



**HAL**  
open science

# Rôle des facteurs de transcription stat3 dans la réponse aux inhibiteurs de topoisomerase : Implication dans la résistance aux traitements de chimiothérapie

Arnaud Vigneron

## ► To cite this version:

Arnaud Vigneron. Rôle des facteurs de transcription stat3 dans la réponse aux inhibiteurs de topoisomerase : Implication dans la résistance aux traitements de chimiothérapie. Biologie cellulaire. Université d'Angers, 2006. Français. NNT : . tel-00338756

**HAL Id: tel-00338756**

**<https://theses.hal.science/tel-00338756>**

Submitted on 14 Nov 2008

**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.

**ROLE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION STAT3 DANS LA  
REPONSE AUX INHIBITEURS DE TOPOISOMERASE.  
IMPLICATION DANS LA RESISTANCE AUX TRAITEMENTS DE  
CHIMIOETHERAPIE**

**THESE DE DOCTORAT**

**Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire**

**ECOLE DOCTORALE D'ANGERS**

**Présentée et soutenue publiquement**

**le : 21 décembre 2006**

**à : Angers**

**par : Arnaud VIGNERON**

**Devant le jury ci-dessous :**

**Mr Laurent CORCOS** (rapporteur, Directeur de recherche INSERM, Brest)

**Mr François VALLETTE** (rapporteur, Directeur de recherche INSERM, Nantes)

**Mr Erick GAMELIN** (examinateur, Professeur, Faculté de médecine d'Angers)

**Mr Christian LARSEN** (examinateur, Professeur, Faculté de médecine de Poitiers)

**Mr Olivier COQUERET** (examinateur, Professeur, Faculté des sciences d'Angers)

**Directeur de thèse : Olivier COQUERET**

**INSERM U564**

**Centre Paul PAPIN**

**2, rue Moll**

**49933 ANGERS cedex 09**

# Remerciements

*Je tiens à remercier Monsieur CORCOS et Monsieur VALLETTE d'avoir accepté de siéger dans ce jury et d'avoir consacré une partie de leur temps, en tant que rapporteurs, à examiner ce travail.*

*J'adresse également ma reconnaissance à Monsieur GAMELIN et Monsieur LARSEN pour avoir accepté de participer à ce jury.*

*Je remercie Hugues GASCAN et plus particulièrement Erick GAMELIN de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire durant ces quelques années.*

*Je souhaite aussi remercier Alain MOREL, Michelle BOISDRON, Agnès CHASSEVANT, Isabelle VALO, et Véronique VERRIELE pour leur disponibilité et les différentes connaissances qu'ils ont pu m'apporter.*

*Je tiens tout spécialement à remercier Olivier. Il m'a permis de développer ma curiosité et mon goût pour la biologie cellulaire, en particulier à l'université. Je veux aussi souligner sa disponibilité et son écoute. Je le remercie enfin de m'avoir laissé une grande liberté dans la conduite de ces travaux, ce qui m'a permis de m'accomplir dans ma vie professionnelle au cours de ces cinq années.*

*Je remercie aussi particulièrement Sandrine et Benjamin, qui ont chacun à leur manière participé à la réussite de ce travail, je n'oublierai pas les intéressantes discussions que nous avons pu avoir autant sur nos recherches que sur les sujets de tous les jours.*

*Je remercie également Frédéric et Amy qui les premiers ont assuré ma formation et avec qui il a été très agréable de travailler.*

*Je souhaite aussi remercier, le pou, la reine-mère, la grenouille, 110kg, souris, la fan du steaua, et la tatiticienne pour tous les joyeux moments que nous avons passés ensemble. Ah, j'oubliais la belle blonde bouclée avec des GRANDS yeux.*

*Je souhaite également remercier toutes les personnes de l'INSERM U564 et des laboratoires du Centre Papin pour l'aide qu'ils ont pu m'apporter sous quelques formes que ce soit.*

*Je remercie mes parents, mes grand-parents et toute ma famille pour ce qu'ils m'ont transmis  
et pour leur soutien au quotidien*

*Enfin, je remercie Sylvaine qui malgré des moments difficiles fut toujours à mes côtés et sur  
qui j'ai pu compter chaque jour où j'en ressentais le besoin*

*Je leur dédie à tous ce travail*

# Table des matières

<i>Index des figures</i>	5
<i>Liste des abréviations</i>	7
<i>Introduction</i>	9
Partie 1 : Mécanisme et contrôle de la tumorigenèse	10
Chapitre I : Caractéristiques et régulations du cycle cellulaire	11
A) Le cycle cellulaire	11
B) Les oncogènes	17
C) Les gènes suppresseurs de tumeur	19
Chapitre II : La tumorigenèse	25
A) La mutation des gènes de contrôle du cycle cellulaire comme élément initiateur de la tumorigenèse	25
B) L'instabilité génomique comme moteur de la tumorigenèse	27
C) La sénescence et l'apoptose : barrière contre la tumorigenèse	34
Partie 2 : Les thérapies antitumorales, réponses et échappements	39
Chapitre I : Les chimiothérapies ciblant les topoisomérases	40
A) Données cliniques sur ces chimiothérapies	40
B) Les deux types de topoisomérase	42
C) Les inhibiteurs de topoisomérase I dérivés des camptothécines	47
D) Les inhibiteurs de topoisomérase II : les anthracyclines.	49
E) Combinaisons avec de nouvelles thérapies ciblant l'EGFR	51
Chapitre II : Réponses et échappements à ces chimiothérapies	54
A) La détection et la réparation des dommages de l'ADN induits par les inhibiteurs de topoisomérase	54
B) L'activation des points de contrôle du cycle cellulaire	60
C) Catastrophe mitotique, apoptose, sénescence et nécrose	65
Partie 3 : Les facteurs de transcription STAT3	72
Chapitre I : Présentation générale des facteurs STAT3	73
A) Structure et domaines fonctionnels des facteurs STAT3	73
B) Activité transcriptionnelle des facteurs STAT3	74
C) Rôle physiologique de STAT3 et gènes cibles	76
Chapitre II : Implication de STAT3 dans la tumorigenèse	78
A) Les oncogènes activent STAT3	78
B) Effets de STAT3 en tant qu'oncogène	82
C) Addiction des tumeurs à l'oncogène STAT3	83
D) Impact de STAT3 sur l'environnement tumoral	85
Chapitre III : STAT3 dans la réponse aux chimiothérapies	87
A) Régulation de STAT3 en réponse aux chimiothérapies	87
B) Effets de STAT3 sur la réponse cellulaire aux chimiothérapies	88
C) Implication de STAT3 dans les réponses cellulaires et cliniques aux chimiothérapies couplées aux thérapies ciblant l'EGFR	90
<i>Résultats</i>	93
Partie 1 : p21 réprime l'activité transcriptionnelle de STAT3 et E2F1 sur la voie c-myc cdc25A	94
Partie 2 : Le complexe STAT3-Rb réprime la transcription de cdc25A	104
Partie 3 : La voie oncogénique SRC-STAT3 inhibe la sénescence induite par la doxorubicine	110
Partie 4 : L'inhibition de la voie EGFR c-src réduit la réparation des dommages de l'ADN	120
Partie 5 : L'oncogène STAT3 comme marqueur prédictif de la résistance aux drogues antitumorales	140
<i>Discussion</i>	142
<i>Bibliographie</i>	157

# Index des figures

Figure 1 : Activation des gènes de la phase S lors de la transition G1/S.....	13
Figure 2 : L'hypothèse de Knudson et le gène du rétinoblastome (69).....	19
Figure 3 : Régulation du profil transcriptionnel de p53(95).....	24
Figure 4 : Le point de contrôle du fuseau mitotique (129).....	30
Figure 5 : Coopération entre oncogène et instabilité génomique.....	33
Figure 6 : Activation de p53 au cours de l'oncogenèse (148).....	36
Figure 7 : Schéma d'activation de Rb au cours de l'oncogenèse.....	37
Figure 8 : Mécanisme réactionnel de la topoisomérase I (175).....	42
Figure 9 : Les topoisomérases I suppriment la tension de l'ADN générée par l'activité hélicase du réplisome (175).....	43
Figure 10 : Les différents domaines fonctionnels des topoisomérases II (178).....	44
Figure 11 : Mécanisme réactionnel simplifié des inhibiteurs de topoisomérase II (178).....	44
Figure 12 : Rôle de la topoisomérase II $\beta$ au cours du remodelage de la chromatine (181).....	45
Figure 13 : Rôle de la topoisomérase II $\alpha$ au cours de la réplication (177).....	46
Figure 14 : La réplication de l'ADN induit la caténation des chromatides sœurs (177).....	47
Figure 15 : Effet des camptothécines sur la réplication (184).....	48
Figure 16 : effet des inhibiteurs des TOPO II au niveau des sites communs de fragilité.....	50
Figure 17 : Elimination du complexe ternaire lors de la collision avec l'ARN polymérase.....	55
Figure 18 : Réparation des cassures de l'ADN générées par la dégradation des TOPO I.....	56
Figure 19 : Réparation des cassures de l'ADN générées par la dégradation de la TOPO II $\beta$ .....	57
Figure 20 : L'inhibition du réplisome induit l'activation d'ATR et le recrutement des protéines BLM ou MRN.....	58
Figure 21 : Activation de la réplication par recombinaison homologue (233).....	59
Figure 22 : Activation des points de contrôle du cycle cellulaire par ATM/ATR Chk1/2 cdc25A/B/C.....	61
Figure 23 : La catastrophe mitotique induit par les inhibiteurs de topoisomérases (270;275).....	67
Figure 24 : L'activité transcriptionnelle de STAT3.....	75
Figure 25 : Le rôle physiologique de STAT3 et ses gènes cibles.....	77
Figure 26 : Implication de STAT3 dans différentes tumeurs (329).....	79
Figure 27 : Addiction des tumeurs aux oncogènes STAT3.....	84
Figure 28 : p21 inhibe la transcription de c-myc induite par l'IL-6 dans les hépatocarcinome HepG2.....	97
Figure 29 : p21 réprime et interagit avec le domaine d'activation transcriptionnelle de STAT3.....	99
Figure 30 : p21 inhibe l'activité basale d'un gène rapporteur.....	100
Figure 31 : Une forte surexpression de p21 inhibe la liaison à l'ADN de STAT3.....	102
Figure 32 : Modèle de régulation de la transcription des gènes de la voie c-myc cdc25A par l'inhibiteur du cycle cellulaire p21.....	103
Figure 33 : L'activation oncogénique de STAT3 limite la répression de cdc25A et l'inhibition de la réplication induite par un stress oxydatif.....	107
Figure 34 : Régulation de la transcription de cdc25A par l'interaction fonctionnelle entre STAT3 c-myc et STAT3 Rb.....	109
Figure 35 : STAT3 est actif sur le promoteur de c-myc dans les cellules exprimant v-src lors d'un traitement à la doxorubicine.....	114
Figure 36 : La structure nucléaire des cellules exprimant l'oncogène v-src est plus altérée que celle des cellules contrôles lors de la catastrophe mitotique.....	115
Figure 37 : La sénescence et p21 sont activées par la doxorubicine dans une minorité des cellules exprimant v-src.....	118
Figure 38 : La voie oncogénique Src-STAT3 inhibe la réponse aux dommages de l'ADN et induit l'instabilité génomique des cellules traitées par les inhibiteurs de topoisomérases II.....	119
Figure 39 : L'association cetuximab SKI sensibilise les lignées HCT116 HT29 au sn38.....	124
Figure 40 : L'association cetuximab SKI inhibe l'activation de l'EGFR par le sn38.....	126
Figure 41 : Activation de la sénescence ou de l'apoptose par le cetuximab et l'inhibiteur de c-src.....	128
Figure 42 : Les inhibiteurs du complexe EGFR c-src augmentent la catastrophe mitotique induite par le sn38.....	130
Figure 43 : Le cetuximab et l'inhibiteur de c-src renforcent l'activation du point de contrôle de la réplication induit par le sn38.....	132
Figure 44 : Le cetuximab et l'inhibiteur de c-src empêchent la réparation des fourches de réplication effondrées par le sn38.....	134

<i>Figure 45 : Le cetuximab et l'inhibiteur de c-src empêchent l'activation transcriptionnelle de Emel par STAT3 lors d'un traitement au sn38</i> .....	135
<i>Figure 46 : Le cetuximab et l'inhibiteur de c-src sensibilisent les lignées colorectales au sn38 en inhibant la réparation des fourches de réplication effondrées.</i> .....	139
<i>Figure 47 : Le facteur de transcription STAT3 en tant que marqueur prédictif des réponses aux chimiothérapies</i> .....	141
<i>Figure 48 : Schéma bilan des différents travaux présentés dans ce manuscrit</i> .....	145
<i>Figure 49 : Les mécanismes impliquant STAT3 comme cible thérapeutique</i> .....	155

## Liste des abréviations

<b>ADAM</b> : a desintegrin and metalloproteinase	<b>CRM1</b> : chromosome region maintenance 1
<b>ADN</b> : Acide désoxyribonucléique	<b>CSA/CSB</b> : Cockayne syndrome type A/B
<b>AIF</b> : Apoptosis inducing factor	<b>CSK</b> : c-src tyrosine kinase
<b>AKT</b> : v-akt thymoma (AKT8) viral oncogene homolog (mouse)	<b>c-SRC</b> : v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)
<b>ALK</b> : Anaplastic lymphoma kinase	<b>CTD</b> : carboxyl terminal domain
<b>AML</b> : Acute Myelogenous Leukemia	<b>DMBA</b> : N,N-diméthylbenzylamine
<b>ANGPTL4</b> : Angiopoietin-like 4	<b>DNAPK</b> : DNA activated protein kinase
<b>Apaf1</b> : Apoptosis protease-activating factor 1	<b>DNAPKcs</b> :DNAPK catalytic subunit
<b>APC/C</b> : Anaphase promoting complex/cyclosome	<b>DNMT1</b> : DNA methyltransferase 1
<b>AP1</b> : Activator protein 1	<b>EGF</b> : epidermal growth factor
<b>ARF</b> : alternate reading frame	<b>eIF4E</b> : eukaryotic translation initiation factor 4E
<b>ARFBP1</b> : ARF binding protein1	<b>Elk1</b> : Ets like gene 1
<b>ARN</b> : Acide ribonucléique	<b>Eme1</b> : essential meiotic endonuclease 1 yeast homolog 1
<b>ARNm</b> : ARN messenger	<b>ERCC1</b> : excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group1
<b>ARNr</b> : ARN ribosomiaux	<b>ERK</b> : Extracellular signal related kinase
<b>ASPP</b> : Apoptosis-stimulating protein of p53	<b>ETS</b> : v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog.
<b>ATP</b> : adenosine triphosphate	<b>E1A</b> : Early region 1A
<b>ATM</b> : Ataxia-telangiectasia mutated gene	<b>E2F</b> : E2 promoter binding factor
<b>ATR</b> : Ataxia telangiectasia- and RAD3-related gene	<b>FDA</b> : Food and drug administration :
<b>ATRIP</b> : ATR-interacting protein	<b>Fen 1</b> : flap structure-specific endonuclease 1
<b>Bcl-2</b> : B-cell lymphoma gene 2	<b>FoxM1</b> : forkhead box M1
<b>Bcl-XL</b> : B-cell lymphoma gene XL	<b>GADD45</b> : growth arrest and DNA-damage-inducible
<b>BER</b> : Base excision repair	<b>GR</b> : glucocorticoïde receptor
<b>BH3</b> : Bcl-2 homologous domain 3	<b>GSK3β</b> : Glycogen synthase kinase 3β
<b>Bid</b> : BH3 interacting domain death agonist	<b>HAT</b> : histone acétyltransférase
<b>BLM</b> : Bloom syndrome gene	<b>HDAC</b> : histone déacétylase
<b>BMI1</b> : B lymphoma Mo-MLV insertion region gene	<b>Hdm 2</b> : Human double minute 2
<b>BRCA</b> : Breast cancer early onset gene	<b>HGF</b> : Hepatocyte nuclear factor
<b>BRG1</b> : BRM-associated factor	<b>HP1</b> : heterochromatin protein 1
<b>BRM</b> : Brahma	<b>hTERT</b> : human telomerase reverse transcriptase
<b>BTG2</b> : B-cell translocation gene 2	<b>IAP</b> : Inhibitor of apoptosis protein
<b>Bub</b> : budding uninhibited by benzimidazoles 1 yeast homolog gene	<b>Id1</b> : inhibitor of differentiation 1
<b>CA</b> : Cyclin A	<b>IL</b> : Interleukin
<b>CAD</b> : caspase activated nuclease	<b>INK4</b> : Inhibitory cyclin associated kinase
<b>CAK</b> : Cdk activation kinase	<b>JAK</b> : janus kinase
<b>CB</b> : cyclin B	<b>JMY</b> : junction-mediating and regulatory protein
<b>Cbl</b> : Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence	<b>JNK</b> : Jun amino-terminal kinase
<b>CBP</b> : CREB binding protein	<b>KIP1</b> : kinase inhibitor protein 1
<b>Cdk</b> : cyclin dependent kinase	<b>KSP</b> : Kinesin spindle protein
<b>CD</b> : cyclin D	<b>LFS</b> : Li-Fraumeni syndrome
<b>cdc</b> : cell division cycle	<b>LIF</b> : Leukemia inhibitory protein
<b>cdt1</b> : chromatin licensing and DNA replication factor 1	<b>LPS</b> : Lipopolysaccharide
<b>CE</b> : cyclin E	<b>Mad2</b> : mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)
<b>CHK1/2</b> : checkpoint kinase 1/2	<b>MAPK</b> : Mitogen activated protein kinase
<b>Chip</b> : chromatin immunoprecipitation	<b>Mcl1</b> : myeloid cell leukemia sequence 1
<b>CIN</b> : chromosomal instability	<b>MCM</b> : Mini chromosome maintenance
<b>Cip</b> : cdk interacting protein 1	<b>Mdc1</b> : mediator of DNA damage checkpoint 1
<b>CKI</b> : cyclin kinase inhibitor	<b>Mdm 2</b> : mouse double minute 2
<b>CK1</b> : casein kinase 1	<b>MIN</b> : microsatellite instability
<b>CML</b> : chronic myeloid leukemia	<b>MTCO2</b> : Mitochondrial cytochrome c oxydase 2
	<b>Miz1</b> : Msx-interacting-zinc finger protein 1



**MK** : MAPKactivated protein kinase  
**MKP** : MAPK phosphatase  
**MLH1** : mutL homolog 1  
**MMP** : metalloproteinase  
**MMR** : Mismatch repair  
**MnSOD** : Manganèse superoxyde dismutase  
**MPF** : Maturing promoting factor  
**MPS1** : Monopolar spindles 1  
**MRN** : Mre11 Rad50 NBS1 complex  
**Mre11** : meiotic recombination 11 yeast homolog  
**MSH2** : mutS homolog 2  
**mSin3** : mamallian Sin3 yeast homolog  
**m-Tor** : mammalian target of rapamycin  
**Mus81** : p6ethyl methansulfonate, UV sensitive 81 endonuclease  
**Myt1** : Membrane associated, tyrosine and threonine specific cdc2 inhibitory kinase  
**NBS1** : Nijmegen breakage syndrome gene  
**NCOA1** : nuclear coactivator 1  
**NER** : nucleotide excision repair  
**NES** : Nuclear export sequence  
**NF-Y** : Nuclear transcription factor Y  
**NHEJ** : non homologous end-joining  
**NLS** : Nuclear localisation sequence  
**NPM** : Nucleophosphamin  
**NRTK** : Non receptor tyrosine kinase  
**NSCLC** : Non small cell lung cancer  
**ORC** : Origin replication complex  
**PARP** : poly(ADP-ribosyl)transferase  
**PCAF** : p300/CBP associated factor  
**PcG** : Polycomb group complex  
**PCNA** : proliferating cell nuclear antigen  
**PDGF** : platelet-derived growth factor  
**PERP** : p53 apoptosis effector related to PMP-22  
**PIG3** : p53 inducible gene 3  
**PI3K** : phosphatidyl inositol 3 kinase  
**PKC** : protein kinase C  
**PLK** : Polo-like kinase  
**PML** : promyelocytic leukemia gene  
**PNKP** : poly nucleotide kinase phosphatase  
**PRC1/2** : Polycomb repressive complex 1/2  
**PSA** : prostate-specific antigen  
**Pré-RC** : pre replication complex  
**PRMT** : protein R(arginine) methyltransferase  
**P-Tefb** : positive-transcription elongation factor  
**PTEN** : Phosphatase and tensin deleted on chromosome 10  
**PUMA** : p53 upregulated modulator of apoptosis  
**p53AIP1** : p53 apoptosis inducing protein1  
**p53BP1** : p53 binding protein 1  
**p53RFP** : p53-inducible RING-finger protein  
**Rb** : Retinoblastoma  
**RFC** : Replication factor C  
**RHA** : RNA helicase A  
**ROS** : reactive oxygen species  
**RPA** : replication protein A  
**RPL** : ribosomal proteine L  
**RSC** : Remodel the Structure of Chromatin complex  
**RSK** : Ribosomal S6 kinase 1  
**RTK** : Receptor tyrosine kinase  
**SAHF** : senescence associated heterochromatin foci  
**SAP** : serum amyloïd P  
**SCF** : Skp1-cullin-Fbox  
**SHP1/2** : Src homology region 2 [SH2]-domain phosphatase 1/2  
**SH2/3** : src homology 2/3  
**SKI** : Src kinase inhibitor  
**Smc1** : Structural maintenance of chromosomes 1  
**SOCS** : suppresor of cytokine signalling  
**SRC1A** : steroïd receptor coactivator  
**SSBR** : Single strand break repair  
**STAT** : signal transducer and activator of transcription  
**SUMO** : small ubiquitin related modifier  
**Suv39H** : Su(var)3-9 homolog  
**Swi/Snf** : Switching/Sucrose non fermenting  
**TACE** : TNF-alpha converting enzyme  
**Tcf** : Ternary complex facor  
**TDP1** : tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1  
**TFIIH** : Transcription factor complex H for gene class II  
**TGF $\alpha/\beta$**  : Transforming growth factor  $\alpha/\beta$   
**TIGAR** : TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator  
**TIMP1** : tissual inhibitor of metalloproteinase 1  
**TNF** : Tumor necrosis factor  
**TopBP1** : Topoisomerase binding protein 1  
**TOPO I/II** : topoisomerase I/II  
**TRF2** : telomeric repeat factor 2  
**Ub** : Ubiquitine  
**Ubc9** : ubiquitin-conjugating enzyme 9 yeast homolog  
**uPA** : Urokinase-type plasminogen activator  
**UTR** : untranslated region  
**VEGF** : vascular endothelial growth factor  
**WRN** : Werner syndrom gene  
**XPA** : xeroderma pigmentosum, complementation group A  
**XPF** : xeroderma pigmentosum, complementation group F  
**XRCC** : X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells  
 **$\beta$ TrCP** :  $\beta$ -transducin repeat-containing protein  
**5-FU** : 5 Fluorouracil

# *Introduction*

*Partie 1 : Mécanisme et contrôle de la  
tumorigenèse*

# **Chapitre I : Caractéristiques et régulations du cycle cellulaire**

Les cellules cancéreuses se caractérisent dans un premier temps par une dérégulation de leur cycle cellulaire. Ceci leur permet de proliférer de manière incontrôlée et d'envahir petit à petit le tissu environnant. Dans cette première partie, nous allons tout d'abord décrire quels sont les mécanismes du cycle cellulaire puis les effets des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur sur ce cycle cellulaire. Dans un second temps, nous analyserons par quels mécanismes la tumorigenèse est mise en place au sein du tissu sain et quel sont les moyens de protection dont dispose l'organisme pour lutter contre la progression tumorale.

## **A) Le cycle cellulaire**

Depuis la fin du 19<sup>ème</sup> siècle et la caractérisation de la mitose par Walter FLEMMING, il est connu que tous les organismes eucaryotes, animaux, végétaux et microorganismes, sont composés de cellules qui se reproduisent par division. FLEMMING décrivit cette division en deux étapes majeures, une étape de division cellulaire proprement dite puis une étape de croissance cellulaire. Il observa la répétition de ces deux étapes de manière cyclique et supposa l'existence d'un mécanisme régulant l'enchaînement de ces étapes, mécanisme appelé aujourd'hui cycle cellulaire.

### **1. Les phases du cycle cellulaire et le MPF**

Depuis les travaux de Flemming, les connaissances du cycle cellulaire se sont beaucoup améliorées. Le rôle majeur du cycle est d'assurer la bonne transmission de l'information génétique de la cellule mère vers les deux cellules filles. Ce cycle cellulaire se compose de quatre phases majeures. Au cours la première phase appelée G1 (Gap1), la cellule intègre les différents signaux de son environnement mais aussi les signaux internes. La seconde phase est la phase de réplication de l'ADN appelée phase S (Synthesis). Au cours de cette phase la cellule réplique son matériel génétique ainsi que le centrosome. Après la fin de la réplication, la cellule entre dans une nouvelle phase du cycle cellulaire appelée G2 (Gap2) où elle contrôle la réplication et prépare la mitose. Enfin la dernière phase est la phase de division cellulaire plus connue sous le nom de mitose où les chromosomes sont séparés en deux lots exactement identiques entre les deux cellules filles.

Les mécanismes à l'origine de ces différentes phases ne commencèrent à être compris qu'à partir de 1971 et la découverte du maturing promoting factor. La microinjection d' un

ovocyte de Xénope avec du cytoplasme d'un ovocyte stimulé par de la progestérone induit l'entrée en méiose du premier ovocyte non stimulé (1;2). Il existait donc un facteur dans la cellule stimulée capable d'activer l'entrée en méiose. Ce facteur fut appelé le maturing promoting factor ou MPF. Des études réalisées grâce à des mutants thermosensibles qui bloquent le cycle cellulaire entre les phases G1/S et G2/M chez la levure ont confirmé l'hypothèse du MPF (3;4). Finalement une étude réalisée dans le laboratoire de Tim Hunt a montré que deux protéines appelées cyclines A et B présentent périodiquement une accumulation et une dégradation au cours du cycle cellulaire et ciblent l'entrée en mitose (5).

L'aboutissement de l'ensemble de ces travaux fut obtenu en 1988 lors de la purification et l'analyse des composants du MPF dans le laboratoire de James Maller (6). Le MPF est composé de deux protéines : la cycline B et cdc2, la cycline B constituant la sous-unité régulatrice de la protéine kinase.

## **2. Rôles et cibles des complexes cycline-cdk**

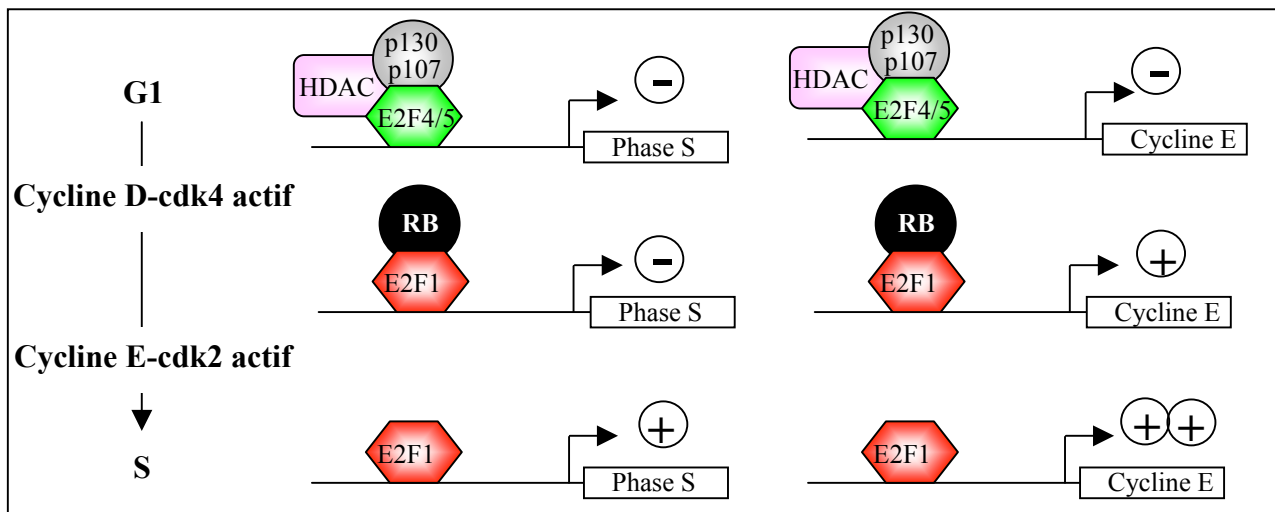
La caractérisation du MPF a permis de découvrir d'autres complexes cycline-cdk. Six complexes majeurs ont été caractérisés chez l'homme et la souris au cours des années 1990. Comme pour le MPF, l'activation des différents complexes repose sur l'apparition de la sous-unité régulatrice (cycline) qui va alors activer la kinase cdk, qui elle est présente tout au long du cycle cellulaire.

La transition de la phase G1 à la phase S repose sur deux éléments essentiels : le premier est l'activation des gènes nécessaires à la réplication (appelés ensuite gène de la phase S par commodité) et le second est l'ouverture des fourches de réplication. Le premier point repose sur l'interaction physique et fonctionnelle de deux familles de protéines : les facteurs de transcription E2Fs et les "pockets" protéines de la famille du rétinoblastome Rb (Rb, p107 et p130). Les facteurs de transcription E2Fs régulent les gènes permettant la réplication de l'ADN, tandis que les protéines de la famille Rb lient ces facteurs et inhibent l'activation de leurs gènes cibles. Deux types de complexes cycline-cdk, cycline D-cdk4/6 et cycline E-cdk2, vont intervenir dans la régulation des interactions entre ces deux familles de protéine et vont donc être à l'origine de la transition vers la phase S (7).

Ils existent deux types de facteurs E2Fs. Les facteurs répresseurs E2F4 et E2F5 inhibent la transcription. Ils ne possèdent pas de séquence d'import dans le noyau (séquence NLS) (8) et sont presque toujours associés aux protéines p107 et p130 (qui permettent leur import dans le noyau) (9;10). Le second type de facteurs E2Fs est au contraire activateur de la

transcription. On trouve dans cette famille les protéines E2F 1, 2 et 3. Ces facteurs agissent de façon séquentielle au niveau des gènes de la phase S.

