



HAL
open science

Bcl2L10 : polymorphisme, résistance oncogénique et conséquences thérapeutique dans le cancer du sein

Minh Quang Duong

► **To cite this version:**

Minh Quang Duong. Bcl2L10 : polymorphisme, résistance oncogénique et conséquences thérapeutique dans le cancer du sein. Cancer. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1008 . tel-03591763

HAL Id: tel-03591763

<https://theses.hal.science/tel-03591763>

Submitted on 28 Feb 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT :
2021LYSE1008

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale N°340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (ED BMIC)

Spécialité de doctorat : BIOLOGIE
Discipline : Biologie cellulaire et moléculaire

Soutenue publiquement le 27/01/2021, par :
Minh Quang DUONG

**Bcl2L10 : polymorphisme, résistance
oncogénique et conséquences
thérapeutiques dans le cancer du sein**

Devant le jury composé de :

M. AUBERGER Patrick, Professeur, Université de Nice Sophia Antipolis
M. CHEVET Éric, Directeur de recherche, INSERM, Rennes
Mme. MOYRET-LALLE Caroline, Professeure, Université Lyon 1
M. BILLAUD Marc, Directeur de recherche, CNRS, Lyon
M. VILLOUTREIX Bruno, Directeur de recherche, INSERM, Paris
Mme. RIMOKH Ruth, Directrice de recherche, INSERM, Lyon

Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Examineur
Directrice de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	
Directeur Général des Services	M. Damien VERHAEGHE

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon-Est – Claude Bernard	Doyen : M. Gilles RODE
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud Charles. Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
UFR d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
UFR - Faculté des Sciences	Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1	Directeur : Emmanuel PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON

MANDATORY FEATURES

Titre en Français

Bcl2L10 : polymorphisme, résistance oncogénique et conséquences thérapeutiques dans le cancer du sein

Mots-clés en Français

Protéines Bcl-2 / Apoptose / Bcl2L10 – Nrh – Bcl-B/ Récepteurs IP3 / calcium / bio marqueur/ prédiction thérapeutique

Résumé Français (1700 caractères)

Les protéines Bcl-2 sont les principales régulatrices de l'apoptose. Bcl2L10 ou Nrh est un membre anti-apoptotique de la famille des protéines Bcl-2 jouant un rôle important au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Nrh interagit par son domaine BH4 avec le canal calcique IP3R au niveau du RE et l'inhibition de cette interaction induit une sensibilité accrue aux drogues des cellules cancéreuses. Bien que très peu exprimée dans les tissus sains, l'expression de Nrh est retrouvée altérée dans les cellules tumorales. L'altération de son expression est corrélée à un mauvais pronostic, en particulier dans les cancers du sein et les leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Un polymorphisme nucléotidique (SNP) a été décrit au niveau de la position 11 (Leu11Arg) dans le BH4 de Nrh. La présence du variant R (Arginine, Nrh-R) a été corrélée à un bon pronostic dans les LAM. Nous avons montré que le variant Nrh-R avait perdu sa capacité à interagir avec IP3R, n'était plus capable de bloquer la sortie active du calcium réticulaire et protégeait moins bien de la mort induite par un stress RE par rapport à la forme Nrh-L. Nous avons analysé le statut de ce SNP dans une cohorte de tumeurs du sein. Nos résultats montrent que les tumeurs exprimant au moins un allèle Nrh-L sont plus résistantes aux chimiothérapies que les patients Nrh-R homozygotes. Par ailleurs, l'analyse des bases de données nous a permis d'établir une liste de composés dont les IC50 varient en fonction du SNP. Pour aller plus loin, nous avons mis en place un programme de « drug discovery » afin d'identifier un inhibiteur spécifique de Nrh-L. La finalité est de cibler Nrh-L et d'améliorer la réponse à la chimiothérapie.

Titre en anglais

Bcl2L10 : polymorphism, oncogenic resistance and therapeutic outcome in breast cancer

Mots-clés en Anglais

Bcl-2 proteins / Apoptosis / Bcl2L10 – Nrh – Bcl-B/ Calcium / IP3 receptors / biomarker / therapy prediction

Résumé Anglais (1700 caractères)

Bcl-2 proteins are main programmed cell death regulators also called apoptosis. Bcl2L10 or Nrh is an anti-apoptotic Bcl-2 playing a key function at the endoplasmic reticulum (ER) unlike other Bcl-2 which are mostly located at the mitochondria. Nrh interacts through its BH4 domain with the calcium channel IP3 receptor (IP3R) at the ER. The interaction's inhibition induces higher drug sensitivity of cancer cells. Although Nrh expression level is low in normal tissues, it is found altered in cancer cells. Up-regulation of Nrh expression is correlated with poor prognosis in patients with breast cancer and acute myeloid leukemia (AML). A single-nucleotide polymorphism (SNP) has been described in Nrh BH4 domain at position 11 (Leu11Arg). The variant R (Arginine, Nrh-R) is correlated with a better prognosis in AML and is a good predictive chemotherapy factor in rectal cancer. We have demonstrated that the Nrh-R variant has lost the ability to interact with the IP3R, to block active ER calcium efflux and to protect cells against ER stress-induced cell death (Thapsigargin) compared with Nrh-L. We have analyzed the SNP status in a large breast cancer cohort. Our data showed that patients with at least one Nrh-L allele displayed higher chemotherapy resistance than homozygotes Nrh-R patients. Furthermore, extensive analysis from databanks has allowed us to establish a list of therapeutic compounds which IC50 varied depending on the SNP status Nrh-L or Nrh-R. Additionally, a drug discovery program has been implemented to identify an inhibitor of Nrh-L and its interaction with the IP3R. The purpose is to target Nrh-L and improve chemotherapy response.

Publications

Article 1 : Duong MQ, Gadet R, Treilleux I, Borel S, Nougarede A, Marcillat O, Mikaelian I, Gonzalo P, Popgeorgiev N, Rimokh R, Gillet G. Bcl2L10 Leu11Arg single nucleotide polymorphism, a new prediction biomarker in cancer. *En cours de soumission.*

Adresse du laboratoire

Equipe Signalisation, Métabolisme et progression tumorale
Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon
UMR 1052 Inserm – CNRS 5286
Centre Léon Bérard, Bâtiment Cheney D, 28 rue Laennec, 69373 Lyon Cedex 08

Remerciements

« Il faut trois conditions pour faire du thé : le temps, les braises, et les amis »

C'est avec beaucoup d'émotions que je rédige ces lignes. Sans l'accompagnement et l'aide de nombreuses personnes, je n'aurais pas pu réaliser ma thèse. Je tiens vraiment à vous remercier.

Je remercie en premier lieu monsieur Patrick Auberge et monsieur Éric Chevet pour leurs temps, leurs expertises et d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie chaleureusement madame Caroline Moyret-Lalle pour m'avoir guidé dans la passionnante vie de la recherche depuis mes études de pharmacie, et d'avoir accepté d'être examinatrice de mon travail. Je remercie monsieur Marc Billaud pour sa participation tant à mes trois comités de suivi de thèse qu'à ma soutenance de thèse en tant qu'examinateur. Je remercie monsieur Bruno Villoutreix d'avoir accepté d'être examinateur de mon travail. Je remercie également monsieur Hubert Vidal pour ses conseils et sa bienveillance durant mes trois comités de suivi de thèse.

Dans l'équipe, je remercie tout d'abord mes deux directeurs de thèses (officiellement et officieux) Ruth Rimokh et Germain Gillet pour m'avoir accueilli, formé, guidé depuis mon master 2 il y a de cela bientôt 4 ans. Malgré les hauts et beaucoup de bas dans le projet, merci d'avoir toujours vu du positif dans le négatif et m'avoir accompagné durant mes années de thèse. J'ai énormément appris lors de nos discussions aussi bien scientifiquement que personnellement.

Je remercie grandement Olivier Marcillat pour énormément de choses que je ne saurais toutes dénombrer, pour tes cours de biochimie en master 2, pour nos longues discussions sur le projet de criblage, pour ta positivité en toute circonstance, mais surtout pour ta bienveillance. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi, merci !

Je remercie particulièrement Rudy Gadet sans qui je crois que j'aurais fini au Vinatier avec les poissons-zèbres et mes protéines fluorescentes. Merci beaucoup pour ton temps et les longues heures passés au confocal, pour ta rigueur scientifique, et tes blagues *ahem* qui remontent le moral. J'ai eu beaucoup de chance d'avoir pu compter sur ton soutien.

À mes chères camarades de PhD, Léa, Pauline, et Trang. À miss Jabbour, la plus jeune des quatre, mais la première à soutenir, je te remercie pour ton aide, soutien et surtout ta joie. Merci pour tes protocoles super détaillés de PLA le matin, ton accent libanais « Touyer » le midi et les Chouffe en afterwork le soir. À Pauline, consœur des dolipranes, merci pour ta bonne humeur et ton soutien dans les moments difficiles (surtout les pauses café à 16h à discuter du temps des débauches en pharma). Merci aussi pour ta prose de qualité et une grammaire plus française que la mienne. À Trang, dernière arrivée en provenance du pays, merci pour les discussions scientifiques mi-français mi-vietnamien et pour ton soutien ! Je tiens à remercier évidemment les anciens Matthieu, Adrien et Jonathan pour m'avoir formé à la science lors de mes stages.

Je remercie spécialement mes sept jeunes guerrières Amazones : Lise, Mélinda, Zetseat, Anaëlle, Emma, Gladys, et Camille. Avec mention spéciale pour : Lise, la première des stagiaires, merci pour tes « primers de l'espoir » et d'avoir galéré avec moi sur le projet L11R. Anaëlle, stagiaire licorne et poney, merci pour tes tartes à la praline, tes tatouages super stylés et ta joie. Gladys, la stagiaire des plages, merci d'avoir assuré comme une cheffe lorsque j'étais sous les cocotiers de Thaïlande. Et enfin Camille,

la petite dernière, merci de m'avoir aidé à finir mes quarante westerns de la fin. Je vous remercie énormément et vous souhaite le plus grand succès pour la suite.

Je remercie Stéphane pour son travail énorme sur le projet L11R et sa bonne humeur. Je remercie aussi Delphine pour ton temps et expertise en sciences statistiques. On serait toujours perdu sans toi. Je remercie Oliver (OL) pour les discussions sur la politique, les poissons et les souris toujours très passionnantes. Je remercie également mes collègues avec qui j'ai partagé le quotidien de l'équipe, Ivan, Philippe, Nikolay, Anca, Sophie, Marie et Audrey.

Je remercie les membres des autres équipes du centre de recherche avec qui j'ai pu interagir et passer des moments de folies en Afterwork. Aux collègues du Cheney D : du 6^e, Marie, mami Joëlle, Helena. Du 4^e : Henry-Phillipe, Ha, Razan, Chang, Mario, Nora. Du 2^e : Hadrien, Simon, Sébastien, Milène, Gaëlle. Du 1^{er} : Dorian, Matthias, Clothilde et Chris. Ainsi qu'à tous les autres collègues d'ailleurs Duy, Angéline, Thomas, et qui n'auraient pas été mentionné.

Je remercie nos collaborateurs du Centre Léon Bérard qui ont contribué à ce projet, notamment le service d'anathomo-pathologie, madame Isabelle Treilleux, Amélie et Laetitia.

À mes frères lyonnais, Nourredingue, Père Ménard, Aurel, Samos, Léo, Bajard, Polo, la bess, je pense qu'il me faudrait au moins une thèse pour raconter toutes les aventures de la bande. Je suis vraiment heureux de vous avoir les frères, surtout après la fin des années de fac.

Aux kopains, Néral, DBD, Colas, Ayoub, Hugo, Poney, Cléa, pour la majorité on se connaît depuis la terrible PACES, j'ai adoré les semaines de ski, à la plage et surtout les moments passés tous ensemble à profiter de la life à coup de protos, cocktails et à se goinfrer sous la bénédiction du cuistot Capitain Burger. Un grand merci pour ces moments ensemble, j'espère que ça durera encore longtemps.

Aux amis rencontrés au fil du temps je ne vous ai pas oubliés ! Les copains de toujours Timothée, Raf, Victor. Les copains de Croix Rousse, Lélia, David, Léa, Julien, Pascal, Simon. Les copains de la fac VDSE, GregiDal, Vincent Flo aka Mr Olympia de Lyon, Laurent, Sophie, Garance, Soho, Nicole, Marjolaine... Les copains de master Estelle, Laura, Loïc, PE, Aurore. Chaque rencontre, moment passé est un trésor pour moi. Merci d'avoir été là, au plaisir de tous vous revoir où que vous soyez !

À ma famille, un grand merci à ma super maman pour tous ses plats, nems, canard laqué, tofu, sushi, poulet au curry, porc au caramel et j'en oublie. Sans toi je serais certainement mort de faim et maigrichon. Merci à toi aussi mon papa, d'avoir toujours été là même quand ça n'allait pas. À ma petite sœur, future pharmacienne de choc, merci de ton soutien et de tes ragots d'étudiants au quotidien.

Je vous aime

Duong Minh Quang

Table des matières

MANDATORY FEATURES	3
REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	7
INTRODUCTION	10
1. LE MOUVEMENT PERPETUEL ENTRE LA VIE ET LA MORT	10
1.1. CHRONIQUES DES BCL-2: COMMENT VIVRE ET SURVIVRE	10
1.1.1. Découverte des gènes de survie et oncogènes.....	10
1.1.2. Le clan des Bcl-2.....	11
1.1.3. Classification des protéines Bcl-2.....	11
1.1.3.1. Multi-domaines anti-apoptotiques	12
1.1.3.2. Multi-domaines pro-apoptotiques des protéines Bcl-2	13
1.1.3.3. BH3-only pro-apoptotiques.....	15
1.2. CHRONIQUES DE LA MORT : TOUS LES CHEMINS MENENT A LA MORT	16
1.2.1. Prédestinée à mourir : l'apoptose.....	17
1.2.1.1. Les petites mains de la mort, les caspases	17
1.2.1.2. La voie extrinsèque de l'apoptose.....	18
1.2.1.3. La voie intrinsèque : danse de la mort des mitochondries.....	20
1.2.2. Autophagie : recycler pour survivre ou mourir.....	26
1.2.2.1. Mécanisme moléculaire	27
1.2.2.2. Autophagie dans le cancer	29
1.2.2.3. Autophagie et Bcl-2	29
1.3. JUGES DE PAIX DU CYCLE DE LA VIE : FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DES PROTEINES BCL-2	30
1.3.1. Localisation subcellulaire	30
1.3.2. Bcl-2 et phénotypes.....	32
1.3.2.1. Fonctions physiologiques des Bcl-2 anti-apoptotiques	32
1.3.2.2. Fonctions physiologiques des Bcl-2 pro-apoptotiques.....	34
1.3.3. La face cachée des Bcl-2 : les fonctions non canoniques	35
1.3.4. Modifications cellulaires régnant sur les Bcl-2.....	38
1.3.4.1. La phosphorylation : entre activation et inhibition	38
1.3.4.2. Ubiquitination, protéasome et dégradation des protéines.....	42
1.4. LE PRIX DE L'IMMORTALITE : PATHOLOGIES LIEES A LA FOLIE DES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2	49
1.4.1. L'altération de l'expression des Bcl-2 dans les cancers.....	49
1.4.2. Résistance aux thérapies	52
1.5. RETABLIR LA BALANCE.....	53
1.5.1. Antagonistes des anti-apoptotiques	53
1.5.1.1. « Pan-Bcl2 » inhibiteurs.....	53
1.5.1.2. Petites molécules inhibitrices spécifiques.....	55
1.5.1.3. BH3-peptides	56
1.5.1.4. Inhibiteurs du BH4.....	57
1.5.2. Activation des pro-apoptotiques Bax/Bak	58
1.5.2.1. Peptides BH3-only	58
1.5.2.2. Activateurs non peptidiques	59
1.5.3. Autres stratégies thérapeutiques :.....	60
1.5.3.1. Agents de conversion	60
1.5.3.2. Inhiber la transcription	61
1.5.3.3. Augmenter la dégradation : les PROTAC	61
2. LE CALCIUM, LA MONNAIE DE CONVERSION DES PROTEINES BCL-2	63

2.1.	HOMEOSTASIE CALCIQUE EN QUELQUES MOTS.....	63
2.2.	MODULATION AU NIVEAU DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE.....	64
2.2.1.	<i>Les récepteurs IP3 : les canaux du calcium</i>	65
2.2.1.1.	Structure des IP3R	65
2.2.1.2.	Libération calcique médiée par l'IP3R	66
2.2.1.3.	Régulation des IP3R par la famille Bcl-2	67
2.2.2.	<i>Les récepteurs de la Ryanodine RyR</i>	68
2.2.3.	<i>La pompe SERCA et Bcl-2</i>	69
2.3.	MODULATION AU NIVEAU DE LA MITOCHONDRIE.....	69
2.3.1.	<i>Modèle unifié du transport de calcium médié par VDAC</i>	70
2.3.2.	<i>Régulation de VDAC par la famille Bcl-2</i>	71
2.4.	REGULATION A LA MEMBRANE CELLULAIRE.....	72
3.	LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE : STOCKAGE, REPLIEMENT ET ADAPTATION AU STRESS	73
3.1.	L'ORGANITE UNIQUE AUX EUCARYOTES	73
3.2.	FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DU RE	73
3.2.1.	<i>Synthèse protéique et repliement</i>	73
3.2.2.	<i>Synthèse lipidique</i>	74
3.2.3.	<i>Homéostasie du calcium</i>	74
3.3.	STRESS DU RE ET LA REPOSE UPR (UNFOLDED PROTEIN RESPONSE).....	75
3.3.1.	<i>La voie traductionnelle : activation de PERK</i>	76
3.3.2.	<i>La voie translationnelle : activation des protéines IRE1 et ATF6</i>	76
3.3.3.	<i>Le stress RE : condition physiologique et cancer</i>	78
3.4.	LA TRINITE DU STRESS RE: APOPTOSE, UPR ET PROTEINES BCL-2	79
4.	BCL2L10 / NRH, LE DERNIER DES GRANDS BCL-2.....	82
4.1.	NRH / Bcl2L10 / Bcl-B : UN DES BCL-2 MULTIFONCTIONS	82
4.1.1.	<i>Organisation structurale de Nrh</i>	82
4.1.2.	<i>Fonctions physiologiques et interactions biochimiques de Nrh</i>	83
4.1.3.	<i>Bcl2L10/Nrh et cancers</i>	85
4.1.3.1.	La surexpression de Nrh, un marqueur de mauvais pronostic.....	86
4.1.3.2.	La perte de l'expression de Nrh, marqueur de mauvais pronostic.....	87
INTRODUCTION AU SUJET DE THESE : LE POLYMORPHISME LEU11ARG DE BCL2L10, UN NOUVEAU MARQUEUR PREDICTIF DE REPOSE AU TRAITEMENT DANS LE CANCER DU SEIN.....		90
ARTICLE 1 : BCL2L10 LEU11ARG SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM, A NEW PREDICTION BIOMARKER IN BREAST CANCER		93
	ABSTRACT	94
	INTRODUCTION	94
	RESULTS	95
	DISCUSSION.....	98
	MATERIALS AND METHODS	100
	TABLES AND FIGURES.....	103
	REFERENCE.....	114
RESULTATS 2 : CONCEPTION D'INHIBITEURS SPECIFIQUES DE NRH, MODELE DE CRIBLAGE BH4 MIMETIQUE		115
	INTRODUCTION, CONCEPTION ET THEORIE DU BH4 MIMETIQUE	115
	RESULTATS DES MODELES DE CRIBLAGE	117
	MATERIEL ET METHODES.....	125

DISCUSSION	128
LE POLYMORPHISME DE NRH, UN MARQUEUR DE BON PRONOSTIC EN THERAPIE ANTI-CANCEREUSE.....	128
BH4 MIMETIQUE INHIBITEUR DE NRH : CHALLENGE ET PERSPECTIVES	131
CONCLUSION.....	134
LISTE DES FIGURES.....	135
LISTE DES TABLEAUX	135
LISTE DES ABREVIATIONS	136
BIBLIOGRAPHIE	141

Introduction

1. Le mouvement perpétuel entre la vie et la mort

À partir des années 1850, le concept d'homéostasie définie par Claude Bernard dans ses travaux intitulés « Introduction à l'étude de la médecine expérimentale », a posé les jalons des futurs travaux sur la vie et la mort. Dans les conditions optimales d'existence, l'équilibre entre la vie et la mort des cellules d'un organisme est régulé de manière perpétuelle par de nombreux mécanismes. La vie par exemple est définie par la capacité de nos cellules à proliférer, à se régénérer et à survivre en conditions difficiles. La mort, état irréversible d'un organisme ayant cessé de vivre, est atteinte de différentes façons, la plus connue est l'apoptose, ou la mort cellulaire programmée.

Dans la première partie introductive, je voudrais passer en revue la littérature sur les mécanismes modulant la vie, la mort et parfois les deux en même temps.

1.1. Chroniques des Bcl-2: comment vivre et survivre

1.1.1. Découverte des gènes de survie et oncogènes

En conditions physiologiques, le cycle cellulaire est une succession d'événements résultant d'un remplacement des cellules « âgées » avec des cellules nouvellement générées. Durant ces événements de renouvellement cellulaire, des gènes modulant des fonctions clés comme la survie cellulaire ou la résistance à la mort peuvent devenir incontrôlables par différents mécanismes d'altération (mutation, surexpression, etc..). Ces gènes peuvent alors prédisposer à la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses. Ces cellules cancéreuses possèdent alors des avantages de survie par rapport aux cellules normales comme une croissance cellulaire accrue ou une meilleure survie en milieu pauvre en nutriments.

Ces gènes qu'on définit maintenant comme oncogène ne sont pas par nature mauvais. Ils sont nécessaires à tout organisme. Le terme oncogène est apparu récemment à la fin des années 1960 avec la découverte du premier oncogène rétroviral SRC dans le poulet (Martin, 2001). À la différence du gène physiologique c-Src (cellular Src), v-Src (viral Src) a démontré lors de l'intégration au génome de l'hôte suite à une infection par le virus du Sarcome de Rous (RSV), sa capacité à transformer les cellules normales en cellules tumorales. Ainsi, le gène normal c-src est dit proto-oncogène puisque c'est l'altération de son activation qui l'amène à devenir oncogénique et à induire le cancer. Suite à cette découverte, en 1982, le Dr Weinberg découvre à son tour le premier oncogène humain dans les lignées de carcinome de la vessie (Shih and Weinberg, 1982). Cet oncogène est en réalité une version mutée du gène RAS (Rat Sarcoma)(Reddy et al., 1982). De manière très intéressante, il existe différents

mécanismes pour qu'un proto-oncogène devienne un oncogène ; par exemple, une mutation dans le proto-oncogène, une altération dans les mécanismes de régulation, ou encore une translocation chromosomique.

1.1.2. Le clan des Bcl-2

Le gène Bcl-2 a été identifié en 1984 à partir de l'analyse moléculaire d'une translocation chromosomique t(14;18)(q32;q21). Cette translocation a pour effet de placer l'oncogène Bcl-2 sous le contrôle du promoteur des chaînes lourdes des immunoglobulines (Pegoraro et al., 1984; Tsujimoto et al., 1984). La conséquence de cette translocation, spécifique des lymphomes folliculaires, a donc pour conséquence la surexpression de ce gène dans les cellules lymphoïdes B. Ainsi naturellement le gène du chromosome 18 a été nommé B cell lymphoma 2 ou Bcl-2. De fait, les études réalisées ont montré que Bcl-2 était différent des oncogènes connus de l'époque comme *c-myc* ou *src* qui favorisent la croissance cellulaire. L'expression de Bcl-2 dans des lymphocytes B permettait leur survie en milieu pauvre en IL-3 (interleukine-3), mais ne conférait pas d'avantages prolifératifs (Vaux et al., 1988). C'est alors qu'une nouvelle classe d'oncogènes a été définie avec la capacité de promouvoir la survie cellulaire dans des conditions désavantageuses. De manière plus spécifique, en 1990 il a été montré pour la première fois que Bcl-2 favorise la survie cellulaire en prévenant l'apoptose ou la mort cellulaire programmée (Hockenbery et al., 1990). Jusqu'à aujourd'hui, des études sont toujours en cours afin de comprendre toutes les fonctions des protéines de la famille des Bcl-2.

1.1.3. Classification des protéines Bcl-2

À la suite de cette découverte, Bcl-2 est devenu très tendance et de nombreuses études ont été réalisées et ont permis d'identifier des protéines ayant des séquences homologues avec Bcl-2, dans de nombreuses espèces, vertébrées et invertébrées. La protéine Bcl-2 est le porte-étendard de la famille, mais n'est certainement pas toute seule. Pour faire partie de la famille, ladite protéine doit posséder au moins un des quatre domaines d'homologie appelés BH (Bcl-2 homology domain), allant de BH1 à BH4. Les domaines BH sont des courtes séquences d'acides aminés conservées retrouvées dans la séquence protéique des Bcl-2. Tous les membres de la famille possèdent à ce jour au moins le domaine BH3 et la plupart du temps également un domaine transmembranaire (TM) nécessaire pour leurs ancrages aux organelles cellulaires comme la mitochondrie ou le réticulum endoplasmique (RE). En fonction de leurs rôles dans la cellule, les protéines Bcl-2 sont séparées en 3 sous-groupes (Figure 1 et Figure 2) : les « multi-domaines » pro-apoptotiques, les « multi-domaines » anti-apoptotiques, et les « monodomaine » BH3-only (Aouacheria et al., 2013). Il est intéressant de noter que pour faire partie du sous-groupe « multi-domaines », on admet que la protéine doit posséder un domaine BH4 et que

la structure tertiaire doit former une poche BH3 capable d'interagir avec d'autres domaines BH3 (Shamas-Din et al., 2011).



Figure 1 Multi-domaines de la famille Bcl-2. (A) Schéma d'un Bcl-2 multi-domaines avec la représentation des structures (hélice alpha) et fonctions. (B) Tableau récapitulatif des Bcl-2 multi-domaines.

1.1.3.1. Multi-domaines anti-apoptotiques

La protéine Bcl-2 étant le premier multi-domaines identifié, 5 autres homologues ont suivi successivement. En 1993, trois d'entre eux ont été identifiés. Le deuxième membre, Bcl-xL (Bcl2L1, B-cell lymphoma-extra large), a été identifié en même temps que son variant d'épissage Bcl-xS (B-cell lymphoma-extra small) (Boise et al., 1993) ; suivi de très près par Mcl-1 (Bcl2L3, Myeloid cell leukemia 1) et Bfl-1 (Bcl2A1, Bcl-2-related gene expressed in fetal liver) (Kozopas et al., 1993; Lin et al., 1993). Notre équipe a ensuite découvert la protéine Nr-13 de la caille puis l'homologue humain Bcl2L10/Nrh/Bcl-B. La protéine existe également chez la souris (Diva / Boo) et le zebrafish (Nr2) (Aouacheria et al., 2001; Gillet et al., 1995). Le dernier de la famille Bcl-W (Bcl2L2) découvert en 1996 montra de nombreuses similitudes avec les autres homologues dans la promotion de la survie cellulaire (Gibson et al., 1996).

Structurellement, les Bcl-2 possèdent tous 4 domaines BH. Les domaines BH1 et BH2 sont plus conservés que les domaines BH3 et surtout BH4. Les domaines 1 et 2 sont importants pour le rôle anti-apoptotique. Ils sont nécessaires notamment pour l'interaction avec le pro-apoptotique Bax (Bcl-2 associated X factor). Il a été montré que des mutations dans les domaines BH1 et BH2 pouvaient interdire l'hétérodimérisation avec Bax, et cela avait pour conséquence la perte de viabilité des cellules dans des milieux « rudes » (Yin et al., 1994). Un autre élément clé du rôle anti-apoptotique du groupe est le BH4. C'est une hélice alpha amphiphile d'une longueur moyenne de 24 acides aminés (Lee et al., 1996) du côté N-terminal de la protéine. Le BH4 est le domaine le moins conservé dans la famille des Bcl-2, cependant il existe quelques spécificités. Le motif reste plutôt conservé entre Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-W, contrairement aux autres membres Mcl-1, Bfl-1, Bcl2L10, et les pro-apoptotiques Bax / Bak (Bcl-2 Antagonist killer) qui sont divergents (Aouacheria et al., 2005; Huang et al., 1998). La perte de BH4 ou des mutations dans ce domaine a montré non seulement, une perte de fonction anti-apoptotique, mais aussi une conversion des protéines anti-apoptotiques en pro-apoptotiques (Cheng et al., 1997; Liu et al., 2016b). Une des explications est que la déficience du domaine BH4 permet l'accès aux facteurs pro-apoptotiques à la poche hydrophobe des anti-apoptotiques (Ding et al., 2010; Petros et al., 2004). Le dernier élément structurellement important est le domaine TM. À l'exception de Bfl-1 qui n'a pas de TM, les autres multi-domaines Bcl-2 possèdent un TM du côté C-terminal. Ce domaine est nécessaire à l'ancrage des Bcl-2 dans les membranes d'organelles comme la mitochondrie, le RE ou encore la membrane nucléaire. À ce jour, de nombreuses études ont démontré l'importance de ce domaine dans la localisation subcellulaire et la dynamique des Bcl-2 dans la cellule. Néanmoins, il reste encore des mécanismes encore mal connus impliquant les Bcl-2, notamment les fonctions non canoniques de ces derniers (Gabellini et al., 2017; Popgeorgiev et al., 2018).

1.1.3.2. Multi-domaines pro-apoptotiques des protéines Bcl-2

Les multi-domaines pro-apoptotiques des Bcl-2 sont composés des trois frères perforateurs de membranes B : Bax (Oltvai et al., 1993) , Bak (Farrow et al., 1995) et Bok (Bcl-2 related ovarian killer) (Hsu et al., 1997). Comme leurs homologues anti-apoptotiques, les trois B possèdent quatre domaines BH de 1 à 4 et un domaine TM en C-terminal. Le domaine BH4 est conservé dans ce groupe. Les trois « B » sont des acteurs clés de l'exécution de l'apoptose. De fait, ils sont régulés très finement par les protéines anti-apoptotiques. Ainsi, c'est le changement de pouvoir entre les anti et pro-apoptotiques qui décide de la destinée cellulaire.

Bax a été le premier à être identifié par l'équipe de Korsmeyer qui étudiait les partenaires d'interactions de Bcl-2. Comme mentionné, Bax possède 4 domaines BH et un domaine TM. Ces derniers forment un cœur hydrophobe entouré de neuf hélices alpha. Le TM est responsable de

l'ancrage de Bax à la membrane externe de la mitochondrie (MEM) (Suzuki et al., 2000). Bax peut former un homodimère et un oligomère en se liant par le sillon hydrophobe formé par le C-terminus de l'hélice alpha-2, de la partie N-terminus de l'hélice alpha-5 et des résidus dans l'hélice alpha-8. C'est cette capacité qui permet la formation de pores. Bax peut également former un hétérodimère avec les anti-apoptotiques Bcl-2. Dans ce dernier cas, Bax est cytosolique et inactivé (Westphal et al., 2014).

Dans les cellules en conditions physiologiques, Bax est sous forme inactivée jusqu'à recevoir des signaux apoptotiques. Bax est alors active et relocalisée à la MEM pour effectuer son rôle de perforateur de membrane (Wolter et al., 1997). Une étude a récemment émis l'hypothèse que Bax serait de manière constitutive à la membrane mitochondriale, mais qu'une dynamique avec Bcl-xL relocaliserait en permanence Bax dans le cytosol (Edlich et al., 2011). Mais ce point est sujet à discussion puisque des observations de relocalisation de Bax indépendamment de Bcl-xL et d'autres anti-apoptotiques ont été observées. Ces derniers points illustrent bien l'importance de la dynamique intracellulaire de Bax pour son rôle pro-apoptotique.

La protéine Bak présente de nombreuses similitudes avec Bax. Elle possède la même structure tertiaire et peut former des pores dans la membrane mitochondriale à travers une oligomérisation via le BH3 (Dewson et al., 2008). Cependant à l'inverse de Bax, Bak est trouvée uniquement à la membrane mitochondriale même quand cette dernière est inactivée. De manière intéressante, l'interaction de Bak avec le canal calcique voltage dépendant VDAC 2 maintient Bak inactivé (Ren et al., 2009). À la réception de signaux apoptotiques, Bak change de conformation, s'oligomérisent et active la mort cellulaire (Leshchiner et al., 2013).

La protéine Bok est retrouvée plus spécifiquement dans les organes reproductifs comme l'utérus, les ovaires ou les testicules (Hsu et al., 1997). Récemment Bok a aussi pu être détectée dans les cellules myéloïdes ou dans le cerveau (Ke et al., 2012). Bok est sous localisée au niveau du RE où elle a été décrite pour des fonctions pro-apoptotiques en réponse au stress du RE indépendamment de la réponse médiée par Bax/Bak (Carpio et al., 2015). Cependant, des études phénotypiques en modèle animal (souris) et en cellules (hépatocytes) ont montré que le Knock out (KO) de Bok n'engendrait pas de réponse phénotypique. Ainsi dans les souris transgéniques *Eμ-Myc* il n'y a pas eu d'accélération du développement des lymphomes (Fernandez-Marrero et al., 2016; Ke et al., 2012). Cela indiquerait des fonctions pro-apoptotiques très spécifiques et limitées à certains organes de Bok, et en parallèle un mécanisme de compensation des autres Bcl-2 pro-apoptotiques vis-à-vis de Bok.

D'autres homologues multi-domaines pro-apoptotique de Bcl-2 ont été décrits, mais ils ne rentrent pas encore dans ce sous-groupe bien particulier. On peut mentionner Bcl-G possédant un domaine BH2 et BH3 qui a été décrit lors de sa découverte comme un pro-apoptotique (Guo et al., 2001).

Cependant une nouvelle étude vient contredire ce rôle (Giam et al., 2012). Le rôle de Bcl-G reste donc encore assez peu connu. Un autre homologue Bcl-Rambo est décrit possédant un domaine BH1, un BH4 et surtout un TM avec un rôle autre que l'ancrage aux membranes. À travers son TM, Bcl-rambo est capable de provoquer la mort cellulaire indépendamment des mécanismes médiés par les Bcl-2 et les domaines BH (Kataoka et al., 2001).

1.1.3.3. *BH3-only pro-apoptotiques*

Parmi les protéines de la famille Bcl-2, les BH3-only sont les plus nombreux, mais aussi les plus difficiles à définir en tant que groupe. Ils sont huit membres canoniques ayant comme leurs noms l'indiquent, un seul domaine unique BH3. C'est aussi cette particularité qui définit les fonctions pro-apoptotiques des BH3-only. Excepté Bik et *hrk*, les BH3-only n'ont pas de TM et de fait on les retrouve dans l'espace cytosolique des cellules ; sauf bien entendu quand ils sont relocalisés pour assurer leurs rôles dans la mort cellulaire.

Les premiers membres, Bad (Bcl-2-associated agonist of cell death) et Bik (Bcl-2 interacting killer), sont identifiés en 1995. Bad a été identifiée en formant un hétérodimère avec Bcl-2 et Bcl-xL. Cette interaction déplace alors l'équilibre de l'interaction (séquestration) de Bcl-xL sur Bax comme mentionné plus haut, restaurant le pouvoir pro-apoptotique de Bax (Yang et al., 1995). De manière similaire, il a été montré que Bik interagissait avec Bcl-2, Bcl-xL, mais aussi avec des protéines anti-apoptotiques virales pour promouvoir l'apoptose (Boyd et al., 1995). Peu de temps après, Bid (BH3 interacting domain death agonist) fut découverte en 1996. Bid est normalement sous forme inactive dans le cytosol. Après réception des signaux apoptotiques, Bid est clivée par la caspase 8 pour donner sa forme tronquée tBid (truncated Bid), afin que ce dernier puisse être transloqué à la mitochondrie pour médier l'apoptose dépendante Bax/Bak. tBid provoque un réarrangement des mitochondries autour du noyau et provoque la sortie de cytochrome c. La co-expression de Bcl-xL restaure les effets induits par tBid, montrant l'importance de la balance pro/anti-apoptotique dans la cellule (Li et al., 1998; Wang et al., 1996). *Harakiri* (Hrk, littéralement protéine suicidaire) a été découverte en 1997. Il est intéressant de noter que Hrk peut interagir avec Bcl-2, Bcl-xL, mais pas Bax ou Bak, et que l'abolition de son domaine BH3 inhibe son activité pro-apoptotique (Inohara et al., 1997). Vient ensuite Bim (Bcl-2 Interacting Mediator Of Cell Death) et ses trois isoformes d'épissage alternatif en 1998, qui en neutralisant les anti-apoptotiques Bcl-2 favorisent le processus de l'apoptose (O'Connor et al., 1998). Noxa (Oda et al., 2000) et Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis) (Nakano and Vousden, 2001) sont souvent cités ensemble parce qu'elles sont toutes les deux régulées au niveau transcriptionnel par le gène suppresseur de tumeur p53. À l'activation de ce dernier, Noxa et Puma

sont up-régulés, ce qui a pour conséquence directe l'activation de l'apoptose au niveau mitochondrial (Shibue et al., 2003; Villunger et al., 2003). Le dernier BH3-only, Bmf (Bcl-2 modifying factor) est associé à l'organisation du cytosquelette de la cellule, et plus précisément au complexe myosine V du réseau filamenteux de l'actine. Lors de la désorganisation de ce réseau, Bmf est relarguée et active l'anoikis, un mécanisme extracellulaire d'apoptose médié par la matrice (Puthalakath et al., 2001).

	Nom	BH4	BH3	BH1	BH2	TM	AA	Localisation Subcellulaire
BH3-only	Bik	Motif Absent	Conservé ●	Motif Absent	Motif Absent	Motif Présent ●	160	RE, membrane nucléaire
	Hrk		Conservé ●				91	Mito, Cytosol
	Bim		Divergent ●			Motif Absent	198	Mito, RE, Cytosol, Noyau
	Bad		Divergent ●				168	Mito, Cytosol
	Bid		Conservé ●				195	Mito, Cytosol, Noyau
	Bmf		Divergent ●				184	Mito, Cytosol
	Noxa		Divergent ●				54	Mito
	Puma		Divergent ●				193	Mito

Figure 2 BH3-only de la famille Bcl-2

1.2. Chroniques de la mort : tous les chemins mènent à la mort

Mourir est parfaitement normal (il existe toutefois quelques exceptions). Il existe plusieurs façons d'atteindre la mort, qu'elle soit contrôlée ou non, passive ou active. Au niveau cellulaire, nous pouvons citer trois principaux programmes actifs comme la mort cellulaire programmée ou apoptose, l'autophagie et la nécroptose. On peut également mentionner la pyroptose qui est un programme de mort spécifique en réponse à des réactions d'inflammation ou encore la ferroptose. Chacun de ces programmes de mort est régulé par différents mécanismes dont certains jouent un rôle dans plusieurs programmes. C'est le cas des protéines de la famille Bcl-2 qui régulent canoniquement l'apoptose. Les Bcl-2 sont également impliquées dans la voie mTor (mechanistic target of rapamycin) qui régule l'autophagie. Dans cette partie, le mécanisme menant à l'apoptose est extensivement revu. Les mécanismes de nécrose (passifs) et nécroptose (actifs) ne sont pas abordés du fait de la faible implication des protéines Bcl-2 dans leurs régulations.

1.2.1. Prédestinée à mourir : l'apoptose

La mort cellulaire programmée ou simplement apoptose est un naturel contrebalancier nécessaire à chaque organisme. L'apoptose non seulement participe aux processus physiologiques comme le développement embryonnaire, le renouvellement cellulaire, etc. Mais l'apoptose est surtout un poison nécessaire pour éliminer les aberrations cellulaires, les processus pathologiques pour nous protéger des maladies. L'absence d'apoptose est en effet une des « hallmarks » caractéristiques principale dans la cancérogenèse décrite par Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2011). Inversement, trop d'apoptose est liée aux maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson (van der Heide and Smidt, 2013) et la maladie de Huntington (Sassone et al., 2013). Du fait de son importance dans la cellule, l'apoptose est finement régulée en particulier par les protéines Bcl-2.

L'apoptose est une cascade d'évènements successifs comprenant : 1) l'initiation, 2) la régulation et 3) l'exécution. Durant l'initiation, la cellule va recevoir un signal de stress physiologique ou pathologique, extérieur ou intérieur via ses capteurs (récepteurs par exemple). Ensuite les protéines Bcl-2 décident ou non d'initier et d'activer l'apoptose en fonction du signal reçu. Enfin si la cellule se commet à l'apoptose, les caspases interviennent et exécutent l'ordre de mort. L'apoptose peut être activée par des facteurs extérieurs à la cellule qui vont se lier aux récepteurs membranaires, ou par des signaux internes à la cellule. On distingue ainsi une voie extrinsèque et une voie intrinsèque ou mitochondriale.

1.2.1.1. Les petites mains de la mort, les caspases

Les Caspases (contraction de cystéine-aspartate protéase) sont les enzymes où convergent les voies d'activation de l'apoptose (Figure 3). Les caspases sont en réalité divisées en « initiatrices » et « exécutrices ». Les caspases initiatrices 2,8,9,10 et 12 ont pour rôle d'activer les caspases exécutrices 3,6 et 7 afin que ces dernières puissent digérer un large éventail de substrats cellulaires. Par ailleurs, il existe un autre type de caspases appelé caspases inflammatoires qui regroupe les caspases 1,4,5 et 12 responsables de l'activation des procytokines inflammatoires (Martinon and Tschopp, 2004). Les caspases possèdent une structure commune très conservée, un prodomaine N-terminal de taille variable, un domaine catalytique central et un motif conservé en C-terminal. Les protéases sont des protéases à cystéines qui peuvent cliver leurs substrats après un résidu acide aspartique et plus rarement glutamique (McIlwain et al., 2013).

Les caspases initiatrices ont un motif unique du côté N-terminal, définissant leurs capacités à former des complexes avec des protéines adaptatrices nécessaires à leurs activités. En effet, contrairement aux exécutrices qui sont activées par clivage, les initiatrices sont activées par dimérisation avec ces

protéines adaptatrices. Les caspases 2 et 9 ont un domaine de recrutement CARD (Caspase And Recruitment Domain), les caspases 8 et 10 un domaine de mort DED (Death Effector Domain). Alors que les initiatrices ont rôle important, mais plus un rôle de soutien, les exécuteurs sont-elles les vraies mains de la mort. Notamment la caspase 3 responsable de la majorité des digestions de substrats cellulaires (Walsh et al., 2008). Les exécuteurs n'ont pas de domaine de recrutement et sont activées par protéolyse des initiatrices (Pop and Salvesen, 2009). Plus de 1500 substrats cellulaires sont connus des caspases (Julien and Wells, 2017). De plus, les caspases exécuteurs peuvent servir d'amplificatrices de la cascade apoptotique en clivant les caspases en amont également (Luthi and Martin, 2007).

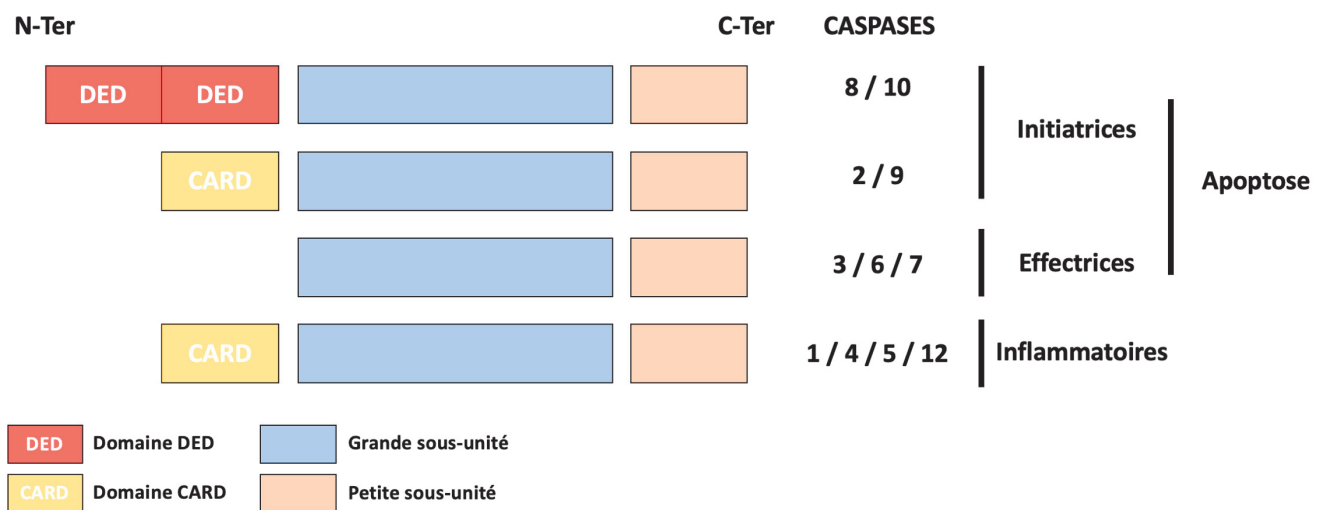


Figure 3 Caspases, les petites mains de la mort

1.2.1.2. La voie extrinsèque de l'apoptose

La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort est activée pour éliminer les aberrations du système immunitaire comme la prolifération non contrôlée des lymphocytes ou les réactions auto-immunes en induisant l'apoptose (Figure 4). Comme le nom l'indique, la voie extrinsèque est déclenchée par un « signal de mort » extérieur à la cellule qui est transmis par un récepteur transmembranaire en signal de réponse, à l'intérieur de la cellule. Le récepteur transmembranaire est appelé récepteur de mort (death receptor) (Ashkenazi and Dixit, 1998). Ces récepteurs font partie de la superfamille des tumor necrosis factor ou TNF (Locksley et al., 2001). Dans cette famille, on peut citer les récepteurs TNF (TNF-R1) qui peuvent lier le TNF- α , le récepteur FAS capable de lier le FAS ligand (FAS-L / CD95 / APO-1) et les récepteurs TRAIL (TNF-related apoptosis, TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5) capable de lier le ligand TRAIL (APO-2L) (Elmore, 2007; Hymowitz et al., 1999).

Les récepteurs TNF ont une structure commune, une partie extracellulaire riche en cystéines CRD (Cysteine Rich Domain) responsable de la liaison avec le ligand, une partie transmembranaire et une

partie intracellulaire nommée Death Domain ou DD d'environ 80 acides aminés. Les modèles de liaison récepteur/ligand les mieux caractérisés de la voie extrinsèque sont TNF-R1/TNF- α et FAS/FAS-L.

Suite à la liaison du ligand sur le CRD du récepteur, des protéines adaptatrices sont recrutées. Ainsi lorsque FAS-L se lie au récepteur FAS, la protéine adaptatrice FADD (Fas-associated death domain) est recrutée au DD. De même lorsqu'un ligand TNF se lie au récepteur TNF une autre protéine adaptatrice TRADD (tumor necrosis factor receptor type-1 associated death domain) est recrutée. De manière simple, la dimérisation des DD avec les protéines FADD permettent le recrutement de pro-caspases 8 et 10 via leurs domaines DED. Le complexe protéique formé alors est appelé le DISC ou Death Inducing Signaling Complex. Le DISC est capable d'auto-activation des pro-caspase 8 et 10 (Kischkel et al., 1995). Le processus d'apoptose est alors enclenché, les caspases 8 et 10 actives sont capable d'aller activer des caspases exécutrices en aval telles que la caspase 3/7, ou Bid en le clivant pour donner sa forme tronquée tBid qui jouera à son tour sur l'activation de l'apoptose médiée par Bax/Bak (Elmore, 2007). Il est intéressant de noter qu'une protéine nommée c-FLIP est capable d'inhiber l'apoptose médiée par les récepteurs de mort en se liant à FADD et à la caspase 8 (Scaffidi et al., 1999).

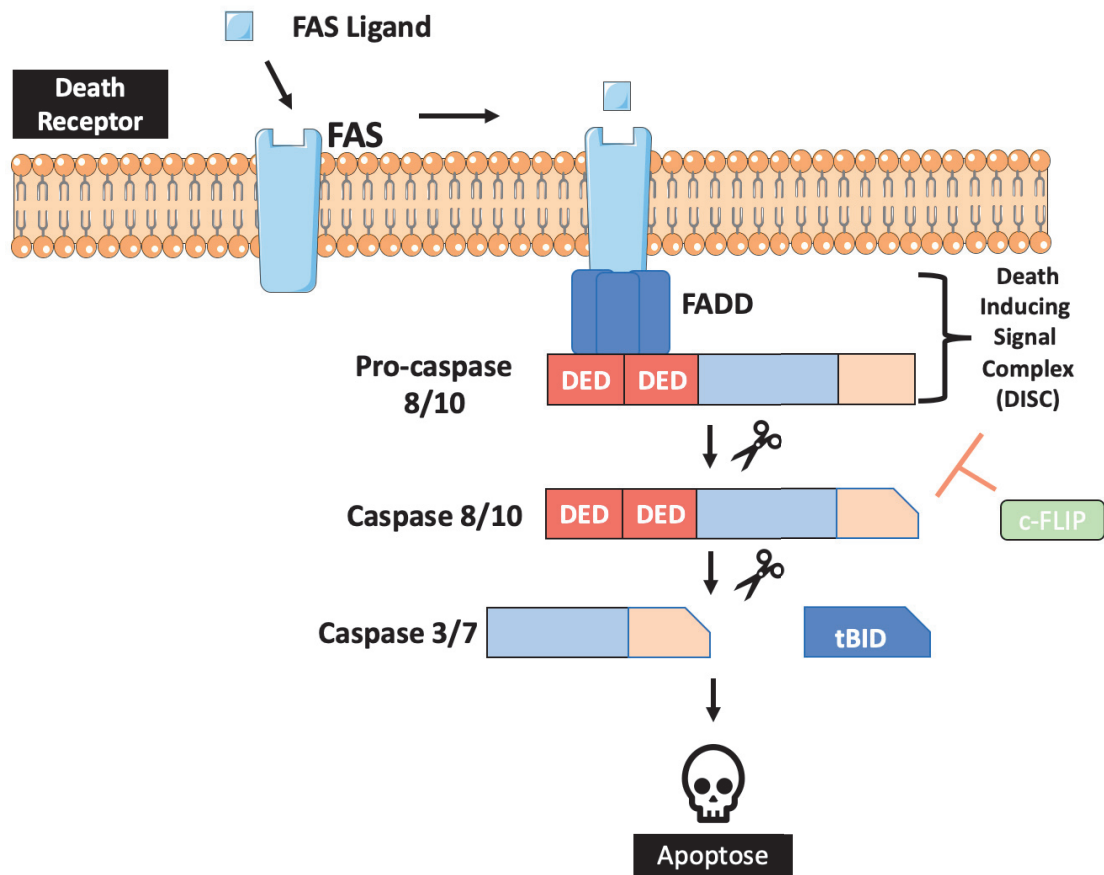


Figure 4 La voie extrinsèque de l'apoptose

1.2.1.3. *La voie intrinsèque : danse de la mort des mitochondries*

La voie intrinsèque de l'apoptose est activée par les signaux d'alarme internes à la cellule (excluant les signaux associés aux récepteurs) comme l'altération de l'ADN, les radiations, toxines, drogues, la survie dans des conditions pauvres en nutriments, etc. Après activation de la voie et une cascade d'évènements à la mitochondrie, cette dernière implose, libérant une quantité massive de protéines dans le cytosol pour engendrer l'apoptose (Figure 5). Il existe deux mécanismes principaux amenant à l'implosion de la mitochondrie, la première est la formation de pores médiée par Bax/Bak dans la membrane externe de la mitochondrie (Tait and Green, 2010). Le deuxième mécanisme implique l'ouverture du pore mPTP (mitochondrial permeability transition pore) médié par le niveau de calcium intracellulaire (Baumgartner et al., 2009). Dans les deux cas, il y a la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (ou MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilisation) et relargage des protéines contenues dans l'espace intramitochondrial (ou IMS, inter mitochondrial space) dans le cytosol, des protéines dont des facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome c, SMAC/Diablo (Second mitochondria-derived activator of caspase / Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding), Omi/HtrA2, AIF (apoptotic-inducing factor) ou encore l'Endonucléase G (EndoG) (Figure 5).

Le cytochrome c est le principal facteur pro-apoptotique et une caractéristique clé de l'apoptose. Le relargage de ce dernier est considéré comme un point de non-retour dans la cascade apoptotique, même si des études plus récentes nuancent sur ce point (Tait and Green, 2010). En conditions physiologiques, le cytochrome c est un élément faisant partie la chaîne respiratoire mitochondriale dans l'IMS. La membrane externe de la mitochondrie est imperméable au cytochrome c et les grosses protéines de l'IMS comme les autres facteurs pro-apoptotiques. C'est pourquoi une perforation physique est nécessaire pour libérer le cytochrome c et exécuter les mécanismes d'apoptose. Par ailleurs, les cellules déficientes en cytochrome c ne sont plus capables d'apoptose (Matapurkar and Lazebnik, 2006) soulignant l'importance de ce facteur dans ce mécanisme de mort. Une fois dans le cytosol, le cytochrome c se lie à Apaf-1 (apoptosis protease factor-1) formant une roue à 7 bras, lui-même se liant ensuite aux procaspases 9 (formes inactivées) via le domaine homologue CARD. Ensemble ils forment une « roue de la mort » ou apoptosome. L'activation de la caspase 9 active à son tour les caspases 3 et 7 en aval de la cascade. Le processus complet provoque la protéolyse et la mort cellulaire (Riedl and Salvesen, 2007). Les protéines Bcl-2 contrôlent le relargage du cytochrome c en régulant le processus de perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (Yang et al., 1997).

En plus du cytochrome c, d'autres facteurs pro-apoptotiques sont libérés du IMS dans le cytosol. Dans le cytosol, le facteur pro-apoptotique AIF a la capacité d'activer la caspase 3 et d'induire une fragmentation de l'ADN (Susin et al., 1999). Néanmoins, le processus de fragmentation requiert

d'autres partenaires comme l'Endonucléase G ou EndoG présente également dans l'IMS (Wang et al., 2002). Les autres facteurs apoptotiques sont SMAC/Diablo et Omi / HtrA2.

Les fonctions de SMAC/Diablo restent à ce jour en grande partie non élucidées, mais son niveau d'expression semble corréluer avec la progression tumorale. Récemment des Smac-mimétiques ont été développés pour activer l'apoptose dans les cancers hématopoïétiques et solides. Ils sont utilisés comme antagoniste direct contre les protéines de la famille IAP (Inhibitor of Apoptosis) avec plus ou moins de succès (Morrish et al., 2020). Omi ou HtrA2 est également un antagoniste des IAPs, mais avec un mécanisme d'action différent que SMAC/Diablo. Omi est une protéase à sérine dont l'activité catalytique est active dans le cytosol pour exercer ses fonctions pro-apoptotiques (Cilenti et al., 2005). A ce jour 8 IAPs sont répertoriés et ont montré des capacités d'inhibition sur les caspases initiatrices et exécutrices (Fulda and Vucic, 2012).

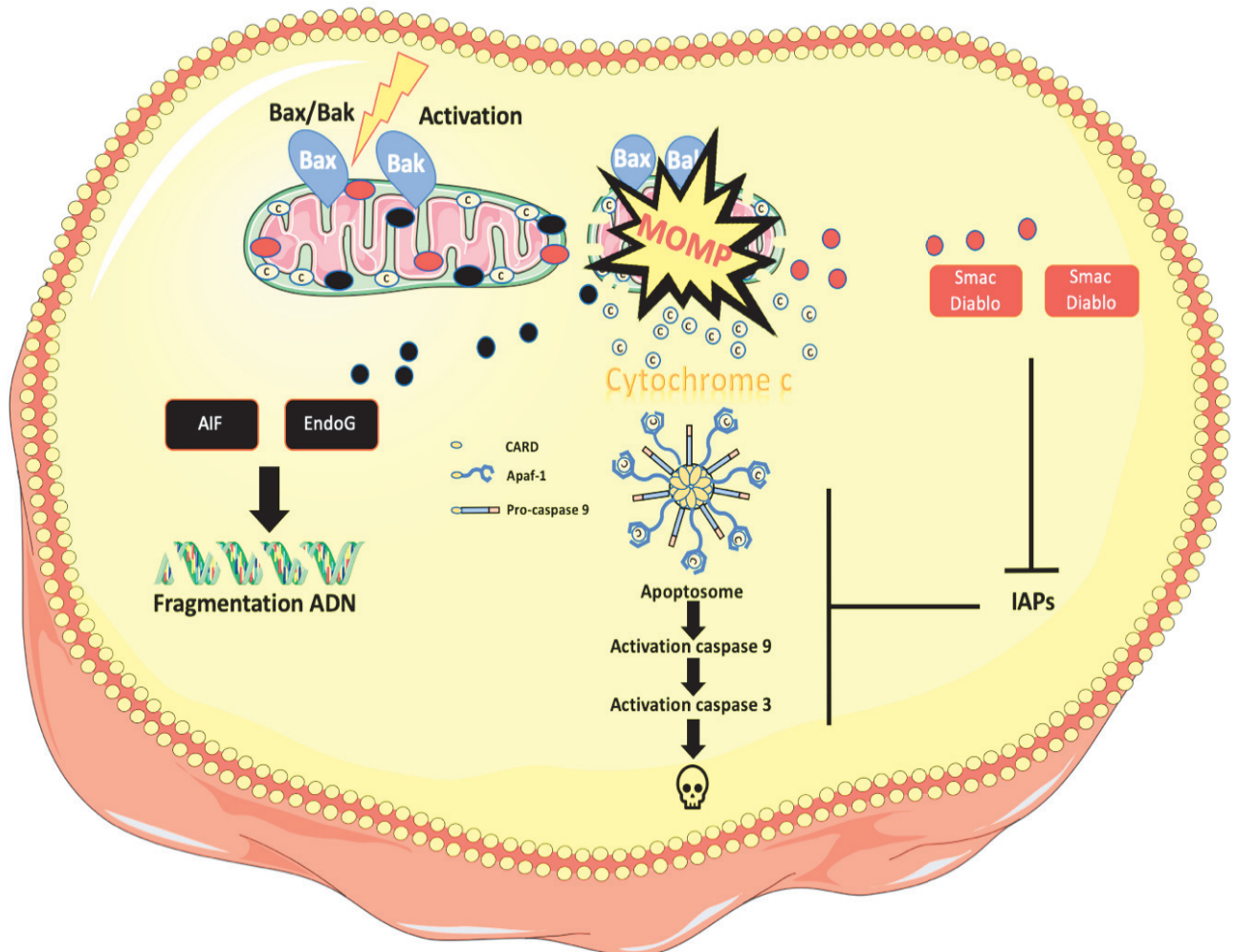


Figure 5 La mort mitochondriale dépendante

1.2.1.3.1. Perméabilisation de la mitochondrie médiée par Bax et Bak

En conditions normales, Bax et Bak sont inactivées par les Bcl-2 anti-apoptotiques. En effet, l'interaction entre les poches hydrophobes de BH3 des anti et pro-apoptotiques interdit à ces derniers d'accomplir leurs rôles (Sattler et al., 1997). Cependant, lors de l'initiation de l'apoptose, l'inhibition sur Bax et Bak est levée pour permettre à ces dernières d'être relocalisées à la mitochondrie et effectuer la perméabilisation membranaire. Par ailleurs, il est à noter que l'absence de Bax ou Bak entraîne nécessairement un dysfonctionnement de l'apoptose mitochondriale (Lindsten et al., 2000; Wei et al., 2001). Dans cette partie, le modèle unifié d'activation de Bax/Bak proposé en 2013 sera abordé. Ce modèle décrit l'équilibre entre la forme liée/libre de Bax/Bak régulé par les anti-apoptotiques Bcl-2, et l'activation de Bax/Bak par les BH3-only (Llambi et al., 2011; Shamas-Din et al., 2013). De plus, nous allons aborder un nouveau modèle émergent décrit par Huang et al, sur la permissivité de l'environnement entrainant une activation spontanée de Bax/Bak (Huang et al., 2019). À ce jour, l'activation de Bax/Bak fait encore débat dans la communauté scientifique.

1.2.1.3.1.1. Bax / Bak modèle d'activation

Comme mentionné, Bax/Bak activé équivaut à la fraction libre Bax/Bak transloquée à la mitochondrie pour effectuer la MOMP (Todt et al., 2015). Le modèle unifié de Llambi et al, sépare l'activation/inhibition de Bax/Bak en deux modes, tous deux ayant les anti-apoptotiques Bcl-2 en facteur clé central. Le premier mode est une activation/inhibition dépendant de l'interaction des BH3-only avec les anti-apoptotiques. Le deuxième mode est une inhibition directe des anti-apoptotiques sur Bax/Bak. Même si les deux modes coexistent, le modèle unifié insiste sur l'importance du deuxième mode. Dans l'ensemble, c'est l'équilibre entre les différents partenaires qui décide de l'activation ou de l'inhibition du système (Llambi et al., 2011).

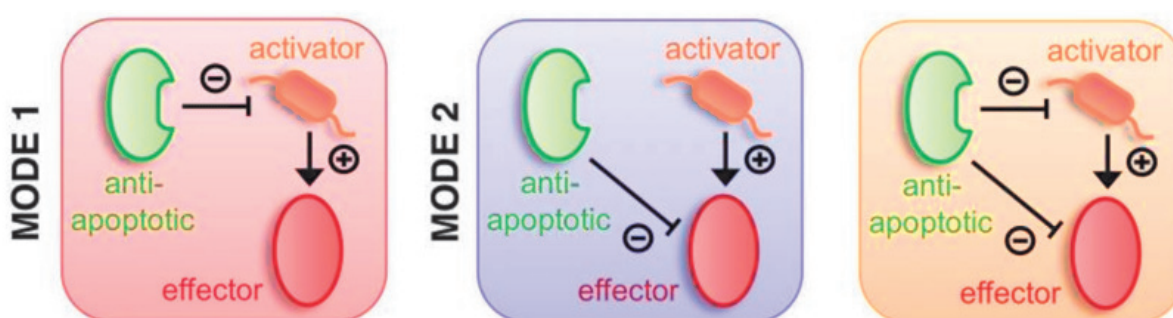


Figure 6 Modèle unifié de Llambi des interactions des protéines Bcl-2 à la mitochondrie (Llambi et al., 2011)

Concernant les modes, les BH3-only activateurs sont représentés par Bid (plus particulièrement sa forme activée tBid), Bim et Puma. Les autres BH3-only Bad, Bik, Bfm, Noxa, Hrk sont des

sensibilisateurs. Dans ce contexte, les BH3-only activateurs peuvent activer directement Bax/Bak et les anti-apoptotiques peuvent inhiber les BH3-only activateurs et/ou Bax/Bak (Shamas-Din et al., 2013). Les BH3-only sensibilisateurs neutralisent directement les anti-apoptotiques Bcl-2, les empêchant d'inactiver Bax/Bak. Et pour ajouter un niveau de complexité, chaque BH3-only sensibilisateur a des sélectivités particulières pour chaque anti-apoptotique (Figure 7) (Chen et al., 2005).

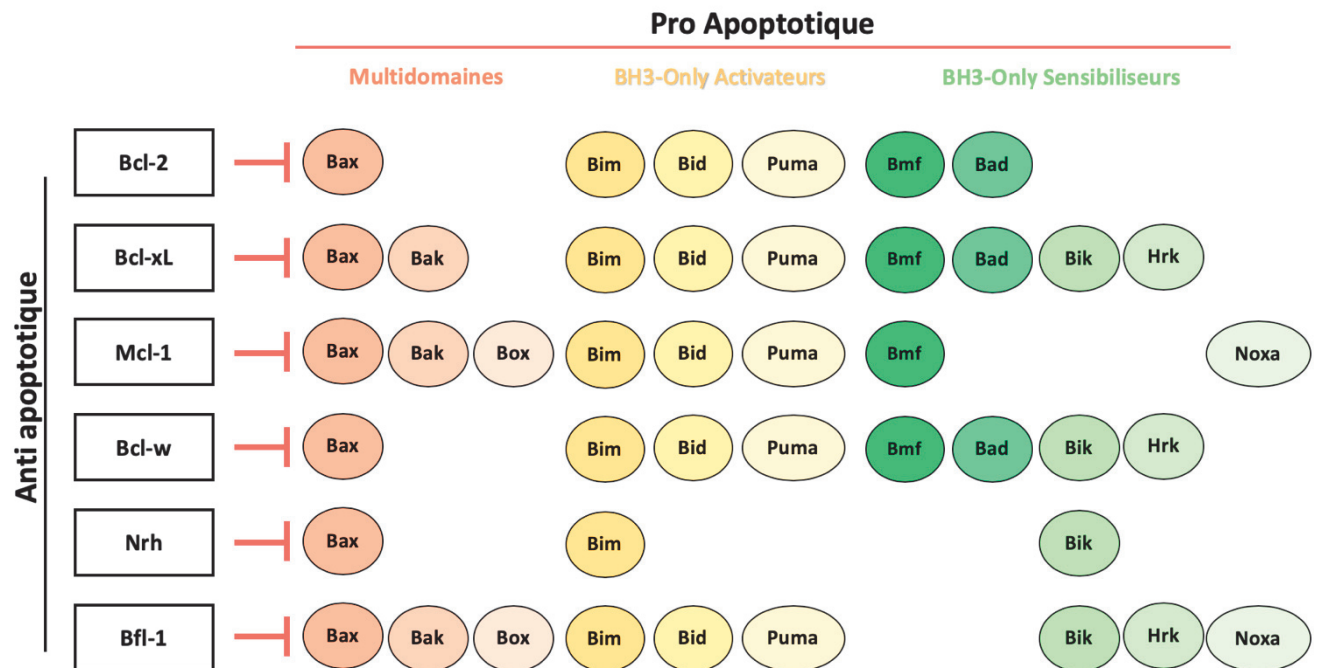


Figure 7 Interaction entre anti/pro-apoptotiques Bcl-2

Comme mentionné, un nouveau modèle d'activation Bax/Bak a récemment émergé. Le modèle « membrane permissive » décrit un environnement préférentiel à l'activation spontanée de Bax/Bak à la membrane mitochondriale. Cet environnement permissif est dû à l'inhibition préférentielle des BH3-Only sur les anti-apoptotiques Bcl-2 présents sur la membrane. Plus particulièrement Bcl-xL et Mcl-1 (Huang et al., 2019). Les deux modèles se complètent mutuellement et peuvent coexister dans la cellule. Le résultat de l'activation de Bax/Bak mène à la formation de pores et à la perméabilisation de la mitochondrie.

1.2.1.3.1.2. Bax / Bak activation

Sous l'effet des facteurs activateurs, Bax et Bak changent de conformation afin d'holo-oligomériser, voir dans certain cas hétéro-oligomériser. Une première dimérisation est réalisée entre le domaine BH3 et la poche hydrophobe formée par l'hélice alpha 4-5 du BH1. De manière symétrique, les dimères forment des multimères de plus grande taille via leurs hélices α -6 (Dewson et al., 2012). Cette

oligomérisation est nécessaire à l'activation de la perméabilisation membranaire mitochondriale puisqu'il en résulte des formations de pores (Dewson et al., 2008). Si à ce jour il est admis que l'oligomérisation de Bax/Bak est nécessaire pour la formation de pores, la question subsiste encore sur la structure même du pore ainsi formé. Est-ce un pore totalement protéique formé d'oligomères ou est-ce un pore lipidique. La réponse est peut-être entre les deux où les deux mécanismes protéique (Zhang et al., 2017) et lipidique (Schafer et al., 2009) se complètent mutuellement (Uren et al., 2017; Westphal et al., 2011).

