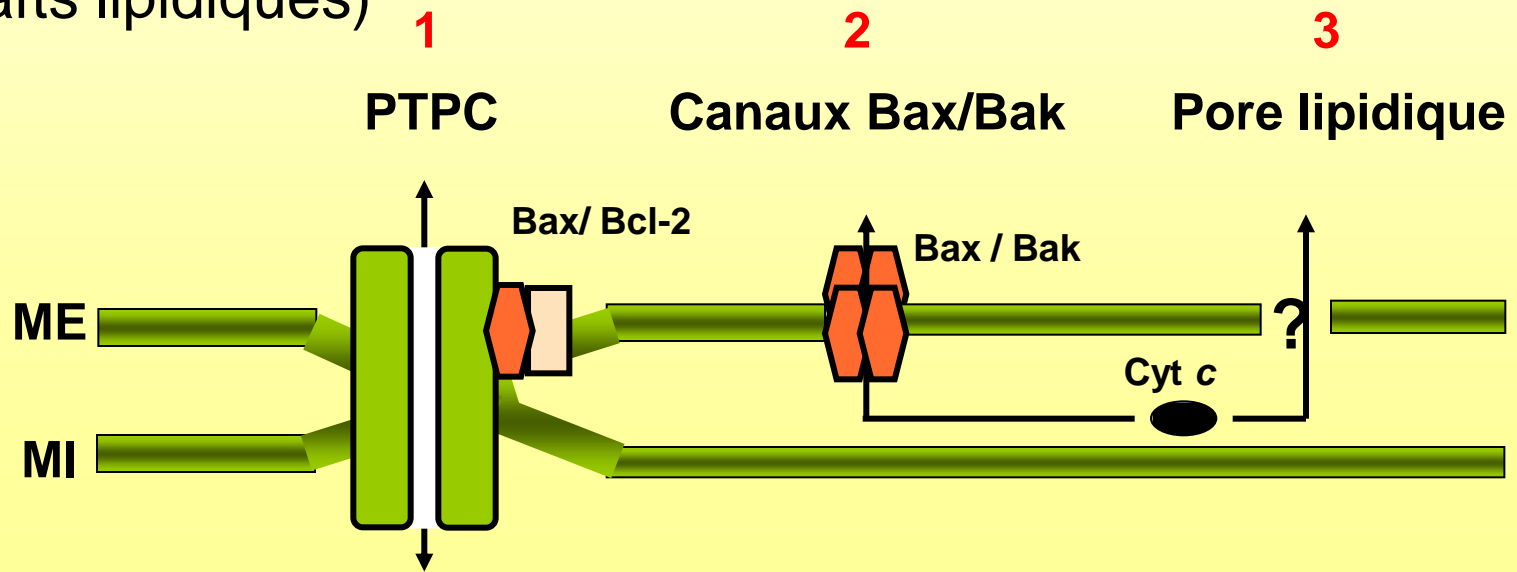
Mécanismes de perméabilisation membranaire: la controverse

A- Formation de pores dans les membranes mitochondriales

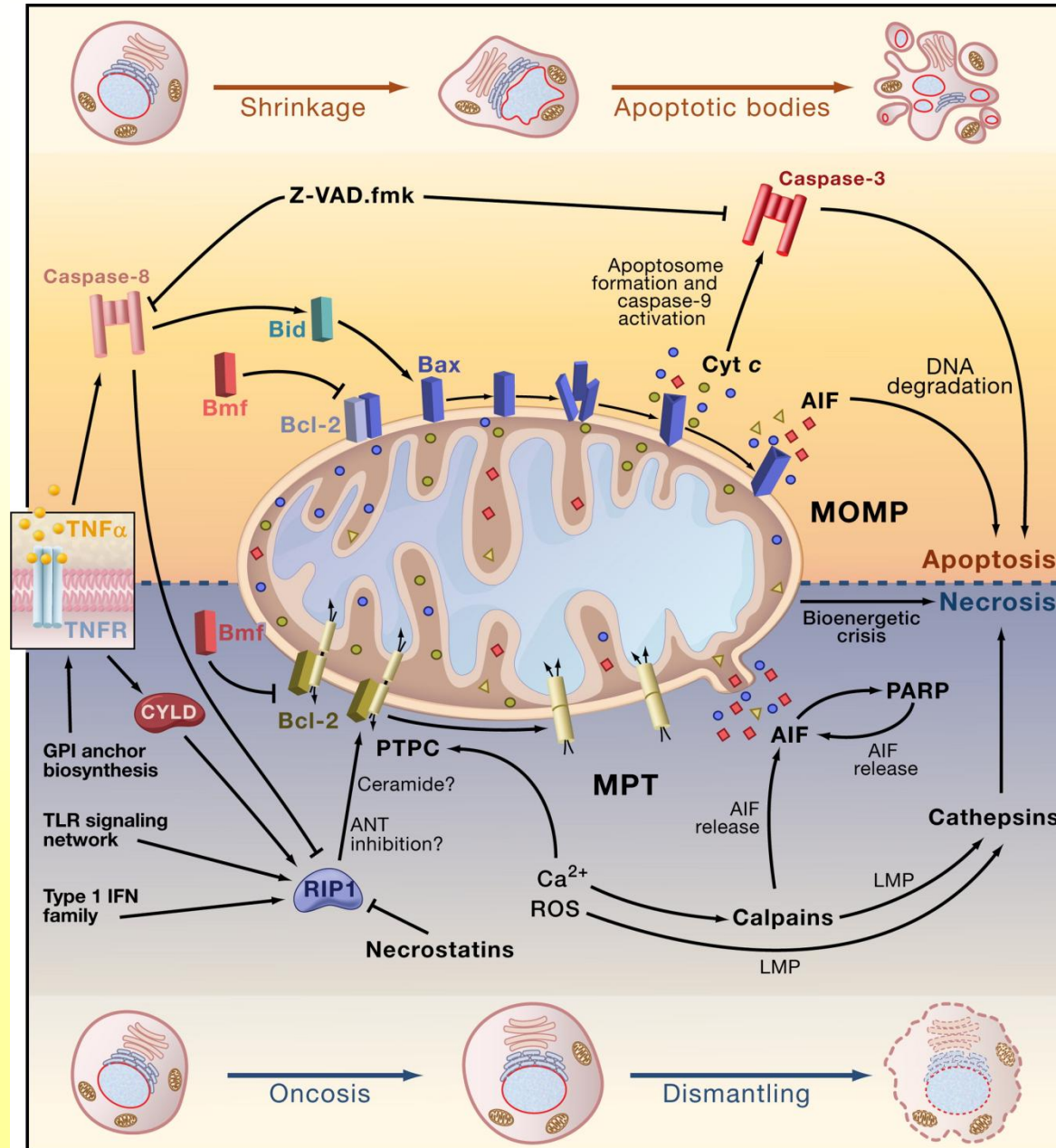
- 1/ PTPC : complexe polyprotéique aux sites de contact entre les membranes interne et externe
- 2/ Pores dans la membrane externe : oncogènes et suppresseurs de tumeur de la famille Bax/Bcl-2

B- Rupture de la membrane externe mitochondriale

- 3/ Formation de pores lipidiques dans la membrane externe (rafts lipidiques)