En début de phase G1, la majorité des gènes de la phase S est occupée par des facteurs E2Fs répresseur (E2F4/5) complexés à p107/p130. Ces complexes protéiques recrutent des histones déacétylase tel que HDAC1 (11) ou HDAC2 (12) et sans doute des méthyltransférases tel que Suv39H1(13) et PRMT5 (14) qui vont par leur activité induire une condensation de la chromatine et empêcher l'accessibilité des promoteurs aux facteurs de transcription E2Fs activateurs (E2F1-3).



**Figure 1 :** Activation des gènes de la phase S lors de la transition G1/S

L'activation du gène de la cycline E par le complexe cycline D-cdk4 permet la formation du complexe cycline E-cdk2 qui active l'ensemble des gènes de la phase S

Lors d'une stimulation mitogénique induisant le passage vers la phase S (figure 1), l'expression de la cycline D permet l'activation des complexes cyclines D/cdk4-6. Ces complexes phosphorylent les trois membres de la famille de Rb (15;16). La phosphorylation de p130 inhibe son interaction avec les facteurs E2Fs répresseurs (15) qui sont alors exportés du noyau. Ceci active la transcription des gènes E2Fs activateurs, étant eux-même régulés par les facteurs E2F4 et 5 (17). Ceci est important car l'activité des facteurs E2Fs activateurs est nécessaire pour la transcription des gènes de la phase S. Ces facteurs sont réprimés par la protéine Rb qui recrute comme p130 des histones déacétylases et des histones méthyltransférases (SUV39H par exemple). De plus Rb recrute des protéines capables de déplacer les nucléosomes comme Brg et Brm qui répriment la transcription en augmentant la densité de nucléosomes au niveau du site d'initiation (18). La phosphorylation de Rb par les complexes cyclines D/cdk4-6 inhibe le recrutement sélectif de certains cofacteurs tel que les HDAC (19) mais pas celui d'autres tel que les protéines Brg/Brm (20). Par contre ces

phosphorylations n'empêchent pas la liaison entre les E2Fs activateurs et Rb (19). Ainsi les complexes cyclines D/cdk4-6 n'activent pas la majorité des gènes de la phase S. En revanche, au niveau de certains gènes dont celui de la cycline E, l'absence d'E2F répresseur couplée à l'absence d'activité des HDACs est suffisante à l'activité du gène (21) L'activation du gène de la cycline E permet alors l'entrée de la cellule en phase S. La cycline E se lie et active la kinase cdk2 qui va alors avoir deux actions principales. La première va être de compléter la phosphorylation de Rb (19) et de permettre la libération des facteurs de transcriptions E2Fs activateurs permettant ainsi d'activer l'ensemble des gènes de la phase S. De plus les cofacteurs de la transcription des facteurs E2Fs vont aussi être la cible de ces complexes. Les histones acétyltransférases (HAT) tel que CBP et p300 sont activées par ces complexes (22;23) tandis que les facteurs de remodelage de la chromatine BRG1 sont phosphorylés ce qui empêche leur interaction avec Rb.

La seconde activité du complexe cycline E/cdk2 est de permettre l'activation des facteurs nécessaires à l'initiation de la réplication. L'initiation de la réplication nécessite la phosphorylation du complexe hélicase formé des protéines MCM2-7 et le recrutement du facteur cdc45 (24;25). Le complexe cycline E-cdk2 phosphoryle les protéines MCMs, ce qui facilite la phosphorylation de ces mêmes protéines MCMs par la kinase cdc7 (26). La phosphorylation du complexe MCM aboutit au recrutement du facteur d'initiation cdc45 qui permet l'initiation proprement dite de la réplication en permettant le déroulement de la double hélice, le recrutement de la protéine rpa qui stabilise l'ADN simple brin et enfin le recrutement des ADN polymérases  $\alpha$  et  $\epsilon$  qui initient la réplication (27).

Au cours de la réplication, les cyclines E et D vont progressivement disparaître au profit des cyclines A puis B permettant la formation de 3 nouveaux complexes cycline A-cdk2, cycline A-cdk1 et cycline B-cdk1. L'activité principale de ces complexes va être de réguler la réplication, l'entrée en mitose puis les premières étapes de la mitose.

L'expression de la cycline A commence à augmenter à la transition G1/S quand les facteurs E2Fs sont complètement activés. Comme le complexe cycline E-cdk2, cycline A-cdk2 régule l'ouverture des fourches de réplication (28). Au cours de l'élongation de la réplication, le complexe reste localisé dans les foci de réplication et continue de décondenser la chromatine en phosphorylant H1(29). En plus de cela de nombreuses protéines participant à l'élongation de la réplication sont phosphorylées par ce complexe. On peut citer par exemple l'ADN polymérase  $\delta$  ou RCF qui permet de charger la polymérase sur l'ADN (30). Ces phosphorylations sont importantes car l'élongation de la réplication est ralentie si l'activité du complexe cycline A-cdk2 est inhibée (31).

A la fin de la réplication, l'activité des facteurs E2Fs est renforcée sur les gènes nécessaires à la mitose. Le complexe cycline A-cdk2 permet l'activation des facteurs de transcriptions b-myb, NF-Y et FoxM (32-34). La phosphorylation de ces facteurs de transcription permet d'augmenter leur activité transcriptionnelle en favorisant le recrutement de cofacteurs activateurs de la transcription. Cependant, ces phosphorylations peuvent également augmenter la liaison à l'ADN ou faciliter leur entrée dans le noyau comme c'est le cas pour NF-YC une des trois sous unités du facteur de transcription NF-Y (35).

Ces facteurs de transcription, conjointement avec E2F permettent d'activer le gène de la cycline B, les gènes nécessaires à l'activation du complexe cycline B/cdk1 et les gènes mitotiques (36). L'activation du complexe cycline B/cdk1 va permettre le déclenchement de la mitose. Ce complexe initie la formation du fuseau mitotique en phosphorylant des protéines du centrosome. Il permet également la disparition de la membrane nucléaire en phosphorylant les lamines nucléaires. Enfin, avec les complexes cycline A-cdk2 et cyclineA-cdk1, il induit la condensation des chromosomes (37). La cycline A est dégradée peu-après la condensation des chromosomes tandis que la cycline B est dégradée lorsque commence l'anaphase. Ces deux protéines sont dégradées par un système de conjugaison à l'ubiquitine reposant sur l'activité de la protéine APC/C (38).

### **3. Régulation des complexes cycline/cdk**

La régulation des complexes cyclines/cdk repose sur la synthèse et la dégradation des cyclines ainsi que sur la phosphorylation des cdk. La régulation transcriptionnelle des cyclines permet leur expression au cours du cycle. Cependant, l'activation des gènes codant les cyclines n'est pas suffisante à leur expression. Par exemple l'expression de la cycline D nécessite d'activer en plus de la transcription, la stabilisation de son ARNm et l'activation de la traduction de cet ARNm par la kinase mTor. Cette kinase est sensible à la présence de nutriment en quantité suffisante (39). De plus la cycline D est contrôlée par un système de dégradation ciblée. La cycline D est une cible la kinase GSK3 $\beta$ . La phosphorylation de la cycline D sur la thréonine 286 induit sa dégradation par un système de conjugaison à l'ubiquitine reposant sur le complexe SCF-ubiquitinE3 ligase ( Skp1-cullin-Fbox) (40).

De la même manière la cycline E est dégradée par un autre complexe ubiquitine ligase SCF Skp1-cullin-Skp2. La cycline A induit une titration de cdk2 qui démasque le motif de conjugaison à l'ubiquitine et permet la dégradation de la cycline E par le complexe SCF (41). Les cyclines A et B sont elles aussi régulées par un système de conjugaison à l'ubiquitine reposant sur l'ubiquitine E3 ligase APC/C activée au cours de la mitose (36).



La cdk est elle-même régulée. La régulation des cdk se fait par un jeu de phosphorylations inhibitrices et activatrices. Le complexe CAK (cycline H/cdk7/Mat1) phosphoryle la Thr 160 de cdk2 et les Thr équivalentes des autres cdk (4, 6, et 1), ce qui permet à ces cdk de contacter leur substrat en dégageant l'entrée du site de contact au substrat (42). Les kinases Myt1 et Wee1 phosphorylent respectivement la Thr 14 et la Tyr15 des complexes cycline A/B-cdk1 et cycline E/A-cdk2. Ces deux phosphorylations inhibent leur activité et empêchent l'entrée prématurée de la cellule en phase S ou en mitose (43). Ces phosphorylations inhibitrices de cdk2 et cdk1 nécessitent donc la présence dans la cellule de phosphatases qui vont déphosphoryler les résidus 14 et 15 de cdk1 et cdk2 permettant ainsi de libérer l'activité kinase de ces protéines. Ces phosphatases appartiennent à la famille des cdc25s. Il existe trois membres cdc25 A, B et C. cdc25A cible plus particulièrement cdk2 et est nécessaire à l'induction de la réplication. cdc25B et C déphosphorylent cdk1 et permettent l'entrée en mitose de la cellule à la fin de la phase G2 (44).

Le dernier niveau de régulation des complexes cycline-cdk est la présence d'inhibiteur endogène appelé CKI pour "cyclin dependent kinase inhibitor". Il existe deux familles de CKI. Les protéines de la famille INK4 telles que p16 inhibent le complexe cycline D-cdk4/6 en perturbant la liaison entre les deux partenaires (45). Ces protéines sont donc principalement activées en G1 et empêchent le passage de la cellule en phase S. Les CIP/KIP protéines dont font parties les protéines p21 et p27 sont capables de se lier et d'inhiber tous les complexes cycline-cdk (46). p27 participe à la régulation de la transition G1/S en inhibant l'activation de cdk2. La transition vers la phase S nécessite d'inhiber l'activité de p27 via sa titration par le complexe cycline D-cdk4 (47) ou via sa dégradation par SCF Skp1-cullin-Skp2 (41). Le rôle de p21 est le même que celui de p27, cependant l'activation de p21 répond souvent à des situations de stress (48). Quand l'expression de p21 est activée, la protéine permet l'arrêt du cycle cellulaire indépendamment de la phase dans laquelle la cellule se trouve. Cependant l'inhibition des complexes cycline D-cdk4 et cycline B-cdk1 par p21 est sujet à débat car des expériences ont montré la présence de p21 dans des complexes catalytiquement actifs (47;49). En fait p21 pourrait participer à l'activation des complexes impliquant cdk4 et cdk1 en facilitant l'association entre les deux partenaires. p21 serait alors seulement impliqué dans l'inhibition de la transition G1/S ou de la réplication via l'inhibition de cdk2.

## **B) Les oncogènes**

### **1. Définition et découverte des oncogènes**

Les oncogènes ont été découverts dans les années 1970 dans l'équipe de Peter Vogt. L'inoculation de fibroblastes infectés par le Rous sarcoma virus dans des poulets induit la formation rapide de tumeur en 1 à 2 semaines (50). L'oncogène se définit donc comme une séquence génétique capable de transformer des fibroblastes en culture (les cellules prolifèrent de manière illimitée et ne sont plus sensibles à une perte d'adhésion) et d'induire des tumeurs chez le poulet ou la souris. Les oncogènes cellulaires sont appelés proto-oncogène, ceci afin de retranscrire le fait que ces gènes codent pour des protéines potentiellement oncogéniques.

### **2. Effet des oncogènes sur le cycle cellulaire : exemple de c-src, c-myc et cdc25A**

Les oncogènes perturbent le cycle cellulaire, l'adhérence cellulaire et l'apoptose. Nous nous concentrerons ici sur le rôle des oncogènes au niveau du cycle cellulaire, et sur les oncogènes c-src, c-myc et cdc25A que nous avons étudiés dans notre travail.

De nombreux oncogènes possédant une activité tyrosine kinase sont présents à la membrane plasmique. Parmi ces oncogènes on trouve des récepteurs membranaires (l'EGFR par exemple) ou des protéines sous membranaires, comme c-src, transductrices du signal des facteurs de croissance (51). c-src, à l'instar de son homologue viral peut induire la transformation de fibroblastes murins capables de proliférer en milieu semi-liquide et d'induire des tumeurs chez des souris nude (52). Cependant l'effet transformant de c-src est moins fort que celui de v-src. L'oncogène c-src agit de façon synergique avec d'autres oncogènes comme l'EGFR (53). c-src est une protéine régulée à trois niveaux. La phosphorylation inhibitrice sur la tyrosine 530 est catalysée par la protéine Csk. Cette phosphorylation replie la molécule sur elle-même, empêche son activation sur la tyrosine 416 phosphorylée par le récepteur tel que l'EGFR et favorise l'ubiquitination de la protéine par la protéine c-cbl (51). La perturbation de ces mécanismes permet l'activation constitutive de c-src qui maintient alors de façon soutenue et durable les voies de signalisation activatrices des complexes cycline D-cdk4 et cycline E-cdk2. Deux points essentiels expliquent ces effets. Le premier est que c-src permet le recyclage des récepteurs membranaires aux facteurs de croissance en inhibant leur dégradation (54). Le second est que c-src induit l'activation de plusieurs facteurs de transcription dont les facteurs STAT3. Ceci est important car STAT3 est absolument requis pour l'activité transformante de v-src et joue donc certainement un rôle important pour celle de c-src (55).

D'autres oncogènes sont des facteurs de transcription. On peut citer les protéines c-fos c-jun formant le complexe AP1, le facteur de transcription c-myc ou encore les protéines de la famille Ets. Ces facteurs dépendent normalement des voies de signalisation issues des récepteurs de croissance. Ils sont constitutivement activés au sein des tumeurs et permettent d'activer de façon indirecte les complexes cycline E-cdk2 (56;57). Au cours de nos travaux nous nous sommes particulièrement intéressé au facteur de transcription c-myc. Des souris mutantes possédant un transgène codant la protéine c-myc sous le contrôle du promoteur des chaînes lourdes des immunoglobulines développent rapidement des lymphomes (58). De façon similaire, des souris inoculées par des fibroblastes murins transfectés par un vecteur codant l'oncogène c-myc sous le contrôle d'un promoteur viral développent rapidement des tumeurs (59). Ce facteur de transcription active l'entrée des cellules en phase S à trois niveaux. c-myc active des gènes comme la cycline D2, cdc25A ou encore SCF(skp2) qui vont permettre d'activer le complexe cycline E-cdk2 (60-62) et peut réprimer les gènes codant les protéines p21 et p27, inhibiteurs de ces mêmes complexes (63). De plus c-myc induit la transcription de gènes participant directement à la réplication tel que l'ornithine décarboxylase, impliquée dans la synthèse des bases azotées (64). Enfin c-myc active la machinerie traductionnelle nécessaire à l'expression des histones (65). c-myc active l'ARN polymérase III, le facteur de traduction eIF4E, de nombreuses protéines ribosomales (S19, L3, L32 par exemple) et des protéines facilitant l'assemblage des ribosomes au niveau du nucléole tel que la nucléoline ou la nucleophosmine B23 qui participe à la maturation des pré-ARNribosomiaux (66). Ainsi l'activation constitutive de c-myc permet d'activer l'entrée des cellules en phase S en absence de tout signaux prolifératifs.

Le dernier type d'oncogène qui nous a intéressé au cours de ces travaux sont ceux capables de réguler de façon directe les complexes cycline-cdk, notamment les complexes cycline E-cdk2 ou cycline D-cdk4/6. Les phosphatases cdc25A activatrices des kinases cdk2 sont ainsi oncogéniques (67). En plus de supprimer la phosphorylation inhibitrice de cdk2, cdc25A limite la liaison de p21 et p27 sur le complexe cycline E-cdk2 car ces trois protéines possèdent le même site de liaison sur cdk2 (68). Ainsi une surexpression de cdc25A, diminue le seuil d'activité nécessaire du complexe cycline D-cdk4/6 pour l'activation du complexe cycline E-cdk2 favorisant ainsi l'entrée prématurée des cellules en phase S. Ces protéines coopèrent avec une protéine mutée de ras et induisent des tumeurs chez la souris (67). Ces tumeurs sont de haut grade et possèdent un karyotype très altéré. Le rôle de cdc25A au niveau du point de contrôle de la phase S sur lequel nous reviendrons est sans doute important pour expliquer le phénotype observé.

## C) Les gènes suppresseurs de tumeur

### 1. Découverte des gènes suppresseurs de tumeur et définition

Le premier gène suppresseur de tumeur a été découvert grâce à un rare syndrome affectant de jeunes enfants : le rétinoblastome, tumeur héréditaire de l'œil. Le karyotype de ces personnes démontre l'absence d'une bande spécifique du chromosome 13 dans l'un des deux chromosomes de chaque cellule de l'individu. En 1971, Alfred Knudson propose l'hypothèse selon laquelle il existe un gène essentiel protégeant la cellule rétinienne contre la tumorigenèse dans cette région spécifique du chromosome 13 (69). De plus, le développement du rétinoblastome doit nécessiter la perte du deuxième allèle codant ce gène appelé alors suppresseur de tumeur. Le clonage de cette région a permis d'identifier ce gène nommé Rb (pour rétinoblastome). Les cas familiaux présentent une mutation germinale de Rb sur l'un des deux allèles et une perte d'hétérozygotie entraîne une perte complète de la fonction de Rb (figure 2). Des mutations ou des pertes du gène Rb ont ensuite été fréquemment observées dans plusieurs carcinomes du poumon, ou du sein par exemple (70;71).

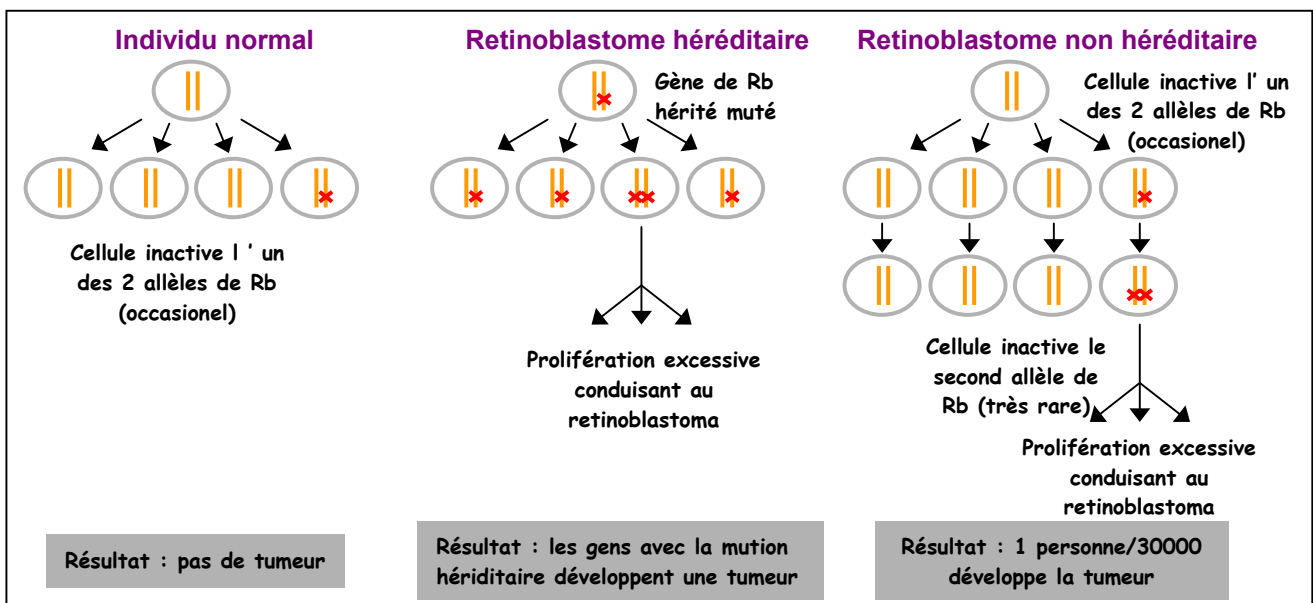


Figure 2 : L'hypothèse de Knudson et le gène du rétinoblastome (69)

La détection de nouveaux gènes suppresseurs de tumeurs a nécessité un gros effort de détermination des sites d'hétérozygotie (nous sommes hétérozygotes sur 1 base sur mille environ). L'analyse de la perte d'hétérozygotie par comparaison de la tumeur et du tissu sain a permis de découvrir d'autres gènes suppresseurs de tumeur comme p53 (72). Au sein des leucémies induites par le virus de Friend, les cellules tumorales portent deux allèles altérés de p53 tandis que dans les cellules saines, seul un allèle au maximum est manquant (73). Ce gène répondait ainsi à l'hypothèse de Knudson.

## **2. Effet des gènes suppresseurs de tumeur : l'exemple de Rb et p53**

Il existe aujourd'hui de nombreux gènes suppresseurs de tumeur répondant à l'hypothèse de Knudson. On peut par exemple citer la phosphatase PTEN qui inhibe la voie des PI3kinase AKT ou la protéine chk1 qui permet l'activation du point de contrôle de la phase S. Cependant nous nous appuierons ici sur deux exemples p53 et Rb qui nous ont plus particulièrement intéressés au cours des travaux présentés par la suite.

### a) Le rôle de Rb en tant que gène suppresseur de tumeur

Les fonctions de Rb s'articulent autour de trois points essentiels. Premièrement Rb permet de coordonner l'entrée des cellules en phase S ou la sortie de quiescence, avec la présence de signaux de prolifération. Le contrôle des facteurs E2F1 est ici un élément important de sa fonction. Comme nous l'avons dit précédemment, ce contrôle repose sur l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de ces facteurs et sur le recrutement de protéines histones déacétylase ou de remodelage de la chromatine.

Deuxièmement, Rb maintient la différenciation cellulaire en réprimant de manière définitive les gènes de prolifération au sein des tissus matures. Un des phénotypes tumoraux le plus caractéristique est la perte de l'état différencié. Le maintien de cet état par Rb garantit une protection efficace contre la tumorigenèse. Ces effets nécessitent le recrutement des histones méthyltransférase PRC1 et PRC2 qui méthylent les lys 27 des histones H3 et participent à la mise en place de nombreux tissus différenciés durant le développement (74).

Enfin, Rb bloque de manière définitive l'expression des gènes de la phase S dans un tissu en prolifération via le recrutement des histones méthyltransférases Suv39H (75). Ces enzymes induisent une triméthylation de la lysine 9 des histones H3 favorisant l'hétérochromatinisation des gènes de la phase S incapables alors d'être induits même en présence de signaux prolifératifs (76). Cette fonction de Rb ne s'observe que dans des cellules en croissance soumises à un fort stress comme la sénescence répllicative, l'hypoxie ou le stress oxydatif, et enfin les dommages de l'ADN qui activent Rb via p16 et p21.

Ces trois points font de RB une protéine centrale contre la progression tumorale. Rb est ainsi fréquemment inactivé dans les cellules cancéreuses. De plus, un très grand nombre de tumeurs, présentent une inactivation du gène INK4A codant la protéine p16 (77). Comme nous l'avons dit précédemment, p16 est activé lors de stress, et empêche alors la progression du cycle cellulaire en condition non favorable pour la cellule. Sa perte induit une activation des complexes cycline-cdk de la phase G1 de manière incontrôlée et inhibe donc les fonctions de Rb. Enfin, Rb peut également être inactivé directement par les oncogènes viraux (78).

### b) Le gène suppresseur de tumeur p53

Le facteur de transcription p53 est activé au cours de l'oncogenèse par les signaux de stress qui sont associés à cette pathologie. Nous reviendrons sur ce point dans le chapitre suivant. p53 permet d'activer l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence, l'apoptose ou la réparation des dommages de l'ADN.

#### i. Mise en évidence du rôle de p53 contre la progression tumorale.

Des souris transgéniques n'exprimant pas p53 développent rapidement des tumeurs de types sarcomes et lymphomes (79;80). L'importance de p53 a également été démontrée par l'analyse du syndrome de Li-Fraumeni (LFS). Les patients atteints possèdent une mutation germinale de p53 et développent rapidement des carcinomes. Cependant, les souris où p53 a été inactivé ne développent pas le même profil tumoral que les patients atteints de LFS. De façon similaire, les sarcomes sont rares chez l'homme qui développe plutôt des carcinomes possédant des formes mutées de p53. Des modèles murins dans lequel un des deux allèles codant pour p53 a été remplacé par une des formes mutées de la protéine retrouvée chez ces patients ont permis de mimer le LFS. Ces souris ne développent plus de sarcomes mais des carcinomes. D'après ces modèles, il apparaît que les mutations de p53 apparaissant au cours de la progression tumorale dans les épithéliums modifient la fonction de p53 qui pourrait alors favoriser la progression tumorale au lieu de l'empêcher (81).

#### ii. p53 induit l'arrêt du cycle cellulaire

p53 active des gènes inhibiteurs du cycle cellulaire comme p21, BTG2, Gadd45 ou 14.3.3 $\sigma$  (82;83). Ces protéines bloquent le cycle dans les phases G1 et G2. p21 inhibe les complexes cycline-cdk, notamment les complexes cdk2. Le rôle de p21 s'est vu confirmé grâce à des modèles murins où le gène de p21 est supprimé. Ces souris développent spontanément des tumeurs de façon tardive, et sont plus susceptibles aux agents carcinogènes (84;85). De plus l'absence de p21 favorise le développement de tumeur mammaire dans un modèle murin de souris exprimant l'oncogène Ras (86). Ces fonctions de p21 sont dépendantes de p53 car l'absence de p21 n'augmente pas le risque de tumeur chez des souris où le gène de p53 a été inactivé (87). BTG2 inhibe quant à lui l'expression des cyclines D et E (82). Enfin Gadd45 et 14.3.3 $\sigma$  seraient plutôt impliqués dans l'inhibition du complexe cycline B/cdk1 (83). Gadd45A inhibe la formation du complexe en se liant à cdk1. La cycline B est alors exportée vers le cytoplasme où elle est retenue inactive par 14.3.3 $\sigma$ .

L'arrêt du cycle cellulaire induit par p53 est aussi dû à l'inhibition de gènes de façon directe ou indirecte par p53. p53 est recruté de manière indirecte sur des gènes comme cdk1

ou la cycline B, notamment via le facteur NF- $\kappa$ B, et induit le recrutement de HDAC1, 4 et 5 (88). Ceci est associé à l'inhibition de ces gènes. De façon similaire, p53 est recruté directement sur le promoteur de c-myc, ce qui induit l'inhibition du gène via le recrutement de corepresseurs à activité histone déacétylase mSin3A (89). Cet effet est essentiel, au moins dans certaines conditions, à l'activation du point de contrôle de la phase G1 par p53.

### iii. p53 active l'apoptose

p53 active plusieurs gènes proapoptotiques tel que les protéines à seul domaine BH3 (NOXA, PUMA, Bid), des protéines de mort tel que Bax ou p53AIP1 et enfin les protéines sensibilisant à l'apoptose induite par le système immunitaire tel que Fas et Daxx (83;90). Les protéines à seul domaine BH3 sont essentielles à l'activité proapoptotique induite par p53. Elles activent les protéines de mort en interagissant avec les protéines de survie tel que Bcl-2 ou Bcl-XL. Ainsi, des souris transgéniques possédant un gène de PUMA inactivé présentent des perturbations du programme apoptotique remarquablement similaire à celles observées dans des souris déficientes pour le gène de p53 (91). Enfin, des études récentes montrent que p53 peut induire l'apoptose indépendamment de son activité transcriptionnelle en induisant la dépolarisation de la membrane mitochondriale via une activité similaire à celle des protéines à unique domaine BH3 (p53 fixerait notamment la protéine de survie Mcl-1) (90).

### iv. Les autres fonctions de p53

p53 limite la formation de métastases via l'activation des protéines Maspin (92). Les Maspin sont des gènes suppresseurs de tumeur de la famille des serpins qui empêchent la migration des cellules tumorales mais aussi des cellules endothéliales inhibant ainsi la formation de métastase et l'angiogénèse.

p53 régule également le métabolisme cellulaire, via l'expression de TIGAR, une protéine inhibitrice de la glycolyse. L'inhibition de la glycolyse pourrait favoriser l'élimination des cellules en cours de cancérisation, car au cours de celle-ci, la glycolyse devient le seul mode de production d'énergie de la cellule. De plus l'inhibition de la glycolyse diminue la production de radicaux libres de l'oxygène, protégeant ainsi la cellule des dommages de l'ADN par exemple (93).

Cette fonction de p53 est en accord avec sa fonction de gardien du génome. p53 active des gènes de réparation de l'ADN comme XPC impliqué dans le « nucleotide excision repair » (NER) et MSH2 impliqué dans le « Mismatch Repair » (94) En plus de son rôle transcriptionnel, p53 aurait ici des rôles plus directs. Les cassures de l'ADN ou l'altération des bases azotées engendrés par les radicaux libres de l'oxygène ou le rayonnement UV recrutent p53 au sein de complexes de réparation. p53 facilite alors la décondensation de la

chromatine, ce qui favoriserait le recrutement des différentes protéines participant au NER. p53 potentialise aussi l'activité enzymatique de protéines du BER tel que Ape1. Comme nous le verrons, l'altération du génome est l'un des moteurs de la carcinogenèse, ainsi la réparation de l'ADN induite par p53 favorise le contrôle de cette carcinogenèse.

Finalement, une autre fonction importante de p53 est l'activation de gènes impliqués dans son propre contrôle. p53 active par exemple l'ubiquitine E3 ligase Hdm2 (Mdm2 chez la souris) qui induit la dégradation de p53. p53 active également les gènes ASPP qui favorisent l'induction de l'apoptose par p53. Nous reviendrons ensuite sur ces protéines.

#### v.Choix entre apoptose et arrêt du cycle

Le choix entre arrêt du cycle et apoptose est mal compris et repose sur des éléments dépendants et indépendants de p53. Le type et la physiologie cellulaire sont importants. Ainsi p53 active préférentiellement l'apoptose au sein des cellules sanguines tandis qu'il induit plutôt un arrêt du cycle cellulaire dans les fibroblastes. Ceci pourrait refléter une activation différentielle des protéines de survie tel que Bcl-2 ou Bcl-XL en fonction du type cellulaire (95). La présence de signaux de survie activateurs de la protéine AKT favorise également l'arrêt du cycle cellulaire. A l'inverse, l'activation des kinases de stress comme p38 et JNK par l'inflammation ou l'hypoxie vont favoriser l'induction de l'apoptose par p53.