1.2.1.3.2. Perméabilisation de la mitochondrie médiée par le calcium

Les mitochondries sont des organelles participant à la régulation du calcium intracellulaire. En conditions physiologiques la concentration calcique intramitochondriale est proche de celle du cytosol. Il peut arriver que la concentration du calcium cytosolique augmente, et dans ce cas la mitochondrie va participer à sa régulation en transportant ce surplus de calcium dans son espace inter membranaire (EIM). Cette augmentation intramitochondriale peut être bénéfique puisque cela va augmenter l'activité des enzymes mitochondriales, participer à la production d'ATP, etc. Cependant un excès peut conduire à l'implosion de la mitochondrie suite à la surcharge calcique (Bonneau et al., 2013). En effet Bax et Bak ne sont pas les seuls facteurs à pouvoir perméabiliser la mitochondrie. L'entrée du calcium s'effectue par le canal VDAC (voltage dependent anion channel) à la membrane externe mitochondriale (MEM), puis via le canal MCU (mitochondrial calcium uniporter) situé à la membrane interne mitochondriale (MIM). La surcharge calcique peut provoquer l'ouverture du PTP (permeability transition pore). Le PTP est en réalité un complexe protéique formant un canal permettant la diffusion de solutés dont le calcium à travers la membrane mitochondriale (Bernardi, 2013). Sa composition moléculaire fait encore l'objet de débat. Mais de façon générale, il est admis que le PTP serait composé de protéines Cyclophilin D (matrice), ANT (adenine nucleotide transporter) et du canal VDAC, respectivement au MIM pour les deux premières et au MEM pour le dernier (Lemasters et al., 2009). Plus récemment il a été démontré que les fractions FO et F1 de l'ATP synthase, et plus particulièrement le dimère est également un élément constitutif du PTP (Giorgio et al., 2013). Par ailleurs, une des hypothèses du pore PTP est que la sous-unité c du FO forme un anneau calcium dépendant avec le domaine extrinsèque de F1 et le cyclophilin D. Ainsi en présence de surcharge calcique dans la matrice mitochondriale, la sous-unité c s'élargit ouvrant ainsi le PTP. Cependant le rôle de la cyclophilin D dans la formation de l'anneau reste encore mal connu (Alavian et al., 2014). L'ouverture du PTP induit un gonflement par osmose pour rééquilibrer les concentrations de la matrice mitochondriale. Jusqu'à un point de rupture la mitochondrie implose, largue massivement des facteurs pro-apoptotiques dans le

cytosol, et la cellule déclenche alors la mort cellulaire. C'est la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale ou MOMP (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation) (1-Figure 8).

Il est intéressant de noter que les protéines Bcl-2 sont également impliquées dans la régulation de cette perméabilisation médiée par le calcium puisqu'ils participent à la régulation de l'homéostasie calcique via les interactions avec les canaux calciques au RE. La régulation de l'homéostasie par les Bcl-2 sera développée tout au long de la partie 2 sur le calcium.

En parallèle des mécanismes que l'on vient d'évoquer, il existe un mécanisme de mort médiée par le calcium, mais indépendante de la mitochondrie. L'élévation du calcium intracellulaire peut activer une famille de protéases : les calpaïnes (2-Figure 8). Les calpaïnes sont des protéases à cystéines non lysosomales dont l'activation est dépendante du niveau de calcium (Blanchard et al., 1997). Les deux domaines centraux de la protéase inactive fusionnent en fixant le calcium pour former une protéase fonctionnelle (Hanna et al., 2008). À ce jour, chez l'homme 15 gènes encodant les calpaïnes ont été décrits. Cette famille a ensuite été divisée en sous-famille en fonction de l'homogénéité des séquences et structures (Sorimachi et al., 2011; Suzuki et al., 1995). Les deux représentants majeurs μ et m -calpaïne sont activés respectivement entre 200-1000 μ M Ca^{2+} et 5-50 μ M Ca^{2+} (Khorchid and Ikura, 2002). Les protéines Bcl-2 sont des cibles des calpaïnes. *In vitro* lors du retour de perfusion après une ischémie cardiovasculaire amenant un rapide influx de calcium, Bid est clivé par la μ -calpaïne en tBid provoquant alors l'initiation de l'apoptose avec libération de cytochrome c (Chen et al., 2001). Bcl-xL est inactivée par la m -calpaïne et son site de clivage est très proche de celui du clivage par la caspase-1. Le clivage de Bcl-xL la convertit en protéine pro-apoptotique (Nakagawa and Yuan, 2000). Le clivage de Bfl-1 par les calpaïnes produit également une version pro-apoptotique de la protéine d'origine (Valero et al., 2012). Bax est clivée par les calpaïnes du côté N-terminal de la protéine, potentialisant ainsi son activité pro-apoptotique (Gao and Dou, 2001; Wood et al., 1998). En somme l'activation des calpaïnes induit une initiation de l'apoptose mitochondriale dépendante (perméabilisation membranaire, libération de cytochrome c, etc.).

Et enfin un dernier point sur la mort médiée par le calcium est l'implication d'une sérine-thréonine phosphatase calcium dépendant : la PP2B (protein phosphatase 2B) ou calcineurine (3-Figure 8). Elle est activée lorsque la concentration cytosolique du calcium est maintenue à un niveau élevée suffisamment longtemps. PP2B peut alors déphosphoryler Bad, augmenter sa translocation à la mitochondrie, favoriser son hétérodimérisation avec Bcl-xL et initier l'apoptose (Wang et al., 1999). La phosphorylation de Bad est importante pour l'inactivation de sa fonction pro-apoptotique (détail en point 1.3.4).

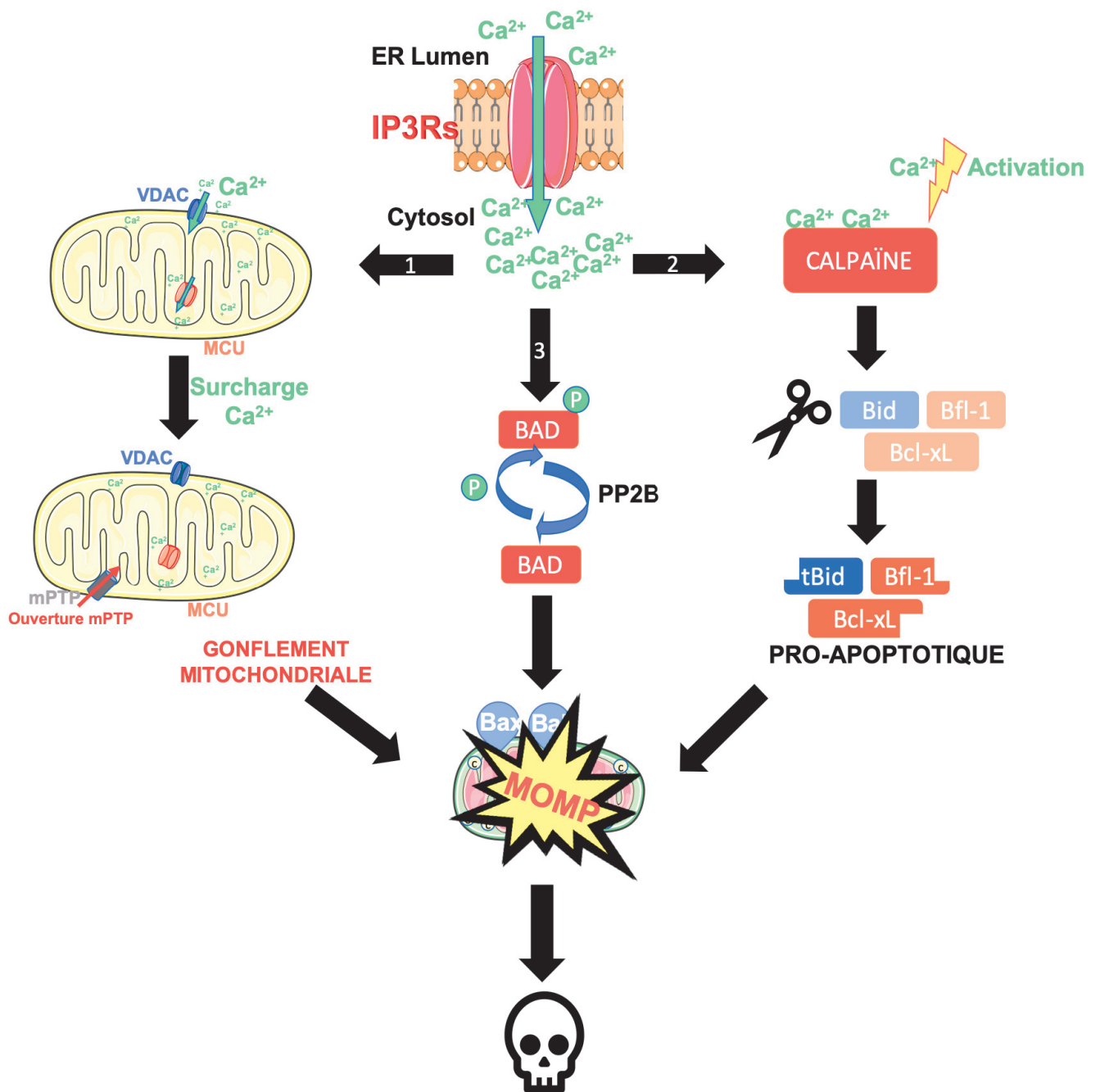


Figure 8 Perméabilisation médiée par le Calcium

1.2.2. Autophagie : recycler pour survivre ou mourir

L'autophagie, du grec « auto » soi-même et « phagos » manger, est un mécanisme physiologique de recyclage d'éléments cellulaires. En réponse au stress, en particulier la carence en nutriments, les cellules utilisent l'autophagie pour recycler les éléments cellulaires (organites, protéines, macromolécules,...) altérés ou endommagés pour en recréer de nouveaux. Ces éléments sont séquestrés dans des vésicules (autophagosomes) vers les lysosomes pour être dégradés suite à la fusion des deux pour former l'autolysosome.

Le terme autophagie regroupe plusieurs processus dont la macroautophagie, l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes et la microautophagie. Dans notre manuscrit, le terme autophagie se réfère en premier lieu à la macroautophagie. Nous discuterons dans un premier temps du processus général de l'autophagie. Puis dans un second temps de l'autophagie dans le cancer et de l'implication des protéines Bcl-2 dans ce processus.

1.2.2.1. Mécanisme moléculaire

Le processus d'autophagie peut être simplifié en quelques étapes (Figure 9). La première est la formation du phagophore, une double membrane phospholipidique, principalement à la membrane réticulaire mais peut être aussi d'origine mitochondriale ou plasmique. Cette étape est contrôlée par le complexe protéique Beclin-1 ou Atg6 (Autophagy related gene 6) et VPS34 (Vesicular protein sorting 34). VPS34 permet la production de phosphatidylinositol triphosphate (PIP₃) permettant l'élongation du phagophore. D'autres complexes protéiques participent également au processus comme l'UVRAG, Atg14L, ou le WIPI1/2. Après la formation initiale du phagophore, s'en suit une étape d'élongation médiée par deux systèmes de conjugaison analogues aux systèmes d'ubiquitination des protéines. Le premier est le système formé par le complexe Atg5-12-16 recruté au phagophore par le WIPI2. Le complexe Atg5-12-16 permet à son tour de recruter le second système nommé LC3 qui résulte de la conjugaison de la protéine Atg8 avec la phosphatidyléthanolamine (PE). LC3 existe sous deux formes, LC3-I cytosolique et LC3-II conjugué à la PE. LC3-II peut s'incorporer dans la membrane du pré-autophagosome et participe à la maturation de l'autophagosome. LC3 constitue entre autre un marqueur clé de l'autophagie. La dernière étape est la séquestration d'une cible (spécifique ou non), un renfermement de l'autophagosome, puis une maturation finale et fusion avec le système lysosomal (Glick et al., 2010; Parzych and Klionsky, 2014).

Régulation, déclenchement et conséquences cellulaires

L'autophagie peut être stimulé en réponse à différents types de signaux de stress comme l'hypoxie ou la carence en nutriments. La kinase PKA et surtout la protéine mTOR joue un rôle prépondérant dans la régulation et l'activation de l'autophagie. Les deux systèmes régulent négativement l'autophagie. Les cellules ayant besoin d'ATP pour fonctionner, la carence en nutriments peut induire une baisse du niveau d'ATP et une augmentation de l'ADP (adénosine diphosphate) puis de l'AMP (adénosine monophosphate). En amont de mTOR, la kinase adénosine 5'monophosphate (AMPK), senseur de l'AMP, est activée lorsque le niveau d'AMP dépasse un seuil critique. L'activation d'AMPK conduit à une inhibition de l'activité de RHEB (Ras homolog enriched in brain) par Tsc1/Tsc2. RHEB est une GTPase dont l'activité est nécessaire au fonctionnement de mTOR. Il en résulte alors une inhibition de

mTOR qui ne peut plus alors réprimer l'induction de l'autophagie. En condition normale, l'activité de l'AMPK est réprimée, mTOR est activée par RHEB qui ensuite inactive la kinase ULK1/2. La kinase ULK1/2 est un élément clé de l'induction de l'autophagie puisqu'elle active à la fois Beclin-1 et VSP34 lors de la formation du phagophore (Yuan et al., 2013). En cas de rupture d'apports énergétiques c'est en s'autodigérant que la cellule gagne de la survie. Cependant si ce phénomène est excessif et non résolu, les autolysosomes ainsi formés sont trop nombreux et la cellule se retrouve débordée. Elle finit par mourir suite à la destruction massive de ces constituants. On distingue alors les deux facettes de l'autophagie, l'une pour la survie et l'adaptabilité, l'autre pour la mort cellulaire (Avalos et al., 2014). L'autophagie est un carrefour où la cellule est entre la survie et la mort cellulaire.

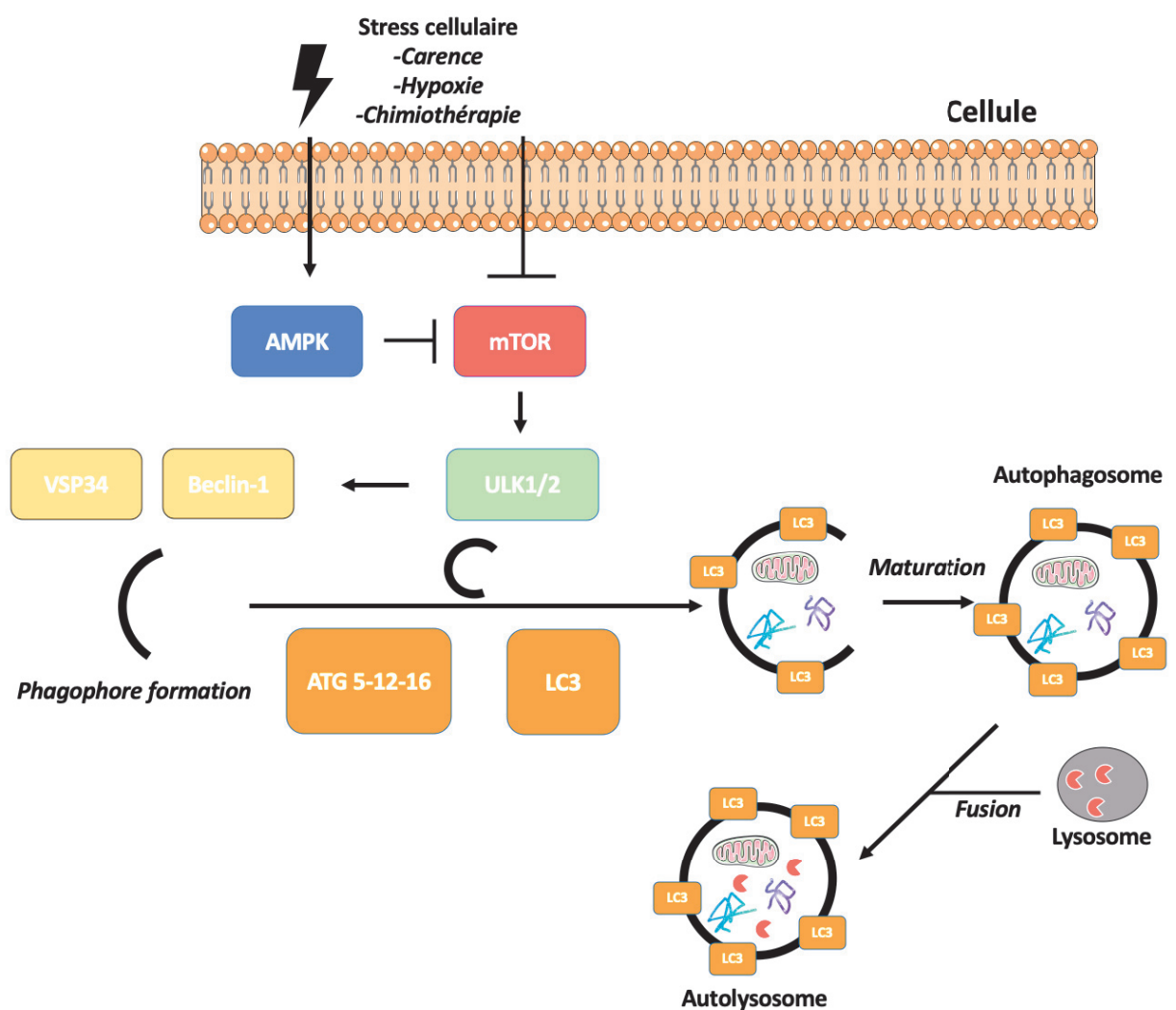


Figure 9 Schéma simple de l'autophagie et la formation de l'autolysosome

1.2.2.2. *Autophagie dans le cancer*

Les cellules tumorales sont soumises en permanence à de nombreux stress (hypoxie, carence, stress oxydatif, etc). Dans le cancer, l'autophagie a montré deux rôles distincts : l'un suppresseur de tumeur et l'autre en tant que promoteur tumoral (Yun and Lee, 2018). On admet que l'autophagie agit en deux temps. Dans les étapes précoces, l'autophagie est suppresseur de tumeur tandis que dans les étapes plus tardives l'autophagie agit comme un anti-apoptotique en donnant aux cellules cancéreuses un avantage de survie en milieu pauvre notamment (Avalos et al., 2014).

Autophagie, suppresseur de tumeur

De manière très intéressante les gènes clés de l'autophagie codant l'expression de Beclin-1 sont perdus dans 40 à 75% des cancers de la prostate, du sein et de l'ovaire, démontrant ainsi la facette antitumorale de l'autophagie (Aita et al., 1999; Choi et al., 2013). La perte de Beclin-1 suggère donc un rôle antitumoral de ce dernier. Cette hypothèse est observée dans les modèles murins ayant une délétion de Beclin-1. Les chercheurs ont observés une augmentation de la prolifération cellulaire combinée à une baisse de l'autophagie (Qu et al., 2003). Dans d'autres modèles murins, la délétion des protéines Atg5 et Atg7 génèrent des hépatocarcinomes suite à un stress oxydatif (Takamura et al., 2011). De plus la génération excessive de ROS combinée à une perte d'autophagie promeut l'oncogenèse, montrant une fois de plus le rôle antitumoral de l'autophagie (Filomeni et al., 2015).

Autophagie, promoteur tumoral

Plusieurs études ont montré que l'autophagie aide les cellules cancéreuses à survivre en environnement défavorable. La délétion de Beclin-1 provoque par exemple la mort cellulaire et une sensibilité augmentée au stress métabolique dans les cellules du rein de souris (BMK) (Degenhardt et al., 2006). L'expression de l'autophagie est retrouvée up-réglée dans les cancers RAS dépendants (cancer pancréas par exemple (Yang et al., 2011)). Dans ces derniers l'autophagie est requise pour la transformation oncogénique et l'invasion métastatique (Guo et al., 2011; Lock et al., 2014). Dans les lignées de carcinomes pulmonaires, la kinase LKB1 induit l'autophagie et promeut la croissance cellulaire. De plus les patients atteints de cancer du poumon exprimant de forts taux de LKB1 ont une survie diminuée (Liu et al., 2018).

1.2.2.3. *Autophagie et Bcl-2*

Initialement, la protéine Beclin-1 a été décrite et isolée comme étant un partenaire de Bcl-2 (Liang et al., 1999). Avec un domaine BH3, Beclin-1 peut se lier avec la poche hydrophobe des Bcl-2 par le même

mécanisme que l'interaction des pro/anti-apoptotiques Bcl-2. On avait pensé que Beclin-1 serait un pro-apoptotique comme les BH3-Only. Il a été montré que Bcl-2 et Bcl-xL inhibent Beclin-1 (Patingre et al., 2005). Plus récemment, Mcl-1 et Bcl2L10 ont également montré une régulation sur Beclin-1 (Elgendy et al., 2014; He et al., 2019). De manière intéressante, l'inhibition de Bcl-2 sur Beclin-1 ne se porte que quand Bcl-2 est adressée au RE, mais pas à la mitochondrie (Patingre et al., 2005). Ce point de spécialisation du rôle en fonction de la localisation subcellulaire peut-être un point important à éclairer. De manière globale, l'inhibition de Beclin-1 par les anti-apoptotiques Bcl-2 engendre une inhibition de la voie autophagique (Avalos et al., 2014). De fait, l'activité oncogénique des Bcl-2, en plus d'inhiber l'apoptose, peut également passer par la voie autophagique.

Par ailleurs il est intéressant de noter une régulation indirecte des Bcl-2 sur l'autophagie via leurs interactions avec les canaux calciques sur le réticulum endoplasmique. La régulation des Bcl-2 sur le calcium sera abordée plus en détail en partie 2. Les protéines de la famille Bcl-2 comme Bcl-2, Bcl-xL et Bcl2L10 ont montré une régulation négative sur les canaux calciques empêchant une élévation du niveau calcium cytosolique. Or l'élévation du calcium cytosolique peut activer la kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendantes-beta (CaMKII- β) qui à son tour active la kinase AMPK et la cascade autophagique (Figure 9) (Høyer-Hansen et al., 2007). L'activation de l'autophagie par le calcium est contrôlée en partie par la protéine WIPI1 lors de l'étape de formation du autophagosome (Groteimer et al., 2010).

1.3. Juges de paix du cycle de la vie : fonctions physiologiques des protéines

Bcl-2

Les protéines Bcl-2 sont quasi-omniprésentes dans la cellule, on peut les retrouver dans tous les compartiments, noyau, mitochondrie, RE, appareil de Golgi, lysosomes... Nous allons examiner en détail dans cette partie les fonctions physiologiques des protéines Bcl-2, notamment les fonctions liées à la localisation subcellulaire des Bcl-2. Nous allons voir ici que la localisation a un rôle essentiel dans la détermination des fonctions des Bcl-2.

1.3.1. Localisation subcellulaire

Les multi-domaines anti et pro-apoptotiques Bcl-2 possèdent un domaine transmembranaire et donc sont capables de s'ancrer dans les membranes cellulaires. Initialement, il a été montré que Bcl-2 était localisée à la mitochondrie et que cette localisation était liée à sa fonction anti-apoptotique (Hockenbery et al., 1990). Rapidement, d'autres localisations subcellulaires sont mises en évidence telles que le RE ou encore la membrane nucléaire (Akao et al., 1994). Concernant Bcl-xL, la protéine est omniprésente dans la cellule. On la retrouve dans le cytosol, à la mitochondrie, au RE et au noyau

(Mizuguchi et al., 1996). On peut également retrouver Bcl-xL dans la membrane interne mitochondriale des neurones (Alavian et al., 2011). Mcl-1 quant à elle est également retrouvée au niveau du RE, de la mitochondrie et de la membrane nucléaire (Popgeorgiev et al., 2018). Bcl-w est retrouvée principalement dans la fraction mitochondriale, mais aussi dans le cytosol et au noyau (O'Reilly et al., 2001). Bfl-1 est, elle aussi, majoritairement à la mitochondrie, mais on la retrouve aussi bien dans le cytosol, sur la membrane nucléaire, dans le noyau, mais pas au RE (Brien et al., 2009; Popgeorgiev et al., 2018). La localisation de Bcl2L10/ Nrh a initialement été décrite à la mitochondrie et à la membrane nucléaire (Aouacheria et al., 2001; Lin et al., 2004). Cependant une nouvelle étude de l'équipe a décrit une localisation préférentiellement au réticulum pour y exercer sa fonction anti-apoptotique (Nougarede et al., 2018).

Bax et Bak comme mentionné précédemment sont retrouvées à la mitochondrie pour assurer son rôle principal dans l'apoptose. Mais Bax et Bak sont également retrouvées au RE (Scorrano et al., 2003). Des études plus récentes ont montré aussi que Bak était présente au niveau des peroxysomes (Hosoi et al., 2017). Comme mentionné, contrairement à Bak, Bax a une forme cytosolique lorsqu'elle est inactivée, c'est peut-être la raison pour laquelle Bax peut être retrouvée au niveau du Golgi (Dumitru et al., 2012) et des lysosomes (Guan et al., 2015) pour activer sa fonction pro-apoptotique. Il est cependant à nuancer que Bak peut avoir une fraction cytosolique, mais que cette dernière soit insuffisante pour être détectée (Todt et al., 2015). La localisation subcellulaire de Bok est quant à elle majoritairement au RE associé à l'appareil de Golgi via son domaine TM et une fraction mitochondriale plus classique. Il a été décrit que Bok régulait une forme de communication entre le RE et le Golgi, et lorsque Bok est surexprimé il induisait la fragmentation du Golgi et du RE (Echeverry et al., 2013).

Les BH3-only comme mentionné sont dépourvus de domaine transmembranaire et se retrouve donc majoritairement dans le cytosol. Sauf au moment de l'apoptose où les protéines sont relocalisées. Ainsi, Bid et Bad s'insèrent dans la membrane externe mitochondriale (Gross et al., 1999; Zha et al., 1997). Bim et Bmf sont toutes deux reliées au cytosquelette de la cellule, on les retrouve respectivement au réseau microtubulaire et dynéine pour Bim, et au réseau actine / myosine V pour Bmf (Puthalakath et al., 2001). Il est par ailleurs intéressant de noter que Bim est également présente au niveau réticulaire où elle peut aider à l'induction de l'apoptose mitochondriale (Kim et al., 2009). Puma et Noxa sont des protéines mitochondriales (Nakano and Vousden, 2001; Oda et al., 2000), Hrk et Bik quant à elles sont localisées au RE et à la mitochondrie (Boyd et al., 1995; Inohara et al., 1997)

Comme nous avons pu le constater, les protéines Bcl-2 sont rarement mono-compartmentale, elles possèdent différentes localisations subcellulaires en fonction de l'état cellulaire. Même en possédant un domaine transmembranaire leur permettant de s'ancrer sur une membrane, les protéines Bcl-2

montrent un dynamisme intracellulaire. Un exemple marquant est Bax, à la fois cytosolique et à la membrane mitochondriale montrant que les localisations subcellulaires ne sont pas figées. Ce dynamisme moléculaire est important pour une modulation des rôles phénotypiques des protéines Bcl-2 (Figure 10).

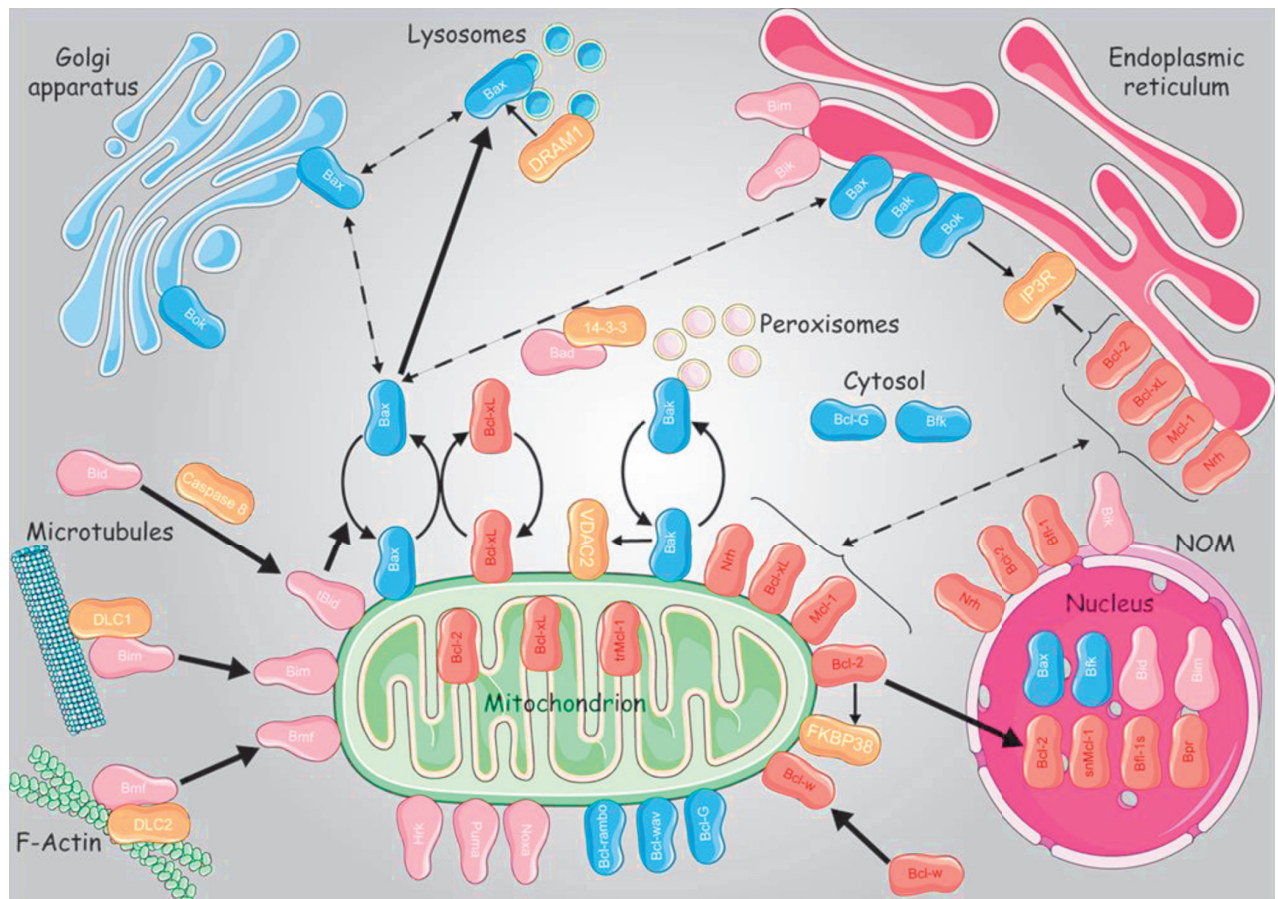


Figure 10 Localisation et dynamique moléculaire des protéines Bcl-2 (Popgeorgiev et al., 2018)

1.3.2. Bcl-2 et phénotypes

Les Bcl-2 sont impliquées dans des fonctions cellulaires diverses et variées. Pour comprendre leurs implications, rôles, et affiner les premières observations, des modèles principalement murins de KO Bcl-2 ont été générés. C'est grâce à ces études que les scientifiques ont pu mettre en lumière les fonctions physiologiques des Bcl-2.

1.3.2.1. Fonctions physiologiques des Bcl-2 anti-apoptotiques

L'étude de Bcl-2 a été réalisée en deux temps, tous deux en 1993 sur deux modèles murins. Une première où des souris chimériques de Bcl-2 étaient générées. Ces souris présentaient un phénotype avec un système immunitaire altéré. Les lymphocytes T étaient notamment plus sensibles à l'apoptose

induite par la dexaméthasone ou par rayonnement gamma (Nakayama et al., 1993). De plus, une lymphocytopenie est largement observée dans ces souris, indiquant un rôle direct de Bcl-2 dans la survie des lymphocytes. Une deuxième étude est allée plus loin avec la génération de souris avec un phénotype de Bcl-2 KO total. Cette fois-ci le phénotype KO généré provoquait des conséquences plus sévères que le phénotype chimérique. Les souris mourraient quelques semaines après la naissance. Les organes étaient anormaux avec perte progressive de pigmentation de la peau, des reins polykystiques, et une apoptose massive dans le thymus et la rate, deux organes essentiels au système immunitaire (Veis et al., 1993). Une étude réalisée plus tard montre que le phénotype Bcl-2 KO peut être diminué avec un phénotype KO de Bim (Bouillet et al., 2001), soulignant une fois de plus l'importance de la balance des anti/pro-apoptotique des Bcl-2.

Les embryons de souris déficientes en Bcl-xL meurent après 13 jours de gestation. Le phénotype est en effet plus sévère que Bcl-2 KO. Une apoptose massive est observée au niveau du cerveau et de la moelle épinière et affecte aussi le système immunitaire et hématopoïétique (Motoyama et al., 1995). Les embryons n'ayant pu atteindre leurs termes, d'autres modèles de délétion conditionnelle ont été développés par la suite pour spécifiquement étudier les organes générant ainsi moins de létalité. C'est ainsi que le rôle critique de Bcl-xL dans la survie des plaquettes a été mis à jour. De même que le rôle de Bcl-xL dans l'homéostasie des tissus sécréteurs et en particulier les tissus mammaires (Walton et al., 2001). De manière similaire au double KO Bcl-2 / Bim, le double KO Bcl-xL/ Bim restaure en partie l'apoptose induite au niveau hématopoïétique, mais pas au niveau neuronal (Akhtar et al., 2008). Cependant le double KO Bcl-xL / Bax diminue l'apoptose induite au niveau neuronal, mais pas dans le système hématopoïétique (Shindler et al., 1997).

Les souris Mcl-1 déficientes génèrent un phénotype aussi léthal pour les embryons, mais à un stade plus précoce que le KO de Bcl-xL. Les embryons Mcl-1KO perdent la capacité d'implantation *in utero* et *in vitro*, et meurent de ce fait. (Rinkenberger et al., 2000). De manière similaire à Bcl-xL, les Mcl-1 KO conditionnels ont permis de montrer l'implication de Mcl-1 dans la survie au niveau du système immunitaire et du système neuronal (Sochalska et al., 2016). Concernant le système immunitaire, Mcl-1 a un rôle clé dans la survie et maturation des lymphocytes B et T (Opferman et al., 2003). Récemment il a été montré un rôle dans la physiologie des mitochondries avec un rôle au niveau de la matrice mitochondriale (Perciavalle et al., 2012).

Bcl-W KO n'engendre pas de phénotype léthal excepté la stérilité observée dans les souris mâles. En effet Bcl-W antagonise l'action de Bax dans les cellules de Sertoli, et son KO impacte donc la spermatogénèse (Ross et al., 1998; Russell et al., 2001). Bcl-w n'aurait alors pas d'autres fonctions critiques dans d'autres tissus.

Le KO des trois isoformes de Bfl-1 / Bcl-2A1 a récemment montré un phénotype sans létalité avec une légère altération dans le système hématopoïétique. On y observe une diminution de lymphocytes T et de cellules dendritiques (Schenk et al., 2017).

Le KO de Bcl2L10 / Nrh / Bcl-B, et en l'occurrence Diva/Boo dans la souris n'a pas donné de phénotype observable. Les souris sont fertiles, n'ont pas de signes histologiques observables et pas de problème de vieillissement (Russell et al., 2002). Cependant, le KO de Nrz l'orthologue chez le zebrafish est léthal due à une altération à l'étape de gastrulation (Popgeorgiev et al., 2011).

En conclusion, les délétions de Bcl-2 n'entraînant pas de phénotypes sévères peuvent souligner une certaine redondance dans les fonctions des anti-apoptotiques, en particulier pour Nrh, Bcl-w et Bfl-1.

1.3.2.2. Fonctions physiologiques des Bcl-2 pro-apoptotiques

Cette redondance des fonctions est encore plus observée dans les pro-apoptotiques. Les phénotypes des simples KO des pro-apoptotiques dans les souris ne donnent pas de phénotypes sévères. Ainsi les souris Bak KO ou Bok KO ne donnent pas de phénotypes notables (Ke et al., 2012; Lindsten et al., 2000). Les souris Bax KO présentent des hyperplasies des lymphocytes T et B immatures combinées à une stérilité des souris mâles à cause de malformations observées dans les spermatogonies (Knudson et al., 1995). Le phénotype résultant d'un double KO Bax et Bak est nettement plus sévère chez la souris. On peut y observer des anomalies dans le développement postnatal : cerveau hypertrophié, doigts mal individualisés, hyperplasie myéloïde et lymphocytaire, accumulation de neurones et de cellules hématopoïétiques. Ainsi seuls 10% des souris arriveront à l'âge adulte. Les femelles sont caractérisées par une absence de perforation vaginale et les mâles ont le même phénotype que les mâles simples Bax KO (stérilité) (Lindsten et al., 2000).

Parmi les KO de BH3-only, seul Bim KO chez la souris a conduit à un phénotype avec des altérations principalement dans le système immunitaire. On y observe une hyperplasie des cellules lymphoïdes et myéloïdes, une accumulation de granulocytes. Les anomalies de maturation et notamment dans les lymphocytes T peuvent conduire à des réactions auto-immunes (Bouillet et al., 1999). Bim serait donc un acteur majeur dans l'homéostasie des cellules immunitaires. Du fait de leurs implications avec le tumeur suppresseur p53, les souris Puma KO et Noxa KO sont de phénotypes normaux, mais sont globalement plus résistantes à l'apoptose induite par l'altération de l'ADN (Jeffers et al., 2003; Villunger et al., 2003). De manière très intéressante, le triple KO Puma / Noxa / Bim induit un phénotype aussi sévère que la perte de p53 (Happo et al., 2010). Les souris Bid KO sont quant à elles

résistantes à l'apoptose induite par le ligand Fas (Yin et al., 1999). Les délétions de Bad, Bik, Hrk et Bmf ne donnent pas de phénotypes notables (Glab et al., 2017).

1.3.3. La face cachée des Bcl-2 : les fonctions non canoniques

Les Bcl-2 régulent d'autres mécanismes que l'apoptose dans la cellule. Comme mentionné précédemment, la régulation de l'autophagie est une des fonctions non canoniques de Bcl-2. Les protéines Bcl-2 sont également impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, la sénescence, l'homéostasie des neurones, et dans le métabolisme glycolytique et mitochondriale. Nous décrirons de manière brève les implications des Bcl-2 dans le cycle cellulaire, la sénescence et la migration des cellules.

A. Cycle cellulaire

D'une façon générale, les cellules n'ont pas besoin de constamment se diviser et d'entrer dans le cycle cellulaire. De ce fait on dit que les cellules sont en stade quiescent ou G0. Les cellules sous l'impulsion de facteurs peuvent entrer en division cellulaire. Dans ce cas la cellule entre en stade G1, un stade de croissance et de préparation à la réplication. Puis elle rentre en phase S où l'ADN se réplique. Ensuite vient la phase G2 avec préparation de la mitose et le dernier stade M avec la mitose. Les cellules ainsi formées peuvent alors soit rentrer dans un nouveau cycle en G1 soit sortir et entrer en stade G0 (Figure 11).

Dans des lignées lymphoïdes et myéloïdes dépendantes de l'IL-3, la surexpression de Bcl-2 permet leur survie dans un milieu pauvre en IL-3. Néanmoins les cellules restent en phase G0 et ne prolifèrent pas. Une des hypothèses était que Bcl-2 bloquerait (effet antiprolifératif) ces cellules le temps qu'un autre oncogène (*c-myc* dans l'étude) s'active (Vaux et al., 1988). Il a ensuite été découvert que Bcl-2 retarde la transition G0 vers la phase S. La surexpression de Bcl-2 dans les lymphocytes T de souris bloque le passage du facteur de transcription NFAT dans le noyau pour transcrire ses gènes cibles dont l'IL-2 (interleukine 2) nécessaire à la transition G1/S (Linette et al., 1996). Par ailleurs, la surexpression de Bcl-xL a donné des résultats équivalents. La surexpression retarde également l'entrée en phase S des lymphocytes T et B et des fibroblastes quiescents (O'Reilly et al., 1996). La surexpression de Bcl-w donne des résultats similaires sur le cycle sur d'autres types cellulaires (Print et al., 1998). La surexpression de Mcl-1 a montré une implication non plus sur la phase G0/G1 vers la phase S mais directement sur la phase S et son avancement. En effet Mcl-1 est un partenaire du PCNA (proliferating nuclear antigen), dont le rôle est d'activer l'ADN polymérase et d'augmenter la réplication d'ADN (Fujise et al., 2000). Par ailleurs, il est important de souligner que les rôles anti-apoptotiques et antiprolifératifs ne sont pas directement liés. En effet des mutations ponctuelles sur une tyrosine du

BH4 de Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W abolissent l'activité sur le cycle cellulaire, mais pas l'activité anti-apoptotique. Les Bcl-2 anti-apoptotiques mutées pouvant encore former des hétérodimères avec Bax, Bak, Bad et Bik (Huang et al., 1997). Ces données soulignent une fois de plus les rôles clés des anti-apoptotiques dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire.

Contrairement aux surexpressions des anti-apoptotiques Bcl-2, la surexpression du pro-apoptotique Bax accélère l'entrée des cellules en phase S en réponse à une stimulation par l'IL-2 (Brady et al., 1996). La surexpression de Bad quant à elle contourne l'arrêt de la cellule en phase G0/G1 pour accélérer la transition vers la phase S. Cependant ce mécanisme est dépendant d'une hétérodimérisation avec Bcl-xL et Bcl-2 (Chattopadhyay et al., 2001).

Les protéines Bcl-2 sont également sujettes à des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation ayant pour conséquence de moduler le cycle cellulaire. Ce point sera détaillé dans la partie sur les phosphorylations.

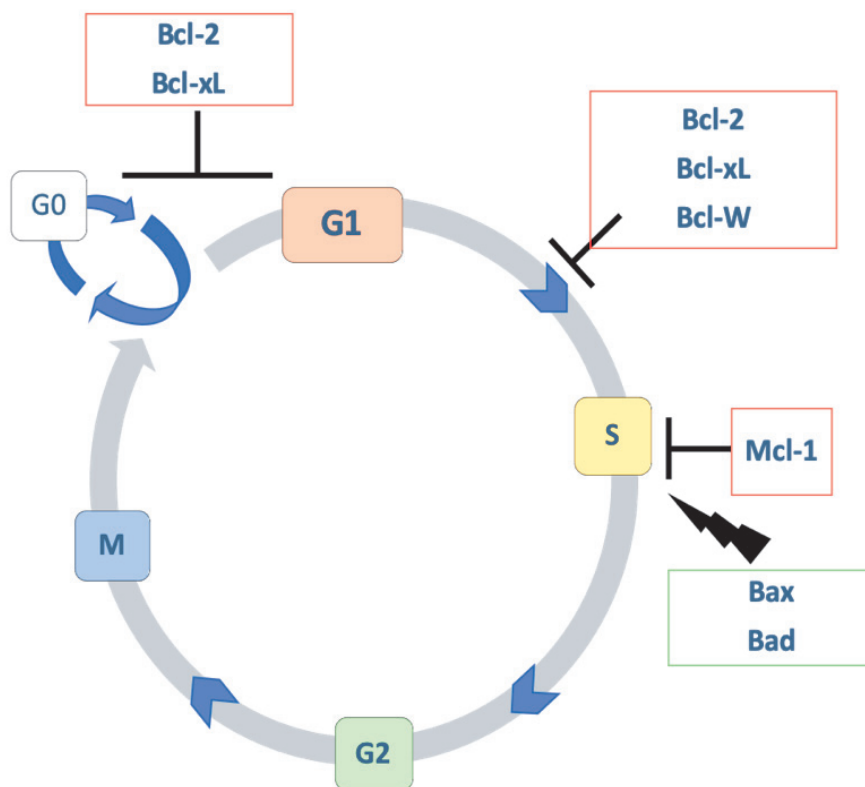


Figure 11 Implication des Bcl-2 dans cycle cellulaire

B. Sénescence

Impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, les protéines Bcl-2 participent également à la régulation de la sénescence cellulaire. La sénescence est un processus cellulaire se traduisant par un blocage

durable du cycle cellulaire à la transition entre les phases G1 et la phase S réplivative. La sénescence peut être activée en réponse à de divers signaux de stress cellulaires, comme l'activation d'oncogène (RAS) ou par un traitement thérapeutique (Hernandez-Segura et al., 2018). Les cellules sénescents présentent plusieurs caractéristiques dont la capacité à résister à l'apoptose. De nombreuses études démontrent l'importance des anti-apoptotiques Bcl-2 dans la mise en place et la maintenance de la sénescence. Dans les cellules sénescents, on peut observer au niveau épigénétique une incapacité à inhiber l'expression du gène BCL-2 suite à l'activation chronique d'un facteur de transcription CREB (cAMP Response Element Binding protein) et une répression de l'expression de Bax par l'histone triméthyle H4K20me3 (Ryu et al., 2007; Sanders et al., 2013). Dans les fibroblastes humains et de souris dont la sénescence a été induite par l'activation de Ras, on retrouve au niveau du protéome, une surexpression de Bcl-2, mais aussi de Bcl-xL et Bcl-W. De manière très intéressante, il est montré que l'expression de Bcl-xL et de Bcl-W est nécessaire à la survie des cellules sénescents et que les traitements BH3 mimétiques comme l'ABT-737 peut éliminer spécifiquement les cellules sénescents (Yosef et al., 2016).

C. Migration et invasion

Les protéines Bcl-2 ont été impliquées dans la migration cellulaire, et sont capables de réguler la capacité d'invasion métastatique des cellules cancéreuses. Ainsi il est montré que la surexpression de Bcl-2 augmente la capacité métastatique des cellules de cancer du sein (Del Bufalo et al., 1997). La même capacité à augmenter la migration et l'invasion est retrouvée lorsque Bcl-2 est surexprimée dans les glioblastomes avec une forte corrélation liée à une augmentation des métalloprotéinases (MMP) MMP2 et MMP9 (Wick et al., 1998). Ce lien de cause à effet entre Bcl-2 et MMP2 est confirmé dans les cancers du poumon à petites cellules (Choi et al., 2005). De manière très intéressante, la capacité de Bcl-2 à réguler le flux calcique influence aussi la migration des cellules. En effet il est montré qu'une augmentation de la sortie du calcium réticulaire provoquée par Bcl-2 entraînait une augmentation du calcium au niveau de la mitochondrie, et par effet domino une augmentation de la production d'ATP et des processus de migration dans les cancers du sein triple négatif (Fouqué et al., 2016). L'augmentation de la sortie du calcium réticulaire peut aussi provoquer une activation du facteur de transcription AP-1 (activating protein-1), favorisant la migration cellulaire (Bonneau et al., 2013). D'autres protéines de la famille Bcl-2 comme Bcl-xL, Mcl-1 et Bcl2L10/Nrh ont été impliquées dans la migration cellulaire. Concernant Mcl-1, son interaction avec VDAC permet d'augmenter la concentration calcique dans la mitochondrie, ce qui provoque alors la production d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS (Reactive oxygen species) et une induction de la migration des cellules de carcinomes du poumon à grandes cellules (Huang et al., 2014). Les fonctions non-canoniques de Bcl-xL sont parmi les plus décrites dans la littérature. Il est montré que l'expression de Bcl-xL pouvait

induire une augmentation de l'activité métastatique dans les cancers du sein, du pancréas, du glioblastome et mélanome (Bessou et al., 2020; Triscioglio et al., 2017). Dans le glioblastome, l'induction de Bcl-xL conduit à une augmentation du TGF β (tumor growth factor beta), qui en retour augmente l'expression des MMP2 et MMP14. Cela a pour effet d'augmenter la capacité d'invasion des cellules cancéreuses (Weiler et al., 2006). Notre équipe a montré que Nrz, l'orthologue de Nrh chez le poisson zèbre, joue un rôle dans la régulation du cytosquelette, avec un rôle important au cours de l'épibolie (une étape de l'embryogénèse du poisson zèbre). Le KO de Nrz conduit à une augmentation cytosolique du calcium, à une hypercontraction des structures actine-myosine qui sont calcium dépendantes et à un détachement de l'embryon de la vésicule vitelline, conduisant à un phénotype léthal (Popgeorgiev et al., 2011).

1.3.4. Modifications cellulaires régnant sur les Bcl-2

Les protéines Bcl-2 en tant que régulatrices clés de la survie cellulaire sont elles-mêmes soumises à des régulations strictes. Nous avons vu dans les parties précédentes que l'expression des Bcl-2 peut être soumise à des régulations par des facteurs de transcription comme le gène tumeur suppresseur p53. Cependant, il existe des régulateurs modulant directement l'activité des protéines Bcl-2 et de façon plus rapide que les facteurs de transcription. Nous allons voir dans cette partie quelques modifications post traductionnelles comme la phosphorylation et l'ubiquitination sur la famille Bcl-2.

1.3.4.1. La phosphorylation : entre activation et inhibition

A. Phosphorylation des anti-apoptotiques

Des études ont montré que la phosphorylation de Bcl-2 est nécessaire pour sa fonction anti-apoptotique. En effet, initialement, il a été démontré une zone de phosphorylation importante dans la boucle flexible formée entre le BH4 et le BH3. Dans cette zone on retrouve la Sérine 70 dont la phosphorylation est cruciale pour l'activité anti-apoptotique. La phosphorylation par la protéine kinase C α (PKC α) à la Ser70 est responsable d'une survie augmentée des cellules traitées à l'étoposide (May et al., 1994). Cette phosphorylation ne perturbe cependant pas l'interaction de Bcl-2 avec les pro-apoptotiques (Ito et al., 1997). Bien au contraire, cette phosphorylation renforce l'interaction de Bcl-2 avec Bax et Bim (Dai et al., 2013). Dans la même zone, la Thr69 et la Ser87 peuvent être phosphorylées en parallèle avec la Ser70 sous traitement au Taxol (Ruvolo et al., 2001). Ces cellules deviennent post-phosphorylation résistantes à la mort induite par les poisons du fuseau mitotique. Il est intéressant de noter que les résidus Thr69, Ser70 et Ser87 forment la boucle flexible entre le BH4 et BH3. Ces phosphorylations sont directement inhibées par la phosphatase PP2 α (Ruvolo et al., 2001). D'autres kinases peuvent également phosphoryler Bcl-2, c'est le cas des ERK1/2 (Extracellular signal-regulated

kinase 1 et 2) de la famille des MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Deng et al., 2000). Par ailleurs, la phosphorylation telle que celle des résidus Thr56, Thr74 et Ser87 augmente la stabilité de Bcl-2 en prévenant l'ubiquitination et en diminuant la dégradation par le système protéolytique. En note, les protéines ERK1/2 sont des régulatrices clé du cycle cellulaire responsable de la transition de G1/S. Leurs activations bloquent cette transition. Ce point peut donc relier la phosphorylation de Bcl-2 et son rôle dans le contrôle du cycle cellulaire (Meloche and Pouyssegur, 2007). A l'inverse des kinases ci-dessus qui en phosphorylant vont activer l'activité de survie de Bcl-2, il existe un certain nombre de kinases qui régulent négativement cette dernière. Raf-1, une kinase de la famille des MAPK, semble jouer un rôle dans l'inhibition de Bcl-2 par phosphorylation (Blagosklonny et al., 1997). Une autre kinase PKA (Protéine Kinase A) AMPcyclique dépendante, après traitement par le Paclitaxel ou la Vincristine provoque une hyperphosphorylation de Bcl-2 (Srivastava et al., 1998). Cette phosphorylation semble se dérouler au résidu S70 et a pour conséquence de rompre la liaison de Bcl-2 à Bax, initialisant ainsi l'apoptose (Shitashige et al., 2001). La kinase c-Jun N-terminal 1 (JNK-1) a montré une inactivation de Bcl-2 par phosphorylation des sites Thr69, Ser70 et Ser87 (Yamamoto et al., 1999). On peut en citer d'autres qui inactivent Bcl-2 : le complexe v-cyclin/CDK6 (cyclin-dépendant kinase, CDK) sur les Ser70 et Ser87 (Ojala et al., 2000), CDK1 qui régule aussi Bcl-xL (Terrano et al., 2010), mTOR (Calastretti et al., 2001), ou p38 sur les Thr56 et Thr87 de Bcl-2 (De Chiara et al., 2006).

En réponse au taxol, Bcl-xL est phosphorylé à la Ser62 ou à la Ser49 par la kinase JNK pour promouvoir la survie cellulaire (Basu and Haldar, 2003). D'autres kinases peuvent aussi intervenir sur ces résidus : JNK-2, MAPK9 ou PLK 1/3 (Polo-like Kinase 1 et 3) (Tamura et al., 2009). De plus la phosphorylation sur la Ser62 est impliquée dans la régulation du passage de phase G2 en phase M, ralentissant ainsi la mitose et le cycle cellulaire (Wang et al., 2011, 2012). La phosphorylation n'a pas pour unique rôle de promouvoir la fonction anti-apoptotique, elle peut également initier l'apoptose. En réponse à l'altération de l'ADN, JNK peut être relocalisée à la mitochondrie pour phosphoryler Thr47 et Thr115 pour initier l'apoptose (Kharbanda et al., 2000). Dans des conditions de stress oxydatif, la kinase Mst1 (macrophage stimulating 1) peut phosphoryler le BH4 de Bcl-xL à la Ser14, perturbant ainsi la liaison Bcl-xL/Bax, et promouvant ainsi l'apoptose (Del Re et al., 2014). La phosphorylation de la Ser73 de Bcl-xL par la kinase CDK2 convertit Bcl-xL en pro apoptotique mimant les effets de Bax/Bak dans les cellules du rein (Megyesi et al., 2016). En note, en présence d'halopéridol la forme alternative Bcl-xS est phosphorylée aux résidus Ser106 et Ser228, inhibant ainsi son activité pro-apoptotique via VDAC (Wei et al., 2009).

Mcl-1 du fait de sa longueur par rapport aux autres multi-domaines, possède un domaine riche en Proline, Glutamate, Sérine et Thréonine nommé PEST entre les résidus 104 et 175 de Mcl-1. Les

phosphorylations sur ce domaine sont directement reliées à la stabilité de la protéine et de sa dégradation par le protéasome (Domina et al., 2004). Sa phosphorylation en Thr92 et Thr163 par la voie des MAPK ERK augmente la stabilité de Mcl-1 et augmente la survie cellulaire (Ding et al., 2008). Au contraire, une phosphorylation en Ser159 par la kinase GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase -3) a pour effet de réduire la stabilité et d'augmenter sa dégradation par l'ubiquitine ligase FBW7 (F-box and WD repeat domain-containing 7) (Inuzuka et al., 2011; Maurer et al., 2006). Par ailleurs Mcl-1 peut être phosphorylé hors de PEST au résidu Ser64 où sa phosphorylation par CDK1/2 ou JNK1 pourrait augmenter sa liaison aux pro-apoptotiques (Bim, Noxa, Bak) (Kobayashi et al., 2007).

Bcl-w est phosphorylé par une sérine/thréonine kinase Akt (ou protein kinase B, PKB) qui a pour conséquence une régulation négative du niveau de Bcl-w, mais à ce jour pas de site spécifique n'a été mis à jour (Garofalo et al., 2008).

Actuellement, aucuns évènements de phosphorylation n'ont été découverts pour Bfl-1 et Bcl2L10/Nrh/Bcl-B.

B. Phosphorylation des multi-domaines pro-apoptotiques

Les membres pro-apoptotiques des Bcl-2 subissent également des modifications post traductionnelles. Nous citons ici quelques modifications sur les multi-domaines Bax, Bak, Bok et les BH3-only.

Le pro-apoptotique Bax est régulé négativement par phosphorylation du côté C-terminal à la Ser184 par ERK des MAPK et par Akt de la voie PI3K (phosphoinositide 3-kinase) (Parikh et al., 2004). Cette phosphorylation dans le domaine transmembranaire empêche Bax d'être à la mitochondrie et contribue à augmenter l'hétérodimérisation avec les anti-apoptotiques Mcl-1 ou Bcl-xL ; diminuant de ce fait l'activité pro-apoptotique de Bax (Gardai et al., 2004). Plus récemment, il a été montré que le résidu Ser184 est un résidu clé pour la fixation à Bcl-xL et l'interaction avec les BH3-Only (Garenne et al., 2016). La phosphorylation par Akt convertit Bax en anti-apoptotique et augmente la résistance à la chimiothérapie (Kale et al., 2018). PKC ζ (protein kinase C isoforme zeta), une autre kinase, peut phosphoryler Bax à la Ser184 dans les cellules de cancers du poumon. La phosphorylation augmente alors la séquestration de Bax dans le cytosol et diminue l'activité pro-apoptotique (Xin et al., 2007). Cependant, en conditions de stress cellulaire, il a été montré que les phosphorylations des kinases JNK et p38 sur la Thr167, et de GSK3 β sur la Ser163 induisaient l'effet inverse (Kim et al., 2006; Linseman et al., 2004). Ces phosphorylations accentuaient l'effet pro-apoptotique de Bax en augmentant sa translocation à la mitochondrie.

Initialement il était admis que la phosphorylation de Bak régulait négativement son activité pro-apoptotique. Il a été démontré que l'initiation de l'apoptose entraînait la déphosphorylation de la Tyr108 par des phosphatases non tyrosine (PTPN) et en particulier le PTPN5. Le site Tyr110 est également noté comme site potentiel de phosphorylation de Bak (Fox et al., 2010). Une autre déphosphorylation sur un autre résidu de la poche hydrophobe, la Ser117, est nécessaire à l'oligomérisation et l'activation de Bax. C'est la combinaison des deux qui permet l'activation de Bax (Azad et al., 2012; Azad and Storey, 2013). Cependant, une étude plus récente remet en cause la phosphorylation de Bax. Dans cette étude aucune phosphorylation sur Bax n'est notable et la substitution de la Tyr108 en alanine n'induit pas l'activation de l'apoptose (Tran et al., 2013).

Les modifications sur Bok sont moins bien connues que celles pour Bax et Bak. Sur une étude récente dans les cellules de cancer du sein, Bok est une cible des kinases suivantes : PKA, PKC et GSK3 α/β . Néanmoins la conséquence directe de cette phosphorylation par le GSK3 n'est pas clairement définie, elle pourrait soit amener à une augmentation de la dégradation par le protéasome via le FBW7, soit à une stabilisation (Onyeagucha et al., 2017).

C. Phosphorylation des BH3-only

La phosphorylation de Bad sur la Ser112 et la Ser136 est connue pour favoriser sa fixation sur les 14-3-3 protéines tout en inhibant l'activité de Bad (Downward, 1999). La phosphorylation de la Ser112 est régulée par la voie des MAPK-Ras (Fang et al., 1999) et RSK1 (ribosomal s6 kinase 1) (Shimamura et al., 2000), par la kinase mitochondriale PKA (Protein kinase A) (Harada et al., 1999), par JNK1, MSK1 et RSK2 sous l'effet des radiations d'ultraviolets (She et al., 2002). Tandis que pour la Ser136 c'est à priori la voie PI3K et Akt (Fang et al., 1999) et par une kinase ribosomale la p70S6 (Harada et al., 2001). D'autres sites de phosphorylation négative de Bad sont également décrits, sur la Ser155 par PKA ou RSK1 (Datta et al., 2000; Tan et al., 2000) et la Thr201 par JNK (Yu et al., 2004). JNK et la kinase CDK1 peuvent en revanche augmenter la fonction pro-apoptotique de Bad en le phosphorylant à la Ser128 (Donovan et al., 2002). Cette modification libère Bad de la protéine 14-3-3. Bad peut également être la cible de phosphatase comme la PP2A ciblant la phosphorylation sur la Ser112 (Chiang et al., 2003).

Bim est aussi la cible de phosphorylation par les kinases de la famille MAPK incluant JNK, ERK et p38 (Hubner et al., 2008). La phosphorylation de Bim a montré plusieurs effets. Sur les résidus Ser65 et Ser69 par la kinase ERK1/2, il a été montré une augmentation de la dégradation par le protéasome ce qui régule alors négativement son activité pro-apoptotique (Ley et al., 2005; Luciano et al., 2003). Bim peut-être aussi phosphorylée sur d'autres sérines (Ser55 et Ser73) par les kinases de MAP augmentant également sa dégradation (Hubner et al., 2008). La kinase JNK peut phosphoryler Bim à la Ser65, mais

cette dernière potentialise l'apoptose médiée par Bax (Putcha et al., 2003). Bik peut aussi être phosphorylé par ERK1/2 à la Thr124 ce qui augmente aussi sa dégradation par le protéasome comme Bim, régulant ainsi son activité pro-apoptotique négativement (Lopez et al., 2012). Cependant l'activité pro-apoptotique peut être potentialisée par phosphorylation des Thr33 et Ser35 par des kinases Casein II (CKII) (Verma et al., 2001). La stabilité de Puma est aussi contrôlée par phosphorylation sur la Ser10 par les kinases I κ B IKK1/IKK2/Nemo (Sandow et al., 2012). En réponse à une stimulation de l'IL-3, Puma est régulé négativement par phosphorylation, car Puma est plus dégradé par le protéasome. Le pro-apoptotique Noxa est également régulé négativement par la kinase CDK5 en Ser13 en réponse à un stress glucidique. Son mutant Ser13Ala induit la mort en réponse à ce stress (Lowman et al., 2010). Bmf est phosphorylée par la kinase ERK2 aux Ser75 et 77 diminuant ainsi sa fonction pro-apoptotique (Shao and Aplin, 2012). Et enfin Bid peut être phosphorylé à sa Thr58 par les kinases Casein CKI et CKII (CKI/II) rendant ainsi Bid insensible au clivage de la caspase8 et provoquant une inhibition de l'apoptose (Desagher et al., 2001).

1.3.4.2. Ubiquitination, protéasome et dégradation des protéines

La dégradation des protéines par le protéasome est un processus spécifique, sélectif et efficace d'hydrolyse de protéines cibles. C'est un processus nécessitant de l'ATP et une collaboration de l'ubiquitine indiquant au protéasome les protéines à détruire (Figure 12). Le processus d'ubiquitination et la dégradation protéasomique (UPP ou ubiquitin proteasome pathway) contrôlent une multitude de processus biologiques dont le contrôle de la progression du cycle cellulaire, la régulation de l'expression des gènes et de l'apoptose. C'est donc les deux derniers points qui vont nous intéresser dans notre manuscrit.

Ce qu'on appelle communément le protéasome ou protéasome 26S est en réalité une méga structure protéique (2×10^6 Da). Le protéasome 26S est composé de deux sous-unités : un noyau catalytique 20S, et une ou deux unités régulatrices 19S flanquées de chaque côté. Il est à noter qu'il existe d'autres types de protéasomes en fonction des composantes du complexe (protéasome 30S et protéasomes hybrides). Structurellement le cœur 20S de 750kDa est formé symétriquement de sous-unités α et β . Les sous-unités α à l'extérieur forment un anneau fermant le domaine catalytique des sous-unités β (α - β - β - α) (Figure 12). Le noyau catalytique 20S est responsable du clivage des protéines en oligopeptides de 3 à 15 acides aminés (Maupin-Furlow et al., 2006). Ces peptides sont ensuite hydrolysés par d'autres peptidases associées au protéasome comme le thimet oligopeptidase TOP (Kloetzel and Ossendorp, 2004). Par ailleurs, il est montré que les protéines mal repliées peuvent être dégradées directement par le protéasome via le binding aux sous-unités α du 20S, favorisant ainsi l'entrée des protéines et leurs dégradation (Jung and Grune, 2008). L'unité 19S est composée de 20

sous-unités réparties en deux groupes ATP dépendant ou non : les Rpt (regulatory particle of triple ATPases) et les Rpn (regulatory particle of non ATPases). Pour résumer de manière simple la séquence d'initiation de la dégradation, l'unité régulatrice 19S permet de reconnaître et de capturer les protéines ubiquitinylées (Rpn10, Rpn13), retirer le marquage ubiquitine (Rpn11), déplier les protéines et ouvrir l'anneau de sous-unités α (Rpt 1-6), et de transférer les protéines dépliées dans le cœur catalytique (Tanaka, 2009). Nous ne détaillerons pas plus le protéasome ici puisque c'est l'ubiquitination qui est au cœur de la régulation des protéines Bcl-2 et de l'apoptose.

La dégradation sélective de protéines est déterminée par le système d'ubiquitination. Une protéine (mono) ou chaînes de protéines (poly) de 76 acides aminés hautement conservés d'ubiquitine est fixée de manière covalente à la protéine cible à détruire par le protéasome. La fixation de l'ubiquitine est le résultat d'un enchainement de réactions avec 3 enzymes du système noté E1 (enzyme d'activation), E2 (enzyme de conjugaison), et E3 (ubiquitine ligase). L'ubiquitine est activée par sa glycine en C-terminal formant une liaison thioester avec une cystéine de l'E1 par une réaction ATP dépendant. L'ubiquitine activée est ensuite transférée sur une ubiquitine transporteuse ou E2. La troisième étape est catalysée par l'ubiquitine ligase E3 qui permet de transférer le groupement ubiquitine sur la protéine cible en formant une liaison covalente avec une lysine de l'ubiquitine et une lysine de la protéine (Figure 10A) (Hershko and Ciechanover, 1998). L'ubiquitine possède 7 lysines capables de former des liaisons pour l'ubiquitination, des thréonines, tyrosines et sérines pour la phosphorylation. En fonction du groupement et de la lysine greffée, la conséquence biologique ne sera pas la même. En effet le groupement ubiquitine peut être une simple ubiquitination ou une poly ubiquitination, linéaire ou sur plusieurs lysines en forme de « branche », le groupement ubiquitine peut être sujet à modification comme la phosphorylation, acétylation, SUMOylation, NEDDylation, générant ainsi un nombre indéfini de groupements d'ubiquitines possible (Figure 12). Initialement, un code d'ubiquitination est établi et sépare l'ubiquitination en 2 grandes fonctions : l'ubiquitination sur la Lys48 pour les fonctions protéolytiques et l'ubiquitination sur la Lys63 pour le signalement et fonctions non protéolytiques (Komander and Rape, 2012). Ce code est progressivement étendu avec une meilleure compréhension biologique de l'ubiquitination sur les autres Lysines (6, 11, 27, 29, et 33) de l'ubiquitine (Swatek and Komander, 2016).

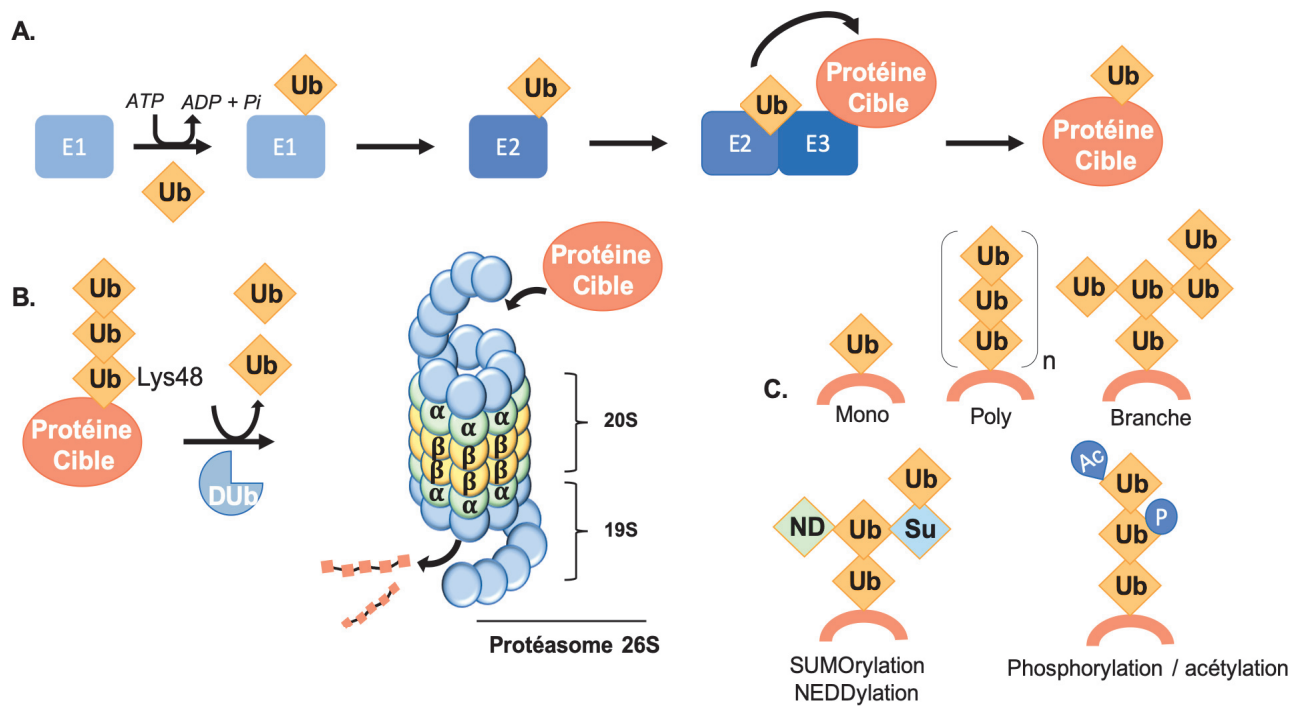


Figure 12 Ubiquitination et protéasome

A. Dégradation et stabilisation des Bcl-2 anti-apoptotiques

Il existe peu de liens directs de régulation du niveau d'expression de Bcl-2 par le système UPP. Une déphosphorylation sur les Thr 56/74 et la Ser87 augmente la dégradation de Bcl-2. De plus l'abolition de l'UPP inhibe la dégradation de Bcl-2 (Dimmeler et al., 1999). L'inhibition de la dégradation est également obtenue lors de la S-nitrosylation sur les Cys158/227 de Bcl-2 (Azad et al., 2006). De plus il est montré que la dégradation est up-régulée en présence d'une protéine tumeur suppresseur ARTS (apoptosis-related protein in the TGF-beta signalling pathway) qui par interaction avec le domaine BH3 et la protéine XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) potentialise l'ubiquitination en Lys17. XIAP par l'interaction avec ARTS agit comme ubiquitine ligase E3 (Edison et al., 2017). Et enfin la protéine Parkin ou PARK2, une ubiquitine E3 cytosolique est montrée pouvant ubiquitinyler Bcl-2 et Bcl-xL (Chen et al., 2010) (Gong et al., 2017). En plus de Parkin, l'augmentation d'un facteur de transcription RNF183 augmente la polyubiquitination et la dégradation de Bcl-xL (Wu et al., 2018). Pour finir, la phosphorylation de Bcl-xL sur la Ser62 par JNK augmente l'ubiquitination et la dégradation de Bcl-xL. Une phosphatase PP6 inhibe cette phosphorylation et diminue la dégradation par l'UPP (Kajihara et al., 2014).