La mitochondrie: un intégrateur central



Apoptose mitochondriale et pathologie

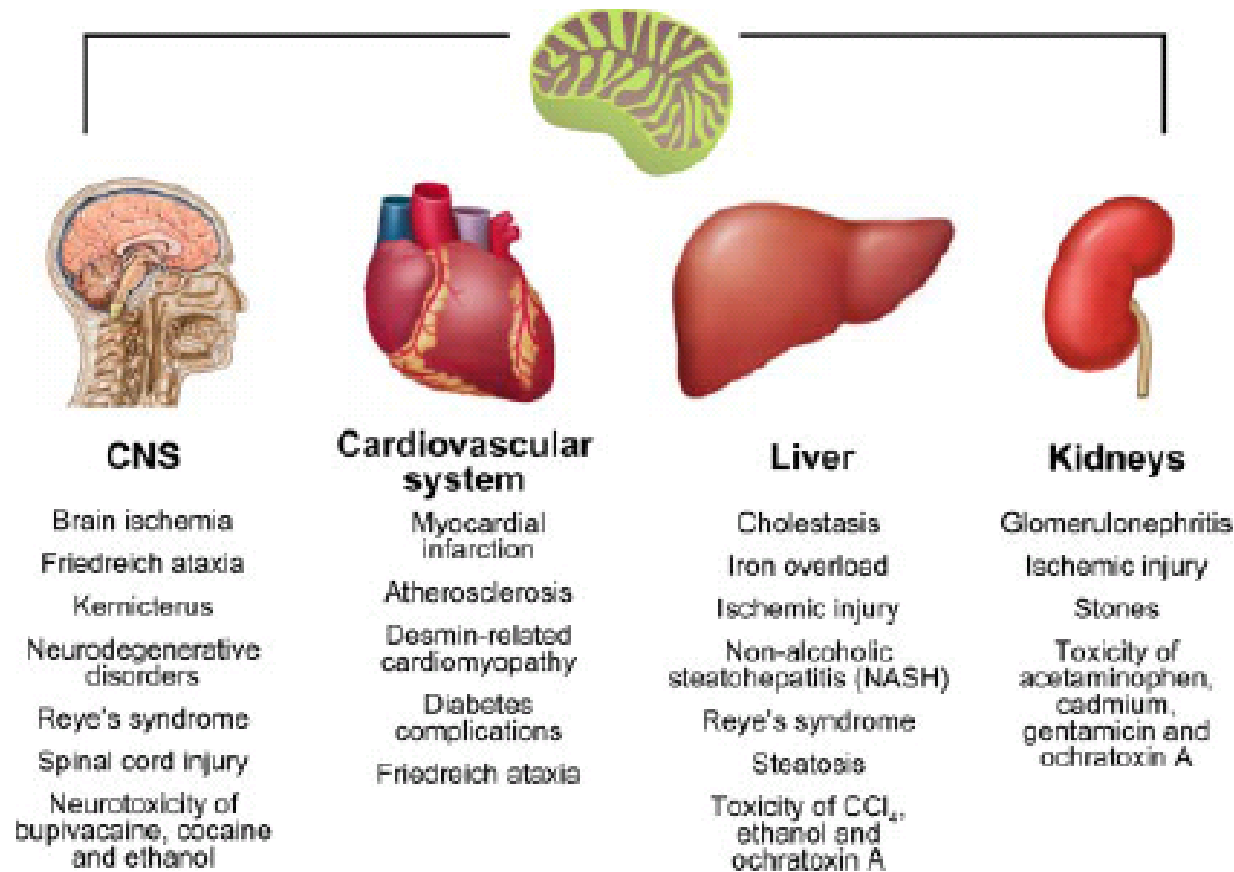


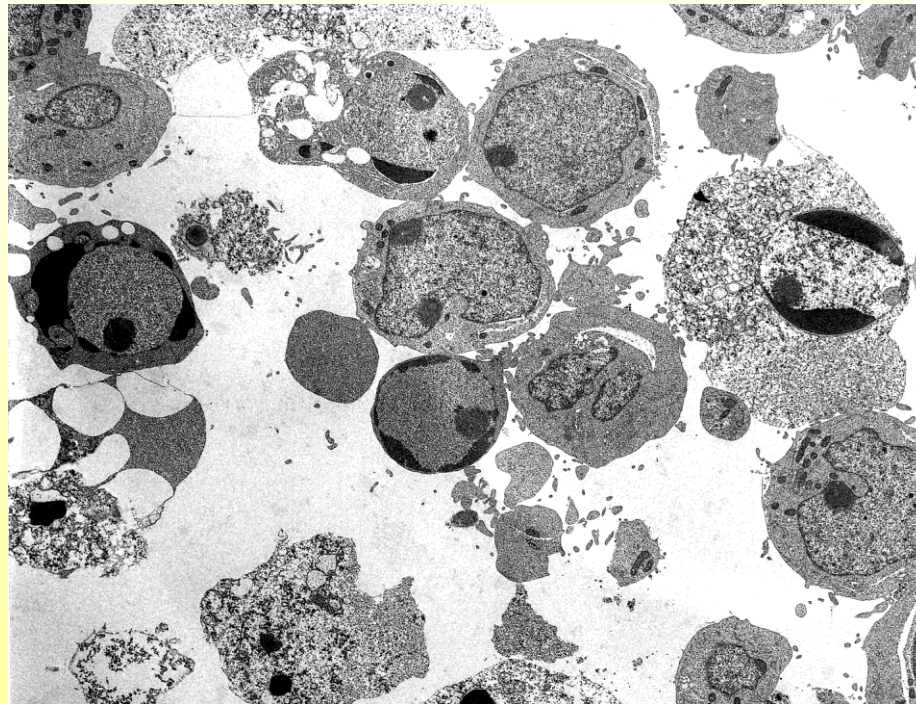
FIG. 12. Examples of the involvement of mitochondrial apoptosis in pathological cell loss. Mitochondrial apoptosis has been implicated in a plethora of acute and chronic human diseases that affect several tissues and organs. The figure reports only a few examples of pathological conditions in which mitochondrial apoptosis plays a prominent role, grouped according to the most affected tissue. Please refer to section IX for further details. CNS, central nervous system; MMP, mitochondrial membrane permeabilization.

Morts cellulaires et cancer

- Introduction:
 - Les différents types de mort cellulaire
- L'apoptose:
 - La voie extrinsèque
 - La voie intrinsèque
 - Les modèles de perméabilisation membranaire
 - Le Pore de Transition de Perméabilité (PTP)
 - Les méthodes de détection

Techniques de détection de l'apoptose

1/ Microscopie électronique

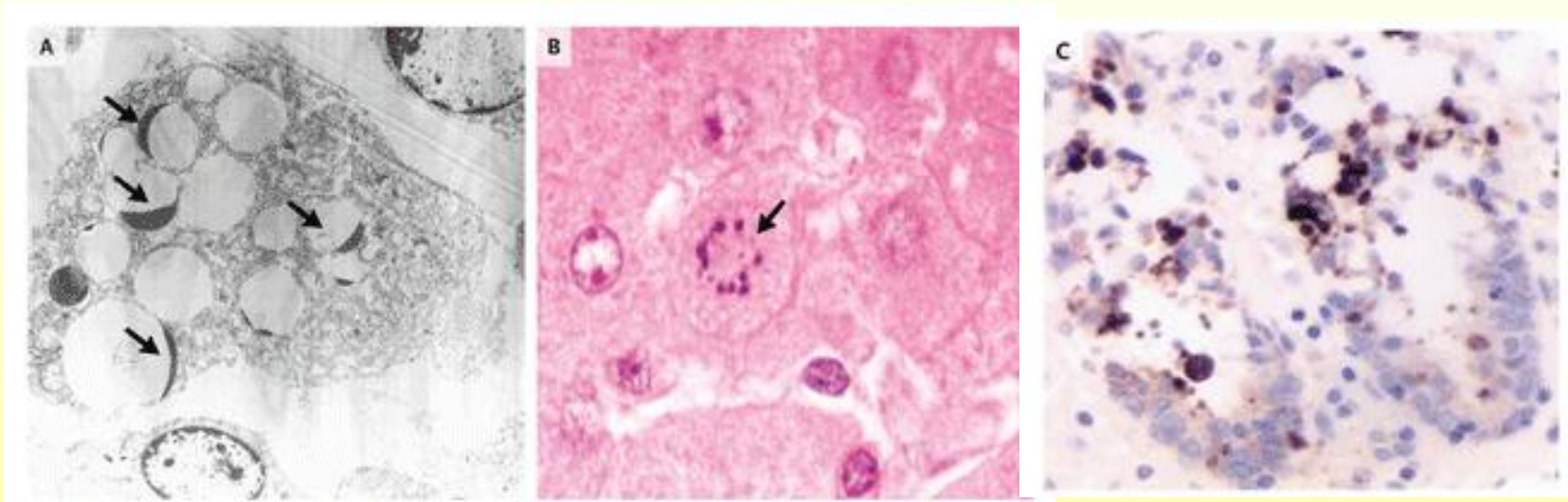


Burkitt lymphoma cells after 24h
treatment with CD77-Ab

Apoptosis detection

1/ At subcellular level

Microscopy +/- staining



EM

hematoxylin and eosin

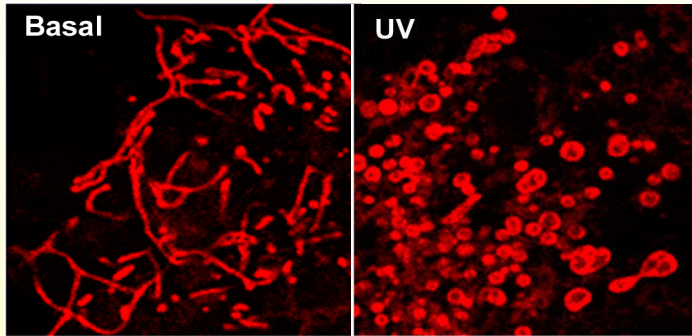
Cleaved cytokeratin 18

Apoptosis detection

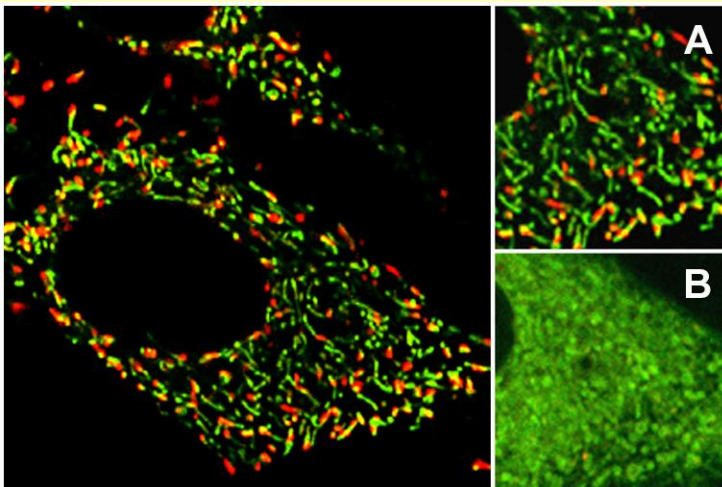
1/ At subcellular level

Mitochondria parameters:

-Morphology (MitoTracker)



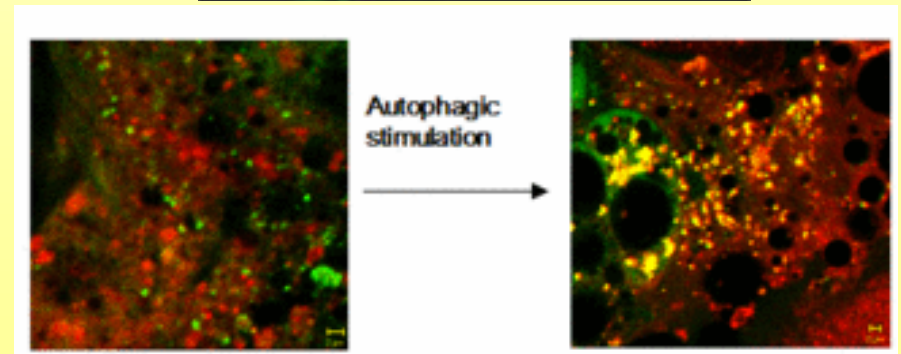
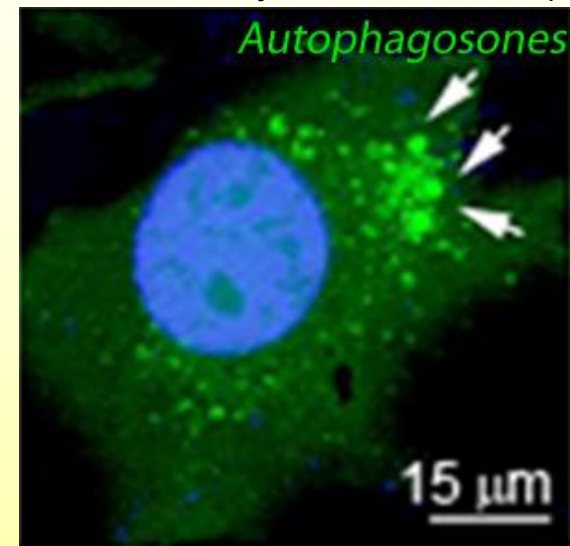
-Membrane potential (JC-1)



Lysosomes parameters:

-Morphology: ,IF

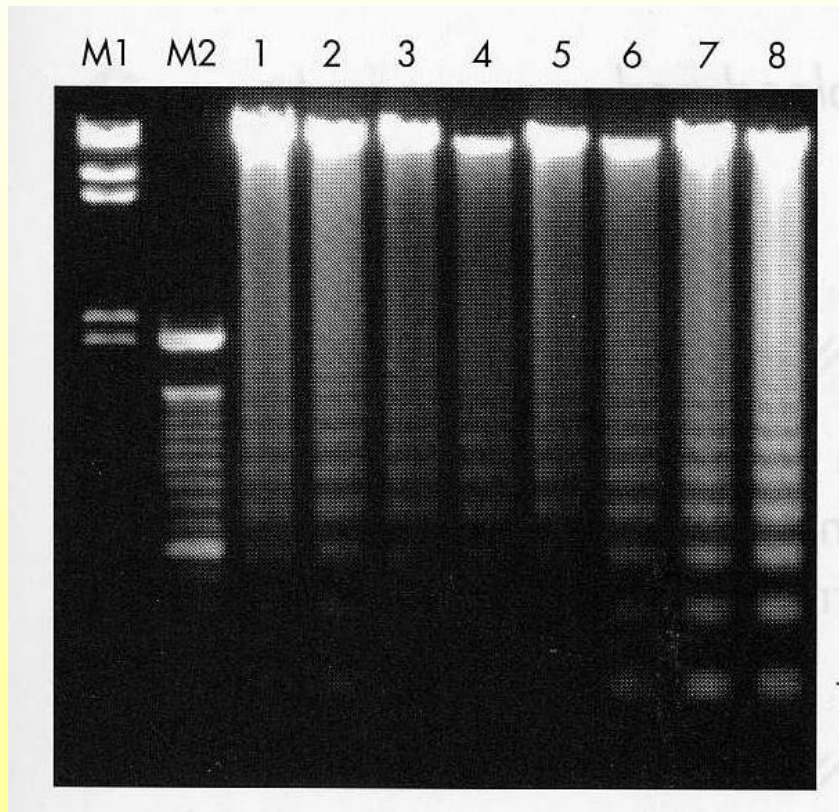
Monodansylcadaverine (MDC)



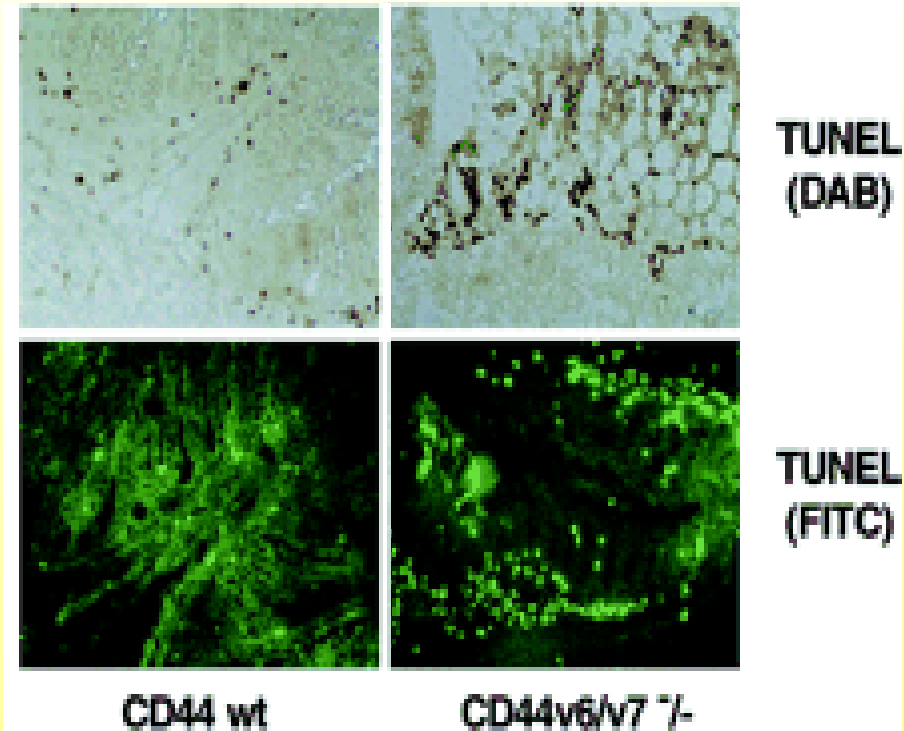
Apoptosis detection

2/ At « DNA » level

Electrophoresis: « DNA ladder »



TUNEL



Apoptosis is increased in CD44v6/v7^{-/-} mice. Apoptotic nuclei were detected with biotinylated nucleotides followed either by diaminobenzidine (DAB) detection or by fluorescein-dUTP (FITC).

Wittig et al, JEM 2000

Apoptosis detection

2/ At « DNA » level

Measurement of DNA content

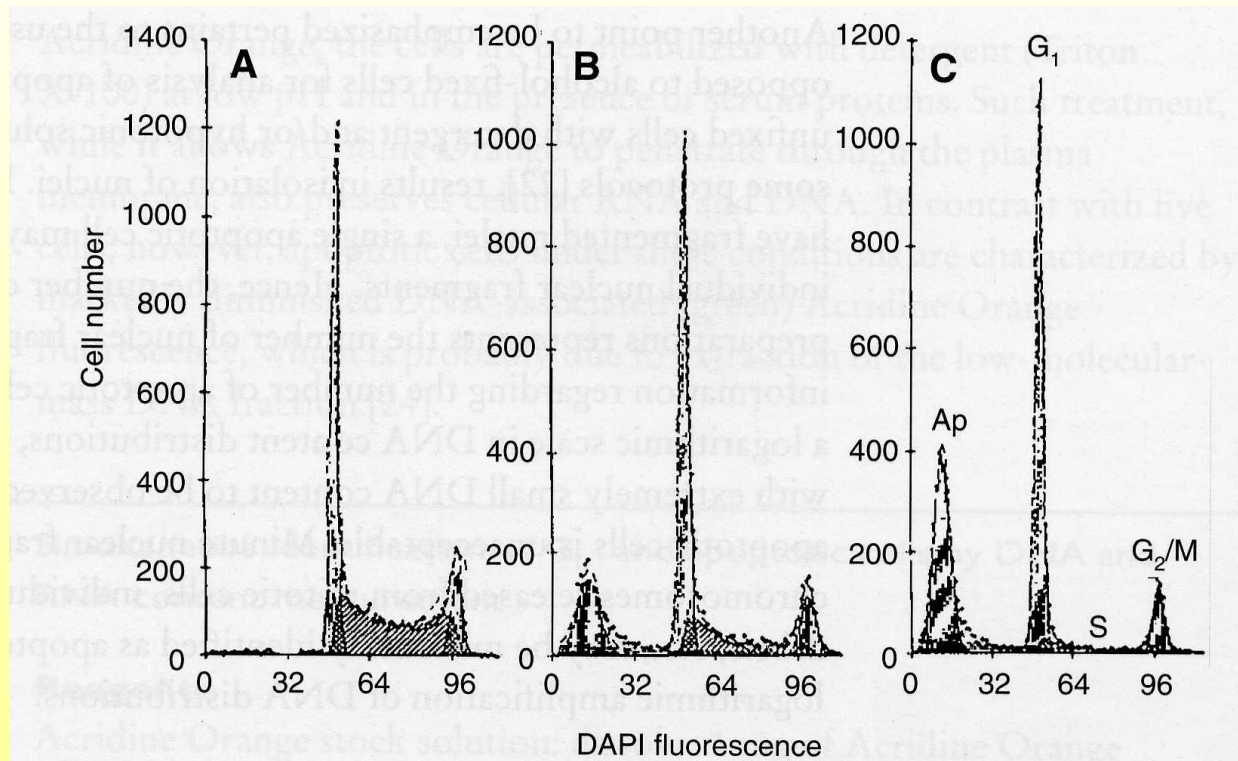
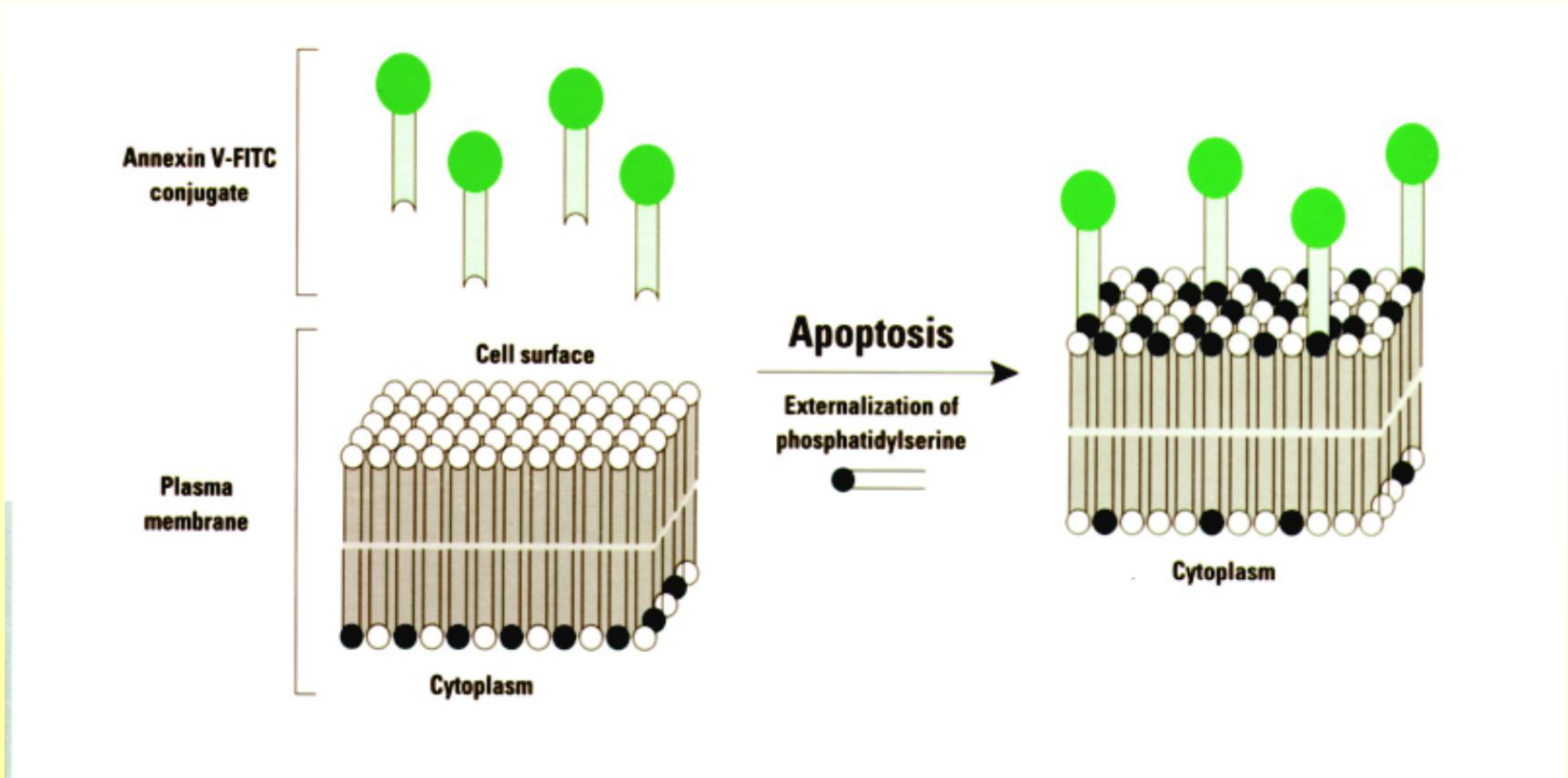