Le signal activant p53 va aussi être déterminant dans le choix entre arrêt du cycle et apoptose. L'affinité de p53 n'est pas la même pour ses différents gènes cibles. Les sites de liaison à p53 des gènes apoptotiques Bax et Noxa sont ainsi de faible affinité. En revanche les gènes nécessaires à l'arrêt du cycle cellulaire et notamment p21 sont très affins et extrêmement sensibles à l'activation même minimale de p53 (95). Un modèle propose donc que l'activation de l'apoptose nécessite un signal de stress important par rapport à celui nécessaire pour l'arrêt du cycle cellulaire. Ceci pourrait être renforcé par le fait que p21 puisse être un inhibiteur de l'apoptose en empêchant le clivage de la caspase3 et en inhibant les kinases de stress JNK et p38 (96). La dégradation spécifique de p21 par l'ubiquitine E3 ligase p53RFP, gène activé par p53, faciliterait la transition vers l'apoptose (97).

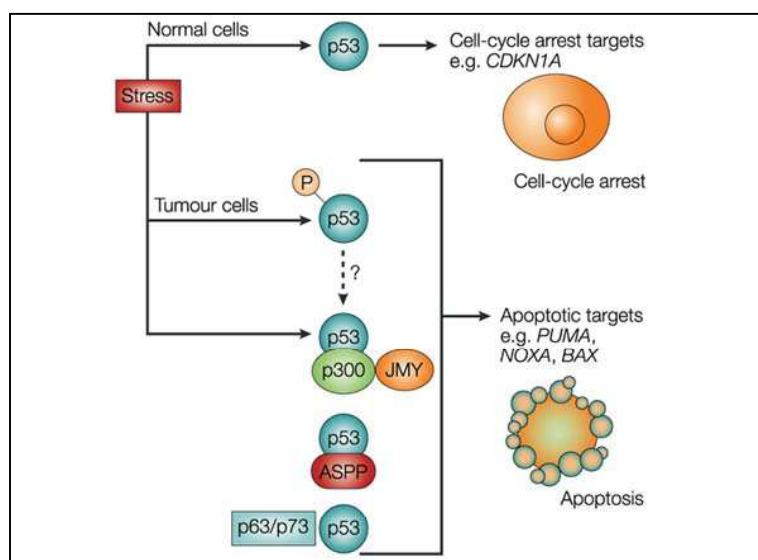
L'activation des gènes proapoptotiques serait ainsi beaucoup plus contrôlée que celle des gènes nécessaires à l'arrêt du cycle cellulaire. Les modifications posttraductionnelles de p53 vont orienter la réponse. La phosphorylation de certains résidus de p53 tel que les sérines 33, 46, 81, 376 et 378, catalysées par les kinases de stress p38 et JNK, vont favoriser la liaison à l'ADN et l'activation de gènes proapoptotiques tel que Bax ou p53AIP1 qui possèdent des sites de liaison de faible affinité (98). Les HAT CBP/p300 acétylent le domaine



C-terminal de p53. Ces résidus acétylés stabilisent le domaine de liaison à l'ADN de p53 sur ses séquences cibles, notamment celles de faible affinité.

Le dernier élément important est la présence de différents facteurs ou cofacteurs de transcription qui moduleraient l'activité de p53 (figure 3). Les protéines ASPP stimulent la transcription des gènes apoptotiques Bax et PIG3 en favorisant la liaison à l'ADN de p53 sur ces gènes (99). Les facteurs de transcription de la famille de p53, p63 et p73 mais également le facteur STAT1 facilitent l'activation de gènes apoptotiques tels que Bax, Noxa ou Fas en participant au recrutement du complexe d'initiation de la transcription (83;100). La protéine JMY qui se lie au cofacteur p300 favorise aussi l'activation des gènes proapoptotiques tel que Bax (101). Enfin des coactivateurs tel que Miz vont favoriser l'activation de p21 dans certains cas mais vont supprimer son expression s'ils sont complexés à c-myc (102).

Si l'on se replace dans le contexte de la progression tumorale, on s'aperçoit qu'elle favorise sans doute le rôle proapoptotique de p53. L'hypoxie, la perte d'adhérence, et les stress oxydatifs générés lors de la progression tumorale favorisent la phosphorylation de p53 (la sérine 46 semble être clef) et l'activité de ses cofacteurs proapoptotiques (figure 3). Il est ainsi possible que l'activation de p53 dans des lésions précancéreuses ait plutôt tendance à induire un arrêt du cycle cellulaire impliquant des gènes tel que p21 tandis que l'activation de p53 au sein d'une tumeur plus avancée favorise l'activation de l'apoptose (95). Ceci a été confirmé par des expériences d'immunohistochimie montrant la présence de cellules fortement marquées pour p21 dans des lésions précancéreuses.



**Figure 3 : Régulation du profil transcriptionnel de p53(95)**

Le modèle présenté propose que la phosphorylation de p53 par les kinases de stress au cours de la progression tumorale, favorise son interaction avec les cofacteurs p300 JMY et ASPP permettant ainsi l'induction de l'apoptose au dépend de l'arrêt du cycle cellulaire.

## **Chapitre II : La tumorigenèse**

On considère aujourd'hui que deux points importants permettent la progression tumorale. Le premier point repose sur la mutation des gènes contrôlant le cycle cellulaire et l'apoptose tandis que le second repose sur l'instabilité génomique associée à la carcinogenèse.

### **A) La mutation des gènes de contrôle du cycle cellulaire comme élément initiateur de la tumorigenèse.**

#### **1. Description de la théorie**

Historiquement, la première hypothèse expliquant la tumorigenèse reposa sur la découverte des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur. La tumorigenèse s'explique selon cette hypothèse par l'apparition au cours des divisions cellulaires de mutations perturbant la fonction normale des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur. Lors de la réplication de l'ADN, l'ADN polymérase  $\delta$  induit un taux d'erreur d'environ 1 base sur  $10^9$ . Ainsi, chez les organismes à vie longue, l'apparition progressive de mutations touchant les oncogènes et les gènes suppresseur de tumeur activerait la prolifération cellulaire et favoriserait ainsi l'émergence de clones de plus en plus mutés, ne répondant plus à aucun critère nécessaire à la prolifération tel que la présence de facteurs de croissance, l'adhérence à une matrice extracellulaire, la préservation du matériel génétique. Ce dernier point est crucial et expliquerait l'apparition tardive de l'instabilité génétique observée dans la plupart des carcinomes humains.

#### **2. Activations des proto-oncogènes et répressions des gènes suppresseurs de tumeur**

Le premier moyen par lequel un proto-oncogène est activé est l'apparition de mutation au sein de sa séquence codante ou de son promoteur. Des mutations ponctuelles peuvent augmenter l'activité de certains proto-oncogènes et les transformer alors en oncogène. On peut citer la mutation de Ras G12V qui induit une activation constitutive de la protéine (103). Des mutations au sein du promoteur peuvent aussi induire une surexpression de la protéine comme pour bcl6 responsable de lymphome T (104). Les mutations non-sens sont aussi à l'origine de formes constitutivement actives d'oncogène. Par exemple la mutation tronquante au niveau du codon 531 de c-src induit l'activité constitutive de cette protéine (105). Cette mutation trouvée initialement dans 12% des tumeurs colorectales de patients américains n'a

cependant été retrouvé qu'à de rares exceptions chez d'autres populations (106). Finalement, des mutations introniques peuvent aboutir à l'apparition d'oncogènes en modifiant l'épissage alternatif. Des variants d'épissage ont été caractérisés pour les cyclines D et E ou la protéine Mdm2 (107-109). Ces différentes protéines induisent la transformation de fibroblastes murins. L'absence d'un ou plusieurs domaines fonctionnels est responsable de ce phénotype. Par exemple les complexes formés entre cdk2 et des formes courtes de la cycline E ne sont plus inhibés par p21 ou p27 qui ne peuvent lier le complexe (110). Enfin, de nombreux oncogènes sont activés de manière indirecte par des mutations touchant leur régulateur. L'oncogène c-src est ainsi activé par des mutations de la protéine CSK (111).

L'inhibition des gènes suppresseurs de tumeur suit les mêmes mécanismes expliquant l'activation des oncogènes. De nombreux gènes suppresseurs de tumeurs comportent dans leur séquence, tant au niveau du promoteur, des exons que des introns, des mutations qui vont aboutir à la perte de leur fonctionnalité. Le domaine de liaison à l'ADN de p53 est ainsi très fréquemment muté (112). De façon similaire la phosphatase PTEN est mutée dans les gliomes de haut grade (113).

Un autre moyen important d'inactivation repose sur la méthylation spécifique de cytosines présentes en grand nombre au sein d'îlots nucléotidiques appelés îlots CpG. La méthylation de ces îlots induit la relocalisation de ces gènes d'une région d'euchromatine vers une région d'hétérochromatine, aboutissant à la suppression de leur expression (114). Ainsi, dans de nombreuses tumeurs, seulement un allèle des gènes suppresseurs est muté. La perte d'expression complète du gène s'explique par la méthylation de l'autre allèle. Le locus INK4 est ainsi l'un des gènes le plus fréquemment méthylé au cours de la progression tumorale aboutissant à la perte d'expression des protéines p16 et p14ARF (115). Le gène codant la protéine apc est également fréquemment méthylé dans les cancers colorectaux, ce qui active des oncogènes tel que la  $\beta$ caténine et c-myc (116). De manière plus générale, des modifications épigénétiques sont sans doute extrêmement importantes au cours de l'initiation de l'oncogenèse. Les cellules souches des tissus différenciés se caractérisent par un profil spécifique de gènes méthylés qui limite leur prolifération et restreint les types cellulaires pouvant être engendrés. Il semble que l'altération de ce profil, aboutissant à la dédifférenciation de ces cellules, puisse être un élément précurseur de l'oncogenèse (117).

## **B) L'instabilité génomique comme moteur de la tumorigenèse**

### **1. Description de la théorie**

La progression tumorale s'accompagne presque toujours de larges réarrangements chromosomiques impliquant la perte complète de chromosomes et la présence de chromosomes surnuméraires. De plus de nombreux oncogènes ne présentent pas de mutation mais une surexpression dû à une amplification génique parfois en de multiples copies (l'oncogène ErbB2 est amplifié entre 10 et 15 copies dans 30% des cancers du sein). De nombreux gènes suppresseurs de tumeur sont inactivés par délétion d'au moins un de leurs deux allèles. Un autre élément essentiel indicatif de cette théorie est l'existence de cas familiaux rares de cancers dû à la mutation germinale de protéines impliquées dans les différents systèmes de réparation de l'ADN tel que ATM ou BRCA1 (118;119). Enfin, la plupart des tumeurs présentent des systèmes de réparation de l'ADN altérés ou un taux de mutation largement supérieur à la normale. Pour les tenants de cette théorie, le taux de mutation d'une cellule en division ne pourrait être suffisant pour induire la tumorigenèse. La tumorigenèse pourrait ainsi s'appuyer sur l'altération des systèmes qui contrôlent l'intégrité de l'ADN puis dans un second temps sur l'apparition de bouleversements chromosomiques capables d'altérer la fonction des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (120).

### **2. Mécanisme de l'instabilité génomique**

#### **a) Instabilité génomique liée à la réplication**

Un élément essentiel pour la stabilité du génome est le contrôle de la réplication. Ainsi, la perte du Mismatch repair (MMR) qui contrôle la présence de mésappariements au cours de la réplication augmente le taux de mutations ponctuelles accumulées à chaque réplication. Environ 15% des cancers colorectaux possèdent ainsi des mutations des gènes codant dans les protéines MLH1, MSH2 et 3. Ces mutations favorisent l'apparition de mutations à un taux extrêmement rapide aboutissant à la cancérisation de ces cellules (121). Les séquences microsatellites, séquences d'ADN répétées, sont très sensibles aux perturbations du MMR et ces tumeurs sont dites microsatellites instables (MIN). Elles possèdent en revanche une quantité d'ADN normale proche de  $2N$  chromosomes.

Une autre source d'instabilité au sein du génome liée à la réplication est la présence de site de réplication fragile. Ces sites sont répliqués à la fin de la phase S. Cette réplication tardive est due à la présence d'une gêne stérique sur l'ADN empêchant le passage du réplisome (structures secondaires d'ADN, protéines liées à l'ADN en grande quantité, gène

transcrits) (122;123). Le réplisome peut alors quitter la fourche de réplication, on parle alors d'effondrement de la fourche de réplication. L'ADN simple brin présent au niveau des fourches effondrées active l'arrêt du cycle cellulaire, les systèmes de recombinaison puis de résolution de doubles jonction Holliday, qui vont permettre de réengager la fourche de réplication. Au niveau des sites fragiles, ces mécanismes sont extrêmement sollicités (124). Ces mécanismes peuvent ainsi être débordés en présence de stress supplémentaires générés par divers agents de l'environnement (UV, stress alkylant, stress oxydatif) Il persiste alors de petites régions génomiques mal répliquées en métaphase qui vont favoriser l'apparition de cassures chromosomiques et perturber la mitose (nous reviendrons sur ce point). Les cellules cancéreuses présentent ainsi très souvent des délétions au niveau de ces sites de fragilité, voir des réarrangements, qui peuvent aboutir à la perte allélique d'un ou plusieurs gènes suppresseurs de tumeur.

Un troisième mécanisme générateur d'instabilité génomique lié à la réplication de l'ADN est la perturbation du contrôle cellulaire des origines de réplication. Les origines des fourches de réplication sont chargées par le complexe de pré-réplication (Pré-RC) formé des protéines Mcm2-7 au début de la phase G1. Ce complexe scanne l'ADN et se fixe au niveau des origines de réplication grâce au complexe ORC (origin recognition complex) contenant cdc6 et cdt1. Ces protéines ne fonctionnent qu'en début de phase G1, lorsque les complexes cycline E-cdk2 n'ont pas encore été activés. L'activation précoce de la kinase cdk2 au cours de la phase G1 inhibe le chargement des Pré-RC. L'absence complète de Pré RC sur une région d'ADN ne permet pas alors la réplication de ces régions qui vont alors perturber la mitose (125). A l'inverse, les Pré RC ne peuvent être rechargés durant les phases S-G2 afin de limiter à une fois la réplication de l'ADN par tour de cycle cellulaire. Lorsque l'ouverture de la fourche de réplication débute, les protéines MCM et cdc6 sont phosphorylées par le complexe cyclineA-cdk2, ce qui inhibe leur recrutement sur l'ADN et exporte cdc6 du noyau. De plus, cdt1 est dégradé, et une protéine essentielle contre la tumorigenèse, la geminin (exprimée uniquement pendant les phases S/G2) inhibe les cdt1 qui auraient pu échapper à cette dégradation. (126). Ces différentes protéines cdc6 cdt1 et geminin ont toutes été retrouvées surexprimées dans un grand nombre de tumeurs et associées à la présence d'une instabilité génomique (127;128). L'augmentation de cdt1 et cdc6 participerait à l'instabilité génomique via l'ouverture de fourche de réplication sur de l'ADN déjà répliqué, tandis que la geminin limiterait ce mécanisme à un taux supportable pour la prolifération cellulaire

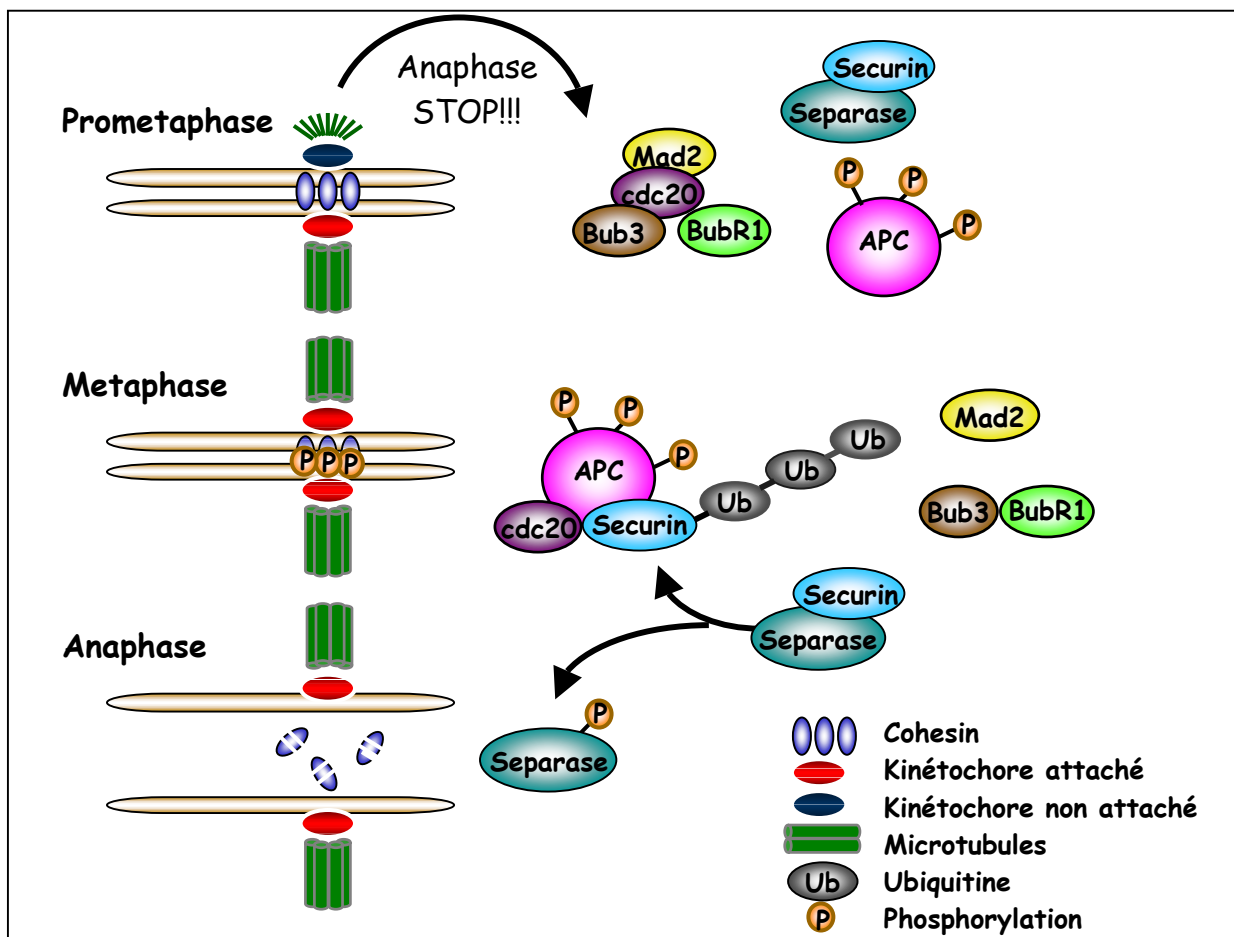
### b) Instabilité génomique lié au point de contrôle du fuseau mitotique.

Un autre élément essentiel pour le contrôle de la stabilité génomique est le point de contrôle du fuseau mitotique qui assure la bonne répartition du matériel génétique entre les deux cellules filles. Au cours de la métaphase, les chromatides sœurs sont maintenues liées entre elles, au niveau de la région centrale du chromosome appelée centromère, par les cohésines. La séparation des chromatides sœurs lors de la transition métaphase anaphase est régulée par la dégradation ciblée de la cohésine par la protéase séparase. La séparase est activée lorsque le centromère de tous les chromosomes est attaché par deux microtubules issus chacun d'un pôle cellulaire différent (attachement au niveau d'un complexe protéique appelé kinétochore). L'absence d'attachement d'un unique chromosome induit un signal via des protéines telles Mad2 ou la kinase BubR1 qui vont maintenir inactivé un complexe ubiquitine E3ligase APC/C en la privant de son activateur cdc20. La libération de cdc20 permet sa liaison au complexe APC/C ce qui active son activité catalytique. La cible d'APC/C est une protéine appelée securin qui empêche l'activation de la séparase (129) (figure 4). Ces mécanismes sont primordiaux pour la stabilité génomique à deux niveaux. Tout d'abord ils assurent qu'à chaque cycle de division, l'ensemble des chromosomes sera attaché de manière bipolaire avant le début de l'anaphase. Ensuite ils permettent de stopper la mitose de cellules qui auraient mal répliqué leur ADN ou qui auraient des cassures au sein de leur ADN (130). Un point important est que ce point de contrôle mesure non seulement l'attachement du centromère au microtubule mais également la tension qui s'exerce à ce niveau. En situation normale, les forces s'exerçant par chaque microtubule attaché à un même chromosome sont identiques mais de sens opposé. Ainsi les tensions anormales s'exerçant au niveau d'un chromosome présentant un nombre incorrect de centromère (du à une cassure ou à une fusion chromosomique) ou des perturbations au sein de sa structure active le point de contrôle du fuseau mitotique (129;130).

L'importance de ces mécanismes pour la tumorigenèse a été soulignée par le fait que des mutations germinales des gènes impliqués dans ces processus tel Bub1B étaient retrouvées dans des cas de cancers familiaux caractérisés par la présence de cellules au karyotype profondément altéré et survenant chez l'enfant sous forme de rhabdomyosarcome et de leucémie (131). De plus, plusieurs modèles murins présentant des haploinsuffisances pour des protéines tel BubR1 ou Bub3, sont plus susceptibles aux cancers (132).

Finalement, la dérégulation du point de contrôle du fuseau mitotique a été impliquée dans l'apparition de cellules tumorales colorectales au karyotype très instable. On dit qu'elles présentent un phénotype CIN (chromosomal instability). Ces cellules sont aneuploïdes.

L'aneuploïdie est extrêmement courante au sein des cellules tumorales, qui ne possèdent cependant pas toutes un phénotype CIN. La particularité des cellules CIN est que le karyotype aneuploïde n'est pas survenu en une étape mais a été au contraire remodelé sur plusieurs générations. Une hypothèse propose que ces cellules sont issues d'une cellule rendue tétraploïde qui a perdue ensuite une partie de ses chromosomes surnuméraires (133). Ceci se base sur le fait que les cellules CIN présentent de 60 à 90 chromosomes en moyenne ( $\cong 3N$  chromosomes). Le point de contrôle du fuseau mitotique a ici un rôle important. Sa dérégulation pourrait être à l'origine de la cellule tétraploïde et permettre l'instabilité chromosomique ultérieure. Ainsi l'inactivation par mutation des protéines Mad2 ou Bub1 (fréquemment mutées chez les patients atteints de CIN) permet de conférer le phénotype CIN à une cellule initialement normale.



**Figure 4 :** Le point de contrôle du fuseau mitotique (129)

Lors de la métaphase, la cohésine retient ensemble les deux chromatides sœurs. La liaison entre les kinétochores et les microtubules active l'ubiquitine E3ligase APC/C qui libère la séparase de la securin. La séparase permet alors de couper la cohésine et libère les deux chromatides sœurs.

### c) Instabilité génomique liée aux cassures double brin de l'ADN

Les cassures doubles brin de l'ADN sont une cause majeure d'instabilité génomique. Les stress environnementaux tels que le rayonnement UV, les radicaux libres de l'oxygène, les rayons  $\gamma$ , les mutagènes induisent ces cassures. Ces agents forment des cassures doubles brins et des cassures simples brins transformées en doubles brins lors de la collision de la cassure avec la fourche de réplication (134). Les cassures doubles brins sont les plus délétères car elles génèrent des fusions entre chromosomes (135;136). Ces chromosomes fusionnés ne peuvent être distribués correctement au moment de la mitose et sont très souvent cassés lors de l'anaphase, générant des cycles de cassure, puis fusion des chromosomes (137). Deux mécanismes, « Le Non homologous end joining » (NHEJ) et la recombinaison homologue permettent la réparation de ces cassures. Nous reviendrons sur ces mécanismes au cours de la partie 2. Plusieurs syndromes humains se caractérisent par la présence de mutation au sein des protéines impliquées dans ces systèmes de réparation. (voir tableau 1) (138). Les patients porteurs de ces mutations développent un nombre anormalement élevé de tumeur confirmant le rôle de ces systèmes dans la prévention de la tumorigenèse.

Syndrome	Phénotype	Gène muté
ataxia telangiectasia (AT)	Retard mental, tumeur, radiosensible, chromosome instable	ATM
ataxia telangiectasia-like disorder	Retard mental, tumeur, radiosensible, chromosome instable	MRE11
Nijmegen breakage syndrome	Retard mental, tumeur, radiosensible, chromosome instable	NBS1
bloom syndrome	Vieillessement et tumeur précoce, chromosome instable	BLM
werner syndrome	Vieillessement et tumeur précoce, chromosome instable	WRN
Rothmund–Thomson syndrome	Vieillessement et tumeur précoce, chromosome instable	RECQL4

**Tableau 1:** Syndrome humain associé à des mutations de gènes de réparation des cassures doubles brins (138).

Une autre forme de cassure double brin sont celles générées par le raccourcissement des télomères. Les télomères sont les séquences terminales des chromosomes. Ces séquences recrutent un complexe protéique constitué notamment de TRF2 qui protège l'extrémité des chromosomes. En absence de télomères ces séquences terminales peuvent fusionner. A chaque division cellulaire le raccourcissement des télomères est problématique et générateur d'instabilité génomique. Sous un certain seuil, les séquences télomériques ne permettent plus le recrutement du complexe protéique constitué de TRF2. Les séquences télomériques sont alors reconnues comme des cassures doubles brins qui normalement arrête le cycle cellulaire.



Si la cellule se divise, les chromosomes peuvent cependant fusionner au niveau de leurs télomères aboutissant à de larges remaniements chromosomiques par des cycles de cassure pendant la mitose puis fusion pendant l'interphase (139).

### **3. Coopération entre oncogène et instabilité génomique**

A partir de ces deux théories une troisième voie se dégage aujourd'hui synthétisant les deux précédentes. L'instabilité génomique serait un catalyseur de l'oncogenèse. Ces conclusions sont fondées sur les expériences montrant que d'une part les oncogènes génèrent de l'instabilité génomique et que ceci est un prérequis à la transformation cellulaire, et que d'autre part, l'instabilité génétique permet l'activité oncogénique en éliminant des gènes suppresseurs de tumeur ou en amplifiant les oncogènes.

Les oncogènes induisent de l'instabilité génomique par divers moyens. L'activation de la prolifération nécessite un métabolisme important, générateur de radicaux libres de l'oxygène (140). Ces radicaux libres sont génotoxiques autant pour l'ADN nucléaire que pour l'ADN mitochondrial. Les radicaux libres de l'oxygène induisent majoritairement des cassures simples brins de l'ADN qui peuvent être transformées en cassure double brin au cours de la réplication. Les radicaux perturbent ainsi le fonctionnement du génome nucléaire mais aussi du génome mitochondrial. Ce dernier point est important car les mitochondries au fonctionnement perturbé vont être à leur tour des génératrices importantes de radicaux libres de l'oxygène amplifiant le phénomène (141). Ainsi une augmentation même minime de la prolifération cellulaire par les oncogènes entraînent ces mécanismes de production de radicaux libres de l'oxygène et d'instabilité génétique.

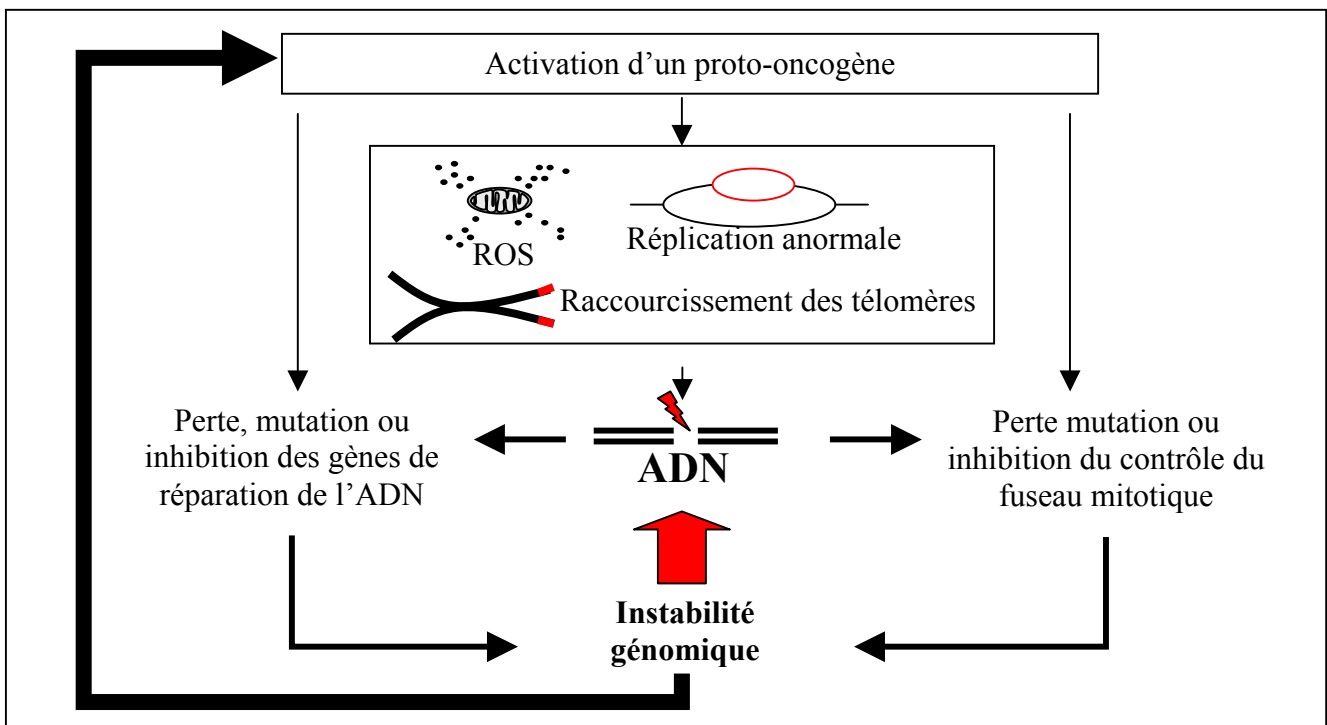
L'activation des complexes cycline E cdk2 par l'activité des oncogènes induit de l'instabilité génétique. Comme nous venons de le voir, le chargement des Pré RC nécessite l'absence d'activité de cdk2 au début de la phase G1. L'activation permanente du complexe cycline E-cdk2 par les oncogènes empêche ainsi ce chargement (125), induisant alors une réplication de l'ADN qui est incomplète en raison du manque d'origine de réplication (122).