Mcl-1 est l'anti-apoptotique le plus sujet à l'ubiquitination suivi par Bfl-1 et Nrh. Quatre ubiquitine ligases E3 ont montré des affinités à Mcl-1. MULE (Mcl-1 ubiquitine ligase E3) agit sur 5 sites d'ubiquitination sur Mcl-1 (Lys5/40/136/194/197). L'ubiquitination par MULE est activée lors de signaux apoptotiques après altération de l'ADN (Zhong et al., 2005). FBW7 et β -TrCP (Beta transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase) sont deux ligases E3 responsables de l'ubiquitination de Mcl-1 et de sa dégradation. L'activité de FBW7 et β -TrCP dépend de la phosphorylation de Mcl-1 par la kinase GSK3 β . Les modèles cellulaires déficients en FBW7 sont résistants aux traitements BH3 mimétiques comme l'ABT 737 (Ding et al., 2007; Inuzuka et al., 2011). Une autre E3 est TRIM17 (Tripartite Motif containing 17) qui régule l'ubiquitination et la dégradation de Mcl-1 dans le contexte de la mort neuronale (Magiera et al., 2013). En revanche Mcl-1 peut être stabilisé et sa dégradation diminuée par une déubiquitination par l'USP9X (Ubiquitin Specific Peptidase 9 X-Linked) pour promouvoir la survie cellulaire (Schwickart et al., 2010).

Bfl-1 a une durée de vie limitée et est dégradé rapidement par le protéasome. Son domaine C-terminal régule la stabilité et sa dégradation par l'UPP. En effet des mutants délétés de la partie C-terminale sont plus stables que la protéine complète (Herold et al., 2006). Récemment une ubiquitine ligase TRIM28 est trouvée à la mitochondrie et est responsable de l'ubiquitination de Bfl-1. De manière étonnante, TRIM17 est décrit ici comme un antagoniste de TRIM28 et un stabilisateur de Bfl-1 (Lionnard et al., 2019).

Nrh/Bcl2L10 est dégradé par l'UPP après sa synthèse. Cependant une mono-ubiquitination par l'Ubiquilin1 permet de stabiliser Nrh et contribue à diminuer sa dégradation. De plus l'interaction avec l'Ubiquilin1 permet la translocation de Nrh des membranes vers le cytosol (Beverly et al., 2012). Trois lysines sur Nrh sont identifiées comme sites de polyubiquitination responsables de sa dégradation, la Lys119/120/128 (van de Kooij et al., 2013). À ce jour, aucune ubiquitine ligase spécifique de Nrh n'a été mise en évidence.

L'activité des Bcl-2 anti-apoptotiques semble être associée à leurs niveaux d'expression conditionnés en partie par la vitesse de renouvellement et de dégradation. Dans un modèle où nous considérons un niveau identique d'expression, les Bcl-2 anti-apoptotiques confèrent la même capacité de résistance à l'apoptose. En réalité, il semble que Bcl2L10, Bfl-1 et Mcl-1 soient plus dégradés par le protéasome que Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w. Conférant ainsi à Bcl-2 plus de capacité de résistance à l'apoptose par rapport à Nrh par exemple (Rooswinkel et al., 2014).

B. Dégradation des pro-apoptotiques

La dégradation de Bax contribue à la progression tumorale par interaction avec l'ubiquitine ligase Parkin /PARK2 (Johnson et al., 2012). PARK2 contribue à l'ubiquitination de Bax sur la Lys128 et inhibe l'activité pro-apoptotique à la mitochondrie (Cakir et al., 2017).

La dégradation de Bak est moins connue que pour Bax. Récemment, la protéine Parkin en plus de l'inhibition sur Bax a été montré comme capable d'inhiber l'activité pro-apoptotique de Bak en empêchant la formation d'oligomères (Bernardini et al., 2019). La dégradation de Bak peut aussi passer par une protéine virale du papillomavirus humain type 5 qui recrute alors la ligase E3 HERC1 (HECT and RLD Domain Containing E3 Ligase 1) pour l'ubiquitination de Bak (Holloway et al., 2015). La stabilité de Bok est liée à sa liaison avec le Coupling Domaine (CD) des récepteurs inositols triphosphates (IP3R), protégeant Bok du clivage protéolytique (Schulman et al., 2013). De plus Bok est ubiquitinylé par la ligase AMFR/GP78 au RE amenant à sa dégradation (Llambi et al., 2016).

Concernant les BH3-only, Bim et Bik sont respectivement ubiquitinylées par TRIM2 (Thompson et al., 2011) et par FATE/RNF183 sur la Lys33 (Maxfield et al., 2015). L'ubiquitination de Puma peut être induite par un agent inhibiteur du ribosome arbus agglutinin, mais il n'y pas encore de ligase spécifique découverte pour le moment (Panda et al., 2018). Noxa est décrite comme étant possiblement un substrat direct du protéasome 26S et indépendamment de l'ubiquitination du fait d'un domaine non-structuré de sa structure (Craxton et al., 2012). L'ubiquitination en C-terminal de Bid et tBid augmente leur dégradation et régule la mort médiée par Bid/tBid (Breitschopf et al., 2000). Lors du clivage de Bid, une boucle non structurée de tBid en N-terminal peut-être ubiquitinylée mais de manière non conventionnelle en ne passant pas par une liaison avec une lysine, mais un mélange de serine/thréonine/cystéine. La dégradation du fragment N-terminal de tBid est nécessaire à l'activité pro-apoptotique (Tait et al., 2007).

Tableau 1 Récapitulatif des modifications post-traductionnelles des Bcl-2 multi-domaines anti-apoptotiques

<i>Protéine</i>	Type	Conséquence	Sites de modifications	Enzymes impliquées
<i>Bcl-2</i>	Phosphorylation	Survie	Thr56, Thr76, Ser79, Ser87	PKC α , ERK1/2
	Phosphorylation	Apoptose	Thr69, Ser70, Ser87	mTor CDK6 Raf-1 JNK1 ERK1/2 PKA CDK1, p38
	Ubiquitination	Dégradation	Lys17	XIAP / ARTS, Parkin
<i>Bcl-xL</i>	Phosphorylation	Survie	Ser49, Ser62	Raf-1, JNK1/2, PLK1/3
	Phosphorylation	Apoptose	Ser14, Thr47, Ser62, Ser73, Thr117	Mst1, Cdk2, JNK
	Ubiquitination	Dégradation	Résidu non identifié	Parkin
<i>Mcl-1</i>	Phosphorylation	Survie	Ser64, Thr92, Thr163	CDK1/2, JNK1, ERK1/2
	Phosphorylation	Apoptose	Ser159	GSK-3
	Ubiquitination	Dégradation	Lys 5, Lys40, Lys136, Lys194, Lys197	Trim17, SCF ^{Fbw7} , SCF ^{β-TrCP} , Mule
<i>Bfl-1 / Bcl2A1</i>	Ubiquitination	Dégradation / Stabilité	Résidu non identifié	Trim28 / Trim17
<i>Bcl-W</i>	Phosphorylation	Activation	Résidu non identifié	Akt
	Ubiquitination	Dégradation	Résidu non identifié	Pas de E3 spécifique identifié
<i>Nrh / Bcl-B / Bcl2L10</i>	Ubiquitination	Dégradation	Lys119, Lys120, Lys128	Pas de E3 spécifique identifié
	Ubiquitination	Stabilité	Mono-ubiquitination multiple lysines	Ubiquilin1

Tableau 2 Récapitulatif des modifications post-traductionnelles des Bcl-2 pro-apoptotiques

<i>Protéine</i>	Type	Conséquence	Sites de modifications	Enzymes impliquées
<i>Bax</i>	Phosphorylation	Activation	Ser163, Thr167	GSK-3 β , JNK1/2, p38
	Phosphorylation	Inactivation	Ser184	Akt, PKC ζ , ERK1/2
	Ubiquitination	Dégradation	Résidu non identifié	Parkin
<i>Bak</i>	Phosphorylation	Inactivation	Tyr108, Tyr110, Ser117	PTPN5
<i>Bok</i>	Phosphorylation	Activation / Dégradation	Site non identifié	PKA, PKC, GSK3 α/β , FBW7
<i>Bad</i>	Phosphorylation	Activation	Ser128	JNK1/2, CDK1
	Phosphorylation	Inhibition	Ser112, Ser136, Ser155, Thr201	RSK1/2, PKA, JNK1, PI3K, Akt, p70S6
	Phosphorylation	Activation	Ser65	JNK1/2
<i>Bim</i>	Phosphorylation	Inhibition	Ser55, Ser65, Ser69, Ser73	ERK1/2, JNK1/2, p38
	Ubiquitination	Dégradation	Site non identifié	Trim2
	Phosphorylation	Inhibition	Thr58	CKI/II
<i>Bid</i>	Ubiquitination	Dégradation	Lys144, Lys146, Lys 157, Lys158	?
	Pas de modifications connues à ce jour			
<i>Hrk</i>	Pas de modifications connues à ce jour			
<i>Puma</i>	Phosphorylation	Inhibition	Ser10	I κ B, IKK1/2, Nemo
<i>Noxa</i>	Phosphorylation	Inhibition	Ser13	CDK5
<i>Bik</i>	Phosphorylation	Inhibition	Thr124	ERK1/2
	Phosphorylation	Activation	Thr33, Ser35	CKII
<i>Bmf</i>	Phosphorylation	Inhibition	Ser75, Ser77	ERK2

1.4. Le prix de l'immortalité : Pathologies liées à la folie des protéines de la famille Bcl-2

La famille de protéines Bcl-2 est étroitement liée à la régulation de l'homéostasie cellulaire. Une altération de cette machinerie finement huilée prédispose l'organisme à des pathologies. La découverte des protéines de la famille des Bcl-2 est étroitement liée aux lymphomes B, et plus généralement aux cancers. En effet, depuis leurs découvertes la dérégulation de l'apoptose est un facteur clé de l'oncogénèse. Nous verrons dans cette partie les cancers dans lesquels les protéines Bcl-2 sont impliquées, les conséquences induites, et les solutions développées au cours du temps.

L'évasion à l'apoptose contribue dans les pathologies cancéreuses à plusieurs niveaux. Elle facilite la survie cellulaire, favorise le développement tumoral et les métastases, et confère une résistance aux traitements chimiothérapeutiques. De fait, de nombreux exemples dans la littérature montrent une altération du niveau d'expression des Bcl-2, que ce soit une augmentation des anti-apoptotiques et/ou une diminution des pro-apoptotiques. C'est cette contribution dans les cancers, et en particulier dans le lymphome qui a conduit à la découverte de Bcl-2. Nous verrons ici quelques exemples de la contribution des Bcl-2 dans les cancers.

1.4.1. L'altération de l'expression des Bcl-2 dans les cancers

A. Augmentations de l'expression des anti-apoptotiques

La modulation de l'expression des anti-apoptotiques peut être réalisée à différents niveaux : une translocation chromosomique plaçant le gène cible sous le contrôle d'un promoteur comme *c-myc*, une amplification du gène, une augmentation de l'expression ou encore une augmentation de la stabilité de la protéine. Chaque mécanisme est plus ou moins impliqué selon le type de cancer.

Mise à part la translocation t(14;18) dans les lymphomes folliculaires et diffus à grandes cellules B (Weiss et al., 1987) qui conduit à une surexpression du gène Bcl-2, les translocations impliquant les autres membres de la famille Bcl-2 sont rares. La multiplication des copies de gènes codant les Bcl-2 anti-apoptotiques est bien plus fréquente dans les cancers. Les modèles transgéniques de surexpression des anti-apoptotiques se sont limités aux tissus hématopoïétiques avec une augmentation de Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1. Ces études montrent une prédisposition aux lymphomes, mais l'interprétation de ces études reste relativement limitée. Il faut attendre 2010 pour avoir une étude sur 26 types de tumeurs et plus de 3000 échantillons qui montre une amplification significative des gènes codant pour Mcl-1 et Bcl-xL (respectivement MCL1 et BCL2L1) (Beroukhi et al., 2010). De manière surprenante, l'amplification de Mcl-1 et de Bcl-xL est plus détectée dans les cancers en dehors des lymphomes. Cette analyse est ensuite confirmée par une analyse de la base de données The Cancer

Genom Atlas (TCGA) par le portail cBioportal. On retrouve ainsi une amplification prépondérante de Mcl-1 et dans une plus petite mesure de Bcl-xL (Figure 13) (Campbell and Tait, 2018).

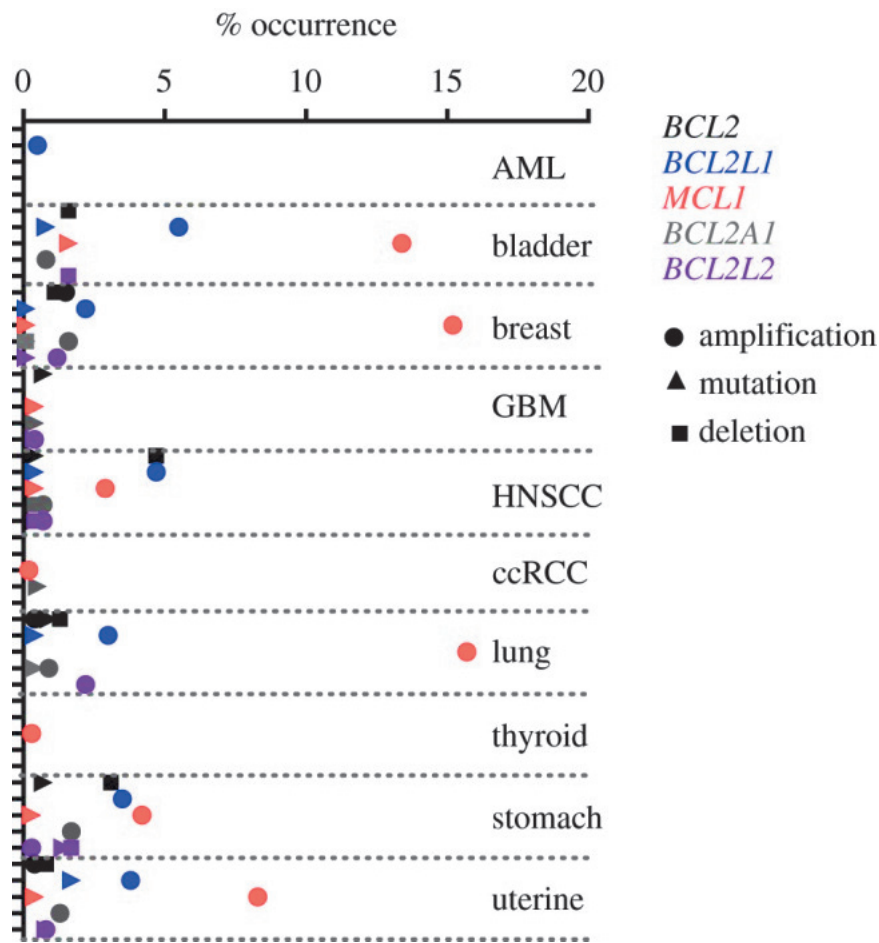


Figure 13 Fréquence des altérations génomiques des Bcl-2 anti-apoptotiques dans les cancers solides
Fréquence d'amplification, mutation et délétion respectivement rond, triangle et carré de Bcl-2, Bcl2L1 (Bcl-xL), Mcl1, Bcl2A1 (Bfl-1), Bcl2L2 (Bcl-W) analysé par cBioportal des données de TCGA (Campbell and Tait, 2018).

Le niveau d'expression des Bcl-2 peut être dû à la perte de microARN (ou microRNA, miR) et à une hypométhylation. Dans plus dans 70% de leucémies lymphoïdes chroniques (LLC), on peut observer une hypométhylation du gène Bcl-2 avec des délétions ou mutations dans les gènes codant miR15 et miR16, répresseur de la transcription de Bcl-2 (Cimmino et al., 2005; Hanada et al., 1993). D'autres altérations sur l'expression sont documentées comme la perte de miR29 dans les LLC et cancers colorectaux (Calin et al., 2005; Cummins et al., 2006). Or miR29 est connu pour être un répresseur de la transcription de Mcl-1, la perte de miR29 affecte alors l'expression et l'apoptose médiée par Mcl-1 (Mott et al., 2007). Plus récemment, l'augmentation de miR-18a dans les hépatocarcinomes a été décrite pour avoir un rôle de promotion de la survie cellulaire en réprimant l'expression de Nrhl/Bcl2L10 (Wang et al., 2018).

Pour finir, un autre mécanisme de régulation passe par les mécanismes de dégradation décrits dans la partie dédiée à l'ubiquitination/protéasome. Dans des tumeurs du sein, l'expression de FBW7 est réprimée conduisant à une accumulation de Mcl-1. Cette accumulation entraîne alors une résistance au Paclitaxel, et plus généralement à une résistance vis-à-vis des poisons du fuseau mitotique (Gasca et al., 2016; Wertz et al., 2011).

Il est cependant à nuancer que l'augmentation des anti-apoptotiques équivaut à un mauvais pronostic et à une résistance thérapeutique. C'est le cas pour Mcl-1 dans les tumeurs du sein où son accumulation est associée à une résistance à la chimiothérapie dans les tumeurs triples négatives (Balko et al., 2014; Campbell et al., 2018). Dans le cas de Bcl-2, une expression élevée est souvent observée dans les cancers du sein, mais s'accompagne d'un pronostic plutôt favorable (Dawson et al., 2010).

B. Diminution de l'expression des pro-apoptotiques

La diminution de l'expression des pro-apoptotiques provoquerait les mêmes conséquences qu'une augmentation des anti-apoptotiques. Cependant pas pour tous les pro-apoptotiques.

La mono délétion des BH3-only dans des modèles murins ne prédispose pas les souris à développer des tumeurs (Labi et al., 2006). Seule la délétion de Bad a induit tardivement des lymphomes B à grandes cellules dans des modèles murins (Ranger et al., 2003). Une autre étude montre que la double délétion de Bim et Bmf donne sensiblement le même résultat qu'une simple délétion, excepté une apparition tardive de maladies liées aux vieillissements (Labi et al., 2014). Ces données démontrent une redondance des activités pro-apoptotiques des BH3-only ; une simple délétion ne possède pas assez de force oncogénique pour initier un cancer. Cependant, dans le cas où il y a une prédisposition à l'initiation tumorale comme une surexpression de *myc*, la délétion de Bim accélère le développement tumoral médié par *myc* (Egle et al., 2004). Cette observation est valable aussi pour la délétion de Puma (et très certainement de Noxa, parce que toutes deux sont régulées par p53) dans les cancers médiés par *myc* (Beroukhim et al., 2010; Garrison et al., 2008).

Concernant Bax/Bak la redondance des fonctions de ces protéines est connue. En effet, un seul allèle sur les quatre suffit à assurer un développement normal. Pour observer un effet et une inhibition de l'apoptose mitochondriale il faudrait que les 4 allèles soient délétés. De plus il semblerait que ce ne soit pas le niveau d'expression absolue de Bax/Bak qui soit important, comme ce dernier a tendance à diminuer avec le vieillissement (Sarosiek et al., 2017), mais plus sa localisation. Dans les leucémies aiguës myéloïdes, les patients ont un meilleur pronostic quand Bax est localisé à la mitochondrie (Reichenbach et al., 2017). Dans des modèles murins avec simple délétion Bax ou Bak, il n'y a pas de

développement tumoral très certainement à cause de la redondance des fonctions. Dans les modèles double KO Bax/Bak les souris meurent au stade embryonnaire (Knudson et al., 1995; Lindsten et al., 2000). Dans les modèles KO conditionnel Bax/Bak dans le système hématopoïétique, les souris meurent de causes auto-immunes (Mason et al., 2013). Le KO conditionnel de Bax/Bak dans le cerveau ou les testicules prédisposaient à un développement tumoral (Katz et al., 2013).

À l'inverse, bien que la perte de Bok est retrouvée dans différents types de cancer (Beroukhim et al., 2010), les études de KO de Bok^{-/-} ont montré peu d'effets phénotypiques dans les modèles murins. La perte de Bok^{-/-} dans les souris *Eu-myc* n'a pas prouvé son rôle de facteur suppresseur de tumeur (Ke et al., 2012). Plus récemment dans un modèle murin d'hépatocarcinogenèse induit par exposition à la diéthylnitrosamine, il est montré que les hépatocarcinomes Bok^{-/-} prolifèrent moins et augmentent l'expression des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire. Bok aurait alors un rôle dans la régulation du cycle cellulaire (Rabachini et al., 2018). Par ailleurs, une nouvelle étude apporte un nouvel éclairage sur la fonction phénotypique de Bok. Bok est impliqué dans la biosynthèse de l'uridine et interagit avec l'uridine monophosphate synthétase. La perte de Bok induit une résistance à la 5-FU (5-fluorouracile) dans les lignées cellulaires et tissus primaires colorectaux (Srivastava et al., 2019).

1.4.2. Résistance aux thérapies

La résistance à la mort induite par stimuli est souvent corrélée à une résistance à la mort médiée par les Bcl-2. En effet la surexpression des Bcl-2 anti-apoptotiques est responsable par exemple de résistance contre le stress environnemental comme le milieu pauvre en facteur de croissance, l'hypoxie ou le stress oxydatif. Mais elle est responsable aussi de la résistance des cancers aux traitements chimiothérapeutiques sans différenciation de mode d'action. Les drogues cytotoxiques « classiques », par exemple les drogues ciblant la réplication de l'ADN, les microtubules, les anti-oestrogènes, dépendent en grande partie de l'activation de l'apoptose mitochondriale induite en amont pour tuer les cellules cancéreuses (Debatin et al., 2002; Reed, 2008). Les protéines Bcl-2 confèrent donc une résistance innée contre les thérapies cytotoxiques à la cellule cancéreuse. Le niveau d'expression des Bcl-2 est alors un indice, un facteur pronostique utilisable pour prédire une réponse à traitement en fonction du niveau d'expression dans certains types de cancers comme les leucémies, les cancers du sein ou du poumon (Campbell et al., 2018; Han et al., 2015; Nougarede et al., 2018; Yang et al., 2013; Zhou et al., 2019).

Les Bcl-2 sont des cibles très intéressantes en thérapie ciblée dans le but de moduler la sensibilité des cellules cancéreuses aux traitements cytotoxiques et de rétablir l'apoptose.

1.5. Rétablir la balance

Cibler les Bcl-2 pour faire pencher la balance en faveur des anti-apoptotiques peut avoir un réel impact dans le traitement des cancers, à condition de cibler les bons Bcl-2. Les cytotoxiques traditionnels ciblant l'ADN comme l'Étoposide, induit une augmentation du gène tumeur suppresseur p53 puis lui-même entraîne une augmentation des BH3-only Puma et Noxa (Luo et al., 2005; Villunger et al., 2003). Néanmoins la seule augmentation des BH3-only ne suffit pas à faire pencher la balance, empêchée par la protection induite par une surexpression des anti-apoptotiques dans les cancers. Dans un premier temps, la stratégie commune était donc d'antagoniser directement les anti-apoptotiques en introduisant des interactants mimant la liaison des anti-apoptotiques / BH3-only : les BH3 mimétiques. Les BH3-mimétiques ciblent en particulier la région de la poche hydrophobe des Bcl-2 anti-apoptotiques.

1.5.1. Antagonistes des anti-apoptotiques

Dans un premier temps nous allons voir les petites molécules organiques antagonistes des anti-apoptotiques, puis les peptido-mimétiques mimant le BH3 des Bcl-2, et enfin d'autres stratégies plus diverses.

1.5.1.1. « Pan-Bcl2 » inhibiteurs

Avant l'arrivée des inhibiteurs spécifiques, un certain nombre de « Pan-Bcl2 » ont été identifiés. Les « Pan-Bcl2 » sont des inhibiteurs non spécifiques des Bcl-2 dont les mécanismes d'action ne sont pas toujours très bien connus.

- **Obatoclox mesylate**

Obatoclox ou GX15-070 est un Pan-Bcl2 inhibiteur hydrophobe issu de la famille des prodigiosines bactérien. Obatoclox a démontré une liaison à faible affinité (entre 1-10 μ M) avec les 6 Bcl-2 anti-apoptotiques lors de sa découverte (Nguyen et al., 2007). Il semblerait en réalité que son mécanisme d'action passe par l'inhibition de Mcl-1 (Nguyen et al., 2015). Après avoir démontré des résultats concluants sur des modèles murins (hématopoïétique et poumon), le développement de l'Obatoclox est interrompu avant son entrée en phase clinique III, possiblement du fait des résultats modestes et des effets indésirables (EI) sur le système nerveux central (Arellano et al., 2014; Goy et al., 2014; Opydo-Chanek et al., 2017).

- **Gossypol et dérivées**

AT-101 ou gossypol de première génération est un dérivé phénolique du cotonnier découvert initialement en tant qu'inhibiteur de Bcl-xL puis qui a montré aussi des inhibitions sur Bcl-2, Mcl-1 et

Bcl-w avec une affinité *in vitro* autour du μM . AT-101 a aussi montré de bons résultats pour l'induction d'apoptose dans des leucémies (Kitada et al., 2003; Zerp et al., 2009). Cependant, à l'image de l'Obatoclax, AT-101 a des résultats modestes et/ou sans efficacité en phase clinique pour les cancers du poumon à petites cellules (Heist et al., 2010), pour le cancer de la prostate (MacVicar et al., 2008) et plus récemment dans les cancers du cou et de la tête (Swiecicki et al., 2016).

Ainsi une deuxième génération de gossypol a été développée pour améliorer les effets anticancéreux. On y retrouve les composés TW-37, BI-97Cl/Sabutoclax et Ch282-5. Ch282-5 a montré des résultats intéressants pour les cancers colorectaux (Wang et al., 2016). TW-37 a été développé pour avoir plus d'affinité avec Bcl-2 et Mcl-1 avec une interaction moindre pour Bcl-xL. *In vitro* ce composé a montré une activité intéressante, mais n'a pas encore fait l'objet d'études cliniques (Ashimori et al., 2009; Mohammad et al., 2007; Wang et al., 2006).

- **ABT-737 / ABT-263**

ABT-737 est le premier « vrai » inhibiteur des Bcl-2. Il est issu d'une conception méthodique par résonance magnétique nucléaire (RMN), de chimie combinatoire et de biologie structurale basée sur l'affinité avec la poche hydrophobe formée par BH3. C'est le premier d'une série de molécules thérapeutiques : les BH3-mimétiques. En effet ABT-737 a été conçu pour avoir une forte affinité avec les Bcl-2 anti-apoptotiques, de l'ordre du nanomolaire pour Bcl-xL, Bcl-w et Bcl-2, mais pas pour Mcl-1 ou Bcl2A1/Bfl ($K_i > 1\mu\text{M}$) (K_i est la constante de dissociation obtenue par inhibition de la fixation d'un ligand et reflète l'affinité du ligand pour le récepteur) (Oltersdorf et al., 2005). ABT-737 a montré des résultats très intéressants dans les modèles *in vivo* de leucémies et de cancer du sein (Del Gaizo Moore et al., 2008; Oakes et al., 2012). Cependant son utilisation en essais cliniques est limitée du fait de ses propriétés pharmacocinétiques. La molécule est faiblement soluble dans l'eau et a une faible biodisponibilité. Un analogue est alors trouvé, l'ABT-263 ou Navitoclax. Ce dérivé est disponible en forme orale, possède les mêmes sélectivités et activités anticancéreuses que l'ABT-737 (Tse et al., 2008). Le Navitoclax a montré dans les études cliniques une régression encourageante chez les patients atteints de tumeurs du poumon à petites cellules et dans des leucémies (Kipps et al., 2015; Rudin et al., 2012; Tolcher et al., 2015). Cependant, un point négatif est soulevé au vu de la sévère thrombocytopenie induite (Tse et al., 2008). La survie des plaquettes étant corrélée aux Bcl-2 et notamment Bcl-xL (Wagner et al., 2000; Zhang et al., 2007), l'utilisation en thérapie du Navitoclax est alors problématique. C'est ainsi qu'un autre dérivé a vu le jour, avec une spécificité unique à Bcl-2 : l'ABT-199 ou Venetoclax.

1.5.1.2. Petites molécules inhibitrices spécifiques

La stratégie des inhibiteurs de Bcl-2 ayant montré des résultats très encourageants, mais des effets secondaires assez prohibitifs sur leur utilisation. Des inhibiteurs spécifiques de Bcl-2 ont vu alors le jour comme l'ABT-199.

- **Inhibiteur de Bcl-2 : ABT-199**

ABT-199 ou Venetoclax a été développé pour pallier la thrombocytopénie induite par l'ABT-737 et le Navitoclax. Le Venetoclax possède une très forte affinité et spécificité pour Bcl-2 ($K_i < 0,010\text{nM}$), 4000 et 2000 fois plus que pour Bcl-xL et Bcl-w (Souers et al., 2013). La haute spécificité est modulée par la liaison du Venetoclax avec la poche hydrophobe et l'arginine 103 de Bcl-2. À ce jour, le Venetoclax est le seul BH3-mimétique approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) en tant qu'agent anti-cancéreux. Le Venetoclax a montré des effets dans les modèles *in vivo* dans les leucémies (chroniques et aiguës) et les tumeurs du sein (Peirs et al., 2014; Vaillant et al., 2013; Vandenberg and Cory, 2013). Mais surtout le Venetoclax a démontré une vraie efficacité en phase clinique dans les lymphomes. En monothérapie dans les leucémies chroniques, 20% de patients ont eu une réponse complète et 79% une réponse partielle (Roberts et al., 2016). En co-thérapie avec le Rituximab, 51% des patients présentent une réponse complète et une période sans rechute de 2 ans (Seymour et al., 2017). D'autres études montrent une réponse encourageante dans les lymphomes non-Hodgkiniens en simple ou co-thérapie (Konopleva et al., 2016). D'autres études sont en cours pour évaluer l'efficacité du Venetoclax dans d'autres tumeurs comme les cancers du poumon et du sein (Lochmann et al., 2018; Lok et al., 2019)

- **Inhibiteur de Bcl-xL : WEHI-539 / A-1155463**

Similairement au Venetoclax, les molécules WEHI-539 et sa version améliorée A-1155463 sont découvertes par approche rationnelle basée sur la structure de Bcl-xL. WEHI-539 et A-1155463 ont respectivement un $K_i < 1\text{nM}$ et $K_i < 0,001\text{nM}$ montrant une forte affinité pour Bcl-xL. Néanmoins, comme le Navitoclax, les inhibiteurs de Bcl-xL induisent une thrombocytopénie certes réversible, mais inutilisable en clinique. Ils restent utiles comme outils de recherche pour comprendre les mécanismes de Bcl-xL (Lessene et al., 2013; Tao et al., 2014).

- **Inhibiteur de Mcl-1 : A-1210477 / S63845 / AMG176**

La résistance aux anticancéreux ne concerne pas que les composés cytotoxiques classiques, mais aussi les BH3-mimétiques. Ainsi il est observé une augmentation de Mcl-1 dans les cellules cancéreuses en réponse aux traitements de BH3-mimétiques (Konopleva et al., 2006). La découverte d'inhibiteurs spécifique de Mcl-1 est plus récente que celle pour Bcl-2. À ce jour un certain nombre de BH3-

mimétiques ont été développés dont le maritoclax (Doi et al., 2012), l'A-1210477 ($K_i=0,45\text{nM}$) (Leverson et al., 2015), l'UMI-77 ($K_i=490\text{nM}$) (Abulwerdi et al., 2014), le S63845 ($K_i=0,19\text{nM}$) (Kotschy et al., 2016) et son dérivé MIK665/S64315, l'AMG176 ($K_i<1\text{nM}$) (Caenepeel et al., 2018), et pour finir l'AZD5991 (Hird et al., 2017). Ces composés montrent de bons résultats d'inhibitions de Mcl-1 et d'efficacité antitumorale *in vitro* et *in vivo*, par exemple l'A-1210477 en simple ou en co-thérapie avec le Navitoclax (Leverson et al., 2015). Les composés MIK665/S64315 et l'AMG176 sont eux en phase clinique 1 d'essai clinique pour le traitement des cancers hématopoïétiques.

Néanmoins, nous manquons de recul vis-à-vis des données récentes pour conclure quant à une efficacité réelle des inhibiteurs de Mcl-1.

- **Inhibiteur de Bcl2L10/Nrh : ML258**

ML258 est un BH3-mimétique de Nrh avec un $K_i = 286\text{nM}$. Ce composé n'a pas montré de résultats significatifs en modèle *in vivo*, et pour l'instant il n'existe pas d'autre inhibiteur spécifique de Nrh (Jiwen Zou, 2011).

1.5.1.3. BH3-peptides

Les peptides sont une stratégie visant à créer une compétition avec le ligand endogène dans le site actif afin d'inhiber l'activité de la protéine visée. Les peptides miment la fixation du ligand dans le site actif. Nous allons voir ici quelques exemples de peptides générés à des fins thérapeutiques.

- **Les SAHB peptides**

Les SAHB peptides pour "Stabilized Alpha-Helix of Bcl-2 domain" peptides ou simplement stabled peptide est une stratégie de modification de BH3 peptides visant à améliorer les propriétés pharmacocinétiques et dynamiques de ces derniers. Cette modification stabilise la conformation hélicoïdale du peptide BH3, diminue sa vitesse de dégradation dans l'organisme, augmente la perméabilité membranaire (peptides = grosse protéine avec difficulté à traverser la membrane lipidique) et améliore l'affinité avec la poche hydrophobe des Bcl-2 anti-apoptotiques (Walensky et al., 2006). Le peptide Bid-BH3 SAHB ainsi modifié améliore son affinité avec Bcl-2 de 6 fois ($K_i 39\text{nM}$ contre 269nM sans modification). Cependant cette modification entraîne parfois des effets inattendus. Le peptide Bim-BH3 SAHB via l'interaction avec Bax peut induire l'apoptose dans les modèles de xénogreffes de leucémies (LaBelle et al., 2012). Cependant l'interaction du peptide modifié avec Bax peut conduire à une inactivation de Bax dans certaines conformations du peptide avec Bax (Verma et al., 2016). Comme la technologie est assez récente, il faut donc l'utiliser avec précautions.

- **NOXA-derived**

Il existe plusieurs versions du peptide BH3-Noxa. En effet ce dernier est l'objet de modifications chimiques comme le SAHB. Le peptide Noxa sans modification a une affinité spécifique pour Mcl-1 de l'ordre du nanomolaire et très peu pour Bcl-xL (1000 moins que pour Mcl-1). En greffant un groupement bisphénol on arrive à améliorer ses propriétés pharmacodynamiques comme pour la modification SAHB (Muppidi et al., 2012; Muppidi et al., 2014).

1.5.1.4. Inhibiteurs du BH4

La modulation de l'apoptose est modulée de façon canonique via l'interaction des domaines BH3 des protéines Bcl-2 anti-apoptotiques leurs antagonistes pro-apoptotiques. Cependant d'autres protéines peuvent se lier aux Bcl-2 via les autres domaines BH, en particulier le BH4 (Liu et al., 2016b). Dans ce contexte des stratégies d'inhibitions du BH4 sont apparues.

1.5.1.4.1. BH4-peptides

- **BIRD-2, peptide BH4 de Bcl-2**

Le domaine BH4 de Bcl-2 est connu pour se lier au canal calcique IP3R1 (Inositol trisphosphate receptor 1), inhibant la sortie du calcium de l'ER et donc l'induction de l'apoptose (Rong et al., 2009a). L'interaction IP3R1 avec les Bcl-2 sera détaillée dans la partie dédiée au calcium. C'est dans le but de restaurer l'apoptose médiée par le calcium qu'un peptide BH4 a été développé : le peptide BIRD-2 pour Bcl-2 IP3 Receptor Disruptor-2. BIRD-2 est un peptide de 20 acides aminés responsable de l'interaction avec la région modulaire du récepteur IP3, fusionné avec une séquence de perméabilité membranaire TAT. BIRD-2 inhibe spécifiquement l'interaction de Bcl-2 avec IP3R1 sans affecter l'interaction Bim-Bcl-2 (Rong et al., 2009b). BIRD-2 provoque la sortie de calcium et une induction de la mort cellulaire dans de multiples modèles de leucémies, lymphomes, cancer du poumon à petites cellules et pancréatite aiguë (Bittremieux et al., 2019; Bittremieux et al., 2018; Lavik et al., 2015; Zhong et al., 2011). De plus l'action de BIRD-2 combinée à des BH3-mimétiques a montré des résultats prometteurs dans le cancer du poumon à petites cellules (Lavik et al., 2015). Ces 2 approches peuvent être complémentaires sachant qu'elles ne ciblent pas les mêmes domaines et localisation cellulaire de Bcl-2. Il reste néanmoins à nuancer que les mécanismes d'action de BIRD-2 ne sont pas encore totalement compris, des études sont en cours pour analyser tout le potentiel de ce peptide (Kerkhofs et al., 2019).

- **Peptide Nrh-BH4**

Suivant la même logique du peptide BIRD-2, notre équipe a développé un peptide BH4 ciblant l'anti-apoptotique Nrh/Bcl2L10. Ce peptide a montré une inhibition de l'interaction Nrh avec le récepteur IP3R1. Les résultats sont concluants sur les modèles *in vivo* de xéno greffes de cancer du sein (Nougarede et al., 2018).

1.5.1.4.2. *Inhibiteurs non peptidiques de BH4*

- **BDA-366**

BDA-366 est le produit d'un criblage *in silico* ciblant le BH4 de Bcl-2. BDA-366 se lie sur le domaine BH4 de Bcl-2 induisant une exposition du domaine BH3 et le site de liaison aux pro-apoptotiques. En quelque sorte BDA-366 agit comme un agent de conversion de Bcl-2 en pro-apoptotique (Han et al., 2015). BDA-366 affecte également la phosphorylation sur la Ser70 de Bcl-2 (Deng et al., 2016). La molécule a montré une efficacité dans les lignées de cancers du poumon à petites et grandes cellules (Han et al., 2015). Une autre étude a démontré l'efficacité de la molécule dans des modèles de myélomes multiples avec de faibles toxicités sur les cellules saines (Deng et al., 2016). Par ailleurs, une résistance au Venetoclax semble induire une cross-résistance au BDA-366 (Kerkhofs et al., 2020). Plus récemment, une étude a étudié plus en détail le mécanisme d'action de BDA-366. BDA-366 inhibe la voie Akt provoquant indirectement la déphosphorylation de Bcl-2 et provoque également une diminution de Mcl-1 (probablement en affectant son turn-over). Cependant contrairement au peptide BIRD-2 de Bcl-2, BDA-366 ne semble pas affecter l'homéostasie calcique de la cellule (Vervloessem et al., 2020).

1.5.2. *Activation des pro-apoptotiques Bax/Bak*

En plus d'inhiber les anti-apoptotiques, une autre stratégie est d'activer directement Bax et Bak pour initier l'apoptose. Nous verrons dans ce point les dérivés de peptides BH3-only et les petites molécules inhibitrices connues pour leurs effets sur Bax / Bak. Ces activateurs sont pour le moment plus utilisés en recherche qu'en clinique dans un but thérapeutique.

1.5.2.1. *Peptides BH3-only*

- **Peptide BID**

In vitro le peptide BH3 Bid SAHB_A a montré une activation avec Bax de l'ordre du nanomolaire. Ce peptide a été conçu pour montrer une activation directe de Bax par Bid dans la cascade apoptotique

(Walensky et al., 2006). C'est également dans le papier de Walensky que des tests de peptides d'activation de Bax par les stapled peptides BH3 Bim ont été conçus.

- **Peptide BIM**

Le peptide BH3 Bim SAHB a démontré une interaction directe avec Bax et une inhibition non spécifique des anti-apoptotiques Bcl2. De plus cette interaction s'effectue dans une autre zone que la poche hydrophobe, et de cette réaction résulte un réarrangement de conformation de Bax conduisant à l'activation de ce dernier (Gavathiotis et al., 2010; Gavathiotis et al., 2008).

- **Peptide PUMA**

Le peptide BH3 Puma est démontré par SPR (surface plasmon resonance) comme un partenaire direct de Bax avec une affinité de l'ordre du nanomolaire. L'interaction du peptide induit l'oligomérisation de bax et l'apoptose qui en découle. Ce peptide a permis de confirmer que Puma était un activateur direct de Bax au même titre que Bim ou tBid (Dai et al., 2014). La version modifiée de Puma en stapled SAHB a aussi été testée. Similairement au peptide Bim modifié, le stapled peptide de Puma se fixe dans une autre zone que la poche hydrophobe habituelle et avec une meilleure affinité. Cela suggère l'existence d'une activation de Bax non canonique par Puma (Edwards et al., 2013).

1.5.2.2. *Activateurs non peptidiques*

- **Bam-7**

Bam-7 et son dérivé amélioré par optimisation structurelle BTC-8 sont des petites molécules organiques activatrices directs de Bax. Bam-7 est découvert par criblage sur le site d'interaction non canonique du peptide Bim SAHB avec Bax (Gavathiotis et al., 2012). Le composé BTC-8 présente une meilleure efficacité *in vivo* que Bam-7. BTC-8 induit une translocation de Bax à la mitochondrie qui conduit à l'activation de l'apoptose par la mitochondrie (Stornaiuolo et al., 2015). BTC-8 a surtout démontré une sélectivité par rapport aux tissus cancéreux sans pour autant affecter les cellules saines (Stornaiuolo et al., 2015).

- **Composé 106/ ZINC 14750348**

Le composé 106 activateur de Bax est créé *in silico* par un criblage virtuel à partir de la chimiothèque ZINC sur la zone d'interaction canonique de Bax (poche hydrophobe BH3). Le composé 106 est celui qui a montré la meilleure cytotoxicité dose et Bax dépendants (Zhao et al., 2014).

- **SMBA et dérivés**

L'induction de la phosphorylation sur la Ser184 de Bax par la nicotine inhibe son activité pro-apoptotique (Xin and Deng, 2005). Cette découverte a conduit au développement d'une série de nouvelles molécules visant à activer l'activité pro-apoptotique de Bax. Suite à un criblage virtuel sur la zone autour de la Ser184, les composés SMBA1, SMBA2 et SMBA3 ont été développés. Les composés SMBA1-3 ont des affinités de l'ordre du nanomolaire pour Bax et du micromolaire pour les Bcl-2 anti-apoptotiques et pour Bak (Xin et al., 2014). Ces composés ont montré des résultats probants *in vivo* contre les lignées de cancer du poumon A549 et H1299, et dans un modèle de xénogreffe avec la lignée A549 (Liu et al., 2016a). Plus récemment, un nouvel analogue, le CYD-2-11 est synthétisé à partir de SMBA1 dans le but d'augmenter l'efficacité anti-tumorale contre les carcinomes du poumon à grandes et petites cellules. De plus il est montré un effet synergique avec un inhibiteur de mTOR (RAD001) (Li et al., 2017).

1.5.3. Autres stratégies thérapeutiques :

1.5.3.1. Agents de conversion

Dans cette partie nous abordons une classe particulière de molécules à visée thérapeutique. Certaines protéines ont la capacité de convertir les anti-apoptotiques Bcl-2 en pro-apoptotique. C'est une stratégie où on utilise la surexpression des Bcl-2 dans les cancers contre eux.

- **Peptide Nur-77**

Nur77/NR4A1 ou facteur de croissance nerveuse IB est décrit comme un facteur de transcription capable de fixation protéique. L'inhibition de Nur77 a pour conséquence l'abolition de l'apoptose et la promotion de la survie de lymphocytes T auto-réactives, éliminés en conditions physiologiques (Zhou et al., 1996). Nur77 est décrit comme pouvant moduler directement l'apoptose en se fixant en N-terminal des Bcl-2 anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Nrh (Lin et al., 2004). Sa fixation au domaine N-terminal des protéines induit un changement de conformation, ouvrant ainsi de manière similaire aux peptides BH4, l'accès de la poche hydrophobe BH3 pouvant interagir avec les BH3-only. De fait, cela peut faciliter l'induction de l'apoptose.

Un peptide de 9 acides aminés de Nur77, NuBCP, couplé à un groupement de pénétration a montré les mêmes propriétés de conversion que Nur77 sur les Bcl-2. NuBCP peut se lier à Bcl-2, Nrh et Bfl-1, mais pas Bcl-xL, Bcl-w ou Mcl-1. À ce jour, des études sont en cours pour affiner/améliorer les propriétés de pénétration et de pharmacocinétiques de ce peptide ; et de le tester avec des combinaisons de drogues (Gupta et al., 2018; Kumar et al., 2014).

1.5.3.2. *Inhiber la transcription*

Oblimersen est une séquence nucléotidique antisens de 18 bases qui cible directement le mRNA codant la protéine Bcl-2. L'utilisation du Oblimersen est très limitée puisqu'en clinique, l'Oblimersen n'a pas montré de résultats significatifs en utilisation seule ou en utilisation combinée pour le moment (Galatin et al., 2011; O'Brien et al., 2009).

1.5.3.3. *Augmenter la dégradation : les PROTAC*

Les PROTAC pour Proteolysis targeting chimera sont une stratégie de création d'une molécule bifonctionnelle se fixant à une cible, dont le but final est la dégradation par le système ubiquitin/protéasome. La molécule est composée de trois parties, une « tête chercheuse » pouvant se lier à la cible, un ligand de l'ubiquitin ligase E3 et un linker pour séparer les deux parties. Ce système connu depuis le début du millénaire a longtemps été considéré comme une curiosité scientifique. Même si les premiers PROTAC avaient donné des résultats convaincants, le système manquait de charme (Sakamoto et al., 2001). Les substrats d'ubiquitine d'origine naturelle posaient le problème de leurs grandes tailles, de leurs faibles pénétrations cellulaires et de leurs propriétés pharmacocinétiques. Il a fallu attendre les années 2014-2015 pour qu'une série de publications relance l'intérêt de la stratégie. Notamment avec le développement de deux grandes séries de ligands de l'E3 ligase plus petits et plus affins : les VHL (von Hippel-Lindau) (Buckley et al., 2015; Zengerle et al., 2015) et les dérivés de thalidomide (Lu et al., 2014a). Les PROTAC ont plusieurs avantages dont la possibilité de potentialiser des drogues existantes et de diminuer leurs toxicités.

Le PROTAC DT2216, une modification du Navitoclax/ABT-263, a montré une réduction de la toxicité sur les plaquettes en plus d'une augmentation de l'effet anti-tumoral sur des modèles de leucémies aiguës versus l'ABT-263. De plus le DT2216 a une spécificité améliorée pour Bcl-xL par rapport à Bcl-2, et possède un effet synergique avec d'autres inhibiteurs de Bcl-2 comme l'ABT-199 *in vivo* sur des modèles de cancer du sein (Khan et al., 2019). L'utilisation de deux autres PROTACs C3 et C5 dérivés de l'A-121047 (inhibiteur Mcl-1) ont montré une diminution de l'expression de Mcl-1 combinée à une activité antitumorale (Wang et al., 2019). D'autres PROTACs peuvent cibler la famille des Bromodomaines, régulateurs épigénétiques modulant l'expression des protéines Bcl-2 comme Bcl-2, Mcl-1 ou Bad, avec des résultats significatifs dans les modèles de leucémies et d'hépatocarcinomes (Saenz et al., 2017; Sun et al., 2018; Zhang et al., 2020).

Par ailleurs, une étude récemment parue a comparé les différents BH3 mimétiques cités ci-dessus sur la base de 3 critères afin de déterminer le niveau d'efficacité de chacun. Ainsi les chercheurs se sont basés sur la spécificité/sélectivité d'induction de la perméabilisation de la mitochondrie et à l'efficacité

de la mort induite. Ainsi le Venetoclax est un excellent BH3 mimétique avec beaucoup de spécificité et de sélectivité pour Bcl-2. Pour Mcl-1, c'est le composé AZD5591 qui est montré comme étant le plus efficace. Dans la même étude, BDA-366 est aussi testé et de manière remarquable, le composé induit une augmentation de la mort indépendamment de Bax/Bak. Cela suggère donc un autre mécanisme de mort lorsque le domaine BH4 est ciblé (Villalobos-Ortiz et al., 2020). Ce mécanisme peut-être lié au calcium ? En référence au peptide BIRD-2 de Bcl-2 qui inhibe l'interaction du récepteur IP3 avec Bcl-2.

Tableau 3 Les stratégies thérapeutiques anti-Bcl-2. (ND : non déterminé)

Stratégie	Classe thérapeutique	Composé / molécule	Cibles	Efficacité clinique	Statut développement
Antagoniste anti-apoptotique	Inhibiteur multi cibles « Pan-Bcl-2 »	Obatoclax	Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1, Bfl-1, Nrh	Oui /Non	Arrêt phase III clinique
		Gossypol / AT-101	Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1	Oui /Non	Phase clinique I/II
		ABT-737	Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W	Oui	Arrêt / faible biodisponibilité
		ABT-263	Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W	Oui	Phase clinique / limitée EI sévère
	Inhibiteur spécifique BH3-mimétique	ABT-199 / Venetoclax	Bcl-2	Oui	Approuvé par FDA
		MIK665/ S64315	Mcl-1	ND	Phase I héματο
		AMG176	Mcl-1	ND	Phase I héματο
		A-1210477	Mcl-1	ND	<i>In cellulo</i>
		AZD5991	Mcl-1	ND	Phase I héματο
		WEHI-539 / A-1155463	Bcl-xL	Oui	Phase clinique / limitée EI sévère
		ML258	Nrh	ND	Arrêt
	Inhibiteur spécifique BH4-mimétique	BDA-366	Bcl-2	ND	Modèles Murins
	Peptide BH3	Bid /Bid SAH _B	Bcl-2	ND	ND
		Noxa BH3	Mcl-1	ND	ND
	Peptide BH4	BIRD-2	Bcl-2 / IP3R	ND	ND
		Nrh-BH4	Nrh/ IP3R	ND	Modèles murins

Agoniste pro-apoptotique	Peptides	Bim / Bim SAHB _A	Bax	ND	Études cellulaires
		Bid / Bid SAHB _B	Bax		
		Puma / Puma SAHB _B	Bax		
	Petites molécules	Bam-7	Bax	ND	Études cellulaires
		ZINC 14750348	Bax	ND	
		SMBA1-3	Bax	ND	
Autres	Agent conversion	NurBCP-9	Bcl-2, Nrh, Bfl-1	ND	Développement Biodistribution
	Inhibiteur transcription	Oblimersen	mRNA Bcl-2	Non	Arrêt
	PROTAC	DT2216	Bcl-xL	ND	Études cellulaires
		C3 /C5	Mcl-1	ND	

2. Le calcium, la monnaie de conversion des protéines Bcl-2

2.1. Homéostasie calcique en quelques mots

L'ion calcium Ca^{2+} est un second messager intracellulaire indispensable à de nombreux processus physiologiques cellulaires comme le métabolisme, la migration, l'activation des voies de signalisation et de la mort cellulaire. On distingue deux compartiments calcique dans l'organisme, l'extracellulaire et l'intracellulaire. Le calcium intracellulaire est réparti en différentes fractions : une fraction libre cytosolique avec une valeur basale entre 50 et 100nM, et une fraction stockée dans les différents organites, par ordre d'importance le réticulum endoplasmique, la mitochondrie, l'appareil de Golgi et les lysosomes. Le Ca^{2+} dans le compartiment extracellulaire est 10^4 fois supérieur à la fraction du cytosol. Les membranes cellulaires étant perméables au Ca^{2+} , le différentiel de concentration suggère une régulation permanente du Ca^{2+} cytosolique. On y observe des oscillations de concentration Ca^{2+} cytosolique jusqu'à 100 fois la concentration basale, mais de manière transitoire. L'augmentation du Ca^{2+} cytosolique peut venir de l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire ou du relargage de Ca^{2+} stockés dans les organites. Les protéines de la famille Bcl-2 sont des partenaires des canaux calciques au RE et à la mitochondrie. De fait, les protéines Bcl-2 modulent le flux calcique intracellulaire et contrôlent potentiellement tout processus physiologique ayant besoin de Ca^{2+} (Figure 14). Dans cette partie 2, nous allons résumer les modulations des flux calciques par les protéines Bcl-2 à la mitochondrie et au RE (Berridge et al., 2000; Clapham, 2007).

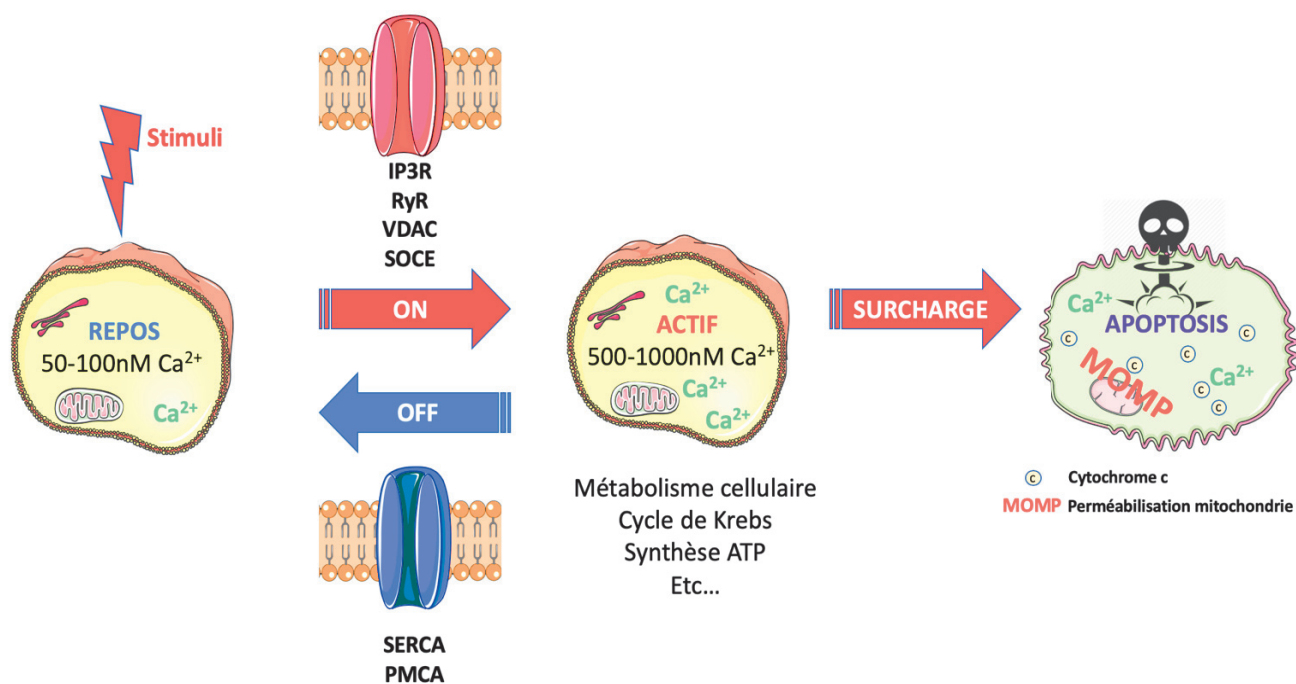


Figure 14 Schéma simplifié des éléments clés de la régulation du calcium et conséquences intracellulaires.

2.2. Modulation au niveau du réticulum endoplasmique

Pendant longtemps un certain nombre d'études ont montré l'implication des Bcl-2 dans la régulation du flux calciques, sans pour autant en comprendre les mécanismes sous-jacents. Ainsi il est montré qu'une accumulation de Bax au RE entraînait une diminution du calcium stocké à l'intérieur (Nutt et al., 2002). Cette observation est confirmée dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) KO Bax/Bak, où la concentration de calcium intra-réticulaire est diminuée par rapport aux cellules contrôles et une surexpression de SERCA corrige cette diminution (Scorrano et al., 2003). Ensuite l'interaction de Bcl-2 avec les récepteurs IP3R est formellement identifiée. Bcl-2 module le flux calcique en réponse à l'IP3 (Chen et al., 2004). À ce jour, 4 membres des Bcl-2 sont identifiés comme partenaire des récepteurs IP3R : Bcl-2 (Chen et al., 2004), Bcl-xL (White et al., 2005), Mcl-1 (Eckenrode et al., 2010) et Nrh (Popgeorgiev et al., 2011). En note, l'interaction avec le réticulum sera abordée plus en détail dans la partie 3.

2.2.1. Les récepteurs IP3 : les canaux du calcium

Les récepteurs IP3 (IP3R) doivent leurs noms à leur principal ligand, l'inositol 1,4,5 triphosphates (IP3). Le premier récepteur à l'IP3 identifié est initialement nommé P400 puis IP3R1 (Miyawaki et al., 1990). Puis deux autres homologues furent identifiés, IP3R2 et IP3R3 avec entre 60-80% d'homologie de séquence (Blondel et al., 1993; Sudhof et al., 1991). Ce sont de très grosses protéines transmembranaires du réticulum (>2500 acides aminés) s'assemblant en tétramère pour former le canal (Figure 15.A-B) (Fan et al., 2015). L'ouverture du tétramère se fait après fixation de ligand IP3 ou du calcium, libérant le calcium du RE vers le cytosol.

2.2.1.1. Structure des IP3R

Le monomère de l'IP3R est divisé en plusieurs domaines fonctionnels. La délimitation des domaines a été décidée à partir de la séquence IP3R1 de la souris. À partir du côté N-terminal du monomère, on distingue le domaine suppresseur (SD, 1 à 225), le binding domaine (α et β , 226 à 578) où se lie l'IP3, les domaines modulateurs et de transduction 1 à 3 (MTD, 579 à 2249), le domaine formant le canal (CFD) et le domaine de couplage (CD) (Figure 15.C). Les monomères peuvent alors former des tétramères, aussi bien homo qu'hétéro-tétramères via le côté C-terminus (Maeda et al., 1991; Monkawa et al., 1995). Il est à noter qu'il existe des versions issues d'épissage alternatif. Par exemple pour IP3R1, il existe trois variants et des variations tissu-dépendant au sein de chaque variant. On peut dénombrer jusqu'à 48 sous-unités différentes pour former le canal IP3R1 (Foskett et al., 2007; Nakagawa et al., 1991). De plus, chaque type cellulaire exprime majoritairement une forme d'IP3R avec plus ou moins un autre isoforme (Vermassen et al., 2004).

Les isoformes ne possèdent pas tous la même affinité pour l'IP3. L'affinité pour IP3 est modulée par le domaine suppresseur (Iwai et al., 2007). Ce dernier régule également l'ouverture du canal puisqu'un mutant délété du domaine suppresseur ne peut libérer le calcium même lors de la fixation de l'IP3 (Uchida et al., 2003). Le domaine MTD est important, car c'est une région de fixation de nombreux régulateurs de l'IP3R. Sa délétion entraîne par ailleurs le non fonctionnement du canal IP3R comme avec le domaine suppresseur (Uchida et al., 2003). Le domaine formant le canal est formé de 6 segments transmembranaires permettant le passage du calcium du RE vers le cytosol. Et enfin le canal couplage permet de coupler le BD avec le domaine canal. La structure entière de l'IP3R1 est élucidée grâce à la cryo-microscopie électronique permettant une meilleure compréhension des mécanismes liées à l'IP3R (Fan et al., 2015).

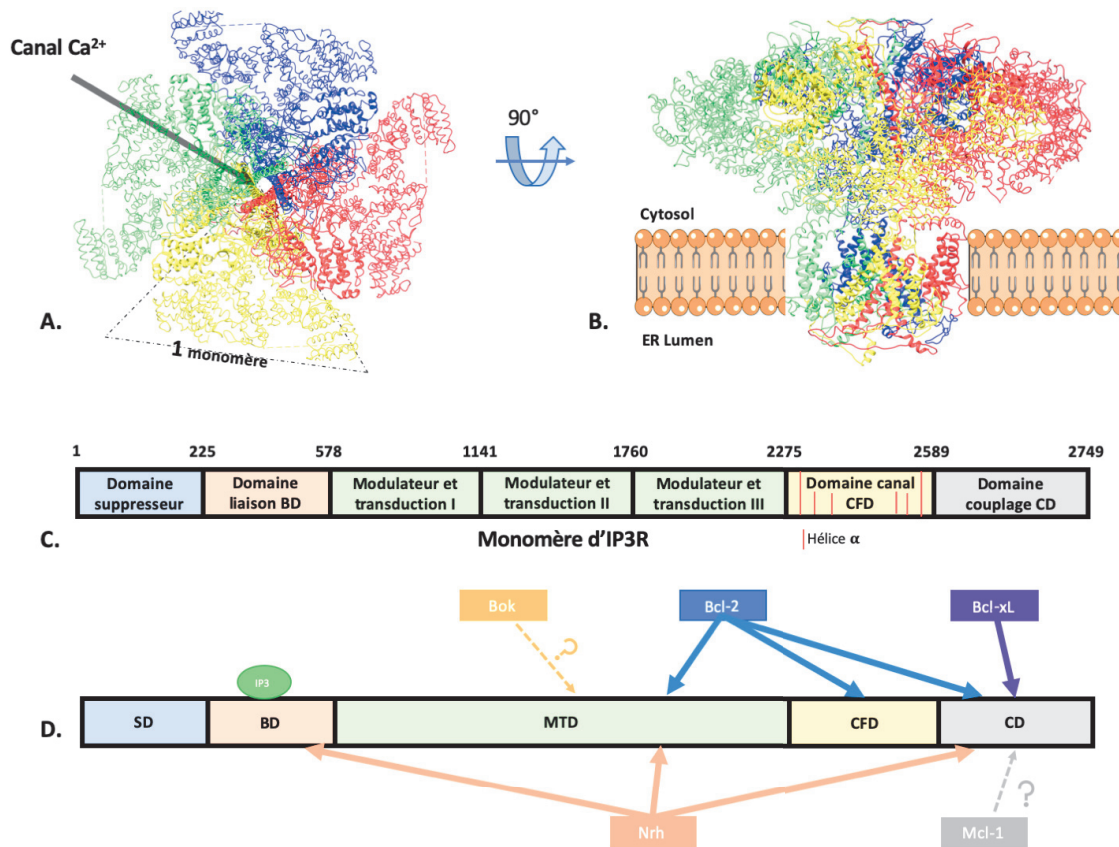


Figure 15 Structure d'un récepteur IP3

2.2.1.2. Libération calcique médiée par l'IP3R

2.2.1.2.1. Ouverture des canaux calciques IP3R

La sortie du calcium à travers l'IP3R est le résultat d'un enchainement d'évènements qui permettent l'ouverture du canal calcique. En tout premier lieu, la réception de stimuli active des récepteurs couplés aux protéines G ou des tyrosines kinases qui vont ensuite activer la phospholipase C. La phospholipase va alors dégrader du phospho-inositol biphosphate membranaire (PIP2), donnant ainsi du diacylglycérol et de l'inositol 1,4,5 triphosphates. L'IP3 peut alors se fixer librement aux récepteurs IP3R sur le binding domaine des 4 monomères. La fixation de l'IP3 induit alors un changement de conformation du récepteur en passant par le domaine suppresseur et le domaine de couplage. Cela a pour conséquence l'ouverture du canal.

2.2.1.2.2. Modulation médiée par le calcium

Il existe un deuxième mécanisme de modulation des récepteurs IP3, même si ce point est encore à ce jour très discuté. Il s'agit de la modulation médiée par le calcium, ou plutôt les oscillations calciques. Le calcium réticulaire à l'ouverture du récepteur provoque des ondes calciques provoquant une

augmentation transitoire (<1s) du calcium localement (autour du récepteur) jusqu'à 600nM (Berridge et al., 2003). Ce signal calcique peut se propager d'un site à un autre par conduction saltatoire et ainsi maintenir l'oscillation. La propagation du signal permet l'ouverture des autres IP3R et les récepteurs de Ryanodines (RyR), également sensibles à la concentration du calcium. L'ouverture de l'IP3R par le calcium passe par un mécanisme nommé le CICR (calcium-induced calcium released). Le calcium exerce une allostérie sur le même site de fixation que l'IP3 et provoque l'ouverture du canal (Foskett et al., 2007). La propagation de l'oscillation calcique dans l'espace cytosolique notamment en direction des mitochondries est facilitée par les membranes associées à la mitochondrie (MAMs) (Vance, 2014).

2.2.1.3. Régulation des IP3R par la famille Bcl-2

À ce jour, 4 Bcl-2 anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 et Nrh) et un pro-apoptotique (Bok) sont décrits comme partenaires avec les récepteurs IP3 (Figure 15.D). L'interaction est permise dans un premier temps par la localisation subcellulaire de ces derniers.

Des expériences d'immunoprécipitations ont montré que Bcl-2 peut interagir avec les trois isoformes d'IP3R (Chen et al., 2004). Le domaine d'interaction sur un monomère d'IP3R1 avec Bcl-2 a été identifié entre les résidus 1389 et 1408, compris dans le MTDII. Ces 20 résidus forment un domaine nommé ARM2 du fait de leur structure secondaire avec des motifs d'Armadillo (Rong et al., 2008). Bcl-2 se lie de façon préférentielle à IP3R1 via son domaine BH4. Ce domaine est critique pour l'interaction avec IP3R1. De plus le domaine seul suffit à inhiber l'ouverture du canal, un peptide TAT-BH4 de Bcl-2 a montré les mêmes capacités d'inhibition que Bcl-2 entière. À l'inverse, il est montré qu'un peptide mimant l'interaction Bcl-2/IP3R1 avec la séquence d'interaction d'IP3R1 peut lever l'inhibition de Bcl-2 sur l'IP3R1 en allant se fixer à Bcl-2 (Rong et al., 2009b)

La protéine Bcl-xL peut aussi interagir avec les trois isoformes d'IP3R. Bcl-xL a un mécanisme différent de Bcl-2. Bcl-xL se fixe préférentiellement du côté C-terminus de IP3R et sa fixation active l'ouverture du canal (White et al., 2005). Le côté C-terminal agit comme un domaine BH3 permettant son interaction avec Bcl-xL (Yang et al., 2016). En réponse à une faible stimulation par IP3, Bcl-xL potentialise la sortie du calcium. L'expression de Bcl-xL perturbe l'équilibre du calcium réticulaire en augmentant la sensibilité des récepteurs au stimuli et exerce son activité anti-apoptotique sur les trois isoformes d'IP3R (Li et al., 2007). L'activité anti-apoptotique peut être antagonisée par l'oncoprotéine K-ras qui après phosphorylation peut se lier à Bcl-xL et empêcher la liaison de cette dernière à l'IP3R (Sung et al., 2013).