Fig. 6. Detection of apoptotic cells based on DNA content measurement (Method 6)

Apoptosis detection

3/ At membrane level

Annexin exposure



Apoptosis detection

3/ At membrane level

Annexin exposure

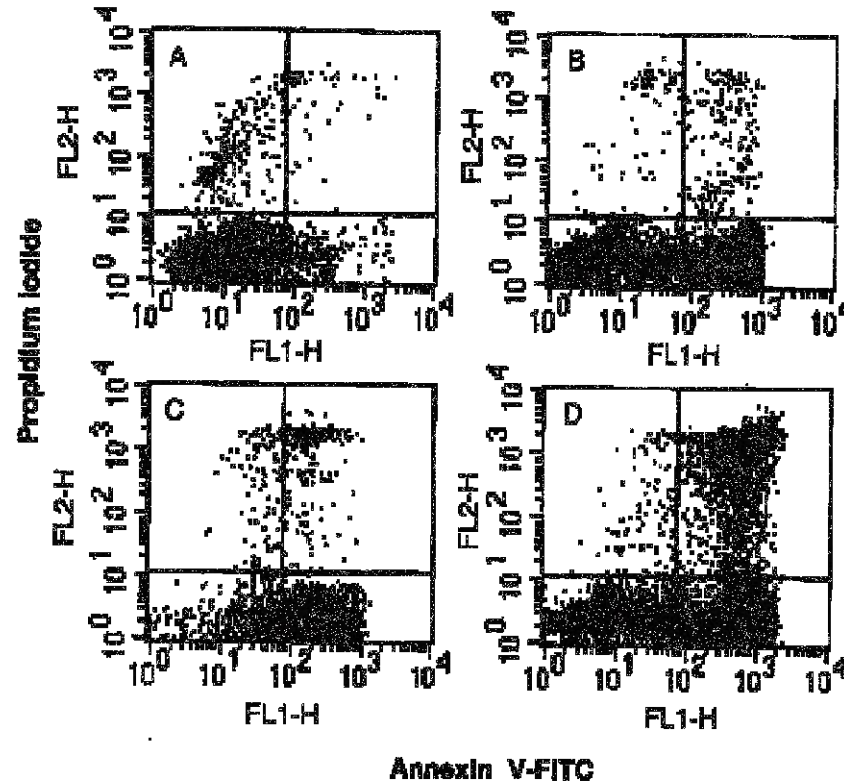


Fig. 2. PS exposure during apoptosis of human peripheral blood neutrophils

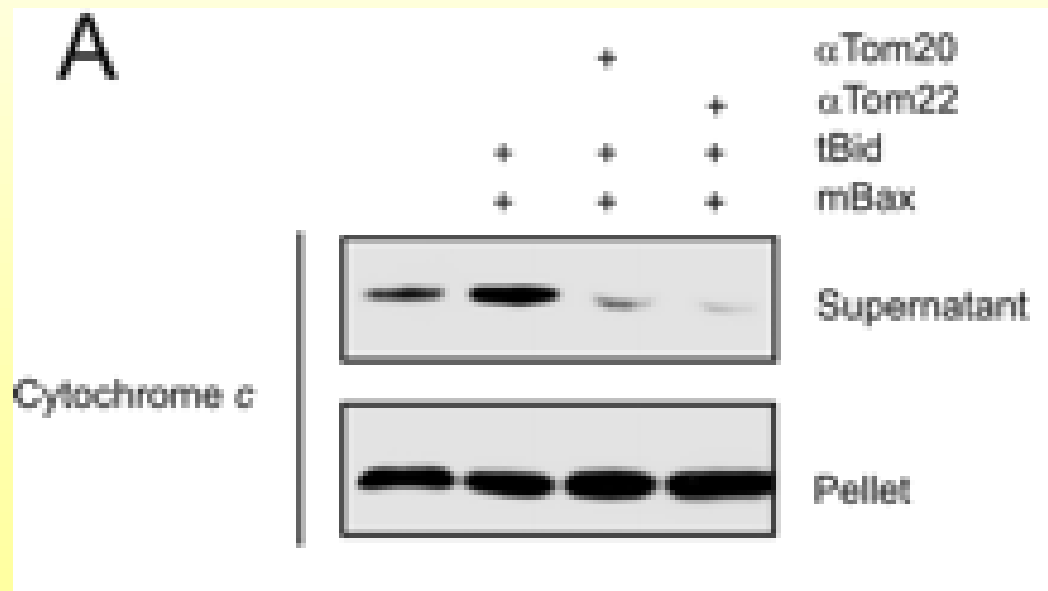
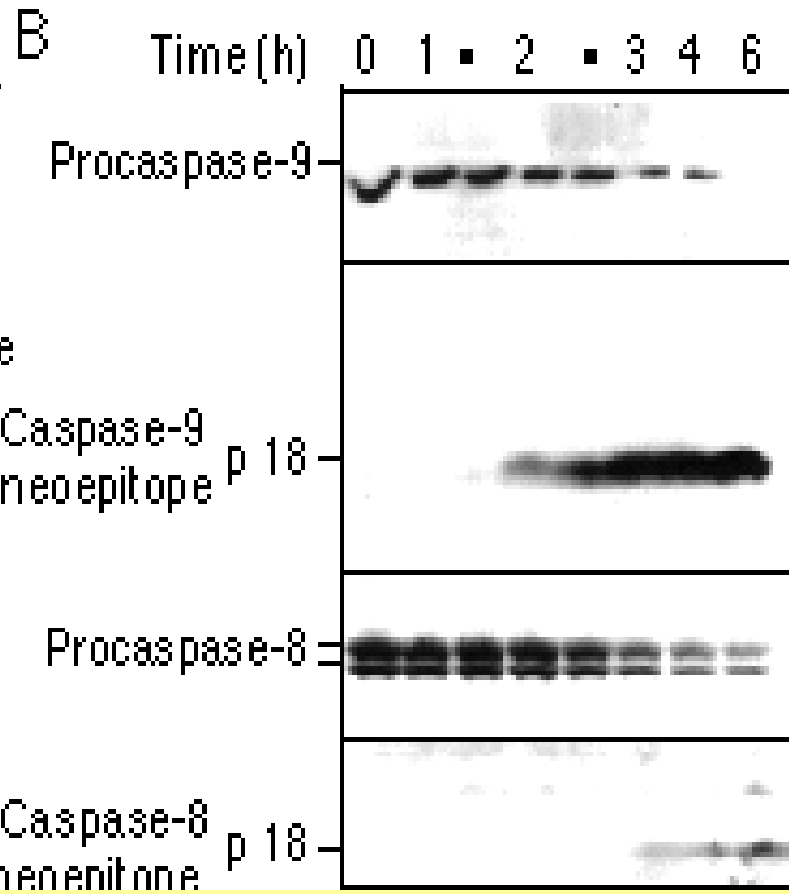
Purified neutrophils were either stained with annexin V-FITC and propidium iodide immediately after isolation (A), after overnight culture in medium alone (B), or in medium containing 10 μ M actinomycin D (C), or 100 ng/ml ionomycin (D). In each case, 10 000 cells were analysed.

Apoptosis detection

4/ At « protein » level

Caspases activation

Cytochrome c release



Morts cellulaires et cancer

- Introduction:
 - Les différents types de mort cellulaire
- L'apoptose:
 - La voie extrinsèque
 - La voie intrinsèque
 - Les modèles de perméabilisation membranaire
 - Le Pore de Transition de Perméabilité (PTP)
 - Les méthodes de détection
- L'autophagie:

Protéolyse: différents systèmes

Protéases cytosoliques

- Caspases: cystéines-aspartases
- => protéolyse ménagée des protéines cytosoliques

Système multi-enzymatique (dans le cytosol ou le noyau)

- **protéasome** => dégradation totale des protéines intracellulaires cytosoliques, réticulaires ou nucléaires

Système multi-enzymatique compartimenté (vacuoles + lysosomes)

- autophagie => protéolyse totale protéines intracellulaires
- endocytose => protéolyse totale des protéines extracellulaires

Protéolyse et Métabolisme protéique

Quel système pour quelle fonction?

Dégradation spécifique: protéasome

- concerne les protéines à durée de vie courte
- spécificité déterminée par:
 - acide aminé N-terminal
 - séquences d'acides aminés spécifiques (ex: PEST)
 - modification post-traductionnelle (ex: ubiquitine)

Dégradation non spécifique: **autophagie**

- concerne les protéines à durée de vie longue
- pas de spécificité apparente connue

DEGRADATION LYSOSOMALE ou AUTOPHAGIE

fonctions

Niveau basal

=> renouvellement du contenu cytoplasmique (homéostasie cytoplasmique: protéines , ARN, organites).