Les oncogènes à travers l'activation de facteurs de transcription tel que E2F1 perturbent le programme transcriptionnel de plusieurs mécanismes nécessaires au maintien de la stabilité du génome. Les gènes cdc6 et cdt1 sont activés par les facteurs E2F1. Comme nous l'avons dit précédemment cdc6 et cdt1 sont inhibés au cours des phases S/G2 respectivement par un système d'export du noyau et de dégradation. Leur surexpression limite ces mécanismes, ce qui peut favoriser le rechargement des Pré -RC sur l'ADN déjà dupliqué et la re-réplication d'une portion du génome (128). Le gène codant la protéine Mad2 est

également sous le contrôle d'E2F1, et la surexpression de Mad2 inhibe le point de contrôle du fuseau mitotique (142). Les facteurs E2F1 activent aussi les gènes impliqués dans le déclenchement de la mitose. La cycline B, cdk1, la PLK1 les phosphatases cdc25 sont par exemple sous le contrôle d'E2F/RB (143). L'inactivation de RB ou l'activation d'E2F1 peut ainsi favoriser le déclenchement de la mitose de manière précoce. Finalement une autre protéine importante régulée par E2F est la protéine Emel. Cette protéine inhibe l'ubiquitine E3 ligase APC/C, et sa surexpression induit l'apparition de cellules tétraploïdes. Lors de la mitose, APC/C inhibée ne peut induire la dégradation des cohésines, les chromosomes ne peuvent pas être séparés et la cellule termine la mitose sans cytotérière (144).

Enfin les oncogènes génèrent de l'instabilité, mais cette fois à long terme. Le raccourcissement des télomères de manière progressive à chaque division aboutit finalement à la fusion de chromosomes entre eux (145). Les chromosomes ne peuvent être séparés au cours de la mitose (plusieurs centromères sur un même chromosome) ce qui entraîne leur cassure ou l'absence de cytotérière aboutissant à une cellule tétraploïde.

Ces mécanismes vont participer à la perte progressive des gènes suppresseurs de tumeurs et vont favoriser une activité oncogénique de plus en plus soutenue aboutissant à un cercle où oncogène et instabilité génétique vont coopérer et promouvoir la transformation de cellules saines en cellules malignes (Figure 5).



**Figure 5 : Coopération entre oncogène et instabilité génétique**

Les dommages de l'ADN générés par l'oncogène induisent une instabilité génétique qui amplifie les effets de l'oncogène et en active d'autres qui vont à leur tour participer à la progression tumorale.

## **C) La sénescence et l'apoptose : barrière contre la tumorigénèse**

p53 et Rb protègent la cellule de l'oncogénèse via leur rôle suppresseur de tumeur. En fait, ces deux protéines font parties de deux grands mécanismes limitant la progression tumorale : la sénescence et l'apoptose. La sénescence est un état cellulaire physiologique particulier. La cellule est vivante, son métabolisme est actif et elle peut selon les circonstances continuer à exercer des activités paracrines. Son phénotype est altéré et se distingue par un cytoplasme de taille anormalement grande en terme de surface mais extrêmement fin en terme de volume. En revanche, elle devient totalement fermée aux signaux de l'environnement, en particulier ceux induisant normalement la prolifération. La cellule est ainsi morte d'un point de vue prolifératif. L'apoptose est un mécanisme plus extrême pour la cellule. La cellule se suicide en dégradant ses constituants de manière spécifique par l'activité d'enzymes à activité cystéine protéase appelées caspases. L'ADN dégradé est également fortement condensé et apparaît extrêmement noir en microscopie électronique. La cellule disparaît par bourgeonnement de petites vésicules renfermant les différents constituants cellulaires appelées corps apoptotiques.

### **1. Activation de p53 au cours de l'oncogénèse**

La protéine p53 est régulée à deux niveaux : traductionnelle et post traductionnelle. La traduction de l'ARN messager est augmentée lors de l'activation de p53. Deux protéines jouent ici un rôle essentiel : la protéine ribosomale L26 (RPL26) se fixe dans le 5'UTR de l'ARN messager de p53 et augmente l'association entre l'ARNm de p53 et des polysomes à fort coefficient de sédimentation contenant un nombre important de ribosome. A l'inverse, la nucléoline inhibe la traduction de l'ARNm là encore en se fixant dans sa région 5' UTR en inhibe le recrutement de RPL26 (146). En condition normale, l'ARNm est majoritairement fixé par la nucléoline et donc peu traduit. Lors d'un stress oncogénique, RPL26 est relocalisée dans le nucléoplasme et perturbe l'association entre la nucléoline et l'ARNm favorisant ainsi une structure de l'ARNm plus facilement reconnaissable par les ribosomes induisant ainsi l'association de cet ARN avec des polysomes à fort coefficient de sédimentation.

Le second niveau de régulation de p53 est la régulation de sa dégradation. En absence de stress, la protéine est dans le noyau associée à deux enzymes ubiquitine E3-ligase Hdm2 (mdm2 chez la souris) et ARF-BP1. L'ubiquitination de p53 par ces protéines entraîne son export du noyau et sa dégradation. Lors d'un stress, l'association entre p53 est les ubiquitines

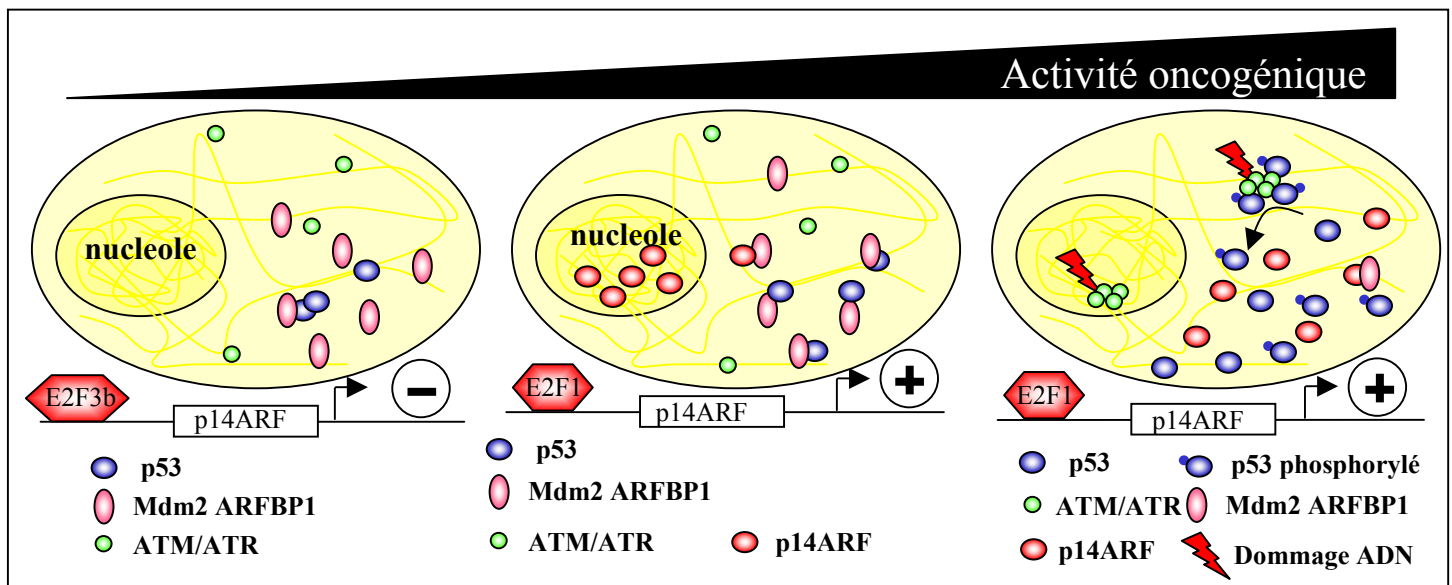
E3 ligase est inhibée, permettant ainsi l'augmentation de la demi-vie de p53 et son expression stable. Cette perturbation est initiée par une protéine du nucléole p14ARF (p19ARF chez la souris) (147) qui favorise de plus l'autoubiquitination de Hdm2 et sa dégradation (148). Cette protéine est codée par le même locus INK4/ARF que la protéine p16 mais ne possède pas le même promoteur, et une séquence intron exon différente de celle de p16 (149).

L'expression de p14ARF est contrôlée par les facteurs E2Fs (150). En condition normale, son promoteur est occupé par le facteur E2F3b qui réprime la transcription du gène. L'inhibition de ce facteur permet l'activation de p14ARF et l'activation de p53. Lors d'une activation oncogénique du facteur E2F1 grâce à la protéine virale E1A, ce facteur est recruté à la place de E2F3b et induit une forte activation de la voie p14ARF/p53 (151). D'après ces résultats, p14ARF pourrait ainsi être activé grâce aux dérégulations des facteurs E2Fs dues à l'oncogène. L'autre point permettant de réguler l'expression de p14ARF est le contrôle du locus INK4A/ARF par les protéines PcG tel que Bmi1. Nous reviendrons sur ce point dans le paragraphe suivant.

Ces mécanismes ne sont pas les seuls capables d'activer p14ARF. L'activation de la ribogénèse dans le nucléole au cours de l'oncogénèse pourrait être déterminante (148). La nucléophosphamine B23 (participe à l'assemblage des ribosomes) et plusieurs protéines ribosomales tel que les protéines ribosomales L5, L23 et L11(152-154) qui possèdent des sites de fixation pour p14ARF augmentent le recrutement et la stabilisation de p14 ARF au sein de nucléole. La stabilisation de p14ARF au sein du nucléole limite sa dégradation par Hdm2. La perturbation structurelle du nucléole induite par l'activité oncogénique (réplication incomplète, cassures de l'ADN, amplification des gènes codant les ARNr, surexpression de protéines ribosomales sous le contrôle de c-myc) induit la relocalisation de ces diverses protéines au sein du nucléoplasme (155). Ceci permet alors à p14ARF ou la nucléophosphamine B23 de venir interagir avec Hdm2 et d'induire la stabilisation de p53 (156).

Parallèlement à la voie de signalisation faisant intervenir p14ARF, p53 peut-être stabilisé par les perturbations génomiques engendrées par l'oncogène. En effet, il existe au sein du domaine d'activation transcriptionnel (N-terminal) de la protéine de nombreux sites de phosphorylations. Les sérines 15 et 20 sont phosphorylées respectivement par les kinases ATM/ATR d'une part et chk1/chk2 d'autre part (98). Ces phosphorylations permettent la phosphorylation d'autres résidus dans la région N-ter de p53 dont la sérine 9 ou la thréonine 18 phosphorylées par les kinases CK1 ou DNA-PK par exemple. Ces phosphorylations déstabilisent la liaison entre Hdm2 et p53 et permettent ainsi la stabilisation de la protéine. De

plus, ces phosphorylations sont absolument nécessaires au recrutement des cofacteurs de la transcription par p53. Les différentes kinases ci-dessus interviennent toutes dans la détection des perturbations du génome permettant ainsi d'activer p53 indépendamment de la présence d'ARF. Au cours de l'oncogenèse, il est probable que la déstabilisation du génome (via des cassures de l'ADN ou la présence de fourches de réplication effondrées) et la perturbation du nucléole coopèrent pour permettre l'activation maximale de p53 (148) (figure 6).



**Figure 6 :** Activation de p53 au cours de l'oncogenèse (148)

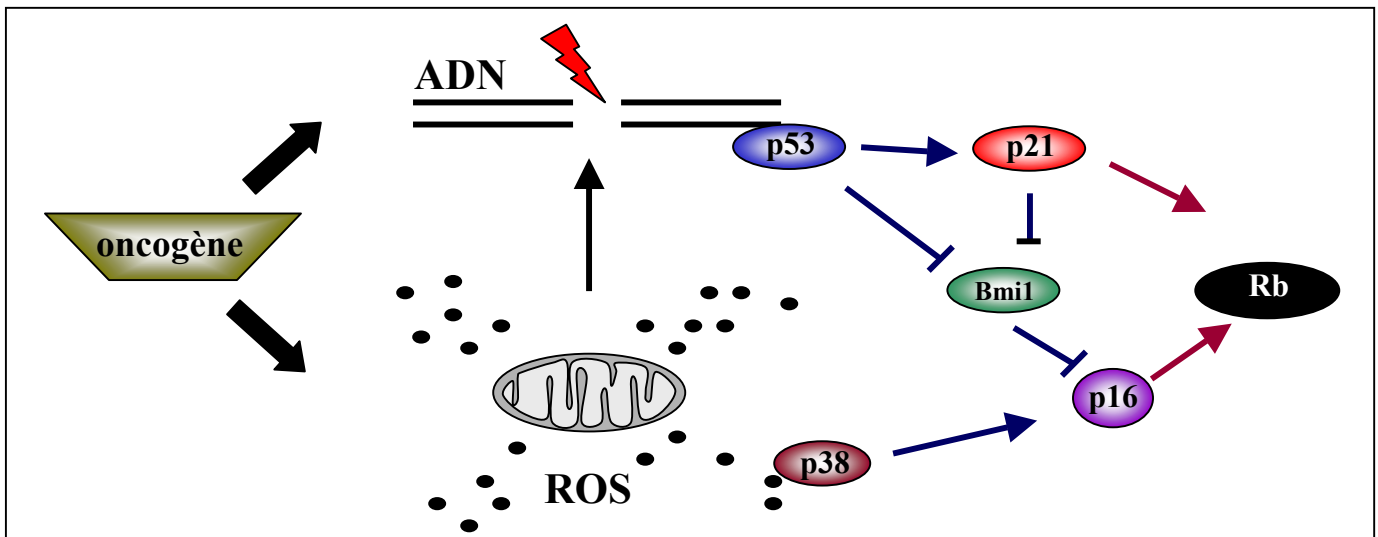
En absence d'activité oncogénique, p53 est dégradé par Mdm2/ARFBP1. La présence d'un oncogène induit l'activation du gène p14ARF. La protéine est stockée dans le nucléole. La progression tumorale s'accompagne de perturbations du génome qui vont activer les kinases ATM/ATR et libérer p14ARF permettant la stabilisation et l'activation de p53.

## 2. Activation de la voie p16-Rb au cours de l'oncogenèse

L'activation de Rb au cours de l'oncogenèse repose sur les inhibiteurs du cycle cellulaire p16 et p21 qui inhibent respectivement les complexes cyclines D-cdk4 et cycline E-cdk2. Tandis que p21 est exprimé via p53, l'activation de p16 est plus complexe (figure7).

Le premier mécanisme repose sur le fait que ce gène est activé suite à la stimulation des facteurs de transcription Ets2 par les kinases ERKs (157). L'activation anormalement prolongée des MAPKs aboutit à l'activation de p16 et au blocage du cycle cellulaire via Rb. Un autre élément important est le contrôle du locus INK4a/ARF par les facteurs PcG Bmi 1, responsable de l'hétérochromatinisation du locus. Lors de l'activation de la sénescence, l'expression de Bmi 1 est réprimé, ce qui active p16 et p19(ARF) (158;159) . Le gène Bmi 1 est en fait sous le contrôle des facteurs de transcriptions prolifératifs E2F1 et c-myc qui sont réprimés par l'activité de p53 au cours de la mise place de la sénescence (160;161).

p16 est activé par les kinases de stress p38. Les stress oxydatifs et métaboliques (perturbation du fonctionnement mitochondrial) induits au cours de l'oncogenèse activent p38 qui réprime le facteur Id1, inhibiteur de p16 (162). Elles activent aussi les protéines kinases MK2/3 qui inhibent l'interaction de Bmi1 avec l'ADN(163). Cet effet de p38 est important car il peut expliquer l'activation de p16 par l'oncogène en absence de p53.



**Figure 7 : Schéma d'activation de Rb au cours de l'oncogenèse**

Le dérèglement des mitochondries et l'activation de p53 lors de l'oncogenèse induit l'activation des protéines p21 et p38. p21 et p38 permettent l'activation du gène de p16 notamment en réprimant l'expression du facteur PcG Bmi1. L'activation de p16 et de p21 permet l'inhibition des complexes cyclines cdk et l'activation de Rb

### 3. La sénescence inhibe définitivement l'activation du cycle cellulaire

L'activation de p21 et de p16 induit une très forte inhibition des complexes cycline-cdk entraînant une déphosphorylation complète de Rb et sa liaison aux facteurs E2Fs. L'activation de Rb dans ce cadre induit la formation de foci d'hétérochromatine spécifiques de la sénescence (SAHF) (76). Ces SAHF colocalisent avec les gènes nécessaires à la réplication comme la cycline A ou PCNA. Ces SAHF sont transcriptionnellement inactifs et extrêmement stables dans le temps. La sénescence correspond donc potentiellement à la compaction et à l'extinction définitive des gènes nécessaires à la prolifération. Cette activité de Rb nécessite le recrutement des protéines Suv39H. Dans un cadre normal de prolifération, Rb permet la déacétylation des lys9 des histones H3 inhibant la transcription de manière réversible, tandis que lors de la sénescence Rb induit la méthylation de ces résidus et le recrutement de la protéine linker HP1 qui induit une forte compaction de la chromatine. De

plus, lors de la mise en place du SAHF par Rb, un dépôt spécifique de l'histone variant macroH2A a lieu dans la chromatine (164). Ce variant induit lui aussi une forte compaction de la chromatine. Rb permet dans ce cadre de cibler correctement les zones du génome à hétérochromatiniser pour permettre l'extinction des gènes de prolifération.

#### **4. L'apoptose permet l'élimination des cellules en cours de transformation**

Contrairement à la sénescence, l'apoptose est un phénomène mis en place rapidement. Nous nous intéresserons ici uniquement au processus apoptotique mis en place par p53 au cours de l'oncogenèse. L'apoptose est régulée à trois niveaux, avec la mitochondrie comme point central à l'ensemble du processus. En amont de la mitochondrie, l'apoptose est régulée par des protéines de mort comme Bax à l'action limitée par des protéines de survie comme Bcl-2 ou Bcl-XL. p53 permet l'activation de Bax à deux niveaux. Il induit tout d'abord la transcription de la protéine, mais surtout il active les gènes codant les protéines BH3 PUMA et Noxa. Ces protéines perturbent l'interaction de Bax et des protéines de survie ce qui permet l'insertion de Bax dans la mitochondrie. L'insertion de Bax induit une dépolarisation mitochondriale qui ne peut plus fonctionner correctement et induit le relargage de plusieurs protéines comme le cytochrome c, AIF et l'endonucléase G. Le cytochrome c permet la formation d'un complexe appelé apoptosome constitué des protéines Apaf-1 cytochrome c et caspase 9, capable d'activer la caspase 9. L'activation de la caspase 9 permet le clivage et l'activation de caspases dite effectrices comme les caspase 3 ou 7 qui vont alors dégrader de nombreuses protéines et activer la nucléase CAD responsable de la dégradation internucléosomale de la chromatide (165). AIF est responsable de la condensation de la chromatide tandis que l'endonucléase G participe à sa dégradation. p53 participe également à la régulation des événements se situant en aval de la mitochondrie.

Enfin, p53 régule également l'apoptose médiée par les récepteurs de mort. Le gène du récepteur de mort Fas est activé par p53. La liaison de Fas et de FAS ligand induit l'activation de la caspase 8. La caspase 8 induit le clivage de la protéine Bid, protéine à domaine BH3 qui induit l'activation de Bax et la libération de cytochrome c.

*Partie 2 : Les thérapies antitumorales, réponses  
et échappements*



# Chapitre I : Les chimiothérapies ciblant les topoisomérases

## A) Données cliniques sur ces chimiothérapies

Les inhibiteurs de topoisomérase sont aujourd'hui un traitement standard de plusieurs pathologies malignes. Les inhibiteurs de topoisomérase I dérivés des camptothécines sont largement utilisés, le plus souvent en seconde ligne de traitement contre des cancers multirésistants (166). Le topotecan est utilisé contre le cancer des ovaires résistants aux sels de platine ou aux inhibiteurs du fuseau mitotique tel que le paclitaxel (167), et contre le cancer du poumon à petites cellules résistant à un cocktail doxorubicine, vincristine cyclophosphamide (168). Il est également utilisé contre des cancers hématologiques tel que les leucémies myéloïdes chroniques (CML) (169). Les résultats obtenus en seconde ligne de traitement ont amené les cliniciens cancérologues à développer de nouvelles combinaisons incluant le topotecan en première ligne de traitement. On peut citer les combinaisons topotecan cisplatine utilisées pour le cancer ovarien ou encore topotecan paclitaxel là encore en première ligne pour le cancer du poumon à petites cellules (166). Le problème majeur de ces combinaisons est la forte toxicité hématologique observée, nécessitant une diminution de chaque agent de manière importante par rapport à leur utilisation seul. Un autre dérivé des camptothécines, l'irinotecan est lui principalement utilisé contre le cancer colorectal métastatique le plus souvent en combinaison avec l'analogue de base 5-Fluorouracil. Cependant des essais ont été réalisés sur d'autres tumeurs comme le cancer du poumon à petites cellules pouvant montrer là aussi des résultats encourageants (166). Enfin, des essais ont montré que l'irinotecan peut être associé avec d'autres drogues antitumorales comme les sels de platine dans le traitement du cancer colorectal. Malgré leur grande utilisation, l'efficacité de ces drogues reste modérée. Les taux de réponse au topotecan utilisé seul varient de 20% dans le traitement du cancer ovarien à 30% contre certaines CMLs. La médiane de survie des patients atteints de cancer des ovaires et traités par irinotecan n'est ainsi que de 15 mois. Le taux de réponse des patients atteints de cancer colorectal métastatique traités par de l'irinotecan seul n'est que de 25%, et la médiane de survie de ces patients ne dépasse pas 12 mois (166). De plus, ces traitements sont associés avec plusieurs toxicités de grade important III/IV. On peut citer parmi les plus fréquentes des neutropénies, thrombopénies, anémies, diarrhées et vomissement pouvant entraîner dans les cas les plus graves la mort du patient. En

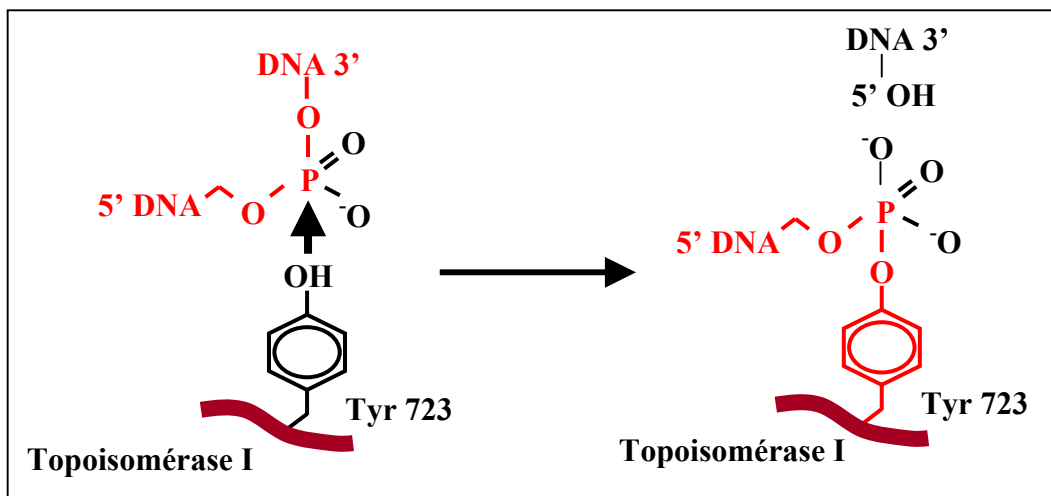
raison de ces différents aspects, de nouveaux analogues de camptothécine sont en développement mais ne sont pas pour l'instant utilisés de manière routinière en thérapie.

Les inhibiteurs de topoisomérase II sont utilisés en première et seconde ligne de traitement contre plusieurs pathologies malignes (170). Il existe deux types d'inhibiteurs, les poisons qui induisent un complexe covalent topoisomérase ADN, et les inhibiteurs catalytiques qui inhibent simplement l'activité de la topoisomérase. Nous nous intéresserons ici uniquement à la première classe d'inhibiteur, les seconds n'ayant pas été utilisés au cours des travaux qui vont suivre. Les poisons des topoisomérases appartiennent à deux grands groupes, les anthracyclines utilisées contre le cancer du sein et des ovaires, contre les leucémies aiguës, les lymphomes, et les myélomes; les épipodophyllotoxines utilisées contre le cancer des testicules et des ovaires, contre certaines leucémies myéloïdes, et contre le cancer du poumon à petite cellule (170). Les anthracyclines sont utilisées en première ligne de traitement contre le cancer du sein en association avec du 5-Fluorouracil et de la cyclophosphamide avec une survie globale moyenne de 80% à 5 ans chez des patients atteints de cancer non métastatique. Elles sont utilisées en seconde ligne de traitement associées avec des taxanes toujours contre le cancer du sein avec cette fois ci une survie globale moyenne proche de 90% à 5 ans chez des patients atteints de cancer non métastatique (171). L'utilisation des anthracyclines en association avec un analogue de base comme la cytarabine en première ligne de traitement contre les leucémies myéloïdes aiguës est aussi un protocole standard de chimiothérapie. 50 à 75% des patients atteints d'AML et traités par ce protocole ont une réponse complète. Cependant seulement 25 à 30% ne présentent pas de récurrences à long terme (171). Certains protocoles utilisent les épipodophyllotoxines en remplacement des anthracyclines dans le traitement des AML avec des résultats à peu près similaires à ceux obtenus avec anthracycline (172). Une toxicité majeure des anthracyclines est l'induction de toxicités cardiaques partiellement résolues par la mise sur le marché de nouvelles générations d'anthracyclines comme l'épirubicine (170). En dehors de cet effet, les patients traités présentent souvent des neutropénies importantes et des problèmes digestifs (vomissement diarrhée). Les inhibiteurs de topoisomérase II comme les inhibiteurs de topoisomérase I sont donc eux aussi toujours en développement afin d'améliorer les combinaisons, les protocoles d'administration et de limiter les toxicités.

## B) Les deux types de topoisomérase

### 1. Les topoisomérases de type I

Ces enzymes sont absolument essentielles et sont présentes dans tous les organismes vivants de la bactérie jusqu'à l'homme. Des expériences d'inactivation de ce gène chez la drosophile l'ont confirmé en montrant que ces mutants n'étaient pas viables (173). Ces topoisomérases sont exprimées tout au long du cycle cellulaire en raison de leur rôle au cours de la transcription. Ces protéines sont constituées de 4 domaines. La région centrale de la protéine, extrêmement bien conservée au cours de l'évolution, interagit avec l'ADN. La région C-terminal est également bien conservée et contient la tyr723, qui se lie de manière covalente à l'ADN (174). La fonction alcool de la tyrosine permet une réaction de transestérification au niveau de la liaison 5'OH du désoxyribose lié au groupement phosphate et induit la coupure de cette liaison en fixant de manière covalente le groupement phosphate en 3' (figure 8).

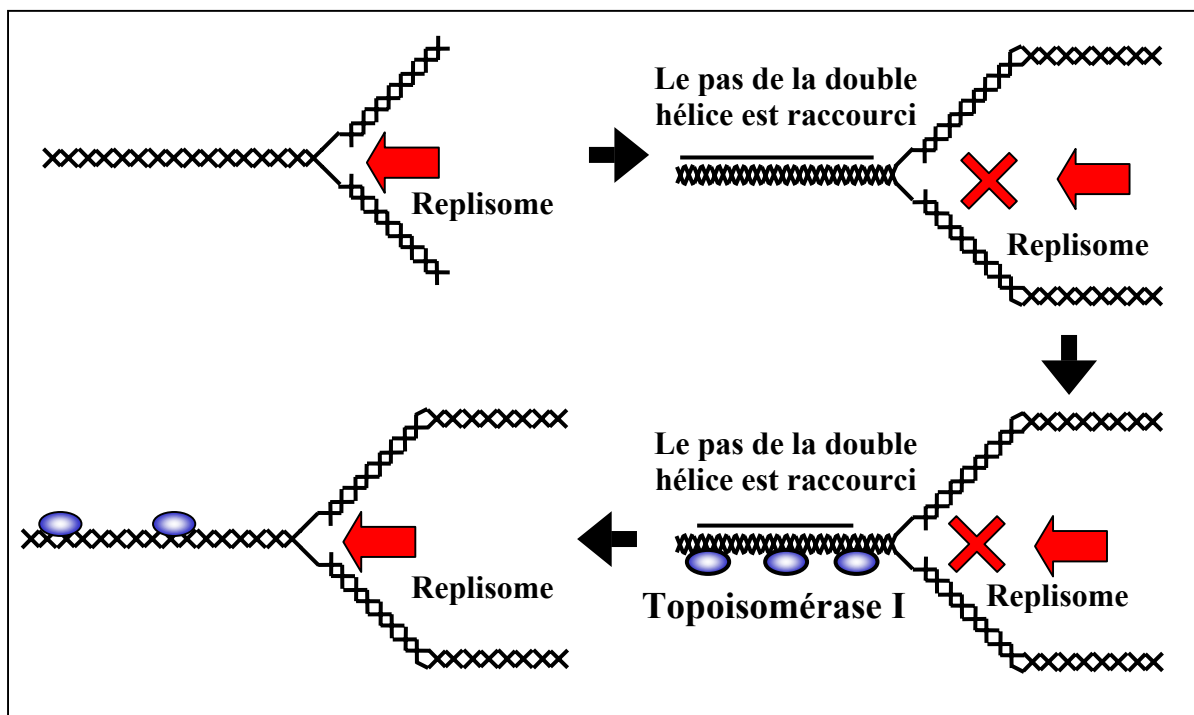


**Figure 8 :** Mécanisme réactionnel de la topoisomérase I (175).

Au cours de la réaction catalysée par la topoisomérase I, l'ADN est lié de manière covalente au résidu tyrosine 723 de la topoisomérase I. A la fin de la réaction, la liaison phosphodiester est reformée selon le mécanisme inverse de celui présenté.

Dans cette configuration, l'hélice d'ADN tourne sur elle-même dans le sens supprimant la tension au sein de l'hélice. Cette réaction énergétiquement favorable ne nécessite pas d'ATP. L'hélice effectuant un tour complet, les deux groupements séparés se retrouvent en contact et la liaison est reformée via une nouvelle réaction de transestérification (175).

Cette réaction permet de restaurer une tension normale au sein de l'hélice d'ADN, tension pouvant être altérée au cours de la transcription et de la réplication par les activités hélicases associées à ces processus. Le déroulement des deux brins d'ADN par les hélicases induit un raccourcissement de la double hélice responsable de la tension générée au sein de l'hélice. Les topoisomérases de type I agissent donc en aval de l'activité hélicase et contribuent au déroulement des deux brins d'ADN (175) (figure 9). En absence de topoisomérase I, le raccourcissement de la double hélice entraîne la formation d'un superenroulement de l'ADN permettant de dissiper la tension sur l'ensemble de l'hélice impliquée dans l'enroulement. Ces enzymes sont surtout impliquées dans les phases d'élongation de la transcription ou de la réplication. La détection des sites de coupure de cette enzyme sur l'ADN confirme ceci en montrant que l'enzyme se fixe principalement plusieurs centaines de base en aval des sites d'initiation de la transcription ou des origines de réplication (176).