Similairement à Bcl-xL, Mcl-1 est décrit pour interagir avec les trois isoformes d'IP3R par leur côté C-terminus (Eckenrode et al., 2010). La liaison de Mcl-1 aux IP3R sensibilise le RE à une faible

concentration d'IP3 et promeut la survie cellulaire. De manière étonnante, dans la même étude, Bcl-2 peut également interagir avec le côté C-terminus même si l'interaction est moindre par rapport au MTD. Le domaine de couplage contient deux motifs du domaine BH3, favorisant donc le contact avec les protéines Bcl-2.

Nrh/Bcl2L10, à la différence de Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 interagit préférentiellement avec l'isoforme IP3R1, peu avec IP3R3 et l'interaction avec IP3R2 très faible. Nrh se lie sur IP3R1 par son domaine BH4. Le BH4 se lie de manière curieuse, à la fois par le MTDII comme avec Bcl-2, mais aussi par le domaine de liaison BD. Il est aussi décrit une interaction avec le domaine de couplage en C-terminal. La délétion de BH4 sur Nrh empêche sa fixation sur le canal. Nrh régule négativement la sortie du calcium du réticulum et promeut la survie cellulaire en inhibant la cascade apoptotique médiée par l'augmentation du calcium. Nrh entre en compétition avec l'IP3 pour la fixation sur le BD (Bonneau et al., 2014; Nougarede et al., 2018).

Et enfin, Bok est le seul pro-apoptotique à être décrit comme interagissant avec les IP3R. Bok interagit via son domaine BH4 avec les résidus 1895 à 1903 dans le MTDIII d'IP3R1. Cependant la fixation de Bok n'entraîne pas de modification du flux calcique et n'exprime pas de phénotype particulier sur la régulation apoptotique. Cependant, il a été démontré que Bok est nécessaire pour le maintien physiologique des mitochondries (Schulman et al., 2019; Schulman et al., 2013).

2.2.2. Les récepteurs de la Ryanodine RyR

Les récepteurs IP3 ne sont pas les seuls canaux calciques au réticulum, les récepteurs de la Ryanodine (RyR) y sont également présents. Il existe 3 isoformes de RyR notés RyR1 à RyR3 (Sorrentino and Volpe, 1993). Un RyR est un tétramère formant un canal calcique dans la membrane du RE. Dans les cellules non-musculaire l'ouverture est modulée par fixation d'ADP ribose cyclique. La caféine est un agoniste connue du canal RyR (Rousseau and Meissner, 1989). À la différence des IP3R, le calcium seul suffit à activer les RyR (Endo, 1981). Les RyR sont donc considérés comme les principaux composants de la libération du calcium induite par le calcium ou CICR mentionné dans le paragraphe 2.2.1.2.2 (Endo, 2009). Même si toutefois, les IP3R peuvent exhiber le CICR, mais nécessitent la présence d'IP3. La structure des RyR partage des points communs avec les IP3R. Du côté N-terminal on y retrouve ce qui correspond au domaine suppresseur et domaine de liaison. Du côté C-terminal on retrouve 6 domaines transmembranaires formant le canal calcique (Seo et al., 2012; Zalk et al., 2015). Seul Bcl-2 et Bcl-xL de la famille des Bcl-2 sont décrits comme partenaires des RyR.

Bcl-2 est identifié comme un inhibiteur des RyR. Bcl-2 se lie au récepteur par son BH4 en se fixant à une région conservée entre les récepteurs RyR et les récepteurs IP3, qui correspond respectivement à

MINK (entre les résidus 2309-2300) et à l'ARM2 (entre les résidus 1389-1408). De manière similaire, le domaine seul BH4 de Bcl-2 suffit à inhiber l'ouverture des RyR. Une expérience permettant l'inhibition de la poche hydrophobe de BH3 sans affecter l'inhibition de Bcl-2 sur les RyR permet de confirmer une fois de plus l'importance du domaine BH4 (Vervliet et al., 2014; Vervliet et al., 2015b). La même équipe décrit que Bcl-xL inhibe également les RyR. Cependant il est à nuancer que seule l'inhibition avec RyR3 est décrite. Il est démontré que seul le domaine BH4 de Bcl-xL suffit à inhiber RyR3 (Vervliet et al., 2015a).

2.2.3. La pompe SERCA et Bcl-2

À l'inverse des récepteurs IP3 et Ryanodine, la pompe ATP dépendante SERCA (sarcoendoplasmic reticulum calcium transport ATPase) permet l'influx de calcium dans le RE et en particulier le réticulum sarcoplasmique (équivalent du RE). L'entrée de calcium nécessite une molécule d'ATP pour deux ions calcium. Il existe plusieurs isoformes de la pompe SERCA dont la distribution varie en fonction des tissus (musculaire ou non, muscle lisse, cardiaque ou squelettique) (Periasamy and Kalyanasundaram, 2007). Des interactions sont montrées avec Bcl-2, toutefois les conclusions sont divergentes. La surexpression de Bcl-2 up-régule l'expression de la pompe SERCA isoforme 2 sans affecter le niveau d'expression des IP3R. La surexpression de SERCA augmente l'entrée de calcium dans le RE dans les tissus mammaires (Kuo et al., 1998). Avec la même isoforme SERCA2, l'expression de Bcl-2 régule négativement son niveau d'expression dans les tissus pulmonaires (Ahmad et al., 2009). Une étude plus récente a identifié par mutagenèse l'acide aminé Gly145 comme étant critique pour l'inhibition de Bcl-2 avec SERCA 1 à 3 (Schoneich et al., 2017).

2.3. Modulation au niveau de la mitochondrie

Après le réticulum, la mitochondrie est la deuxième organelle de stockage du calcium dans la cellule, la concentration calcique pouvant osciller de 100 à 800nM. Au-delà du simple stockage, le calcium mitochondrial est primordial pour son fonctionnement. La mitochondrie est la centrale énergétique de la cellule en produisant l'ATP et le calcium la monnaie pour la main d'œuvre. Ainsi un niveau constant minimal de calcium est requis pour le fonctionnement du cycle de Krebs en activant la pyruvate déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase et l'alpha-cétoglutarate déshydrogénase (Finkel et al., 2015). Un autre rôle de la mitochondrie est qu'elle sert de « tampon » pour les oscillations calciques. La mitochondrie peut absorber le calcium cytosolique par deux canaux calciques, le canal voltage dépendant VDAC et le canal MCU situés respectivement à la membrane externe et la membrane interne. Néanmoins comme nous l'avons vu, une surcharge de calcium mitochondrial peut faire implorer la structure, libérant au passage le calcium, le cytochrome c et d'autres facteurs

contenus dans l'espace intra mitochondrial (Figure 14). La régulation du calcium est donc cruciale. Les protéines Bcl-2 peuvent réguler la concentration du calcium intra mitochondrial en modulant l'influx par le canal VDAC.

2.3.1. Modèle unifié du transport de calcium médié par VDAC

Voltage dependant anion channel ou VDAC, est une famille de protéine transmembranaire des mitochondries comprenant chez les mammifères 3 isoformes conservés, VDAC1 à VDAC3. Le canal VDAC est composé de 300 acides aminés formant un tonneau β de 19 brins de feuilletts β et une hélice α (Figure 16). L'hélice α de 26 acides aminés en travers dans le tonneau permet de moduler la sélectivité de VDAC pour les métabolites et ions en diminuant l'espace central du pore (Bayrhuber et al., 2008; Hiller et al., 2008). VDAC possède deux conformations, une ouverte et l'autre fermée, modulées par le potentiel de membrane de la mitochondrie. Ainsi une tension générée de $-/+ 30$ à 40mV d'amplitude provoque la fermeture du canal, alors qu'une amplitude entre $-/+ 10\text{mV}$ permet de garder le canal ouvert (Shoshan-Barmatz et al., 2010). La conformation ouverte laisse passer (entrée et/ou sortie) un large éventail de produits et d'une taille allant jusqu'à 5kDa : des ions (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , etc.), des nucléotides (ATP, ADP, NADH) et des métabolites (pyruvate, malate, glutamate, etc). En revanche en conformation fermée, le canal n'est perméable qu'aux petites molécules en diffusion passive, comme les ions Ca^{2+} . En note, VDAC en conformation fermée a une meilleure perméabilité et conductance aux ions Ca^{2+} (Tan and Colombini, 2007). De plus VDAC contient des sites de liaison au calcium. À forte concentration de Ca^{2+} , VDAC s'ouvre et provoque un influx de calcium dans la mitochondrie, pouvant alors provoquer alors l'apoptose.

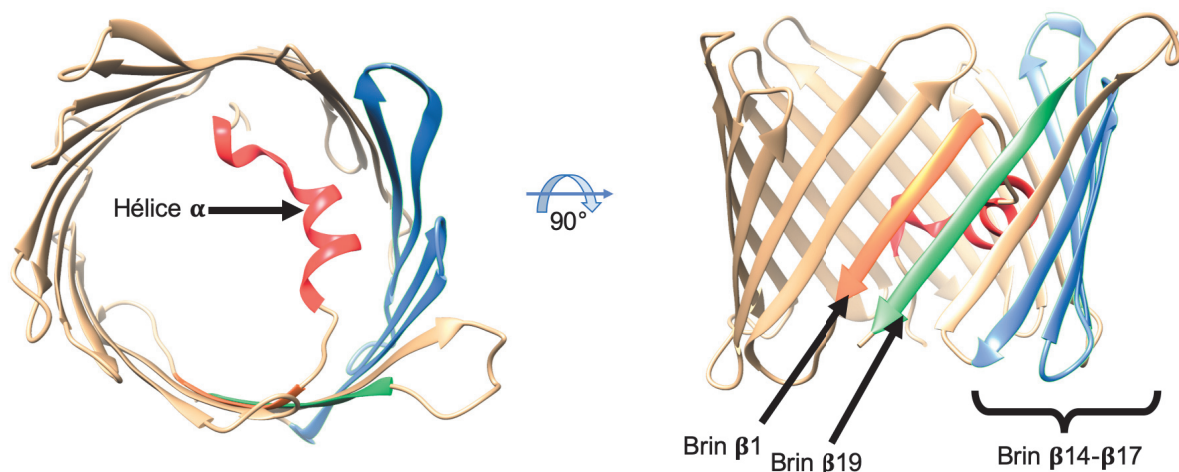


Figure 16 Structure du canal VDAC1

Structure 3D de VDAC1 (PDB : 3EMN) traitée par Chimera®. À gauche, une vue de dessus. À droite une vue latérale. Rouge : Hélice α en N-terminus. Orange : brin $\beta 1$. Vert : brin $\beta 2$. Bleu : brins $\beta 14$ - $\beta 17$. Rouge et bleu sont les zones d'interactions avec Bcl-2 et Bcl-xL

2.3.2. Régulation de VDAC par la famille Bcl-2

Bcl-xL est la première protéine Bcl-2 à être décrite pour interagir avec VDAC. L'hypothèse initiale étant que Bax s'oligomériserait avec VDAC pour former de large canal laissant alors sortir le cytochrome C. Bcl-xL et Bcl-2 inhiberaient l'interaction et favoriseraient la fermeture de VDAC (Shimizu et al., 1999). Ces données sont nuancées par la suite montrant alors que Bcl-xL favorise et garde l'ouverture du canal VDAC (Vander Heiden et al., 2001). Dans les deux cas, la communauté scientifique s'accorde pour indiquer que Bcl-xL est bien un régulateur de VDAC, mais dans quel sens ? Bcl-xL interagit avec VDAC1 et VDAC3, mais pas VDAC2 (Huang et al., 2013). Bcl-xL est montré comme un inhibiteur de l'ouverture de VDAC. Le domaine BH4 de Bcl-xL inhibe l'entrée du calcium dans la mitochondrie et inhibe l'apoptose (Monaco et al., 2015; Shimizu et al., 2000). Cependant dans les cellules de fibroblaste d'embryons murins KO Bcl-xL, on peut y observer une baisse de l'influx du calcium dans les mitochondries après stimulation par l'ATP ou calcium. Le phénotype est rétabli lorsque Bcl-xL est réintroduit spécifiquement à la mitochondrie. Les deux effets inhibiteur et activateur ne sont pas incompatibles quand on sait que la régulation du calcium est complexe et fait intervenir d'autres partenaires, le contexte cellulaire faisant pencher l'action de Bcl-xL d'un côté ou de l'autre. Mcl-1 est aussi décrit pour interagir avec VDAC1 et VDAC3, mais pas avec VDAC2. La fixation de Mcl-1 ouvre le canal permettant un influx des métabolites et ions. On peut observer une formation accrue des ROS par la mitochondrie. De plus Mcl-1 semble avoir plus d'affinité avec VDAC1 que Bcl-xL (Huang et al., 2014).

Concernant les sites d'interaction des Bcl-2 avec VDAC, des études utilisant des peptides dérivés de VDAC ont montré l'interaction des Bcl-2 à différents endroits. Les peptides dérivés des boucles des brins β 14- β 15, β 16- β 17 et de l'hélice α ont montré une interaction avec Bcl-2 et Bcl-xL (Arbel et al., 2012; Arbel and Shoshan-Barmatz, 2010). Comme mentionné le domaine BH4 des Bcl-2 est nécessaire à la fonction d'inhibition du canal VDAC, mais il est montré que cette interaction avec VDAC est plus d'ordre fonctionnel qu'une forte liaison. La majeure fixation des Bcl-2 à VDAC nécessite une zone d'interaction formée entre les hélices α 4, 5, 6 et 7 des Bcl-2 (Malia and Wagner, 2007).

Pour Bcl-2 l'interaction fonctionnelle avec VDAC est à nuancer. Initialement Bcl-2 était aussi un candidat pour interagir avec VDAC1 mais au vu des résultats sur les peptides BH4, l'hypothèse est largement remise en cause. Dans une étude récente, le peptide BH4 de Bcl-2 ne protège pas contre l'influx calcique induite contrairement au peptide BH4 de Bcl-xL. Cela est confirmé par l'utilisation d'un peptide dérivé de l'hélice alpha en N-terminus de VDAC. Le peptide VDAC-N-terminus lève l'inhibition de Bcl-xL sur VDAC, mais pas avec Bcl-2 (Monaco et al., 2015). Mcl-1 semble agir sur les mêmes

domaines que Bcl-xL, les peptides VDAC N-Terminus et β 14- β 15 lèvent l'interaction VDAC1/Mcl-1 (Huang et al., 2014).

Bax au contraire des Bcl-2 anti-apoptotiques interagit avec VDAC2. L'étude montre qu'en délétant VDAC2, on inhibe l'apoptose médiée par Bax. Bak interagit également avec VDAC2, mais la délétion de VDAC2 ne montre pas le même phénotype qu'avec Bax (Chin et al., 2018). Bid est aussi décrit pour interagir avec VDAC même si son rôle n'est pas tout à fait clair. La fixation de Bid ferme VDAC et perturbe ainsi les flux calciques et les échanges entre le cytosol et la mitochondrie (Rostovtseva et al., 2004).

2.4. Régulation à la membrane cellulaire

À la membrane cellulaire, l'homéostasie calcique est régulée par différents canaux laissant circuler le calcium. Les canaux de la superfamille des TRP (Transient Receptor Potential channel), divisés en 7 sous-groupes, sont pour la plupart non sélectifs et perméables aux cations. Les mécanismes d'activations de ces canaux sont divers de la liaison ligand-récepteur au changement de température entraînant un changement de conformation. Ils régulent l'entrée des cations importants au fonctionnement de la cellule comme le calcium ou le magnésium. Du fait de l'importance du calcium dans la cellule, les mutations touchant les TRP peuvent entraîner des pathologies diverses : maladies neurodégénératives, dysplasie squelettique, etc. (Nilius and Owsianik, 2011). À ce jour, très peu d'études ont montré une relation des protéines Bcl-2 avec les TRP.

Un autre mécanisme existe à la membrane cellulaire et associe le canal calcium sélectif membranaire Orai1 avec un capteur réticulaire du calcium STIM1 (Stromal interaction molecule 1). Lors d'une diminution de calcium, STIM1 capte le changement, migre et s'accumule aux environs de la membrane plasmique (25nm) pour se dimériser et activer le canal Orai1 (ORAI Calcium Release-Activated Calcium Modulator 1) (Clapham, 2007). L'activation de Orai1 permet l'influx du calcium extracellulaire dans le cytosol où l'excédent est capté par le RE via l'activation de la pompe SERCA. L'ensemble des étapes forme le processus SOCE (Store-operate calcium entry channel) (Prakriya and Lewis, 2015). Le lien entre les protéines Bcl-2 et le processus SOCE n'est pas entièrement établi. Il est montré qu'un mutant BH1 de Bcl-2 provoque une augmentation de l'expression des protéines de SOCE pour compenser la faible concentration calcique dans le RE en augmentant donc l'influx dans le cytosol du calcium. Cependant, l'augmentation de perméabilisation du calcium fragilise alors les cellules et entre plus facilement en apoptose après un stress (Chiu et al., 2018). La régulation est à priori le résultat de l'adaptation cellulaire plus qu'une régulation directe par Bcl-2.

3. Le réticulum endoplasmique : stockage, repliement et adaptation au stress

3.1. *L'organite unique aux eucaryotes*

Le réticulum endoplasmique (RE) est le plus grand organite unique aux cellules eucaryotes et représente à lui seul 50% des membranes de la cellule. Le RE est l'usine de synthèse, transport et repliement protéiques, de synthèse de lipides et stéroïdes, du métabolisme glucidique, et du stockage et régulation du calcium. De fait le RE est énormément impliqué dans le destin de la cellule (Schwarz and Blower, 2016).

Le RE est constitué d'un large réseau de membrane étendu replié en feuillettes compartimentant le cytosol et sa lumière. Les feuillettes nommées cisternae sont plats et de taille variable, mais la taille de la lumière varie peu (environ 50nm) (Bernales et al., 2006a). Une partie de sa membrane est partagée avec la membrane externe du noyau ce qui permet à la lumière du RE d'être en continuité avec l'espace intermembranaire du noyau. Le réticulum est séparé en deux « zones » :

- Le réticulum granuleux (REG) couvert de ribosomes actifs dont le rôle est la traduction, repliement et le transport de protéines vers membranes et autres organites comme l'appareil de Golgi.
- Le réticulum lisse (REL) sans ribosomes actifs/absents dont le rôle est la synthèse de lipides et stockage de calcium.

Différents travaux sur le RE ont montré une séparation en domaines, chaque domaine remplissant des fonctions particulières en fonction de la structure et des zones de contacts avec d'autres organites.

3.2. *Fonctions physiologiques du RE*

3.2.1. *Synthèse protéique et repliement*

Une des fonctions les plus importantes du RE est la synthèse protéique et le contrôle qualité qui en suit. La synthèse de protéine nécessite un appairage d'un complexe ARNm/Ribosome sur la membrane côté cytosolique du RE. La synthèse débute en amont dans le cytosol puis se termine sur le RE. Le peptide ainsi traduit peut alors rentrer dans la membrane du RE par le translocon (Rapoport, 2007). En fonction de la destination de la protéine, membranaire ou sécrétée, les modifications subies par les protéines ne seront pas les mêmes. Pour les protéines transmembranaires, ces protéines vont rester collées à la membrane lipidique (Blobel, 1980). Pour les non membranaires destinées à être sécrétées, elles sont prises en charge par des enzymes et protéines chaperonnes. Le RE offre un environnement

propice à la maturation de protéines avec une forte concentration de calcium nécessaire à l'activité des protéines chaperonnes Bip (Binding immunoglobulin protein) ou la calréticuline pour effectuer le repliement et modification comme la N-glycosylation. De plus le RE possède un environnement oxydatif favorable à la formation de pont disulfure par les protéines disulfures isomérases et l'oligomérisation (Braakman and Bulleid, 2011). Après repliement ces protéines seront transportées vers leurs destinations finales. Cependant il arrive que les protéines se replient mal, et n'aient pas une structure conforme et puissent dans certains cas s'agréger. Ces protéines sont mauvaises pour la cellule et sont dirigées vers la dégradation médiée par le protéasome (ER associated degradation ou ERAD) (Ruggiano et al., 2014).

3.2.2. Synthèse lipidique

La synthèse lipidique du RE est essentielle pour la formation des membranes lipidiques de la cellule (Fagone and Jackowski, 2009). La synthèse se déroule près des sites de contacts du réticulum avec l'appareil de Golgi nommée ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC). Cette zone est riche en tubulines et en vésicules pour transporter et distribuer rapidement les composés synthétisés dans la cellule (Appenzeller-Herzog and Hauri, 2006). Le transport passe en particulier par le *cis* de Golgi puis arrive au réseau *trans*-Golgi qui sert de centre de tri d'expédition (Guo et al., 2014).

3.2.3. Homéostasie du calcium

Comme mentionné à la partie 2, le RE joue un rôle important dans l'homéostasie du calcium cellulaire. Le RE stocke et régule le relargage du calcium vers le cytosol et la mitochondrie. Pour réguler ce flux de calcium il existe 3 entrées de calcium sur le RE : les IP3R, les RyR et les SERCA. Comme mentionné, les récepteurs IP3R et RyR permettent la libération du calcium du RE. La pompe SERCA permet, elle de faire rentrer activement le calcium dans le RE. Par ailleurs, la baisse rapide de concentration du calcium dans le RE par ouverture des IP3R peut aussi induire une augmentation d'influx de calcium via les canaux de la membrane plasmique (SOCE, SMI1 et ORA1). La concentration totale de calcium dans le RE est estimée entre 5-10mmol/L. La fraction libre dans le RE est d'environ 50-1000µmol/L soit 10 000 fois supérieur à la fraction libre cytosolique (Meldolesi and Pozzan, 1998). L'estimation exacte de la concentration Ca^{2+} est complexe car il est difficile de séparer la forme libre de celle liée aux protéines du RE. Dans le RE, les chaperonnes solubles comme la calréticuline, la Grp94, BiP /Grp78 et la protéine disulfure-isomérase peuvent fixer le calcium libre (Coe and Michalak, 2009). La modulation du flux calcique par le RE est effectuée en réponse aux stimuli ou besoins cellulaires.

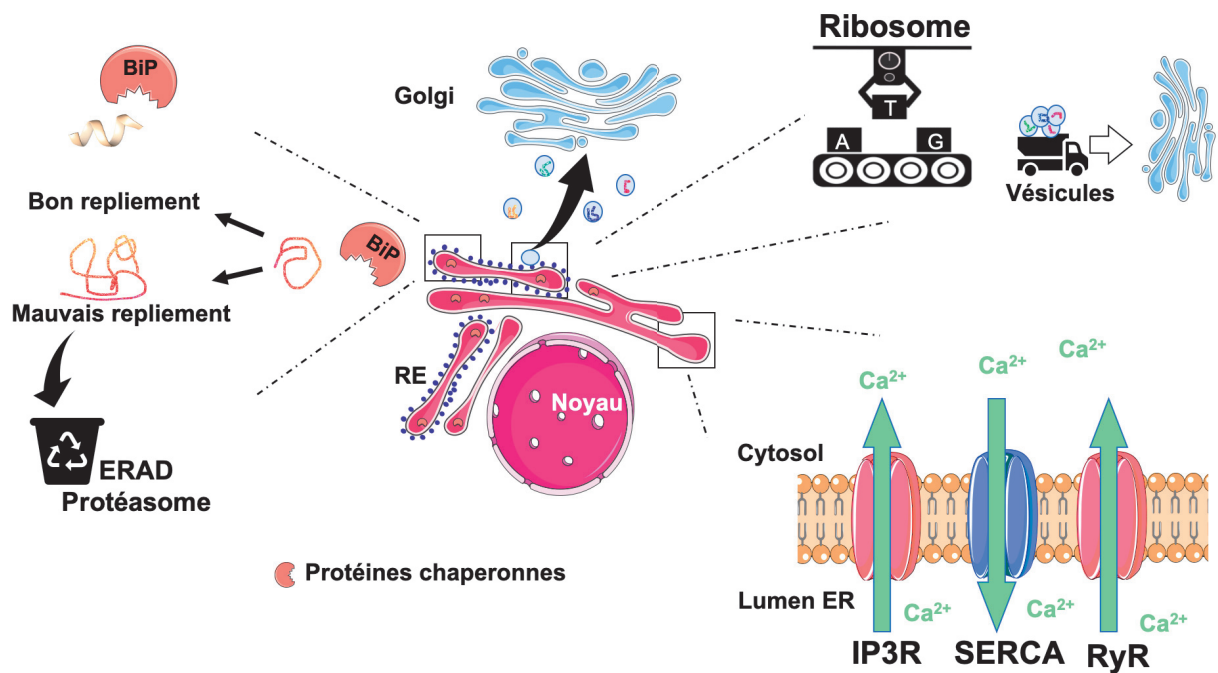


Figure 17 Les principales fonctions physiologiques du RE

3.3. Stress du RE et la réponse UPR (Unfolded Protein Response)

La capacité de la cellule à résister aux perturbations des fonctions réticulaires ou stress du RE est essentielle à la survie de la cellule. Le stress du RE est une accumulation de protéines mal repliées dans le RE. Les raisons de stress du RE sont multiples : une augmentation de la synthèse des protéines, une surcharge des capacités de repliement des protéines chaperonnes, une perturbation dans l'homéostasie calcique du RE ou encore un stress oxydatif. Le stress du RE peut être causé par des pathologies comme le diabète sucré, l'infection virale, les maladies neurodégénératives ou le cancer. Le stress du RE peut être provoqué pharmacologiquement par exemple par la tunicamycine qui inhibe de la N-glycosylation, la brefeldine A qui inhibe le transport de protéines du RE vers le Golgi, la Thapsigargine qui provoque une diminution de calcium intra RE par inhibition de SERCA, ou encore l'inhibition du système de dégradation par le protéasome (Foufelle and Fromenty, 2016).

Pour répondre à la perturbation, les cellules enclenchent un système de correction pour la survie. C'est l'UPR ou unfolded protein response. La réponse UPR est régulée par 3 voies de régulation menées par 3 détecteurs transmembranaires : l'enzyme IRE1 (inositol requiring enzyme 1), la kinase PERK (protéine kinase RNA-like ER kinase) et le facteur de transcription ATF6 (activating transcription factor 6). L'activation des 3 composantes repose sur la dissociation de la protéine chaperonne BiP (binding immunoglobulin protein) / GRP78 (glucose-related protein 78) / Hsp (heat shock protein) avec les 3 composantes précédentes dans la lumière du RE. BiP/GRP78 va alors s'associer aux protéines en cours de repliement. La cellule augmente alors les capacités du RE et de ces composantes dont les protéines

chaperonnes, diminue la traduction, et augmente la dégradation par des protéines ayant une mauvaise conformation par l'ERAD (Bernales et al., 2006b). Si le stress n'est pas résolu, la cellule peut entrer en apoptose. Nous allons voir ici les composantes de l'UPR (Figure 18).

3.3.1. La voie traductionnelle : activation de PERK

Cette voie est la première à se mettre en place. Son activation permet une inhibition de la synthèse de protéines afin de diminuer la pression sur le RE. L'activation de la voie s'effectue par la dimérisation de PERK et l'autophosphorylation en *trans*. PERK alors activée phosphoryle la sous-unité α du facteur d'initiation de traduction eIF-2 (eukaryotic translation initiation factor) sur la Ser51 (Harding et al., 1999). La phosphorylation et l'activation de eIF-2 α (en p-eIF-2 α) a alors deux conséquences, la première est l'inhibition du complexe de pré-initiation de traduction impliquant les ARNm avec la sous-unité 40s du ribosome avec pour conséquence directe une diminution de la synthèse protéique. Cette inhibition ne concerne pas tous les ARNm et provoque la deuxième conséquence qui est la traduction d'ATF4 (Activating Transcription Factor 4). La présence de cadres de lecture non traduits en amont du côté 5' (upstream open frame reading ou uORF) du gène codant ATF4 permet l'expression du gène même en cas d'inhibition de synthèse protéique. En cas de stress réticulaire prolongé, ATF4 active à son tour l'expression de la protéine CHOP / GADD₁₅₃ (CEBP homologous protein), activant en retour l'activation de la voie apoptotique de la réponse UPR (Harding et al., 2000). Les trois protéines activées p-eIF-2 α , ATF4 et CHOP augmentent la transcription de GADD34 (growth arrest and DNA damage inducible 34). GADD34 en retour apporte une rétro-action sur la phosphorylation de eIF-2, amenant une restauration de la synthèse protéique (Marciniak et al., 2004; Novoa et al., 2001). En conclusion lors d'un stress réticulaire prolongé, l'expression de CHOP amène une ré-augmentation de la synthèse protéique et une surcharge du RE ; provoquant alors un maintien du stress réticulaire et *in fine* l'apoptose de la cellule. Le mécanisme exact conduisant à l'apoptose n'est pas encore bien définie et peut être liée à la régulation de CHOP sur les protéines Bcl-2 (Rozpedek et al., 2016).

3.3.2. La voie translationnelle : activation des protéines IRE1 et ATF6

- **IRE1**

Chez les mammifères, il existe deux isoformes de la protéine, IRE1 α et IRE1 β . IRE1 β est exprimée de manière spécifique au niveau des cellules épithéliales et gastro-intestinales tandis que l'expression est ubiquitaire pour IRE1 α (Bertolotti et al., 2001). De plus le KO d'IRE1 α se révèle être létal pour le développement dans les modèles murins contrairement à l'isoforme IRE1 β . IRE1 α est nécessaire au développement placentaire et embryonnaire (Iwawaki et al., 2009). De fait, la majorité des études sur IRE1 chez les mammifères est portée sur l'isoforme α et IRE1 se réfère directement à ce dernier

isoforme. La protéine possède une double activité sérine/thréonine kinase et endoribonucléase via son domaine cytoplasmique. L'activation de IRE1 est liée à la dissociation de la protéine Bip de IRE1 provoquant ainsi l'induction de l'activité kinase. Ce qui permet en retour son autophosphorylation en *trans* et l'induction de l'activité endoribonucléase (RNase) (Ali et al., 2011). L'activité RNase de IRE1 permet un épissage d'un ARNm nommé Xbp-1u (X-box binding protein 1 unspliced) induite par le facteur ATF6 (Sidrauski and Walter, 1997). Le clivage de 26 acides aminés de Xbp-1u donne alors Xbp-1s (Xbp-1 spliced) (Yoshida et al., 2001). La protéine Xbp-1s fait partie de la famille des glissières à leucine ou basic leucine zipper (bZip) capable de fixer des séquences d'ADN et de réguler la transcription. La protéine Xbp-1s ainsi formée peut alors aller au noyau et fixer les séquences (CCAATN9CCACG) des éléments de réponses du RE ou ERSE (ER stress response element). Cette fixation permet d'initialiser la transcription de gènes codant les composantes du système dégradation ERAD, les protéines chaperonnes pour la maturation et le repliement des protéines dans le but de diminuer le stress du RE (Lee et al., 2003).

IRE1 est aussi impliqué dans d'autres activations de facteurs. IRE1 régule la dégradation des ARNm pour diminuer le stress RE par le système RIDD (regulated IRE1-dependent decay) (Hollien and Weissman, 2006). L'activité RNase d'IRE1 est requise pour l'activation de RIDD, mais pas auto suffisante pour activer RIDD toute seule. D'autres facteurs pourraient entrer en jeu (Hollien et al., 2009).

- **ATF6**

ATF6 est une protéine transmembranaire de type II (contrairement à IRE1 et PERK) spécialisée dans la régulation de la qualité des protéines dans le RE en modulant l'expression des protéines chaperonnes et des composants de l'ERAD. ATF6 possède un détecteur de stress en C-terminus dans la lumière et un domaine bZip de transcription en N-terminal (Adachi et al., 2008).

ATF6 est également activé lors de sa dissociation avec Bip/Grp78. ATF6 migre du RE au Golgi où elle subit un double clivage protéolytique par les protéases S1P et S2P pour libérer le facteur de transcription bZip (Haze et al., 1999). De manière similaire avec Xbp-1, le facteur de transcription va alors aller au noyau et fixer les séquences (CCAATN9CCACG) des éléments de réponses du RE ou ERSE. Ces séquences sont présentes dans les promoteurs de gènes codant les composants de la réponse UPR favorisant le repliement de protéines comme Bip/Grp78, Grp94 et les protéines disulfides isomérases (Yoshida et al., 1998). De plus ATF6 participe également à la réponse par IRE1 par la transcription de Xbp-1 (Yoshida et al., 2001). Il est intéressant de souligner qu'en promouvant l'expression de Xbp-1, ATF6 augmente aussi indirectement l'expression de CHOP, modulant de fait la réponse apoptotique médiée par CHOP (Yoshida et al., 2000).

3.3.3. Le stress RE : condition physiologique et cancer

La résistance au stress réticulaire est un ensemble de mécanismes nécessaires à la survie de la cellule en condition normale ou pathologique.

L'UPR est nécessaire à de nombreux processus en condition physiologique, dont le développement embryonnaire, la croissance et différenciation cellulaire, le métabolisme des acides aminés, lipidiques et glucidiques (Almanza et al., 2019). Par exemple, dans un modèle murin KO Bip/GRP78, l'absence de Bip provoque l'arrêt prématuré de l'embryogénèse chez la souris (Luo et al., 2006). Un autre exemple montrant l'importance de l'UPR est qu'elle est nécessaire au maintien de l'intégrité des cellules souches hématopoïétiques pendant un stress réticulaire (van Galen et al., 2014).

A l'inverse, l'UPR contribue aussi au développement de pathologies comme le cancer notamment dans l'oncogénèse et la résistance à la chimiothérapie. L'activation d'oncogènes comme *c-myc*, BRAF^{V600E} ou encore HRAS conduit souvent à un stress RE lié à la division rapide des cellules tumorales et à la surcharge des systèmes de repliements des protéines. Dans les mélanomes, l'oncogène BRAF^{V600E} active IRE1 et ATF6 par rapport aux cellules saines (Croft et al., 2014). On retrouve aussi la surexpression et l'activation de l'UPR (augmentation de phosphorylation EIF α , augmentation du niveau d'ATF4 et de XBP-1s) chez les patients atteints de lymphome de Burkitt (Hart et al., 2012). L'activation de HRAS conduit également à une activation de IRE1 dans les mélanocytes et kératinocytes (Blazanin et al., 2017). L'activation du système UPR permet une meilleure survie des cellules tumorales soumises au stress RE. L'UPR contribue aux développements du cancer à tous les stades (Madden et al., 2019). Après activation de l'UPR, la cellule cancéreuse peut réguler négativement le versant de la mort induite de ce dernier. En effet, il est montré qu'après activation de *c-myc*, l'activation de la voie PERK permet d'atténuer la mort en activant l'autophagie (Hart et al., 2012). Par ailleurs, l'activation de HRAS dans les fibroblastes d'embryons de souris diminue l'expression de CHOP (Rong et al., 2005). Plus récemment, il est montré que les modifications sur les marqueurs d'UPR peuvent être oncogéniques eux-mêmes. Ainsi on retrouve fréquemment des mutations somatiques sur les trois voies d'UPR dans les cancers. De manière intéressante, la fréquence des mutations retrouvées sont tissus dépendants. Ainsi les mutations sur la voie PERK sont plus fréquentes dans les tumeurs malignes osseuses, tandis que les mutations sur IRE1 sont retrouvées dans les cancers du système nerveux (Chevet et al., 2015). Les voies d'UPR émergent alors de plus en plus comme des cibles thérapeutiques dans l'arsenal thérapeutique contre le cancer (Almanza et al., 2019).

3.4. La trinité du stress RE: Apoptose, UPR et protéines Bcl-2

Suite au stress RE, si la réponse UPR ne suffit pas à rétablir une condition acceptable pour la cellule, elle peut entrer en apoptose. Les trois voies décrites dans l'UPR modulent à différents degrés l'induction de l'apoptose aussi bien par la voie extrinsèque que par la voie intrinsèque. Surtout, des liens sont établis entre les acteurs de la réponse UPR et les membres de la famille des Bcl-2 (Figure 18). En effet l'UPR déclenche l'apoptose par une régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des protéines Bcl-2.

UPR et les Bcl-2, des liens complexes

La voie IRE1 et la cascade apoptotique partagent des composantes communes, dont la modulation par et sur les protéines Bcl-2. En réponse au stress, le domaine cytoplasmique COOH d'IRE1 peut recruter une protéine adaptatrice TRAF2 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 2) pour activer ASK1 (apoptosis signal regulating 1) puis par la suite activer les kinases JNK (de la voie des MAPK) pour induire l'apoptose (Ron and Hubbard, 2008; Urano et al., 2000). De la même façon IRE1 peut stimuler l'activation de la kinase p38 des MAPK, cette dernière induit l'apoptose par phosphorylation sur les Ser78 et Ser81 de CHOP (Sari et al., 2011; Wang and Ron, 1996). Récemment, il est aussi décrit que l'activation de JNK est un facteur de régulation de CHOP (Guo et al., 2017). L'activation de JNK et de p38 peut aussi conduire à une phosphorylation de Bax conduisant à sa relocalisation à la mitochondrie et l'induction de l'apoptose (Kim et al., 2006). JNK est décrit pour réprimer également l'expression de Bcl-2 et de Bcl-xL (Fan et al., 2000). En revanche l'activation de la voie IRE1/Xbp-1 dans certains cancers comme le mélanome augmente la transcription d'un facteur de transcription Ets-1 (E26 transformation-specific sequence-1). Ce dernier est un régulateur positif de l'expression Mcl-1. Mcl-1 est alors retrouvé surexprimée dans ce cas (Dong et al., 2011).

Comme mentionné, CHOP est up-régulé en aval par l'activation des trois voies de l'UPR. CHOP est un acteur important de la régulation de la réponse apoptotique médiée par l'UPR. En effet, étant un facteur de transcription, CHOP peut réguler l'expression des gènes codant les protéines Bcl-2, GADD34, TRB-3 (Tribbles homolog 3) et DOCs (Downstream of CHOP) (Hu et al., 2018). CHOP est connu pour diminuer l'expression de Bcl-2 et sensibiliser la cellule à la mort suite à un stress RE (McCullough et al., 2001). Bcl-2 n'est pas le seul anti-apoptotique à être réprimé par CHOP, Mcl-1 l'est également (Gomez-Bougie et al., 2016). En plus d'inhiber l'expression des anti-apoptotiques, CHOP promeut l'expression de certains BH3-only dont Bim (Puthalakath et al., 2007), Puma et Noxa par p53 (Li et al., 2006; Reimertz et al., 2003). Noxa en particulier semble nécessaire pour l'apoptose PERK dépendante. Dans les MEFs déficientes en PERK, l'hypersensibilité au stress du RE est résolue en éteignant Noxa (Gupta et al., 2012). En effet Noxa est directement up-régulé par ATF4 en formant un complexe avec ATF3

(Wang et al., 2009). En plus d'être impliqué dans la mort mitochondriale, CHOP induit également la mort par la voie extrinsèque. CHOP augmente l'expression du récepteur de mort DR5 suite à un stress RE induit par la Thapsigargine (Yamaguchi and Wang, 2004). L'up-régulation du récepteur DR5 active alors la caspase 8, qui en retour clive Bid en tBid activant en amont Bax pour initialiser l'apoptose (Lu et al., 2014b; Yamaguchi et al., 2003). CHOP est aussi impliqué dans l'activation du récepteur de mort DR4. Un complexe CHOP avec la forme phosphorylée active de la kinase JNK et le facteur de transcription AP-1 (activating protein) est retrouvé dans la région promotrice de DR4 et aussi de DR5. Aussi, il est démontré que la région N-terminale de CHOP interagit avec une histone acétyltransférase GCN5 pour moduler la transcription de DR4 et DR5 (Li et al., 2015). CHOP est aussi impliqué dans d'autres morts comme l'autophagie avec la régulation de la formation d'autophagosome via la caspase 8 et le complexe résultant avec FADD, Atg, mais ces points ne seront pas détaillés ici (Tomar et al., 2013). La mort autophagique est complémentaire avec la mort mitochondriale dans ce cadre (Deegan et al., 2014).

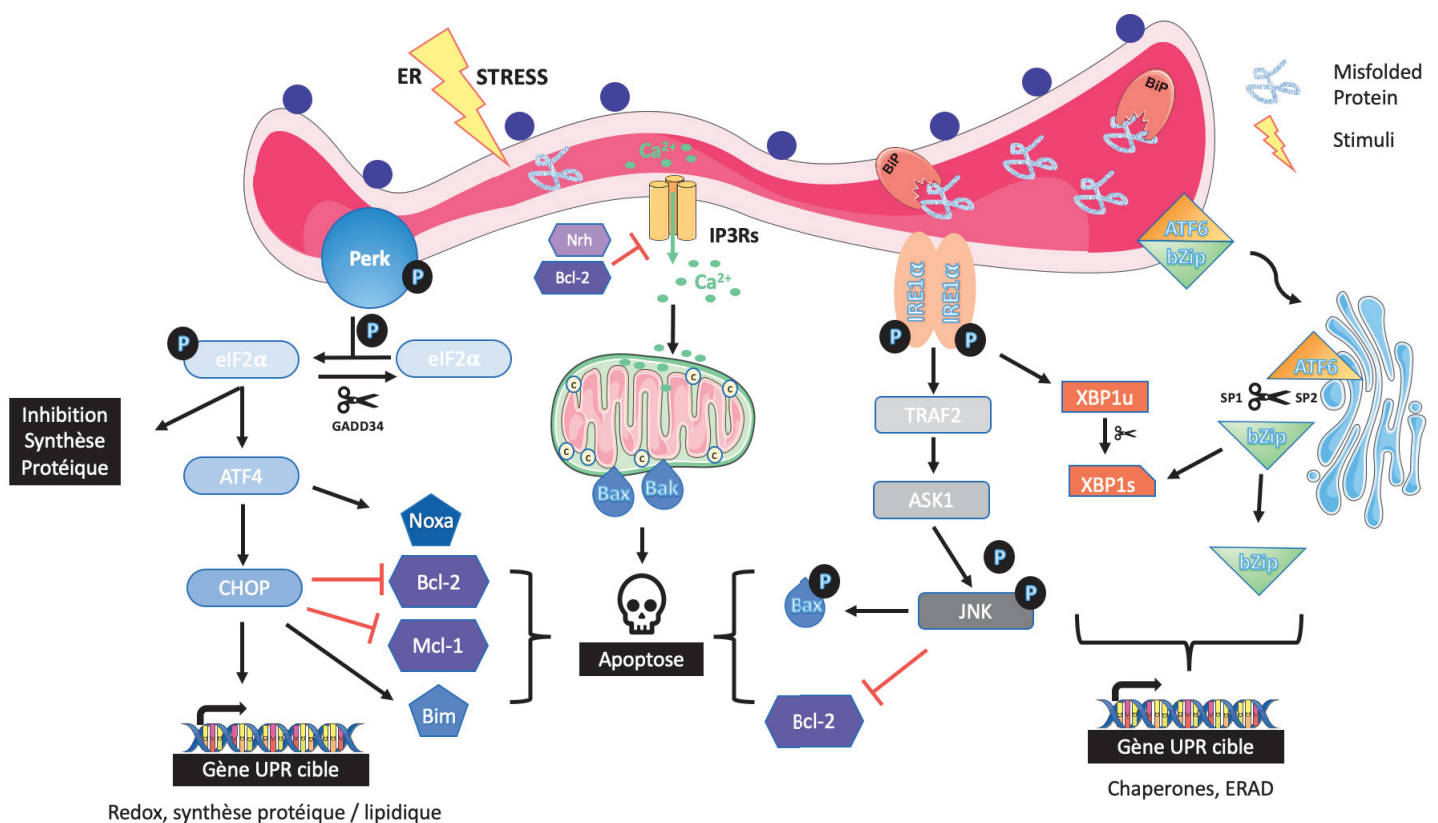


Figure 18 Les voies de l'UPR et conséquences cellulaires avec les protéines Bcl-2

Bcl-2 et l'apoptose induit par stress RE

Outre les nombreuses régulations des acteurs de l'UPR sur les protéines Bcl-2, les Bcl-2 sont aussi connues pour interagir directement sur les voies d'UPR, et certaines sont essentielles à l'activation de la mort induite de l'UPR. Ainsi les cellules déficientes en BH3-Only (BID, BIM, PUMA) sont résistantes à la mort induite par stress réticulaire (Ren et al., 2010). Plus récemment, il est montré que les BH3-only peuvent participer directement à la régulation de l'activation de l'UPR et plus spécifiquement de la voie IRE1 (Rodriguez et al., 2012). Comme mentionné, certains BH3-only sont up-régulés par l'activation de l'UPR.

De même, les cellules KO Bax^{-/-} et Bak^{-/-} ne peuvent activer la voie IRE1. Il est aussi montré que Bax/Bak interagissent directement avec le côté cytosolique de IRE1 (Hetz et al., 2006). Ces mêmes cellules KO Bax/Bak sont également résistantes à la mort induite par thapsigargine (Zhang and Armstrong, 2007). L'activation Bax/Bak est donc un mécanisme essentiel à la mort induite par stress RE.

Les anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 régulent l'apoptose induite par un stress du RE à différents niveaux (Pihán et al., 2017). Bcl-2, Bcl-xL, Bcl2L10 sont connues pour interagir avec les récepteurs IP3R au RE et participent à la régulation de l'homéostasie calcique. Ces Bcl-2 inhibent le flux calcique sortant et l'initiation de l'apoptose (Monaco et al., 2012; Nougarede et al., 2018; Rong et al., 2009a). De plus les anti-apoptotiques Bcl-2 inhibe l'activation de Bax/Bak, inhibant ainsi l'apoptose Bax/Bak dépendant.

Notre équipe a démontré une inhibition de la réponse UPR spécifiquement par la voie PERK par Nrh/Bcl2L10 suite à une induction du stress RE par la Thapsigargine. Nrh inhibe l'homéostasie du calcium en bloquant la sortie par le canal IP3R1, et retarde la réponse d'UPR. Cependant le mécanisme exact de ce retard n'est pas connu (Nougarede et al., 2018). Et enfin, l'autophagie est activée en cas de stress du RE. Comme mentionné en partie 1.2.2, les anti-apoptotiques Bcl-2 régulent l'activation de l'autophagie par interaction avec Beclin-1.

On peut observer une convergence des trois voies de la survie/mort (apoptose, UPR et autophagie) autour des Bcl-2 et de leurs activités à la membrane réticulaire. Les protéines Bcl-2 sont la pierre angulaire d'un système dictant la survie ou la mort de la cellule lors d'un stress du RE.

4. Bcl2L10 / Nrh, le dernier des grands Bcl-2

Comparativement aux autres anti-apoptotiques des Bcl-2, Nrh/Bcl2L10 est le moins connu et est relativement passé aux oubliettes malgré sa découverte dans le dernier millénaire (Gillet et al., 1995). Récemment la protéine Nrh a connu un regain de popularité. Les interactions biochimiques sont mieux connues et détaillées dans plusieurs études. La communauté a presque élucidé entièrement la structure 3D de Nrh, et des données reliant les fonctions physiologiques de Nrh commencent à émerger. Cette partie détaillera la littérature sur Nrh, ses différentes fonctions physiologiques et son rôle dans le cancer.

4.1. Nrh / Bcl2L10 / Bcl-B : un des Bcl-2 multifonctions

4.1.1. Organisation structurale de Nrh

Comme mentionné tout au long de l'introduction, Nrh est une protéine anti-apoptotique de la famille des Bcl-2. Nrh possède les 4 domaines BH avec un BH4 au motif divergent par rapport à Bcl-2. Récemment, la structure tridimensionnelle de Nrh a été partiellement résolue comme on peut le voir sur la Figure 19. Son architecture est proche des multi domaines de Bcl-2, glomérulaire, formant une poche hydrophobe avec ses domaines BH3 et BH1. Toutefois la structure n'est pas entièrement résolue, le domaine transmembranaire TM est manquant (27 acides aminés), deux substitutions Cys26Ser et Cys128Ser, et la boucle entre le BH4 et BH3 est prédite *in silico* (Rautureau et al., 2012). Par ailleurs une boucle non structurée contenant les lysines d'ubiquitination entre le domaine BH1 et BH3 est encore assez mal définie. Un polymorphisme de Nrh (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) est situé dans son domaine BH4 à la position 11 ou 21 (selon l'ATG de départ de la protéine, en magenta sur la figure). L'organisation structurale de Nrh étant proche de Bcl-2, il est donc aisé de le comparer à Bcl-2 et ce d'autant plus qu'il existe de nombreuses similitudes dans leurs fonctions biologiques.

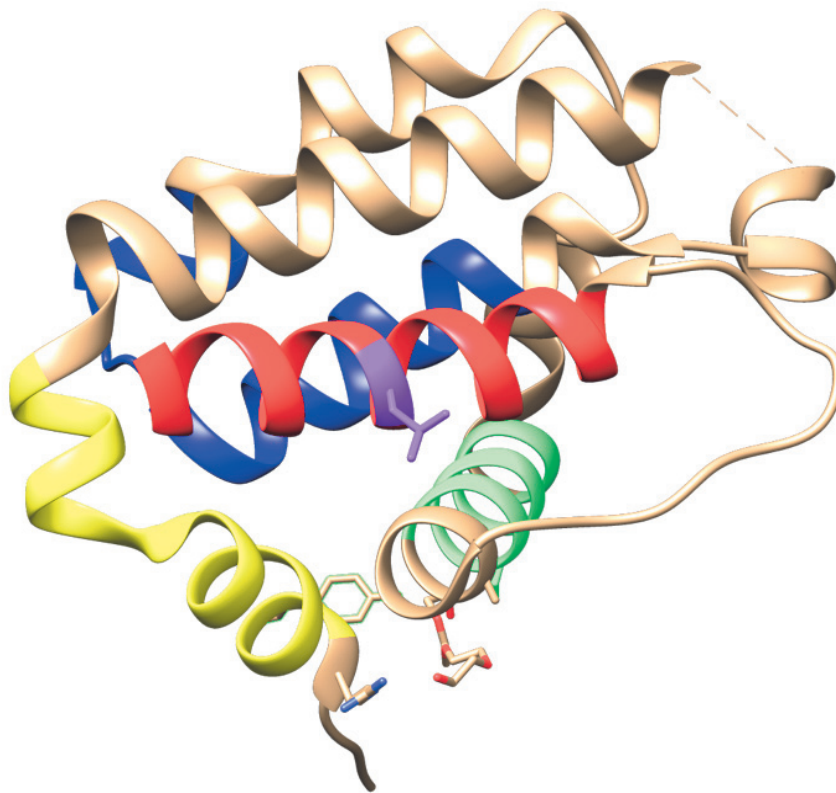


Figure 19 Architecture de Nrh/Bcl2L10 (PDB : 4B4S) par (Rautureau et al., 2012)

En Rouge BH4, Vert BH3, Bleu BH1 et Jaune BH2. La position 11 en magenta avec la leucine représentée ici

4.1.2. Fonctions physiologiques et interactions biochimiques de Nrh

Les interactions biochimiques de Nrh sont à ce jour bien décrites (Figure 20). Toutefois l'impact physiologique de Nrh chez l'homme est encore un mystère. Une étude en 2008 par l'équipe de Reed et complétée par les données de l'équipe sur l'expression a permis de mettre en évidence que Nrh/Bcl2L10 est exprimé de façon très limitée dans les tissus sains, en particulier fortement dans le tissu rénal, hématopoïétique (principalement dans les plasmocytes), le foie et la peau ; moyennement dans la thyroïde, des trompes de Fallope, l'œsophage et le cerveau (cortex et cervelet). L'expression de Nrh est aussi retrouvée dans l'estomac, l'intestin et le pancréas (Fagerberg et al., 2014; Krajewska et al., 2008; Nougarede et al., 2018).

Comme mentionné dans la partie 1.3.2.1 sur les fonctions physiologiques des Bcl-2, le KO de Diva/Boo (orthologue de Nrh chez la souris) a montré une absence de phénotype observable induite par l'invalidation du gène (Russell et al., 2002). Le rôle physiologique de Diva/Boo est alors très certainement redondant dans ce modèle murin. Il faut attendre quelques années les travaux sur l'orthologue chez le poisson-zèbre pour mettre en lumière un premier rôle physiologique dans le développement et l'homéostasie calcique. En effet l'invalidation de Nrz (orthologue de Nrh chez le

poisson zèbre) est létale durant le développement embryonnaire du poisson-zèbre, et des perturbations des flux calciques sont observées (Popgeorgiev et al., 2011). Notre équipe a démontré que cette perturbation de l'homéostasie calcique est due à l'interaction de Nr2 avec le récepteur IP3R1, bloquant la sortie du calcium du RE (Bonneau et al., 2014). Il s'avère que l'orthologue humain Nr2/Bcl2l10 possède lui aussi la même fonction d'inhibition de l'IP3R1 par son domaine BH4 comme mentionné dans le paragraphe 2.2.1.3 (Nougarede et al., 2018). De plus l'inhibition qu'exerce Nr2 sur IP3R1 peut être potentialisée par son interaction avec une autre protéine régulatrice des récepteurs IP3R : IRBIT (IP3R binding protein released with IP3). À noter que lors d'une activation de l'apoptose suite à un stress, IRBIT peut être déphosphorylée et devient alors un inhibiteur de Nr2 (Bonneau et al., 2016).

Une autre fonction physiologique de Nr2 est décrite dans sa participation à la régulation de l'autophagie et la mitophagie. Il est montré que Nr2 a un double effet sur la protéine Parkin. Nr2 inhibe à la fois sa phosphorylation, mais aussi se lie directement à la protéine Parkin phosphorylée. Dans la fibrose hépatique, Nr2 inhibe la mitophagie et induit une inhibition de l'apoptose (Ding et al., 2019). Nr2 participe aussi à l'autophagie en interagissant avec Beclin-1 présente elle aussi au réticulum endoplasmique. Il est montré une corrélation entre l'interaction de Nr2 avec Beclin-1 et la régulation de la mort autophagique. Une surexpression de Nr2 inhibe la mort par l'autophagie et dans le même sens, un knockdown de Nr2 sensibilise les cellules à un manque d'apport en acides aminés. De plus l'association de Nr2 avec Beclin-1 module la voie des phosphoinositide 3 kinase (PI3K) / Akt intervenant ainsi indirectement dans les mécanismes de métabolisme, angiogenèse et cancérogenèse (He et al., 2019). Il est intéressant de noter que l'interaction de Nr2 avec Beclin-1 passe par le BH1 de Nr2 et le BH3 de Beclin-1, alors que IP3R1 interagit avec le domaine BH4 de Nr2 (Robert et al., 2012). Concernant les interactions classiques en lien direct avec l'activité anti-apoptotique, Nr2 a un répertoire d'affinité avec les pro-apoptotiques très limité puisque Nr2 n'interagit qu'avec Bax, Bim et Bik (Figure 7) (Rautureau et al., 2012). Récemment, il a été montré que Nr2 est la cible du microARN 18-a, responsable de l'inhibition de son expression (Wang et al., 2018). Et enfin le récepteur nucléaire orphelin Nur-77/TR3 est capable de se lier aux protéines Bcl-2, dont Nr2, Bcl-2 et Bfl-1, mais pas Mcl-1, Bcl-xL ou Bcl-W. La liaison avec Nr2 est la plus forte parmi les Bcl-2, et induit un changement de fonction chez Nr2. Il est montré qu'elle devient alors une protéine pro-apoptotique en cas de fixation de Nur-77. Cette interaction est montrée dans les cellules du sang et en particulier dans les myélomes (Luciano et al., 2007).

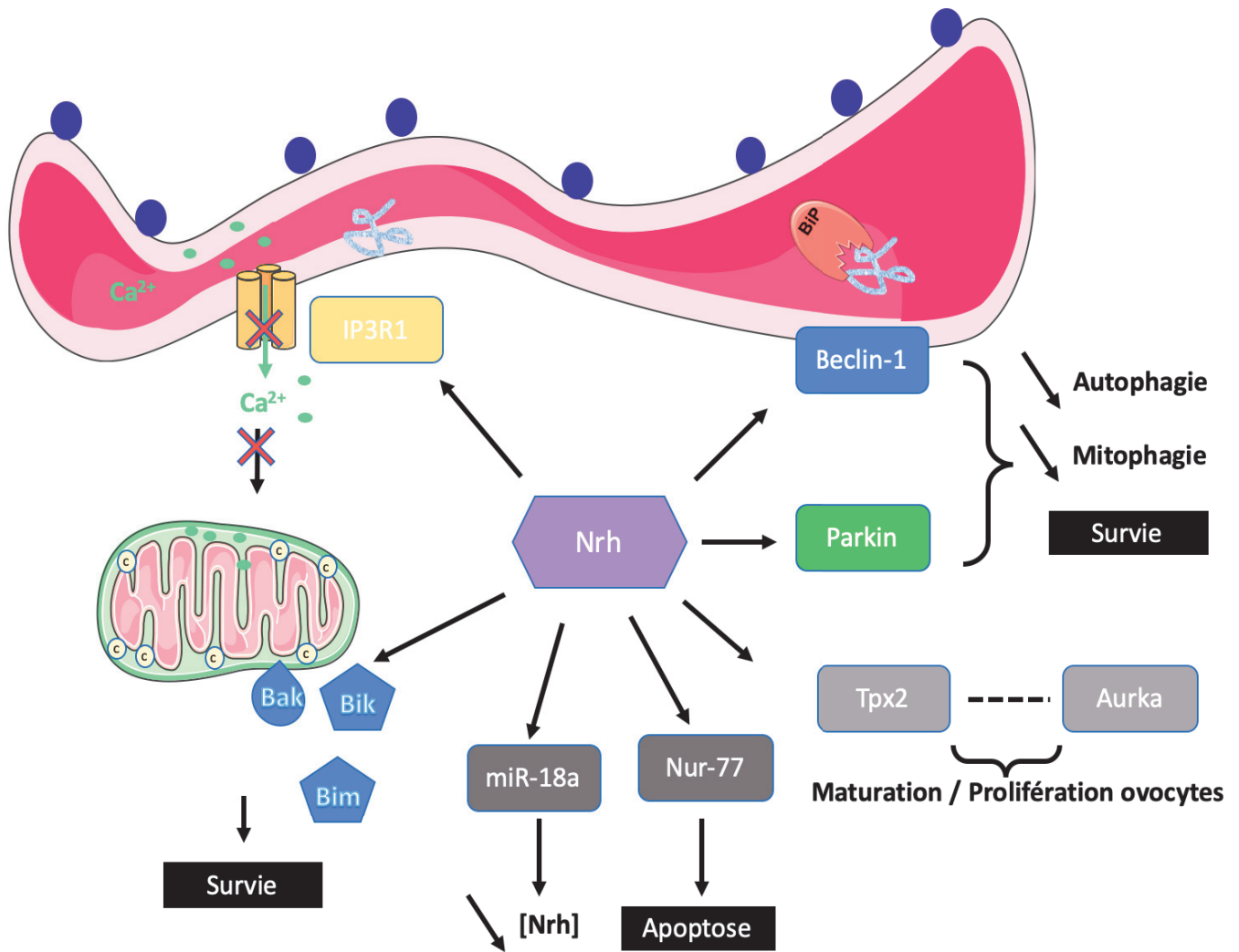


Figure 20 Les interactions biochimiques de Nrh dans la cellule

4.1.3. *Bcl2L10/Nrh* et cancers

L'altération de l'expression de Nrh est souvent décrite comme un facteur de mauvais pronostic dans le cancer. Nous allons voir dans une première partie les études décrivant la corrélation de la surexpression de Nrh à un mauvais pronostic. Mais également, nous allons souligner dans une seconde partie que la corrélation avec un mauvais pronostic peut aussi être liée à la perte de Nrh dans certains cancers (Figure 22).

4.1.3.1. *La surexpression de Nrh, un marqueur de mauvais pronostic*

- **Dans les cancers pulmonaires**

Dans les tumeurs solides, une augmentation de l'expression de Nrh est observée dans plusieurs types de tumeurs. C'est le cas des cancers pulmonaires, notamment pour les carcinomes bronchiques à petites cellules (CBPC). Ainsi il est observé dans une cohorte de 79 patients atteints de CBPC qu'une forte expression de Nrh est corrélée à une plus faible survie à terme pour les patients (Figure 21, A2). Dans la même étude, une cohorte de 82 patients atteints de carcinomes bronchiques à non petites cellules présentaient également une augmentation de l'expression de Nrh. Cependant les données de survie ne sont pas disponibles pour ce groupe (Krajewska et al., 2008).

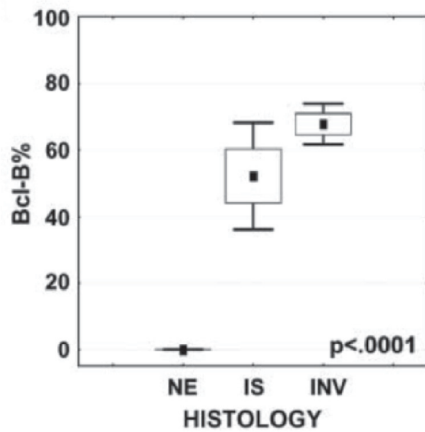
- **Dans les cancers du sein**

En complément de l'étude réalisé en 2008 (Krajewska et al., 2008), notre équipe a montré qu'une surexpression de Nrh dans les carcinomes du sein est un facteur de mauvais pronostic pour les patientes. L'expression de Nrh peut être corrélée à une survie diminuée et une résistance à la chimiothérapie. On retrouve cette surexpression dans 50% des carcinomes mammaires ainsi étudiés, et cette expression est indépendante des marqueurs classiques HER2, récepteurs œstrogènes et progestérones (Figure 21, B) (Nougarede et al., 2018)

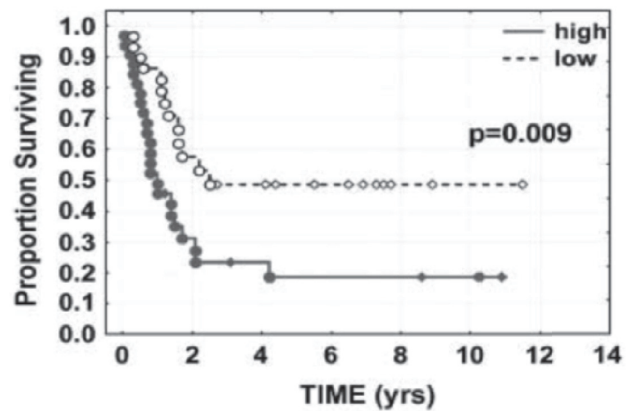
- **Dans les cancers hématopoïétiques**

Dans un modèle murin transgénique, l'expression de Nrh placée sous le contrôle du promoteur E μ induit l'apparition de myélomes multiples. Cette observation chez les souris est corrélée à une surexpression observée chez les patients atteints de myélomes multiples (Hamouda et al., 2016). De surcroît, lorsque Nrh est surexprimée, il est observé une résistance à l'Azacitidine, un agent chimiothérapeutique utilisé dans le traitement des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) et des syndromes myélodysplasiques (Figure 21, C) (Cluzeau et al., 2012). Le statut de Nrh pourrait donc constituer un marqueur pronostique de réponse à la chimiothérapie dans les cancers hématopoïétiques (Vidal et al., 2017). La surexpression de Nrh est combinée à une hyperméthylation du gène dans environ 45% des LAM analysées. Le gène BCL2L10 codant pour Nrh est très souvent la cible de méthylation aberrante dans les leucémies (Fabiani et al., 2010).

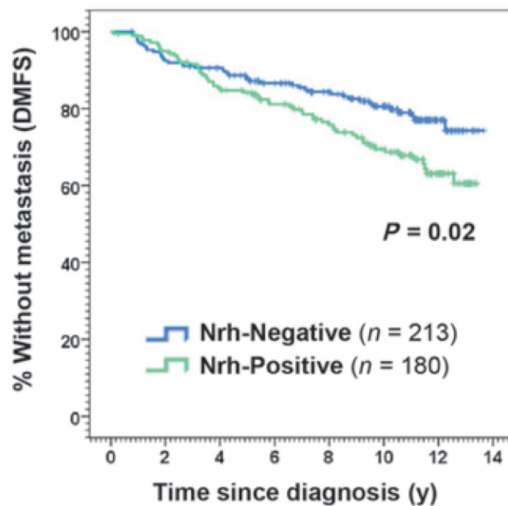
A



A.2



B



C

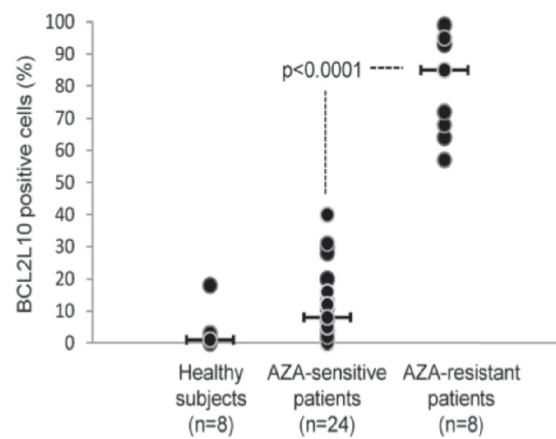


Figure 21 Corrélation du niveau d'expression de Nrh/Bcl2L10/Bcl-B avec la survie et la résistance à la thérapeutique. (A) D'après (Krajewska et al., 2008), l'expression de Nrh dans les carcinomes du sein en fonction du tissu : NE (epithelium normal), IS (in situ), INV (invasif). (A.2) D'après Krajewska et al, une corrélation entre le niveau d'expression de Nrh et la survie des patients atteints de cancers pulmonaires à petites cellules. (B) D'après (Nougarede et al., 2018), la corrélation entre l'apparition de métastases en fonction de l'expression de Nrh. (C) D'après (Cluzeau et al., 2012), résistance à l'Azacitidine en fonction de l'expression de Nrh.

4.1.3.2. La perte de l'expression de Nrh, marqueur de mauvais pronostic

Communément admise comme un anti-pro-apoptotique des Bcl-2, Nrh est mentionné comme telle dans les cancers du sein et les cancers hématopoïétiques (leucémies aiguës, syndromes myélodysplasiques). Mais cette fonction anti-apoptotique est nuancée par plusieurs études dans le cancer de l'estomac, du foie et de l'ovaire. Dans ces cancers, la diminution de l'expression de Nrh est un facteur de mauvais pronostic, et une expression élevée est corrélée à un facteur de bon pronostic. Nrh joue un rôle de facteur suppresseur de tumeur dans ces cas et présente les caractéristiques de

protéines pro-apoptotiques. Une des premières études mentionnant cette dualité de fonction de Nrh provient d'une étude sur son orthologue chez la souris Diva/Boo. Ce dernier peut fixer directement Apaf-1 et initialiser l'apoptose (Inohara et al., 1998).

- **Cancer de l'estomac**

Dans les cancers de l'estomac, il est fréquent de trouver des mutations amenant à une hyperméthylation des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs. Cela a pour conséquence de diminuer l'expression de ces gènes. C'est le cas de la protéine Nrh que l'on peut retrouver dans les tissus tumoraux avec une hyperméthylation de son promoteur amenant ainsi une diminution du niveau d'expression de Nrh. Une étude a montré l'hyperméthylation dans près de 40% des tissus cancéreux de l'estomac (Mikata et al., 2010). La faible expression de Nrh dans le cancer de l'estomac est corrélée à un mauvais pronostic clinique (Xu et al., 2010) et la surexpression dans les lignées gastriques montre une induction de l'apoptose (Xu et al., 2011). De plus l'inhibition de Nrh pourrait être un élément déclencheur dans la genèse des cancers gastriques (Mikata et al., 2006), puisqu'une diminution de l'expression de Nrh dans les lignées de cancer de l'estomac entraîne une augmentation de la prolifération des cellules (Xu et al., 2011).