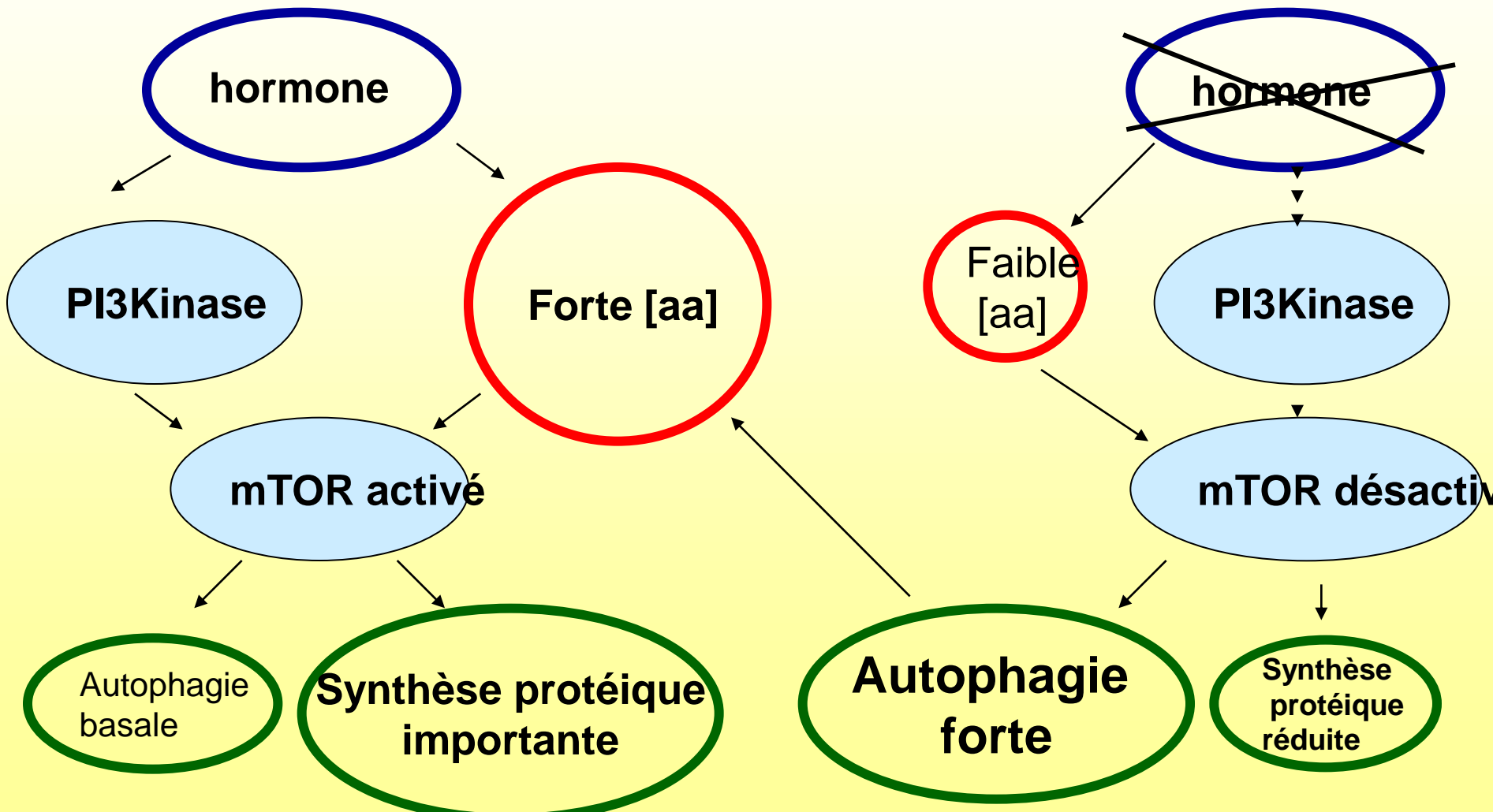
Situation de carence nutritionnelle

=> favorise la dégradation protéique et fournit des acides aminés essentiels.

DEGRADATION LYSOSOMALE ou AUTOPHAGIE

processus de survie

Autophagie induite par la carence = processus auto-régulé



DEGRADATION LYSOSOMALE ou AUTOPHAGIE

fonctions

Niveau basal

=> renouvellement du contenu cytoplasmique (homéostasie cytoplasmique: protéines , ARN, organites).

Situation de carence nutritionnelle

=> favorise la dégradation protéique et fournit des acides aminés essentiels.

Situation de stress

=> élimination des macromolécules et structures cellulaires altérées (ex: protéines oxydées, mitochondries endommagées).

Persistance => **mort cellulaire.**

DEGRADATION LYSOSOMALE et mort cellulaire par AUTOPHAGIE

Inducteurs :

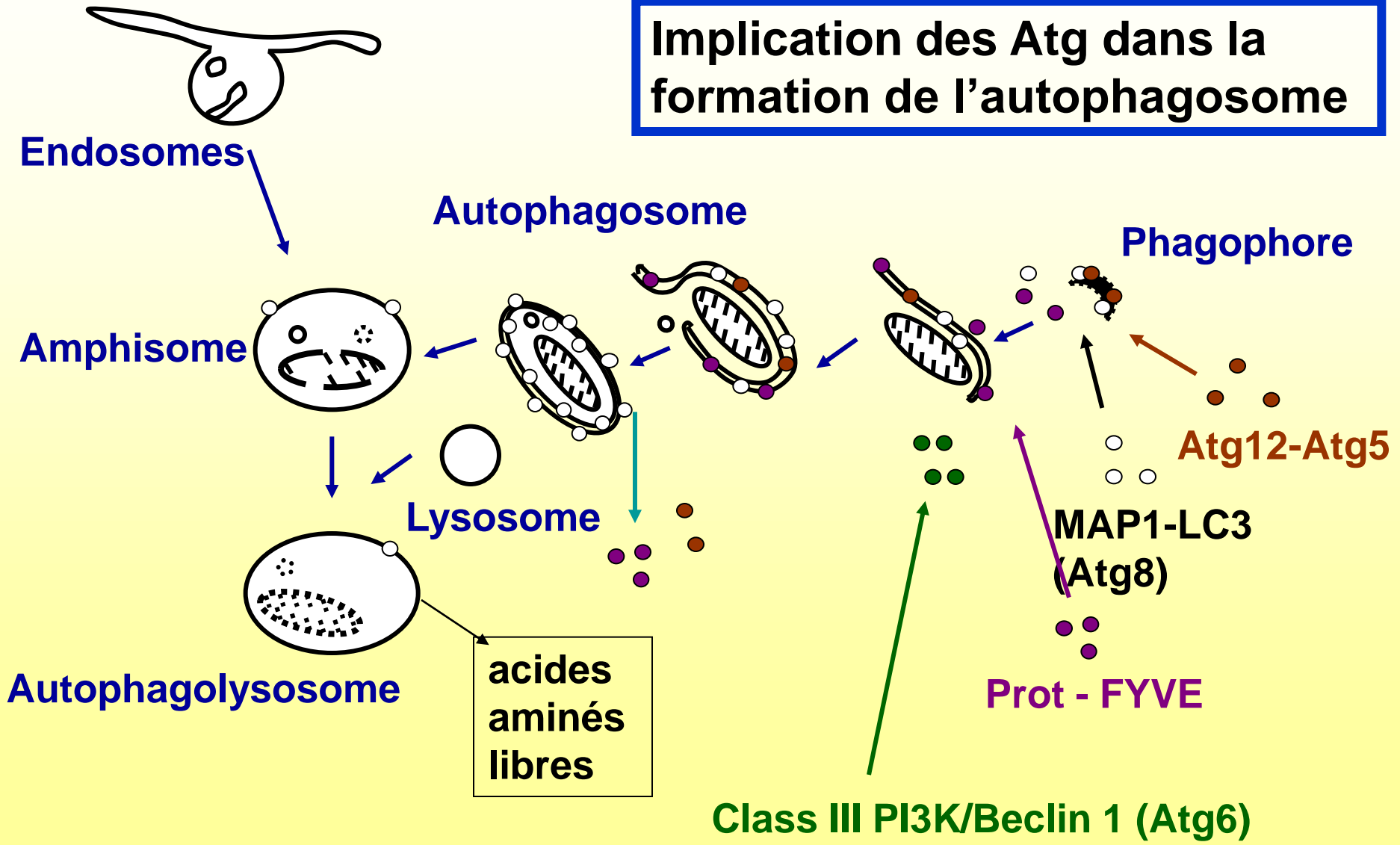
- Carence alimentaire ou en acides aminés
- Carence en facteurs de croissance ou hormones
- Stress intracellulaire (dommage ADN)
- Drogues ou agents chimiothérapeutiques
- Infections virales
- Choc thermique
- Radiations UV ou γ

**Induction maintenue
et importante
=> mort cellulaire**

DEGRADATION LYSOSOMALE ou AUTOPHAGIE

≈ trentaine de gènes appelés **Atg** (autophagy gene)

Implication des Atg dans la formation de l'autophagosome



Morts cellulaires et cancer

- Introduction:
 - Les différents types de mort cellulaire
 - Gènes et cancer
- L'apoptose:
 - La voie extrinsèque
 - La voie intrinsèque
 - Les modèles de perméabilisation membranaire
 - Le Pore de Transition de Perméabilité (PTP)
- L'autophagie:
- **Comparaison des 2 voies**

MORTS CELLULAIRES

comparaison des caractéristiques

Apoptose

- Condensation de la chromatine avec **fragmentation d'ADN**
- Pas d'accumulation de vacuoles
- Condensation du cytoplasme
- Ouverture du pore de transition mitochondrial
- **Activation des caspases**
- Bourgeonnement membranaire

Autophagie

- Condensation partielle de la chromatine possible sans fragmentation d'ADN
- **Accumulation de vacuoles autophagiques**
- Ouverture possible du pore de transition mitochondrial
- Pas d'activation de caspases
- Bourgeonnement membranaire

MORTS CELLULAIRES

comparaison des inducteurs

Apoptose

- Carence alimentaire ou en acides aminés
- Carence en facteurs de croissance ou hormones
- Stress intracellulaire (dommage ADN)
- Drogues ou agents chimiothérapeutiques
- Infections virales
- Choc thermique
- Radiations UV ou γ

Autophagie

- Carence alimentaire ou en acides aminés
- Carence en facteurs de croissance ou hormones
- Stress intracellulaire (dommage ADN)
- Drogues ou agents chimiothérapeutiques
- Infections virales
- Choc thermique
- Radiations UV ou γ

Morts cellulaires et cancer

- Introduction:
 - Les différents types de mort cellulaire
 - Gènes et cancer
- L'apoptose:
 - La voie extrinsèque
 - La voie intrinsèque
 - Les modèles de perméabilisation membranaire
 - Le Pore de Transition de Perméabilité (PTP)
- L'autophagie:
- Comparaison des 2 voies
- **Morts cellulaires: la polémique**

Mort cellulaire: la polémique

- Comment reconnaître une cellule morte?