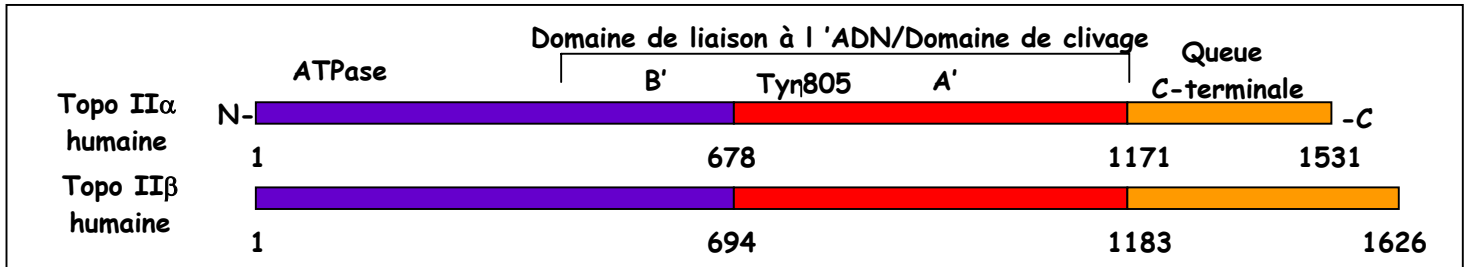


**Figure 9** : Les topoisomérases I suppriment la tension de l'ADN générée par l'activité hélicase du réplisome (175).

L'activité hélicase associée au réplisome induit un raccourcissement du pas de la double hélice induisant une tension sur la structure de l'ADN. La tension empêche la progression du réplisome. Les topoisomérases I suppriment un tour d'hélice diminuant la tension s'exerçant sur la structure de l'ADN et permettent le redémarrage de l'activité hélicase associée au réplisome.

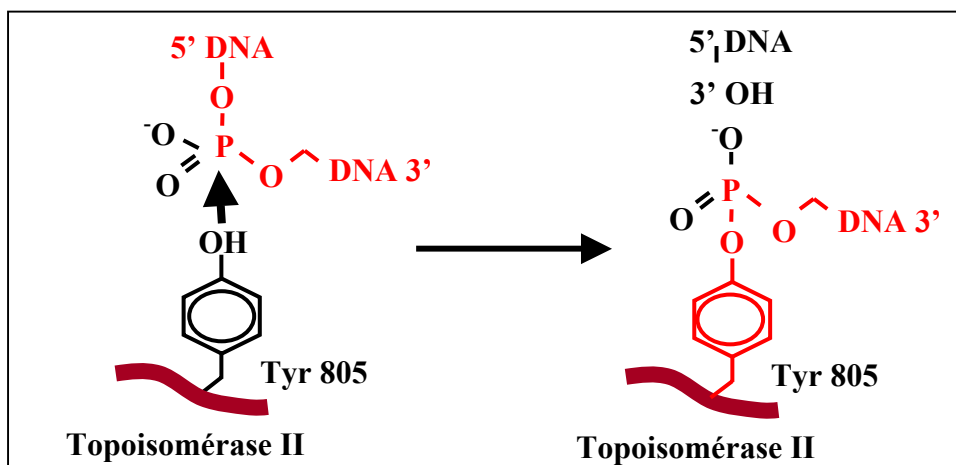
## 2. Les topoisomérase de type II

Les topoisomérases de types II sont codées par deux gènes chez l'homme. La topoisomérase II $\alpha$  est exprimée de façon cyclique de la transition G1/S jusqu'en mitose. De plus, elle est seulement exprimée dans les tissus prolifératifs. La topoisomérase II $\beta$  est exprimée de façon ubiquitaire tout au long du cycle cellulaire et dans tous les tissus (177).



**Figure 10 :** Les différents domaines fonctionnels des topoisomérases II (178)

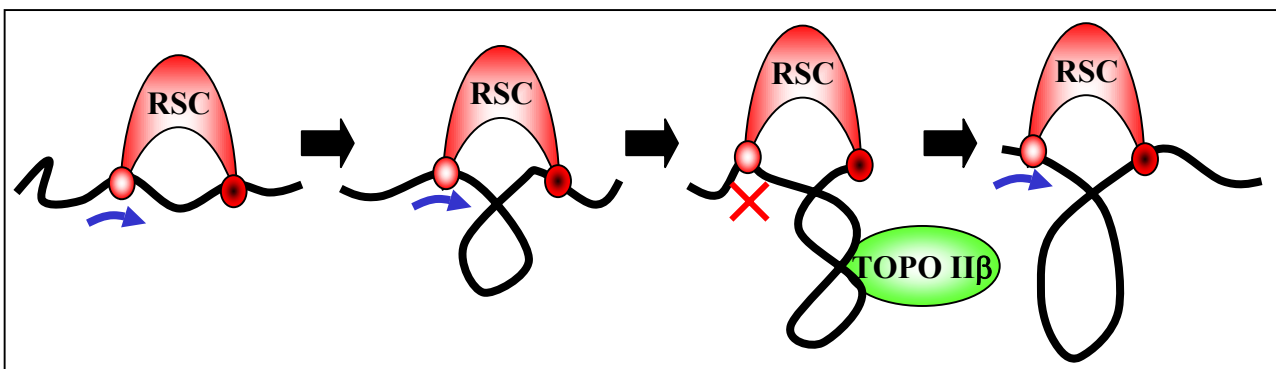
Ces enzymes catalysent le transport d'une double hélice d'ADN à travers une autre de manière ATP dépendante. Elles sont homodimériques et possèdent plusieurs domaines fonctionnels (figure 10). La région N-terminal est constituée de deux domaines : 1 ATP-ase capable de lier l'ATP et de le dégrader, fournissant l'énergie nécessaire à la réaction catalysée par l'enzyme. Le domaine central B'A' permet la liaison à l'ADN de l'enzyme et le clivage double brin de l'ADN, chaque monomère clivant l'un des deux brins. Ce clivage repose sur l'interaction d'une tyrosine (805 chez la topoisomérase II $\alpha$  humaine) avec l'ADN. La réaction est la même que dans le cas des topoisomérases I mais cette fois ci, c'est la liaison entre le 3'OH du désoxyribose et le groupement phosphate qui est ciblée (figure 11).



**Figure 11 :** Mécanisme réactionnel simplifié des inhibiteurs de topoisomérase II (178)

Au cours de la réaction catalysée par la topoisomérase II $\alpha$ , l'ADN est lié de manière covalente au résidu tyrosine 805 de la topoisomérase. A la fin de la réaction, la liaison phosphodiester est reformée selon le mécanisme inverse de celui présenté.

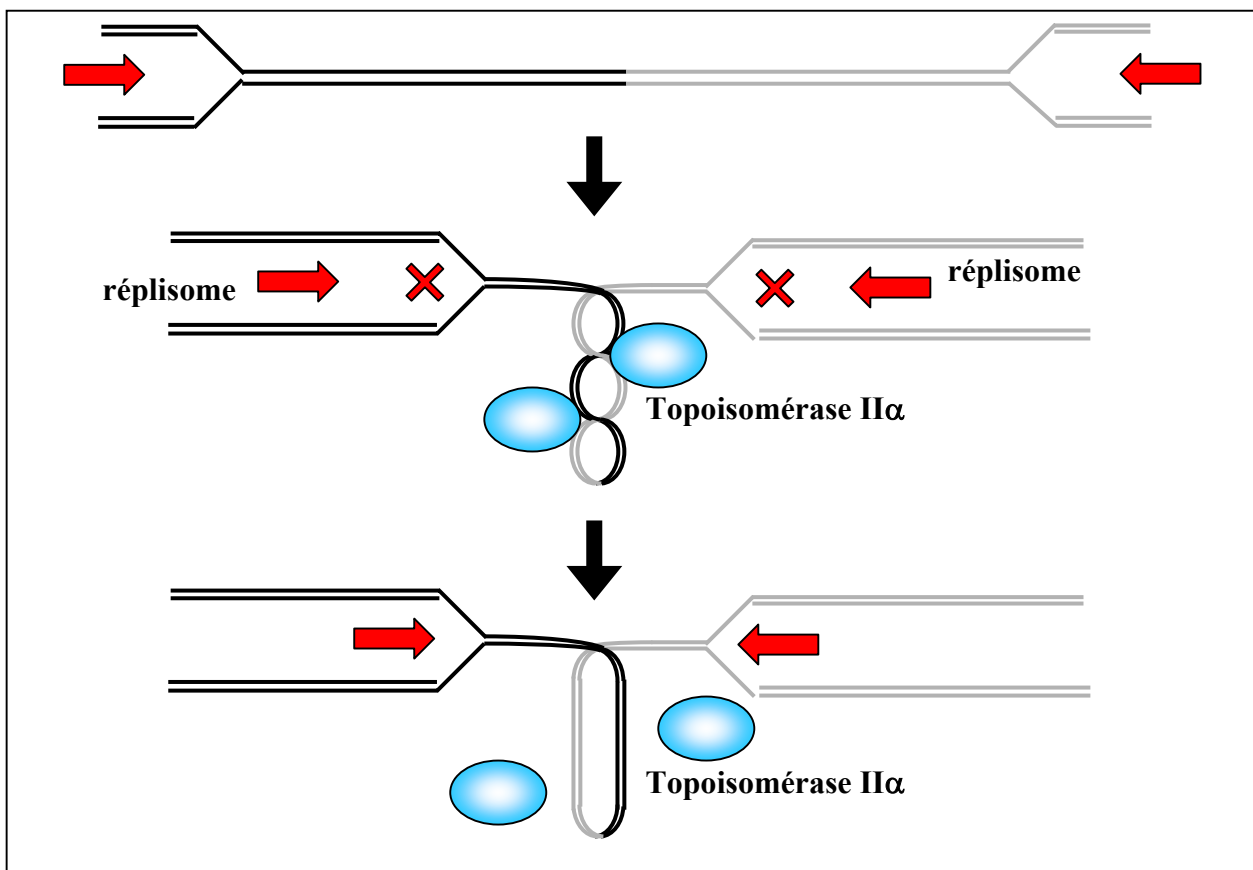
Les topoisomérases sont extrêmement efficaces sur l'ADN chromatinisé. Elles sont les seules capables de supprimer les superenroulements de l'ADN et de dissocier deux hélices d'ADN enroulées l'une autour de l'autre (177). Les topoisomérases de type II $\beta$  ont un rôle essentiel au cours de la transcription, ce qui explique leur expression au sein de tous les tissus prolifératifs ou non (178). Une recherche des sites de coupures de l'ADN par ces enzymes a montré qu'elles agissaient principalement au niveau des régions d'initiation et de terminaison de la transcription (176). Deux études peuvent expliquer le rôle de la topoisomérase II $\beta$  au niveau de l'initiation de la transcription. Les topoisomérases II $\beta$  induisent une cassure double brin de l'ADN au niveau des nucléosomes présents sur le site d'initiation de la transcription de gènes comme PSA, pS2 ou MMP12 par exemple. La cassure double brin présente au sein du site catalytique de l'enzyme active une protéine PARP qui greffe des poly(ADP)ribose fortement chargé négativement. Ces charges déstabilisent l'interaction entre l'ADN et les histones de la chromatine, aboutissant au relâchement de celle-ci (179). Le second mécanisme impliquant les topoisomérase II $\beta$  dans l'initiation de la transcription repose sur l'activité des complexes de remodelage RSC (180;181). Les topoisomérases II $\beta$  permettent de supprimer les superenroulements négatifs de l'ADN qui empêchent la torsion de l'ADN nécessaire à l'activité des complexes RSC (figure 12). Les topoisomérases II $\beta$  participent donc au remodelage de la chromatine, ce qui permet le recrutement des facteurs nécessaires à l'activation de la transcription.



**Figure 12 :** Rôle de la topoisomérase II $\beta$  au cours du remodelage de la chromatine (181).

Les complexes de remodelage de la chromatine induisent une torsion de l'ADN qui génère des superenroulements négatifs. La topoisomérase II $\beta$  permet de supprimer ces superenroulements ce qui favorise l'activité des complexes de remodelage.

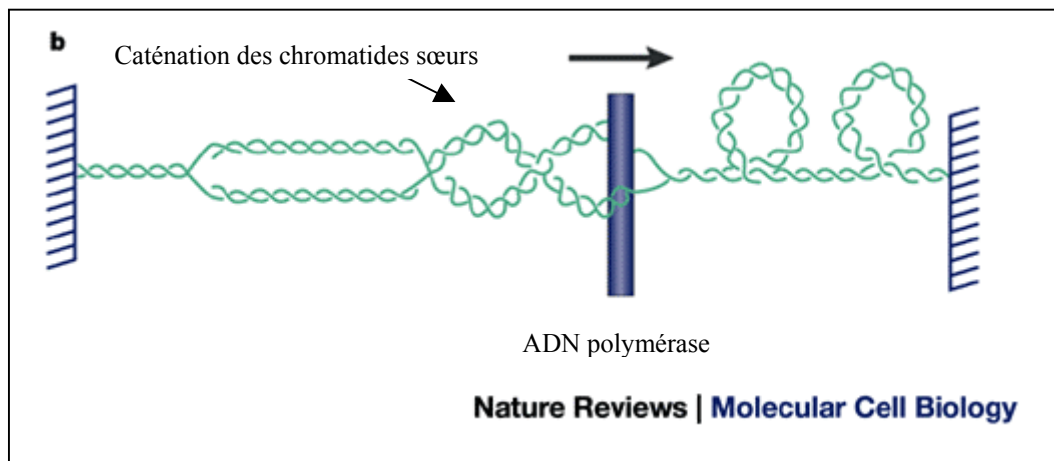
Les topoisomérases II $\beta$  et II $\alpha$  vont respectivement agir à la fin de la transcription d'un gène et à la fin de la réplication pour des raisons similaires. Les sites de terminaison de la transcription sont des zones où l'ADN est fortement structuré, par des liaisons entre les bases azotées (G quadruplex) ou par des protéines (hétérochromatine par exemple). Ces sites peuvent également correspondre aux sites où deux complexes ARN polymérase se rencontrent en sens inverse. De façon similaire à la fin de la réplication, les fourches de réplication se rencontrent au niveau de régions difficiles à répliquer, les sites communs de fragilité, contenant là aussi de l'ADN fortement structuré. La topoisomérase I n'est pas efficace ici car l'ADN ne peut pas tourner sur lui-même, ce qui entraîne l'apparition de superenroulements négatifs. Les topoisomérases II les suppriment, ce qui permet la progression du complexe ARN polymérase ou du réplisome (177;182) (Figure 13).



**Figure 13 : Rôle de la topoisomérase II $\alpha$  au cours de la réplication (177)**

A la fin de la réplication, au niveau des sites communs de fragilité, la rencontre entre deux fourches de réplication induit des superenroulements négatifs de l'ADN. Les topoisomérases II $\alpha$  suppriment ces superenroulements et permettent aux réplisomes de finir la réplication.

L'autre activité essentielle de la topoisomérase II $\alpha$  est de permettre la décaténation des chromatides sœurs générée lors de la réplication de l'ADN. La caténation est l'enroulement des deux chromatides sœurs l'une autour de l'autre au cours de leur réplication. Cette caténation des chromatides au cours de la réplication est complémentaire à l'activité de la topoisomérase I afin de diminuer les tensions s'exerçant sur l'ADN. La caténation des chromatides sœurs permet au réplisome de tourner sur lui-même, dissipant ainsi une partie des tensions générées par l'hélicase en arrière du complexe par rapport à son sens de progression (177) (figure 14).



**Figure 14 :** La réplication de l'ADN induit la caténation des chromatides sœurs (177)

La rotation du réplisome sur lui-même disperse une partie des tensions générées en aval de l'hélicase en arrière et augmente l'efficacité de l'hélicase. En contre partie, les chromatides sœurs sont enroulées l'une autour de l'autre. On parle de caténation des chromatides sœurs.

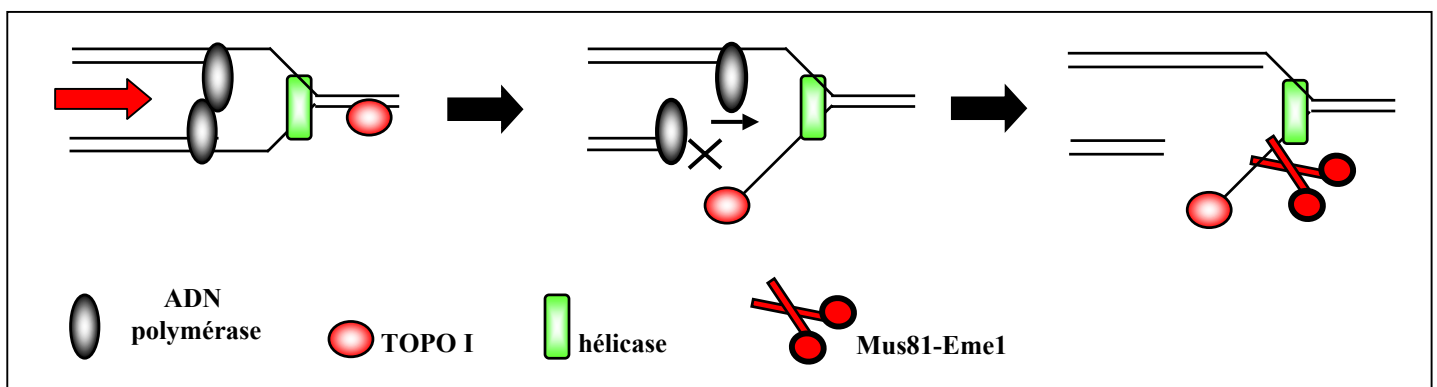
La caténation des chromatides participe à la cohésion des chromatides sœurs jusqu'à l'anaphase. La topoisomérase II $\alpha$  permet de séparer ces chromatides sœurs. Cette activité débute à la fin de la réplication et se poursuit jusqu'en métaphase. Cette activité est essentielle car la caténation de ces chromatides sœurs empêche leur séparation lors de la transition métaphase anaphase et s'oppose à la condensation correcte du chromosome (183).

### **C) Les inhibiteurs de topoisomérase I dérivés des camptothécines**

Ces inhibiteurs agissent tous via la stabilisation d'un complexe entre l'ADN clivé par la topoisomérase, l'inhibiteur lui-même et la topoisomérase de type I. Au cours de la réaction enzymatique, l'inhibiteur s'intercale entre le nucléotide -1 et le nucléotide +1 par rapport au site de coupure de l'enzyme. Le complexe topoisomérase I-ADN-drogue appelé complexe ternaire est stabilisé par un ensemble de ponts hydrogènes entre l'inhibiteur et l'ADN d'une



part et l'inhibiteur et la topoisomérase d'autre part. Sous cette forme, l'étape de religation de l'ADN est extrêmement ralentie mais n'est cependant pas totalement inhibée permettant au complexe d'être réversible. La collision entre le complexe ternaire et le réplisome (ADN polymérase et hélicase), stabilise le complexe et induit le décrochage du réplisome lorsqu'il atteint la cassure de l'ADN (134). L'effondrement de la fourche de réplication s'accompagne par la libération d'une extrémité double brin d'ADN reconnue comme une cassure de l'ADN par la cellule. Bien que ces événements soient délétères pour l'intégrité du génome ils présentent l'avantage de générer une structure 3'FLAP reconnu spécifiquement par des endonucléases tel que Mus81-Eme1 capable de cliver la branche d'ADN liée à la topoisomérase (184) (figure 15).



**Figure 15 :** Effet des camptothécines sur la réplication (184)

Lors de la collision entre le complexe ternaire et la fourche de réplication, l'activité hélicase est découplée de l'activité polymérase qui est bloquée par la cassure de l'ADN. Ceci induit le décrochage du réplisome, génère une extrémité double brin et une structure 3'FLAP au quelle est liée la topoisomérase. L'endonucléase Mus81Eme1 reconnaît spécifiquement cette structure et supprime le complexe ternaire.

L'effondrement de la fourche de réplication est vraisemblablement l'effet le plus délétère pour la cellule en raison de la génération de cassures doubles brins d'une part et de la réplication incomplète d'autre part. Cependant, en plus de ces effets sur la réplication, les dérivés des camptothécines perturbent la transcription. Les topoisomérases de types I sont constitutivement associées au complexe transcriptionnel (185). De façon similaire à la collision entre la fourche de réplication et le complexe ternaire, l'ARN polymérase est bloquée par le complexe ternaire. La cassure simple brin associée au complexe ternaire est réparée le plus souvent de manière efficace par le système de réparation couplé à la transcription (détaillé dans le chapitre suivant), permettant le redémarrage de la transcription.

## **D) Les inhibiteurs de topoisomérase II : les anthracyclines.**

Comme les inhibiteurs de topoisomérase I, les anthracyclines induisent la formation d'un complexe stable entre l'ADN clivé sur ses deux brins par l'enzyme, la topoisomérase II et la drogue. Les brins d'ADN sont fixés en 5' à la topoisomérase via la drogue tandis que l'extrémité 3'est maintenue au sein du site catalytique uniquement par des ponts salins (186). Ce complexe est encore une fois appelé complexe ternaire ou complexe de clivage.

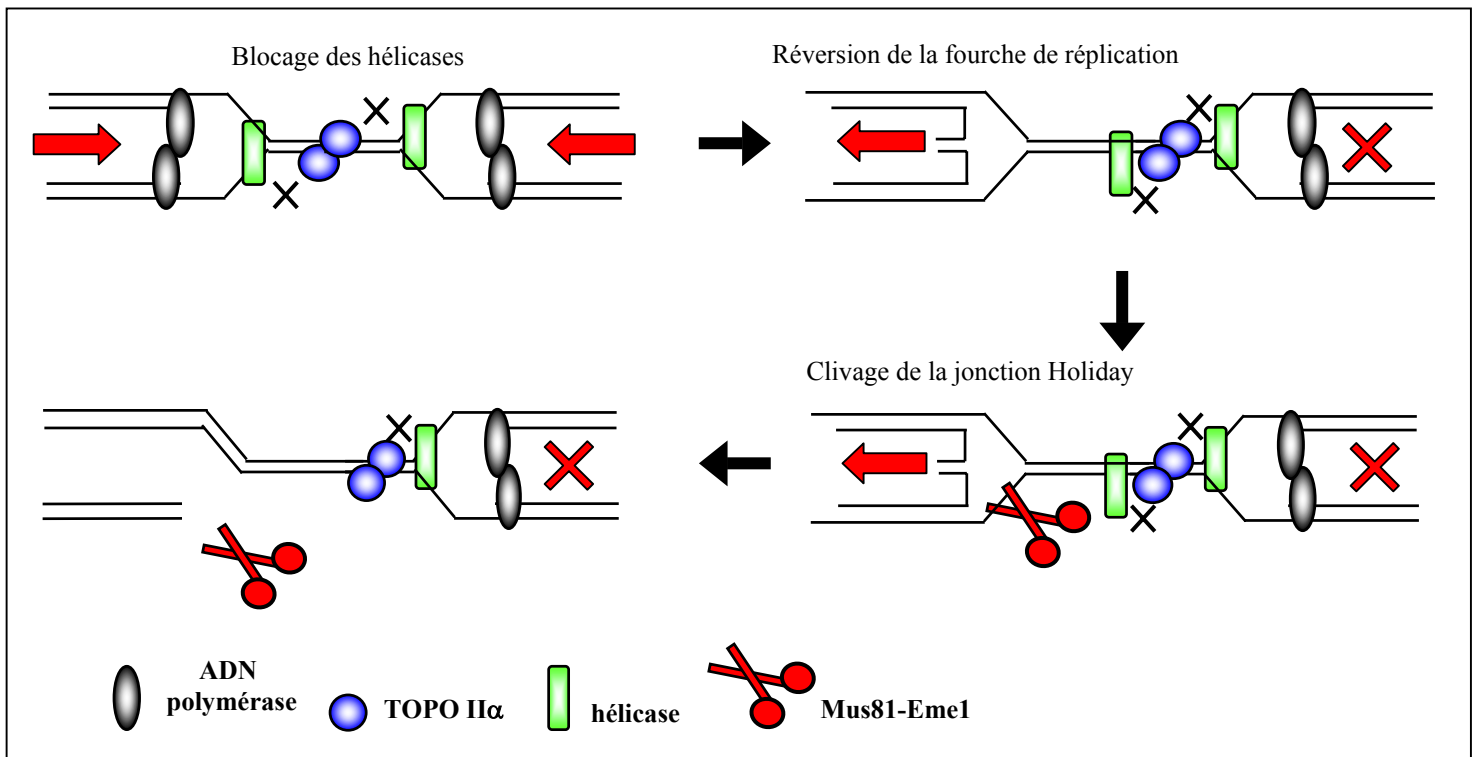
Le complexe de clivage est stable mais réversible et n'est pas toxique en soit pour la cellule. L'induction de cassures doubles brins par cet inhibiteur est beaucoup plus complexe et mal comprise que dans le cas des inhibiteurs de topoisomérase I. La plupart des cassures doubles brins sont générées en aval du réplisome. En effet, comme dans le cas des topoisomérases I, le complexe est stabilisé lors de sa collision avec la fourche de réplication. Ainsi les complexes générés lors de la décaténation ne produisent sans doute pas où très peu de cassures doubles brins, ne pouvant entrer en collision avec une fourche de réplication.

Les sites communs de fragilité sont les sites répliqués en dernier. Ces sites sont fréquemment le siège de cassures chromosomiques et sont particulièrement sensibles à divers agents génotoxiques capables de stopper la réplication, dont les inhibiteurs de topoisomérases II (124). Comme nous l'avons dit précédemment, ces sites sont difficiles à répliquer et induisent un fort ralentissement de la réplication (187). Leur réplication s'effectue à une vitesse extrêmement lente et ne se termine probablement pas avant la fin de la phase G2, lors de la rencontre entre les fourches de réplication précoce et les fourches de réplication tardives. Les topoisomérases II $\alpha$  sont indispensables à leur réplication car l'ADN ne peut effectuer la rotation nécessaire à sa relaxation par les topoisomérases de types I (la relaxation pour une fourche induit une tension pour l'autre) (177). Les cassures de l'ADN vont ainsi être préférentiellement générées au niveau de ces sites à la fin de la réplication, c'est à dire à la fin de la phase S voir au cours de la phase G2.

Des expériences réalisées chez la bactérie E.Coli, ont montré que la plupart du temps, le complexe ternaire n'induit pas d'effondrement de la fourche de réplication car il bloque la progression du réplisome qui ne se décroche pas (188). Chez l'homme cet arrêt induit le recrutement des protéines BLM et WRN qui permettent une régression de la fourche de réplication induisant la formation d'une jonction Holliday (branchement entre deux hélices d'ADN (189) (figure 16) . Si le complexe ternaire n'est pas réversé naturellement, la jonction Holiday est résolue par les protéines de la famille Mus81-Eme1, qui génèrent un effondrement de la fourche de réplication et une cassure double brin (190). La même série

d'événement peut avoir lieu sur l'autre fourche. Le complexe ternaire n'est pas supprimé par ces mécanismes, mais les chromatides sœurs ne sont plus liées entre elles, et peuvent alors être réparée par les systèmes de recombinaison ou du NHEJ

Finalement, de la même manière que les inhibiteurs de topoisomérase I, la collision entre le complexe transcriptionnel et le complexe ternaire stabilise le complexe irrémédiablement. Cette collision induit des cassures doubles brins que la cellule doit réparer. La collision induit en fait une dégradation de la topoisomérase de type II et démasque ainsi la cassure double brin (191). Nous reviendrons sur ces mécanismes dans le chapitre suivant.



**Figure 16 :** effet des inhibiteurs des TOPO II au niveau des sites communs de fragilité.

La présence d'un complexe ternaire entre deux fourches de réplication au niveau des sites communs de fragilité empêche la progression du réplisome. Sous l'effet de protéines RecQ hélicases, l'une des fourches subie une régression et forme une jonction Holiday. Cette jonction est spécifiquement reconnue par l'endonuclease Mus81-Eme1 qui la coupe et génère une extrémité double brin. Le complexe ternaire n'est cependant pas supprimé et la même série d'événement peut avoir lieu sur l'autre fourche de réplication aboutissant à la formation d'une autre extrémité double brin.

## **E) Combinaisons avec de nouvelles thérapies ciblant l'EGFR**

Le développement des thérapies ciblant spécifiquement une voie moléculaire a permis de mettre au point toute une série d'inhibiteurs capables d'augmenter les bénéfices des chimiothérapies classiques sur le patient. Parmi ces thérapies, les inhibiteurs de la famille de l'EGFR se sont révélés efficaces contre des tumeurs colorectales métastatiques résistantes aux inhibiteurs de topoisomérase I (192). Deux grands types d'inhibiteurs ont été développés. Le premier est un anticorps monoclonal humanisé (cetuximab) dirigé contre le domaine extracellulaire du récepteur et qui empêche sa liaison par les activateurs classiques de l'EGFR (193). Le cetuximab cible aussi l'endocytose du récepteur et sa dégradation par le lysosome. L'anticorps agit en bloquant le récepteur dans une configuration où il ne peut se dimériser de façon efficace (194). Le second, le gefitinib, est un inhibiteur du domaine kinase de l'EGFR qui empêche le récepteur de s'autophosphoryler lors de son activation, ce qui inhibe la transduction du signal d'activation du récepteur à l'intérieur de la cellule. La plus large étude conduite à ce jour a été réalisée chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique résistants aux inhibiteurs de topoisomérase I (Irinotecan) (192). L'étude mesurait l'effet d'un traitement conjuguant l'irinotecan et le cetuximab et le comparait avec un traitement utilisant le cetuximab seul. Le traitement irinotecan plus cetuximab induit un taux de réponse global de 50% avec une médiane de survie de 8,6 mois. Le traitement au cetuximab induit aussi un taux objectif de réponse mais seulement chez 12% des patients avec une médiane de survie de 6,9 mois. Ces résultats ont été confirmés par deux autres études, y compris chez des patients résistants à l'irinotecan et à l'oxaliplatine (195;196). Tous ces essais ont été réalisés chez des patients exprimant fortement l'EGFR car les résultats précliniques indiquaient que le cetuximab n'est actif que sur des cellules exprimant fortement l'EGFR. Depuis, des rapports ont modifié cette vision en montrant que l'expression de l'EGFR n'était pas un facteur prédictif de réponse (197).