- **Dans les cancers du foie**

Dans les hépatocarcinomes (HCC), Nrh serait également considérée comme un pro-apoptotique. Physiologiquement présent dans les tissus sains du foie, il est constaté une perte d'expression dans les HCC. Une étude en 2019 a notamment souligné cette perte d'expression de Nrh par rapport aux tissus normaux adjacents (He et al., 2019). L'induction de l'expression de Nrh dans les lignées d'HCC inhibe la croissance et la formation de métastases (Bai et al., 2017). Il est montré que Nrh induit l'apoptose, diminue la tumorigénèse (modèles murins) et la capacité de migration des lignées de HCC. La diminution de l'expression de Nrh, dans certains HCC pourrait être due à des modifications dans l'expression de microARN, dont le microRNA-18a (miR-18a). Nrh est la cible directe de ce microARN qui serait responsable de la diminution de son expression. En effet, dans certains HCC, le taux de miR-18a est doublé par rapport au groupe contrôle, et est corrélé à une baisse d'expression de Nrh et à la progression tumorale des HCC (Wang et al., 2018). Par ailleurs dans les HCC, Nrh interviendrait dans plusieurs voies de signalisation différentes, dont l'autophagie avec l'inhibition sur Beclin-1 et la voie JAK1/STAT3. Dans ce cadre, la diminution de Nrh entrainerait une augmentation de l'autophagie médiée par Beclin-1 (He et al., 2019). L'autophagie pourrait promouvoir en retour la survie du cancer comme mentionné précédemment en 1.2.2.

- **Cancer de l’ovaire**

Dans les cancers de l’ovaire, Nrh est aussi décrite comme un facteur suppresseur de tumeur, le KO de Nrh dans les cellules induisant une augmentation de la croissance et de la mobilité cellulaire. De plus, Nrh serait un inhibiteur de la kinase Aurora a (Aurka). La surexpression de Aurka est corrélée à un mauvais facteur de survie. Le mécanisme de régulation de Nrh sur Aurka semble être une régulation indirecte qui pourrait passer par une autre protéine, TPX2 (Targeting protein for Xklp2) (Lee et al., 2016). Lorsque l’expression de Nrh est diminuée, dans certains cas cela peut entraîner une évolution négative du cancer.

En conclusion de cette partie, il existe bien une dualité de fonctions de Nrh en tant qu’anti et pro-apoptotique. Cette dualité de fonctions est conditionnée par les interactions de Nrh avec son environnement et ses partenaires dans la cellule. La cellule cancéreuse peut alors tirer parti de cette dualité et induire ou inhiber l’expression de Nrh/Bcl2L10 pour favoriser son développement (Figure 22).

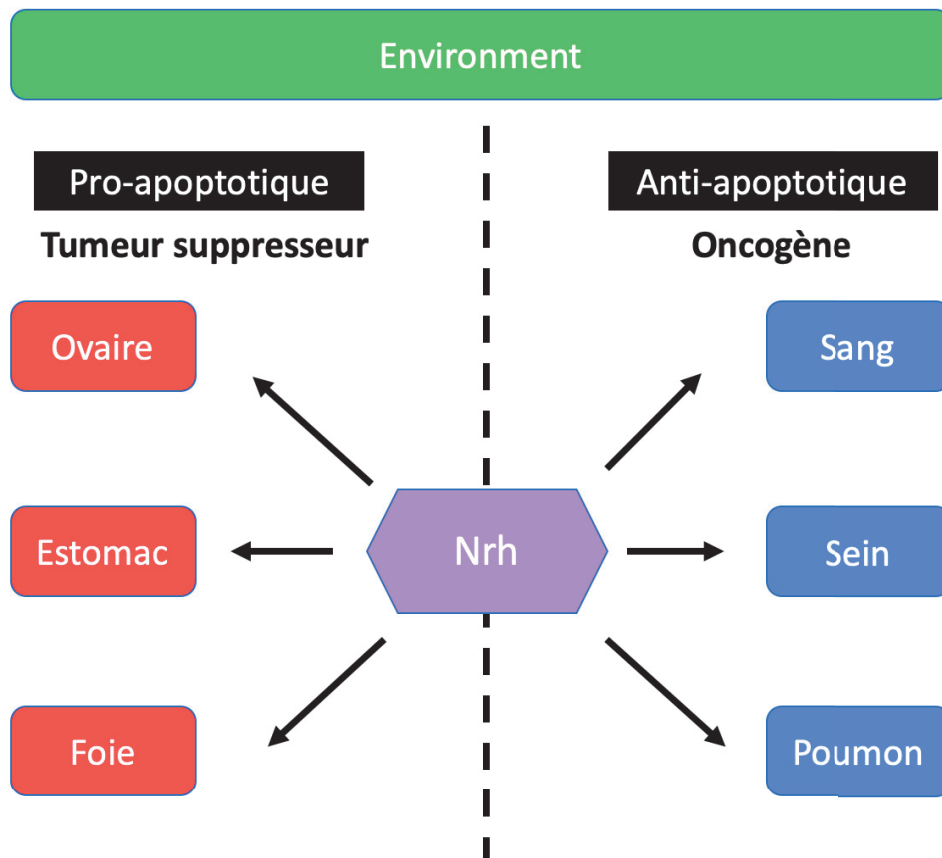


Figure 22 Nrh anti/pro-apoptotique selon l'environnement tumoral

Introduction au sujet de thèse : Le polymorphisme Leu11Arg de BCL2L10, un nouveau marqueur prédictif de réponse au traitement dans le cancer du sein

En France selon Santé Publique France et l'Institut National du Cancer, le cancer représente la première cause de décès chez l'homme et la deuxième chez la femme avec près de 157000 morts en 2018. De nouvelles technologies et stratégies thérapeutiques sont développées en permanence dans le but de combattre le cancer.

La personnalisation des traitements est un progrès nécessaire, prenant en compte les particularités individuelles comme les caractères propres de chaque tumeur (pharmacogénomique, PG). La PG est un des éléments clés de la thérapeutique anticancéreuse d'aujourd'hui. Elle vise à adapter à chaque patient le traitement en fonction de son contexte génétique. La PG permet de prédire la résistance aux traitements et de combattre les rechutes, liées par exemple aux polymorphismes (Lu et al., 2015). Le polymorphisme nucléotidique ou SNP (Single Nucleotide Polymorphism) est une variation d'une seule paire de bases du génome ayant une proportion supérieure à 1% dans l'espèce considérée. Bien que la plupart des SNPs soient silencieux, d'autres peuvent avoir des conséquences significatives sur le phénotype (Risch, 2000). De nombreux SNP intéressants ont été identifiés en oncopharmacologie et peuvent avoir un effet protecteur ou un effet délétère pour le patient. Par exemple, le SNP de la protéine p53 à la position 72 permet l'induction plus ou moins efficace de l'apoptose liée à la chimiothérapie. Ainsi les patients possédant le variant arginine Arg72 ont une meilleure réponse à la chimiothérapie que les patients possédant le variant proline Pro72 (Bergamaschi et al., 2003; Dumont et al., 2003). Il existe également des polymorphismes affectant les protéines Bcl-2 et qui peuvent influencer la réponse aux traitements anticancéreux. Par exemple, un polymorphisme de Bim provoque un épissage alternatif donnant une protéine Bim sans son domaine BH3. Ce polymorphisme induit alors une résistance intrinsèque aux inhibiteurs des Tyrosine kinases (Ng et al., 2012).

Fabiani et al ont décrit la première fois un SNP de Nrh suite à une étude génomique sur les leucémies aiguës et les syndromes myélodysplasiques. Les patients exprimant le variant nommé Leu21Arg (ce variant sera noté Nrh-R) ont moins de risques de rechute. Ce SNP résulte du remplacement d'une leucine par une arginine au niveau de l'acide aminé 21 (Fabiani et al., 2014) (Figure 23). Plus récemment, la forme Nrh-R a été décrite comme un bon facteur de réponse à la chimiothérapie dans le cancer colorectal (Lee et al., 2018). Certaines équipes utilisent le 1er ATG pour déterminer la phase codante de Nrh et ce polymorphisme est alors noté en position 21. Dans nos études, nous utilisons le 2e ATG, nous parlons donc de la position 11. Il est à noter que notre équipe a montré que l'initiation de la protéine au 1er ou 2e ATG ne changeait pas son effet anti-apoptotique (Guillemin et al., 2011).

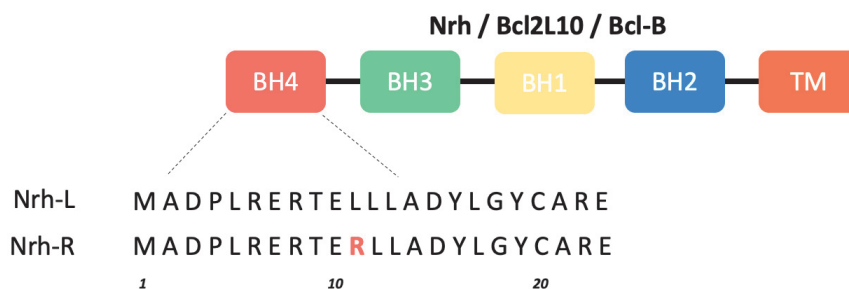


Figure 23 SNP (rs2231292) de Nrh localisée au niveau du domaine BH4 de la protéine

Les travaux réalisés par l'équipe sur la protéine Nrh peuvent nous donner des éléments de réponse quant au pronostic lié au SNP de Nrh. Comme présenté dans la partie 4.1 sur les fonctions biologiques de Nrh et la partie 2.2.1.3 sur le calcium, la protéine Nrh est localisée de manière préférentielle au RE. Nrh interagit avec le binding domaine (BD) du récepteur IP3 et bloque la sortie du calcium du RE. Le domaine BH4 de Nrh est donc critique pour l'interaction avec le BD de l'IP3R, or c'est aussi le domaine dans lequel a été localisé le polymorphisme de Nrh (Figure 23).

L'hypothèse initiale est que ce polymorphisme pourrait donc avoir un effet sur l'interaction avec le BD de l'IP3R et donc affecter l'homéostasie calcique au niveau du RE. Le SNP peut éventuellement affecter la réponse du stress calcique et de l'UPR. De plus, comme l'équipe a démontré que l'inhibition de l'interaction de Nrh avec le BD de l'IP3R sensibilise les cellules cancéreuses à l'apoptose (Nougarede et al, 2018). Le SNP pourrait affecter alors la sensibilité à la chimiothérapie des cellules cancéreuses exprimant la forme L ou la forme R.

Notre travail consistera à évaluer l'impact du SNP sur l'homéostasie et la réponse au stress calcique, puis à analyser l'influence du SNP sur la réponse à la chimiothérapie. Nous utiliserons à la fois des modèles cellulaires et nous nous appuierons sur des données cliniques pour adresser nos hypothèses.

Dans un premier temps nous avons généré des modèles cellulaires avec une surexpression de Nrh-L ou Nrh-R dans une lignée ayant une expression de Nrh très faible. Ce modèle permet de supplémente pour le moment le manque de lignées CRISPR Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR Associated protein 9) knock-in homozygote Nrh-R versus Nrh-L que nous n'avons pas réussi à obtenir. Nos résultats montrent que les cellules exprimant Nrh-R sont plus sensibles que les cellules exprimant Nrh-L à la Thapsigargine. Nous avons donc analysé la localisation subcellulaire de Nrh-R, son interaction avec IP3R1, la régulation de la sortie du calcium au RE et l'effet sur la réponse au stress par l'UPR.

Nos résultats montrent que le polymorphisme ne change pas la localisation subcellulaire de Nrh. Mais par des expériences de co-immunoprécipitation (CO-IP), nous avons montré que Nrh-R perdait sa

capacité à interagir avec le BD de l'IP3R. Cette perte d'interaction avec le BD a engendré des différences au niveau de la régulation de la sortie du calcium au récepteur. Nrh-R perd la capacité à réduire la sortie active du calcium par rapport à Nrh-L. Cette différence peut alors expliquer la différence observée par la suite dans la réponse de la cellule cancéreuse face au stress réticulaire induit par la Thapsigargine. Les cellules exprimant Nrh-L résistent mieux au stress réticulaire en affectant la voie PERK.

Cependant nous constatons peu de différence de sensibilité à l'apoptose des cellules cancéreuses vis-à-vis de plusieurs drogues testées (azacitidine, Étoposide, gemcitabine et 5FU). Pour compléter notre analyse de sensibilité à la chimiothérapie en fonction du statut polymorphique, nous avons utilisé une approche beaucoup plus systématique. Cette approche utilise à la fois les résultats de banques de données sur les lignées cellulaires et des données issues de cohortes de patients. Nous avons extrait à partir de bases de données le statut polymorphique de quelques centaines de lignées cellulaires cancéreuses (CCLE, Cancer Cell Line Encyclopedia). Puis nous avons comparé les IC50 de plusieurs drogues en fonction du statut R ou L des lignées (données de concentrations inhibitrices médianes de Genomics of Drug Sensitivity in Cancer). De manière intéressante, les résultats montrent que pour un grand nombre de composés, les IC50 sont significativement plus élevés dans les lignées Nrh-R, et ceci particulièrement dans les lignées issues de cancers du poumon, de l'ovaire et du sang. Une des perspectives de ce travail serait de tester ces molécules sorties du « criblage génotypique » dans différents modèles cellulaires afin de confirmer le différentiel de sensibilité lié au polymorphisme.

Nous avons également analysé plusieurs grandes cohortes de tumeurs (sein, ovaire, myélome). Nous n'avons pas observé de différences dans la répartition des génotypes par rapport à la population normale. Le statut polymorphique n'aurait donc pas d'incidence sur l'apparition de tumeurs. En revanche, dans une cohorte de tumeurs du sein issue du CLB, les résultats préliminaires montrent que les tumeurs Nrh-R seraient plus sensibles à la chimiothérapie. Cette étude a été réalisée sur une cohorte de 150 tumeurs du sein pour laquelle nous disposons de toutes les données clinico-biologiques. La réponse à la chimiothérapie dans ces tumeurs a été analysée à l'aide du score RCB (Residual Cancer Burden) réalisé sur le prélèvement tumoral après chirurgie chez les patientes ayant reçues la chimiothérapie avant chirurgie (collaboration avec Isabelle Treilleux, CLB).

En conclusion, le statut du polymorphisme Leu11Arg pourrait constituer un marqueur prédictif de réponse à la chimiothérapie dans les cancers.

Article 1 : Bcl2L10 Leu11Arg single nucleotide polymorphism, a new prediction biomarker in breast cancer

Duong Minh Quang¹, Gadet Rudy¹, Treilleux Isabelle⁴, Borel Stéphane¹, Nougarède Adrien^{1,5}, Marcillat Olivier¹, Popgeorgiev Nikolay¹, Gonzalo Philippe^{1, 2}, Mikealian Ivan¹, Rimokh Ruth^{1*}, Gillet Germain^{1,3*}

¹ Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, Lyon, 69008, France

² Laboratoire de Biochimie, CHU de Saint-Etienne, Université de Lyon, France

³ Hospices civils de Lyon, Centre de Biologie Sud, Centre Hospitalier Lyon Sud, chemin du Grand Revoyet, 69495 Pierre Bénite, France

⁴ Département de Biopathologie, Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁵ Division for biology and healthcare technologies, CEA-LETI, MINATEC Campus, F-38054 Grenoble, France

*These authors share senior authorship

Correspondence:

germain.gillet@univ-lyon1.fr; Tel.: +33469166656; Fax: +33469166660

ruth.rimokh@inserm.fr; Tel.: +33478782903; Fax: +33469166660

In preparation for submission

Abstract

Overexpression of Bcl-2 proteins such as Bcl2L10, also referred to as Nrh, is associated with therapy resistance and poor survival prognosis in various cancers, including breast cancer, lung cancer and leukemia. The single nucleotide polymorphism (SNP) of BCL2L10 in its BH4 domain at position 11 (BCL2L10 Leu11Arg, #rs2231292), corresponding to position 11 in Nrh open reading frame, is reported to lower resistance towards chemotherapy, patients showing better survival in the context of acute leukemia and colorectal cancer. Using cellular models and cohort analyses, we aimed to decipher the underlying mechanisms regarding breast cancer. We report here that Nrh Leu11Arg isoform (Nrh-R) conferred higher sensitivity towards Thapsigargin compared to Nrh-L isoform, due to altered interactions with IP₃R1 Ca²⁺ channels. Indeed, cells expressing the Nrh-R isoform were found to be more prone to death triggered by ER stress and subsequent unfolded protein response, compared to Nrh-L expressing cells. Analysis of breast cancer cohorts revealed that patients genotyped as Nrh-R/Nrh-R are likely to experience better outcome. Finally, we mapped out a list of therapeutic compounds being presumably more potent against Nrh-R- than Nrh-L- expressing tumour cell lines. Overall, this study supports the notion that the rs2231292 Nrh SNP could be used as a predictive tool regarding chemoresistance, helping decide the most effective therapy.

Introduction

Since the discovery of Bcl-2 in the early 1980s, the role of Bcl-2 family proteins in cell death has been extensively studied. Indeed, to cope with oncogenic stress, cancer cells often rely on the upregulation of antiapoptotic Bcl-2 proteins. Anti-apoptotic Bcl-2 homologs have four homologies domain referred to as Bcl-2 homology (BH) domains. BH3, BH1 and BH2 domains are clustered at the level of an hydrophobic binding pocket that mediates most protein-protein interactions (PPI) involved in apoptosis control (Popgeorgiev et al., 2018). Moreover, the BH4 domain appears to act as a guardian of the pocket entrance (Liu et al., 2016b). Of note, the BH4 domain was also reported to interact with a number of partners outside the Bcl-2 family, contributing in this way to non-canonical functions, beyond apoptosis, such as Ca²⁺ homeostasis maintenance (Bonneau et al., 2013; Gross and Katz, 2017). In this respect, it is noteworthy that, regarding Bcl-2 and Bcl-2l10/Nrh for instance, the BH4 domain contributes to complex formation with IP3R Ca²⁺ channels at the level of the endoplasmic reticulum (ER). Actually, there is growing evidence that the BH4 domain is involved in resistance towards chemotherapy (Liu et al., 2016b). However, the underlying mechanisms remain to be fully understood. Bcl2L10 also referred to as Bcl-B or Nrh was identified as an antiapoptotic protein, being found to be up-regulated in various cancers, including leukemia and breast cancer (Hamouda et al., 2016;

Nougarede et al., 2018). *Nrh* expression was correlated with poor prognosis in several instances (Nougarede et al., 2018). However, *Nrh* can also exert proapoptotic effects in some cancers by still unknown mechanisms (Bai et al., 2017; Xu et al., 2011). A single nucleotide polymorphism (SNP #rs2231292) was described in the *BCL2L10* locus, at position 21 *BCL2L10*-Leu11>A (position 11 with respect to *Nrh* ORF). This SNP is located at the level of the BH4-encoding region. It was associated with risk of relapse and chemoresistance in acute leukemia and colorectal cancer, respectively (Fabiani et al., 2014; Lee et al., 2018). To date the underlying mechanisms remain unknown.

We previously showed that *nrh* gene expression is an independent poor prognostic marker in breast cancer, being associated with shorter Distant Metastasis Free Survival (DMFS) (Nougarede et al., 2018). Here, we sought to assess the significance of the rs2231292 polymorphism described in the *nrh* locus in the context of breast cancer. Analyses performed on patient cohorts indicate that this polymorphism is not predictive as a risk factor. On the other hand, the homozygous R/R character was found to be of good prognosis factor regarding the response to chemotherapy. Mechanistically, we showed that the *Nrh*-R isoform, in contrast to the *Nrh*-L isoform, had lost its ability to associate with the N-terminal region of the IP3R1 Ca²⁺ channel and thus to block the response to Ca²⁺ stress inducers. Collectively, our data provide a molecular explanation regarding current clinical data and identify the *Nrh*/IP3R1 complex as a novel therapeutic target.

Results

The *nrh* gene harbours a polymorphism (SNP #rs223192) affecting the N-terminal region of the *Nrh* protein such that either a leucine (L) or an arginine (R) is found at position 11, see Fig. 1A. Analysis of available databases shows that 10% of the population worldwide, regardless of gender, is homozygous R/R. Of the rest of the population, 58.3% are homozygous L/L and 32% heterozygous L/R (Fig. 1B).

We showed that the expression of *Nrh* is of bad prognosis in the context of breast cancer. Analysis of this polymorphism in two cohorts of patients (SIGNAL/PHARE and Centre Léon Bérard) shows no difference compared to the general population (Fig. 1C). Thus, this polymorphism does not appear to be predictive as a risk factor for breast cancer.

Nrh is an anti-apoptotic protein mainly located in the endoplasmic reticulum (ER) (Nougarede et al., 2018). At this level, *Nrh* controls the release of Ca²⁺_{ER} by interacting with the IP₃R1 channel. The L/R polymorphism is located right in the middle of the BH4 region at the N-terminus end of *Nrh*. Interestingly this region was reported to interact with the ligand binding domain of human IP₃R1 (hBD)

(Nougarede et al., 2018). This prompted us to test whether the polymorphism could affect the anti-apoptotic function of Nrh, and in particular its ability to interact with the IP₃R1 channel.

Using HeLa cells as a model, we established that ectopic expression of Nrh-L and Nrh-R isoforms inhibited cell death induced by staurosporin, a promoter of the mitochondrial pathway of apoptosis, to the same extent (Fig. 2A,B). Similarly, in these cells, both isoforms protected with equal efficacy against azacytidine, 5FU and other cytotoxic agents used in chemotherapy (Supplementary Fig. S1). In contrast, the Nrh-L isoform was significantly more effective against Thapsigargin, a Ca²⁺ stress inducer (Fig. 2 A-C). These observations were corroborated by measuring the activity of Caspase-3, an enzymatic marker of apoptosis (Fig. 2 D, E).

Mechanistically, the location of Nrh at the level of the ER is critical for its effect on Ca²⁺ homeostasis and Thapsigargin-induced cell death (Nougarede et al., 2018). In fact, both Nrh isoforms display similar subcellular distribution (Fig. 3A,B). In contrast, co-immunoprecipitation (co-IP) experiments described in Fig. 3C (left panel) clearly showed that the binding affinity of the Nrh-R isoform for the hBD region of IP₃R1 is significantly lower. Very interestingly, in the same series of experiments we were able to show that the affinity of Nrh for the central region MTDII is independent of the L/R polymorphism (Fig. 3C, right panel).

Overall, the above data showed that the L/R polymorphism affects the Nrh/IP₃R1 complex at the level of the hBD region, suggesting consequences regarding IP₃-dependent Ca²⁺ permeability of the IP₃R1 channel.

To test this hypothesis, using HeLa cells as a model, we measured the ability of both Nrh isoforms to modulate the release of Ca²⁺_{ER}, following treatment with Histamine, a Phospholipase-C activator causing rapid increase of IP₃ levels and subsequent IP₃R1 channel opening. Measurements made using the fluorochrome R-Cepia1er clearly showed that the Nrh-R isoform did lost its ability to prevent the release of Ca²⁺_{ER} in response to Histamine (Fig. 4A).

At the ER level, several proteins of the Bcl-2 family have been described as acting, in addition to the IP₃-dependent Ca²⁺_{ER} release, on the passive Ca²⁺_{ER} output, which is independent of IP₃. This so-called "passive" output can be measured by blocking the uptake of Ca²⁺ by the ER with Thapsigargin, an inhibitor of the SERCA pump. The results depicted in Fig. 4B show that the passive Ca²⁺ leakage was effectively increased by Nrh-L, and to a lesser extent by Nrh-R. These observations are in close correlation with their respective capacities to inhibit Thapsigargin-induced cell death (see Fig. 2).

On the other hand, neither isoform appeared to significantly affect the incoming Ca²⁺ flows from outside the cell referred to as Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE, see Fig. 4C).

Overall, these data show that the Nrh-L and Nrh-R isoforms act differentially on the response to Ca²⁺ stress induced by Thapsigargin and Histamine. In contrast, in stressless steady state conditions, neither isoform appeared to notably affect Ca²⁺_{ER} levels (Fig. 4D).

Taken together, the above results show that Nrh-R is less protective with respect to Ca²⁺ stress. We previously showed that, downstream of Ca²⁺ stress, Nrh was able to dampen the UPR response, which could contribute to its tumour-promoting effect (Nougarede et al., 2018). We therefore compared the status of a series of markers of the UPR response in cells ectopically expressing one or the other Nrh isoform. To this end, we again used the model of HeLa cells transfected with pCS2⁺ expression vectors and treated for 24 hours with Thapsigargin (10µM). Fig. 5 clearly shows that Nrh-L prevents the phosphorylation of the eIF2 factor, unlike Nrh-R. On the other hand, under these conditions, the levels of GRP78/Bip and CHOP did not seem to be significantly affected (see also additional Fig. S2).

Overall our data indicate that the L/R polymorphism affects the anti-death ability of Nrh, by affecting the Nrh/IP3R1 complex. A number of data in the literature indicate that the Nrh/IP₃R1 complex may play a role in the response to cell death-inducing agents, including anticancer agents (Nougarede et al., 2018). We therefore investigated, in a clinical context, the extent to which L/R polymorphism could be correlated with chemoresistance. To do this, we examined the response to chemotherapy in a cohort of CLB patients. Our results clearly showed that homozygous R/R patients respond better to treatment (50% complete remission) than L/L or L/R patients among whom no more than 20% show complete remission (Table 1).

Beyond breast cancer, we have analysed the available data about the resistance of a collection of human lines established from different tumours. For this purpose, we have listed for each cell line, the IC₅₀ as calculated from a collection of anticancer agents of clinical interest. Data in Table 2 show that, overall, L/L cells seem to be more resistant (higher IC₅₀) than R/R cells, which supports that, beyond the context of breast cancer, the Nrh L/R polymorphism could be an indicator of chemotherapy response in a number of cases.

Discussion

Nrh polymorphism and chemoresistance

Expression of *bcl2L10/nrh* has been repeatedly reported as a poor prognosis marker, including in acute myeloid leukemia, colorectal cancer and breast cancer. Moreover *nrh* overexpression in breast cancer shortens DMFS. Here we hypothesized that expression of the Nrh-R isoform may not have the same detrimental outcome as its Nrh-L counterpart. Indeed, breast cancer patient cohorts analysis revealed that Nrh-R expression may predispose towards higher chemo sensitivity. Indeed, Nrh-R-expressing cells appear to be more sensitive to Thapsigargin than Nrh-L cells. At the molecular level, this can be explained by the loss of interaction between Nrh-R and IP3R1 at the hBD level. Therefore, Nrh-R could not control ER Ca^{2+} homeostasis, as Nrh-L does, cells being unable to deal with ER stress anymore. However as shown in supplementary Fig. S1, not all compounds are concerned by Nrh-dependent Ca^{2+} homeostasis. Indeed, Nrh-L- and Nrh-R- expressing cells displaying the same level of chemo resistance to azacitidine or etoposide, for instance. Mechanically speaking, the BH4 domain is critical for the interaction with IP3R1 hBD, contributing to its anti-apoptotic activity. Therefore, the present polymorphism might not affect interactions outside hBD and the IP3R (ie: mitochondria). Indeed, we have shown no difference of interaction between Nrh-L and Nrh-R at the modulating domain II (MTDII) (Fig. 3 D). In this regard, it would be interesting to be able to further disrupt such interactions and check whether it can fully abolish cell death resistance.

Nrh and calcium dependent apoptosis

Our data suggest that Nrh-L confers better protection with regard to Ca^{2+} stress inducers, which may underly chemoresistance. At the level of the ER, Nrh appears to affect both IP3-dependent (active) and passive $\text{Ca}^{2+}_{\text{ER}}$ release. Indeed, Nrh-L, but not Nrh-R, efficiently decreases active $\text{Ca}^{2+}_{\text{ER}}$ release. On the other hand, we observed that Nrh-L fosters $\text{Ca}^{2+}_{\text{ER}}$ passive leakage more efficiently, compared to Nrh-R, as measured in presence of Thapsigargin. Both effects may contribute to the observed increased chemoresistance as observed in Nrh-L-expressing cells. Indeed, the decrease of $\text{Ca}^{2+}_{\text{ER}}$ is known to prevent mitochondrial outer membrane permeabilization and subsequent apoptosis (Szegezdi et al., 2009). It is worth to be noted that, in addition, Nrh-L may negatively impact the UPR via the lowering of eIF2 α phosphorylation which might synergistically promote chemoresistance resistance. Activation of Perk and subsequent phosphorylation of eIF2 α results in global downregulation of protein synthesis. Actually, it is anticipated that the increase of protein synthesis, including anti-apoptotic proteins, resulting from eIF2 α dephosphorylation, may help cope with apoptosis triggered by ER stress (Rozpedek et al., 2016). Further experiments are required to validate our hypothesis.

Nrh in breast cancer, cancer onset and chemo response

Collectively cohort analyses confirmed that our observation that Nrh-R may be a good prognosis marker regarding response to chemotherapy. In contrast our data do not suggest an impact of Nrh polymorphism regarding cancer onset. Thus, we did not come to the same conclusion as Fabiani and colleagues (Fabiani et al., 2014; Lee et al., 2018). In fact , Nrh polymorphism is presumably far to be the only factor impacting cancer onset.

Data mining and predictive drugs profiling

A systematic approach using data mining and predictive drugs profiling based on chemo sensitivity (IC_{50} , see Table 2), have been used. Interestingly, a number of compounds were found to be more effective against Nrh-R than Nrh-L-expressing cell. The data mining method was limited mainly due to the number of available cell lines from each organs. Additionally, as the Nrh-R isoform is under represented in the global population (10%, figure 1.B), fewer Nrh-R/Nrh-R homozygous cell lines are available, which is a limitation regarding statistical analyses. Such *in silico* observations require further experimental and clinical confirmation. Nevertheless, the observations reported herein collectively support the idea that the ability of cancer cells to hijack Ca^{2+} homeostasis control opens novel avenues for targeted therapies.

Materials and methods

Tumor samples

A prospective clinical cohort (SIGNAL/PHARE) was specifically designed to study constitutional genetics in patients with breast cancer. This cohort, funded by the French National Cancer Institute (INCa), consists of over 9800 patients diagnosed with breast cancer, recruited through a network of clinicians across France from May 2006 to December 2013. The SNP status of rs2414131, strongly associated with the SNP studied in this work (rs223192), was determined in 8356 patients.

We screened 145 female patients (median age 49 years) with operable primary breast cancer who underwent neoadjuvant therapy before surgery at Centre Léon Bérard (CLB) between 2006 and 2015. The SNP status of rs223192 was directly determined on archival formalin-fixed paraffin-embedded by TaqMan™ probe (Biosystems Assay probe #4351379). Chemoresponse was determined using Residual Burden Score (RCB) on tumor samples after surgery.

Big Data analysis

Half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of therapeutic compounds in cell lines were extracted from Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC) database. The SNP status of rs2414131, strongly associated with the SNP studied in this work (rs223192), was available in the database of the Broad Institute Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE). The strong correlation between rs2414131 and rs223192 was determined using LDpair Tool of the National cancer institute (NIH).

Cell culture

HeLa and MDA-MB-231 cells were obtained from the ATCC and cultured on collagen-coated dishes in DMEM (Gibco, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum, streptomycin and penicillin (100U.mL⁻¹). Cell lines were routinely tested for mycoplasma contamination using Mycoalert kit (Lonza) and authenticated by single nucleotide polymorphism profiling (Multiplexion GmbH).

Intracellular Ca²⁺ measurements

Before Ca²⁺ imaging, cells were plated in Nunc™ Labtek® chambered cover glass. For subcellular ER Ca²⁺ imaging, HeLa cells were transfected with R-CEPIA1er probe, 2 days prior imaging using XtremeGENE HP DNA (Roche). For cytosolic measurement, cells were loaded with 5 μM of FluoForte™ Ca²⁺ probe in a Ca²⁺-free Balanced Salt Solution (BSS) (121 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgCl₂, 6 mM NaHCO₃, 5.5 mM D-glucose, 25 mM HEPES, pH 7.3) for 30 min at 37°C. After 10 seconds of measurement, either 100 μM histamine or 10 μM of Thapsigargin in Ca²⁺ free solution was added. For calcium refilling assays, a solution of 2 mM Ca²⁺ was added to the mix. Time-lapse fluorescence values

were collected using a Zeiss LSM 780 confocal microscope. The images were captured at a rate of one frame per 2 seconds using a x40 objective. All images were analyzed by ImageJ software.

Apoptosis assay

HeLa cells were treated either with staurosporine (1 μ M for 24h), Thapsigargin (10 μ M for 72h), etoposide (25 μ M for 48h), azacytidine (25 μ M for 72h) and doxorubicin (10 μ M for 72h). For kinetic experiments, cells were seeded onto a 96-well plate 12h prior treatments. Images were acquired using an Incucyte ZOOMTM at a rate of every hour from 0 to 72h at 4x magnification. Dead cells were determined using SytoxTM Green Nucleic Stain (0.5 μ M, ThermoFischer Scientific). Data were processed using a dedicated algorithm and normalized through cell confluence.

Immunoprecipitation Assay

HeLa cells were transfected with the indicated vectors and grown for another 48 hours in 6-well plate. Cells were lysed in TNE buffer (10 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA (pH 7.4), 1 mmol/L b-glycerophosphate, 1 mmol/L sodium orthovanadate, 0.1 mmol/L sodium pyrophosphate, 0.2 % NP-40, protease and phosphatase inhibitor (Roche)). Lysates were precleared with protein G-Sepharose beads (Sigma) for 2 hours at 4°C, then incubated overnight with 2 mg primary antibodies (Flag or HA). Extracts were incubated with protein G-Sepharose beads for 3 hours. Immunoprecipitated fractions were washed three times with TNE buffer, and analyzed by immunoblotting. Alternatively FlagM2 magnetic beads (Sigma) can also be used as a replacement for primary antibodies and protein G-Sepharose.

Immuno Blotting assay

For kinetic experiments, cells were treated prior harvesting with corresponding drugs. Cell pellets were prepared using RIPA solution then separated via SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked for 1h in 5% milk or BSA TBS solution followed by overnight incubation with primary antibodies at 4°C. Membranes were washed for 3x 15 min at RT in TBS-T (0,1%). Goat anti mouse/rabbit HRP-conjugated secondary antibodies (Dako, 1:3000) were incubated for 1h in 5% milk at RT followed by 3x 15 min at RT in TBS-T. Membranes were exposed to Lumi-Light western blotting substrate (Roche) and detected on Bio-rad ChemidocTM imagers.

Primary antibodies used : Vinculin (Santa Cruz #sc-55465; 1:2000), α -Tubulin (Santa Cruz #sc-32293; 1:1000), Actin (Sigma-Aldrich #A2066; 1:1000), eIF2 α (Cell Signaling #2103, 1/1000), phospho-eIF2 α (Cell Signaling #3398, 1:1000), ATF4 (Cell Signaling #11815, 1:1000), CHOP (Cell Signaling L63R7 #2895, 1:1000), FlagM2 (Sigma #F1804, 1:1000), HA (Sigma #H6908, 1:1000)

Immunofluorescence

Cells were seeded on a glass cover slip in 12-well plates. After 24h and prior to fixation, cells were incubated with mitochondria-staining dye (MitoTracker™ Red CMXRos, Life technologies) for 20 min at 37°C and then fixed with 4% Paraformaldehyde. Paraformaldehyde was discarded and cells were washed with PBS. Cells were incubated for 30 minutes (min) with blocking buffer (0.1% Triton X100, 3% BSA in PBS), incubated for 1 hour at RT with primary antibodies and then incubated 1 hour with Alexa fluor® secondary antibodies (488, 568nm, Invitrogen). Hoechst 33342 (1:10000, Invitrogen #H3570) in TBS-T was added to stain cells' nucleus. Covers lips were mounted with a Dako mounting medium. Images were acquired using a Zeiss 780 confocal microscope. Primary antibodies included : FlagM2 (Sigma #F1804, 1:1000), Calnexin (Cell signaling #2679, 1:1000), cleaved caspase 3 (Cell signaling #9661S, 1:400).

Quantitative PCR

Total RNA was isolated from HeLa cells treated with 10µM Thapsigargin over 24 hours (NucleoSpin RNA plus kit, MACHEREY-NAGEL). 1µg of total RNA was used for cDNA synthesis using reverse transcriptase SuperScript II™ (ThermoFisher Scientific) and hexamer random primers following manufactured recommendations. The synthesized cDNA was used for RT-QPCR using FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche, Germany). The primer sequences are given in the following table:

GENE NAME	FORWARD	REVERSE
CHOP	AGAACCAGGAAACGGAAACAGA	TCTCCTTCATGCGCTGCTTT
XBP-1s	CTGAGTCCGAATCAGGTGCAG	ATCCATGGGGAGATGTTCTGG
ATF4	GTTCTCCAGCGACAAGGCTA	ATCCTGCTTGCTGTTGTTGG
GAPDH	CCATCACCATCTTCCAGGAGCGA	GGTGGTGAAGACGCCAGTGGA
HTRP	TATGGCGACCCGCAGCCCT	CATCTCGAGCAAGACGTTTCAG

Statistical analyses

Statistical significance between two groups was analyzed using the 1-tailed Student t test . All statistical tests regarding data analysis were two-sided. A p value equal to or under 0,05 was considered statistically significant.

Tables and figures

Table 1. Breast cancer chemoresponse as a function of Nrh polymorphism

Bcl2L10 Breast / CLB	Test population	Residual cancer burden (RCB)		Statistical analysis Fischer's exact test	
Genotype	n = 112	pCR %	RCB I-III %	OR (95%)CI	p-value
Arg/Arg	12	50,0	50,0	1,00 (Ref)	
Leu/Leu	49	22,4	77,6	0,29 (0,077-1,08)	0,077
Leu/Arg	51	17,6	82,4	0,21 (0,056-0,82)	0,028
Leu/Leu + Leu/Arg	100	20,0	80,0	0,25 (0,072 - 0,85)	0,031

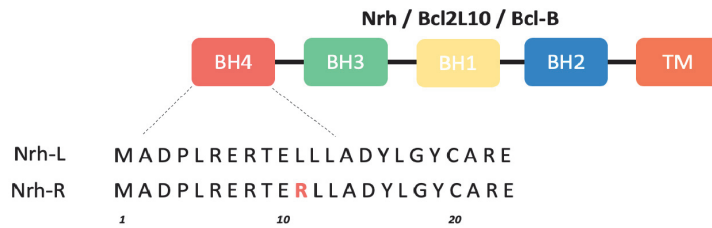
Residual Cancer Burden (RCB) score was determined through pathologic section of primary breast tumor. pCR (pathologic complete response) was considered the best chemoresponse and worst outcome from RCB-I to RCB-III. Statistical analysis was performed using Fischer's exact test with an Odds Ratio (OR) at 95% confidence interval (CI). OR<1 indicated lower odds of association between Nrh-L and pCR. p<0,05 was considered as statistically significant.

Table 2. Polymorphism and drug resistance

A

Cancer Cell Lines	Compound	Statistical analysis, p-value		
		Nr _h -L vs Nr _h -R		Wilcoxon Sum Rank Test
		Median IC ₅₀ μM		
L/L	R/R			
Lung	JQ12	6,43	1,32	0,0030
	Zibotentan	282,08	208,63	0,0068
	AKT VIII inhibitor	13,40	6,42	0,0077
	JNK-9L	0,98	0,57	0,0130
	EHT-1864	55,62	28,29	0,0132
	BAY-61-3606	12,87	7,66	0,0192
	Epothilone B	0,013	0,0026	0,0195
	SNX-2112	1,15	0,37	0,0203
	JAK1_3715	100,43	52,80	0,0217
	Thapsigargin	0,021	0,0081	0,0360
Blood	Enzastaurin	11,71	4,94	0,0053
	IPA-3	24,05	8,87	0,0135
	THZ-2-49	1,71	0,54	0,0178
	AZD7969	6,63	2,66	0,0190
	PHA-793887	1,42	0,42	0,0207
	XMD8-85	11,25	5,52	0,0237
	JW-7-24-1	0,42	0,17	0,0298
	AZD5582	1,12	0,50	0,0371
	T0901317	27,33	12,91	0,0396
	Kobe2602	75,23	48,85	0,0408
Ovary	TWS119	16,30	3,89	0,00023
	SB505124	86,32	4,97	0,00047
	WHI-P97	51,68	13,71	0,00168
	C-75	209,84	48,31	0,00280
	IMD-0354	3,96	0,99	0,00980
	CI-1033	36,53	5,54	0,01401
	GSK1059615	3,48	1,29	0,01401
	Afatinib	3,24	0,45	0,01401
	FR-180204	153,25	52,41	0,01513
	THZ-2-102-1	0,29	0,09	0,02269

Results of compound's IC₅₀ from GDSC set1 combined with polymorphism rs3794541 for each cell lines from CCLE. Table shows top compounds which displayed higher resistance (IC₅₀ mean Nr_h-L > Nr_h-R) for Nr_h-L compared with Nr_h-R for lung, blood and ovarian cancer cell lines.

A**B**

Gnomad dataset GRCH37/HG19	Population n=	L/L %	L/R %	R/R %
ALL population	177982	58,3	32,0	9,7
Male	98502	59,0	31,6	9,4
Female	79480	57,5	32,5	10,0

C

Breast Cohort	n=	Leu/Leu %	Leu/Arg %	Arg/Arg %
SIGNAL PHARE	8356	43	46	11
Centre Léon Bérard	145	45,8	43,6	10,6

Figure 1 SNP Leu11Arg of Nrh

(A) Scheme of the Nrh protein displaying BH and TM domains (colored boxes). Location of the L/R polymorphism, giving rise to Nrh-L and Nrh-R isoforms is shown.

(B) Distribution of Nrh-L and Nrh-R isoforms (SNP # rs223192) among the general population worldwide, according to Gnomad dataset GRCH37/HG19.

(C) Distribution of Nrh-L and Nrh-R isoforms (SNP # rs223192) in breast cancer patient cohorts (Signal Phare and Centre Léon Bérard).

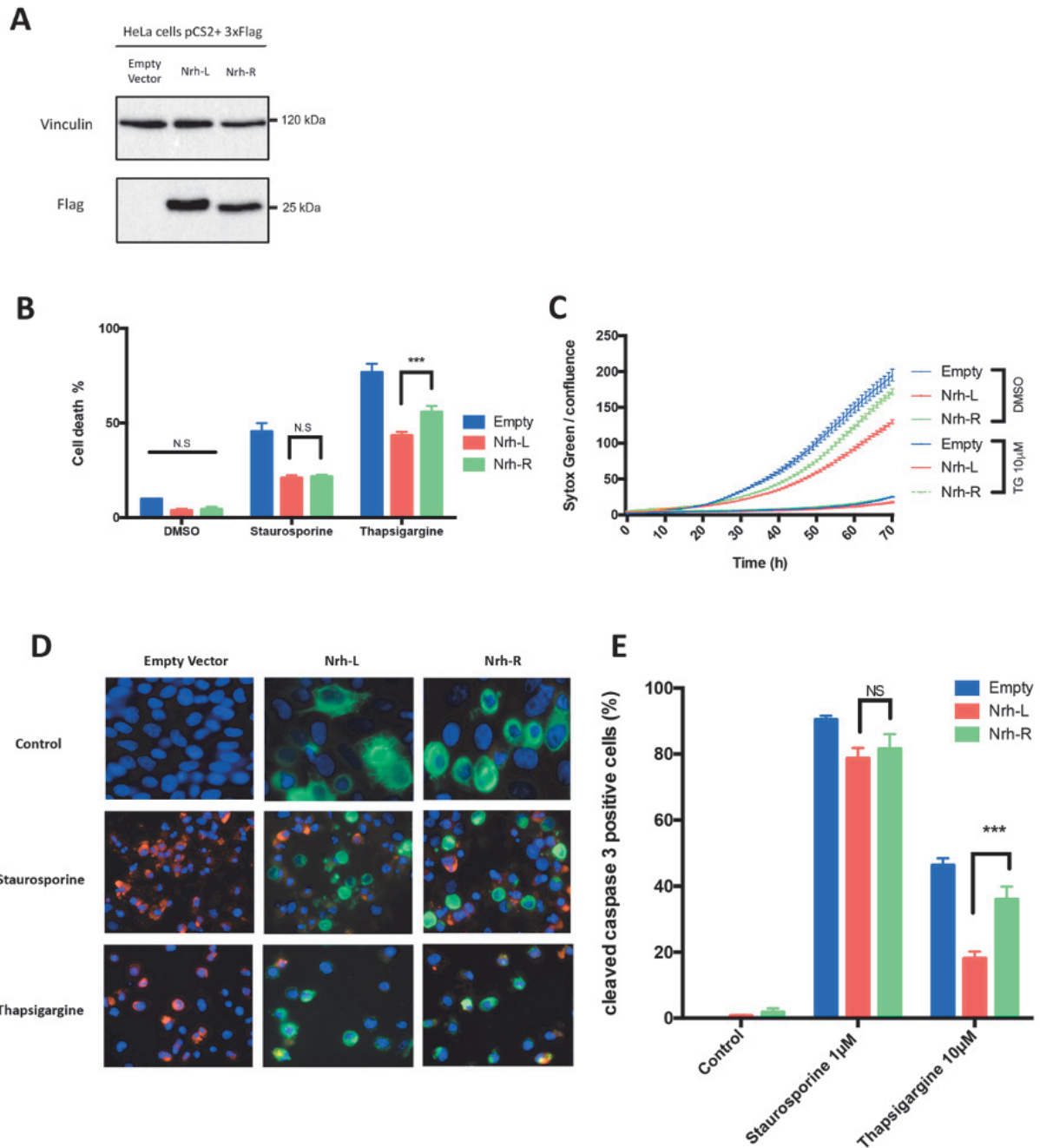


Figure 2 Effect of Nrh-L and Nrh-R with respect to Staurosporine and Thapsigargin insults

(A) Western blotting. Nrh expression in pCS2⁺ transfected HeLa cells. Anti-Flag antibody was used for the detection of Flag-tagged Nrh, anti-vinculin was used for calibration.

(B) Cell death quantification (SytoxGreenTM positive cells), compared to control ("Cell death %", vertical axis), in HeLa cells stably transfected with pCS2⁺ empty vector, pCS2⁺ Flag Nrh-L or pCS2⁺ Flag Nrh-R. Cells were treated with 0,125µM Staurosporine for 24 hours or 10µM Thapsigargin (TG) for 72h h.

(C) Kinetics analysis of cell death (0 to 72h) with respect to cell density (SytoxGreenTM/confluence) upon Thapsigargin treatment (TG). DMSO-treated cells were used as a control.

(D) Immunofluorescence detection of cleaved Caspase-3 (orange) and Flag-tagged Nrh (green) in cells treated with either Staurosporine 1µM for 24h or 10µM of Thapsigargin for 48h.

(E) Quantification ("Cleaved caspase-3 positive cells %", vertical axis) of dying cells as detected by immunofluorescence. Statistical analyses were performed using mean ± SEM (n=3).

*** T-test P value < 0.001

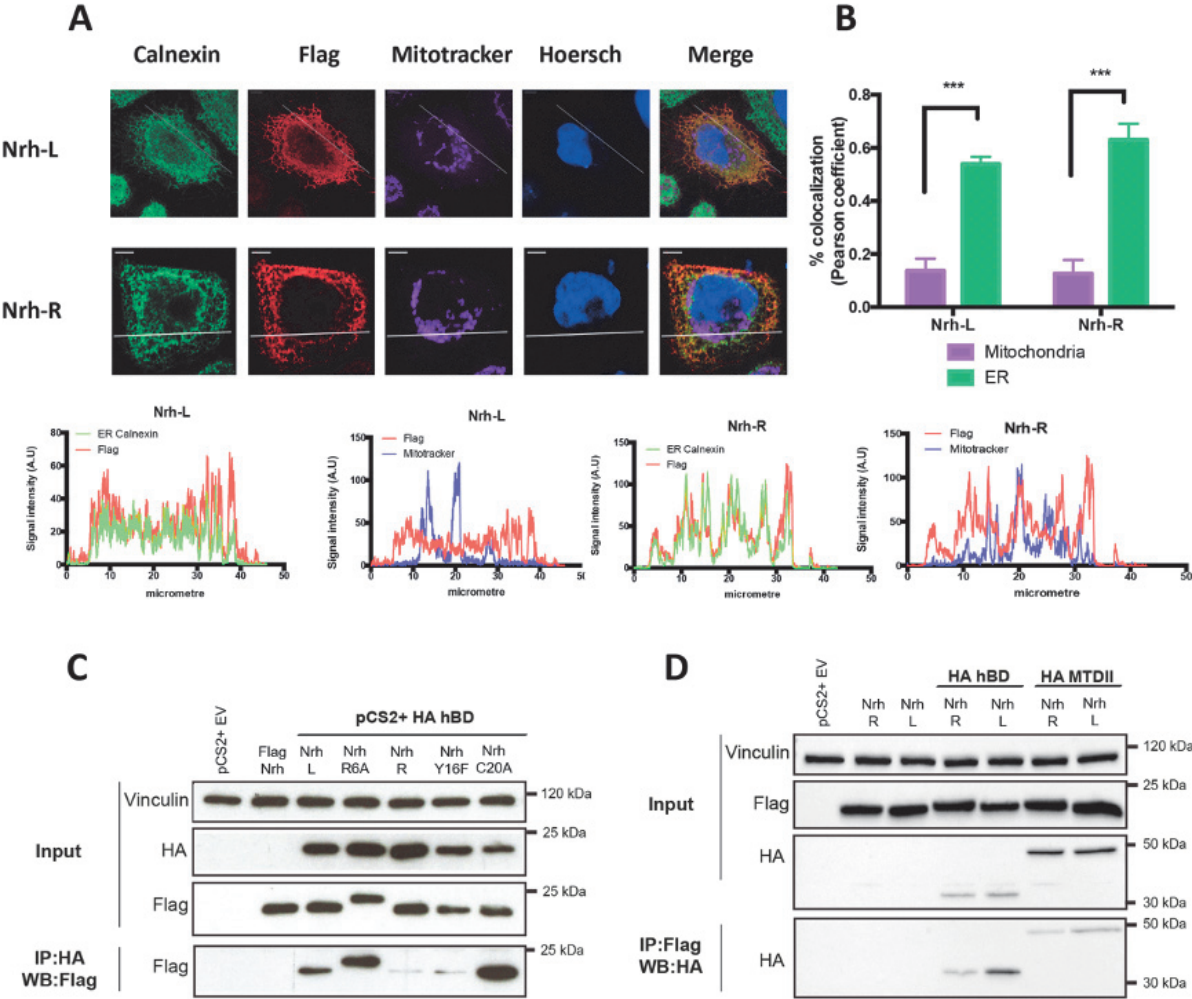


Figure 3 Distribution of Nrh-R and Nrh-L isoforms

(A) Upper left panels: confocal imaging. Immunofluorescence detection of Nrh subcellular localization in HeLa cells expressing Nrh-L and Nrh-R. ER and mitochondria localization was assessed using anti calnexin antibody and MitoTracker™ Deep Red, respectively (Scale bars: 5µm). Lower panels: profile plots showing fluorescence intensity along the white segments displayed on merged images (ImageJ™ software quantification).

(B) Histograms showing percentage of colocalization according to Pearson coefficient (Fiji™ software using Coloc2 tool). Both Nrh isoforms exhibit similar localization.

(C) Co-immunoprecipitations. HeLa cells were co-transfected with vectors expressing IP3R1 binding domain (HA-hBD) and Flag-tagged Nrh (Nrh-L, Nrh-R or Nrh BH4 mutants, as indicated). Immunoprecipitations were performed using anti-HA antibodies, immunoblots were revealed with anti-Flag antibodies.

(D) Co-immunoprecipitations. HeLa cells were co-transfected with vectors expressing IP3R1 binding domain (HA-hBD) or IP3R1 transducing domain II (MTDII) with either pCS2⁺ empty vector, pCS2⁺ Flag Nrh-L or pCS2⁺ Flag Nrh-R. Immunoprecipitations were performed using anti-Flag antibodies, immunoblots were revealed with anti-HA antibodies. Nrh-R exhibit poor binding affinity with hBD, compared with Nrh-L

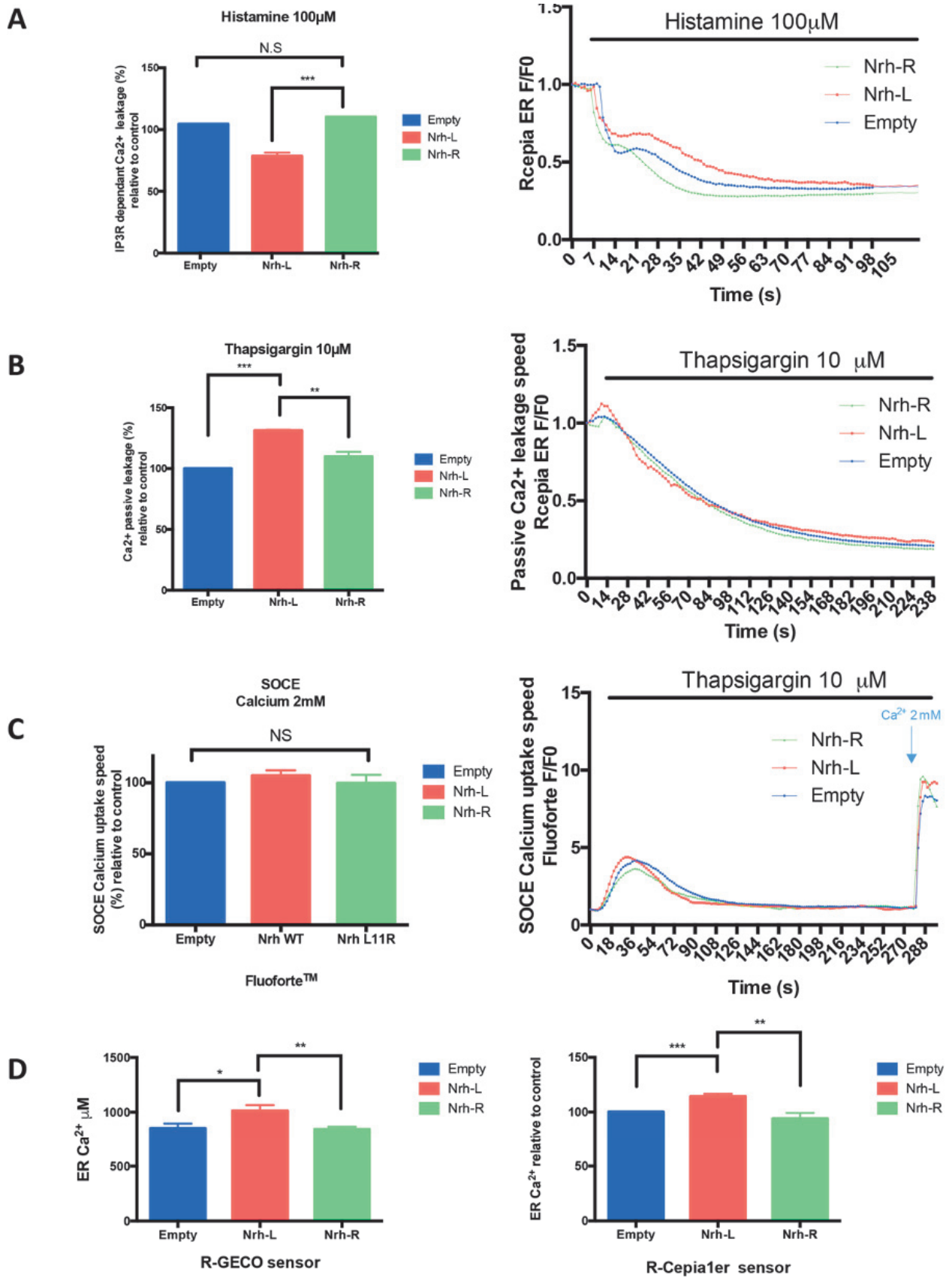


Figure 4 Effect of Nrh-R and Nrh-L isoforms on Ca²⁺ trafficking

(A) Quantification of the slope coefficient of $\text{Ca}^{2+}_{\text{ER}}$ release after Histamine injection ($100 \mu\text{M}$) in HeLa cells transfected with either pCS2+ empty vector, pCS2+ Flag Nrh-L or pCS2+ Flag Nrh-R. Prior to the experiment cells were transfected with R-Cepia1er, a $\text{Ca}^{2+}_{\text{ER}}$ specific probe.

(B) Quantification of the slope coefficient of $\text{Ca}^{2+}_{\text{ER}}$ release after Thapsigargin injection ($10 \mu\text{M}$) in HeLa cells transfected with pCS2+ empty vector, pCS2+ Flag Nrh-L or pCS2+ Flag Nrh-R. Prior to the experiment cells were transfected with R-Cepia1er.

(C) Quantification of the slope coefficient of SOCE activation induced by Ca^{2+} injection (2 mM) after 4 min of $\text{Ca}^{2+}_{\text{ER}}$ emptying by Thapsigargin ($10 \mu\text{M}$) in HeLa cells transfected with pCS2+ empty vector, pCS2+ Flag Nrh-L or pCS2+ Flag Nrh-R. Prior to the experiment, cells were incubated with Fluoforte™ ($5 \mu\text{M}$) to detect $\text{Ca}^{2+}_{\text{Cyt}}$.

(D) Ca^{2+} level ER measurement using R-GECO (left) and R-Cepia sensors (right).

Histograms show means \pm SEM (n=3). Student's T-test : $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***.

A

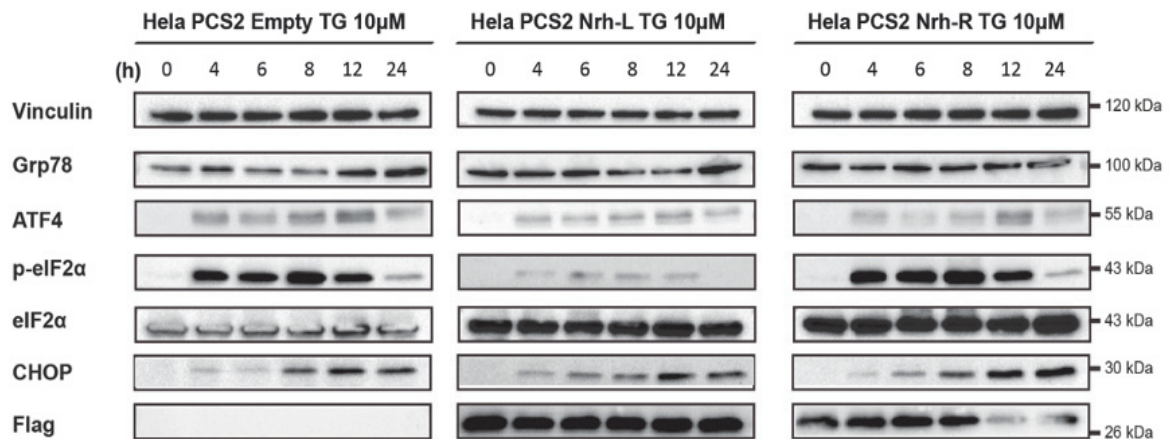
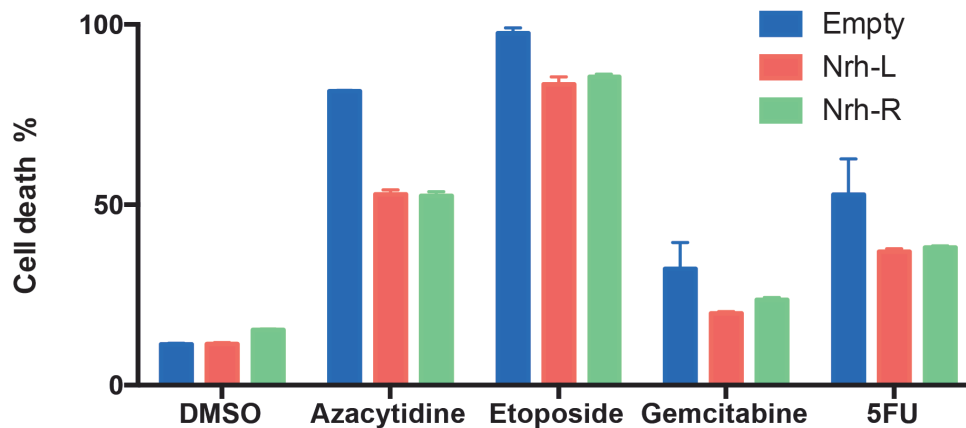


Figure 5 Effect of Nrh-L and Nrh-R isoforms on UPR markers

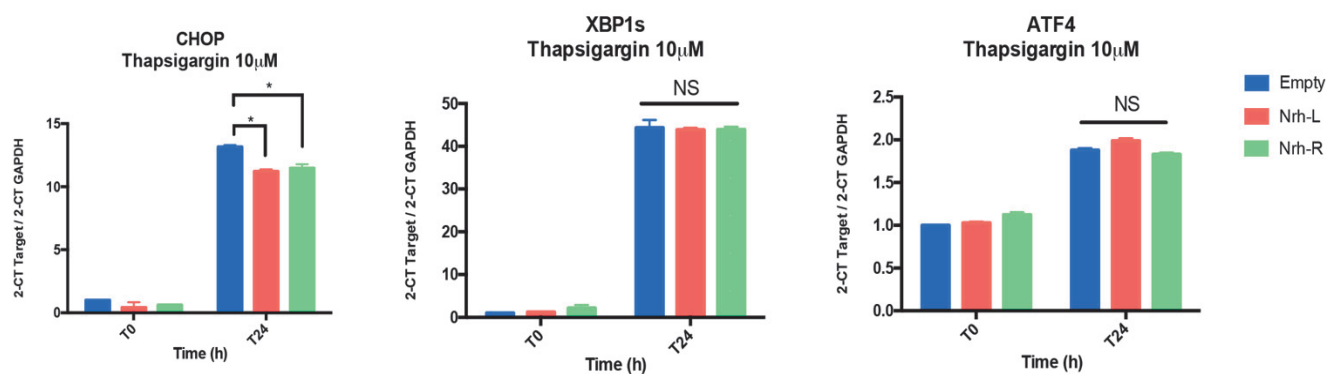
(A) Kinetics of UPR markers in the presence of $10 \mu\text{M}$ Thapsigargin over 24 hours in HeLa cells transfected with pCS2+ empty vector, pCS2+ Flag Nrh-L or pCS2+ Flag Nrh-R. Vinculin was used as a loading control.

SUPPLEMENTARY MATERIAL



Supplementary figure S1 Effect of Nrh-L and Nrh-R with respect to drugs insults

Cell death quantification (SytoxGreenTM positive cells), compared to control ("Cell death %", vertical axis), in HeLa cells stably transfected with pCS2⁺ empty vector, pCS2⁺ Flag Nrh-L or pCS2⁺ Flag Nrh-R. Cells were treated with either 50 μ M of Azacytidine for 40 hours, 25 μ M of Etoposide or 5 μ M of Gemcitabine or 150 μ M of 5-Fluorouracil for 72 hours



Supplementary figure S2 Effect of Nrh-L and Nrh-R on UPR markers at transcriptional level

RT-PCR assay was used to analyze the mRNA levels of the UPR markers *XBP-1s*, *CHOP* and *ATF4* in HeLa cells transfected with pCS2⁺ empty vector, pCS2⁺ Flag Nrh-L or pCS2⁺ Flag Nrh-R in presence of 10 μ M Thapsigargin over 24 hours.

Supplementary table 1

A

Lung Cell Lines	Compound	Statistical analysis, p-value Nrh-L vs Nrh-R		
		Median IC50 μ M		Wilcoxon
		L/L	R/R	Sum Rank Test
IC50 L>R	JQ12	6,43	1,32	0,0030
	Zibotentan	282,08	208,63	0,0068
	AKT VIII inhibitor	13,40	6,42	0,0077
	JNK-9L	0,98	0,57	0,0130
	EHT-1864	55,62	28,29	0,0132
	BAY-61-3606	12,87	7,66	0,0192
	Epothilone B	0,013	0,0026	0,0195
	SNX-2112	1,15	0,37	0,0203
	JAK1_3715	100,43	52,80	0,0217
	Linifanib	12,70	9,39	0,0221
	Tipifarnib	8,89	2,79	0,0255
	Ruxolitinib	69,26	45,21	0,0255
	CP724714	110,62	63,18	0,0262
	Wnt-C59	18,60	14,66	0,0305
	Bicalutamide	15,54	13,17	0,0326
	Luminespib	0,08	0,03	0,0331
	T0901317	137,96	87,38	0,0335
	Thapsigargin	0,021	0,0081	0,0360
	A-770041	44,97	26,53	0,0369
	LGK974	20,08	15,66	0,0369
	CCT-018159	33,22	15,11	0,0376
	JQ1	12,50	8,32	0,0401
	KIN001-266	35,21	19,27	0,0429
	Lenalidomide	70,28	42,83	0,0431
	Gemcitabine	0,13	0,014	0,0448
	Selisistat	286,43	236,75	0,0448
DMOG	821,32	250,05	0,0456	
Veliparib	64,00	43,11	0,0457	
AZD8931	8,51	3,76	0,0486	
IC50 R>L	LDN-193189	3,39	4,14	0,0157
	Panobinostat	0,060	0,10	0,0251

B

Blood Cell Lines	Compound	Statistical analysis, p-value Nrh-L vs Nrh-R		
		Median IC50 μ M		Wilcoxon
		L/L	R/R	Sum Rank Test
IC50 L>R	Enzastaurin	11,71	4,94	0,0053
	IPA-3	24,05	8,87	0,0135
	THZ-2-49	1,71	0,54	0,0178
	AZD7969	6,63	2,66	0,0190
	PHA-793887	1,42	0,42	0,0207
	XMD8-85	11,25	5,52	0,0237
	JW-7-24-1	0,42	0,17	0,0298
	AZD5582	1,12	0,50	0,0371
	T0901317	27,33	12,91	0,0396
	Kobe2602	75,23	48,85	0,0408
	CAP-232, TT-23	97,41	23,35	0,0432
	SGC0946	4,18	3,14	0,0434
	Idelalisib	39,30	16,26	0,0443
	PFI-1	8,01	3,76	0,0480
IC50 R>L	OSI-027	3,16	4,99	0,0249
	Sorafenib	5,47	8,11	0,0385

C

Ovary Cell Lines	Compound	Statistical analysis, p-value Nrh-L vs Nrh-R			
		Median IC50 μ M		Wilcoxon	
		L/L	R/R	Sum Rank Test	
IC50 L>R	TWS119	16,30	3,89	0,00023	
	SB505124	86,32	4,97	0,00047	
	WHI-P97	51,68	13,71	0,00168	
	C-75	209,84	48,31	0,00280	
	IMD-0354	3,96	0,99	0,00980	
	CI-1033	36,53	5,54	0,01401	
	GSK1059615	3,48	1,29	0,01401	
	Afatinib (0,5)	3,24	0,45	0,01401	
	FR-180204	153,25	52,41	0,01513	
	Afatinib (10)	25,92	3,36	0,01937	
	THZ-2-102-1	0,29	0,09	0,02269	
	NSC319726	0,23	0,0028	0,02500	
	Alisertib	18,53	3,29	0,03501	
	Trichostatin A	0,63	0,23	0,04599	
	CD532	3,21	1,89	0,04599	
	IC50 R>L	PARP_9495	2,12	10,89	0,04599

Results of compound's IC50 from GDSC set1 combined with polymorphism rs3794541 for each cell lines from CCLE. Table shows top compounds which displayed either higher or lower resistance (IC50 mean Nrh-L > Nrh-R or Nrh-R > Nrh-L) for Nrh-L compared with Nrh-R for lung (A), blood (B) and ovarian (C) cancer cell lines.