Cell death mode	Morphological features	Notes
Apoptosis	Rounding-up of the cell Retraction of pseudopodes Reduction of cellular and nuclear volume (pyknosis) Nuclear fragmentation (karyorrhexis) Minor modification of cytoplasmic organelles Plasma membrane blebbing Engulfment by resident phagocytes, <i>in vivo</i>	'Apoptosis' is the original term introduced by Kerr <i>et al.</i> ¹⁴ to define a type of cell death with specific morphological features. Apoptosis is NOT a synonym of programmed cell death or caspase activation.
Autophagy	Lack of chromatin condensation Massive vacuolization of the cytoplasm Accumulation of (double-membraned) autophagic vacuoles Little or no uptake by phagocytic cells, <i>in vivo</i>	'Autophagic cell death' defines cell death occurring with autophagy, though it may misleadingly suggest a form of death occurring by autophagy as this process often promotes cell survival. ^{15,16}
Necrosis	Cytoplasmic swelling (oncosis) Rupture of plasma membrane Swelling of cytoplasmic organelles Moderate chromatin condensation	'Necrosis' identifies, in a negative fashion, cell death lacking the features of apoptosis or autophagy. ⁴ Note that necrosis can occur in a regulated fashion, involving a precise sequence of signals.

Mort cellulaire: la polémique

• Comment étudier la mort cellulaire?

Table 3 Biochemical aspects of distinct modalities of cellular catabolism

Cell death mode	Biochemical features	Methods for detection ³⁻⁵
Apoptosis	Activation of proapoptotic Bcl-2 family proteins (e.g., Bax, Bak, Bid)	IF microscopy localization studies Immunoblotting with conformation-specific antibodies
	Activation of caspases	Colorimetric/fluorogenic substrate-based assays in live cells Colorimetric/fluorogenic substrate-based assays of lysates in microtiter plates FACS/IF microscopy quantification with antibodies specifically recognizing the active form of caspases FACS/IF microscopy quantification with antibodies specific for cleaved caspase substrates FACS/IF microscopy quantification with fluorogenic substrates Immunoblotting assessment of caspase-activation state Immunoblotting assessment of the cleavage of caspase products
	$\Delta\Psi_m$ dissipation	Calcein-cobalt technique (FACS/IF microscopy) FACS/IF microscopy quantification with $\Delta\Psi_m$ -sensitive probes Oxygen-consumption studies (polarography)
	MMP	Colorimetric techniques to assess the accessibility of exogenous substrates to IM-embedded enzymatic activities FACS-assisted detection of IMS proteins upon plasma membrane permeabilization FACS-assisted detection of physical parameters of purified mitochondria HPLC-assisted quantification of mitochondrial alterations in purified mitochondria IF microscopy colocalization studies of IMS proteins (e.g., Cyt <i>c</i>) with sessile mitochondrial proteins (e.g., VDAC1) IF (video) microscopy with Cyt <i>c</i> -GFP fusion protein Immunoblotting detection of IMS proteins (e.g., Cyt <i>c</i>) upon cellular fractionation
	Oligonucleosomal DNA fragmentation	DNA ladders FACS quantification of hypodiploid cells (sub-G ₁ peak) TUNEL assays
	Plasma membrane rupture	Colorimetric/fluorogenic substrate-based assays of culture supernatants in microtiter plates to determine the release of cytosolic enzymatic activities (e.g., LDH) FACS quantification with vital dyes
	PS exposure	FACS quantification of Annexin V binding
	ROS overgeneration	FACS/IF microscopy quantification with ROS-sensitive probes
	ssDNA accumulation	FACS quantification with ssDNA-specific antibodies

Mort cellulaire: la polémique

- Comment étudier la mort cellulaire?

Autophagy	Beclin-1 dissociation from Bcl-2/X _L Dependency on <i>atg</i> gene products LC3-I to LC3-II conversion p62 ^{Leck} degradation	Co-immunoprecipitation studies Genetic studies (e.g., knockout models, RNA interference, plasmid-driven overexpression systems) IF microscopy with GFP-LC3 fusion protein Immunoblotting with LC3-specific antibodies Immunoblotting with p62-specific antibodies
Necrosis	Activation of calpains Activation of cathepsins Drop of ATP levels HMGB-1 release LMP Plasma membrane rupture RIP1 phosphorylation RIP1 ubiquitination ROS overgeneration Specific PARP1 cleavage pattern	Colorimetric/fluorogenic substrate-based assays of cell lysates in microtiter plates Colorimetric/fluorogenic substrate-based assays in live cells Colorimetric/fluorogenic substrate-based assays of cell lysates in microtiter plates Luminometric assessments of ATP/ADP ratio Immunoblotting of culture medium with HMGB-1-specific antibodies FACS quantification with lysomorphotropic probes Colorimetric/fluorogenic substrate-based assays of culture supernatants in microtiter plates to determine the release of cytosolic enzymatic activities (e.g., LDH) FACS quantification with vital dyes Immunoblotting with phosphoepitope-specific antibodies Immunoprecipitation with anti-RIP1 antibodies followed by immunoblotting with anti-ubiquitin antibodies FACS quantification with ROS-sensitive probes Immunoblotting with PARP1-specific antibodies

Mort cellulaire: la polémique

• Quel est le point de non retour?

Proposed points-of-no return to define dying cells

Massive activation of caspases	Caspases execute the classic apoptotic program, yet in several instances, caspase-independent death occurs. Moreover, caspases are involved in non-lethal processes including differentiation and activation of cells	Immunoblotting FACS quantification by means of fluorogenic substrates or specific antibodies
$\Delta\Psi_m$ dissipation	Protracted $\Delta\Psi_m$ loss usually precedes MMP and cell death; however, transient dissipation is not always a lethal event	FACS quantification with $\Delta\Psi_m$ -sensitive probes Calcein-cobalt technique
MMP	Complete MMP results in the liberation of lethal catabolic enzymes or activators of such enzymes. Nonetheless, partial permeabilization may not necessarily lead to cell death	IF colocalization studies Immunoblotting after subcellular fractionation
PS exposure	PS exposure on the outer leaflet of the plasma membrane often is an early event of apoptosis, but may be reversible. PS exposure occurs also in T-cell activation, without cell death	FACS quantification of Annexin V binding

Operative definition of cell death, in particular in cancer research

Loss of clonogenic survival	This method does not distinguish cell death from long-lasting or irreversible cell cycle arrest	Clonogenic assays
-----------------------------	---	-------------------

Morts cellulaires et cancer

- Introduction:
 - Les différents types de mort cellulaire
 - Gènes et cancer
- L'apoptose:
 - La voie extrinsèque
 - La voie intrinsèque
 - Les modèles de perméabilisation membranaire
 - Le Pore de Transition de Perméabilité (PTP)
- L'autophagie:
- Comparaison des 2 voies
- **Stratégies thérapeutiques**

Les stratégies thérapeutiques

- Réactiver l'apoptose via les acteurs de la voie extrinsèque
 - TRAIL: très exprimé dans les cellules
 - ligand de TRAIL
 - MAbs: HGS-ETR1, HGS-RTR2 (phases I et II)
 - c-FLIP: réverse la résistance *in vitro* et réduit le volume tumoral de xénogreffes *in vivo*
 - TNF:
 - TNF- α : toxique, effet sensibilisateur (sarcomes, mélanomes)

Les stratégies thérapeutiques

- Activer les caspases (initiatrices ou exécutoires)
 - Peptides synthétiques:
 - Peptides RGD se lient aux intégrines et sont capables d'interagir et d'activer la caspase-3
 - En combinaison avec d'autres molécules:
RGD + paclitaxel cible le récepteur aux αV intégrines (cellules cancéreuses métastatiques)
 - Molécules naturelles:
 - Apoptin, dérivée d'un virus aviaire
 - Induit les caspases dans les cellules cancéreuses indépendamment de Bcl-2 et p53

Les stratégies thérapeutiques

- **Cibler les régulateurs de caspases: IAPs**
 - Niveau élevé de IAPs = mauvais pronostic
 - 2 voies: bloquer IAPs ou augmenter effet de leurs inhibiteurs naturels
 - XIAP antisens: tests précliniques, inhibition tumorale en combinaison avec un traitement chimiothérapeutique
 - Smac/DIABLO: mimétiques qui se lient à XIAP, c-IAPs
 - 12d: augmente l'apoptose induite par le cisplatine dans des cellules de cancer de la prostate (PC-3)
 - compound 3: synergise l'effet de TRAIL et de TNF- α dans des cellules de glioblastome (T98G)

Les stratégies thérapeutiques

- **Cibler les protéines de la famille Bcl-2**
 - Réactiver les membres pro-apoptotiques ou inhiber les membres anti-apoptotiques
 - Antisense Bcl-2:
 - Phase I (+ chimiothérapie) chez des patients atteints de LAM: la réponse au traitement est corrélée au niveau d'extinction de Bcl-2
 - Phase II (+ dexaméthasone + thalidomine) chez des patients atteints de myélome multiple: bonne tolérance à la chimiothérapie
 - Phase III (+ chimiothérapie) pour plusieurs types de **cancers**: bénéfique significatif pour des mélanomes métastatiques (suivi 24 mois)