Des essais incorporant un nombre beaucoup moins important de patient ont été réalisés avec le gefitinib chez des patients traités précédemment par l'oxaliplatine ou l'irinotecan. Les résultats sont beaucoup moins probants que ceux utilisant le cetuximab. L'induction de forte toxicité (neutropénie, diarrhée et déshydratation) est sans doute responsable de ceci car les doses utilisées ont dû être revues à la baisse (198).

De façon générale, les toxicités induites par les inhibiteurs de l'EGFR, en particulier le cetuximab ne sont pas très importantes. La plus courante est le rash acnéique reporté chez 85% des patients environ traités par le cetuximab. Un traitement d'antibiotique appliqué

localement suffit la plupart du temps. Les diarrhées déjà mentionnées sont le problème majeur des inhibiteurs du domaine kinase de l'EGFR qui induisent également un rash acnéique (60% des patients).

L'effet bénéfique des inhibiteurs de l'EGFR n'est pas bien compris. L'utilisation des inhibiteurs de l'EGFR s'est basée sur plusieurs études précliniques utilisant des xénogreffes de cellules colorectales humaines chez la souris. Ainsi le cetuximab augmente par exemple l'efficacité d'un traitement utilisant un inhibiteur de topoisomérase I sur une xénogreffe de cellules colorectales (199). Des xénogreffes similaires avec plusieurs lignées colorectales différentes ont montré que l'expression et la phosphorylation de l'EGFR ne sont pas prédictives de l'efficacité des inhibiteurs de l'EGFR seul ou en association avec des traitements de chimiothérapie comme l'irinotecan ou le cisplatine (200). Ces données qui sont en accord avec l'étude clinique présentée par N.E Kemeny et ses collaborateurs posent un problème car l'un des critères de sélection des patients traités par le cetuximab est l'expression de l'EGFR. Une étude clinique réalisée chez une dizaine de patients réfractaires aux traitements conventionnels de chimiothérapie par irinotecan ou oxaliplatine et n'exprimant pas l'EGFR propose un nouveau mécanisme d'action des inhibiteurs de l'EGFR. Les patients qui répondaient favorablement au traitement irinotecan plus cetuximab présentaient une diminution importante du taux de VEGF circulant. Ainsi il est possible que l'inhibition des récepteurs à l'EGFR inhibe l'angiogénèse induite dans l'environnement tumoral pouvant expliquer l'efficacité de ce traitement y compris chez des patients où l'EGFR n'est pas exprimé par les cellules tumorales (201).

L'autre élément important expliquant les effets des inhibiteurs de l'EGFR est l'activation de l'EGFR par les traitements de chimiothérapie (200). L'activation des métalloprotéinases membranaires ADAM17/TACE par l'irinotecan est sans doute en partie responsable (202). Ces protéases coupent l'ectodomaine des ligands membranaires de l'EGFR libérant ces ligands dans le milieu extracellulaire capable alors d'activer l'EGFR (203). Ces protéases sont activés par plusieurs kinases comme les kinases de stress p38, ou la PKC $\alpha$  (202). Une étude utilisant le cisplatine a également montré que ce traitement induisait l'activation de l'EGFR via la tyrosine kinase c-src (204). Bien que cette étude indique que c-src active directement l'EGFR, il est probable que l'activation des métalloprotéinases par c-src est un mécanisme important (205). L'activation de l'EGFR par les traitements de chimiothérapie est associée à l'activation des MAPK ERK et de la kinase AKT (206). Chez les patients atteints de cancer du poumon et n'ayant jamais fumé, on a rapporté l'existence de récepteurs mutés qui présentent une activité constitutive et activent fortement la kinase AKT.

Ces patients ont un excellent taux de réponse au gefitinib (207). En fait, il semble que l'EGFR inhibe l'action de la drogue en limitant la sensibilité à l'apoptose. L'EGFR permet l'activation de la protéine kinase AKT, et nous le verrons dans la partie III du facteur de transcription STAT3. L'activité de ces deux protéines permet la transcription et l'activation de plusieurs protéines de survie comme Bcl-XL. De plus AKT phosphoryle Bax et inhibe sa translocation à la mitochondrie (208). Finalement la phosphorylation de l'EGFR sur la tyrosine 845 après un traitement à la doxorubicine a été impliqué dans sa translocation à la mitochondrie. Il interagit alors avec la sous unité II de l'oxydase du cytochrome c (MTCO2), ce qui inhiberait la perméabilisation mitochondriale et l'apoptose (209).

L'EGFR favorise également la réparation des cassures de l'ADN induite par les traitements de chimiothérapie (210). Actuellement les gènes impliqués ne sont pas clairement définis mais plusieurs gènes du nucléotide excision repair comme ERCC1 (211) ou du NHEJ comme les DNA-PKcs semblent être impliqués (212). De plus l'EGFR pourrait agir directement au sein du noyau, plusieurs études ayant montré son import nucléaire après un traitement irradiant (213). L'EGFR interagit ainsi directement avec les DNA-PK et l'activité kinase de l'EGFR semble nécessaire à l'import nucléaire des DNA-PK(214).

On voit d'après ces données, que l'utilisation des inhibiteurs de l'EGFR pourrait être améliorée, si l'on comprenait mieux le mode d'action de ces inhibiteurs en relation avec les différents paramètres impliqués dans la réponse aux dommages de l'ADN, générés par exemple, par les inhibiteurs de topoisomérase.

## **Chapitre II : Réponses et échappements à ces chimiothérapies**

### **A) La détection et la réparation des dommages de l'ADN induits par les inhibiteurs de topoisomérase**

Avant d'analyser en détail les mécanismes de réparation des dommages de l'ADN induit par les inhibiteurs de topoisomérase, il faut souligner le fait que deux grands mécanismes extrêmement différents agissent au sein de la cellule. Comme nous l'avons dit précédemment, les dommages de l'ADN sont induits lors de la collision des complexes ternaires avec le réplisome ou le complexe de l'ARN polymérase. Lors de la collision impliquant le réplisome, la présence des chromatides sœurs et le danger que représente l'effondrement de la fourche de réplication vont induire des mécanismes tout à fait différents de ceux induit lors d'une collision impliquant l'ARN polymérase.

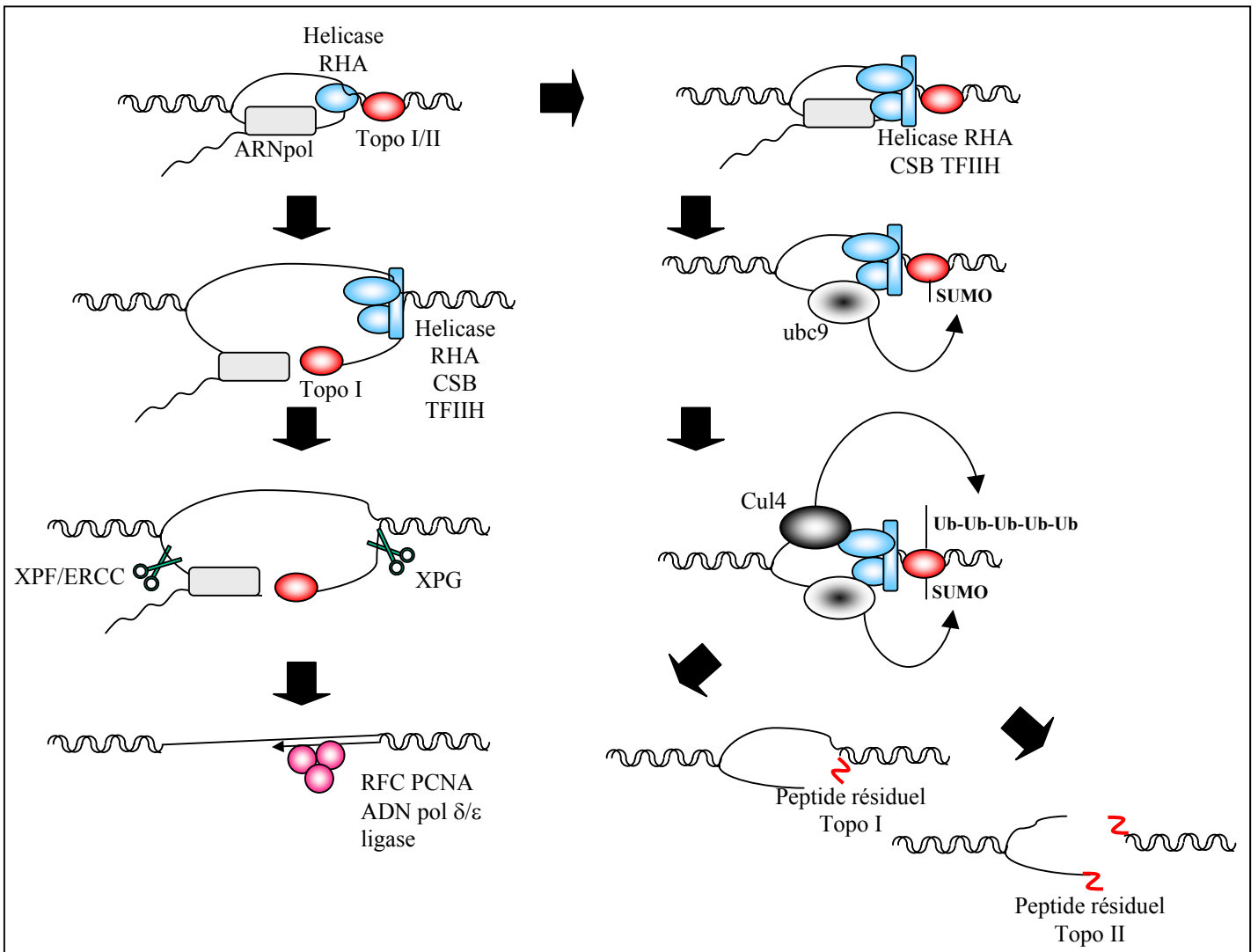
#### **1. Dommage de l'ADN et complexe transcriptionnel**

Lors de la collision entre l'ARN polymérase et le complexe ternaire, le premier signal qui active les systèmes de réparation est l'arrêt de la transcription. Cet arrêt induit le recrutement des protéines SUMO-1 E2 ligase *ubc9*, qui induisent la sumoylation de RHA une sous unité hélicase du complexe ARN polymérase (215). Les protéines CSB (hélicase/ATPase de la famille de Swi/Snf) ainsi que la protéine du nucléotide excision repair à activité hélicase TFIIH sont également recrutées (216). Ces enzymes permettent d'augmenter l'activité hélicase de l'ARN polymérase afin de traverser le complexe ternaire qui s'oppose à la progression de la polymérase.

Si l'activité hélicase associée à la polymérase permet le déroulement de l'hélice d'ADN malgré la présence de la topoisomérase de type I, la séparation des deux brins d'ADN sur une longueur d'environ 30 nucléotides permet alors l'activation du nucléotide excision repair (217). Le nucléotide excision repair fait intervenir un complexe protéique constitué de deux endonucléases, XPF/ERCC1 et XPG, et d'une protéine XPA capable d'engager ces endonucléases au niveau du complexe transcriptionnel (216). L'incision de l'ADN permet de supprimer la région génomique liée à la topoisomérase de type I ou altérée par l'activité de la topoisomérase. Cette région est ensuite restaurée par complémentarité de séquence avec l'autre brin par les protéines RFC/PCNA DNA polymérase  $\epsilon/\delta$  et une ligase (figure 17).

En présence de topoisomérase II et certainement fréquemment dans le cas de la topoisomérase I, l'activité hélicase de RHA, CSB, et TFIIH n'est cependant pas suffisante

pour déplacer le complexe ternaire. Le blocage définitif de la polymérase induit son décrochage et sa dégradation par l'ubiquitine E3 ligase Cul4 (216). L'absence de polymérase au niveau du complexe transcriptionnel active la sumoylation et l'ubiquitination des topoisomérases via la SUMO-1 E2 ligase *ubc9* (218) et l'ubiquitine E3 ligase Cul4 (219). La dégradation de la topoisomérase I ou II induit alors l'apparition d'une cassure simple brin dans le cas de la topoisomérase I et double brin dans le cas de la topoisomérase II (figure 17).

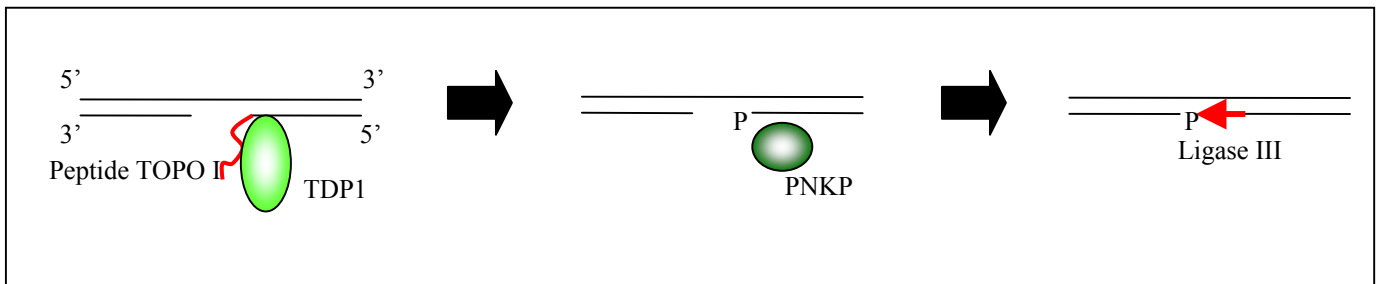


**Figure 17 :** *Elimination du complexe ternaire lors de la collision avec l'ARN polymérase*

Lors de la collision, l'activité hélicase recrutée par le complexe transcriptionnel peut permettre d'engager le NER qui supprime une petite région d'ADN contenant le complexe ternaire. Si l'activité hélicase ne peut engager le NER, la topoisomérase est dégradée via une ubiquitination dirigée par une SUMOylation, ce qui génère une cassure simple brin ou double brin avec un peptide résiduel de la topoisomérase à l'extrémité de l'ADN.



Les extrémités de la cassure en 3' dans le cas de la topoisomérase I et en 5' dans le cas de la topoisomérase II sont cependant liées par un peptide résiduel de la topoisomérase. La Tyrosyl-DNA phosphodiesterase TDP1 clive la liaison entre le phosphate lié au ribose et la tyrosine du peptide résiduel de la topoisomérase (184;220). Après action de TDP1 sur le complexe formé par la topoisomérase I, la PNKP (polynucleotide kinase phosphatase) supprime le groupement phosphate en 3' encore présent sur ce nucléotide et phosphoryle celui en 5' sur le nucléotide situé en position -1 par rapport au site de coupure de la topoisomérase I. Les deux processus enzymatiques via TDP1 et PNKP génèrent la structure nucléotidique capable d'engager la voie de réponse aux dommages de l'ADN simple brin (figure 18). Dans le cadre de la topoisomérase II, l'action de TDP1 est suffisante car la tyrosine catalytique est liée au phosphate en 5' du nucléotide situé en position +1 du site catalytique (220).



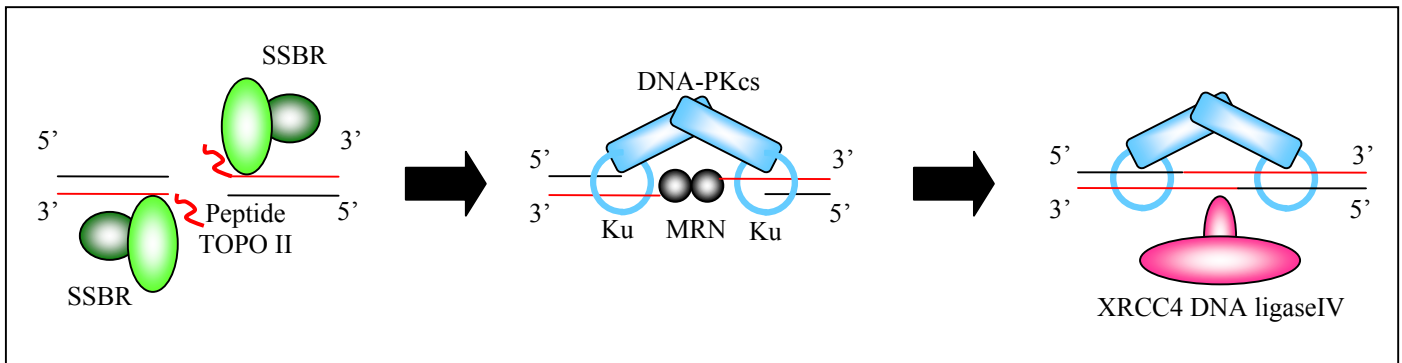
**Figure 18 :** Réparation des cassures de l'ADN générées par la dégradation des TOPO I

Après la dégradation de la topoisomérase I, le peptide résiduel est supprimé par le complexe TDP1 PNKP, ce qui permet la réparation de l'ADN par la ligase III.

Les cassures simples brins sont reconnues par un complexe protéique appelé le SSBR (single strand break repair) assimilable au "base excision repair". Le SSBR contient les protéines TDP1 et PARP (221). PARP est essentielle car c'est la protéine qui détecte la cassure simple brin générée après la dégradation de la topoisomérase I. PARP se lie spécifiquement aux cassures simple brin et induit une réaction de poly(ADP-ribosylation) sur ses protéines cibles. Cette réaction permet d'induire une très forte décompaction de la chromatine et le recrutement de la protéine XRCC1 qui coordonne les différentes activités du SSBR. Après l'action de TDP1 et de la PNKP, la cassure peut-être réparée par un complexe DNA polymérase  $\beta$ /ligase3.

La reconnaissance des cassures doubles brins générées par le processing des topoisomérases II est un phénomène plus compliqué (222). Après action du SSBR qui supprime le peptide résiduel de la topoisomérase II, deux complexes protéiques permettent de conserver une certaine cohésion entre les deux extrémités fragmentées : les complexes DNA-

PK et MRN. Le complexe DNA-PK lie une extrémité de l'ADN et se dimérise avec le même complexe sur l'autre extrémité (223). Il permet l'activation du NHEJ (Non homologous end joining). Le complexe MRN (Mre11-Rad50-NBS1) se lie à chaque extrémité de la cassure via Mre11 et forme un pont moléculaire entre les deux extrémités cassées via les domaines coiled-coil de Rad50 (224). Lorsque les deux extrémités de l'ADN sont à bout cohésif la cohésion des deux extrémités permet le recrutement d'un complexe XRCC4/ DNA ligaseIV capable de relier les deux extrémités de l'ADN double brin en une seule étape (figure 19).



**Figure 19 :** Réparation des cassures de l'ADN générées par la dégradation de la TOPO II $\beta$

Après la dégradation de la topoisomérase II, le peptide résiduel est supprimé par le SSBR. La cassure double brin est alors réparée par le NHEJ.

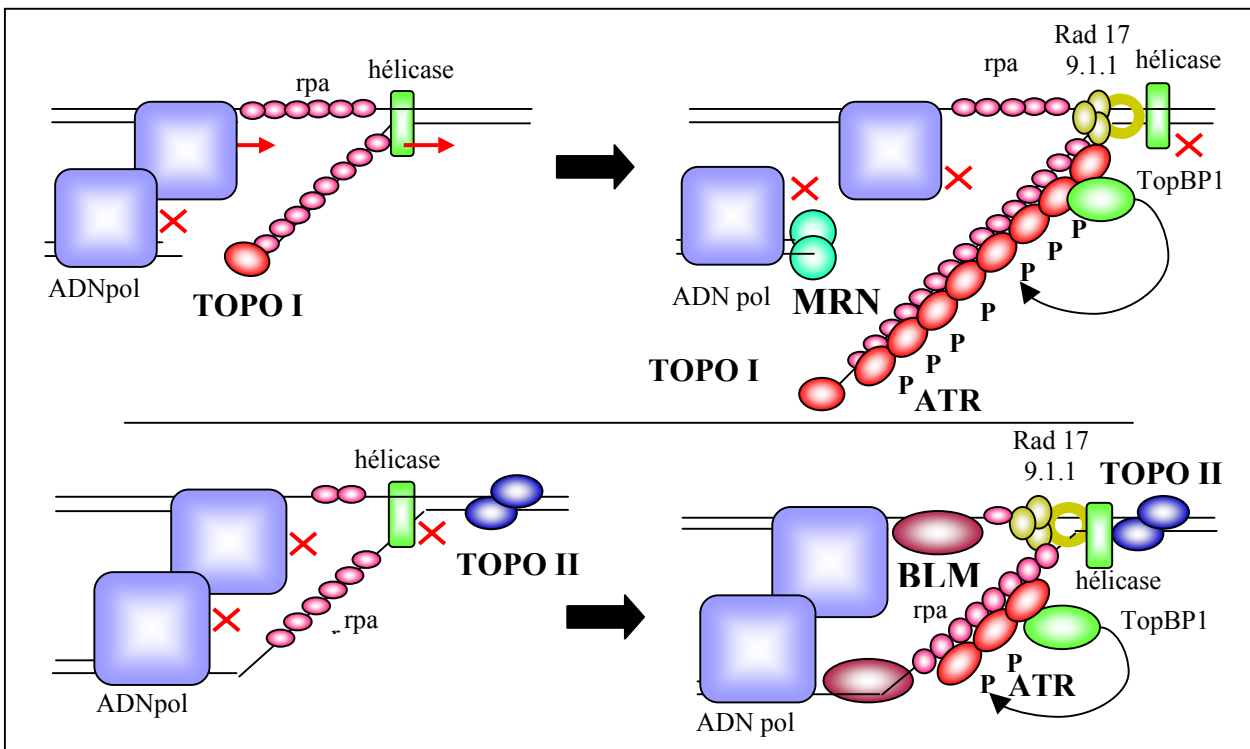
## 2. Dommages de l'ADN et fourche de réplication

La collision de la fourche de réplication avec le complexe ternaire induit des structures génomiques différentes de celles générées par la collision de l'ARN polymérase avec ce même complexe. La principale différence se situe dans la présence d'une longueur non négligeable d'ADN simple brin. Ceci est important car avant même l'apparition de cassure double brin, la présence de cet ADN simple brin va permettre d'engager les systèmes de réparations capables d'éliminer le complexe ternaire. La réparation des cassures doubles brins apparues au cours de ces processus n'est ici réalisée que dans un second temps et de manière indirecte via la recombinaison homologue. Ceci est possible au cours de la phase S et G2 grâce à la présence de la chromatide sœur au niveau de la fourche de réplication.

Les inhibiteurs de topoisomérase I et II induisent l'apparition d'ADN simple brin. Les inhibiteurs de topoisomérase I induisent un découplage entre les activités hélicase et ADN polymérase. Ce découplage génère l'ADN simple brin entre l'hélicase et la polymérase. Les inhibiteurs de topoisomérase II bloquent l'activité hélicase. L'activité polymérase et hélicase étant liées, la polymérase ne peut finir la réplication de l'ADN déjà déroulé par l'hélicase ce qui maintient là encore une région d'ADN simple brin (225). Enfin, l'ADN simple brin est

généralisé après l'arrêt de la fourche de réplication ou au cours de la réparation des cassures doubles brins engendrées par l'effondrement des fourches de réplication

L'ADN simple brin recrute la protéine rpa qui le protège. La protéine rpa se lie de manière spécifique à la protéine kinase ATR et permet le recrutement du complexe ATR-ATRIP (226). Le recrutement d'ATR nécessite la présence d'un autre complexe protéique composé du complexe Rad1 Rad9 Hus1, et de la protéine clamp Rad17(227). Enfin la protéine TopBP1 (topoisomérase binding protein), se lie spécifiquement à ATR recruté sur rpa et l'active (228). L'activation d'ATR permet le recrutement et l'activation des complexes MRN et des RecQ hélicase BLM (229-231) (figure 20). Les protéines BLM inhibent la recombinaison homologue et favorisent la régression de la fourche de réplication quand cela est possible. Le complexe MRN au contraire favorise la résection d'une région importante d'ADN à partir de l'extrémité double brin, ce qui génère une longue région d'ADN simple brin capable d'engager la recombinaison homologue. Le complexe MRN permet également de recruter BRCA1, protéine nécessaire à la recombinaison homologue.

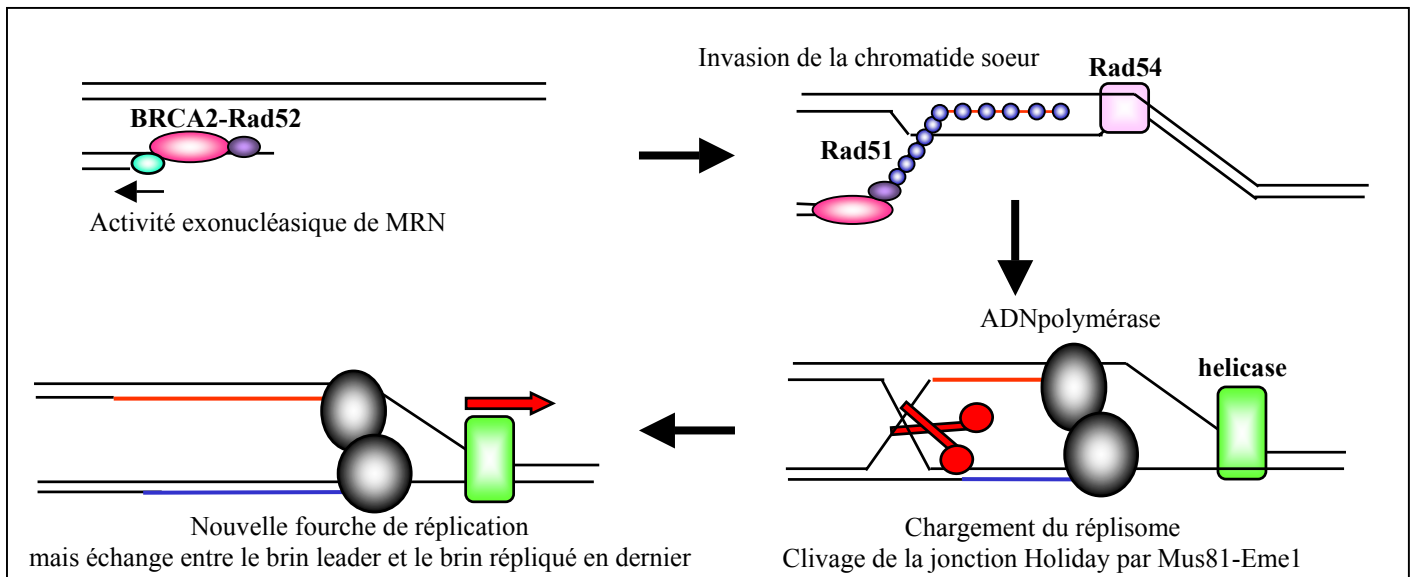


**Figure 20 :** L'inhibition du réplisome induit l'activation d'ATR et le recrutement des protéines BLM ou MRN

Le découplage de l'hélicase et de l'ADN polymérase ou l'arrêt de l'hélicase génère de l'ADN simple brin qui induit l'activation d'ATR. ATR permet alors le recrutement des protéines MRN au niveau de l'extrémité double brin générée par les inhibiteurs de topoisomérase I. ATR permet également le chargement des protéines BLM au niveau de la fourche de réplication bloquée par les inhibiteurs de topoisomérase II

Dans le cas des inhibiteurs de topoisomérase I, la présence d'une cassure simple brin au niveau du brin leader s'oppose à la régression de la fourche de réplication car les RecQ hélicase n'agissent pas sur des structures doubles brins à bout franc (la cassure simple brin est transformé en double brin par la réplication). Ceci par contre permet de manière optimale le recrutement de MRN et induit son activité exonucléasique. Dans le cas des inhibiteurs de topoisomérase II, il n'y a pas ce type de cassure lors de l'arrêt de la réplication mais uniquement un ADN simple brin, excellent substrat pour ATR et les protéines BLM qui favorise alors la régression de la fourche de réplication (figure 20).

Après l'effondrement de la fourche, le redémarrage de la réplication nécessite la recombinaison homologue. Au niveau de l'ADN simple brin, le recrutement de BRCA2 par les protéines BRCA1 permet le chargement de la protéine Rad51 et sa nucléation autour de l'ADN (231;232). La protéine Rad52 se lie à l'ADN et à rpa et participe au recrutement de Rad51. L'ADN est alors sous forme d'un long filament enroulé par les protéines Rad51 capable de rechercher dans la chromatide sœur la séquence homologue nécessaire à la recombinaison. Les protéines Rad54 permettent de dérouler la double hélice au niveau de la chromatide sœur afin de permettre la recherche d'homologie. La réussite de ce processus permet de réengager la réplication en se servant comme matrice de la chromatide sœur synthétisée au niveau du brin répliqué en dernier (233)(figure 21). Finalement la jonction Holliday générée par la recombinaison homologue est résolue par les protéines Mus81-Eme1.



**Figure 21 :** Activation de la réplication par recombinaison homologue (233)

La résection d'un brin d'ADN par le complexe MRN permet le recrutement des protéines BRCA2 et RAD52. Ces protéines permettent alors le chargement des protéines Rad51 sur l'ADN simple brin et l'invasion de la chromatide sœur. Lorsque la recombinaison fonctionne, le réplisome est rechargé et la jonction holiday est clivée par des résolvases de type Emel-Mus81. La réplication redémarre alors générant cependant un échange de chromatides sœurs.

## **B) L'activation des points de contrôle du cycle cellulaire**

### **1. Arrêt du cycle cellulaire**

Les inhibiteurs de topoisomérase I induisent majoritairement un blocage de la réplication et donc un blocage de la cellule en phase S. Le problème majeur posé par ces inhibiteurs est l'effondrement de la fourche de réplication sur elle-même et la génération d'une cassure double brin à une extrémité qui activent les protéines kinases ATR et ATM avec un rôle prépondérant pour ATR (225).