Supplementary table 2

A

Large intestine Cell Lines	Compound	Statistical analysis, p-value Nrh-L vs Nrh-R		
		Median IC50 μ M		Wilcoxon
		L/L	R/R	Sum Rank Test
	PF-00299804	10,50	36,67	0,0019
	kb NB 142-70	17,75	78,43	0,0024
	AST-1306	8,51	26,77	0,0024
	Tenovin-6	15,36	48,43	0,0031
	SBS05124	23,81	122,95	0,0038
	CI-1033	16,54	73,76	0,0059
	FMK	223,95	326,19	0,0078
	Refametinib	0,39	3,63	0,0108
	Torin 2	0,66	6,10	0,0121
	JQ1	9,57	16,39	0,0128
	TL-1-85	22,79	78,85	0,0130
	Pilaralisib	35,49	85,04	0,0130
	NVP-BHG712	7,31	33,80	0,0155
	TWS119	22,95	74,58	0,0155
	IMD-0354	2,81	8,45	0,0185
	UNC0638	36,79	168,40	0,0204
	PD0325901	0,062	0,24	0,0211
	FTY-720	10,13	19,01	0,0220
	Apitolisib	1,59	10,73	0,0220
	UNC0642	6,33	10,97	0,0252
	XMD8-92	18,64	44,16	0,0315
	PIK-93	14,49	43,07	0,0358
	VX-11e	1,70	5,63	0,0358
	UNC1215	15,12	16,60	0,0362
	CAP-232, TT-23	57,20	222,26	0,0417
	I-BET-762	20,49	75,85	0,0417
	FTI-277	11,26	23,72	0,0435
	CHIR-99021	12,18	45,37	0,0435
	AZD3514	28,90	102,35	0,0473
	RU-SKI 43	81,32	164,80	0,0484
	BIBF-1120	22,03	57,48	0,0484
	GSK1059615	2,63	11,30	0,0484

B

Breast Cell Lines	Compound	Statistical analysis, p-value Nrh-L vs Nrh-R		
		Median IC50 μ M		Wilcoxon
		L/L	R/R	Sum Rank Test
	JNK-9L	0,71	2,35	0,0037
	KU-55933	54,88	171,44	0,0043
	Bryostatins	0,056	0,12	0,0098
	Doxorubicin	0,17	0,83	0,0136
	PARP_9482	1,29	21,86	0,0136
	Rucaparib	35,28	91,36	0,0143
	CCT-018159	16,74	104,75	0,0143
	PARP_0108	1,67	13,04	0,0161
	AS601245	8,08	17,34	0,0203
	PARP_9495	6,13	15,58	0,0203
	GSK1904529A	5,95	15,10	0,0203
	AZD1208	39,30	57,54	0,0225
	Ara-G	111,24	185,77	0,0240
	ETP-45835	199,22	316,22	0,0240
	Gemcitabine	0,031	0,18	0,0263
	Cisplatin	7,82	31,44	0,0263
	AZD6738	7,71	28,24	0,0263
	Talazoparib	21,13	133,41	0,0279
	CHIR-99021	23,77	47,17	0,0279
	TTK_3146	18,29	63,53	0,0307
	YK-4-279	4,96	16,47	0,0331
	MCT1_6447	79,34	145,81	0,0331
	AZD7762	1,59	6,00	0,0331
	AZD7969	14,07	55,21	0,0385
	JAK1_3715	90,38	177,86	0,0475
	AZD7762	1,26	11,31	0,0475
IC50 L>R	AICA Ribonucleotide	2284,44	714,22	0,0331

C

Stomach Cell Lines	Compound	Statistical analysis, p-value Nrh-L vs Nrh-R		
		Median IC50 μ M		Wilcoxon
		L/L	R/R	Sum Rank Test
	IAP_5620	42,87	129,74	0,0023
	Talazoparib	5,18	52,32	0,0070
	Olaparib	18,30	99,72	0,0175
	Avagacestat	24,39	54,14	0,0281
	Pictilisib	0,51	2,01	0,0293
	XAV939	24,90	48,99	0,0379
	AZD8055	0,53	0,90	0,0426
	AZ20	1,32	4,05	0,0499
	CD532	1,19	0,46	0,0127
IC50 L>R	AICA Ribonucleotide	5624,51	2002,67	0,0379
	Tenovin-6	9,54	4,76	0,0426
	Brivanib, BMS	238,80	24,64	0,0426

D

Oesophagus Cell Lines	Compound	Statistical analysis, p-value Nrh-L vs Nrh-R		
		Median IC50 μ M		Wilcoxon
		L/L	R/R	Sum Rank Test
	OSU-03012	2,04	11,08	0,0008
	Obatoclax Mesylate	0,10	0,98	0,0017
	QL-XI-92	77,70	146,02	0,0034
	A-83-01	23,26	85,04	0,0059
	QS11	11,79	102,15	0,0101
	Embelin	10,78	34,47	0,0101
	IPA-3	25,23	238,03	0,0101
	Etoposide	1,91	17,68	0,0151
	Tipifarnib	1,13	15,76	0,0227
	LGK974	6,57	19,35	0,0227
	Doxorubicin	0,04	0,21	0,0227
	Wnt-C59	3,94	15,40	0,0319
	Gemcitabine	0,02	1,07	0,0319
	Luminespib	0,013	0,089	0,0418
	IOX2	0,94	1,66	0,0418
	BAY-61-3606	4,14	46,42	0,0445
	HG6-64-1	0,89	8,88	0,0445
	CX-5461	42,15	189,10	0,0445
IC50 L>R	LCL161	97,98	30,55	0,0034

Results of compound's IC50 from GDSC set1 combined with polymorphism rs3794541 for each cell lines from CCLE. Table shows top compounds which displayed either higher or lower resistance (IC50 mean Nrh-L > Nrh-R or Nrh-R > Nrh-L) for Nrh-L compared with Nrh-R for large intestine (A), Breast (B), stomach (C) and oesophagus (D) cancer cell lines.

Reference

- Bai, Y., Wang, J., Han, J., Xie, X.L., Ji, C.G., Yin, J., Chen, L., Wang, C.K., Jiang, X.Y., Qi, W., *et al.* (2017). BCL2L10 inhibits growth and metastasis of hepatocellular carcinoma both in vitro and in vivo. *Molecular carcinogenesis* 56, 1137-1149.
- Bonneau, B., Prudent, J., Popgeorgiev, N., and Gillet, G. (2013). Non-apoptotic roles of Bcl-2 family: the calcium connection. *Biochimica et biophysica acta* 1833, 1755-1765.
- Fabiani, E., Fianchi, L., Falconi, G., Boncompagni, R., Criscuolo, M., Guidi, F., La Brocca, A., Hohaus, S., Leone, G., and Voso, M.T. (2014). The BCL2L10 Leu21Arg variant and risk of therapy-related myeloid neoplasms and de novo myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 55, 1538-1543.
- Gross, A., and Katz, S.G. (2017). Non-apoptotic functions of BCL-2 family proteins. *Cell death and differentiation* 24, 1348-1358.
- Hamouda, M.-A., Jacquet, A., Robert, G., Puissant, A., Richez, V., Cassel, R., Fenouille, N., Roulland, S., Gilleron, J., Griessinger, E., *et al.* (2016). BCL-B (BCL2L10) is overexpressed in patients suffering from multiple myeloma (MM) and drives an MM-like disease in transgenic mice. *The Journal of Experimental Medicine* 213, 1705-1722.
- Lee, I.H., Kang, K., Kang, B.W., Lee, S.J., Bae, W.K., Hwang, J.E., Kim, H.J., Park, S.Y., Park, J.S., Choi, G.S., *et al.* (2018). Genetic variations using whole-exome sequencing might predict response for neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 35, 145.
- Liu, Z., Wild, C., Ding, Y., Ye, N., Chen, H., Wold, E.A., and Zhou, J. (2016). BH4 domain of Bcl-2 as a novel target for cancer therapy. *Drug discovery today* 21, 989-996.
- Nougarede, A., Popgeorgiev, N., Kassem, L., Omarjee, S., Borel, S., Mikaelian, I., Lopez, J., Gadet, R., Marcillat, O., Treilleux, I., *et al.* (2018). Breast Cancer Targeting through Inhibition of the Endoplasmic Reticulum-Based Apoptosis Regulator Nrh/BCL2L10. *Cancer research* 78, 1404-1417.
- Popgeorgiev, N., Jabbour, L., and Gillet, G. (2018). Subcellular Localization and Dynamics of the Bcl-2 Family of Proteins. *Frontiers in cell and developmental biology* 6, 13.
- Rozpedek, W., Pytel, D., Mucha, B., Leszczynska, H., Diehl, J.A., and Majsterek, I. (2016). The Role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Current molecular medicine* 16, 533-544.
- Szegezdi, E., MacDonald, D.C., Ní Chonghaile, T., Gupta, S., and Samali, A. (2009). Bcl-2 family on guard at the ER. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 296, C941-C953.
- Xu, J.D., Cao, X.X., Long, Z.W., Liu, X.P., Furuya, T., Xu, J.W., Liu, X.L., De Xu, Z., Sasaki, K., and Li, Q.Q. (2011). BCL2L10 protein regulates apoptosis/proliferation through differential pathways in gastric cancer cells. *The Journal of pathology* 223, 400-409.

Résultats 2 : Conception d'inhibiteurs spécifiques de Nrh, modèle de criblage BH4 mimétique

La résistance des cancers à la chimiothérapie, enjeu majeur de santé publique, est souvent expliquée par la présence de facteurs bloquant la mort cellulaire programmée tels que les membres de la famille Bcl-2. Les protéines Bcl-2 contribuent à cette résistance via leur capacité à bloquer la mort cellulaire au niveau de la mitochondrie. Sur le plan moléculaire, ces protéines empêchent l'activation de la machinerie de l'apoptose par la mitochondrie (Youle and Strasser, 2008). Le ciblage de ces protéines au niveau mitochondrial est l'approche privilégiée pour le développement de nouvelles molécules anti-tumorales. Malheureusement, la plupart des molécules actuellement disponibles ont des effets secondaires importants.

Le projet de recherche est centré sur le développement d'une nouvelle classe d'inhibiteur de Bcl-2, les BH4 mimétiques dont un seul est connu actuellement, le BDA-366 (cf. Tableau 3). Une autre partie de mon travail a donc été consacrée à la recherche d'un inhibiteur spécifique de Nrh à visée thérapeutique.

Introduction, conception et théorie du BH4 mimétique

La surexpression de Nrh est corrélée à un mauvais pronostic et à la chimiorésistance dans plusieurs types de cancers. Notre équipe a montré que l'inhibition de l'interaction Nrh/IP3R1 (à l'aide d'un peptide issu du domaine BH4 de Nrh, TAT-BH4-Nrh) sensibilise les cellules tumorales à la mort induite par diverses drogues utilisées en chimiothérapie, dans des modèles cellulaires et dans des modèles de xénogreffes (Nougarede et al., 2018). Dans le cadre de la thérapie anti-cancéreuse, il nous a semblé très intéressant de développer un inhibiteur de Nrh. Il a été montré que le peptide TAT-BH4-Nrh inhibe l'interaction de Nrh-L avec le BD de l'IP3R, mais aussi l'interaction de Nrh-L avec lui-même. L'utilisation du peptide TAT-BH4-Nrh, d'un point de vue pharmaceutique s'avère difficile en prenant compte des paramètres biologiques : absorption, distribution, métabolisme, élimination et toxicité (ADMET). Une petite molécule chimique répliquant l'effet du peptide sur l'inhibition de Nrh serait alors plus adaptée pour moduler ces paramètres ADMET. Un programme de recherche de petites molécules inhibitrices BH4-mimétiques de Nrh a été mis en place. La première étape vise à établir des tests de criblage afin de trouver des molécules inhibitrices de Nrh-L. Les tests de criblage sont basés sur l'inhibition de l'interaction Nrh/ IP3R-BD, mais aussi sur l'inhibition de la formation du dimère Nrh.

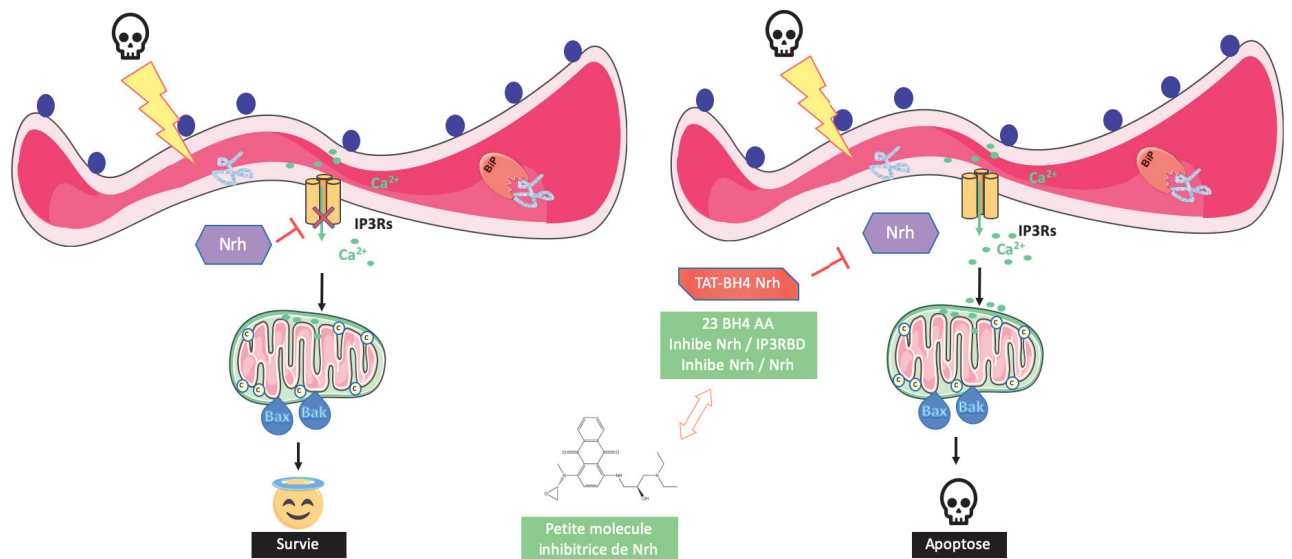


Figure 24 Concepts d'un BH4 mimétique : peptide TAT-BH4 Nrh et petite molécule inhibitrice

Dans un premier temps nous avons tenté de reproduire les interactions Nrh/IP3R-BD et Nrh/Nrh avec pour objectif de créer un système de mesure quantifiable et robuste des interactions. Nous avons utilisé deux technologies différentes : le transfert de fluorescence dit FRET (Förster resonance energy transfer) et le système de complémentation d'adénylate cyclase bactérien dit BACTH (Bacterial adenylate cyclase two hybrid). Les deux systèmes sont résumés ci-dessous (Figure 25).

Le système de FRET repose sur le transfert d'énergie lorsque les deux domaines fluorescents sont assez proches l'un de l'autre. De manière simple, lorsqu'il y a interaction et que le FRET peut avoir lieu, on observe alors une augmentation du signal fluorescent du receveur. S'il n'y a pas d'interaction ou que le FRET ne peut avoir lieu, le signal fluorescent receveur ne varie pas. Ce transfert de fluorescence est quantifiable et les résultats des expériences de FRET sont résumés en Figure 26 et Figure 27. Les constructions des protéines de fusion sont résumées dans le Tableau 4.

Le système BACTH repose sur la reconstitution de l'enzyme Adénylate Cyclase bactérien séparé en deux domaines distincts : T25 et T18. La complémentation de T25 avec T18 permet la reconstitution de l'activité enzymatique, induisant une production de l'AMP cyclique (AMPC) et une augmentation de l'activité β -galactosidase subséquente. De la même manière que pour le FRET, lorsqu'il y a interaction et que la complémentation T25-T18 peut avoir lieu, on observe alors une augmentation de l'activité de la β -galactosidase (coloration bleue). S'il n'y a pas d'interaction ou que la complémentation ne peut avoir lieu il n'y a pas d'activité β -galactosidase mesurable. Le résultat des expériences BACTH est montré en Figure 29.C. Les constructions des protéines de fusion sont résumées dans le Tableau 4.

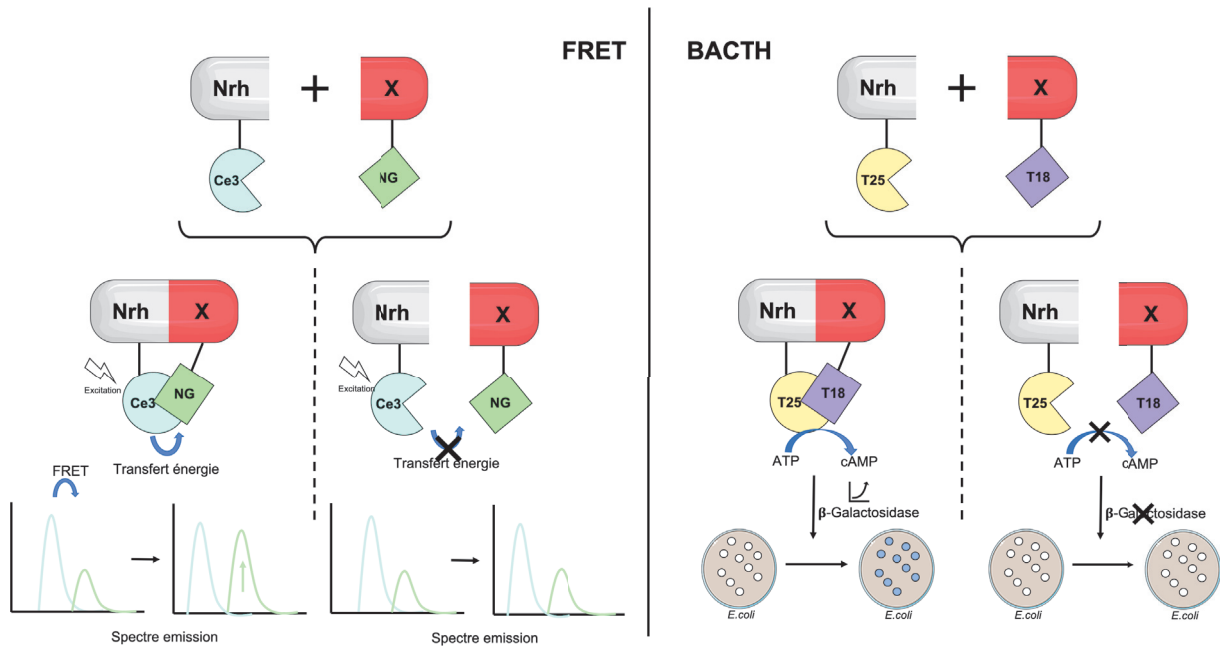


Figure 25 FRET et BACTH : X représente un partenaire de Nrh (IP3R-BD par exemple).

Résultats des modèles de criblage

- Modèle FRET Nrh/ IP3R-BD

Initialement le modèle Nrh/IP3R-BD a été pensé pour un test de criblage FRET purement *in vitro*, mais le modèle s'est heurté à un certain nombre de difficultés techniques dont la synthèse de la protéine IP3R-BD. Nous nous sommes donc tournés vers un modèle de FRET *in cellulo*. Nous avons utilisé des vecteurs d'expression de protéines de fusion fluorescentes pour exprimer un premier couple donneur/accepteur avec Nrh-Neogreen (Nrh-NG) et IP3R-BD-mScarlet (BD-mSc). Puis un second couple de donneur/accepteur Nrh-Cerulean3 (Nrh-Ce3) et IP3R-BD-Neogreen (BD-NG).

Les interactions donneur/accepteur entre les partenaires des deux couples sont démontrées dans la Figure 26.A et Figure 26.B par co-immunoprécipitation (CO-IP). Cependant, comme le montre la Figure 26.C, et Figure 26.D, en présence des deux partenaires l'efficacité de FRET ou le signal de FRET ne varie pas entre nos différentes conditions de transfection. Malgré l'interaction détectée par CO-IP nous n'avons pas de transfert de fluorescence. Le transfert de fluorescence est conditionné par de multiples facteurs critiques dont la distance entre les deux domaines fluorescents ou le nombre d'interactions dans la cellule à un instant t. Avec ce modèle de FRET Nrh/IP3R-BD, nous n'avons pas de système de mesure quantifiable nécessaire à un crible.

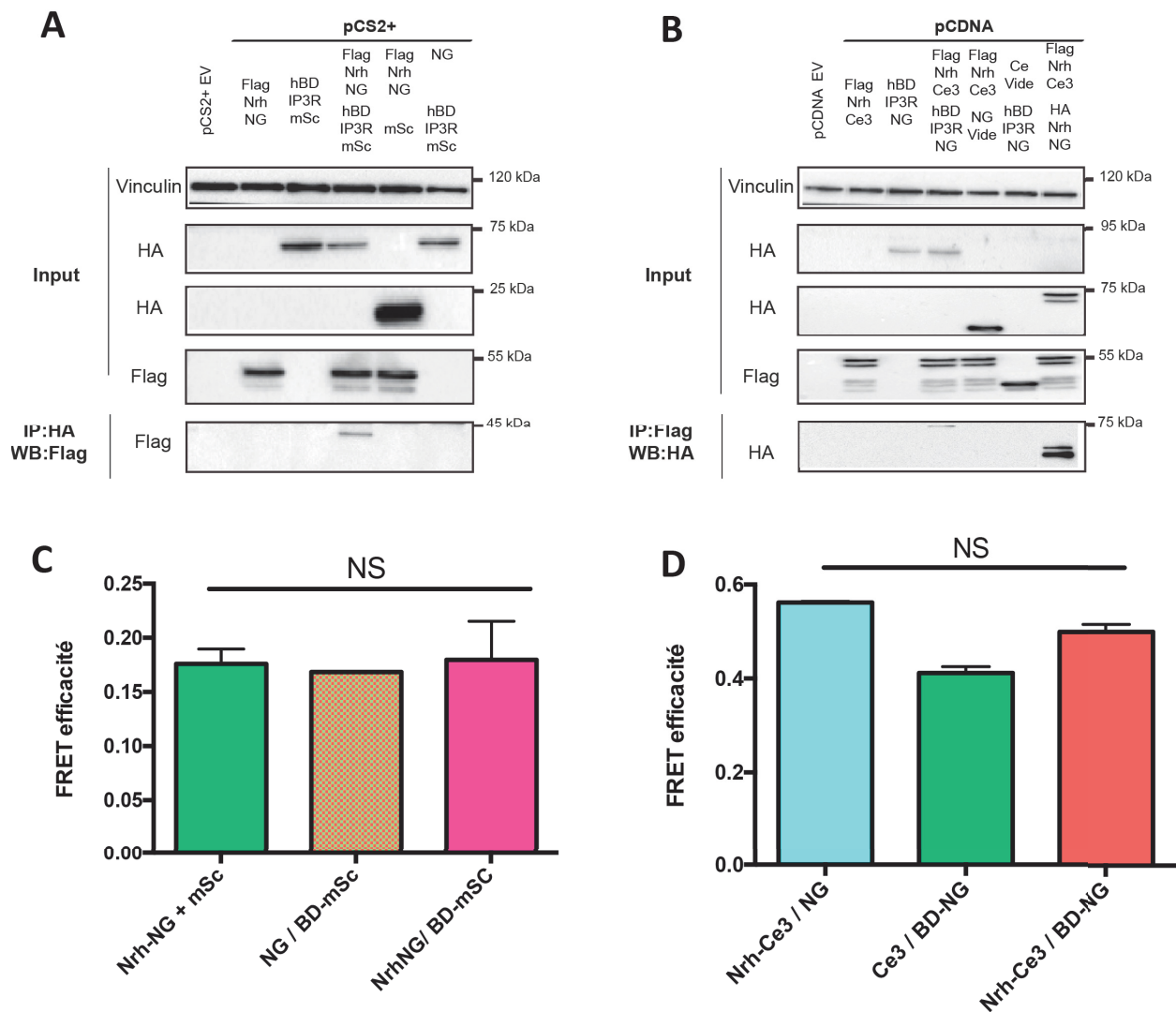


Figure 26 Expériences et quantifications de FRET sur le modèle Nrh / BD-IP3R

(A) Expérience de co-immunoprécipitation avec les anticorps HA des protéines de fusion fluorescentes par transfection dans les cellules HeLa avec les vecteurs correspondants : vecteur vide (pCS2+ EV), Flag-Nrh-NG, HA-BD-IP3R-mSc, Neongreen (NG), mScarlet (mSc). (B) Expérience de co-immunoprécipitation avec les anticorps FlagM2 des protéines de fusion fluorescentes par transfection dans les cellules HeLa avec les vecteurs correspondants : vecteur vide (pCDNA EV), HA-BD-IP3R-NG, Flag-Nrh-Ce3, HA-Nrh-NG, Cerulean3 (Ce-3), Neongreen (NG). (C) Évaluation du transfert de FRET dans les cellules HeLa après 24 heures de co-transfection avec les vecteurs correspondants : Flag-Nrh-NG (Nrh-NG), mScarlet (mSc), Neongreen (NG), HA-BD-mSc (BD-mSc). La quantification du niveau de fluorescence des protéines de fusion en plaque 96 puits opaque est réalisée à l'aide d'un lecteur de plaque (Clariostar). (D) Évaluation du transfert de FRET dans les cellules HeLa après 24 heures de co-transfection avec les vecteurs correspondants : Flag-Nrh-Ce3 (Nrh-Ce3), Neongreen (NG), Cerulin (Ce3); HA-BD-IP3R-NG (BD-NG), HA-Nrh-Ce3. BD-IP3R-NG (BD-NG) La quantification du niveau de fluorescence des protéines de fusion en plaque 96 puits opaque est réalisée à l'aide d'un lecteur de plaque (Clariostar).

- **Modèle FRET Nrh/Nrh (dimère)**

Afin de compléter le modèle précédent, nous avons conçu un troisième couple donneur/accepteur de fluorescence basé sur le dimère Nrh-L. Toujours *in cellulo* nous avons utilisé des vecteurs d'expression codant une protéine de fusion pour exprimer Nrh-L avec Cerulean3 ou Neongreen (noté Nrh-Ce3 ou Nrh-NG). De plus, pour nos expériences nous avons ajouté le polymorphisme Nrh-R comme contrôle négatif interne. L'utilisation de Nrh-R est justifiée par l'incapacité de Nrh-R à se dimériser et à interagir avec Nrh-L comme le montre la CO-IP en Figure 27.A. La mesure de FRET avec le couple Nrh / Nrh ne montre pas plus de résultats qu'avec Nrh / IP3R-BD. L'efficacité de FRET pour la condition Nrh-L-Ce3 / Nrh-L-NG n'a pas varié de manière significativement différente (Figure 27.B). Cependant, au regard de la CO-IP de validation des interactions (Figure 27.C), nous avons observé que les protéines de fusion Nrh-R-Ce3 et Nrh-R-NG pouvaient interagir ensemble.

La protéine de fusion Nrh couplée à un domaine fluorescent pourrait modifier ses interactions via BH4, et même s'il y a une interaction protéine-protéine, nous ne pouvons détecter de FRET avec les couples Nrh / Nrh et Nrh / IP3R-BD. Ce résultat nous a conduit à abandonner cette approche de FRET.

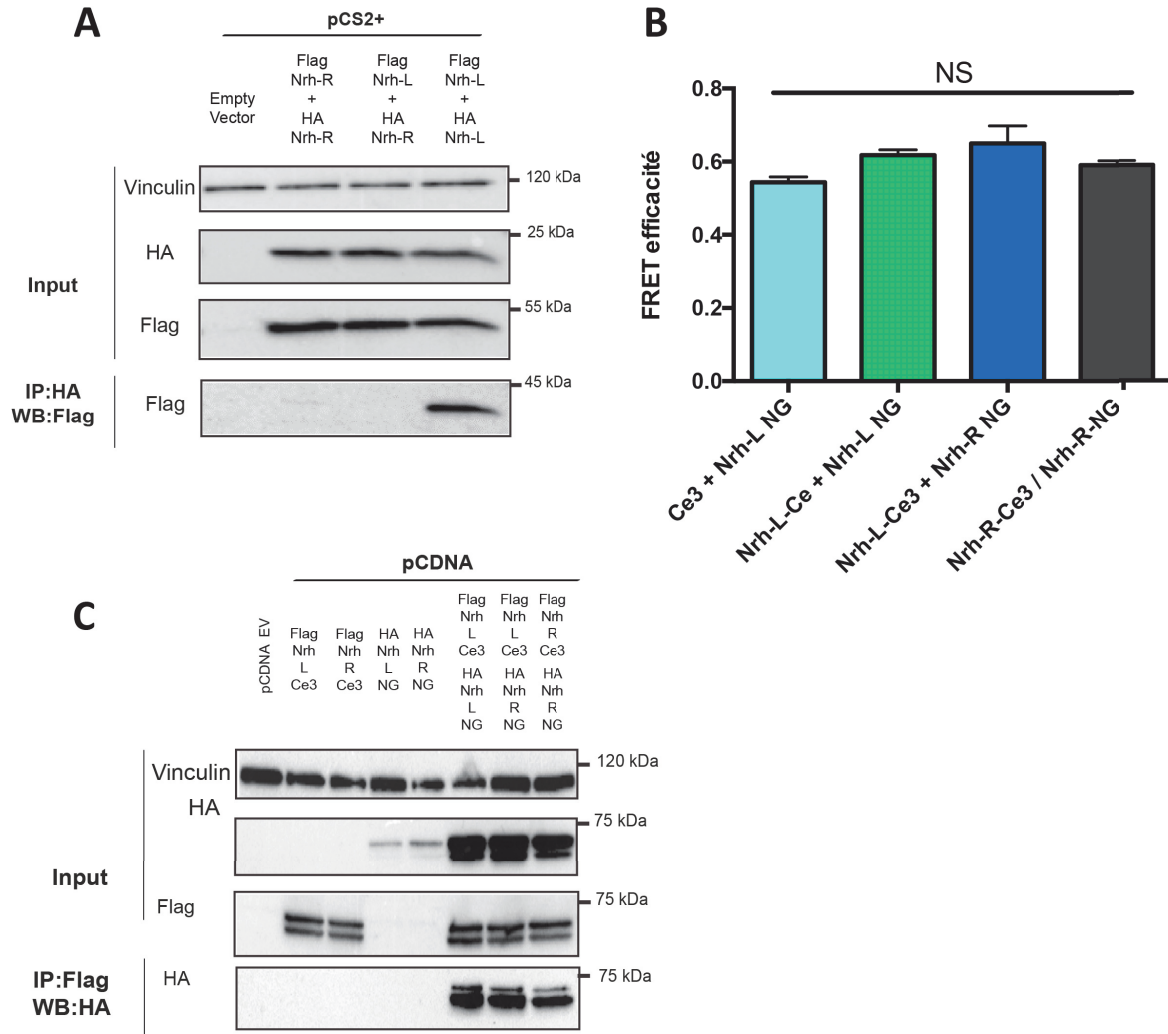


Figure 27 Expériences et quantifications de FRET sur le modèle du dimère Nrh / Nrh

(A) Expérience de co-immunoprécipitation avec les anticorps FlagM2 des protéines par transfection dans les cellules HeLa avec les vecteurs correspondants : vecteur vide (empty vector), Flag-Nrh-R, HA-Nrh-R, Flag-Nrh-L, HA-Nrh-L. (B) Évaluation du transfert de FRET dans les cellules HeLa après 24 heures de co-transfection avec les vecteurs correspondants : Cerulean3 (Ce-3), Flag-Nrh-L-Ce3 (Nrh-L-Ce), HA-Nrh-L-NG (Nrh-L-NG), HA-Nrh-R-NG (Nrh-R-NG), Flag-Nrh-R-Ce3 (Nrh-R-Ce3). La quantification du niveau de fluorescence des protéines de fusion en plaque 96 est réalisée à l'aide d'un lecteur de plaque (Clariostar). (C) Expérience de co-immunoprécipitation avec les anticorps FlagM2 des protéines de fusion fluorescentes par transfection dans les cellules HeLa avec les vecteurs correspondants : vecteur vide (pCDNA-EV), Flag-Nrh-L-Ce3, Flag-Nrh-R-Ce3, HA-Nrh-L-NG, HA-Nrh-R-NG.

- **Modèles *in vitro* avec l'utilisation du peptide TAT-BH4-Nrh**

Nous avons alors étudié la possibilité d'un test de criblage avec l'utilisation du peptide TAT-BH4-Nrh. Pour cela, nous avons construit puis acheté commercialement un peptide TAT-BH4-Nrh couplé à une molécule de tétraméthyl-rhodamine (TMR, fluorescence rouge). Le peptide TMR-TAT-BH4-Nrh est construit avec les deux variants Nrh-L et Nrh-R (Figure 30). En parallèle nous avons produit deux protéines Nrh, une première couplée avec NG et un tag 6histidines (6his-Nrh-NG), la deuxième sans NG et avec un tag GST (Gluthathione-S-transferase) (GST-Nrh). Nous avons utilisé deux modèles pour évaluer la pertinence d'utilisation du peptide Nrh dans un modèle de criblage.

Dans un premier temps nous avons évalué l'efficacité de pull-down de 6his-Nrh-NG avec les peptides TMR-Nrh. En présence d'une quantité constante de protéines 6his-Nrh-NG, nous avons observé une différence d'affinité entre les deux variants de peptides (Figure 28.A). Néanmoins, nous ne sommes pas parvenus à atteindre une courbe de saturation de pulldown. Le deuxième inconvénient est la forte fixation non spécifique des peptides Nrh aux billes / colonnes chromatographiques (Figure 28.B). Plus de 70% de peptides restent dans la colonne indépendamment de l'interaction avec 6his-Nrh-NG. C'est un facteur non contrôlé et non négligeable, empêchant alors l'utilisation de cette méthode.

Dans un second temps, nous avons utilisé une approche de fluorescence polarisée. En présence d'une quantité constante en peptide TMR-TAT-Nrh-L- nous voulons obtenir une courbe de saturation de la polarisation du peptide, en ajoutant de manière croissante des quantités de protéines 6his-Nrh-L-NG ou de GST-Nrh-L. Encore une fois nous ne sommes pas parvenus à obtenir une courbe de saturation permettant de calculer les constantes d'affinité de Nrh pour le peptide (Figure 28.C). Nous avons plutôt une courbe montrant une addition d'interactions non spécifiques. En conclusion, il est très difficile d'utiliser ce modèle pour le test de criblage. De manière générale l'utilisation du peptide TMR-Nrh pour un système de crible s'avère très complexe à mettre au point. Cependant le peptide reste un élément de choix pour tester de l'efficacité d'un futur test de criblage.

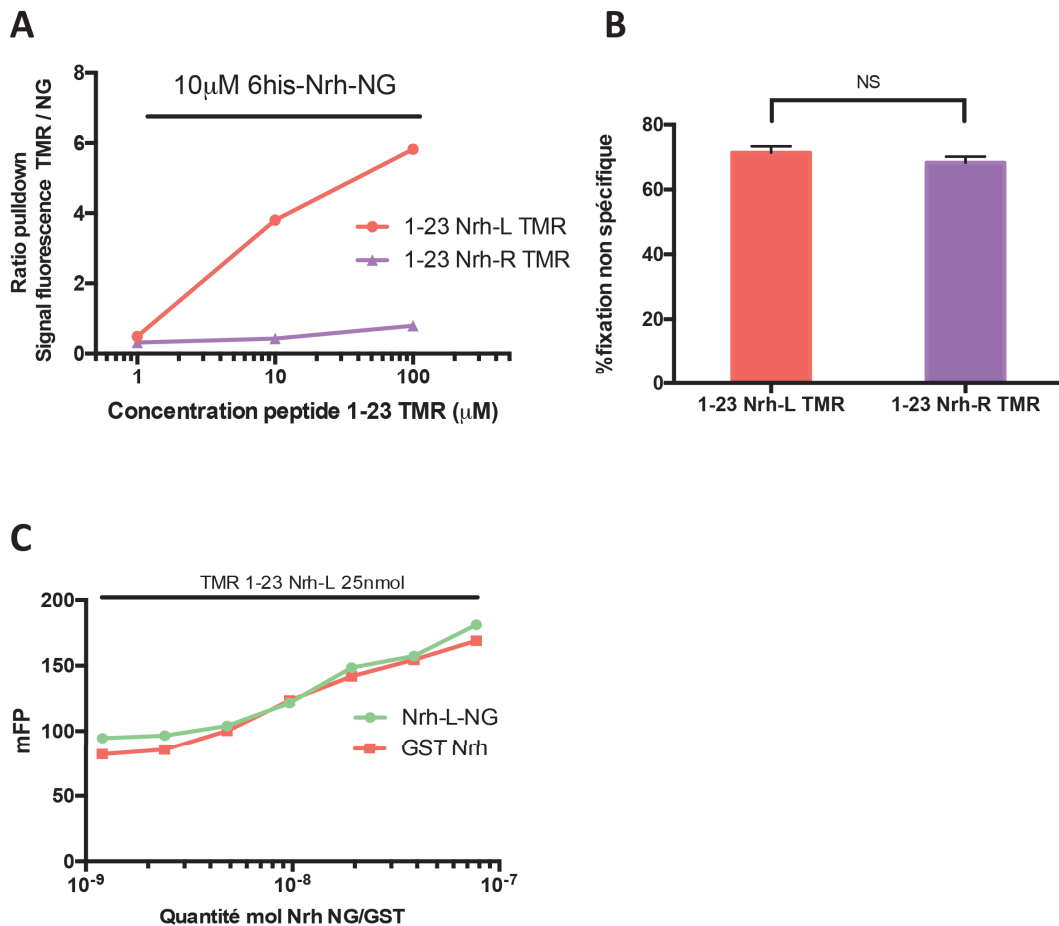


Figure 28 Expériences *in vitro* de *pull-down* et de fluorescence polarisée utilisant le peptide TAT-BH4-Nrh-L/R avec Nrh

(A) Expérience *in vitro* de *pull-down* avec des billes Ni-NTA. 10 μM de protéines 6His-Nrh-NG sont incubées au préalable dans un tampon NaCl à température ambiante puis sont ajoutées à des concentrations croissantes de peptides TMR-TAT-BH4-Nrh-L/R (1 à 100 μM). Les protéines sont ensuite éluées avec un tampon imidazole et le niveau de fluorescence est quantifiée à l'aide d'un lecteur de plaque (Clariostar) dans une plaque 96 puits opaque. Le ratio *pull-down* est ensuite déterminé par le rapport fluorescence rouge / fluorescence verte. (B) Même expérience de *pull-down* avec les billes Ni-NTA. Après élution totale par l'imidazole, les protéines sont éluées avec de la guanidine (5M). La fluorescence du TMR est mesurée l'aide d'un lecteur de plaque (Clariostar) dans une plaque 96 puits opaque. Le % de fixation non spécifique est calculé en faisant le rapport niveau de fluorescence élué / niveau de fluorescence initiale. (C) Expérience *in vitro* de fluorescence polarisée. 25 nmol de peptide TMR-TAT-BH4-Nrh-L sont incubées au préalable dans un tampon phosphate de sodium, puis une quantité croissante de protéine GST-Nrh ou 6His-Nrh-L-NG est ajoutée. Les mesures de fluorescence polarisée sont réalisées à l'aide d'un lecteur de plaque (Clariostar) dans une plaque 96 puits opaque.

- **Le modèle BACTH (Bacterial Adenylate Cyclase-based Two-Hybrid) avec Nrh**

Afin de compléter les approches FRET des modèles d'interactions Nrh/IP3R-BD et de Nrh/Nrh, nous avons utilisé le système du double hybrides BACTH. Dans ce modèle nous avons ajouté deux partenaires supplémentaires de Nrh, le domaine modulateur II de l'IP3R (MTDII) et Beclin-1. Le domaine modulateur de l'IP3R est connue pour être un autre domaine d'interaction BH4 dépendant de la protéine Bcl-2 et pourrait interagir également avec Nrh. Beclin-1 quant à lui est décrit pour interagir avec Nrh dans le contrôle de l'autophagie via la poche hydrophobe et le domaine BH1 de Nrh (Robert et al., 2012). Beclin-1 est utilisé ici d'abord en contrôle interne pour tester par exemple le bon repliement de Nrh. Pour aller plus loin, l'interaction Nrh/Beclin-1 pourrait également servir pour expérimenter un modèle d'interaction poche hydrophobe dépendant.

Comme attendu, la CO-IP en co-transfection dans des cellules HeLa nous montre l'interaction de Nrh avec le BD, le MTDII de l'IP3R, et avec Beclin-1 (Figure 29.A). Par la suite, par CO-IP nous montre que le traitement avec le peptide TAT-BH4-Nrh-L inhibe l'interaction de Nrh-L avec le BD et aussi du MTDII. Nous validons ici que le MTDII est un choix possible comme le BD de IP3R pour un criblage d'un BH4 mimétique de Nrh (Figure 29.B). Après avoir validé les interactions de Nrh avec les partenaires, nous avons construit des vecteurs d'expression exprimant Nrh-L, IP3R-BD, IP3R-MTDII, ou Beclin-1 en fusion avec le domaine T25 ou le domaine T18 de l'adénylate cyclase bactérien. Nous montrons une nouvelle fois qu'il est difficile créer un système de lecture quantifiable d'interaction BH4 dépendant entre Nrh /IP3R-BD, Nrh/IP3R-MTD et Nrh/Nrh. En effet, nous n'avons pas pu observer une augmentation de l'activité de la β -galactosidase dans ces conditions (Figure 29.C). Pour Beclin-1 / Nrh l'interaction par le système double hybride a montré des résultats intéressants (Figure 29.C). Nous avons observé une augmentation de l'activité de la β -galactosidase liée à l'interaction Nrh-T25 et Beclin-1-T18 de manière quantifiable et répétable. Ces résultats montrent que le système Batch pourrait être utilisé comme test de criblage basé sur Nrh / Beclin-1 pour cibler la poche hydrophobe de Nrh. Par contre, ce test ne pourra pas être utilisé pour l'interaction de Nrh avec IP3R. Nous poursuivons ces études *in cellulo* en collaboration avec une start-up (SYNSIGHT).

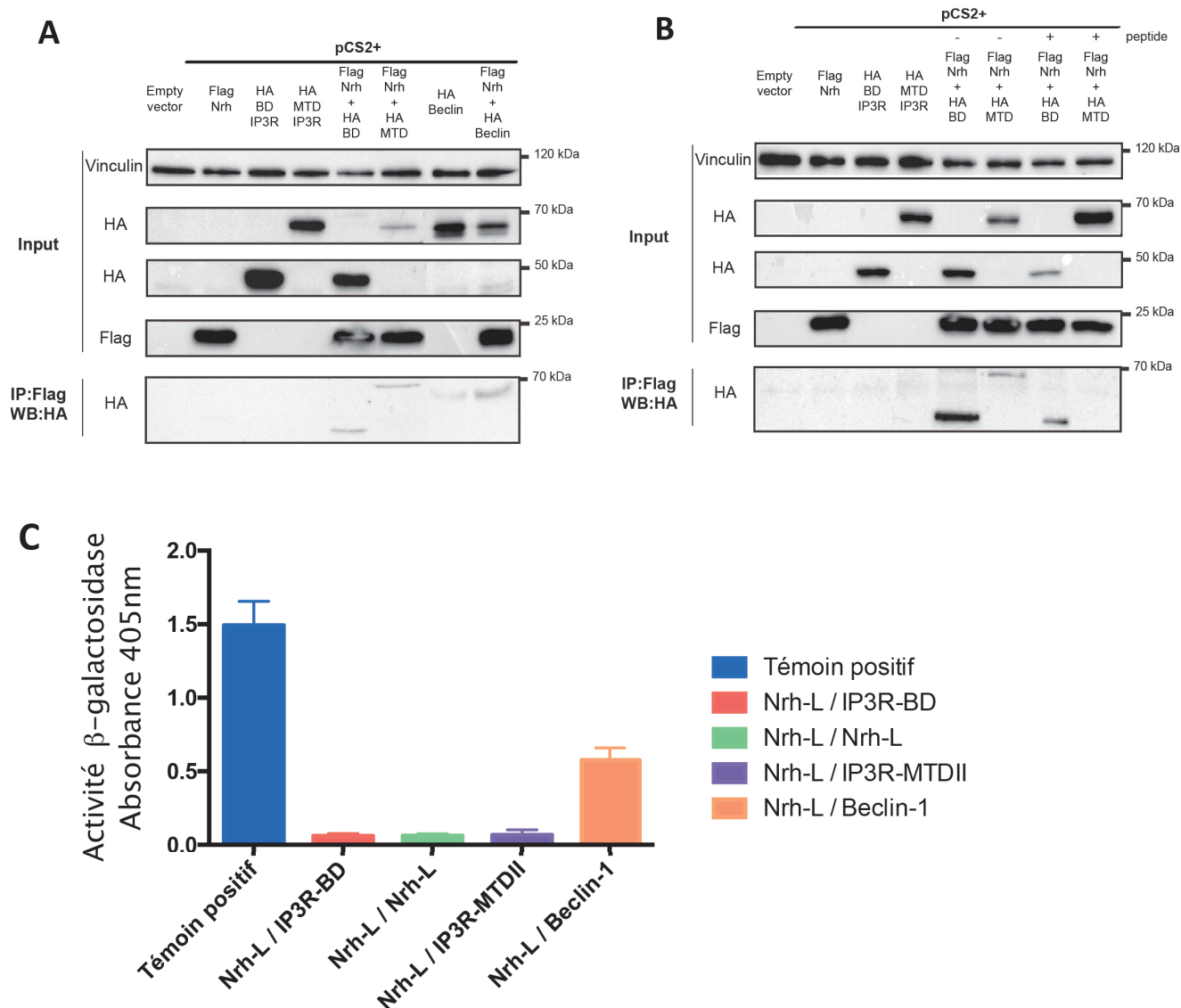


Figure 29 Les partenaires de Nrh, possibilités et perspectives du système double hybride BACTH (Bacterial Adenylate Cyclase-based Two-Hybrid)

(A) Expérience de co-immunoprécipitation avec les anticorps FlagM2 des protéines après transfection dans les cellules HeLa avec les vecteurs correspondants : vecteur vide (empty vector), Flag-Nrh-L (Flag-Nrh), HA-BD-IP3R, HA-MTDII-IP3R, HA-Beclin-1. (B) Expérience de co-immunoprécipitation avec les anticorps FlagM2 des protéines après transfection dans les cellules HeLa avec les vecteurs correspondants : vecteur vide (empty vector), Flag-Nrh-L, HA-BD-IP3R, HA-MTDII-IP3R. Les expériences de CO-IP ont été réalisées en présence ou non de 10µM de peptide TAT-BH4-Nrh 24 heures après la transfection et 24 heures avant la récolte. (C) Expérience BACTH : Mesure de l'activité de la β-galactosidase issue des colonies co-transformées avec les vecteurs correspondants : témoin positif T25-T18 (kit Euromedex), Nrh-L-T25, Nrh-L-T18, BD-IP3R-T18, MTDII-IP3R-T18, Beclin-1-T18.

Matériel et méthodes

Vecteur d'expression et protéines de fusion

Pour évaluer nos modèles FRET et BACTH nous avons construit des outils à la fois *in cellulo* et *in vitro*. L'ensemble des constructions des protéines de fusions est résumé dans le Tableau 4.

Tableau 4 Construction des protéines de fusion pour FRET et BACTH

Expérience	Protéine	Domaine de fusion	Tag	NCBI Reference Sequence
FRET	Nrh-L	Cerulean3 / Neongreen / mScarlet	Flag	NM_020396.3
	Nrh-R	Cerulean3 / Neongreen / mScarlet	Flag	NM_020396.3
	IP3R-BD	Neongreen / mScarlet	HA	NM_001099952.2
BACTH	Nrh	T25 / T18	/	NM_020396.3
	IP3R-BD	T18	/	NM_001099952.2
	IP3R-MTD	T18	/	NM_001099952.2
	Beclin-1	T18	/	NM_001313998.2

Expérience de FRET

Le lecteur de plaque CLARIOstar (BMG Labtech) a été utilisé pour réaliser les mesures par spectrophotométrie des protéines fluorescentes. L'efficacité de transfert est calculée à l'aide de la formule suivante : $Fa/(Fa + Fd)$ où Fa et Fd représentent respectivement la fluorescence de l'accepteur et du donneur. Nous utilisons deux couples de donneurs / accepteurs, Cerulean3 (Ce3) / Neongreen (NG) et Neongreen / mScarlet (mSc). Les longueurs d'onde respectives sont résumées dans le Tableau 5. Brièvement, nous avons transfecté les cellules HeLa avec les vecteurs d'expression codant Nrh, IP3R-BD, ou IP3R-MTDII avec Ce3 / mSc ou NG pendant 24 heures. Les cellules sont ensuite plâtées dans une plaque 96 puits opaque pour lecture. Les spectres d'émission et d'excitation sont au préalable mesurés et optimisés pour la lecture de FRET.

Tableau 5 Protéines fluorescentes

Protéine fluorescente	Spectre nm peak excitation (ex), émission (em)	Reference
Cerulean3	ex 435, em 475	(Markwardt et al., 2011)
Neongreen	ex 500, em 530	(Shaner et al., 2013)
mScarlet	ex 569, em 594	(Bindels et al., 2017)

Expérience de Fluorescence polarisée

Le degré de fluorescence polarisée est déterminée par le lecteur de plaque en utilisant la formule suivante : $F_p = \frac{F_{II} - F_{\perp}}{F_{II} + F_{\perp}}$ où F_{II} correspond à l'intensité de fluorescence émise parallèlement au rayon incident et F_{\perp} l'intensité de fluorescence est émise perpendiculairement au rayon incident. Brièvement, après avoir produit respectivement la protéine 6his-Nrh-Neongreen et GST-Nrh in vitro chez *Escherichia coli* (*E.Coli*), nous les avons incubé une heure à température ambiante dans une solution avec une concentration fixe de peptide TAT-BH4-Nrh-TMR (tétraméthyl-rhodamine, fluorescence rouge) et une concentration croissante de 6his-Nrh-Neongreen ou de GST-Nrh. Puis chacune des conditions estensemencée dans une plaque opaque 96 puits pour la lecture de fluorescence avec le lecteur de plaque CLARIOstar. En théorie, notre peptide Nrh est très peu polarisé du fait de sa petite taille, lors de son interaction avec une grosse molécule (Nrh) il va progressivement se polariser. La courbe de saturation résultante permettra de calculer les constantes biochimiques d'affinité des deux partenaires.

Les peptides TMR-TAT-BH4-Nrh- sont achetés commercialement chez Covalab® avec les séquences suivantes :



Figure 30 TMR-TAT-BH4-Nrh

Système double hybride bactérien (BATCH, Bacterial Adenylate Cyclase-based Two-Hybrid)

Le kit double hybrides d'Euromedex® a été utilisé pour réaliser nos tests d'interaction protéine-protéine selon le protocole du fournisseur. Ainsi différents vecteurs ont été générés comprenant les partenaires de nos modèles dont les protéines Nrh de fusion avec les protéines T18 ou T25 (Tableau 4). Une co-transformation des vecteurs dans des bactéries *Escherichia coli BTH101* est réalisée, puis la sélection est faite par antibiotiques (Ampicilline / Kanamycine) sur 48 heures à 30°C. Une coloration bleue des colonies résultantes montre l'activité restaurée de l'adénylate cyclase et donc l'interaction protéine-protéine des deux partenaires. Un test de l'activité de la bêta-galactosidase est ensuite réalisé pour quantifier l'interaction protéine-protéine résultante. Ce test est réalisé sur 6 colonies par condition de co-transformation. La coloration est induite par l'IPTG et dosée par spectrophotométrie à 405nm.

Discussion

Le polymorphisme de Nrh, un marqueur de bon pronostic en thérapie anti-cancéreuse

L'expression de Nrh est souvent corrélée à un mauvais pronostic en oncologie. Dans les leucémies aiguës myéloïdes, l'expression de Nrh induit une résistance à l'azacitidine et dans le cancer du sein son expression réduit la durée de survie sans rechute métastatique (Cluzeau et al., 2012; Nougarede et al., 2018). De manière intéressante, deux études soulignent l'existence d'un polymorphisme de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) de Nrh à la position 11 au niveau de son domaine BH4 (Leu11Arg) et le caractère bon pronostic du variant Arginine comparé au variant Leucine (Fabiani et al., 2014; Lee et al., 2018). Nos travaux proposent d'étudier les mécanismes sous-jacents du bon pronostic de Nrh-R (Arg) et l'effet phénotypique dans le cancer du sein. Nous proposons ensuite grâce à un travail bio-informatique une liste de molécules dont l'efficacité varie en fonction du statut polymorphique.

Nos travaux sur le polymorphisme de Nrh ont souligné une différence de la résistance à l'apoptose selon la forme L ou R au niveau cellulaire. Nos expériences ont permis de mettre en évidence une perte de régulation du calcium au RE de la forme Nrh-R comparée à la forme Nrh-L. Nrh-R perd la capacité à bloquer la sortie active du calcium réticulaire suite à la perte de l'interaction de Nrh-R avec le binding domaine de l'IP3R. Cette perte de fonction de Nrh-R au niveau de IP3R, bien que partielle induit une différence notable dans la sensibilité à la mort induite par la Thapsigargine. Nous avons démontré que Nrh-R protège moins bien de la mort induite par un stress réticulaire que Nrh-L. Cette différence peut s'expliquer par une moindre activation de la voie PERK dans la réponse à l'UPR, notamment au niveau de la phosphorylation de eIF2 α , dans les cellules exprimant la forme Nrh-L par rapport à la forme Nrh-R. La diminution de la phosphorylation de eIF2 α peut traduire une modification de la régulation traductionnelle des protéines, pouvant promouvoir la survie de la cellule. Il sera intéressant de réaliser un transcriptome des cellules R versus L après induction ou non à la thapsigargine.

Par ailleurs, une autre question subsiste : la forme L protège t-elle mieux que la forme R contre les stress réticulaires ? Cet avantage de survie ne pourrait être effectif que contre les stress réticulaires induits par un changement de l'homéostasie du calcium au RE. Il serait intéressant d'évaluer cette protection avec d'autres inducteurs de stress RE comme la Brefeldine A ou la Tunycamicine par exemple. A la différence de la thapsigargine, un inhibiteur de la pompe SERCA, la Brefeldin A (BFA) est un inhibiteur de transporteur vésiculaire entre le RE et le Golgi. L'inhibition par la BFA provoque un effondrement du Golgi et une fusion membranaire avec le RE (Klausner et al., 1992). Il en résulte une activation de l'UPR parfois jusqu'à l'apoptose. Il est connu depuis longtemps que la surexpression de

Bcl-2 réprime la mort induite par BFA en régulant la perméabilité membranaire mitochondriale (Guo et al., 1998). Nrhl-L ayant des fonctions anti-apoptotiques similaires à Bcl-2 via la régulation sur les canaux IP3R au RE (Lavik et al., 2015), sa surexpression devrait donc aussi protéger les cellules du BFA. A l'inverse Nrhl-R pourrait ne plus protéger de l'apoptose car cette forme n'est plus capable d'interagir avec IP3R. Cependant si la protection de l'apoptose par la protéine Bcl-2 contre la BFA nécessite de réprimer d'autres voies de l'UPR comme la voie IRE1 (Chonghaile et al., 2015), la surexpression de Nrhl-L ou Nrhl-R ne pourra pas protéger la cellule contre la BFA. En effet, lors du stress du RE, nous n'avons pas vu d'implication de Nrhl dans cette voie, notamment sur l'induction de XBP-1s (figure s2).

De plus, à l'aide des données issues des grandes banques de données, un large travail de bio-informatique a été effectué et a permis de définir une liste de composés anticancéreux dont les IC50 varient selon le génotype Nrhl-L ou Nrhl-R. Nous avons analysé 368 composés thérapeutiques, les meilleurs composés sont résumés dans les données supplémentaires 1 et 2. Nous avons pu tester quelques drogues à usage thérapeutique sur nos lignées cellulaires dont la Gemcitabine, le 5-FU, et l'Azacytidine (figure S1). Nous avons observé que la surexpression de Nrhl sous sa forme L ou R protégeait de la mort de la même manière. Cette observation souligne une fonction anti-apoptotique plus classique des Bcl-2, très certainement via la mitochondrie. Des expériences avec les composés thérapeutiques sur nos lignées cellulaires sont en cours pour valider notre criblage informatique.

La difficulté est de différencier la capacité intrinsèque de Nrhl à protéger de l'apoptose mitochondriale de sa fonction anti-apoptotique liée au calcium et au stress réticulaire. Les drogues ayant un mécanisme moléculaire avec un impact plus ou moins indirect sur l'homéostasie du calcium pourrait donc être plus efficace sur les tumeurs exprimant la forme Nrhl-R par rapport aux tumeurs exprimant la forme L.

Afin de confirmer l'hypothèse d'un meilleur pronostic de la forme L, nous avons réalisé l'analyse du génotype L11R sur des cohortes de tumeurs. Les résultats montrent que le statut polymorphique (L ou R) n'aurait pas d'incidence sur l'apparition des tumeurs. Par contre, nous avons montré que les patientes atteintes de cancer du sein et ayant au moins un allèle Nrhl-L résistent mieux à la chimiothérapie que les patientes Nrhl-R. Le SNP L11R pourrait donc constituer un bon marqueur prédictif de la réponse à la chimiothérapie dans le cancer du sein. Ces résultats sont en accord avec la littérature (Fabiani et al., 2014; Lee et al., 2018). Nos résultats pourraient s'avérer utile pour adapter un traitement au patient. Par exemple, les patients Nrhl-R pourrait mieux répondre que les patients Nrhl-L à un dérivé de la Thapsigargine, le composé G-202 ou Mipsagargin, utilisé dans des essais cliniques.

Plusieurs pistes de travaux existent pour compléter nos travaux. Une future perspective de travail est de vérifier dans notre cohorte de cancer du sein l'expression de Nrh en fonction de son polymorphisme. En effet nous avons montré, indépendamment de l'expression, que la forme Nrh-R serait de meilleur pronostic que la forme Nrh-L. Or dans les travaux précédents de l'équipe, il a été montré que la surexpression de Nrh est corrélée à une évolution délétère pour le patient. Quelle est la répartition du polymorphisme dans cette surexpression ? Le SNP peut-il affecter la survie après traitement ? Quel est le niveau d'expression de Nrh chez les patients Nrh-R ayant une résistance versus les patients Nrh-R répondant mieux à la chimiothérapie ?

Dans notre cohorte, notre groupe d'homozygotes Nrh-R est nettement plus faible par rapport aux autres groupes. Cela est liée *de facto* à la faible répartition (10%) de ce phénotype dans la population globale. Cette faible proportion d'homozygotes Nrh-R peut introduire un biais statistique et d'interprétation non négligeable. Nous prévoyons l'analyse du polymorphisme sur une cohorte de plus grande taille. De plus, toutes les patientes de la cohorte n'ont pas reçu le même protocole de néo-adjuvant initial, introduisant ainsi une seconde variable d'interprétation. Cependant l'analyse des protocoles de néo-adjuvant pourrait nous donner de précieuses informations sur la sensibilité à la chimiothérapie en fonction du polymorphisme. Ces études sont en cours (Collaboration avec le Dr Isabelle Treilleux, CLB).

Dans un second temps, il serait intéressant de confronter nos données avec d'autres cohortes provenant d'autres organes comme les myélomes multiples, les cancers de l'ovaire et les cancers du poumon afin de d'analyser l'influence du polymorphisme dans ces types tumoraux. Comme montré en données supplémentaires 1 et 2, on observe une tendance à la résistance à la chimiothérapie différent en fonction du statut polymorphique et de l'organe. On peut observer que les lignées cellulaires issues du tractus gastro-intestinal (œsophage, estomac, colon) et du sein, et exprimant un génotype Nrh-L sont plus sensibles aux drogues que les lignées Nrh-R. Inversement, les lignées cellulaires issues du poumon, des ovaires et des tissus hématopoïétiques exprimant Nrh-R sont plus sensibles aux drogues que les lignées Nrh-L. Nos données bio-informatiques ne reflètent pas nécessairement la réalité, mais peuvent à titre informatif être utilisées pour guider le choix de la thérapie. À ce jour, il n'est pas possible d'expliquer ces observations sur les lignées, mais nous pouvons avancer quelques hypothèses :

Dans le cancer gastrique, il est montré que l'expression de Nrh induit une sensibilisation des cellules cancéreuses à la chimiothérapie (Xu et al., 2011; Xu et al., 2010). En considérant que Nrh-L est la forme active capable d'interagir avec IP3R, on pourrait imaginer que son expression sensibilise plus les cellules à la mort. Alors que la forme Nrh-R, incapable d'interagir avec IP3R se comporterait comme

un mutant perte de fonction et induirait une résistance à la chimiothérapie. Ce qui pourrait expliquer pourquoi dans ces lignées, les cellules Nrh-R sont plus résistantes que les cellules Nrh-L.

Dans les lignées de cancer du sein, on a observé que certains composés sont plus efficaces contre les lignées Nrh-L que pour les lignées Nrh-R. On y observe par exemple la Bryostatin, un inhibiteur de protéine kinase C (PKC). Les PKC sont une famille de kinases enzymatiques impliquées dans de diverses fonctions physiologiques et qui peuvent être activées par le calcium intracellulaire. L'isoforme PKepsilon, surexprimé dans les cancers du côlon, du sein et de l'estomac, joue un rôle particulier dans la survie et module la réponse apoptotique liée aux protéines Bcl-2 (Garg et al., 2014). On peut alors imaginer un lien entre l'homéostasie calcique contrôlée par Nrh et une augmentation de la sensibilité apoptotique. Les cellules exprimant Nrh-L ont moins de calcium mobilisable et donc activeraient moins le PKepsilon pour se protéger par rapport à la forme Nrh-R. De manière plus globale, nous constatons que beaucoup de composés sensibles à Nrh-R ou Nrh-L sont des inhibiteurs de kinases (Akt, JNK, PKC, etc...) dont l'activité enzymatique est plus ou moins liée directement au niveau de calcium intracellulaire. Il serait donc intéressant de tester l'effet du SNP dans ces voies de régulations cellulaires.

Il sera intéressant de poursuivre cette étude à l'aide de lignées knock-in générées par la technique CRISPR Cas9. Avec ces lignées, nous pourrions analyser dans un même fond génétique l'impact de ce polymorphisme sur l'interaction Nrh/IP3R1, sur les flux calciques, sur la sensibilité des cellules à la mort induite par différentes drogues utilisées en chimiothérapie ainsi que leur pouvoir transformant.

BH4 mimétique inhibiteur de Nrh : challenge et perspectives

Le développement d'inhibiteurs spécifiques des protéines Bcl-2 a été long, difficile et s'est heurté à beaucoup d'échecs. La seule molécule à ce jour disponible en thérapeutique est le Venetoclax, un BH3 mimétique de Bcl-2. Une partie du développement des autres inhibiteurs est pour le moment à l'arrêt. Les échecs des BH3 mimétiques comme le Navitoclax peuvent être expliqués par la toxicité trop importante chez le patient (sévère thrombocytopenie en particulier), liée en partie à la non-spécificité des molécules. Les BH4 mimétiques ont été développés pour limiter les effets secondaires des BH3 mimétiques des Bcl-2. C'est ainsi que nous nous sommes intéressés au développement d'un inhibiteur de Nrh, qui à l'instar des autres Bcl-2, n'a pas encore d'inhibiteurs connus à ce jour. Or, l'inhibition de Nrh par un peptide inhibiteur a montré sa capacité à sensibiliser les cellules cancéreuses à la chimiothérapie, par une inhibition de l'interaction entre Nrh et l'IP3R. L'interaction BH4 Nrh et IP3R constitue donc une cible thérapeutique très intéressante.

Challenge du BH4 mimétique de Nrh

Nous nous sommes donc intéressés à créer un test de criblage basé sur l'interaction Nrh et l'IP3R, dans le but de suppléer l'utilisation du peptide inhibiteur dans la thérapeutique. Du fait de la structure tridimensionnelle du BH4 de Nrh, une hélice alpha « flottante » à la différence d'une poche hydrophobe BH3 stable, il est difficile de le modéliser de test de criblage correctement. Pour le moment nous avons échoué à créer un modèle avec un système de lecture claire permettant un test de criblage de BH4 mimétiques basée sur les interactions Nrh/IP3R ou Nrh/Nrh. D'après nos données, les protéines de fusion semblent bien interagir ensemble, mais il nous est impossible de quantifier l'interaction précisément dans la cellule. La disposition spatiale des deux partenaires est critique dans ce type d'expérience, surtout pour le FRET où la distance entre les deux parties fluorescences est extrêmement critique. Éventuellement il existe d'autres méthodes de mesure basées sur les propriétés physico-chimiques de l'interaction pouvant servir comme test de criblage. Nous faisons référence au BLI (bio-layer interferometry) ou encore à l'ITC (Isothermal titration calorimetry) (Pierce et al., 1999). Néanmoins ces deux méthodes nécessitent une synthèse des protéines *in vitro* et en quantité suffisante. Nous avons réussi à synthétiser les protéines fusion de Nrh (GST-Nrh, Nrh-NG et 1-23 Nrh-NG), mais des problèmes de stabilité et de solubilité des protéines BD-IP3R ont limité fortement notre approche avec ces méthodes. Un dernier essai est actuellement en cours pour tenter de modéliser l'interaction Nrh / BD-IP3R avec une start-up (SYNSIGHT) sur une technologie d'appairage d'une protéine de fusion Nrh ou IP3R avec la protéine Tau. Cette technologie permettra de visualiser en temps réelle la localisation des protéines sur le réseau micro tubulaire et permettra la visualisation de l'interaction entre Nrh et IP3R (Maucuer et al., 2018).

Par ailleurs, nous avons étudié le couple Nrh / MTDII par analogie avec Bcl-2. Le peptide Bcl-2 (BIRD-2) rompt l'interaction Bcl-2 / MTDII, lève l'inhibition de Bcl-2 sur l'IP3R, et sensibilise les cellules à la mort (Bittremieux et al., 2018; Lavik et al., 2015). Nous avons aussi montré que notre peptide TAT-BH4-Nrh-L pouvait aussi lever l'inhibition de Nrh sur le BD-IP3R, mais aussi sur le MTDII. De fait il serait intéressant de considérer le domaine MTD comme partenaire possible pour le test de criblage. Néanmoins les résultats préliminaires avec le système BACTH ne semblent guère convaincants pour tester ce duo dans d'autres systèmes.

Il est impossible ici de ne pas mentionner le travail effectué par modélisation *in silico* (données non montrées). Nous avons déterminé plusieurs sites d'interaction possible du peptide BH4-Nrh avec Nrh. Cependant la structure de la protéine Nrh n'est pas totalement élucidée, des zones sont encore manquantes (PDB : Q9HD36). De plus sa structure est modifiée à des cystéines clés pour augmenter sa stabilité. Il n'est donc pas possible d'effectuer des criblages *in silico* pour le moment.

Nous avons pu mettre en évidence l'interaction de Beclin-1 avec NRH avec le système BACTH. Cependant ce modèle d'interaction Nrh/Beclin-1 ne dépend pas du domaine BH4 de Nrh. L'interaction s'effectue essentiellement entre le domaine BH1 de Nrh et le BH3 de Beclin-1 (Robert et al., 2012). Nous nous éloignons donc du test de criblage pour un BH4 mimétique, il s'agirait plus d'un inhibiteur de Nrh s'approchant du cadre des BH3 /BH1 mimétiques. Néanmoins, il est montré que le KO de Nrh accentue l'autophagie et sensibilise les cellules à la mort (Robert et al., 2012). Il serait donc très intéressant de trouver un inhibiteur spécifique pour rompre l'interaction Nrh / Beclin-1.

Perspectives d'après

Le programme de « Drug discovery » initié est un long processus, mais nécessaire dans le développement de thérapies issues de recherches fondamentales. Durant une partie de ma thèse, nous avons contribué à tester un grand nombre de méthodes pouvant aboutir à la modélisation d'un test de criblage basée sur le concept des BH4 mimétiques. Nous avons pu réduire considérablement les possibilités pour construire ce test. Les travaux sont encore en cours au sein du laboratoire, néanmoins le risque que le BH4 de Nrh en tant que cible thérapeutique soit « undruggable / impossible » reste important à moins d'une avancée technologique (une structure plus affinée de Nrh par exemple).