Les stratégies thérapeutiques

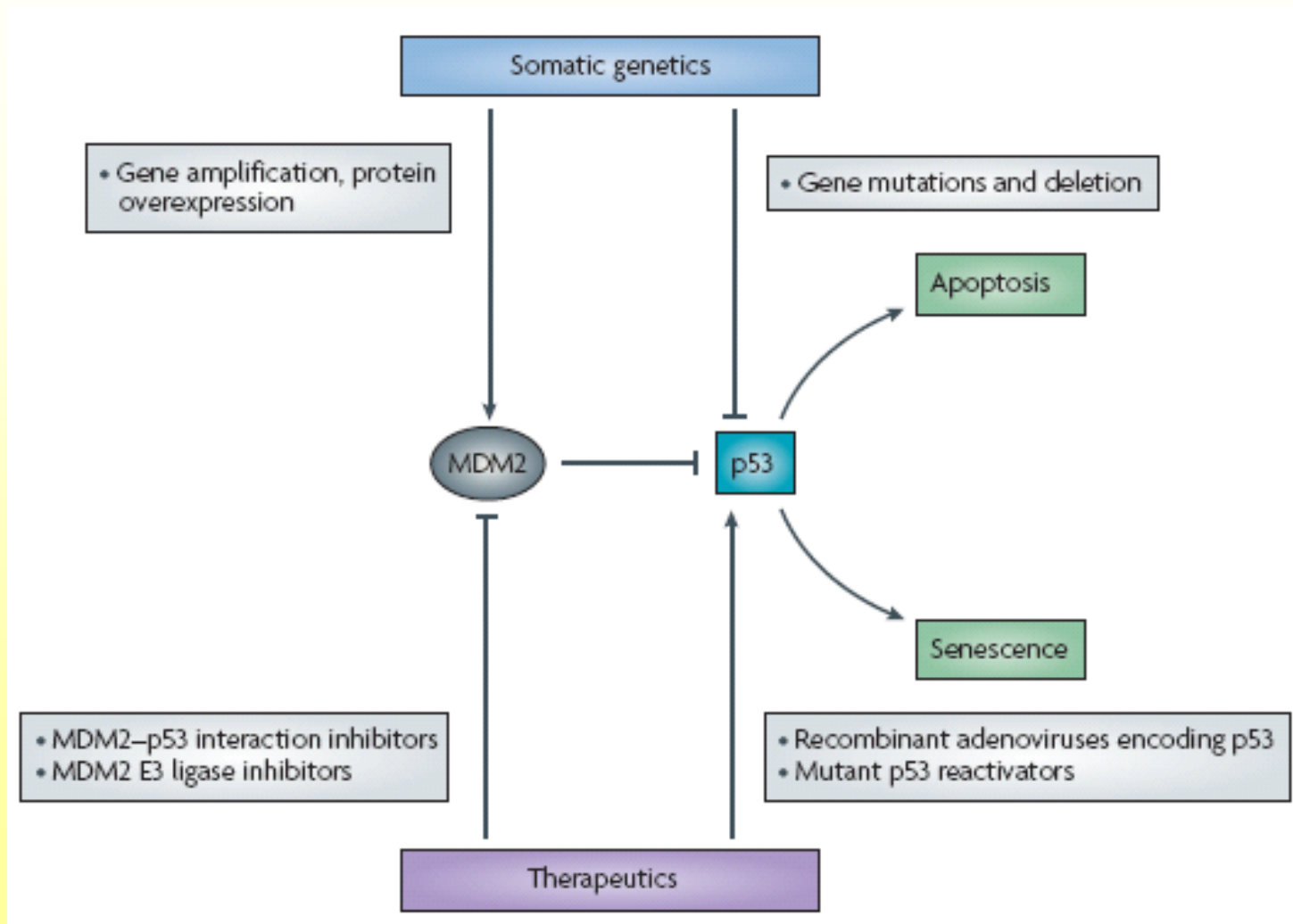
- **Cibler les protéines de la famille Bcl-2 (2)**
 - Agoniste de Bcl-2: ABT-737
 - Inhibition de Bcl-2 et Bcl-XL
 - Allonge la survie , induit une régression tumorale et permet une guérison fréquente dans des modèles murins
 - Bénéfique en combinaison avec traitement (lymphomes ou SCLC)

Stratégie anti-Bcl-2 est la plus avancée au niveau clinique

Bientôt adjuvants à la chimio ou radio-thérapie classiques

Les stratégies thérapeutiques

- Réactiver les fonctions de p53



Les stratégies thérapeutiques

- Réactiver les fonctions de p53
 - PRIMA-1 (P53 Reactivation and Induction for a Massive Apoptosis)
 - Restauration de la conformation sauvage de p53: transactivation de Bax, relargage de protéines Bcl-2 séquestrée par Bcl-XL
 - *In vivo*: synergie avec le cisplatine: induction de l'apoptose, inhibition de la croissance tumorale et des xénogreffes
 - RITA
 - Cible les tumeurs avec surexpression de MDM2
 - Inhibition de l'interaction p53/MDM2: p53 est stable et active

Les stratégies thérapeutiques

- Réactiver les fonctions de p53 (2)
 - Adénovirus p53: ONYX-015
 - Le virus se réplique uniquement dans les cellules avec une p53 déficiente
 - En phase III: synergie avec cisplatine ou 5-FU
 - ?? sur la sélectivité cellulaire??

Les stratégies thérapeutiques

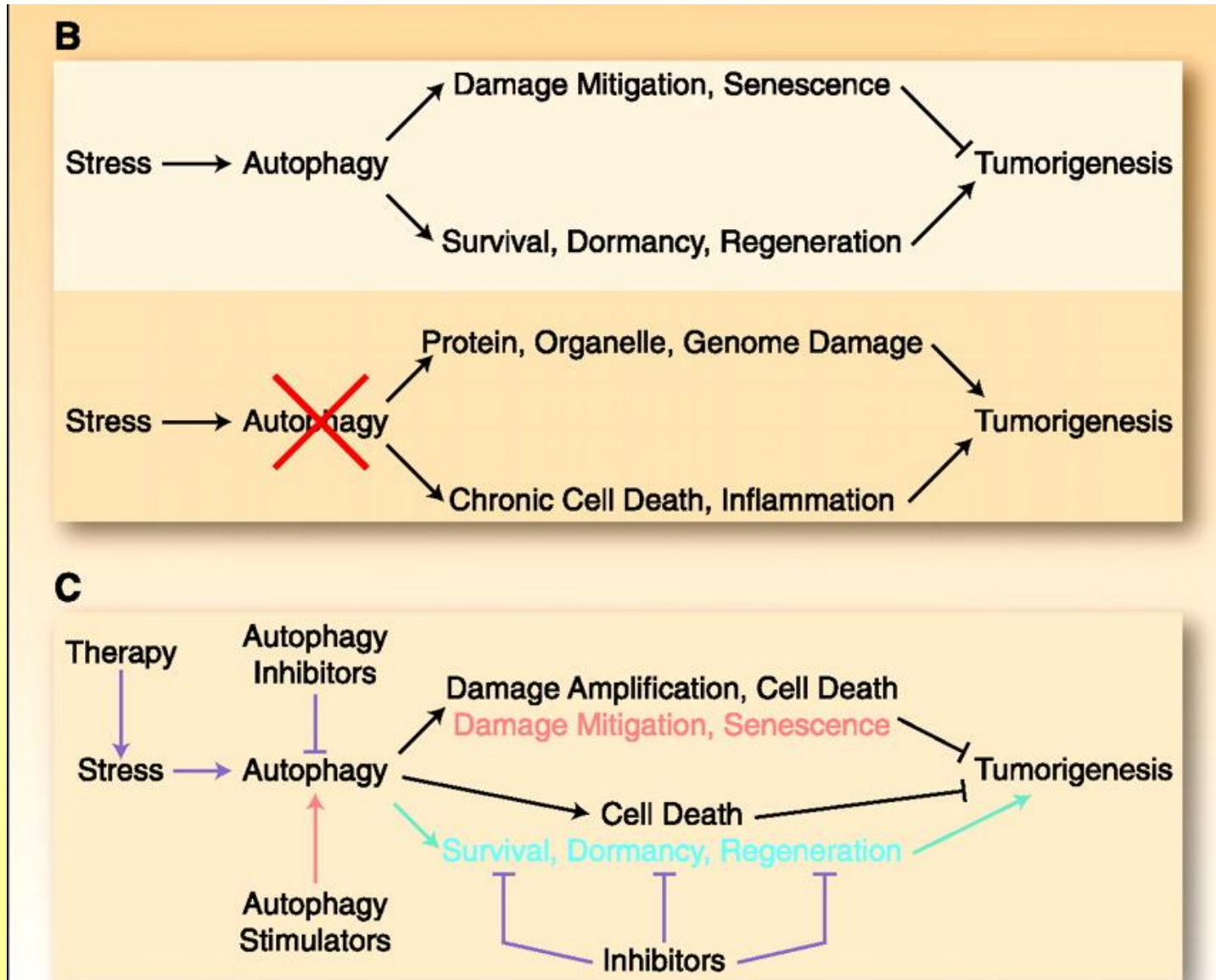
- Réactiver les fonctions de p53 (3)

Table 1 | Agents that reactivate p53 in cells

Mechanism of action	Agent	Stage of development*	Types of cancers in trials
<i>Wild-type p53 restoration</i>			
Recombinant adenovirus encoding p53	Gendicine	Approval in China	Head and neck
	Advexin	Phase I through phase III	Head and neck, NSCLC, breast, oesophageal, prostate, ovarian, bladder, bronchoaveolar and glioblastoma
	SCH 58500	Phase I through phase III	Ovarian, lung, bladder and liver
Mutant p53 reactivation	CDB3	Preclinical	N/A
	CP-31398	Preclinical	N/A
	Ellipticine	Preclinical	N/A
	WR1065	Preclinical	N/A
	PRIMA-1	Preclinical	N/A
	MIRA-1	Preclinical	N/A
<i>p53 stabilization</i>			
MDM2-p53 interaction inhibitor	Nutlins	Preclinical	N/A
	Benzodiazepines	Preclinical	N/A
	RITA	Preclinical	N/A
	Spiro-oxindoles	Preclinical	N/A
	Quinolinols	Preclinical	N/A
MDM2 E3 ligase inhibitor	HL198C	Preclinical	N/A