L'effet des inhibiteurs de topoisomérase II est complexe et dépend de deux facteurs importants. Le premier est le fait que ces inhibiteurs sont plus actifs sur la topoisomérase de type II $\alpha$  que la topoisomérase de type II $\beta$  (234). L'expression de cette topoisomérase est activée progressivement au cours du cycle cellulaire. Ainsi dans la plupart des types cellulaires, ces inhibiteurs induisent un blocage des phases S et surtout G2 (235). Ces topoisomérases agissent à la fin de la réplication lors de la décaténation des chromatides sœurs et en amont de la fourche au niveau des sites communs de fragilité. L'inhibition de la décaténation et la présence de complexe ternaire en aval de la fourche bloquent la progression de la fourche de réplication (236). L'inhibition de la réplication induit la présence d'ADN simple brin au niveau des sites communs de fragilité et l'apparition de cassures doubles brins, ce qui active ATR et ATM bloquant alors l'entrée en mitose.

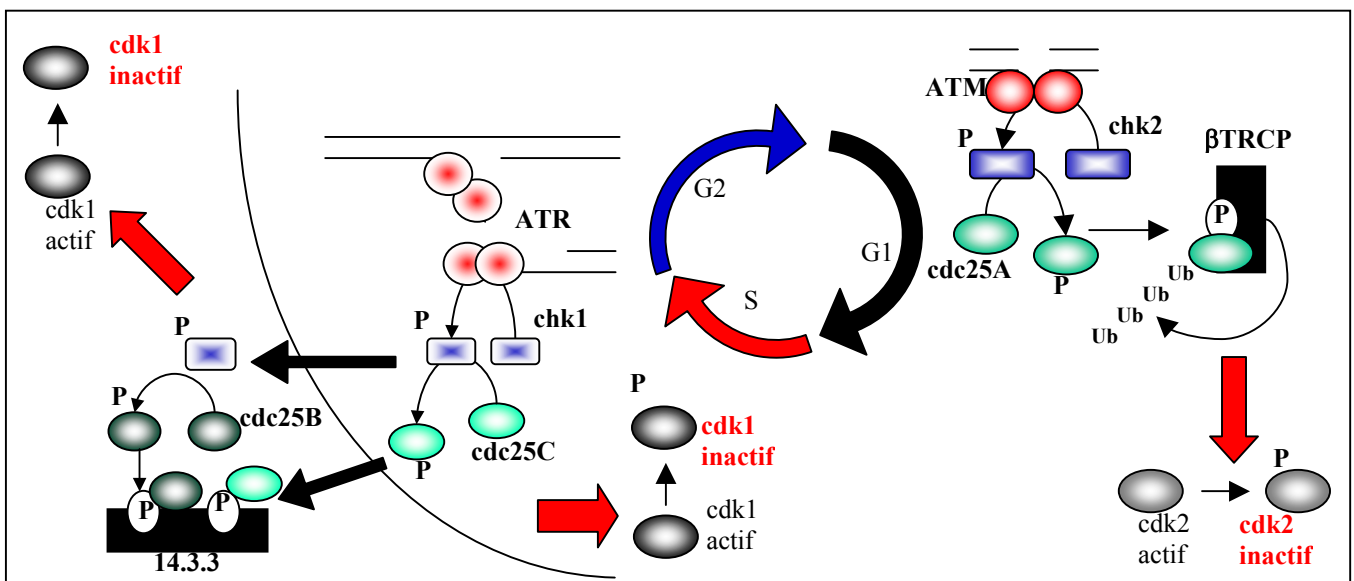
### **2. Activation du point de contrôle dépendant de la voie de signalisation**

#### **Chk/cdc25**

La présence de foci d'ATR au niveau de l'ADN simple brin permet l'activation des protéines chk1. Ces protéines kinases ne sont pas retenues au niveau du foci et peuvent circuler librement pour inhiber les phosphatases cdc25 (237). Les phosphatases cdc25A phosphorylées par chk1 sont dégradées par un complexe E3 ubiquitine ligase  $\beta$ TRCP, aboutissant à l'inhibition des complexes cycline E-cdk2 et cycline A-cdk2 (238). L'inhibition de ces complexes empêche la phosphorylation de cdc45 et son recrutement au niveau des origines de réplication. Ceci empêche alors l'activation des fourches de réplication (239).

L'activation des kinases chk1 par ATR induit également la phosphorylation des phosphatases cdc25B et cdc25C (240). La phosphorylation de ces phosphatases induit leur séquestration dans le cytoplasme par des protéines 14.3.3 et empêche l'activation des complexes cyclines B-cdk1 (237;241). Le blocage des phosphatases cdc25 inhibe ainsi de façon extrêmement efficace l'entrée des cellules en mitose.

La collision entre les fourches de réplication et les complexes ternaires permet également l'activation d'ATR, bien que ceci soit un évènement plus tardif et sans doute de moindre amplitude que celle d'ATR. ATM permet l'activation de la protéine kinase chk2 (242). Comme chk1, chk2 phosphoryle la protéine cdc25A et induit sa dégradation avec les mêmes conséquences pour le cycle cellulaire. En revanche chk2 a peu d'effet sur cdc25B et cdc25C. Finalement, l'apparition de cassure double brin au cours de la phase G1 induit l'activation d'ATR. L'activation de chk2 par ATM permet d'inhiber la phosphatase cdc25A et les protéines kinases cdk2 qui ne peuvent alors activer le démarrage de la réplication. La régulation des protéines Chk que nous venons de détailler est schématisés ci-dessous.



**Figure 22 :** Activation des points de contrôle du cycle cellulaire par ATM/ATR Chk1/2 cdc25A/B/C

Les cassures doubles brins de l'ADN induisent l'activation de chk2 au cours de la phase G1 et la dégradation de cdc25A par βTRCP. La kinase cdk2 est alors inactive et la cellule ne peut démarrer la réplication de l'ADN. L'effondrement des fourches de réplication au cours des phases S et G2 induit l'activation de chk1. chk1 induit la séquestration des protéines cdc25B et cdc25C par les protéines 14.3.3. La kinase cdk1 est alors inactive et ne peut déclencher la mitose.

L'activation du point de contrôle protège la cellule des inhibiteurs de topoisomérase à deux niveaux. L'activation de chk1 et l'inhibition des protéines cdc25A au cours de la phase S permet à la cellule de stopper la réplication de l'ADN. Ceci diminue le nombre de collision entre la fourche de réplication et les complexes ternaires. De plus, l'inhibition des protéines cdc25B et cdc25C permet à la cellule d'obtenir du temps supplémentaire pour répliquer les zones non répliqués à cause des inhibiteurs de topoisomérase en particulier les sites communs de fragilité.

### **3. Activation du point de contrôle dépendant de la voie p53**

#### a) Mise en évidence du rôle de p53

Le rôle de p53 dans la réponse aux dommages de l'ADN a été confirmé par l'utilisation de souris transgéniques. Chez des souris déficientes ou présentant des mutations de p53, on observe une radiorésistance, en particulier au sein des lignées hématopoïétiques (243). De façon similaire, les fibroblastes de la peau des patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni (mutation germinale de p53) sont résistants aux irradiations (244). La radiorésistance des souris ou des cellules possédant un gène de p53 altéré est associée avec l'absence d'induction d'apoptose après un traitement aux rayons irradiants. La contrepartie de cette radiorésistance est que ces souris développent des lymphomes et des sarcomes (245). Ces tumeurs sont toutes aneuploïdes, ce qui confirme le rôle de p53 au cours de la réponse aux dommages de l'ADN qui sont les précurseurs de l'aneuploïdie.

#### b) Activation de p53 par les dommages de l'ADN

p53 est directement recruté au niveau des foci de dommages de l'ADN car cette protéine colocalise et coimmunoprécipite avec les protéines histones H2AX phosphorylées (246). Au niveau des foci, p53 est phosphorylé par ATR/ATM sur la sérine 15, ce qui semble être impliqué dans l'activation de l'apoptose. Ainsi dans des splénocytes et des thymocytes de souris transgéniques possédant la mutation p53 S18A (la sérine 18 chez la souris correspond à la sérine 15 chez l'homme) l'apoptose n'est pas induite par les dommages de l'ADN (247). En revanche, p53 est stabilisé de façon identique dans les cellules contrôles et dans celles portant la mutation. Cette phosphorylation est en fait nécessaire pour la phosphorylation d'autres résidus sérines, comme la ser46 impliquées dans l'activation de l'apoptose (248). De façon similaire cette phosphorylation est impliquée dans l'acétylation du domaine C-terminal de p53 sur les résidus lys 320 et 386. Ces résidus permettent de stabiliser p53 sur des promoteurs de faible affinité pour p53. Ainsi, des mutants de p53 sur la sérine 15 ne sont plus capables d'activer la transcription et d'interagir avec l'histone acétyltransférase p300, bien qu'ils soient toujours stabilisés par les dommages de l'ADN (249).

Les kinases chk1/chk2, activées par ATM/ATR phosphorylent p53 sur la sérine 20. La phosphorylation de la sérine 20 est critique car elle induit la dissociation du complexe Hdm2 p53, empêche l'ubiquitination de la protéine et induit sa stabilisation (250). Ces expériences ont été confirmées grâce à des cellules embryonnaires issues de souris où le gène de chk2 a été inactivé. Ces cellules sont radiorésistantes et leur irradiation n'induit pas la stabilisation de p53 (251).

Enfin, la protéine p14ARF pourrait être impliquée dans l'activation de p53 par les dommages de l'ADN. Les souris inactivées pour le gène de p19ARF sont très sensibles aux agents irradiants et carcinogène qui induisent l'apparition rapide de tumeurs (252). Ainsi p53 n'est pas activé de manière efficace par les dommages de l'ADN dans des fibroblastes embryonnaire de ces souris (253). Finalement un traitement irradiant induit la liaison de p14ARF à p53 et Hdm2, liaison nécessaire à l'activation de p53 (254). Comme nous l'avons déjà évoqué, il est probable que les dommages de l'ADN au sein du nucléole induise la libération de p14 ARF et l'activation de p53 (155).

c) L'arrêt du cycle cellulaire est activé par les dommages de l'ADN et p53

L'activation de p53 par les dommages de l'ADN peut induire en théorie un arrêt du cycle cellulaire dans toutes les phases du cycle. Cependant, l'activation du point de contrôle de la phase G1 par p21 est essentielle à l'activité de p53. Ceci a été confirmé par deux modèles murins démontrant que p21 supprime l'aneuploïdie. Il existe une forme mutée de p53, p53 R172P, qui ne peut induire l'apoptose mais qui est encore capable d'activer p21 et l'arrêt du cycle cellulaire (255). Des souris transgéniques porteuses de cette forme mutée développent spontanément des tumeurs, mais moins rapidement que des souris où le gène de p53 est absent. De plus les tumeurs développées chez les souris p53 R172P sont diploïdes tandis que les tumeurs développées par les souris où le gène de p53 est inactivé sont hautement aneuploïdes. Dans un autre modèle murin, l'absence de p21 augmente l'apparition de tumeur chez des souris où le gène ATM a été éliminé par recombinaison homologue. Ces tumeurs ont la particularité de présenter une instabilité chromosomique importante, instabilité exacerbée en absence de p21 (256).

La cible essentielle de p21 au cours du point de contrôle de la phase G1 est le complexe cycline E-cdk2. L'importance de l'inhibition de cdk2 par p21 a été confirmée par la génération de cellules colorectales humaines déficientes pour p21. Ces cellules malgré la présence d'une protéine p53 fonctionnelle ne peuvent activer le point de contrôle de la phase G1 et répliquent leur ADN après un traitement génotoxique (257). Au sein des cellules colorectales p21<sup>-/-</sup>, le point de contrôle de la phase G2 est fonctionnel et bloque l'entrée en mitose. Cependant, à la différence des cellules sauvages, les complexes cycline E cdk2 sont réactivés dans ces cellules p21<sup>-/-</sup> et induisent alors une nouvelle réplication de l'ADN et la tétraploïdie (258).



#### d) p53 induit des gènes inhibiteurs des phases G1 et G2

Comme nous l'avons évoqué dans la partie I, p53 induit de nombreux autres gènes inhibiteurs des phases G1 et G2. Les protéines BTG2 et cdc4 $\beta$  vont par exemple inhiber de façon directe ou indirecte l'activation du complexe cycline E-cdk2. L'activation de Gadd45A et de 14.3.3 $\sigma$  induit l'inhibition des complexes cycline B-cdk1 respectivement en dissociant le complexe (259) et en séquestrant la cycline B dans le cytoplasme. Gadd45 induit également la séquestration de cdk1 au sein de petits compartiments nucléaires associés à la maturation des ARN (260) et inhibe l'activité de la kinase Aurora-A, enzyme nécessaire à l'activation du complexe cyclineB-cdk1, notamment au niveau du centrosome (261). Finalement, p53 et p21 induisent une répression de la transcription des gènes nécessaires au déroulement de la mitose.

#### e) Le rôle de p53 dans la réponse aux inhibiteurs de topoisomérase

L'arrêt du cycle cellulaire induit par les dommages de l'ADN repose au moins en partie sur l'activation de p53 et de p21, ce qui implique que les mutations de p53 devraient avoir un impact important sur la réponse aux traitements de chimiothérapie. Cependant si l'absence de p53 ou p21 sensibilise les cellules à ces traitements n'est pas clair. Un traitement avec le sn38, le métabolite actif de l'irinotecan induit le point de contrôle de la phase S. Ce point de contrôle dépend de l'inhibition des cdc25 et est indépendant de la présence de p53 et de p21 (262). L'activation de p53 et de p21 induit ensuite les points de contrôle de la phase G2 et G1 et l'apparition du phénotype assimilable à la sénescence (263). En absence de ces protéines, les cellules ne deviennent pas sénescents mais meurent par apoptose, en particulier lors de la mitose. Les mêmes phénomènes ont été observés avec les inhibiteurs de topoisomérase II (264;265). Ainsi, malgré ces réponses très différentes, l'efficacité de ces traitements semble donc être indépendante de la présence de p53 et du type de réponse associée (263).

L'analyse des mutations et de l'expression de p53 chez les patients confirme ceci. Si la présence de mutation de p53 est un facteur global de mauvais pronostic dans certaines tumeurs, par exemple celles du sein ou du poumon (NSCLC), ceci ne dépend pas de la réponse cellulaire au traitement de chimiothérapie mais tient plus du phénotype invasif de ces tumeurs (266). L'inhibition du profil métastatique via l'activation des Maspin par p53 est sans doute essentiel ici. Nous reviendrons sur ces divers mécanismes dans le sous-chapitre suivant.

## **C) Catastrophe mitotique, apoptose, sénescence et nécrose**

### **1. Les chimiothérapies n'induisent pas d'apoptose au sein des tumeurs solides.**

L'utilisation des chimiothérapies est basée sur des expériences montrant que l'apparition de dommages de l'ADN dans une cellule active la protéine p53 qui elle même induit l'apoptose et la mort de la cellule. Cette apoptose survient alors rapidement lors du traitement (4 à 6h). Ces mécanismes sont essentiels lors du traitement de plusieurs tumeurs d'origine hématologique. Cependant, le traitement de la plupart des tumeurs solides n'induit pas l'apoptose. Lorsque ces tumeurs répondent de façon favorable aux traitements de chimiothérapie, des phénomènes de mitoses anormales, de nécroses et d'arrêts définitifs du cycle cellulaire sont le plus souvent observés. La raison de ceci n'est pas clair et deux hypothèses sont aujourd'hui privilégiées. La première est que les cellules hématologiques sont des cellules à renouvellement rapide contrairement à la plupart des cellules épithéliales. Ainsi la mort des cellules hématologiques par apoptose n'est pas en soit un problème car elles sont rapidement remplacées. Les mécanismes conduisant à l'apoptose sont donc peut-être beaucoup plus sensibles dans ces cellules que dans les cellules épithéliales (267). L'autre hypothèse repose sur la progression de ces tumeurs. La caractéristique commune à toutes les tumeurs épithéliales est le fait qu'au cours de la tumorigenèse, le microenvironnement de ces cellules est complètement perturbé. Ces cellules doivent survivre à un stress oxydatif constant, à l'hypoxie, à l'absence de facteur de croissance et de survie et finalement à la perte d'adhérence. Ainsi il est vraisemblable que les différents mécanismes nécessaires à la mise en place de l'apoptose soient altérés par cette histoire tumorale, histoire que l'on ne retrouve pas chez les cellules hématologiques (268)

La conception de la réponse cellulaire des cellules épithéliales aux traitements de chimiothérapie a ainsi considérablement évolué et deux paramètres sont essentiels. Le premier est que dans la majorité des cas, ces cellules incapables d'induire l'apoptose de façon rapide sont capables d'entrer en mitose malgré la présence de perturbations importantes dans leur génome. Ensuite, la présence de chromosomes altérés en particulier les chromosomes dicentriques ou acentriques au cours de la mitose serait l'événement précurseur de la mort cellulaire. Ce type de mort cellulaire est classiquement appelé catastrophe mitotique et aboutit à l'apoptose, à un arrêt définitif du cycle cellulaire (sénescence) ou à une nécrose (269). Au niveau cellulaire cette mort est caractérisée par la présence de micronoyaux dans les cellules, ou par l'analyse directe d'une répartition chromosomique anormale au cours de la mitose (270). La présence de ponts chromosomiques entre les deux pôles cellulaire sont ainsi

particulièrement recherchés. Les micronoyaux correspondent à des fragments chromatiniens ou des chromosomes entiers qui n'ont pu être ségrégués de manière correcte au cours de la mitose. Les ponts chromosomiques favorisent quant à eux la formation de cellules binucléées car ils empêchent la cytotélerèse lors de la télophase. La mort cellulaire serait tardive car la cellule doit entrer en mitose où la mise en place de la mort cellulaire est lente, en particulier lorsque la catastrophe mitotique induit la sénescence ou la nécrose .

Ces mécanismes ont deux implications importantes dans le cadre de l'étude des réponses aux traitements de chimiothérapie. Le traitement des tumeurs par les inhibiteurs de topoisomérase I ou II n'induit pas l'apoptose au cours des premières heures. Les cellules ne meurent qu'après plusieurs jours de traitement de façon graduelle. Les différents tests de survie par exclusion de marqueur vital ou par mesure de l'activité métabolique sont ainsi mal adaptés à l'étude de ces réponses. De même, les mesures de la réponse apoptotique sont mal adaptées puisque les tests effectués après 24 ou 48h de traitements ne sont pas prédictifs de la réponse aux traitements (269). L'analyse de cette réponse nécessite une mesure à plus long terme et le seul test valide ici est le test de clonogénicité. Ce test effectué sur une période de plus de 10 jours permet de mesurer la capacité proliférative des cellules traitées et tient compte de deux paramètres : la lenteur à laquelle la réponse se met en place et l'activation d'un programme définitif d'arrêt du cycle cellulaire assimilable à la sénescence répllicative dans un nombre non négligeable de cellules. Ainsi, des cellules qui semblent être insensibles à une chimiothérapie, peuvent en fait se révéler y être sensibles quand un test de clonogénicité est effectué. Le mécanisme de sénescence a été confirmé au sein de tumeurs du sein et du poumon issues de patients traités par des inhibiteurs de topoisomérase II ou des sels de platine (271;272). A partir des données obtenues chez la souris, on peut supposer que la sénescence est également induite chez les patients atteints de tumeurs colorectales lors d'un traitement par les inhibiteurs de topoisomérase I (263).

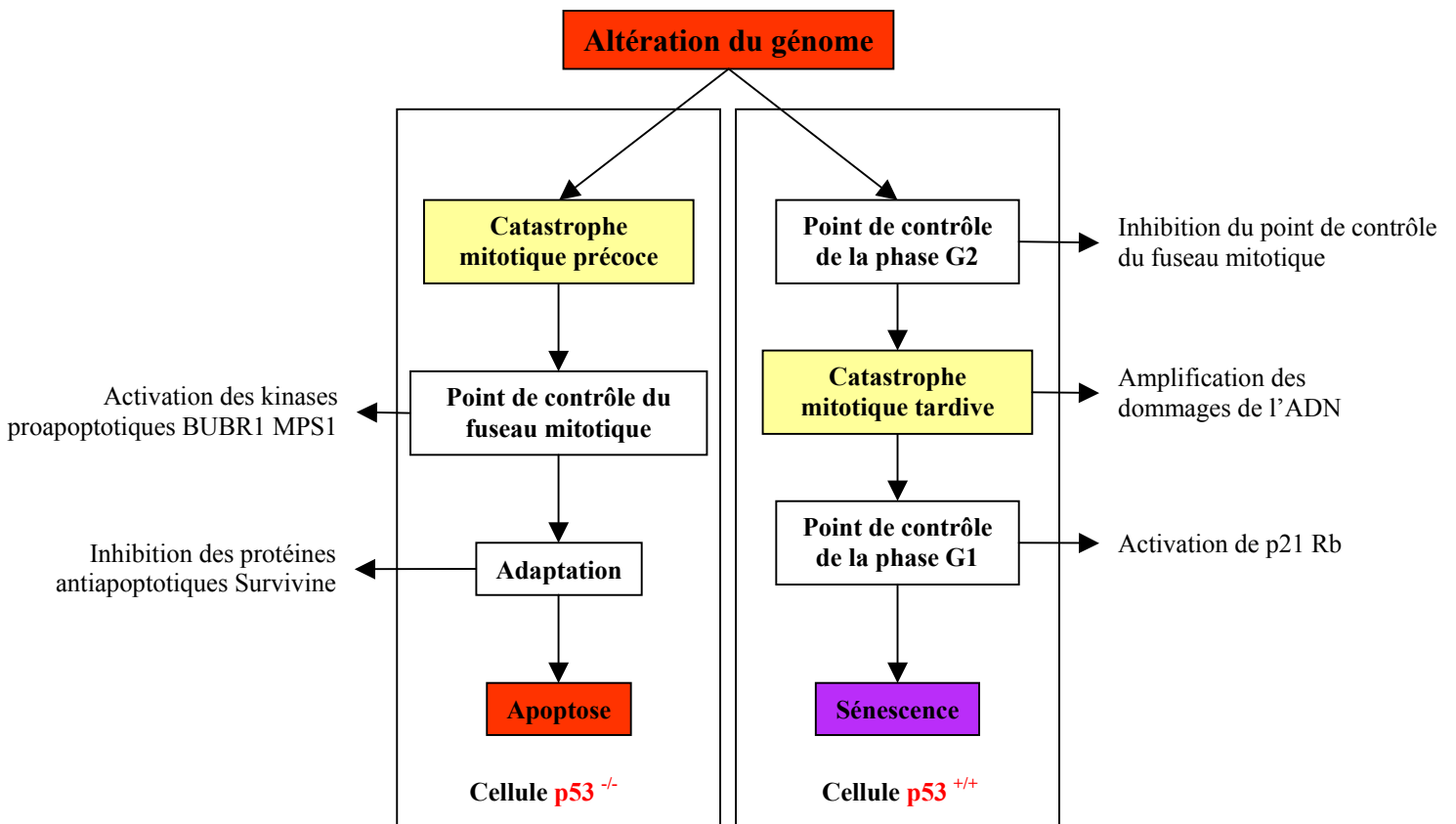
La seconde implication du mode de réponse des tumeurs solides est le choix de la dose de chimiothérapie à utiliser *in vitro*. *In vitro*, l'apoptose peut être induite dans des cellules issues de tumeurs solides par les chimiothérapies. Cependant les doses utilisées sont plus de cent fois supérieures aux doses nécessaires pour tuer plus de 99% des cellules lors d'un test de clonogénicité (273;274). Ainsi, l'apoptose n'est sans doute pas représentative de ce qui se passe en thérapie chez les patients.

## 2. Activation, régulation et implication de la catastrophe mitotique

A partir des données présentées ci-dessus, on voit qu'il est important de déterminer s'il est possible de moduler la catastrophe mitotique afin d'augmenter l'efficacité des traitements de chimiothérapie. La catastrophe mitotique peut ainsi induire l'apoptose, la sénescence ou la nécrose qui vont bien sûr impliquer chacun des mécanismes différents.

### a) Le rôle de p53

La présence d'une protéine p53 fonctionnelle est déterminante pour le type de réponse cellulaire observée lors d'un traitement de chimiothérapie. En présence de p53, l'activation du point de contrôle de la phase G2 via l'inhibition des cdc25 et l'activation de p21 s'opposent à la catastrophe mitotique. De plus, durant ce point de contrôle, les gènes qui régulent la mitose et notamment ceux qui activent le point de contrôle du fuseau mitotique sont réprimés par les protéines p53 p21. A l'inverse, les cellules où p53 n'est pas actif ne peuvent maintenir de façon prolongée le point de contrôle de la phase G2 et les gènes de la mitose sont correctement exprimés (figure 23) (270).



**Figure 23 :** La catastrophe mitotique induit par les inhibiteurs de topoisomérases (270;275).

Au sein des cellules colorectales qui expriment p53, les inhibiteurs de topoisomérase induisent une catastrophe mitotique tardive et la sénescence. Au contraire, dans les cellules déficientes en p53, les inhibiteurs de topoisomérase induisent une catastrophe mitotique rapide et la mort de ces cellules par apoptose.

### b) La catastrophe mitotique des cellules exprimant p53

La catastrophe mitotique est observée dans ces cellules de façon tardive. La réparation des dommages de l'ADN et le rétrocontrôle de p53 via l'activation d'Hdm2 peuvent permettre d'atténuer progressivement l'activation de p21 et des autres gènes nécessaires à l'inhibition des complexes cycline A-cdk2 et cycline B-cdk1 permettant progressivement de lever l'activation du point de contrôle (270). La présence résiduelle de p21 pourrait même être alors activatrice de la mitose car une étude montre que p21 favorise la formation et l'activité du complexe cycline B-cdk1 lorsqu'il est phosphorylé par cdk2 (49).

Lors de l'atténuation du point de contrôle, les complexes cyclines cdk sont réexprimés de manière précoce par rapport aux gènes qui contrôlent la mitose (270;275). Ces deux mécanismes vont favoriser le développement de mitoses anormales où les chromosomes ne vont pouvoir être condensés et attachés aux microtubules correctement. L'inhibition des protéines nécessaires au point de contrôle du fuseau mitotique permet alors à ces cellules de traverser la mitose rapidement, ce qui produit des cellules tétraploïdes binucléées et micronucléées.

La catastrophe mitotique amplifie les aberrations chromosomiques produites au cours de l'interphase précédente. Par exemple, les chromatides sœurs sont retenues entre elles au niveau des jonctions Holiday ou des régions non décaténées par les topoisomérases II. Cette liaison qui s'oppose à leur séparation peut céder entraînant la cassure du chromosome sous l'action du fuseau mitotique (276). Les cassures doubles brins de l'ADN générées au cours de la catastrophe mitotique activent alors la voie de signalisation ATM-chk2-p53-p21, bloquent le cycle cellulaire et induisent un arrêt définitif du cycle cellulaire assimilable à de la sénescence. Le rôle de p16 n'a pas été clairement définis ici car la plupart des cellules tumorales dans lequel le gène de p53 est fonctionnel présentent une inactivation de p16.

### c) La catastrophe mitotique des cellules n'exprimant pas p53

Les cellules qui ne possèdent pas p53 entrent rapidement en mitose malgré la présence de dommages de l'ADN. A la différence des cellules qui inactivent le point de contrôle du fuseau mitotique via l'activation de p53, ces cellules p53 déficientes ont un point de contrôle du fuseau mitotique fonctionnel (275). Les dommages de l'ADN induits par les inhibiteurs de topoisomérase entraînent la formation de chromosomes anormaux qui ne peuvent s'attacher correctement au fuseau mitotique, ce qui active le point de contrôle du fuseau mitotique présenté dans la première partie de l'introduction. L'activation de ce point de contrôle par les inhibiteurs de topoisomérase est importante car elle empêche les cellules de progresser en phase G1 et induit leur apoptose (277).

L'apoptose est induite par la mitose lorsque le point de contrôle du fuseau mitotique est activé puis adapté par la cellule (278). L'adaptation correspond à une sortie de la mitose et à l'entrée des cellules en phase G1 malgré la présence de chromosomes non ou mal attachés au microtubule (279). La dégradation progressive de la cycline B par le protéasome, malgré l'activation du point de contrôle du fuseau mitotique, est sans doute responsable de cette adaptation (280).

Le rôle distinct de l'activation puis de l'adaptation du point de contrôle laisse supposer une activation de l'apoptose en deux étapes. Au cours de l'activation du point de contrôle des protéines proapoptotiques sont activées. Les protéines kinases BubR1 sont ainsi proapoptotiques (281). Il est possible bien que non testé pour l'instant que les kinases Mps1 soient aussi proapoptotiques. Parallèlement, l'activité de ces protéines doit être contrebalancée par des protéines antiapoptotiques. La phosphorylation de Bcl-2 et de la survivine par cdk1 au cours de la mitose augmente leur activité et donc ces protéines sont peut-être les protéines qui empêchent l'activation de l'apoptose par le point de contrôle du fuseau (282). Lors de l'adaptation, l'activité de cdk1 décline tandis que les protéines kinases du point de contrôle sont toujours actives ce qui pourrait alors induire l'apoptose.

Les deux types différents de catastrophe mitotique induits par des inhibiteurs de topoisomérase sont importants, mais ils ne déterminent pas de façon absolue l'efficacité du traitement de chimiothérapie par les inhibiteurs de topoisomérase. Ainsi, des résultats obtenus à partir de xénogreffes de cellules colorectales chez des souris nudes montrent que diverses lignées, certaines déficientes pour p53 (HT29, HCT 116 p53<sup>-/-</sup>) et d'autres non (LS180, HCT116) sont sensibles à l'irinotecan de façon similaire (263).

### **3. Devenir des cellules qui n'entrent ni en apoptose ni en sénescence lors de la catastrophe mitotique**

Il est raisonnable de penser que les deux mécanismes présentés ci dessus ne sont pas complètement fonctionnels au sein des diverses tumeurs présentes chez le patient. Par exemple les adénocarcinomes colorectaux possèdent la plupart du temps un point de contrôle du fuseau mitotique altéré (281). La surexpression de la survivine, qui inhibe l'apoptose et perturbe ce point de contrôle est ainsi associée à un mauvais pronostique de façon systématique, quelque soit le type de tumeur analysé (266). Au sein des tumeurs où p53 est fonctionnel, des mutations de Rb où l'inactivation de p21 empêchent l'activation du programme de sénescence (265). Ainsi la catastrophe mitotique peut ne pas conduire à ces

deux phénotypes. Le devenir de ces cellules semble alors régulé de manière stochastique. Au hasard de la division et de la répartition du matériel chromosomique, les cellules meurent progressivement (269). On a longtemps crû que ce mécanisme était irréversible et conduisait à la mort de toutes les cellules ayant subi une catastrophe mitotique, cependant des études de vidéomicroscopie qui ont pu suivre ces cellules sur plusieurs générations ont montré que une faible proportion d'entre elles sont capables de restituer une colonie (283-285). De plus, ces cellules quittent parfois le cycle cellulaire normal et réalisent des endocycles (cycle sans mitose) aboutissant à la formation de cellules polyploïdes. Une étude a montré que ces cellules pouvaient alors subir une réduction somatique de leur nombre de chromosome de façon similaire à une méiose et générer de multiples cellules capables de reformer une colonie (284). Les mécanismes moléculaires intervenant ici ne sont pas connus mais plusieurs protéines méiotiques tel que Mos sont surexprimées dans ces cellules.