Nos études se poursuivent actuellement avec la collaboration avec la start-up SYNSIGHT. La start-up utilise une technologie d'appairage entre les partenaires sur le réseau micro-tubulaire avec des protéines recombinantes Nrh ou IP3R-BD fusionnées avec la protéine Tau. Ce système a déjà fait ses preuves pour visualiser et détecter des interactions protéine-protéine *in cellulo* (Maucuer et al., 2018). Ce système de détection est beaucoup plus fin et précis que les systèmes que nous avons utilisés. Les premiers résultats sont probants et nous attendons rapidement la validation de ces résultats afin de conclure sur le système de crible.

En parallèle, une deuxième stratégie intéressante serait d'étudier le complexe Nrh / Beclin-1. En parallèle à une mise en place de l'automatisation du test double hybride Nrh/Beclin-1, il serait intéressant de produire Beclin-1 en protéine *in vitro*, dans le but de cristalliser le complexe Nrh / Beclin-1. Nous obtiendrions alors une structure totale de Nrh permettant un travail *in silico* plus performant. Pour référence, BDA-366, BH4 mimétique de Bcl-2, est issu de travaux *in silico* sur la structure de Bcl-2 (Han et al., 2015).

Conclusion

Nos différents travaux portant sur Nrh sont très complémentaires. Le premier travail sur le SNP nous indique qu'il n'existe pas un seul Nrh mais bien deux protéines induisant un phénotype cellulaire différent. Il en résulte alors une stratégie thérapeutique que nous pouvons exploiter dans le but d'optimiser le traitement pour le patient, traitement que nous travaillons à trouver dans notre deuxième travail sur les inhibiteurs de Nrh. Le criblage de BH4 mimétiques pourrait donner un inhibiteur spécifique plus ou moins actif selon le SNP. L'inhibiteur BH4 mimétique de Nrh devrait être plus actif sur la forme Nrh-L. Pour les inhibiteurs issus du criblage basé sur le complexe Nrh / Beclin-1, ils seront probablement moins SNP dépendant car ils cibleraient la poche hydrophobe de Nrh. Leurs utilisations en thérapeutique seront donc conditionnées par l'étude de l'environnement tumoral.

« Comme les antibiotiques, les inhibiteurs de Nrh c'est pas automatique ».

Liste des figures

Figure 1 Multi-domaines de la famille Bcl-2.....	12
Figure 2 BH3-only de la famille Bcl-2	16
Figure 3 Caspases, les petites mains de la mort.....	18
Figure 4 La voie extrinsèque de l'apoptose.....	19
Figure 5 La mort mitochondriale dépendante	21
Figure 6 Modèle unifié de l'impact des interactions des protéines Bcl-2 à la mitochondrie	22
Figure 7 Interaction entre anti/pro-apoptotiques Bcl-2	23
Figure 8 Perméabilisation médiée par le Calcium.....	26
Figure 9 Schéma simple de l'autophagie et la formation de l'autolysosome	28
Figure 10 Localisation et dynamique moléculaire des protéines Bcl-2.....	32
Figure 11 Implication des Bcl-2 dans cycle cellulaire	36
Figure 12 Ubiquitination et protéasome.....	44
Figure 13 Fréquence des altérations génomiques des Bcl-2 anti-apoptotiques dans les cancers solides	50
Figure 14 Schéma simplifié des éléments clés de la régulation du calcium et conséquences intracellulaires.....	64
Figure 15 Structure d'un récepteur IP3.....	66
Figure 16 Structure du canal VDAC1 <i>Structure 3D de VDAC1</i>	70
Figure 17 Les principales fonctions physiologiques du RE	75
Figure 18 Les voies de l'UPR et conséquences cellulaires avec les protéines Bcl-2	80
Figure 19 Architecture de Nrh/Bcl2L10 (PDB : 4B4S).....	83
Figure 20 Les interactions biochimiques de Nrh dans la cellule	85
Figure 21 Corrélation du niveau d'expression de Nrh/Bcl2L10/Bcl-B avec la survie et la résistance à la thérapeutique.	87
Figure 22 Nrh anti/pro-apoptotique selon l'environnement tumoral	89
Figure 23 SNP (<i>rs2231292</i>) de Nrh localisée au niveau du domaine BH4 de la protéine.....	91
Figure 24 Concepts d'un BH4 mimétique : peptide TAT-BH4 Nrh et petite molécule inhibitrice	116
Figure 25 FRET et BACTH	117
Figure 26 Expériences et quantifications de FRET sur le modèle Nrh / BD-IP3R	118
Figure 27 Expériences et quantifications de FRET sur le modèle du dimère Nrh / Nrh	120
Figure 28 Expériences in vitro de <i>pulldown</i> et de fluorescence polarisée utilisant le peptide TAT-BH4-Nrh-L/R avec Nrh.....	122
Figure 29 Les partenaires de Nrh, possibilités et perspectives du système double hybride BACTH... ..	124
Figure 30 TMR-TAT-BH4-Nrh.....	126

Liste des tableaux

Tableau 1 Récapitulatif des modifications post-traductionnelles des Bcl-2 multi-domaines anti-apoptotiques.....	47
Tableau 2 Récapitulatif des modifications post-traductionnelles des Bcl-2 pro-apoptotiques	48
Tableau 3 Les stratégies thérapeutiques anti-Bcl-2.	62
Tableau 4 Construction des protéines de fusion pour FRET et BACTH	125
Tableau 5 Protéines fluorescentes.....	126

Liste des abréviations

ADP	Adénosine Diphosphate
ADMET	Absorption, Distribution, Métabolisme, Élimination Et Toxicité
AIF	Apoptotic-Inducing Factor
AMP	Adénosine monophosphate
AMPC	AMP Cyclique
AMPK	Adénosine 5' monophosphate kinase
ANT	Adenine Nucleotide Transporter
AP-1	Activating Protein-1
Apaf-1	Apoptosis Protease Factor-1
ARTS	Apoptosis-Related Protein In The TGF-Beta Signalling Pathway
ASK1	Apoptosis Signal Regulating 1
ATF6	Activating Transcription Factor 6
ATP	Adénosine Triphosphate
Aurka	Kinase Aurora A
β -TrCP	Beta Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase
BACTH	Bacterial Adenylate Cyclase Two Hybrid
Bad	Bcl-2-Associated Agonist Of Cell Death
Bak	Bcl-2 Antagonist Killer
Bax	Bcl-2 Associated X Factor
Bcl-2	B Cell Lymphoma 2
Bcl-xL	B-Cell Lymphoma Extra Large
Bcl-xS	B-Cell Lymphoma-Extra Small
BD	Binding Domain
BFA	Brefeldin A
Bfl-1	Bcl-2-Related Gene Expressed in Fetal Liver
BH	Bcl-2 Homology Domain
Bid	BH3 Interacting Domain Death Agonist
Bik	Bcl-2-Interacting Killer
Bim	Bcl-2 Interacting Mediator Of Cell Death
Bip	Binding Immunoglobulin Protein
BIRD-2	Bcl-2 Ip3 Receptor Disruptor-2
BLI	Bio Layer Interference
Bmf	Bcl-2 Modifying Factor
Bok	Bcl-2 Ovarian Killer
bZip	Basic Leucine Zipper
c-Src	Cellular Src
CARD	Caspase And Recruitment Domain

Caspase	Cystéine-Aspartate Protéase
CBPC	Carcinomes Bronchiques à Petites Cellules
CCLL	Cancer Cell Line Encyclopedia
CD	Coupling Domain
CDK	Cyclin-Dependant Kinase
Ce3	Cerulean3
CFD	Canal Forming Domain
CHOP	CEBP Homologous Protein
CICR	Calcium-Induced Calcium Released
CK	Casein Kinase
CLB	Centré Léon Bérard
CO-IP	Co-Immunoprecipitation
CRD	Cysteine Rich Domain
CREB	Camp Response Element Binding Protein
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
Diablo	Direct Inhibitor Of Apoptosis-Binding
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DOCs	Downstream Of CHOP
eIF2	Eukaryotic Translation Initiation Factor
EIM	Espace Inter Membranaire
EndoG	Endonucléase G
ERAD	Dégradation Médiée Par Le Protéasome
ERGIC	ER-Golgi Intermediate Compartment
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
ERK1/2	Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2
ERSE	ER Stress Response Element
Ets-1	E26 Transformation-Specific Sequence-1
EV	Empty Vector
FADD	Fas-Associated Death Domain Protein
FAS-L	FAS ligand
FBW7	F-Box And WD Repeat Domain-Containing 7
FDA	Food And Drug Administration
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
GADD34	Growth Arrest And DNA Damage Inducible 34
GDSC	Genomics Of Drug Sensitivity In Cancer
Grp75	Glucose-Related Protein 75
Grp78	Glucose-Related Protein 78
GSK	Glycogen Synthase Kinase
GST	Gluthathione-S-Transferase
HERC1	HECT And RLD Domain Containing E3 Ligase 1

<i>Hrk</i>	Protéine Harakiri
HSP	Heat Shock Protein
IAP	Inhibitor Of Apoptosis
IC50	Concentration Inhibitrice Médiane
IL-2	Interleukine 2
IL-3	Interleukine 3
IMS	Inter Mitochondrial Space
IP3	Inositol 1,4,5-Triphosphate
IP3R	Récepteur à l'IP3
IRBIT	Inositol-1,4,5-Trisphosphate (IP3) Receptors Binding Protein Released With IP3
IRE1	Inositol Requiring Enzyme 1
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
JNK	c-Jun N-Terminal Kinases
Ki	Constante inhibitrice
KO	Knock Out
LAM	Leucémies Aiguës Myéloïdes
LLC	Leucémies Lymphoïdes Chroniques
MAMs	Mitochondria Associated Membranes
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCL-1	Myeloid Cell Leukemia 1
MCU	Mitochondrial Calcium Uniporter
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
MEM	Membrane Externe Mitochondriale
MIM	Membrane Interne Mitochondriale
miR	MicroRNA
MMP	Métalloprotéinases
MOM	Membrane Externe Mitochondriale
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation
mPTP	Mitochondrial Permeability Transition Pore
mSc	mScarlet
Mst1	Macrophage Stimulating 1
MTD	Modulating And Transducing Domain
mTor	Mechanistic Target Of Rapamycin
MULE	Mcl-1 Ubiquitine Ligase E3
NG	Neongreen
Orai1	Orai Calcium Release-Activated Calcium Modulator 1
PERK	Proteine Kinase RNA-Like ER Kinase
PEST	Domaine Riche En Proline, Glutamate, Sérine Et Thréonine
PG	Pharmacogénomique
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PIP2	Phospho-Inositol Biphosphate Membranaire

PKA	Protéine Kinase A
PKCa	Protéine Kinase Ca
PKCζ	Protein Kinase C Isoforme Zeta
PLK	Polo-Like Kinase
PP2a	Phosphatase 2a
PP2B	Sérine-Thréonine Phosphatase Calcium Dépendent
PROTAC	Proteolysis Targeting Chimera
PTP	Permeability Transition Pore
PTPN	Phosphatases Non Tyrosine
Puma	P53 Upregulated Modulator Of Apoptosis
RAS	Rat Sarcoma
RCB	Residual Cancer Burden
RE	Réticulum Endoplasmique
REG	Réticulum Endoplasmique Granuleux
REL	Reticulum Endoplasmique Lisse
RHEB	RAS Homolog Enriched in Brain
RIDD	Regulated IRE1-Dependent Decay
RNase	Acitivité Endoribonucléase
ROS	Reactive Oxygen Species
Rpn	Regulatory Particle Of Non ATPases
Rpt	Regulatory Particle Of Triple ATPases
RSK	Ribosomal S6 Kinase
RSV	Virus du Sarcome de Rous
RyR	Ryanodin Receptor
SAHB	Stabilized Alpha-Helix Of Bcl-2 Domain
SD	Suppressor Domain
SERCA	Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium Transport ATPase
SMAC	Second Mitochondria-Derivec Activator Of Caspases
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOCE	Store-Operated Calcium Entry
SPR	Surface Plamon Resonance
STIM1	Stromal Interaction Molecule 1
tBid	Truncated Bid
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TGFβ	Tumor Growth Factor Beta
TM	Domaine Transmembranaire
TMR	Tétraméthylrhodamine
TNF	Tumor Necrosis Factor
TOP	Thimet Oligopeptidase
TPX2	Targeting Protein For Xklp2
TRADD	Tumor Necrosis Factor Receptor Type-1 Associated Death Domain

TRAF2	Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 2
TRAIL	TNF-Related Apoptosis
TRB-3	Tribbles Homolog 3
TRIM17	Tripartite Motif Containing 17
TRP	Transient Receptor Potential Channel
UPP	Ubiquitin Proteasome Pathway
UPR	Unfolded Proteine Response
USP9X	Ubiquitin Specific Peptidase 9 X-Linked
v-Src	Viral Src
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
VHL	Von Hippel-Lindau
VPS34	Vesicle protein sorting 34
Xbp-1	X-Box Binding Protein 1
xbp-1S	X-Box Binding Protein 1 Spliced
xbp-1u	X-Box Binding Protein 1 Unspliced
XIAP	X-Linked Inhibitor Of Apoptosis Protein

Bibliographie

Abulwerdi, F., Liao, C., Liu, M., Azmi, A.S., Aboukameel, A., Mady, A.S., Gulappa, T., Cierpicki, T., Owens, S., Zhang, T., *et al.* (2014). A novel small-molecule inhibitor of mcl-1 blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics* *13*, 565-575.

Adachi, Y., Yamamoto, K., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., and Mori, K. (2008). ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell structure and function* *33*, 75-89.

Ahmad, S., Ahmad, A., Dremina, E.S., Sharov, V.S., Guo, X., Jones, T.N., Loader, J.E., Tatreau, J.R., Perraud, A.L., Schoneich, C., *et al.* (2009). Bcl-2 suppresses sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase expression in cystic fibrosis airways: role in oxidant-mediated cell death. *American journal of respiratory and critical care medicine* *179*, 816-826.

Aita, V.M., Liang, X.H., Murty, V.V., Pincus, D.L., Yu, W., Cayanis, E., Kalachikov, S., Gilliam, T.C., and Levine, B. (1999). Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* *59*, 59-65.

Akao, Y., Otsuki, Y., Kataoka, S., Ito, Y., and Tsujimoto, Y. (1994). Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer research* *54*, 2468-2471.

Akhtar, R.S., Klocke, B.J., Strasser, A., and Roth, K.A. (2008). Loss of BH3-only protein Bim inhibits apoptosis of hemopoietic cells in the fetal liver and male germ cells but not neuronal cells in bcl-x-deficient mice. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* *56*, 921-927.

Alavian, K.N., Beutner, G., Lazrove, E., Sacchetti, S., Park, H.A., Licznerski, P., Li, H., Nabili, P., Hockensmith, K., Graham, M., *et al.* (2014). An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, 10580-10585.

Alavian, K.N., Li, H., Collis, L., Bonanni, L., Zeng, L., Sacchetti, S., Lazrove, E., Nabili, P., Flaherty, B., Graham, M., *et al.* (2011). Bcl-xL regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F1FO ATP synthase. *Nat Cell Biol* *13*, 1224-1233.

Ali, M.M., Bagratuni, T., Davenport, E.L., Nowak, P.R., Silva-Santisteban, M.C., Hardcastle, A., McAndrews, C., Rowlands, M.G., Morgan, G.J., Aherne, W., *et al.* (2011). Structure of the Ire1 autophosphorylation complex and implications for the unfolded protein response. *The EMBO journal* *30*, 894-905.

Almanza, A., Carlesso, A., Chintha, C., Creedican, S., Doultinos, D., Leuzzi, B., Luís, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., *et al.* (2019). Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J* *286*, 241-278.

Aouacheria, A., Arnaud, E., Venet, S., Lalle, P., Gouy, M., Rigal, D., and Gillet, G. (2001). Nr4a1, a human homologue of Nr-13 associates with Bcl-Xs and is an inhibitor of apoptosis. *Oncogene* *20*, 5846-5855.

Aouacheria, A., Brunet, F., and Gouy, M. (2005). Phylogenomics of life-or-death switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip families of apoptotic regulators. *Molecular biology and evolution* *22*, 2395-2416.

Aouacheria, A., Rech de Laval, V., Combet, C., and Hardwick, J.M. (2013). Evolution of Bcl-2 homology motifs: homology versus homoplasy. *Trends in cell biology* 23, 103-111.

Appenzeller-Herzog, C., and Hauri, H.P. (2006). The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *Journal of cell science* 119, 2173-2183.

Arbel, N., Ben-Hail, D., and Shoshan-Barmatz, V. (2012). Mediation of the Antiapoptotic Activity of Bcl-xL Protein upon Interaction with VDAC1 Protein. *Journal of Biological Chemistry* 287, 23152-23161.

Arbel, N., and Shoshan-Barmatz, V. (2010). Voltage-dependent anion channel 1-based peptides interact with Bcl-2 to prevent antiapoptotic activity. *The Journal of biological chemistry* 285, 6053-6062.

Arellano, M.L., Borthakur, G., Berger, M., Luer, J., and Raza, A. (2014). A phase II, multicenter, open-label study of obatoclox mesylate in patients with previously untreated myelodysplastic syndromes with anemia or thrombocytopenia. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia* 14, 534-539.

Ashimori, N., Zeitlin, B.D., Zhang, Z., Warner, K., Turkienicz, I.M., Spalding, A.C., Teknos, T.N., Wang, S., and Nor, J.E. (2009). TW-37, a small-molecule inhibitor of Bcl-2, mediates S-phase cell cycle arrest and suppresses head and neck tumor angiogenesis. *Molecular cancer therapeutics* 8, 893-903.

Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science (New York, N.Y.)* 281, 1305-1308.

Avalos, Y., Canales, J., Bravo-Sagua, R., Criollo, A., Lavandero, S., and Quest, A.F. (2014). Tumor suppression and promotion by autophagy. *Biomed Res Int* 2014, 603980.

Azad, A., Fox, J., Leverrier, S., and Storey, A. (2012). Blockade of the BAK hydrophobic groove by inhibitory phosphorylation regulates commitment to apoptosis. *PLoS One* 7, e49601.

Azad, A., and Storey, A. (2013). BAK multimerization for apoptosis, but not bid binding, is inhibited by negatively charged residue in the BAK hydrophobic groove. *Molecular Cancer* 12, 65.

Azad, N., Vallyathan, V., Wang, L., Tantishaiyakul, V., Stehlik, C., Leonard, S.S., and Rojanasakul, Y. (2006). S-nitrosylation of Bcl-2 inhibits its ubiquitin-proteasomal degradation. A novel antiapoptotic mechanism that suppresses apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 281, 34124-34134.

Bai, Y., Wang, J., Han, J., Xie, X.L., Ji, C.G., Yin, J., Chen, L., Wang, C.K., Jiang, X.Y., Qi, W., *et al.* (2017). BCL2L10 inhibits growth and metastasis of hepatocellular carcinoma both in vitro and in vivo. *Molecular carcinogenesis* 56, 1137-1149.

Balko, J.M., Giltneane, J.M., Wang, K., Schwarz, L.J., Young, C.D., Cook, R.S., Owens, P., Sanders, M.E., Kuba, M.G., Sanchez, V., *et al.* (2014). Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer discovery* 4, 232-245.

Basu, A., and Haldar, S. (2003). Identification of a novel Bcl-xL phosphorylation site regulating the sensitivity of taxol- or 2-methoxyestradiol-induced apoptosis. *FEBS Lett* 538, 41-47.

Baumgartner, H.K., Gerasimenko, J.V., Thorne, C., Ferdek, P., Pozzan, T., Tepikin, A.V., Petersen, O.H., Sutton, R., Watson, A.J., and Gerasimenko, O.V. (2009). Calcium elevation in

mitochondria is the main Ca²⁺ requirement for mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening. *The Journal of biological chemistry* 284, 20796-20803.

Bayrhuber, M., Meins, T., Habeck, M., Becker, S., Giller, K., Villinger, S., Vonnrhein, C., Griesinger, C., Zweckstetter, M., and Zeth, K. (2008). Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 15370-15375.

Bergamaschi, D., Gasco, M., Hiller, L., Sullivan, A., Syed, N., Trigiante, G., Yulug, I., Merlano, M., Numico, G., Comino, A., *et al.* (2003). p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer cell* 3, 387-402.

Bernales, S., McDonald, K.L., and Walter, P. (2006a). Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS biology* 4, e423.

Bernales, S., Papa, F.R., and Walter, P. (2006b). Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annual review of cell and developmental biology* 22, 487-508.

Bernardi, P. (2013). The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Frontiers in physiology* 4, 95.

Bernardini, J.P., Brouwer, J.M., Tan, I.K., Sandow, J.J., Huang, S., Stafford, C.A., Bankovacki, A., Riffkin, C.D., Wardak, A.Z., Czabotar, P.E., *et al.* (2019). Parkin inhibits BAK and BAX apoptotic function by distinct mechanisms during mitophagy. *The EMBO journal* 38.

Beroukhi, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J.S., Dobson, J., Urashima, M., *et al.* (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463, 899-905.

Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4, 517-529.

Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1, 11-21.

Bertolotti, A., Wang, X., Novoa, I., Jungreis, R., Schlessinger, K., Cho, J.H., West, A.B., and Ron, D. (2001). Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1 β -deficient mice. *The Journal of clinical investigation* 107, 585-593.

Bessou, M., Lopez, J., Gadet, R., Deygas, M., Popgeorgiev, N., Poncet, D., Nougarede, A., Billard, P., Mikaelian, I., Gonzalo, P., *et al.* (2020). The apoptosis inhibitor Bcl-xL controls breast cancer cell migration through mitochondria-dependent reactive oxygen species production. *Oncogene* 39, 3056-3074.

Beverly, L.J., Lockwood, W.W., Shah, P.P., Erdjument-Bromage, H., and Varmus, H. (2012). Ubiquitination, localization, and stability of an anti-apoptotic BCL2-like protein, BCL2L10/BCLb, are regulated by Ubiquilin1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E119-126.

Bindels, D.S., Haarbosch, L., van Weeren, L., Postma, M., Wiese, K.E., Mastop, M., Aumonier, S., Gotthard, G., Royant, A., Hink, M.A., *et al.* (2017). mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging. *Nature methods* 14, 53-56.

Bittremieux, M., La Rovere, R.M., Akl, H., Martines, C., Welkenhuyzen, K., Dubron, K., Baes, M., Janssens, A., Vandenberghe, P., Laurenti, L., *et al.* (2019). Constitutive IP3 signaling underlies the sensitivity of B-cell cancers to the Bcl-2/IP3 receptor disruptor BIRD-2. *Cell death and differentiation* 26, 531-547.

Bittremieux, M., La Rovere, R.M., Schuermans, M., Luyten, T., Mikoshiba, K., Vangheluwe, P., Parys, J.B., and Bultynck, G. (2018). Extracellular and ER-stored Ca²⁺ contribute to BIRD-2-induced cell death in diffuse large B-cell lymphoma cells. *Cell death discovery* 4, 101.

Blagosklonny, M.V., Giannakakou, P., el-Deiry, W.S., Kingston, D.G., Higgs, P.I., Neckers, L., and Fojo, T. (1997). Raf-1/bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death. *Cancer research* 57, 130-135.

Blanchard, H., Grochulski, P., Li, Y., Arthur, J.S.C., Davies, P.L., Elce, J.S., and Cygler, M. (1997). Structure of a calpain Ca²⁺-binding domain reveals a novel EF-hand and Ca²⁺-induced conformational changes. *Nature Structural Biology* 4, 532-538.

Blazanin, N., Son, J., Craig-Lucas, A.B., John, C.L., Breech, K.J., Podolsky, M.A., and Glick, A.B. (2017). ER stress and distinct outputs of the IRE1 α RNase control proliferation and senescence in response to oncogenic Ras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, 9900-9905.

Blobel, G. (1980). Intracellular protein topogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 1496-1500.

Blondel, O., Takeda, J., Janssen, H., Seino, S., and Bell, G.I. (1993). Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP3R-3, expressed in pancreatic islets, kidney, gastrointestinal tract, and other tissues. *The Journal of biological chemistry* 268, 11356-11363.

Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G., and Thompson, C.B. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608.

Bonneau, B., Ando, H., Kawaai, K., Hirose, M., Takahashi-Iwanaga, H., and Mikoshiba, K. (2016). IRBIT controls apoptosis by interacting with the Bcl-2 homolog, Bcl2l10, and by promoting ER-mitochondria contact. *eLife* 5.

Bonneau, B., Nougarede, A., Prudent, J., Popgeorgiev, N., Peyrieras, N., Rimokh, R., and Gillet, G. (2014). The Bcl-2 homolog Nr2f1 inhibits binding of IP3 to its receptor to control calcium signaling during zebrafish epiboly. *Science signaling* 7, ra14.

Bonneau, B., Prudent, J., Popgeorgiev, N., and Gillet, G. (2013). Non-apoptotic roles of Bcl-2 family: the calcium connection. *Biochimica et biophysica acta* 1833, 1755-1765.

Bouillet, P., Cory, S., Zhang, L.C., Strasser, A., and Adams, J.M. (2001). Degenerative disorders caused by Bcl-2 deficiency prevented by loss of its BH3-only antagonist Bim. *Developmental cell* 1, 645-653.

Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D.C., Tarlinton, D.M., Kay, T.W., Kontgen, F., Adams, J.M., and Strasser, A. (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science (New York, N.Y.)* 286, 1735-1738.

Boyd, J.M., Gallo, G.J., Elangovan, B., Houghton, A.B., Malstrom, S., Avery, B.J., Ebb, R.G., Subramanian, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., *et al.* (1995). Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* *11*, 1921-1928.

Braakman, I., and Bulleid, N.J. (2011). Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annual review of biochemistry* *80*, 71-99.

Brady, H.J., Gil-Gomez, G., Kirberg, J., and Berns, A.J. (1996). Bax alpha perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells. *The EMBO journal* *15*, 6991-7001.

Breitschopf, K., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2000). Ubiquitin-mediated Degradation of the Proapoptotic Active Form of Bid: A FUNCTIONAL CONSEQUENCE ON APOPTOSIS INDUCTION. *Journal of Biological Chemistry* *275*, 21648-21652.

Brien, G., Debaud, A.L., Robert, X., Oliver, L., Trescol-Biemont, M.C., Cauquil, N., Geneste, O., Aghajari, N., Vallette, F.M., Haser, R., *et al.* (2009). C-terminal residues regulate localization and function of the antiapoptotic protein Bfl-1. *The Journal of biological chemistry* *284*, 30257-30263.

Buckley, D.L., Raina, K., Darricarrere, N., Hines, J., Gustafson, J.L., Smith, I.E., Miah, A.H., Harling, J.D., and Crews, C.M. (2015). HaloPROTACS: Use of Small Molecule PROTACs to Induce Degradation of HaloTag Fusion Proteins. *ACS Chemical Biology* *10*, 1831-1837.

Caenepeel, S., Brown, S.P., Belmontes, B., Moody, G., Keegan, K.S., Chui, D., Whittington, D.A., Huang, X., Poppe, L., Cheng, A.C., *et al.* (2018). AMG 176, a Selective MCL1 Inhibitor, Is Effective in Hematologic Cancer Models Alone and in Combination with Established Therapies. *Cancer discovery* *8*, 1582-1597.

Cakir, Z., Funk, K., Lauterwasser, J., Todt, F., Zerbes, R.M., Oelgeklaus, A., Tanaka, A., van der Laan, M., and Edlich, F. (2017). Parkin promotes proteasomal degradation of misregulated BAX. *Journal of cell science* *130*, 2903-2913.

Calastretti, A., Bevilacqua, A., Ceriani, C., Vigano, S., Zancai, P., Capaccioli, S., and Nicolin, A. (2001). Damaged microtubules can inactivate BCL-2 by means of the mTOR kinase. *Oncogene* *20*, 6172-6180.

Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Iorio, M.V., Visone, R., Sever, N.I., Fabbri, M., *et al.* (2005). A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* *353*, 1793-1801.

Campbell, K.J., Dhayade, S., Ferrari, N., Sims, A.H., Johnson, E., Mason, S.M., Dickson, A., Ryan, K.M., Kalna, G., Edwards, J., *et al.* (2018). MCL-1 is a prognostic indicator and drug target in breast cancer. *Cell Death Dis* *9*, 19.

Campbell, K.J., and Tait, S.W.G. (2018). Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open biology* *8*.

Carpio, M.A., Michaud, M., Zhou, W., Fisher, J.K., Walensky, L.D., and Katz, S.G. (2015). BCL-2 family member BOK promotes apoptosis in response to endoplasmic reticulum stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *112*, 7201-7206.

Chattopadhyay, A., Chiang, C.W., and Yang, E. (2001). BAD/BCL-[X(L)] heterodimerization leads to bypass of G0/G1 arrest. *Oncogene* *20*, 4507-4518.

Chen, D., Gao, F., Li, B., Wang, H., Xu, Y., Zhu, C., and Wang, G. (2010). Parkin Mono-ubiquitinates Bcl-2 and Regulates Autophagy. *Journal of Biological Chemistry* 285, 38214-38223.

Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular cell* 17, 393-403.

Chen, M., He, H., Zhan, S., Krajewski, S., Reed, J.C., and Gottlieb, R.A. (2001). Bid Is Cleaved by Calpain to an Active Fragment in Vitro and during Myocardial Ischemia/Reperfusion. *Journal of Biological Chemistry* 276, 30724-30728.

Chen, R., Valencia, I., Zhong, F., McColl, K.S., Roderick, H.L., Bootman, M.D., Berridge, M.J., Conway, S.J., Holmes, A.B., Mignery, G.A., *et al.* (2004). Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *The Journal of cell biology* 166, 193-203.

Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K., and Hardwick, J.M. (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science (New York, N.Y.)* 278, 1966-1968.

Chevet, E., Hetz, C., and Samali, A. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress-Activated Cell Reprogramming in Oncogenesis. *Cancer discovery* 5, 586.

Chiang, C.W., Kanies, C., Kim, K.W., Fang, W.B., Parkhurst, C., Xie, M., Henry, T., and Yang, E. (2003). Protein phosphatase 2A dephosphorylation of phosphoserine 112 plays the gatekeeper role for BAD-mediated apoptosis. *Molecular and cellular biology* 23, 6350-6362.

Chin, H.S., Li, M.X., Tan, I.K.L., Ninnis, R.L., Reljic, B., Scicluna, K., Dagley, L.F., Sandow, J.J., Kelly, G.L., Samson, A.L., *et al.* (2018). VDAC2 enables BAX to mediate apoptosis and limit tumor development. *Nature communications* 9, 4976.

Chiu, W.-T., Chang, H.-A., Lin, Y.-H., Lin, Y.-S., Chang, H.-T., Lin, H.-H., Huang, S.-C., Tang, M.-J., and Shen, M.-R. (2018). Bcl-2 regulates store-operated Ca²⁺ entry to modulate ER stress-induced apoptosis. *Cell death discovery* 4, 37.

Choi, A.M., Ryter, S.W., and Levine, B. (2013). Autophagy in human health and disease. *The New England journal of medicine* 368, 651-662.

Choi, J., Choi, K., Benveniste, E.N., Hong, Y.-S., Lee, J.-H., Kim, J., and Park, K. (2005). Bcl-2 promotes invasion and lung metastasis by inducing matrix metalloproteinase-2. *Cancer research* 65, 5554-5560.

Chonghaile, T.N., Gupta, S., John, M., Szegezdi, E., Logue, S.E., and Samali, A. (2015). BCL-2 modulates the unfolded protein response by enhancing splicing of X-box binding protein-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 466, 40-45.

Cilenti, L., Kyriazis, G.A., Soundarapandian, M.M., Stratico, V., Yerkes, A., Park, K.M., Sheridan, A.M., Alnemri, E.S., Bonventre, J.V., and Zervos, A.S. (2005). Omi/HtrA2 protease mediates cisplatin-induced cell death in renal cells. *American journal of physiology. Renal physiology* 288, F371-379.

Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., *et al.* (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 13944-13949.

- Clapham, D.E. (2007). Calcium Signaling. *Cell* *131*, 1047-1058.
- Cluzeau, T., Robert, G., Mounier, N., Karsenti, J.M., Dufies, M., Puissant, A., Jacquel, A., Renneville, A., Preudhomme, C., Cassuto, J.P., *et al.* (2012). BCL2L10 is a predictive factor for resistance to azacitidine in MDS and AML patients. *Oncotarget* *3*, 490-501.
- Coe, H., and Michalak, M. (2009). Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *General physiology and biophysics* *28 Spec No Focus*, F96-f103.
- Craxton, A., Butterworth, M., Harper, N., Fairall, L., Schwabe, J., Ciechanover, A., and Cohen, G.M. (2012). NOXA, a sensor of proteasome integrity, is degraded by 26S proteasomes by an ubiquitin-independent pathway that is blocked by MCL-1. *Cell Death & Differentiation* *19*, 1424-1434.
- Croft, A., Tay, K.H., Boyd, S.C., Guo, S.T., Jiang, C.C., Lai, F., Tseng, H.Y., Jin, L., Rizos, H., Hersey, P., *et al.* (2014). Oncogenic activation of MEK/ERK primes melanoma cells for adaptation to endoplasmic reticulum stress. *The Journal of investigative dermatology* *134*, 488-497.
- Cummins, J.M., He, Y., Leary, R.J., Pagliarini, R., Diaz, L.A., Jr., Sjoblom, T., Barad, O., Bentwich, Z., Szafranska, A.E., Labourier, E., *et al.* (2006). The colorectal microRNAome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 3687-3692.
- Dai, H., Ding, H., Meng, X.W., Lee, S.-H., Schneider, P.A., and Kaufmann, S.H. (2013). Contribution of Bcl-2 Phosphorylation to Bak Binding and Drug Resistance. *Cancer research* *73*, 6998-7008.
- Dai, H., Pang, Y.-P., Ramirez-Alvarado, M., and Kaufmann, S.H. (2014). Evaluation of the BH3-only Protein Puma as a Direct Bak Activator. *Journal of Biological Chemistry* *289*, 89-99.
- Datta, S.R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S.W., Yaffe, M.B., and Greenberg, M.E. (2000). 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Molecular cell* *6*, 41-51.
- Dawson, S.J., Makretsov, N., Blows, F.M., Driver, K.E., Provenzano, E., Le Quesne, J., Baglietto, L., Severi, G., Giles, G.G., McLean, C.A., *et al.* (2010). BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *British journal of cancer* *103*, 668-675.
- De Chiara, G., Marcocci, M.E., Torcia, M., Lucibello, M., Rosini, P., Bonini, P., Higashimoto, Y., Damonte, G., Armirotti, A., Amodei, S., *et al.* (2006). Bcl-2 Phosphorylation by p38 MAPK: IDENTIFICATION OF TARGET SITES AND BIOLOGIC CONSEQUENCES. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 21353-21361.
- Debatin, K.-M., Poncet, D., and Kroemer, G. (2002). Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* *21*, 8786-8803.
- Deegan, S., Saveljeva, S., Logue, S.E., Pakos-Zebrucka, K., Gupta, S., Vandenabeele, P., Bertrand, M.J., and Samali, A. (2014). Deficiency in the mitochondrial apoptotic pathway reveals the toxic potential of autophagy under ER stress conditions. *Autophagy* *10*, 1921-1936.
- Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gélinas, C., Fan, Y., *et al.* (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer cell* *10*, 51-64.

Del Bufalo, D., Biroccio, A., Leonetti, C., and Zupi, G. (1997). Bcl-2 overexpression enhances the metastatic potential of a human breast cancer line. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *11*, 947-953.

Del Gaizo Moore, V., Schlis, K.D., Sallan, S.E., Armstrong, S.A., and Letai, A. (2008). BCL-2 dependence and ABT-737 sensitivity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* *111*, 2300-2309.

Del Re, D.P., Matsuda, T., Zhai, P., Maejima, Y., Jain, M.R., Liu, T., Li, H., Hsu, C.P., and Sadoshima, J. (2014). Mst1 promotes cardiac myocyte apoptosis through phosphorylation and inhibition of Bcl-xL. *Molecular cell* *54*, 639-650.

Deng, J., Park, D., Wang, M., Nooka, A., Deng, Q., Matulis, S., Kaufman, J., Lonial, S., Boise, L.H., Galipeau, J., *et al.* (2016). BCL2-BH4 antagonist BDA-366 suppresses human myeloma growth. *Oncotarget* *7*, 27753-27763.

Deng, X., Ruvolo, P., Carr, B., and May, W.S. (2000). Survival function of ERK1/2 as IL-3-activated, staurosporine-resistant Bcl2 kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *97*, 1578-1583.

Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., Journot, L., Antonsson, B., and Martinou, J.-C. (2001). Phosphorylation of Bid by Casein Kinases I and II Regulates Its Cleavage by Caspase 8. *Molecular cell* *8*, 601-611.

Dewson, G., Kratina, T., Sim, H.W., Puthalakath, H., Adams, J.M., Colman, P.M., and Kluck, R.M. (2008). To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3:groove interactions. *Molecular cell* *30*, 369-380.

Dewson, G., Ma, S., Frederick, P., Hockings, C., Tan, I., Kratina, T., and Kluck, R.M. (2012). Bax dimerizes via a symmetric BH3:groove interface during apoptosis. *Cell death and differentiation* *19*, 661-670.

Dimmeler, S., Breitschopf, K., Haendeler, J., and Zeiher, A.M. (1999). Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J Exp Med* *189*, 1815-1822.

Ding, J., Zhang, Z., Roberts, G.J., Falcone, M., Miao, Y., Shao, Y., Zhang, X.C., Andrews, D.W., and Lin, J. (2010). Bcl-2 and Bax Interact via the BH1-3 Groove-BH3 Motif Interface and a Novel Interface Involving the BH4 Motif. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 28749-28763.

Ding, Q., He, X., Hsu, J.-M., Xia, W., Chen, C.-T., Li, L.-Y., Lee, D.-F., Liu, J.-C., Zhong, Q., Wang, X., *et al.* (2007). Degradation of Mcl-1 by β -TrCP Mediates Glycogen Synthase Kinase 3-Induced Tumor Suppression and Chemosensitization. *Molecular and cellular biology* *27*, 4006-4017.

Ding, Q., Huo, L., Yang, J.Y., Xia, W., Wei, Y., Liao, Y., Chang, C.J., Yang, Y., Lai, C.C., Lee, D.F., *et al.* (2008). Down-regulation of myeloid cell leukemia-1 through inhibiting Erk/Pin 1 pathway by sorafenib facilitates chemosensitization in breast cancer. *Cancer research* *68*, 6109-6117.

Ding, Q., Xie, X.-L., Wang, M.-M., Yin, J., Tian, J.-M., Jiang, X.-Y., Zhang, D., Han, J., Bai, Y., Cui, Z.-J., *et al.* (2019). The role of the apoptosis-related protein BCL-B in the regulation of mitophagy in hepatic stellate cells during the regression of liver fibrosis. *Experimental & Molecular Medicine* *51*, 1-13.

Doi, K., Li, R., Sung, S.S., Wu, H., Liu, Y., Manieri, W., Krishnegowda, G., Awwad, A., Dewey, A., Liu, X., *et al.* (2012). Discovery of marinopyrrole A (maritoclax) as a selective Mcl-1 antagonist that overcomes ABT-737 resistance by binding to and targeting Mcl-1 for proteasomal degradation. *The Journal of biological chemistry* 287, 10224-10235.

Domina, A.M., Vrana, J.A., Gregory, M.A., Hann, S.R., and Craig, R.W. (2004). MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene* 23, 5301-5315.

Dong, L., Jiang, C.C., Thorne, R.F., Croft, A., Yang, F., Liu, H., de Bock, C.E., Hersey, P., and Zhang, X.D. (2011). Ets-1 mediates upregulation of Mcl-1 downstream of XBP-1 in human melanoma cells upon ER stress. *Oncogene* 30, 3716-3726.

Donovan, N., Becker, E.B.E., Konishi, Y., and Bonni, A. (2002). JNK Phosphorylation and Activation of BAD Couples the Stress-activated Signaling Pathway to the Cell Death Machinery. *Journal of Biological Chemistry* 277, 40944-40949.

Downward, J. (1999). How BAD phosphorylation is good for survival. *Nature Cell Biology* 1, E33-E35.

Dumitru, R., Gama, V., Fagan, B.M., Bower, J.J., Swahari, V., Pevny, L.H., and Deshmukh, M. (2012). Human embryonic stem cells have constitutively active Bax at the Golgi and are primed to undergo rapid apoptosis. *Molecular cell* 46, 573-583.

Dumont, P., Leu, J.I.J., Della Pietra, A.C., George, D.L., and Murphy, M. (2003). The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nature Genetics* 33, 357-365.

Echeverry, N., Bachmann, D., Ke, F., Strasser, A., Simon, H.U., and Kaufmann, T. (2013). Intracellular localization of the BCL-2 family member BOK and functional implications. *Cell death and differentiation* 20, 785-799.

Eckenrode, E.F., Yang, J., Velmurugan, G.V., Foskett, J.K., and White, C. (2010). Apoptosis protection by Mcl-1 and Bcl-2 modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-dependent Ca²⁺ signaling. *The Journal of biological chemistry* 285, 13678-13684.

Edison, N., Curtz, Y., Paland, N., Mamriev, D., Chorubczyk, N., Haviv-Reingewertz, T., Kfir, N., Morgenstern, D., Kupervaser, M., Kagan, J., *et al.* (2017). Degradation of Bcl-2 by XIAP and ARTS Promotes Apoptosis. *Cell Reports* 21, 442-454.

Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., and Youle, R.J. (2011). Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 145, 104-116.

Edwards, A.L., Gavathiotis, E., LaBelle, J.L., Braun, C.R., Opoku-Nsiah, K.A., Bird, G.H., and Walensky, L.D. (2013). Multimodal interaction with BCL-2 family proteins underlies the proapoptotic activity of PUMA BH3. *Chemistry & biology* 20, 888-902.

Egle, A., Harris, A.W., Bouillet, P., and Cory, S. (2004). Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 6164-6169.

Elgendy, M., Ciro, M., Abdel-Aziz, A.K., Belmonte, G., Dal Zuffo, R., Mercurio, C., Miracco, C., Lanfrancone, L., Foiani, M., and Minucci, S. (2014). Bcl-1 restrains tumorigenesis through Mcl-1 destabilization in an autophagy-independent reciprocal manner. *Nature communications* 5, 5637.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35, 495-516.

Endo, M. (1981). Mechanism of calcium-induced calcium release in the SR membrane (Academic Press, New York).

Endo, M. (2009). Calcium-Induced Calcium Release in Skeletal Muscle. *Physiological reviews* 89, 1153-1176.

Fabiani, E., Fianchi, L., Falconi, G., Boncompagni, R., Criscuolo, M., Guidi, F., La Brocca, A., Hohaus, S., Leone, G., and Voso, M.T. (2014). The BCL2L10 Leu21Arg variant and risk of therapy-related myeloid neoplasms and de novo myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 55, 1538-1543.

Fabiani, E., Leone, G., Giachelia, M., D'Alo, F., Greco, M., Criscuolo, M., Guidi, F., Rutella, S., Hohaus, S., and Voso, M.T. (2010). Analysis of genome-wide methylation and gene expression induced by 5-aza-2'-deoxycytidine identifies BCL2L10 as a frequent methylation target in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 51, 2275-2284.

Fagerberg, L., Hallstrom, B.M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., Habuka, M., Tahmasebpour, S., Danielsson, A., Edlund, K., *et al.* (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 13, 397-406.

Fagone, P., and Jackowski, S. (2009). Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *Journal of lipid research* 50 Suppl, S311-316.

Fan, G., Baker, M.L., Wang, Z., Baker, M.R., Sinyagovskiy, P.A., Chiu, W., Ludtke, S.J., and Serysheva, I. (2015). Gating machinery of InsP3R channels revealed by electron cryomicroscopy. *Nature* 527, 336-341.

Fan, M., Goodwin, M., Vu, T., Brantley-Finley, C., Gaarde, W.A., and Chambers, T.C. (2000). Vinblastine-induced phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL is mediated by JNK and occurs in parallel with inactivation of the Raf-1/MEK/ERK cascade. *The Journal of biological chemistry* 275, 29980-29985.

Fang, X., Yu, S., Eder, A., Mao, M., Bast, R.C., Boyd, D., and Mills, G.B. (1999). Regulation of BAD phosphorylation at serine 112 by the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene* 18, 6635-6640.

Farrow, S.N., White, J.H.M., Martinou, I., Raven, T., Pun, K.-T., Grinham, C.J., Martinou, J.-C., and Brown, R. (1995). Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 374, 731-733.

Fernandez-Marrero, Y., Ke, F., Echeverry, N., Bouillet, P., Bachmann, D., Strasser, A., and Kaufmann, T. (2016). Is BOK required for apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, E492-E493.

Filomeni, G., De Zio, D., and Cecconi, F. (2015). Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell death and differentiation* 22, 377-388.

Finkel, T., Menazza, S., Holmstrom, K.M., Parks, R.J., Liu, J., Sun, J., Liu, J., Pan, X., and Murphy, E. (2015). The ins and outs of mitochondrial calcium. *Circulation research* 116, 1810-1819.

Foskett, J.K., White, C., Cheung, K.H., and Mak, D.O. (2007). Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels. *Physiological reviews* 87, 593-658.

Foufelle, F., and Fromenty, B. (2016). Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharmacology research & perspectives* 4, e00211.

Fouqué, A., Lepvrier, E., Debure, L., Gouriou, Y., Malleter, M., Delcroix, V., Ovize, M., Ducret, T., Li, C., Hammadi, M., *et al.* (2016). The apoptotic members CD95, Bcl_xL, and Bcl-2 cooperate to promote cell migration by inducing Ca²⁺ flux from the endoplasmic reticulum to mitochondria. *Cell Death & Differentiation* 23, 1702-1716.

Fox, J.L., Ismail, F., Azad, A., Ternette, N., Leverrier, S., Edelmann, M.J., Kessler, B.M., Leigh, I.M., Jackson, S., and Storey, A. (2010). Tyrosine dephosphorylation is required for Bak activation in apoptosis. *The EMBO journal* 29, 3853-3868.

Fujise, K., Zhang, D., Liu, J., and Yeh, E.T. (2000). Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *The Journal of biological chemistry* 275, 39458-39465.

Fulda, S., and Vucic, D. (2012). Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 11, 109-124.

Gabellini, C., Trisciuglio, D., and Del Bufalo, D. (2017). Non-canonical roles of Bcl-2 and Bcl-xL proteins: relevance of BH4 domain. *Carcinogenesis* 38, 579-587.

Galatin, P.S., Advani, R.H., Fisher, G.A., Francisco, B., Julian, T., Losa, R., Sierra, M.I., and Sikic, B.I. (2011). Phase I trial of oblimersen (Genasense(R)) and gemcitabine in refractory and advanced malignancies. *Investigational new drugs* 29, 971-977.

Gao, G., and Dou, Q.P. (2001). N-terminal cleavage of Bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes Bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J. Cell. Biochem.* 80, 53-72.

Gardai, S.J., Hildeman, D.A., Frankel, S.K., Whitlock, B.B., Frasch, S.C., Borregaard, N., Marrack, P., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (2004). Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *The Journal of biological chemistry* 279, 21085-21095.

Garenne, D., Renault, T.T., and Manon, S. (2016). Bax mitochondrial relocation is linked to its phosphorylation and its interaction with Bcl-xL. *Microbial cell (Graz, Austria)* 3, 597-605.

Garg, R., Benedetti, L.G., Abera, M.B., Wang, H., Abba, M., and Kazanietz, M.G. (2014). Protein kinase C and cancer: what we know and what we do not. *Oncogene* 33, 5225-5237.

Garofalo, M., Quintavalle, C., Zanca, C., De Rienzo, A., Romano, G., Acunzo, M., Puca, L., Incoronato, M., Croce, C.M., and Condorelli, G. (2008). Akt regulates drug-induced cell death through Bcl-w downregulation. *PLoS One* 3, e4070.

Garrison, S.P., Jeffers, J.R., Yang, C., Nilsson, J.A., Hall, M.A., Rehg, J.E., Yue, W., Yu, J., Zhang, L., Onciu, M., *et al.* (2008). Selection against PUMA gene expression in Myc-driven B-cell lymphomagenesis. *Molecular and cellular biology* 28, 5391-5402.

Gasca, J., Flores, M.L., Giraldez, S., Ruiz-Borrego, M., Tortolero, M., Romero, F., Japon, M.A., and Saez, C. (2016). Loss of FBXW7 and accumulation of MCL1 and PLK1 promote paclitaxel resistance in breast cancer. *Oncotarget* 7, 52751-52765.

Gavathiotis, E., Reyna, D.E., Bellairs, J.A., Leshchiner, E.S., and Walensky, L.D. (2012). Direct and selective small-molecule activation of proapoptotic BAX. *Nature chemical biology* 8, 639-645.

Gavathiotis, E., Reyna, D.E., Davis, M.L., Bird, G.H., and Walensky, L.D. (2010). BH3-triggered structural reorganization drives the activation of proapoptotic BAX. *Molecular cell* 40, 481-492.

Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M.L., Pitter, K., Bird, G.H., Katz, S.G., Tu, H.C., Kim, H., Cheng, E.H., Tjandra, N., *et al.* (2008). BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* 455, 1076-1081.

Giam, M., Okamoto, T., Mintern, J.D., Strasser, A., and Bouillet, P. (2012). Bcl-2 family member Bcl-G is not a proapoptotic protein. *Cell Death & Disease* 3, e404-e404.

Gibson, L., Holmgreen, S.P., Huang, D.C., Bernard, O., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sutherland, G.R., Baker, E., Adams, J.M., and Cory, S. (1996). bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* 13, 665-675.

Gillet, G., Guerin, M., Trembleau, A., and Brun, G. (1995). A Bcl-2-related gene is activated in avian cells transformed by the Rous sarcoma virus. *The EMBO journal* 14, 1372-1381.

Giorgio, V., von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., Glick, G.D., Petronilli, V., Zoratti, M., Szabó, I., *et al.* (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 5887-5892.

Glab, J.A., Mbogo, G.W., and Puthalakath, H. (2017). BH3-Only Proteins in Health and Disease. *International review of cell and molecular biology* 328, 163-196.

Glick, D., Barth, S., and Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology* 221, 3-12.

Gomez-Bougie, P., Halliez, M., Moreau, P., Pellat-Deceunynck, C., and Amiot, M. (2016). Repression of Mcl-1 and disruption of the Mcl-1/Bak interaction in myeloma cells couple ER stress to mitochondrial apoptosis. *Cancer letters* 383, 204-211.

Gong, Y., Schumacher, S.E., Wu, W.H., Tang, F., Beroukhi, R., and Chan, T.A. (2017). Pan-Cancer Analysis Links PARK2 to BCL-XL-Dependent Control of Apoptosis. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 19, 75-83.

Goy, A., Hernandez-Ilzaliturri, F.J., Kahl, B., Ford, P., Protomastro, E., and Berger, M. (2014). A phase I/II study of the pan Bcl-2 inhibitor obatoclax mesylate plus bortezomib for relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 55, 2761-2768.

Gross, A., and Katz, S.G. (2017). Non-apoptotic functions of BCL-2 family proteins. *Cell death and differentiation* 24, 1348-1358.

Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Korsmeyer, S.J. (1999). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *The Journal of biological chemistry* 274, 1156-1163.

Grottemeier, A., Alers, S., Pfisterer, S.G., Paasch, F., Daubrawa, M., Dieterle, A., Viollet, B., Wesselborg, S., Proikas-Cezanne, T., and Stork, B. (2010). AMPK-independent induction of autophagy by cytosolic Ca²⁺ increase. *Cellular signalling* 22, 914-925.

Guan, J.J., Zhang, X.D., Sun, W., Qi, L., Wu, J.C., and Qin, Z.H. (2015). DRAM1 regulates apoptosis through increasing protein levels and lysosomal localization of BAX. *Cell Death Dis* 6, e1624.

Guillemin, Y., Cornut-Thibaut, A., Gillet, G., Penin, F., and Aouacheria, A. (2011). Characterization of unique signature sequences in the divergent maternal protein Bcl2l10. *Molecular biology and evolution* 28, 3271-3283.

Guo, B., Godzik, A., and Reed, J.C. (2001). Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *The Journal of biological chemistry* 276, 2780-2785.

Guo, H., Tittle, T.V., Allen, H., and Maziarz, R.T. (1998). Brefeldin A-Mediated Apoptosis Requires the Activation of Caspases and Is Inhibited by Bcl-2. *Experimental Cell Research* 245, 57-68.

Guo, J.Y., Chen, H.Y., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A.M., Karsli-Uzunbas, G., Kamphorst, J.J., Chen, G., Lemons, J.M., Karantza, V., *et al.* (2011). Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes & development* 25, 460-470.

Guo, X., Meng, Y., Sheng, X., Guan, Y., Zhang, F., Han, Z., Kang, Y., Tai, G., Zhou, Y., and Cheng, H. (2017). Tunicamycin enhances human colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by JNK-CHOP-mediated DR5 upregulation and the inhibition of the EGFR pathway. *Anticancer Drugs* 28, 66-74.

Guo, Y., Sirkis, D.W., and Schekman, R. (2014). Protein sorting at the trans-Golgi network. *Annual review of cell and developmental biology* 30, 169-206.

Gupta, D., Kumar, M., Tyagi, P., Kapoor, S., Tyagi, A., Barman, T.K., Kharbanda, S., Kufe, D., and Singh, H. (2018). Concomitant Delivery of Paclitaxel and NuBCP-9 peptide for synergistic enhancement of cancer therapy. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 14, 1301-1313.

Gupta, S., Giricz, Z., Natoni, A., Donnelly, N., Deegan, S., Szegezdi, E., and Samali, A. (2012). NOXA contributes to the sensitivity of PERK-deficient cells to ER stress. *FEBS Lett.* 586, 4023-4030.

Hamouda, M.-A., Jacquel, A., Robert, G., Puissant, A., Richez, V., Cassel, R., Fenouille, N., Roulland, S., Gilleron, J., Griessinger, E., *et al.* (2016). BCL-B (BCL2L10) is overexpressed in patients suffering from multiple myeloma (MM) and drives an MM-like disease in transgenic mice. *The Journal of Experimental Medicine* 213, 1705-1722.

Han, B., Park, D., Li, R., Xie, M., Owonikoko, T.K., Zhang, G., Sica, G.L., Ding, C., Zhou, J., Magis, A.T., *et al.* (2015). Small-Molecule Bcl2 BH4 Antagonist for Lung Cancer Therapy. *Cancer cell* 27, 852-863.

Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E., and Reed, J.C. (1993). bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 82, 1820-1828.

Hanahan, D., and Weinberg, Robert A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646-674.

Hanna, R.A., Campbell, R.L., and Davies, P.L. (2008). Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature* 456, 409-412.

Happo, L., Cragg, M.S., Phipson, B., Haga, J.M., Jansen, E.S., Herold, M.J., Dewson, G., Michalak, E.M., Vandenberg, C.J., Smyth, G.K., *et al.* (2010). Maximal killing of lymphoma cells by DNA damage-inducing therapy requires not only the p53 targets Puma and Noxa, but also Bim. *Blood* 116, 5256-5267.

Harada, H., Andersen, J.S., Mann, M., Terada, N., and Korsmeyer, S.J. (2001). p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9666-9670.

Harada, H., Becknell, B., Wilm, M., Mann, M., Huang, L.J.-s., Taylor, S.S., Scott, J.D., and Korsmeyer, S.J. (1999). Phosphorylation and Inactivation of BAD by Mitochondria-Anchored Protein Kinase A. *Molecular cell* 3, 413-422.

Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular cell* 6, 1099-1108.

Harding, H.P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271-274.

Hart, L.S., Cunningham, J.T., Datta, T., Dey, S., Tameire, F., Lehman, S.L., Qiu, B., Zhang, H., Cerniglia, G., Bi, M., *et al.* (2012). ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. *J Clin Invest* 122, 4621-4634.

Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Molecular biology of the cell* 10, 3787-3799.

He, J., Deng, L., Liu, H., Chen, T., Chen, S., Xia, S., and Liu, Y. (2019). BCL2L10/BECN1 modulates hepatoma cells autophagy by regulating PI3K/AKT signaling pathway. *Aging* 11, 350-370.

Heist, R.S., Fain, J., Chinnasami, B., Khan, W., Molina, J.R., Sequist, L.V., Temel, J.S., Fidias, P., Brainerd, V., Leopold, L., *et al.* (2010). Phase I/II study of AT-101 with topotecan in relapsed and refractory small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 5, 1637-1643.

Hernandez-Segura, A., Nehme, J., and Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in cell biology* 28, 436-453.

Herold, M.J., Zeitz, J., Pelzer, C., Kraus, C., Peters, A., Wohlleben, G., and Berberich, I. (2006). The Stability and Anti-apoptotic Function of A1 Are Controlled by Its C Terminus. *Journal of Biological Chemistry* 281, 13663-13671.

Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry* 67, 425-479.

Hetz, C., Bernasconi, P., Fisher, J., Lee, A.H., Bassik, M.C., Antonsson, B., Brandt, G.S., Iwakoshi, N.N., Schinzl, A., Glimcher, L.H., *et al.* (2006). Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science (New York, N.Y.)* 312, 572-576.

Hiller, S., Garces, R.G., Malia, T.J., Orekhov, V.Y., Colombini, M., and Wagner, G. (2008). Solution Structure of the Integral Human Membrane Protein VDAC-1 in Detergent Micelles. *Science (New York, N.Y.)* *321*, 1206-1210.

Hird, A.W., Secrist, J.P., Adam, A., Belmonte, M.A., Gangl, E., Gibbons, F., Hargreaves, D., Johannes, J.W., Kazmirski, S.L., and Kettle, J.G. (2017). Abstract DDT01-02: AZD5991: A potent and selective macrocyclic inhibitor of Mcl-1 for treatment of hematologic cancers. (AACR).

Hockenbery, D., Nunez, G., Millman, C., Schreiber, R.D., and Korsmeyer, S.J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* *348*, 334-336.

Hollien, J., Lin, J.H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., and Weissman, J.S. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *The Journal of cell biology* *186*, 323-331.

Hollien, J., and Weissman, J.S. (2006). Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science (New York, N.Y.)* *313*, 104-107.

Holloway, A., Simmonds, M., Azad, A., Fox, J.L., and Storey, A. (2015). Resistance to UV-induced apoptosis by beta-HPV5 E6 involves targeting of activated BAK for proteolysis by recruitment of the HERC1 ubiquitin ligase. *International journal of cancer* *136*, 2831-2843.

Hosoi, K.I., Miyata, N., Mukai, S., Furuki, S., Okumoto, K., Cheng, E.H., and Fujiki, Y. (2017). The VDAC2-BAK axis regulates peroxisomal membrane permeability. *The Journal of cell biology* *216*, 709-722.

Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Fehrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R., *et al.* (2007). Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Molecular cell* *25*, 193-205.

Hsu, S.Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., and Hsueh, A.J. (1997). Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 12401-12406.

Hu, H., Tian, M., Ding, C., and Yu, S. (2018). The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection. *Frontiers in immunology* *9*, 3083.

Huang, D.C., Adams, J.M., and Cory, S. (1998). The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *The EMBO journal* *17*, 1029-1039.

Huang, D.C., O'Reilly, L.A., Strasser, A., and Cory, S. (1997). The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *The EMBO journal* *16*, 4628-4638.

Huang, H., Hu, X., Eno, C.O., Zhao, G., Li, C., and White, C. (2013). An interaction between Bcl-xL and the voltage-dependent anion channel (VDAC) promotes mitochondrial Ca²⁺ uptake. *The Journal of biological chemistry* *288*, 19870-19881.

Huang, H., Shah, K., Bradbury, N.A., Li, C., and White, C. (2014). Mcl-1 promotes lung cancer cell migration by directly interacting with VDAC to increase mitochondrial Ca²⁺ uptake and reactive oxygen species generation. *Cell Death Dis* *5*, e1482.

Huang, K., O'Neill, K.L., Li, J., Zhou, W., Han, N., Pang, X., Wu, W., Struble, L., Borgstahl, G., Liu, Z., *et al.* (2019). BH3-only proteins target BCL-xL/MCL-1, not BAX/BAK, to initiate apoptosis. *Cell Research* 29, 942-952.

Hubner, A., Barrett, T., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2008). Multisite phosphorylation regulates Bim stability and apoptotic activity. *Molecular cell* 30, 415-425.

Hymowitz, S.G., Christinger, H.W., Fuh, G., Ultsch, M., O'Connell, M., Kelley, R.F., Ashkenazi, A., and de Vos, A.M. (1999). Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Molecular cell* 4, 563-571.

Inohara, N., Ding, L., Chen, S., and Nunez, G. (1997). harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *The EMBO journal* 16, 1686-1694.

Inohara, N., Gourley, T.S., Carrio, R., Muniz, M., Merino, J., Garcia, I., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S., and Nunez, G. (1998). Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death. *The Journal of biological chemistry* 273, 32479-32486.

Inuzuka, H., Shaik, S., Onoyama, I., Gao, D., Tseng, A., Maser, R.S., Zhai, B., Wan, L., Gutierrez, A., Lau, A.W., *et al.* (2011). SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature* 471, 104-109.

Ito, T., Deng, X., Carr, B., and May, W.S. (1997). Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *The Journal of biological chemistry* 272, 11671-11673.

Iwai, M., Michikawa, T., Bosanac, I., Ikura, M., and Mikoshiba, K. (2007). Molecular basis of the isoform-specific ligand-binding affinity of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *The Journal of biological chemistry* 282, 12755-12764.

Iwawaki, T., Akai, R., Yamanaka, S., and Kohno, K. (2009). Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 16657-16662.

Jeffers, J.R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., MacLean, K.H., Han, J., Chittenden, T., Ihle, J.N., *et al.* (2003). Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer cell* 4, 321-328.

Jiwen Zou, R.A., Anthony B. Pinkerton, Eduard Sergienko, Ying Su, Derek Stonich, Ramona F. Curpan, Peter C. Simons, Dayong Zhai, Paul Diaz, Susan M. Young, Mark B. Carter, G. Cristian Bologa, Tudor I. Oprea, Bruce S. Edwards, Arnold C. Satterthwait, Arianna Mangravita-Novo, Michael Vicchiarelli, Danielle McAnally, Layton H. Smith, Jena Diwan, Thomas D.Y. Chung, John C. Reed, and Larry A. Sklar. (2011). Selective Bcl-2 Inhibitor Probes. In NIH Molecular Libraries Program (National Center for Biotechnology Information).

Johnson, B.N., Berger, A.K., Cortese, G.P., and Lavoie, M.J. (2012). The ubiquitin E3 ligase parkin regulates the proapoptotic function of Bax. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 6283-6288.

Julien, O., and Wells, J.A. (2017). Caspases and their substrates. *Cell death and differentiation* 24, 1380-1389.

Jung, T., and Grune, T. (2008). The proteasome and its role in the degradation of oxidized proteins. *IUBMB Life* 60, 743-752.

Kajihara, R., Sakamoto, H., Tanabe, K., Takemoto, K., Tasaki, M., Ando, Y., and Inui, S. (2014). Protein phosphatase 6 controls BCR-induced apoptosis of WEHI-231 cells by regulating ubiquitination of Bcl-xL. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 192, 5720-5729.

Kale, J., Kutuk, O., Brito, G.C., Andrews, T.S., Leber, B., Letai, A., and Andrews, D.W. (2018). Phosphorylation switches Bax from promoting to inhibiting apoptosis thereby increasing drug resistance. *EMBO reports* 19.

Kataoka, T., Holler, N., Micheau, O., Martinon, F., Tinel, A., Hofmann, K., and Tschopp, J. (2001). Bcl-rambo, a novel Bcl-2 homologue that induces apoptosis via its unique C-terminal extension. *The Journal of biological chemistry* 276, 19548-19554.

Katz, S.G., Fisher, J.K., Correll, M., Bronson, R.T., Ligon, K.L., and Walensky, L.D. (2013). Brain and testicular tumors in mice with progenitor cells lacking BAX and BAK. *Oncogene* 32, 4078-4085.

Ke, F., Voss, A., Kerr, J.B., O'Reilly, L.A., Tai, L., Echeverry, N., Bouillet, P., Strasser, A., and Kaufmann, T. (2012). BCL-2 family member BOK is widely expressed but its loss has only minimal impact in mice. *Cell death and differentiation* 19, 915-925.

Kerkhofs, M., Vervloessem, T., Bittremieux, M., and Bultynck, G. (2019). Recent advances in uncovering the mechanisms contributing to BIRD-2-induced cell death in B-cell cancer cells. *Cell Death & Disease* 10, 42.

Kerkhofs, M., Vervloessem, T., Stopa, K.B., Smith, V.M., Vogler, M., and Bultynck, G. (2020). DLBCL Cells with Acquired Resistance to Venetoclax Are Not Sensitized to BIRD-2 But Can Be Resensitized to Venetoclax through Bcl-XL Inhibition. *Biomolecules* 10.

Khan, S., Zhang, X., Lv, D., Zhang, Q., He, Y., Zhang, P., Liu, X., Thummuri, D., Yuan, Y., Wiegand, J.S., *et al.* (2019). A selective BCL-XL PROTAC degrader achieves safe and potent antitumor activity. *Nature Medicine* 25, 1938-1947.

Kharbanda, S., Saxena, S., Yoshida, K., Pandey, P., Kaneki, M., Wang, Q., Cheng, K., Chen, Y.N., Campbell, A., Sudha, T., *et al.* (2000). Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry* 275, 322-327.

Khorchid, A., and Ikura, M. (2002). How calpain is activated by calcium. *Nature Structural Biology* 9, 239-241.

Kim, B.J., Ryu, S.W., and Song, B.J. (2006). JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *The Journal of biological chemistry* 281, 21256-21265.

Kim, H., Tu, H.C., Ren, D., Takeuchi, O., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J., and Cheng, E.H. (2009). Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Molecular cell* 36, 487-499.

Kipps, T.J., Eradat, H., Grosicki, S., Catalano, J., Cosolo, W., Dyagil, I.S., Yalamanchili, S., Chai, A., Sahasranaman, S., Punnoose, E., *et al.* (2015). A phase 2 study of the BH3 mimetic BCL2 inhibitor navitoclax (ABT-263) with or without rituximab, in previously untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 56, 2826-2833.

Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal* *14*, 5579-5588.

Kitada, S., Leone, M., Sareth, S., Zhai, D., Reed, J.C., and Pellecchia, M. (2003). Discovery, Characterization, and Structure–Activity Relationships Studies of Proapoptotic Polyphenols Targeting B-Cell Lymphocyte/Leukemia-2 Proteins. *J. Med. Chem.* *46*, 4259-4264.

Klausner, R.D., Donaldson, J.G., and Lippincott-Schwartz, J. (1992). Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *The Journal of cell biology* *116*, 1071-1080.

Kloetzel, P.M., and Ossendorp, F. (2004). Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Current opinion in immunology* *16*, 76-81.

Knudson, C.M., Tung, K.S., Tourtellotte, W.G., Brown, G.A., and Korsmeyer, S.J. (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science (New York, N.Y.)* *270*, 96-99.

Kobayashi, S., Lee, S.H., Meng, X.W., Mott, J.L., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Craig, R.W., Kaufmann, S.H., and Gores, G.J. (2007). Serine 64 phosphorylation enhances the antiapoptotic function of Mcl-1. *The Journal of biological chemistry* *282*, 18407-18417.

Komander, D., and Rape, M. (2012). The Ubiquitin Code. *Annual review of biochemistry* *81*, 203-229.

Konopleva, M., Contractor, R., Tsao, T., Samudio, I., Ruvolo, P.P., Kitada, S., Deng, X., Zhai, D., Shi, Y.X., Sneed, T., *et al.* (2006). Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer cell* *10*, 375-388.

Konopleva, M., Pollyea, D.A., Potluri, J., Chyla, B., Hogdal, L., Busman, T., McKeegan, E., Salem, A.H., Zhu, M., Ricker, J.L., *et al.* (2016). Efficacy and Biological Correlates of Response in a Phase II Study of Venetoclax Monotherapy in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer discovery* *6*, 1106-1117.

Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A.L., Le Toumelin-Braizat, G., Chanrion, M., Kelly, G.L., Gong, J.N., Moujalled, D.M., *et al.* (2016). The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature* *538*, 477-482.

Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P., and Craig, R.W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 3516-3520.

Krajewska, M., Kitada, S., Winter, J.N., Variakojis, D., Lichtenstein, A., Zhai, D., Cuddy, M., Huang, X., Luciano, F., Baker, C.H., *et al.* (2008). Bcl-B expression in human epithelial and nonepithelial malignancies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *14*, 3011-3021.

Kumar, M., Gupta, D., Singh, G., Sharma, S., Bhat, M., Prashant, C.K., Dinda, A.K., Kharbanda, S., Kufe, D., and Singh, H. (2014). Novel polymeric nanoparticles for intracellular delivery of peptide Cargos: antitumor efficacy of the BCL-2 conversion peptide NuBCP-9. *Cancer research* *74*, 3271-3281.

Kuo, T.H., Kim, H.R., Zhu, L., Yu, Y., Lin, H.M., and Tsang, W. (1998). Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump by Bcl-2. *Oncogene* *17*, 1903-1910.

LaBelle, J.L., Katz, S.G., Bird, G.H., Gavathiotis, E., Stewart, M.L., Lawrence, C., Fisher, J.K., Godes, M., Pitter, K., Kung, A.L., *et al.* (2012). A stapled BIM peptide overcomes apoptotic resistance in hematologic cancers. *J Clin Invest* 122, 2018-2031.

Labi, V., Erlacher, M., Kiessling, S., and Villunger, A. (2006). BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy. *Cell death and differentiation* 13, 1325-1338.

Labi, V., Woess, C., Tuzlak, S., Erlacher, M., Bouillet, P., Strasser, A., Tzankov, A., and Villunger, A. (2014). Deregulated cell death and lymphocyte homeostasis cause premature lethality in mice lacking the BH3-only proteins Bim and Bmf. *Blood* 123, 2652-2662.

Lavik, A.R., Zhong, F., Chang, M.J., Greenberg, E., Choudhary, Y., Smith, M.R., McColl, K.S., Pink, J., Reu, F.J., Matsuyama, S., *et al.* (2015). A synthetic peptide targeting the BH4 domain of Bcl-2 induces apoptosis in multiple myeloma and follicular lymphoma cells alone or in combination with agents targeting the BH3-binding pocket of Bcl-2. *Oncotarget* 6, 27388-27402.

Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., and Glimcher, L.H. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Molecular and cellular biology* 23, 7448-7459.

Lee, I.H., Kang, K., Kang, B.W., Lee, S.J., Bae, W.K., Hwang, J.E., Kim, H.J., Park, S.Y., Park, J.S., Choi, G.S., *et al.* (2018). Genetic variations using whole-exome sequencing might predict response for neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 35, 145.

Lee, L.C., Hunter, J.J., Mujeeb, A., Turck, C., and Parslow, T.G. (1996). Evidence for α -Helical Conformation of an Essential N-terminal Region in the Human Bcl2 Protein. *Journal of Biological Chemistry* 271, 23284-23288.

Lee, S.Y., Kim, E.Y., Kim, K.H., and Lee, K.A. (2016). Bcl2l10, a new Tpx2 binding partner, is a master regulator of Aurora kinase A in mouse oocytes. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 15, 3296-3305.

Lemasters, J.J., Theruvath, T.P., Zhong, Z., and Nieminen, A.L. (2009). Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochimica et biophysica acta* 1787, 1395-1401.

Leshchiner, E.S., Braun, C.R., Bird, G.H., and Walensky, L.D. (2013). Direct activation of full-length proapoptotic BAK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E986-995.

Lessene, G., Czabotar, P.E., Sleebs, B.E., Zobel, K., Lowes, K.N., Adams, J.M., Baell, J.B., Colman, P.M., Deshayes, K., Fairbrother, W.J., *et al.* (2013). Structure-guided design of a selective BCL-X(L) inhibitor. *Nature chemical biology* 9, 390-397.

Leverson, J.D., Zhang, H., Chen, J., Tahir, S.K., Phillips, D.C., Xue, J., Nimmer, P., Jin, S., Smith, M., Xiao, Y., *et al.* (2015). Potent and selective small-molecule MCL-1 inhibitors demonstrate on-target cancer cell killing activity as single agents and in combination with ABT-263 (navitoclax). *Cell Death Dis* 6, e1590.

Ley, R., Ewings, K.E., Hadfield, K., and Cook, S.J. (2005). Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell death and differentiation* 12, 1008-1014.

Li, C., Wang, X., Vais, H., Thompson, C.B., Foskett, J.K., and White, C. (2007). Apoptosis regulation by Bcl-x_L modulation of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel isoform gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *104*, 12565-12570.

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* *94*, 491-501.

Li, J., Lee, B., and Lee, A.S. (2006). Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *The Journal of biological chemistry* *281*, 7260-7270.

Li, R., Ding, C., Zhang, J., Xie, M., Park, D., Ding, Y., Chen, G., Zhang, G., Gilbert-Ross, M., Zhou, W., *et al.* (2017). Modulation of Bax and mTOR for Cancer Therapeutics. *Cancer research* *77*, 3001.

Li, T., Su, L., Lei, Y., Liu, X., Zhang, Y., and Liu, X. (2015). DDIT3 and KAT2A Proteins Regulate TNFRSF10A and TNFRSF10B Expression in Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Apoptosis in Human Lung Cancer Cells. *The Journal of biological chemistry* *290*, 11108-11118.

Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* *402*, 672-676.

Lin, B., Kolluri, S.K., Lin, F., Liu, W., Han, Y.H., Cao, X., Dawson, M.I., Reed, J.C., and Zhang, X.K. (2004). Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* *116*, 527-540.

Lin, E.Y., Orlofsky, A., Berger, M.S., and Prystowsky, M.B. (1993). Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* *151*, 1979-1988.

Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., *et al.* (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Molecular cell* *6*, 1389-1399.

Linette, G.P., Li, Y., Roth, K., and Korsmeyer, S.J. (1996). Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 9545-9552.

Linseman, D.A., Butts, B.D., Precht, T.A., Phelps, R.A., Le, S.S., Laessig, T.A., Bouchard, R.J., Florez-McClure, M.L., and Heidenreich, K.A. (2004). Glycogen Synthase Kinase-3 β Phosphorylates Bax and Promotes Its Mitochondrial Localization during Neuronal Apoptosis. *The Journal of Neuroscience* *24*, 9993-10002.

Lionnard, L., Duc, P., Brennan, M.S., Kueh, A.J., Pal, M., Guardia, F., Mojsa, B., Damiano, M.A., Mora, S., Lassot, I., *et al.* (2019). TRIM17 and TRIM28 antagonistically regulate the ubiquitination and anti-apoptotic activity of BCL2A1. *Cell death and differentiation* *26*, 902-917.

Liu, M., Jiang, L., Fu, X., Wang, W., Ma, J., Tian, T., Nan, K., and Liang, X. (2018). Cytoplasmic liver kinase B1 promotes the growth of human lung adenocarcinoma by enhancing autophagy. *Cancer science* *109*, 3055-3067.

Liu, Z., Ding, Y., Ye, N., Wild, C., Chen, H., and Zhou, J. (2016a). Direct Activation of Bax Protein for Cancer Therapy. *Medicinal research reviews* *36*, 313-341.

Liu, Z., Wild, C., Ding, Y., Ye, N., Chen, H., Wold, E.A., and Zhou, J. (2016b). BH4 domain of Bcl-2 as a novel target for cancer therapy. *Drug discovery today* 21, 989-996.

Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L.L., Dillon, C.P., and Green, D.R. (2011). A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Molecular cell* 44, 517-531.

Llambi, F., Wang, Y.M., Victor, B., Yang, M., Schneider, D.M., Gingras, S., Parsons, M.J., Zheng, J.H., Brown, S.A., Pelletier, S., *et al.* (2016). BOK Is a Non-canonical BCL-2 Family Effector of Apoptosis Regulated by ER-Associated Degradation. *Cell* 165, 421-433.

Lochmann, T.L., Floros, K.V., Naseri, M., Powell, K.M., Cook, W., March, R.J., Stein, G.T., Greninger, P., Maves, Y.K., Saunders, L.R., *et al.* (2018). Venetoclax Is Effective in Small-Cell Lung Cancers with High BCL-2 Expression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 24, 360-369.

Lock, R., Kenific, C.M., Leidal, A.M., Salas, E., and Debnath, J. (2014). Autophagy-dependent production of secreted factors facilitates oncogenic RAS-driven invasion. *Cancer discovery* 4, 466-479.

Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.

Lok, S.W., Whittle, J.R., Vaillant, F., Teh, C.E., Lo, L.L., Policheni, A.N., Bergin, A.R.T., Desai, J., Ftouni, S., Gandolfo, L.C., *et al.* (2019). A Phase Ib Dose-Escalation and Expansion Study of the BCL2 Inhibitor Venetoclax Combined with Tamoxifen in ER and BCL2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Cancer discovery* 9, 354-369.

Lopez, J., Hesling, C., Prudent, J., Popgeorgiev, N., Gadet, R., Mikaelian, I., Rimokh, R., Gillet, G., and Gonzalo, P. (2012). Src tyrosine kinase inhibits apoptosis through the Erk1/2- dependent degradation of the death accelerator Bik. *Cell death and differentiation* 19, 1459-1469.

Lowman, X.H., McDonnell, M.A., Kosloske, A., Odumade, O.A., Jenness, C., Karim, C.B., Jemmerson, R., and Kelekar, A. (2010). The proapoptotic function of Noxa in human leukemia cells is regulated by the kinase Cdk5 and by glucose. *Molecular cell* 40, 823-833.

Lu, D.Y., Lu, T.R., Xu, B., and Ding, J. (2015). Pharmacogenetics of cancer therapy: breakthroughs from beyond? *Future science OA* 1, Fso80.

Lu, G., Middleton, R.E., Sun, H., Naniong, M., Ott, C.J., Mitsiades, C.S., Wong, K.-K., Bradner, J.E., and Kaelin, W.G. (2014a). The Myeloma Drug Lenalidomide Promotes the Cereblon-Dependent Destruction of Ikaros Proteins. *Science (New York, N.Y.)* 343, 305-309.

Lu, M., Lawrence, D.A., Marsters, S., Acosta-Alvear, D., Kimmig, P., Mendez, A.S., Paton, A.W., Paton, J.C., Walter, P., and Ashkenazi, A. (2014b). Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. *Science (New York, N.Y.)* 345, 98-101.

Luciano, F., Jacquelin, A., Colosetti, P., Herrant, M., Cagnol, S., Pages, G., and Auberger, P. (2003). Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene* 22, 6785-6793.

Luciano, F., Krajewska, M., Ortiz-Rubio, P., Krajewski, S., Zhai, D., Faustin, B., Bruey, J.M., Bailly-Maitre, B., Lichtenstein, A., Kolluri, S.K., *et al.* (2007). Nur77 converts phenotype of Bcl-B, an antiapoptotic protein expressed in plasma cells and myeloma. *Blood* *109*, 3849-3855.

Luo, S., Mao, C., Lee, B., and Lee, A.S. (2006). GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Molecular and cellular biology* *26*, 5688-5697.

Luo, X., He, Q., Huang, Y., and Sheikh, M.S. (2005). Transcriptional upregulation of PUMA modulates endoplasmic reticulum calcium pool depletion-induced apoptosis via Bax activation. *Cell Death & Differentiation* *12*, 1310-1318.

Luthi, A.U., and Martin, S.J. (2007). The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell death and differentiation* *14*, 641-650.

MacVicar, G., Kuzel, T., Curti, B., Poiesz, B., Somer, B., Greco, F., Gressler, V., Brill, K., and Leopold, L. (2008). An open-label, multicenter, phase I/II study of AT-101 in combination with docetaxel (D) and prednisone (P) in men with hormone refractory prostate cancer (HRPC). *Journal of Clinical Oncology* *26*, 16043-16043.

Madden, E., Logue, S.E., Healy, S.J., Manie, S., and Samali, A. (2019). The role of the unfolded protein response in cancer progression: From oncogenesis to chemoresistance. *Biology of the cell* *111*, 1-17.

Maeda, N., Kawasaki, T., Nakade, S., Yokota, N., Taguchi, T., Kasai, M., and Mikoshiba, K. (1991). Structural and functional characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel from mouse cerebellum. *Journal of Biological Chemistry* *266*, 1109-1116.

Magiera, M.M., Mora, S., Mojsa, B., Robbins, I., Lassot, I., and Desagher, S. (2013). Trim17-mediated ubiquitination and degradation of Mcl-1 initiate apoptosis in neurons. *Cell death and differentiation* *20*, 281-292.

Malia, T.J., and Wagner, G. (2007). NMR structural investigation of the mitochondrial outer membrane protein VDAC and its interaction with antiapoptotic Bcl-xL. *Biochemistry* *46*, 514-525.

Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., and Ron, D. (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes & development* *18*, 3066-3077.

Markwardt, M.L., Kremers, G.J., Kraft, C.A., Ray, K., Cranfill, P.J., Wilson, K.A., Day, R.N., Wachter, R.M., Davidson, M.W., and Rizzo, M.A. (2011). An improved cerulean fluorescent protein with enhanced brightness and reduced reversible photoswitching. *PLoS One* *6*, e17896.

Martin, G.S. (2001). The hunting of the Src. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2*, 467-475.

Martinon, F., and Tschopp, J. (2004). Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* *117*, 561-574.

Mason, K.D., Lin, A., Robb, L., Josefsson, E.C., Henley, K.J., Gray, D.H., Kile, B.T., Roberts, A.W., Strasser, A., Huang, D.C., *et al.* (2013). Proapoptotic Bak and Bax guard against fatal systemic and organ-specific autoimmune disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 2599-2604.

Matapurkar, A., and Lazebnik, Y. (2006). Requirement of cytochrome c for apoptosis in human cells. *Cell death and differentiation* 13, 2062-2067.

Maucuer, A., Desforges, B., Joshi, V., Boca, M., Kretov, D.A., Hamon, L., Bouhss, A., Curmi, P.A., and Pastré, D. (2018). Microtubules as platforms for probing liquid–liquid phase separation in cells – application to RNA-binding proteins. *Journal of cell science* 131, jcs214692.

Maupin-Furlow, J.A., Humbard, M.A., Kirkland, P.A., Li, W., Reuter, C.J., Wright, A.J., and Zhou, G. (2006). Proteasomes from structure to function: perspectives from Archaea. *Current topics in developmental biology* 75, 125-169.

Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A.S., Dejardin, E., and Green, D.R. (2006). Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Molecular cell* 21, 749-760.

Maxfield, K.E., Taus, P.J., Corcoran, K., Wooten, J., Macion, J., Zhou, Y., Borromeo, M., Kollipara, R.K., Yan, J., Xie, Y., *et al.* (2015). Comprehensive functional characterization of cancer-testis antigens defines obligate participation in multiple hallmarks of cancer. *Nature communications* 6, 8840.

May, W.S., Tyler, P.G., Ito, T., Armstrong, D.K., Qatsha, K.A., and Davidson, N.E. (1994). Interleukin-3 and bryostatin-1 mediate hyperphosphorylation of BCL2 alpha in association with suppression of apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 269, 26865-26870.

McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.-O., Aw, T.-Y., and Holbrook, N.J. (2001). Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and Perturbing the Cellular Redox State. *Molecular and cellular biology* 21, 1249-1259.

McIlwain, D.R., Berger, T., and Mak, T.W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5, a008656.

Megyesi, J., Tarcsafalvi, A., Seng, N., Hodeify, R., and Price, P.M. (2016). Cdk2 phosphorylation of Bcl-xL after stress converts it to a pro-apoptotic protein mimicking Bax/Bak. *Cell death discovery* 2, 15066.

Meldolesi, J., and Pozzan, T. (1998). The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends in biochemical sciences* 23, 10-14.

Meloche, S., and Pouyssegur, J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26, 3227-3239.

Mikata, R., Fukai, K., Imazeki, F., Arai, M., Fujiwara, K., Yonemitsu, Y., Zhang, K., Nabeya, Y., Ochiai, T., and Yokosuka, O. (2010). BCL2L10 is frequently silenced by promoter hypermethylation in gastric cancer. *Oncol Rep* 23, 1701-1708.

Mikata, R., Yokosuka, O., Fukai, K., Imazeki, F., Arai, M., Tada, M., Kurihara, T., Zhang, K., Kanda, T., and Saisho, H. (2006). Analysis of genes upregulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine in gastric cancer cell lines. *International journal of cancer* 119, 1616-1622.

Miyawaki, A., Furuichi, T., Maeda, N., and Mikoshiba, K. (1990). Expressed cerebellar-type inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, P₄₀₀, has calcium release activity in a fibroblast L cell line. *Neuron* 5, 11-18.

Mizuguchi, M., Sohma, O., Takashima, S., Ikeda, K., Yamada, M., Shiraiwa, N., and Ohta, S. (1996). Immunochemical and immunohistochemical localization of Bcl-x protein in the rat central nervous system. *Brain research* 712, 281-286.

Mohammad, R.M., Goustin, A.S., Aboukameel, A., Chen, B., Banerjee, S., Wang, G., Nikolovska-Coleska, Z., Wang, S., and Al-Katib, A. (2007). Preclinical studies of TW-37, a new nonpeptidic small-molecule inhibitor of Bcl-2, in diffuse large cell lymphoma xenograft model reveal drug action on both Bcl-2 and Mcl-1. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 2226-2235.

Monaco, G., Decrock, E., Akl, H., Ponsaerts, R., Vervliet, T., Luyten, T., De Maeyer, M., Missiaen, L., Distelhorst, C.W., De Smedt, H., *et al.* (2012). Selective regulation of IP3-receptor-mediated Ca²⁺ signaling and apoptosis by the BH4 domain of Bcl-2 versus Bcl-XL. *Cell death and differentiation* 19, 295-309.

Monaco, G., Decrock, E., Arbel, N., van Vliet, A.R., La Rovere, R.M., De Smedt, H., Parys, J.B., Agostinis, P., Leybaert, L., Shoshan-Barmatz, V., *et al.* (2015). The BH4 domain of anti-apoptotic Bcl-XL, but not that of the related Bcl-2, limits the voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1)-mediated transfer of pro-apoptotic Ca²⁺ signals to mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 290, 9150-9161.

Monkawa, T., Miyawaki, A., Sugiyama, T., Yoneshima, H., Yamamoto-Hino, M., Furuichi, T., Saruta, T., Hasegawa, M., and Mikoshiba, K. (1995). Heterotetrameric complex formation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subunits. *The Journal of biological chemistry* 270, 14700-14704.

Morrish, E., Brumatti, G., and Silke, J. (2020). Future Therapeutic Directions for Smac-Mimetics. *Cells* 9.

Motoyama, N., Wang, F., Roth, K.A., Sawa, H., Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., Fujii, S., *et al.* (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science (New York, N.Y.)* 267, 1506-1510.

Mott, J.L., Kobayashi, S., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (2007). mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* 26, 6133-6140.

Muppidi, A., Doi, K., Edwardraja, S., Drake, E.J., Gulick, A.M., Wang, H.G., and Lin, Q. (2012). Rational design of proteolytically stable, cell-permeable peptide-based selective Mcl-1 inhibitors. *Journal of the American Chemical Society* 134, 14734-14737.

Muppidi, A., Doi, K., Ramil, C.P., Wang, H.G., and Lin, Q. (2014). Synthesis of cell-permeable stapled BH3 peptide-based Mcl-1 inhibitors containing simple aryl and vinylaryl cross-linkers. *Tetrahedron* 70, 7740-7745.

Nakagawa, T., Okano, H., Furuichi, T., Aruga, J., and Mikoshiba, K. (1991). The subtypes of the mouse inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are expressed in a tissue-specific and developmentally specific manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 6244-6248.

Nakagawa, T., and Yuan, J. (2000). Cross-Talk between Two Cysteine Protease Families: Activation of Caspase-12 by Calpain in Apoptosis. *Journal of Cell Biology* 150, 887-894.

Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular cell* 7, 683-694.

Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Kuida, K., Shinkai, Y., Louie, M.C., Fields, L.E., Lucas, P.J., Stewart, V., Alt, F.W., *et al.* (1993). Disappearance of the lymphoid system in Bcl-2 homozygous mutant chimeric mice. *Science (New York, N.Y.)* *261*, 1584-1588.

Ng, K.P., Hillmer, A.M., Chuah, C.T., Juan, W.C., Ko, T.K., Teo, A.S., Ariyaratne, P.N., Takahashi, N., Sawada, K., Fei, Y., *et al.* (2012). A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med* *18*, 521-528.

Nguyen, M., Cencic, R., Ertel, F., Bernier, C., Pelletier, J., Roulston, A., Silvius, J.R., and Shore, G.C. (2015). Obatoclox is a direct and potent antagonist of membrane-restricted Mcl-1 and is synthetic lethal with treatment that induces Bim. *BMC Cancer* *15*, 568.

Nguyen, M., Marcellus, R.C., Roulston, A., Watson, M., Serfass, L., Murthy Madiraju, S.R., Goulet, D., Viallet, J., Belec, L., Billot, X., *et al.* (2007). Small molecule obatoclox (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 19512-19517.

Nilius, B., and Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome biology* *12*, 218.

Nougarede, A., Popgeorgiev, N., Kassem, L., Omarjee, S., Borel, S., Mikaelian, I., Lopez, J., Gadet, R., Marcillat, O., Treilleux, I., *et al.* (2018). Breast Cancer Targeting through Inhibition of the Endoplasmic Reticulum-Based Apoptosis Regulator Nrh/BCL2L10. *Cancer research* *78*, 1404-1417.

Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., and Ron, D. (2001). Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *The Journal of cell biology* *153*, 1011-1022.

Nutt, L.K., Pataer, A., Pahler, J., Fang, B., Roth, J., McConkey, D.J., and Swisher, S.G. (2002). Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca²⁺ stores. *The Journal of biological chemistry* *277*, 9219-9225.

O'Brien, S., Moore, J.O., Boyd, T.E., Larratt, L.M., Skotnicki, A.B., Koziner, B., Chanan-Khan, A.A., Seymour, J.F., Gribben, J., Itri, L.M., *et al.* (2009). 5-year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *27*, 5208-5212.

O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L.A., Hausmann, G., Adams, J.M., Cory, S., and Huang, D.C. (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *The EMBO journal* *17*, 384-395.

O'Reilly, L.A., Huang, D.C., and Strasser, A. (1996). The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *The EMBO journal* *15*, 6979-6990.

O'Reilly, L.A., Print, C., Hausmann, G., Moriishi, K., Cory, S., Huang, D.C., and Strasser, A. (2001). Tissue expression and subcellular localization of the pro-survival molecule Bcl-w. *Cell death and differentiation* *8*, 486-494.

Oakes, S.R., Vaillant, F., Lim, E., Lee, L., Breslin, K., Feleppa, F., Deb, S., Ritchie, M.E., Takano, E., and Ward, T. (2012). Sensitization of BCL-2-expressing breast tumors to chemotherapy by the BH3 mimetic ABT-737. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, 2766-2771.

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science (New York, N.Y.)* *288*, 1053-1058.

Ojala, P.M., Yamamoto, K., Castanos-Velez, E., Biberfeld, P., Korsmeyer, S.J., and Makela, T.P. (2000). The apoptotic v-cyclin-CDK6 complex phosphorylates and inactivates Bcl-2. *Nat Cell Biol* *2*, 819-825.

Oltersdorf, T., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Armstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B.A., Bruncko, M., Deckwerth, T.L., Dinges, J., Hajduk, P.J., *et al.* (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* *435*, 677-681.

Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* *74*, 609-619.

Onyeagucha, B., Subbarayalu, P., Abdelfattah, N., Rajamanickam, S., Timilsina, S., Guzman, R., Zeballos, C., Eedunuri, V., Bansal, S., Mohammad, T., *et al.* (2017). Novel post-transcriptional and post-translational regulation of pro-apoptotic protein BOK and anti-apoptotic protein Mcl-1 determine the fate of breast cancer cells to survive or die. *Oncotarget* *8*, 85984-85996.

Opferman, J.T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M.D., Ong, C.C., and Korsmeyer, S.J. (2003). Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* *426*, 671-676.

Opydo-Chanek, M., Gonzalo, O., and Marzo, I. (2017). Multifaceted anticancer activity of BH3 mimetics: Current evidence and future prospects. *Biochemical pharmacology* *136*, 12-23.

Panda, P.K., Naik, P.P., Meher, B.R., Das, D.N., Mukhopadhyay, S., Praharaj, P.P., Maiti, T.K., and Bhutia, S.K. (2018). PUMA dependent mitophagy by Abrus agglutinin contributes to apoptosis through ceramide generation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1865*, 480-495.

Parikh, N., Sade, H., Kurian, L., and Sarin, A. (2004). The Bax N Terminus Is Required for Negative Regulation by the Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase and Akt Signaling Pathways in T Cells. *The Journal of Immunology* *173*, 6220-6227.

Parzych, K.R., and Klionsky, D.J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling* *20*, 460-473.

Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy. *Cell* *122*, 927-939.

Pegoraro, L., Palumbo, A., Erikson, J., Falda, M., Giovanazzo, B., Emanuel, B.S., Rovera, G., Nowell, P.C., and Croce, C.M. (1984). A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *81*, 7166.

Peirs, S., Matthijssens, F., Goossens, S., Van de Walle, I., Ruggero, K., De Bock, C.E., Degryse, S., Canté-Barrett, K., Briot, D., and Clappier, E. (2014). ABT-199 mediated inhibition of BCL-2 as a novel therapeutic strategy in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* *124*, 3738-3747.

Perciavalle, R.M., Stewart, D.P., Koss, B., Lynch, J., Milasta, S., Bathina, M., Temirov, J., Cleland, M.M., Pelletier, S., Schuetz, J.D., *et al.* (2012). Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. *Nat Cell Biol* 14, 575-583.

Periasamy, M., and Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle & nerve* 35, 430-442.

Petros, A.M., Olejniczak, E.T., and Fesik, S.W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1644, 83-94.

Pierce, M.M., Raman, C.S., and Nall, B.T. (1999). Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods (San Diego, Calif.)* 19, 213-221.

Pihán, P., Carreras-Sureda, A., and Hetz, C. (2017). BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise. *Cell Death & Differentiation* 24, 1478-1487.

Pop, C., and Salvesen, G.S. (2009). Human caspases: activation, specificity, and regulation. *The Journal of biological chemistry* 284, 21777-21781.

Popgeorgiev, N., Bonneau, B., Ferri, K.F., Prudent, J., Thibaut, J., and Gillet, G. (2011). The apoptotic regulator Nr2 controls cytoskeletal dynamics via the regulation of Ca²⁺ trafficking in the zebrafish blastula. *Developmental cell* 20, 663-676.

Popgeorgiev, N., Jabbour, L., and Gillet, G. (2018). Subcellular Localization and Dynamics of the Bcl-2 Family of Proteins. *Frontiers in cell and developmental biology* 6, 13.

Prakriya, M., and Lewis, R.S. (2015). Store-Operated Calcium Channels. *Physiological reviews* 95, 1383-1436.

Print, C.G., Loveland, K.L., Gibson, L., Meehan, T., Stylianou, A., Wreford, N., de Kretser, D., Metcalf, D., Köntgen, F., Adams, J.M., *et al.* (1998). Apoptosis regulator Bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 12424-12431.

Putcha, G.V., Le, S., Frank, S., Besirli, C.G., Clark, K., Chu, B., Alix, S., Youle, R.J., LaMarche, A., Maroney, A.C., *et al.* (2003). JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron* 38, 899-914.

Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., *et al.* (2007). ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim. *Cell* 129, 1337-1349.

Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L.A., Beaumont, J.G., Coultas, L., Cheney, R.E., Huang, D.C., and Strasser, A. (2001). Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science (New York, N.Y.)* 293, 1829-1832.

Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E.L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., *et al.* (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 112, 1809-1820.

Rabachini, T., Fernandez-Marrero, Y., Montani, M., Loforese, G., Sladky, V., He, Z., Bachmann, D., Wicki, S., Villunger, A., Stroka, D., *et al.* (2018). BOK promotes chemical-induced hepatocarcinogenesis in mice. *Cell death and differentiation* 25, 708-720.

Ranger, A.M., Zha, J., Harada, H., Datta, S.R., Danial, N.N., Gilmore, A.P., Kutok, J.L., Le Beau, M.M., Greenberg, M.E., and Korsmeyer, S.J. (2003). Bad-deficient mice develop diffuse large B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 9324-9329.

Rapoport, T.A. (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* *450*, 663-669.

Rautureau, G.J.P., Yabal, M., Yang, H., Huang, D.C.S., Kvensakul, M., and Hinds, M.G. (2012). The restricted binding repertoire of Bcl-B leaves Bim as the universal BH3-only prosurvival Bcl-2 protein antagonist. *Cell Death & Disease* *3*, e443-e443.

Reddy, E.P., Reynolds, R.K., Santos, E., and Barbacid, M. (1982). A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* *300*, 149-152.

Reed, J.C. (2008). Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* *111*, 3322-3330.

Reichenbach, F., Wiedenmann, C., Schalk, E., Becker, D., Funk, K., Scholz-Kreisel, P., Todt, F., Wolleschak, D., Dohner, K., Marquardt, J.U., *et al.* (2017). Mitochondrial BAX Determines the Predisposition to Apoptosis in Human AML. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *23*, 4805-4816.

Reimertz, C., Kögel, D., Rami, A., Chittenden, T., and Prehn, J.H.M. (2003). Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons : induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *Journal of Cell Biology* *162*, 587-597.

Ren, D., Kim, H., Tu, H.C., Westergard, T.D., Fisher, J.K., Rubens, J.A., Korsmeyer, S.J., Hsieh, J.J., and Cheng, E.H. (2009). The VDAC2-BAK rheostat controls thymocyte survival. *Science signaling* *2*, ra48.

Ren, D., Tu, H.C., Kim, H., Wang, G.X., Bean, G.R., Takeuchi, O., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J., and Cheng, E.H. (2010). BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science (New York, N.Y.)* *330*, 1390-1393.

Riedl, S.J., and Salvesen, G.S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *8*, 405-413.

Rinkenberger, J.L., Horning, S., Klocke, B., Roth, K., and Korsmeyer, S.J. (2000). Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes & development* *14*, 23-27.

Risch, N.J. (2000). Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* *405*, 847-856.

Robert, G., Gastaldi, C., Puissant, A., Hamouda, A., Jacquiel, A., Dufies, M., Belhacene, N., Colosetti, P., Reed, J.C., Auberger, P., *et al.* (2012). The anti-apoptotic Bcl-B protein inhibits BECN1-dependent autophagic cell death. *Autophagy* *8*, 637-649.

Roberts, A.W., Davids, M.S., Pagel, J.M., Kahl, B.S., Puvvada, S.D., Gerecitano, J.F., Kipps, T.J., Anderson, M.A., Brown, J.R., Gressick, L., *et al.* (2016). Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England journal of medicine* *374*, 311-322.

Rodriguez, D.A., Zamorano, S., Lisbona, F., Rojas-Rivera, D., Urra, H., Cubillos-Ruiz, J.R., Armisen, R., Henriquez, D.R., Cheng, E.H., Letek, M., *et al.* (2012). BH3-only proteins are part of a regulatory network that control the sustained signalling of the unfolded protein response sensor IRE1 α . *The EMBO journal* *31*, 2322-2335.

Ron, D., and Hubbard, S.R. (2008). How IRE1 reacts to ER stress. *Cell* *132*, 24-26.

Rong, R., Montalbano, J., Jin, W., Zhang, J., Garling, M., Sheikh, M.S., and Huang, Y. (2005). Oncogenic Ras-mediated downregulation of Gadd153/CHOP is required for Ras-induced cellular transformation. *Oncogene* *24*, 4867-4872.

Rong, Y.-P., Bultynck, G., Aromolaran, A.S., Zhong, F., Parys, J.B., De Smedt, H., Mignery, G.A., Roderick, H.L., Bootman, M.D., and Distelhorst, C.W. (2009a). The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *106*, 14397-14402.

Rong, Y.P., Aromolaran, A.S., Bultynck, G., Zhong, F., Li, X., McColl, K., Matsuyama, S., Herlitze, S., Roderick, H.L., Bootman, M.D., *et al.* (2008). Targeting Bcl-2-IP3 receptor interaction to reverse Bcl-2's inhibition of apoptotic calcium signals. *Molecular cell* *31*, 255-265.

Rong, Y.P., Barr, P., Yee, V.C., and Distelhorst, C.W. (2009b). Targeting Bcl-2 based on the interaction of its BH4 domain with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochimica et biophysica acta* *1793*, 971-978.

Rooswinkel, R.W., van de Kooij, B., de Vries, E., Paauwe, M., Braster, R., Verheij, M., and Borst, J. (2014). Antiapoptotic potency of Bcl-2 proteins primarily relies on their stability, not binding selectivity. *Blood* *123*, 2806-2815.

Ross, A.J., Waymire, K.G., Moss, J.E., Parlow, A.F., Skinner, M.K., Russell, L.D., and MacGregor, G.R. (1998). Testicular degeneration in Bclw-deficient mice. *Nature Genetics* *18*, 251-256.

Rostovtseva, T.K., Antonsson, B., Suzuki, M., Youle, R.J., Colombini, M., and Bezrukov, S.M. (2004). Bid, but not Bax, regulates VDAC channels. *The Journal of biological chemistry* *279*, 13575-13583.

Rousseau, E., and Meissner, G. (1989). Single cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channel: activation by caffeine. *The American journal of physiology* *256*, H328-333.

Rozpedek, W., Pytel, D., Mucha, B., Leszczynska, H., Diehl, J.A., and Majsterek, I. (2016). The Role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Current molecular medicine* *16*, 533-544.

Rudin, C.M., Hann, C.L., Garon, E.B., Ribeiro de Oliveira, M., Bonomi, P.D., Camidge, D.R., Chu, Q., Giaccone, G., Khaira, D., Ramalingam, S.S., *et al.* (2012). Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *18*, 3163-3169.

Ruggiano, A., Foresti, O., and Carvalho, P. (2014). Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. *The Journal of cell biology* *204*, 869-879.

Russell, H.R., Lee, Y., Miller, H.L., Zhao, J., and McKinnon, P.J. (2002). Murine ovarian development is not affected by inactivation of the bcl-2 family member diva. *Molecular and cellular biology* *22*, 6866-6870.

Russell, L.D., Warren, J., Debeljuk, L., Richardson, L.L., Mahar, P.L., Waymire, K.G., Amy, S.P., Ross, A.J., and MacGregor, G.R. (2001). Spermatogenesis in Bclw-deficient mice. *Biology of reproduction* *65*, 318-332.

Ruvolo, P.P., Deng, X., and May, W.S. (2001). Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia* *15*, 515-522.

Ryu, S.J., Oh, Y.S., and Park, S.C. (2007). Failure of stress-induced downregulation of Bcl-2 contributes to apoptosis resistance in senescent human diploid fibroblasts. *Cell Death & Differentiation* *14*, 1020-1028.

Saenz, D.T., Fiskus, W., Qian, Y., Manshouri, T., Rajapakshe, K., Raina, K., Coleman, K.G., Crew, A.P., Shen, A., Mill, C.P., *et al.* (2017). Novel BET protein proteolysis-targeting chimera exerts superior lethal activity than bromodomain inhibitor (BETi) against post-myeloproliferative neoplasm secondary (s) AML cells. *Leukemia* *31*, 1951-1961.

Sakamoto, K.M., Kim, K.B., Kumagai, A., Mercurio, F., Crews, C.M., and Deshaies, R.J. (2001). Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 8554-8559.

Sanders, Y.Y., Liu, H., Zhang, X., Hecker, L., Bernard, K., Desai, L., Liu, G., and Thannickal, V.J. (2013). Histone Modifications in Senescence-Associated Resistance to Apoptosis by Oxidative Stress. *Redox Biology* *1*, 8-16.

Sandow, J.J., Jabbour, A.M., Condina, M.R., Daunt, C.P., Stomski, F.C., Green, B.D., Riffkin, C.D., Hoffmann, P., Guthridge, M.A., Silke, J., *et al.* (2012). Cytokine receptor signaling activates an IKK-dependent phosphorylation of PUMA to prevent cell death. *Cell Death & Differentiation* *19*, 633-641.

Sari, F.R., Widyantoro, B., Thandavarayan, R.A., Harima, M., Lakshmanan, A.P., Zhang, S., Muslin, A.J., Suzuki, K., Kodama, M., and Watanabe, K. (2011). Attenuation of CHOP-mediated myocardial apoptosis in pressure-overloaded dominant negative p38alpha mitogen-activated protein kinase mice. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* *27*, 487-496.

Sarosiek, K.A., Fraser, C., Muthalagu, N., Bhola, P.D., Chang, W., McBrayer, S.K., Cantlon, A., Fisch, S., Golomb-Mello, G., Ryan, J.A., *et al.* (2017). Developmental Regulation of Mitochondrial Apoptosis by c-Myc Governs Age- and Tissue-Specific Sensitivity to Cancer Therapeutics. *Cancer cell* *31*, 142-156.

Sassone, J., Maraschi, A., Sassone, F., Silani, V., and Ciammola, A. (2013). Defining the role of the Bcl-2 family proteins in Huntington's disease. *Cell Death & Disease* *4*, e772-e772.

Sattler, M., Liang, H., Nettlesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., *et al.* (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science (New York, N.Y.)* *275*, 983-986.

Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* *274*, 1541-1548.

Schafer, B., Quispe, J., Choudhary, V., Chipuk, J.E., Ajero, T.G., Du, H., Schneider, R., and Kuwana, T. (2009). Mitochondrial outer membrane proteins assist Bid in Bax-mediated lipidic pore formation. *Molecular biology of the cell* *20*, 2276-2285.

Schenk, R.L., Tuzlak, S., Carrington, E.M., Zhan, Y., Heinzl, S., Teh, C.E., Gray, D.H., Tai, L., Lew, A.M., Villunger, A., *et al.* (2017). Characterisation of mice lacking all functional isoforms of the pro-survival BCL-2 family member A1 reveals minor defects in the haematopoietic compartment. *Cell death and differentiation* 24, 534-545.

Schoneich, C., Dremina, E., and Hewarathna, A. (2017). P 163 - Bcl-2 modulates ER/SR calcium uptake by interaction with SERCA and heat shock proteins. *Free Radical Biology and Medicine* 108, S73.

Schulman, J.J., Szczesniak, L.M., Bunker, E.N., Nelson, H.A., Roe, M.W., Wagner, L.E., 2nd, Yule, D.I., and Wojcikiewicz, R.J.H. (2019). Bok regulates mitochondrial fusion and morphology. *Cell death and differentiation* 26, 2682-2694.

Schulman, J.J., Wright, F.A., Kaufmann, T., and Wojcikiewicz, R.J. (2013). The Bcl-2 protein family member Bok binds to the coupling domain of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and protects them from proteolytic cleavage. *The Journal of biological chemistry* 288, 25340-25349.

Schwarz, D.S., and Blower, M.D. (2016). The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73, 79-94.

Schwickart, M., Huang, X., Lill, J.R., Liu, J., Ferrando, R., French, D.M., Maecker, H., O'Rourke, K., Bazan, F., Eastham-Anderson, J., *et al.* (2010). Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature* 463, 103-107.

Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science (New York, N.Y.)* 300, 135-139.

Seo, M.D., Velamakanni, S., Ishiyama, N., Stathopoulos, P.B., Rossi, A.M., Khan, S.A., Dale, P., Li, C., Ames, J.B., Ikura, M., *et al.* (2012). Structural and functional conservation of key domains in InsP3 and ryanodine receptors. *Nature* 483, 108-112.

Seymour, J.F., Ma, S., Brander, D.M., Choi, M.Y., Barrientos, J., Davids, M.S., Anderson, M.A., Beaven, A.W., Rosen, S.T., Tam, C.S., *et al.* (2017). Venetoclax plus rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia: a phase 1b study. *The Lancet. Oncology* 18, 230-240.

Shamas-Din, A., Brahmabhatt, H., Leber, B., and Andrews, D.W. (2011). BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochimica et biophysica acta* 1813, 508-520.

Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B., and Andrews, D.W. (2013). Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5, a008714.

Shaner, N.C., Lambert, G.G., Chammas, A., Ni, Y., Cranfill, P.J., Baird, M.A., Sell, B.R., Allen, J.R., Day, R.N., Israelsson, M., *et al.* (2013). A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nature methods* 10, 407-409.

Shao, Y., and Aplin, A.E. (2012). ERK2 phosphorylation of serine 77 regulates Bmf pro-apoptotic activity. *Cell Death Dis* 3, e253.

She, Q.B., Ma, W.Y., Zhong, S., and Dong, Z. (2002). Activation of JNK1, RSK2, and MSK1 is involved in serine 112 phosphorylation of Bad by ultraviolet B radiation. *The Journal of biological chemistry* 277, 24039-24048.

Shibue, T., Takeda, K., Oda, E., Tanaka, H., Murasawa, H., Takaoka, A., Morishita, Y., Akira, S., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2003). Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes & development* *17*, 2233-2238.

Shih, C., and Weinberg, R.A. (1982). Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* *29*, 161-169.

Shimamura, A., Ballif, B.A., Richards, S.A., and Blenis, J. (2000). Rsk1 mediates a MEK-MAP kinase cell survival signal. *Current biology : CB* *10*, 127-135.

Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T., and Tsujimoto, Y. (2000). BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 3100-3105.

Shimizu, S., Narita, M., Tsujimoto, Y., and Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* *399*, 483-487.

Shindler, K.S., Latham, C.B., and Roth, K.A. (1997). Bax deficiency prevents the increased cell death of immature neurons in bcl-x-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *17*, 3112-3119.

Shitashige, M., Toi, M., Yano, T., Shibata, M., Matsuo, Y., and Shibasaki, F. (2001). Dissociation of Bax from a Bcl-2/Bax heterodimer triggered by phosphorylation of serine 70 of Bcl-2. *Journal of biochemistry* *130*, 741-748.

Shoshan-Barmatz, V., De Pinto, V., Zweckstetter, M., Raviv, Z., Keinan, N., and Arbel, N. (2010). VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Molecular aspects of medicine* *31*, 227-285.

Sidrauski, C., and Walter, P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* *90*, 1031-1039.

Sochalska, M., Ottina, E., Tuzlak, S., Herzog, S., Herold, M., and Villunger, A. (2016). Conditional knockdown of BCL2A1 reveals rate-limiting roles in BCR-dependent B-cell survival. *Cell death and differentiation* *23*, 628-639.

Sorimachi, H., Hata, S., and Ono, Y. (2011). Impact of genetic insights into calpain biology. *The Journal of Biochemistry* *150*, 23-37.

Sorrentino, V., and Volpe, P. (1993). Ryanodine receptors: how many, where and why? *Trends in pharmacological sciences* *14*, 98-103.

Souers, A.J., Levenson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S.L., Catron, N.D., Chen, J., Dayton, B.D., Ding, H., Enschede, S.H., and Fairbrother, W.J. (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature medicine* *19*, 202.

Srivastava, R., Cao, Z., Nedeva, C., Naim, S., Bachmann, D., Rabachini, T., Gangoda, L., Shahi, S., Glab, J., Menassa, J., *et al.* (2019). BCL-2 family protein BOK is a positive regulator of uridine metabolism in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *116*, 15469.

Srivastava, R.K., Srivastava, A.R., Korsmeyer, S.J., Nesterova, M., Cho-Chung, Y.S., and Longo, D.L. (1998). Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Molecular and cellular biology* 18, 3509-3517.

Stornaiuolo, M., La Regina, G., Passacantilli, S., Grassia, G., Coluccia, A., La Pietra, V., Giustiniano, M., Cassese, H., Di Maro, S., Brancaccio, D., *et al.* (2015). Structure-based lead optimization and biological evaluation of BAX direct activators as novel potential anticancer agents. *J Med Chem* 58, 2135-2148.

Sudhof, T.C., Newton, C.L., Archer, B.T., 3rd, Ushkaryov, Y.A., and Mignery, G.A. (1991). Structure of a novel InsP3 receptor. *The EMBO journal* 10, 3199-3206.

Sun, B., Fiskus, W., Qian, Y., Rajapakshe, K., Raina, K., Coleman, K.G., Crew, A.P., Shen, A., Saenz, D.T., Mill, C.P., *et al.* (2018). BET protein proteolysis targeting chimera (PROTAC) exerts potent lethal activity against mantle cell lymphoma cells. *Leukemia* 32, 343-352.

Sung, P.J., Tsai, F.D., Vais, H., Court, H., Yang, J., Fehrenbacher, N., Foskett, J.K., and Philips, M.R. (2013). Phosphorylated K-Ras limits cell survival by blocking Bcl-xL sensitization of inositol trisphosphate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 20593-20598.

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., *et al.* (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.

Suzuki, K., Sorimachi, H., Yoshizawa, T., Kinbara, K., and Ishiura, S. (1995). Calpain: novel family members, activation, and physiological function. *Biological Chemistry Hoppe Seyler* 376, 523-523.

Suzuki, M., Youle, R.J., and Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: Coregulation of Dimer Formation and Intracellular Localization. *Cell* 103, 645-654.

Swatek, K.N., and Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Research* 26, 399-422.

Swiecicki, P.L., Bellile, E., Sacco, A.G., Pearson, A.T., Taylor, J.M., Jackson, T.L., Chepeha, D.B., Spector, M.E., Shuman, A., Malloy, K., *et al.* (2016). A phase II trial of the BCL-2 homolog domain 3 mimetic AT-101 in combination with docetaxel for recurrent, locally advanced, or metastatic head and neck cancer. *Investigational new drugs* 34, 481-489.

Szegezdi, E., MacDonald, D.C., Ní Chonghaile, T., Gupta, S., and Samali, A. (2009). Bcl-2 family on guard at the ER. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 296, C941-C953.

Tait, S.W., de Vries, E., Maas, C., Keller, A.M., D'Santos, C.S., and Borst, J. (2007). Apoptosis induction by Bid requires unconventional ubiquitination and degradation of its N-terminal fragment. *The Journal of cell biology* 179, 1453-1466.

Tait, S.W., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11, 621-632.

Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., Eishi, Y., Hino, O., Tanaka, K., and Mizushima, N. (2011). Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes & development* 25, 795-800.

Tamura, Y., Simizu, S., Muroi, M., Takagi, S., Kawatani, M., Watanabe, N., and Osada, H. (2009). Polo-like kinase 1 phosphorylates and regulates Bcl-xL during pironetin-induced apoptosis. *Oncogene* 28, 107-116.

Tan, W., and Colombini, M. (2007). VDAC closure increases calcium ion flux. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1768, 2510-2515.

Tan, Y., Demeter, M.R., Ruan, H., and Comb, M.J. (2000). BAD Ser-155 Phosphorylation Regulates BAD/Bcl-XL Interaction and Cell Survival. *Journal of Biological Chemistry* 275, 25865-25869.

Tanaka, K. (2009). The proteasome: overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* 85, 12-36.

Tao, Z.F., Hasvold, L., Wang, L., Wang, X., Petros, A.M., Park, C.H., Boghaert, E.R., Catron, N.D., Chen, J., Colman, P.M., *et al.* (2014). Discovery of a Potent and Selective BCL-XL Inhibitor with in Vivo Activity. *ACS Med Chem Lett* 5, 1088-1093.

Terrano, D.T., Upreti, M., and Chambers, T.C. (2010). Cyclin-dependent kinase 1-mediated Bcl-xL/Bcl-2 phosphorylation acts as a functional link coupling mitotic arrest and apoptosis. *Molecular and cellular biology* 30, 640-656.

Thompson, S., Pearson, A.N., Ashley, M.D., Jessick, V., Murphy, B.M., Gafken, P., Henshall, D.C., Morris, K.T., Simon, R.P., and Meller, R. (2011). Identification of a Novel Bcl-2-interacting Mediator of Cell Death (Bim) E3 Ligase, Tripartite Motif-containing Protein 2 (TRIM2), and Its Role in Rapid Ischemic Tolerance-induced Neuroprotection. *Journal of Biological Chemistry* 286, 19331-19339.

Todt, F., Cakir, Z., Reichenbach, F., Emschermann, F., Lauterwasser, J., Kaiser, A., Ichim, G., Tait, S.W., Frank, S., Langer, H.F., *et al.* (2015). Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak. *The EMBO journal* 34, 67-80.

Tolcher, A.W., LoRusso, P., Arzt, J., Busman, T.A., Lian, G., Rudersdorf, N.S., Vanderwal, C.A., Kirschbrown, W., Holen, K.D., and Rosen, L.S. (2015). Safety, efficacy, and pharmacokinetics of navitoclax (ABT-263) in combination with erlotinib in patients with advanced solid tumors. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 76, 1025-1032.

Tomar, D., Prajapati, P., Sripada, L., Singh, K., Singh, R., Singh, A.K., and Singh, R. (2013). TRIM13 regulates caspase-8 ubiquitination, translocation to autophagosomes and activation during ER stress induced cell death. *Biochimica et biophysica acta* 1833, 3134-3144.

Tran, V.H., Bartolo, R., Westphal, D., Alsop, A., Dewson, G., and Kluck, R.M. (2013). Bak apoptotic function is not directly regulated by phosphorylation. *Cell Death & Disease* 4, e452-e452.

Trisciuglio, D., Tupone, M.G., Desideri, M., Di Martile, M., Gabellini, C., Buglioni, S., Pallocca, M., Alessandrini, G., D'Aguzzo, S., and Del Bufalo, D. (2017). BCL-XL overexpression promotes tumor progression-associated properties. *Cell Death & Disease* 8, 3216.

Tse, C., Shoemaker, A.R., Adickes, J., Anderson, M.G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E.F., Marsh, K.C., Mitten, M.J., Nimmer, P., *et al.* (2008). ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer research* 68, 3421-3428.

Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., and Croce, C.M. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science (New York, N.Y.)* 226, 1097-1099.

Uchida, K., Miyauchi, H., Furuichi, T., Michikawa, T., and Mikoshiba, K. (2003). Critical regions for activation gating of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *The Journal of biological chemistry* 278, 16551-16560.

Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science (New York, N.Y.)* 287, 664-666.

Uren, R.T., Iyer, S., and Kluck, R.M. (2017). Pore formation by dimeric Bak and Bax: an unusual pore? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 372.

Vaillant, F., Merino, D., Lee, L., Breslin, K., Pal, B., Ritchie, M.E., Smyth, G.K., Christie, M., Phillipson, L.J., and Burns, C.J. (2013). Targeting BCL-2 with the BH3 mimetic ABT-199 in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer cell* 24, 120-129.

Valero, J.G., Cornut-Thibaut, A., Juge, R., Debaud, A.L., Gimenez, D., Gillet, G., Bonnefoy-Berard, N., Salgado, J., Salles, G., Aouacheria, A., *et al.* (2012). micro-Calpain conversion of antiapoptotic Bfl-1 (BCL2A1) into a prodeath factor reveals two distinct alpha-helices inducing mitochondria-mediated apoptosis. *PLoS One* 7, e38620.

van de Kooij, B., Rooswinkel, R.W., Kok, F., Herrebout, M., de Vries, E., Paauwe, M., Janssen, G.M.C., van Veelen, P.A., and Borst, J. (2013). Polyubiquitination and proteasomal turnover controls the anti-apoptotic activity of Bcl-B. *Oncogene* 32, 5439-5448.

van der Heide, L.P., and Smidt, M.P. (2013). The BCL2 code to dopaminergic development and Parkinson's disease. *Trends in molecular medicine* 19, 211-216.

van Galen, P., Kreso, A., Mbong, N., Kent, D.G., Fitzmaurice, T., Chambers, J.E., Xie, S., Laurenti, E., Hermans, K., Eppert, K., *et al.* (2014). The unfolded protein response governs integrity of the haematopoietic stem-cell pool during stress. *Nature* 510, 268-272.

Vance, J.E. (2014). MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: Lipids and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841, 595-609.

Vandenberg, C.J., and Cory, S. (2013). ABT-199, a new Bcl-2-specific BH3 mimetic, has in vivo efficacy against aggressive Myc-driven mouse lymphomas without provoking thrombocytopenia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 121, 2285-2288.

Vander Heiden, M.G., Li, X.X., Gottlieb, E., Hill, R.B., Thompson, C.B., and Colombini, M. (2001). Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *The Journal of biological chemistry* 276, 19414-19419.

Vaux, D.L., Cory, S., and Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-442.

Weis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75, 229-240.

Verma, S., Goyal, S., Tyagi, C., Jamal, S., Singh, A., and Grover, A. (2016). BIM (BCL-2 interacting mediator of cell death) SAHB (stabilized α helix of BCL2) not always convinces BAX (BCL-2-associated X protein) for apoptosis. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 67, 94-101.

Verma, S., Zhao, L.J., and Chinnadurai, G. (2001). Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 276, 4671-4676.

Vermassen, E., Parys, J.B., and Mauger, J.P. (2004). Subcellular distribution of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: functional relevance and molecular determinants. *Biology of the cell* 96, 3-17.

Vervliet, T., Decrock, E., Molgo, J., Sorrentino, V., Missiaen, L., Leybaert, L., De Smedt, H., Kasri, N.N., Parys, J.B., and Bultynck, G. (2014). Bcl-2 binds to and inhibits ryanodine receptors. *Journal of cell science* 127, 2782-2792.

Vervliet, T., Lemmens, I., Vandermarliere, E., Decrock, E., Ivanova, H., Monaco, G., Sorrentino, V., Nadif Kasri, N., Missiaen, L., Martens, L., *et al.* (2015a). Ryanodine receptors are targeted by anti-apoptotic Bcl-XL involving its BH4 domain and Lys87 from its BH3 domain. *Scientific reports* 5, 9641.

Vervliet, T., Lemmens, I., Welkenhuyzen, K., Tavernier, J., Parys, J.B., and Bultynck, G. (2015b). Regulation of the ryanodine receptor by anti-apoptotic Bcl-2 is independent of its BH3-domain-binding properties. *Biochem Biophys Res Commun* 463, 174-179.

Vervloessem, T., Sasi, B.K., Xerxa, E., Karamanou, S., Kale, J., La Rovere, R.M., Chakraborty, S., Sneyers, F., Vogler, M., Economou, A., *et al.* (2020). BDA-366, a putative Bcl-2 BH4 domain antagonist, induces apoptosis independently of Bcl-2 in a variety of cancer cell models. *Cell Death Dis* 11, 769.

Vidal, V., Robert, G., Goursaud, L., Durand, L., Ginot, C., Karsenti, J.M., Luciano, F., Gastaud, L., Garnier, G., Braun, T., *et al.* (2017). BCL2L10 positive cells in bone marrow are an independent prognostic factor of azacitidine outcome in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Oncotarget* 8, 47103-47109.

Villalobos-Ortiz, M., Ryan, J., Mashaka, T.N., Opferman, J.T., and Letai, A. (2020). BH3 profiling discriminates on-target small molecule BH3 mimetics from putative mimetics. *Cell death and differentiation* 27, 999-1007.

Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Müllauer, F., Böck, G., Ausserlechner, M.J., Adams, J.M., and Strasser, A. (2003). p53- and Drug-Induced Apoptotic Responses Mediated by BH3-Only Proteins Puma and Noxa. *Science (New York, N.Y.)* 302, 1036-1038.

Wagner, K.U., Claudio, E., Rucker, E.B., 3rd, Riedlinger, G., Broussard, C., Schwartzberg, P.L., Siebenlist, U., and Hennighausen, L. (2000). Conditional deletion of the Bcl-x gene from erythroid cells results in hemolytic anemia and profound splenomegaly. *Development (Cambridge, England)* 127, 4949-4958.

Walensky, L.D., Pitter, K., Morash, J., Oh, K.J., Barbuto, S., Fisher, J., Smith, E., Verdine, G.L., and Korsmeyer, S.J. (2006). A Stapled BID BH3 Helix Directly Binds and Activates BAX. *Molecular cell* 24, 199-210.

Walsh, J.G., Cullen, S.P., Sheridan, C., Luthi, A.U., Gerner, C., and Martin, S.J. (2008). Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 12815-12819.

Walton, K.D., Wagner, K.U., Rucker, E.B., 3rd, Shillingford, J.M., Miyoshi, K., and Hennighausen, L. (2001). Conditional deletion of the bcl-x gene from mouse mammary epithelium results in

accelerated apoptosis during involution but does not compromise cell function during lactation. *Mechanisms of development* 109, 281-293.

Wang, G., Nikolovska-Coleska, Z., Yang, C.Y., Wang, R., Tang, G., Guo, J., Shangary, S., Qiu, S., Gao, W., Yang, D., *et al.* (2006). Structure-based design of potent small-molecule inhibitors of anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *J Med Chem* 49, 6139-6142.

Wang, H.-G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F., and Reed, J.C. (1999). Ca²⁺-Induced Apoptosis Through Calcineurin Dephosphorylation of BAD. *Science (New York, N.Y.)* 284, 339-343.

Wang, J., Beauchemin, M., and Bertrand, R. (2011). Bcl-xL phosphorylation at Ser49 by polo kinase 3 during cell cycle progression and checkpoints. *Cellular signalling* 23, 2030-2038.

Wang, J., Beauchemin, M., and Bertrand, R. (2012). Phospho-Bcl-x(L)(Ser62) plays a key role at DNA damage-induced G(2) checkpoint. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 11, 2159-2169.

Wang, K., Yin, X.M., Chao, D.T., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1996). BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes & development* 10, 2859-2869.

Wang, Q., Mora-Jensen, H., Weniger, M.A., Perez-Galan, P., Wolford, C., Hai, T., Ron, D., Chen, W., Trenkle, W., Wiestner, A., *et al.* (2009). ERAD inhibitors integrate ER stress with an epigenetic mechanism to activate BH3-only protein NOXA in cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 2200-2205.

Wang, X., Lu, J., Cao, J., Ma, B., Gao, C., and Qi, F. (2018). MicroRNA-18a promotes hepatocellular carcinoma proliferation, migration, and invasion by targeting Bcl2L10. *OncoTargets and therapy* 11, 7919-7934.

Wang, X., Yang, C., Chai, J., Shi, Y., and Xue, D. (2002). Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, N.Y.)* 298, 1587-1592.

Wang, X., Zhang, C., Yan, X., Lan, B., Wang, J., Wei, C., Cao, X., Wang, R., Yao, J., and Zhou, T. (2016). A novel bioavailable BH3 mimetic efficiently inhibits colon cancer via cascade effects of mitochondria. *Clinical Cancer Research* 22, 1445-1458.

Wang, X.Z., and Ron, D. (1996). Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science (New York, N.Y.)* 272, 1347-1349.

Wang, Z., He, N., Guo, Z., Niu, C., Song, T., Guo, Y., Cao, K., Wang, A., Zhu, J., Zhang, X., *et al.* (2019). Proteolysis Targeting Chimeras for the Selective Degradation of Mcl-1/Bcl-2 Derived from Nonselective Target Binding Ligands. *J Med Chem* 62, 8152-8163.

Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (New York, N.Y.)* 292, 727-730.

Wei, Z., Qi, J., Dai, Y., Bowen, W.D., and Mousseau, D.D. (2009). Haloperidol disrupts Akt signalling to reveal a phosphorylation-dependent regulation of pro-apoptotic Bcl-XS function. *Cellular signalling* 21, 161-168.

Weiler, M., Bähr, O., Hohlweg, U., Naumann, U., Rieger, J., Huang, H., Tabatabai, G., Krell, H.W., Ohgaki, H., Weller, M., *et al.* (2006). BCL-xL: time-dependent dissociation between modulation

of apoptosis and invasiveness in human malignant glioma cells. *Cell death and differentiation* **13**, 1156-1169.

Weiss, L.M., Warnke, R.A., Sklar, J., and Cleary, M.L. (1987). Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *The New England journal of medicine* **317**, 1185-1189.

Wertz, I.E., Kusam, S., Lam, C., Okamoto, T., Sandoval, W., Anderson, D.J., Helgason, E., Ernst, J.A., Eby, M., Liu, J., *et al.* (2011). Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature* **471**, 110-114.

Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P.E., and Kluck, R.M. (2011). Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica et biophysica acta* **1813**, 521-531.

Westphal, D., Kluck, R.M., and Dewson, G. (2014). Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell death and differentiation* **21**, 196-205.

White, C., Li, C., Yang, J., Petrenko, N.B., Madesh, M., Thompson, C.B., and Foskett, J.K. (2005). The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-XL modulation of the InsP3R. *Nature Cell Biology* **7**, 1021-1028.

Wick, W., Wagner, S., Kerkau, S., Dichgans, J., Tonn, J.C., and Weller, M. (1998). BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells. *FEBS Lett.* **440**, 419-424.

Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., and Youle, R.J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *The Journal of cell biology* **139**, 1281-1292.

Wood, D.E., Thomas, A., Devi, L.A., Berman, Y., Beavis, R.C., Reed, J.C., and Newcomb, E.W. (1998). Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene* **17**, 1069-1078.

Wu, Y., Li, X., Jia, J., Zhang, Y., Li, J., Zhu, Z., Wang, H., Tang, J., and Hu, J. (2018). Transmembrane E3 ligase RNF183 mediates ER stress-induced apoptosis by degrading Bcl-xL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**, E2762-e2771.

Xin, M., and Deng, X. (2005). Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **280**, 10781-10789.

Xin, M., Gao, F., May, W.S., Flagg, T., and Deng, X. (2007). Protein kinase Czeta abrogates the proapoptotic function of Bax through phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **282**, 21268-21277.

Xin, M., Li, R., Xie, M., Park, D., Owonikoko, T.K., Sica, G.L., Corsino, P.E., Zhou, J., Ding, C., White, M.A., *et al.* (2014). Small-molecule Bax agonists for cancer therapy. *Nature communications* **5**, 4935.

Xu, J.D., Cao, X.X., Long, Z.W., Liu, X.P., Furuya, T., Xu, J.W., Liu, X.L., De Xu, Z., Sasaki, K., and Li, Q.Q. (2011). BCL2L10 protein regulates apoptosis/proliferation through differential pathways in gastric cancer cells. *The Journal of pathology* **223**, 400-409.

Xu, J.D., Furuya, T., Cao, X.X., Liu, X.L., Li, Q.Q., Wang, W.J., Xu, J.W., Xu, Z.D., Sasaki, K., and Liu, X.P. (2010). Loss of BCL2L10 protein expression as prognostic predictor for poor clinical outcome in gastric carcinoma. *Histopathology* **57**, 814-824.

Yamaguchi, H., Bhalla, K., and Wang, H.-G. (2003). Bax Plays a Pivotal Role in Thapsigargin-induced Apoptosis of Human Colon Cancer HCT116 Cells by Controlling Smac/Diablo and Omi/HtrA2 Release from Mitochondria. *Cancer research* 63, 1483-1489.

Yamaguchi, H., and Wang, H.G. (2004). CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 45495-45502.

Yamamoto, K., Ichijo, H., and Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Molecular and cellular biology* 19, 8469-8478.

Yang, D., Chen, M.-B., Wang, L.-Q., Yang, L., Liu, C.-Y., and Lu, P.-H. (2013). Bcl-2 expression predicts sensitivity to chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 32, 105.

Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80, 285-291.

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., and Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science (New York, N.Y.)* 275, 1129-1132.

Yang, J., Vais, H., Gu, W., and Foskett, J.K. (2016). Biphasic regulation of InsP₃ receptor gating by dual Ca²⁺ release channel BH3-like domains mediates Bcl-x_L control of cell viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, E1953-E1962.

Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., Bause, A., Li, Y., Stommel, J.M., Dell'antonio, G., *et al.* (2011). Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes & development* 25, 717-729.

Yin, X.-M., Oltvai, Z.N., and Korsmeyer, S.J. (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369, 321-323.

Yin, X.M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K.A., and Korsmeyer, S.J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400, 886-891.

Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., Vadai, E., Dassa, L., Shahar, E., Condiotti, R., *et al.* (2016). Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nature communications* 7, 11190.

Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1998). Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *The Journal of biological chemistry* 273, 33741-33749.

Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107, 881-891.

Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., and Mori, K. (2000). ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Molecular and cellular biology* 20, 6755-6767.

Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 47-59.

Yu, C., Minemoto, Y., Zhang, J., Liu, J., Tang, F., Bui, T.N., Xiang, J., and Lin, A. (2004). JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Molecular cell* 13, 329-340.

Yuan, H.-X., Russell, R.C., and Guan, K.-L. (2013). Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy. *Autophagy* 9, 1983-1995.

Yun, C.W., and Lee, S.H. (2018). The Roles of Autophagy in Cancer. *Int J Mol Sci* 19.

Zalk, R., Clarke, O.B., des Georges, A., Grassucci, R.A., Reiken, S., Mancina, F., Hendrickson, W.A., Frank, J., and Marks, A.R. (2015). Structure of a mammalian ryanodine receptor. *Nature* 517, 44-49.

Zengerle, M., Chan, K.-H., and Ciulli, A. (2015). Selective Small Molecule Induced Degradation of the BET Bromodomain Protein BRD4. *ACS Chemical Biology* 10, 1770-1777.

Zerp, S.F., Stoter, R., Kuipers, G., Yang, D., Lippman, M.E., van Blitterswijk, W.J., Bartelink, H., Rooswinkel, R., Lafleur, V., and Verheij, M. (2009). AT-101, a small molecule inhibitor of anti-apoptotic Bcl-2 family members, activates the SAPK/JNK pathway and enhances radiation-induced apoptosis. *Radiation oncology (London, England)* 4, 47.

Zha, J., Harada, H., Osipov, K., Jockel, J., Waksman, G., and Korsmeyer, S.J. (1997). BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *The Journal of biological chemistry* 272, 24101-24104.

Zhang, D., and Armstrong, J.S. (2007). Bax and the mitochondrial permeability transition cooperate in the release of cytochrome c during endoplasmic reticulum-stress-induced apoptosis. *Cell death and differentiation* 14, 703-715.

Zhang, H., Li, G., Zhang, Y., Shi, J., Yan, B., Tang, H., Chen, S., Zhang, J., Wen, P., Wang, Z., *et al.* (2020). Targeting BET Proteins With a PROTAC Molecule Elicits Potent Anticancer Activity in HCC Cells. *Frontiers in Oncology* 9.

Zhang, H., Nimmer, P.M., Tahir, S.K., Chen, J., Fryer, R.M., Hahn, K.R., Iciek, L.A., Morgan, S.J., Nasarre, M.C., Nelson, R., *et al.* (2007). Bcl-2 family proteins are essential for platelet survival. *Cell death and differentiation* 14, 943-951.

Zhang, M., Zheng, J., Nussinov, R., and Ma, B. (2017). Release of Cytochrome C from Bax Pores at the Mitochondrial Membrane. *Scientific reports* 7, 2635.

Zhao, G., Zhu, Y., Eno, C.O., Liu, Y., Deleeuw, L., Burlison, J.A., Chaires, J.B., Trent, J.O., and Li, C. (2014). Activation of the proapoptotic Bcl-2 protein Bax by a small molecule induces tumor cell apoptosis. *Molecular and cellular biology* 34, 1198-1207.

Zhong, F., Harr, M.W., Bultynck, G., Monaco, G., Parys, J.B., De Smedt, H., Rong, Y.-P., Molitoris, J.K., Lam, M., Ryder, C., *et al.* (2011). Induction of Ca²⁺-driven apoptosis in chronic

lymphocytic leukemia cells by peptide-mediated disruption of Bcl-2–IP3 receptor interaction. *Blood* *117*, 2924-2934.

Zhong, Q., Gao, W., Du, F., and Wang, X. (2005). Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* *121*, 1085-1095.

Zhou, J.-d., Zhang, T.-j., Xu, Z.-j., Gu, Y., Ma, J.-c., Li, X.-x., Guo, H., Wen, X.-m., Zhang, W., Yang, L., *et al.* (2019). BCL2 overexpression: clinical implication and biological insights in acute myeloid leukemia. *Diagnostic Pathology* *14*, 68.

Zhou, T., Cheng, J., Yang, P., Wang, Z., Liu, C., Su, X., Bluethmann, H., and Mountz, J.D. (1996). Inhibition of Nur77/Nurr1 leads to inefficient clonal deletion of self-reactive T cells. *J Exp Med* *183*, 1879-1892.