Les stratégies thérapeutiques

- Réactiver les mécanismes de l'autophagie



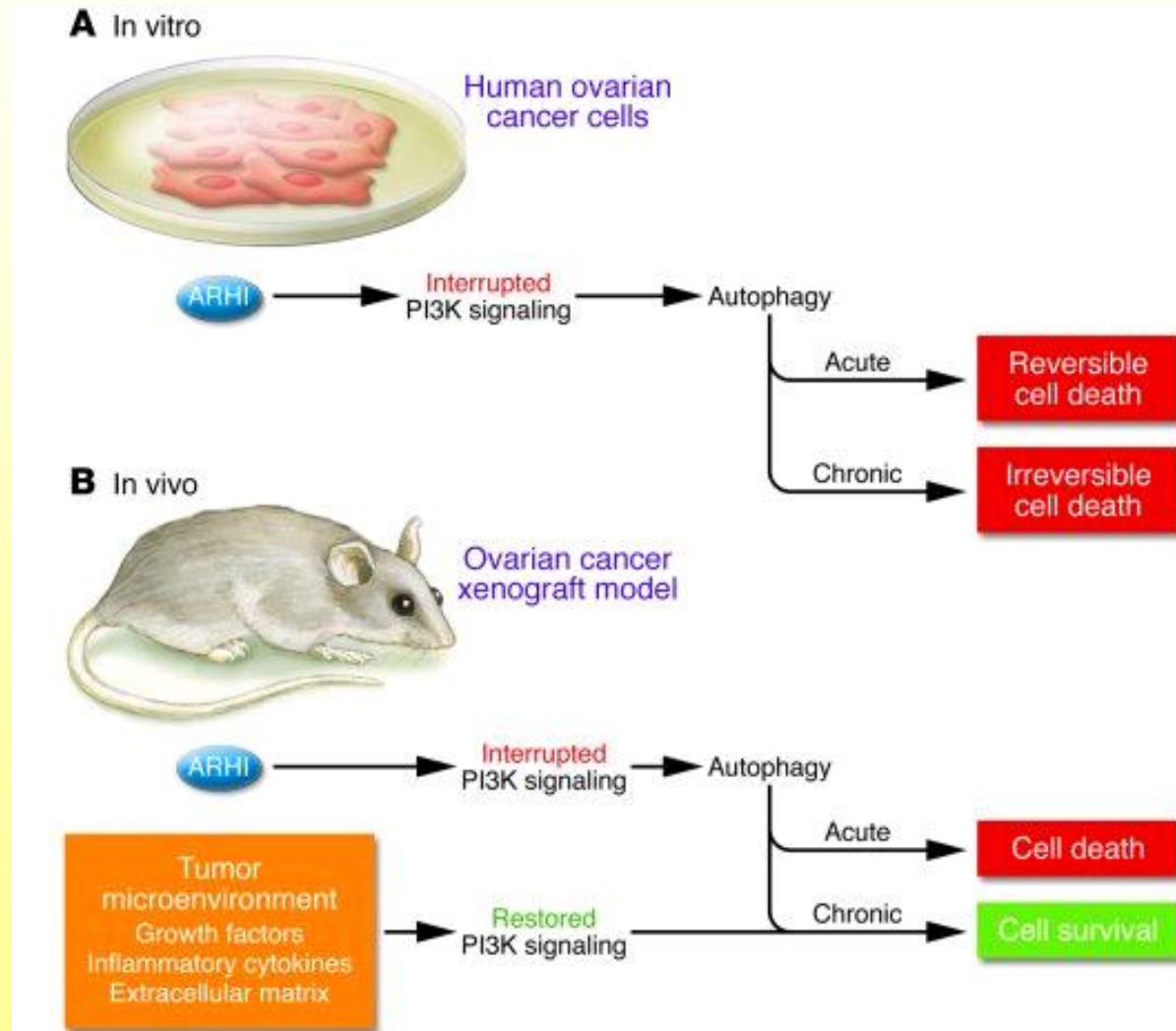
Les stratégies thérapeutiques

• Réactiver les mécanismes de l'autophagie

ARHI, gène suppresseur de tumeurs: Implications cliniques

-60% des tumeurs ovariennes avec expression de ARHI diminuée
-période de rémission clinique raccourcie

->amélioration par drogues pro-autophagies + chimio?



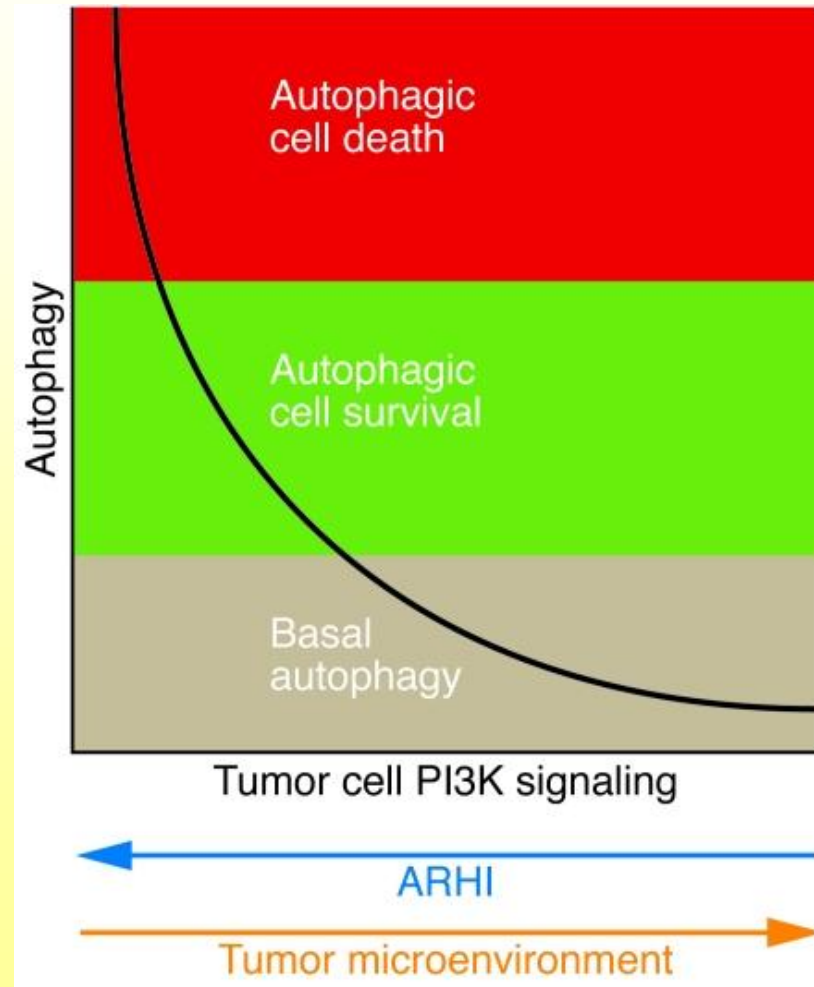
Les stratégies thérapeutiques

- Réactiver les mécanismes de l'autophagie

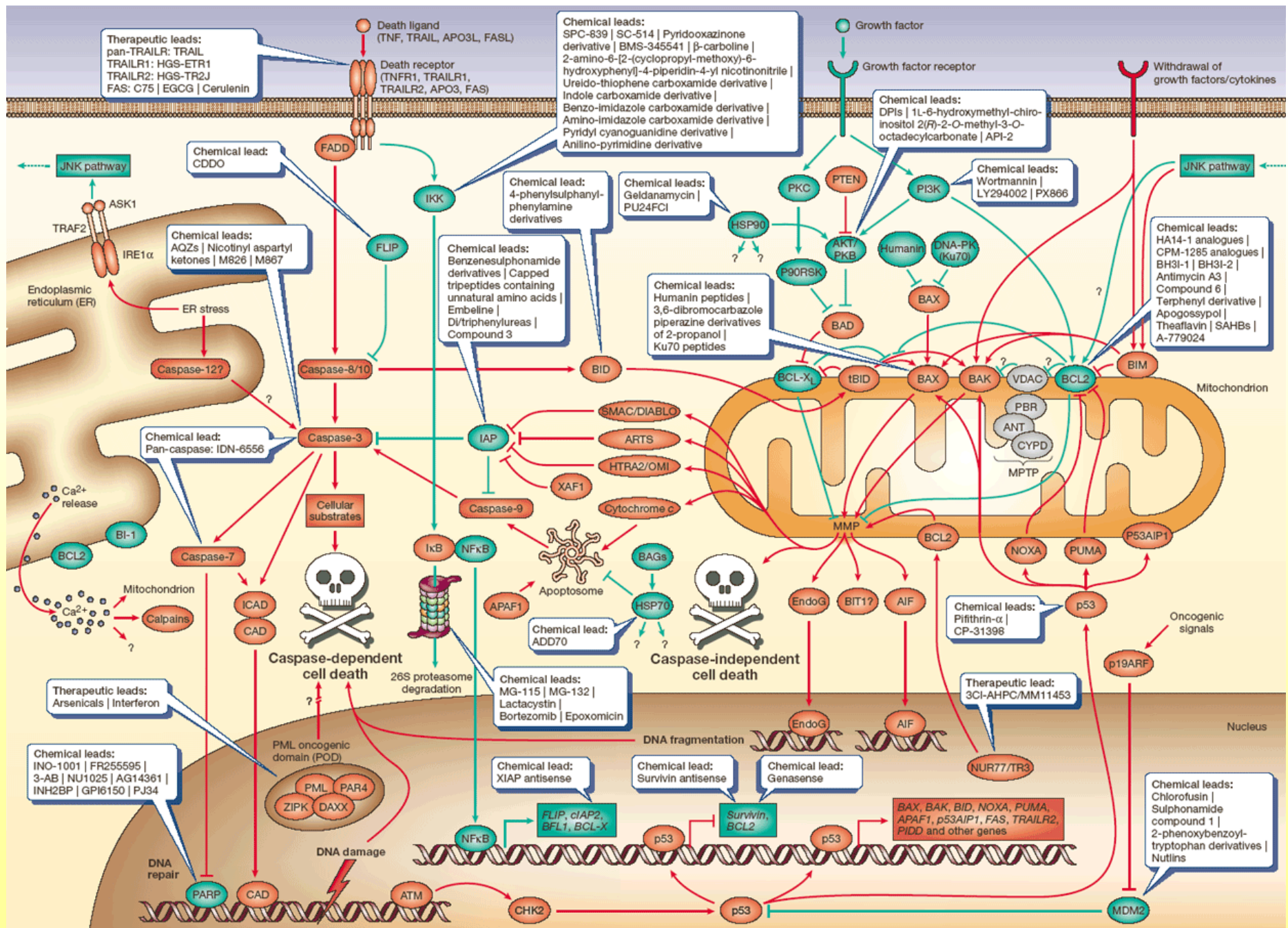
ARHI, gène suppresseur de tumeurs: Implications cliniques

-60% des tumeurs ovariennes avec expression de ARHI diminuée
-période de rémission clinique raccourcie

->amélioration par drogues pro-autophagies + chimio?



La mort cellulaire, en résumé...



Module Optionnel Médecine Moléculaire
26 Novembre 2012

Morts cellulaires et Cancer

Morgane Le Bras

morgane.le_bras@univ-paris-diderot.fr

Hôpital Saint Louis

INSERM U944-CNRS UMR 7212