#### **4. La catastrophe mitotique comme cible thérapeutique.**

Le premier mécanisme de résistance est ainsi la capacité à réparer les dommages de l'ADN en amont de la catastrophe mitotique (266). L'activation du point de contrôle du fuseau mitotique ou l'activation du point de contrôle de la phase G1 dépendent de la quantité de dommages de l'ADN présents au cours de la catastrophe mitotique. Ainsi, les cellules capables de limiter ces dommages via l'élimination de la drogue ou via une réparation de l'ADN accrue seront beaucoup plus difficiles à traiter. En absence d'apoptose et de sénescence, la quantité des dommages présents après la catastrophe mitotique va également déterminer l'importance de la mort cellulaire observée par nécrose. Plus le nombre de chromosomes altérés sera grand, plus la probabilité qu'une cellule puisse survivre sera faible. De façon générale, la présence ou l'absence de tel ou tel système de réparation pourrait être un bien meilleur facteur pronostique de la réponse tumorale au traitement de chimiothérapie que la détection des protéines impliquées dans l'apoptose ou le contrôle du cycle cellulaire (286). L'activation de système de réparation spécifique permet ainsi aux cellules de résister aux inhibiteurs de topoisomérase I et II tandis que l'inhibition pharmacologique de ces systèmes permet de sensibiliser ces cellules (287;288).

Une autre stratégie permettant d'augmenter la mort cellulaire via la catastrophe mitotique consiste à accélérer l'entrée en mitose des cellules traitées afin qu'elles ne puissent avoir le temps de réparer leur ADN (289). Les réparations de l'ADN après la catastrophe mitotique sont beaucoup plus compliquées à réaliser (absence de chromatides sœurs, chromosomes isolés), et cette stratégie permet donc d'éliminer les cellules tumorales capables

intrinsèquement de réparer leur ADN. Cette stratégie est possible car le point de contrôle de la phase G2 au sein des cellules normales repose sur les deux systèmes cdc25 et p53 tandis que le point de contrôle est altéré sur l'un de ces systèmes dans la plupart des cellules tumorales. Ainsi, l'élimination du seul système présent au sein des cellules tumorales permet de cibler spécifiquement ces cellules vers la catastrophe mitotique. Des inhibiteurs des protéines kinases chk1 et cdc25 sont ainsi en cours de développement et plusieurs études de phase I ont été réalisées avec l'UCN-01, un inhibiteur de chk1. Une étude présente par exemple les résultats obtenus lors d'un traitement par le topotecan, un inhibiteur de topoisomérase I et l'UCN 01 un inhibiteur de chk1. Le cancer traité est un cancer des ovaires incurable par les sels de platines. Le traitement est bien supporté et augmente la médiane de survie de ces patientes par rapport à un traitement au topotecan seul (290). Une étude de phase II est en cours actuellement.

La dernier moyen de moduler la réponse aux traitements de chimiothérapie en fonction de la catastrophe mitotique est de moduler directement l'activation des points de contrôle du fuseau mitotique et de la phase G1 par les dommages de l'ADN (269). L'intérêt est de supprimer les cellules de manière active par apoptose ou par sénescence et non plus de manière stochastique par nécrose. En permettant l'activation efficace de l'apoptose ou de la sénescence après la catastrophe mitotique par un nombre limité de dommages à l'ADN, les traitements de chimiothérapie pourraient induire la mort des cellules qui réparent de manière efficace leur ADN. Il est ainsi possible que les divers poisons du fuseau mitotique, beaucoup plus efficaces pour induire le point de contrôle du fuseau mitotique que les dommages de l'ADN, agissent de cette manière en thérapie clinique lorsqu'ils sont associés avec divers traitements de chimiothérapie qui endommagent l'ADN.



### *Partie 3 : Les facteurs de transcription STAT3*

## **Chapitre I : Présentation générale des facteurs STAT3**

La compréhension des mécanismes liés à la tumorigenèse a permis de mettre en évidence de nombreuses protéines impliquées dans ces processus. Parmi ces protéines, on trouve des facteurs de transcription qui vont par leur activité induire la surexpression ou l'inhibition de gènes nécessaires aux différentes étapes de la tumorigenèse. Ce travail porte sur le rôle du facteur de transcription STAT3 dans les mécanismes de résistance aux traitements. Cette protéine joue un rôle essentiel dans la régulation des gènes impliqués dans la prolifération, la survie et la différenciation. Elle est activée de manière constitutive dans la plupart des tumeurs.

### **A) Structure et domaines fonctionnels des facteurs STAT3**

Le gène codant pour la protéine STAT3 est localisé sur le chromosome 17, chromosome portant deux autres membres de la famille STAT5a et STAT5b (291). Comme tous les facteurs de transcription, ces protéines possèdent plusieurs domaines fonctionnels cruciaux à leur fonctionnement.

Trois domaines sont importants. Le domaine de liaison à l'ADN est situé entre les acides aminés 320 et 480. Les arginines 414-417 permettent l'interaction de STAT3 avec l'ADN suite à la dimérisation du facteur de transcription (292). Le second domaine fonctionnel important est le domaine SH2 qui forme une poche à la surface de la protéine capable de lier les tyrosines phosphorylées. Ce domaine est impliqué dans la liaison aux récepteurs membranaires, la dimérisation et par conséquent la translocation nucléaire de STAT3 (293).

Le dernier domaine important de la protéine est le domaine C-terminal qui est nécessaire à l'activité transcriptionnelle de STAT3. Ce domaine contient 3 résidus importants. La lysine 685, acétylée par les histones acétyltransférases CBP/p300, stabilise le dimère et la liaison à l'ADN de STAT3. La phosphorylation de la tyrosine 705 permet quant à elle la formation du dimère de deux protéines STAT3 et leur activation. Finalement la phosphorylation de la sérine 727 possède un double rôle. La phosphorylation précoce de ce résidu bloque l'association de STAT3 avec les récepteurs membranaires et la phosphorylation de la tyrosine 705 (294). A l'inverse, la phosphorylation de la sérine 727 au sein du noyau est nécessaire à l'activité transcriptionnelle de STAT3 impliquant peut-être le recrutement de coactivateurs tel que l'histone acétyltransférase CBP (295).

Il existe un variant d'épissage alternatif STAT3 $\beta$  qui ne possède pas ce dernier domaine C-terminal. Ce variant est ainsi constitutivement dimérisé et nucléaire et est considéré comme un dominant négatif de STAT3 $\alpha$ . Cependant des inactivations spécifiques de cet isoforme montrent que STAT3 $\beta$  n'est pas un vrai dominant négatif. Il peut induire l'expression de gène de la phase aiguë de l'inflammation comme le fibrinogène ou la SAP (serum amyloïd P) après injection de LPS (296) et coopérer avec c-jun sur différents gènes tel que l' $\alpha$ 2-macroglobuline et l' $\alpha$ 1-chymotrypsine (297).

## **B) Activité transcriptionnelle des facteurs STAT3**

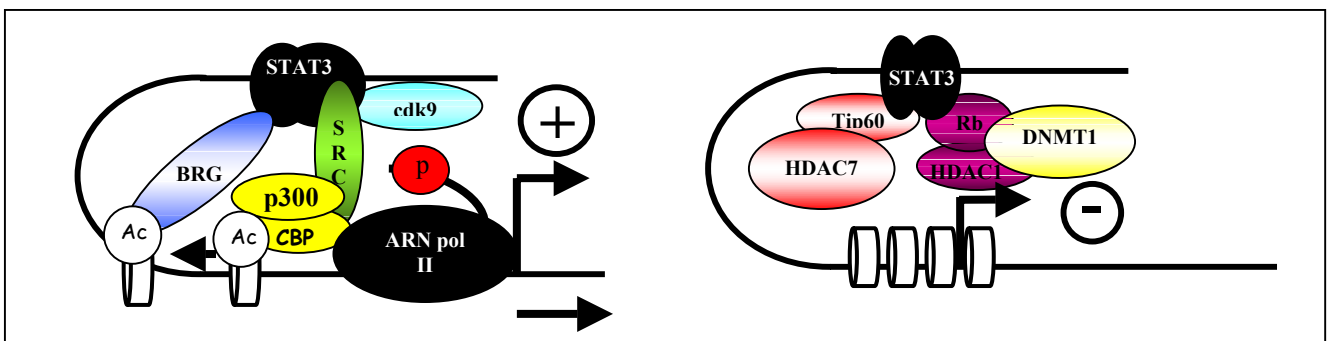
Historiquement, STAT3 était un facteur cytoplasmique activé en réponse aux cytokines, notamment celle de la famille de l'Interleukine 6 (IL-6). L'activation du récepteur à l'IL-6 induit l'activation des kinases JAKs. Ces kinases phosphorylent la protéine gp130, chaîne transductrice du signal transmis par le récepteur à l'IL-6, pour permettre le recrutement de STAT3 au niveau du récepteur. STAT3 est alors phosphorylé à son tour par les kinases JAK au niveau de la tyrosine 705, ce qui induit la dimérisation de STAT3 et sa translocation dans le noyau. Cette forme dimérisée de STAT3 est nécessaire à la rétention du facteur de transcription au sein du noyau et surtout à sa liaison à l'ADN(293).

Le mode d'activation décrit ci dessus est le modèle classique. Cependant, des travaux récent ont modifié quelque peu cette vision. Les facteurs de transcription STAT3 sont capables de se dimériser en absence de phosphorylation, et ces facteurs peuvent activer la transcription de certains gènes, notamment des gènes différents de ceux activés par les formes phosphorylées de STAT3 (298). Des formes monomériques de STAT3 peuvent également être importées au sein du noyau via une interaction avec l'importine  $\alpha$ 5. On ne connaît pas la fonction de ces monomères, mais il est possible que l'ADN soit capable de favoriser l'association de deux monomères entre eux au niveau des sites de liaison à STAT3, en absence de phosphorylation de la tyrosine 705.

Deux derniers évènements induisant des modifications post-traductionnelles sont importants pour l'activité de STAT3. STAT3 est phosphorylé sur la sérine 727 et acétylé sur les lysines 49, 87 et 685. L'acétylation des lysines par CBP/p300 permettrait la stabilisation du dimère sur l'ADN et augmenterait son activité transcriptionnelle (299;300). Lors d'une stimulation à l'IL-6, la phosphorylation de la sérine 727 par la PKC $\delta$  est tardive et impliquée dans l'activation de la transcription (301). L'inhibition de cette phosphorylation empêche le

recrutement des histones acétyltransférases CBP/p300 et diminue l'acétylation des gènes activés par STAT3 (295).

L'activation des gènes cibles de STAT3 fait intervenir différents cofacteurs (figure 24) nécessaires aux étapes successives de l'activation transcriptionnelle qui consistent en la transition d'une structure chromatinienne condensée vers une structure décondensée, le chargement du complexe ARN polymérase de type II, et l'activation de cette ARN polymérase, via des phosphorylations de son domaine C-terminal (CTD), en une ARN polymérase capable d'initier la transcription et de la poursuivre sur l'ensemble du gène (figure 24). La première étape fait intervenir le recrutement direct ou indirect par STAT3 de coactivateurs tel que SRC1A, les protéines histones acétyltransférases CBP ou p300, et des complexes de remodelage de la chromatine tel que les complexes BRG/BRM (302;303). Les protéines SRC1A et BRG interagissent directement avec le domaine d'activation transcriptionnelle de STAT3, tandis que CBP ou p300 nécessite le recrutement préalable du coactivateur SRC1A. L'acétylation de la chromatine par CBP/p300 permet un certain relâchement de l'ADN au sein du nucléosome, élément préalable au remodelage de la chromatine via une inhibition du nucléosome ou un glissement de ces nucléosome le long de l'ADN. Le recrutement de Brg par STAT3 pourrait permettre ces activités (303). Enfin STAT3 recrute la kinase cdk9 via son domaine C-terminal. La kinase cdk9 au sein du complexe pTEFB phosphoryle le domaine CTD de l'ARN polymérase II ce qui permet la phase d'élongation de la transcription (304).



**Figure 24:** L'activité transcriptionnelle de STAT3

Le facteur de transcription STAT3 peut induire ou réprimer la transcription. L'activation de la transcription nécessite le recrutement direct de plusieurs coactivateurs tel que BRG, CBP et cdk9. A l'inverse lorsque STAT3 induit une répression transcriptionnelle il recrute des corépresseurs tel que les HDAC ou DNMT1.

STAT3 est aussi impliqué dans l'inhibition de la transcription (figure 24), car il permet le recrutement de Tip60 et des histones déacétylases HDAC7 (305). De façon similaire, STAT3 peut induire la fixation d'un complexe DNMT1-HDAC1 sur le promoteur de SHP-1(306). Ce complexe induit une méthylation des îlots CpG du gène, ce qui empêche l'activation du gène par tout autre facteur de transcription. Enfin, des travaux présentés dans ce manuscrit indiquent que STAT3 s'associe avec les protéines du cycle cellulaire Rb et p21 pour induire la répression de la transcription (307;308).

Finalement, STAT3 coopère avec d'autres facteurs comme GR, oct-1, et c-jun pour former un complexe sur le gène de l' $\alpha$ 2macroglobuline. La conjugaison des quatre facteurs de transcription permet l'agencement spatial optimal de leur domaine de transactivation et le recrutement efficace de la machinerie transcriptionnelle (309).

### **C) Rôle physiologique de STAT3 et gènes cibles**

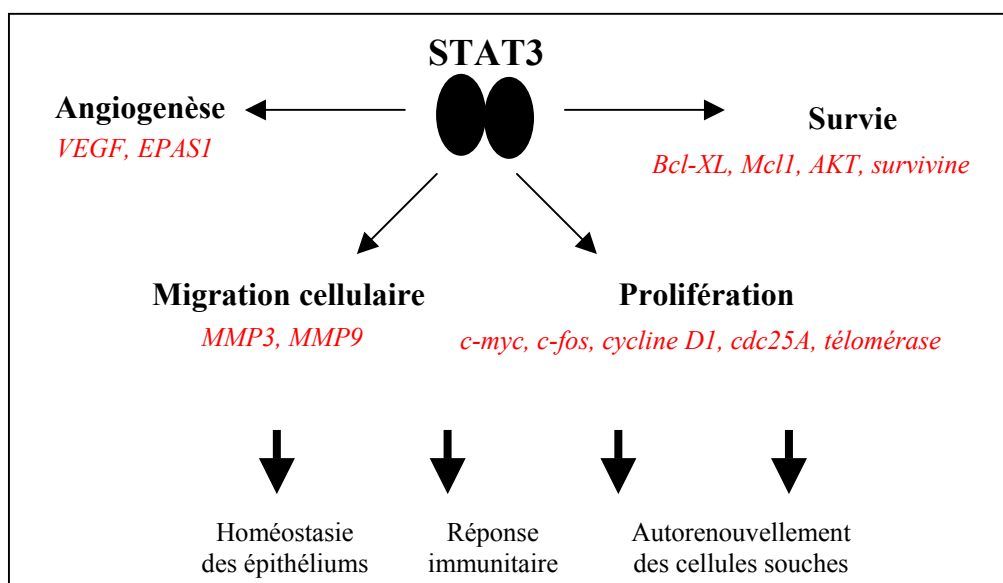
L'inactivation de STAT3 chez la souris induit la mort de l'embryon avant la gastrulation. STAT3 est exprimé à 7,5 jours post-coïtum au sein de l'endoderme viscéral extra-embryonnaire. La sécrétion du LIF, qui active STAT3, au cours du premier tiers de la gestation induit la prolifération et l'invasion du tissu utérin maternel par des cellules de l'embryon appelées trophoblastiques (310). Ces cellules sont alors à l'origine du placenta permettant les échanges entre le tissu maternel et l'embryon.

L'inactivation conditionnelle de STAT3 a permis ensuite de mettre ses rôles en évidence chez l'adulte (figure 25). STAT3 est impliqué dans la prolifération cellulaire et régule l'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques (311), au niveau de la moelle osseuse et de la rate, et les progéniteurs précoces des lignées érythroïdes, myéloïde et lymphoïde surtout au niveau de la rate (312). En absence d'activation de STAT3, les 3 compartiments érythroïdes, myéloïdes et lymphoïde présentent un nombre réduit de cellules matures induisant une anémie et un déficit immunitaire important (313). STAT3 active aussi la prolifération des cellules immunitaires au cours de l'inflammation. Finalement STAT3 régule l'homéostasie des épithéliums en participant notamment à la régénération hépatique et à la cicatrisation (314;315). Plusieurs gènes cibles sont impliqués dans ces processus, en particulier les gènes nécessaires à l'entrée de cellules quiescentes en phase G1. STAT3 active par exemple les facteurs de transcription c-fos et c-myc (316;317), mais également des gènes activant la transition G1-S comme la cycline D1 ou cdc25A (307;318). STAT3 induit

également l'expression de la télomérase (319), ce qui empêche la perte des séquences télomériques au cours de la division cellulaire.

L'autre fonction importante de STAT3 est sa capacité à induire la survie cellulaire. Ce rôle est par exemple important au cours de l'inflammation (320) car STAT3 protège les cellules épithéliales et immunitaires de l'apoptose induite par les radicaux libres de l'oxygène produits. L'activation de STAT3 au sein des tissus lésés par des agents environnementaux protège là-aussi ces cellules de l'apoptose. STAT3 active trois types de gènes antiapoptotiques. Les gènes Bcl-XL et Mcl1 inhibent l'activation de Bax par les protéines à domaine BH3 et bloque la perméabilisation mitochondriale (321;322). La kinase AKT induit la séquestration de Bax par les protéines 14.3.3 (323). Finalement STAT3 active la survivine, protéine de la famille des IAPs qui inhibent l'activation des caspases (324).

Enfin, STAT3 régule le microenvironnement cellulaire en favorisant par exemple la migration cellulaire et l'angiogénèse au cours de la cicatrisation (325). STAT3 régule également la perméabilité vasculaire et le recrutement des cellules immunitaires au cours de l'inflammation (320). Plusieurs gènes activés par STAT3 sont impliqués comme les métalloprotéinases MMP3 et MMP9 qui permettent la dégradation de la matrice extracellulaire. STAT3 active aussi le VEGF, le facteur de transcription Epas1 central à l'angiogénèse et favorise ainsi le processus angiogénique.



**Figure 25 :** Le rôle physiologique de STAT3 et ses gènes cibles

L'activité de STAT3 permet la prolifération, la survie cellulaire, l'angiogénèse et la migration cellulaire. Ces différentes fonctions sont assurées par un nombre important de gènes cibles dont l'activité doit être coordonnée au mieux afin d'assurer des fonctions essentielles comme l'homéostasie des épithéliums, la réponse immunitaire et l'autorenouvellement des cellules souches des lignées hématopoïétiques par exemple.

## Chapitre II : Implication de STAT3 dans la tumorigenèse

### A) Les oncogènes activent STAT3

Bien que le facteur de transcription soit potentiellement oncogénique, il n'a pas été retrouvé de mutation de son gène dans les diverses tumeurs analysées. En revanche, la liste des oncogènes capable d'activer le facteur de transcription STAT3 s'est incroyablement allongé au cours de ces dernières années. Parmi ces oncogènes on trouve de très nombreuses protéines de fusion tel que Bcr-Abl, Tel-JAK impliquées dans des leucémies, lymphomes et myélomes (326;327). Ces protéines résultent de translocations chromosomiques. Ainsi des souris transgéniques porteurs de la protéine NPM-ALK développent naturellement des lymphomes. STAT3 est absolument nécessaire au développement de ces tumeurs et le traitement des tumeurs établies par un leurre oligonucléotidique dirigé contre le domaine de liaison à l'ADN de STAT3 induit leur régression (328).

En dehors du système hématopoïétique, STAT3 est activé dans différents carcinomes de la face et du cou, du pancréas, de l'œsophage, des poumons, du foie et du colon (329). L'induction de cancer de la peau chez la souris par un traitement au DMBA a montré que STAT3 est activé de manière extrêmement précoce lors de la formation de ces tumeurs (au stade dysplasique) et permet la formation de tumeurs bénignes (papillome) précurseur de carcinome beaucoup moins bénin (330). L'inactivation de STAT3 inhibe complètement la formation des papillomes et STAT3 est également impliqué dans leur transformation en carcinome. Finalement l'inhibition de STAT3 au sein des tumeurs établies induit leur régression. Dans un autre modèle murin, l'activation constitutive de STAT3 par un récepteur gp130 muté induit le développement d'adénome gastrique dans 100% des souris étudiées (331).

L'inflammation chronique des tissus participe également à l'activation de STAT3 via l'activation des récepteurs à l'IL-6 et est une cause fréquente de la tumorigenèse (332). Cette inflammation peut-être environnementale (fumée de cigarettes pour les poumons, alcool pour le foie par exemple) ou dû à une dérégulation du système immunitaire : maladie de Crohn pour le colon. Des souris présentant une inactivation de SOCS-1, un inhibiteur de STAT3 impliqué dans le rétrocontrôle de l'inflammation, développent ainsi naturellement des tumeurs coliques (333).

Finalement STAT3 peut-être activé de manière constitutive par différents récepteurs tyrosine kinase (RTK : receptor tyrosine kinase) ou de simple tyrosine kinase (NRTK : Non receptor tyrosine kinase). Parmi ces récepteur, on trouve les récepteurs Met, le PDGFR et l'EGFR par exemple (334). Des formes mutées de l'EGFR permettent la transformation de fibroblastes et la formation de tumeurs chez les souris inoculées par ces cellules. L'inhibition de STAT3 empêche totalement la transformation de ces fibroblastes. Parmi les NRTK, on trouve les protéines JAKs, ainsi que plusieurs protéines kinase de la famille des kinases src tel que c-src, Fyn ou Lyn (335).

Une forme constitutivement active de STAT3 appelé STAT3-C a permis de confirmer l'importance de STAT3 au cours de la tumorigenèse. Cette forme a été créée par les mutations A661C et N663C de la séquence codante de STAT3. Les deux cystéines permettent de former un dimère stable de STAT3, y compris en absence de phosphorylation de la tyrosine 705 de STAT3, via la formation de ponts dissulfures entre les deux monomères (336). Cette forme n'est pas retrouvée in vivo mais permet d'étudier les conséquences de l'activation de STAT3 dans un cadre oncogénique. L'inoculation de souris nudes avec des fibroblastes ou des cellules épithéliales transformées par STAT3-C induit la formation de tumeurs au sein de ces souris. Le tableau ci-dessous récapitule le profil d'activation de STAT3 au sein de différents types tumoraux et les oncogènes responsables de cette activation.

STAT3 actif de manière constitutive dans la tumeur primaire	
Tumeur solide	Tumeur liquide
Cancer du sein	Leucémie myéloïde chronique
Cancer de la tête et du cou	Leucémie myéloïde aiguë
Cancer de la prostate	Leucémie lymphoïde chronique
Mélanome	Leucémie lymphoblastique aiguë
Cancer des ovaires	Erythroleucémie
Cancer du poumon	Lymphome de Burkitt
Tumeur du cerveau	Leucémie des grands lymphocytes granulaires
Cancer du pancréas	Myélome
Carcinome rénal	Lymphome de Hodgkins
	Lymphome des grandes cellules anaplastiques
STAT3 impliqué dans le phénotype transformant	
Lignées cellulaire ou tumeurs primaires	Oncogène
Cancer du sein	Src
Cancer de la tête et du cou	Erk
Cancer de la prostate	Ret
Mélanome	lck
Cancer de la thyroïde	
Myélome	
Lymphome de Hodgkins	
Leucémie des grands lymphocytes granulaires	

**Figure 26 :** Implication de STAT3 dans différentes tumeurs (329)



On peut noter que dans certaines tumeurs STAT3 est actif mais n'est pas absolument requis pour le développement tumoral tandis que dans d'autres, STAT3 est absolument essentiel. Nous allons nous attarder sur deux oncogènes utilisés au cours des travaux présentés et important pour la tumorigenèse du tissu colique : v-src, et le complexe EGFR-c-src

### **1. Activation de STAT3 par l'oncogène v-src**

L'oncogène v-src est un oncogène viral issu de la séquence nucléotidique du Rous sarcoma virus et similaire à la protéine c-src. La différence se situe au niveau du domaine c-terminal qui inhibe l'activité kinase de la protéine en se repliant. La protéine v-src a perdu ce domaine et est donc constitutivement active. La protéine v-src induit la transformation de fibroblastes murins qui acquièrent la capacité de proliférer en milieu semi-liquide et induisent des tumeurs chez la souris. L'inhibition de STAT3 par des mutants dominants négatifs empêche la transformation de ces fibroblastes par v-src, indiquant que STAT3 est nécessaire à l'activité transformante de l'oncogène v-src (55). En fait v-src induit la phosphorylation de STAT3 sur la tyrosine 705, sa dimérisation et sa translocation dans le noyau. Différentes études ont impliqué les JAKs dans l'activation optimale de STAT3 par v-src (337). Cependant des expériences in vitro dans des cellules d'insectes montre que l'expression de v-src et de STAT3 en absence de tout autre protéine kinase permet la phosphorylation et l'activation de STAT3. L'oncogène v-src induit le recrutement de STAT3 sur plusieurs de ses gènes cibles notamment, c-myc, la cycline D1, Bcl-XL protéine impliqué dans la prolifération, la protection contre l'apoptose et le phénotype transformant (55;265;318). Les gènes de p21 et de la cycline D1 sont aussi induit dans des fibroblastes exprimant v-src et leur expression dépend de STAT3 (338). La cycline D1 est essentielle à la transformation puisque des fibroblastes n'exprimant pas la cycline D1 ne peuvent être transformé par l'oncogène v-src. De façon similaire c-myc est activé dans ces cellules et encore une fois l'activation de c-myc dépend du recrutement de STAT3 sur le promoteur du gène (318). L'activation de c-myc par STAT3 est également essentielle à l'activité de l'oncogène v-src car l'expression ectopique de c-myc permet de compenser l'absence de STAT3 dans le processus de transformation induit par v-src (339). De plus des fibroblastes n'exprimant pas c-myc ne peuvent être transformés par l'oncogène v-src. Finalement la forme constitutivement active STAT3C induit des effets très similaires à ceux observés par v-src, confirmant le rôle de STAT3 dans le potentiel transformant de v-src (336).

## 2. Activation par le complexe EGFR/c-src

Le complexe EGFR-c-src est important dans plusieurs types de tumeurs en particulier les tumeurs pulmonaires et les tumeurs colorectales. La relation entre c-src et l'EGFR au cours de l'oncogenèse a été mise en évidence par des études montrant que c-src potentialise l'activité transformante de l'EGFR, en amplifiant la réplication, la croissance des cellules en milieu semi-liquide et la formation de tumeur chez la souris induite par l'EGFR (53). La protéine c-src, de façon similaire à l'oncogène v-src, est capable de phosphoryler STAT3 sur la tyrosine 705 et de l'activer. Au sein des tumeurs, bien que c-src soit une protéine rarement mutée son expression et son activité augmentent, en particulier au sein des tumeurs coliques, ce qui participe à la tumorigenèse (51). Comme nous l'avons vu, c-src n'est pas constitutivement actif car il possède un domaine répresseur de son activité catalytique. La tyrosine 531 phosphorylée par Csk induit le repliement du domaine répresseur sur le domaine kinase et l'inhibe (340). Il est donc probable que l'activité de CSK soit inhibée au cours du développement tumoral.

L'EGFR1 fait partie d'une famille de quatre récepteurs de EGFR1 à EGFR4 capables de se dimériser entre eux (341), les dimères EGFR1 et EGFR1/EGFR2 étant les plus souvent rencontrés au sein du tissu colorectal ou pulmonaire. Dans ces tumeurs, l'EGFR est constitutivement activé par la surproduction de ses ligands, notamment l'EGF mais plus souvent le TGF $\alpha$  et l'amphiregulin (342). Au sein du tissu pulmonaire, il existe des mutations du domaine kinase de l'EGFR1 qui confèrent une activité constitutive à la protéine (343) mais qui n'ont pas été retrouvées pour l'instant au sein du tissu colique. L'EGFR induit l'activation de STAT3 qui est cependant complexe et n'est pas un phénomène général. Cette activation induit des gènes de survie et de prolifération et dépend entre autre du type cellulaire utilisé et des conditions de stimulation de l'EGFR (344). Une étude par exemple a démontré que des kératinocytes normaux ou simplement immortalisés n'activaient pas STAT3 lors d'une stimulation de l'EGFR alors que les mêmes cellules transformées le faisaient (53).

L'activation de STAT3 par l'EGF dans des fibroblastes exprimant l'EGFR1 dépend de la présence de c-src (345), et l'inhibition de c-src par un inhibiteur pharmacologique empêche l'activation de STAT3 par ces récepteurs (346). De façon analogue, l'activation de STAT3 par c-src dépend de l'activation de récepteur membranaire tyrosine kinase comme l'EGFR. L'activation des récepteurs membranaires tyrosine kinase induit le recrutement de c-src au niveau du récepteur, l'inhibition de la protéine Csk par la phosphatase SHP2 et la phosphorylation de la tyrosine 418 qui potentialise l'activité kinase de c-src (345). Le recrutement et l'activation de c-src par l'EGFR induisent la phosphorylation de la tyrosine

845 de l'EGFR par c-src et permettent le recrutement de STAT3 qui est alors phosphorylé par les activités kinases des deux protéines.

Au sein des tumeurs, le complexe EGFR c-src est fréquemment surexprimé. Par exemple c-src est surexprimé avec au moins l'un des membres de l'EGFR dans plus de 70% des tumeurs du sein (347). Plusieurs mécanismes amplifient l'activation de STAT3 par le complexe EGFR c-src. L'activation de l'EGFR par ses ligands ou par des mutations de son domaine tyrosine kinase induit l'activation constitutive de STAT3 (343). STAT3 est ainsi activé dans des fibroblastes transformés par les formes mutées de l'EGFR et STAT3 est absolument nécessaire à cette transformation (348). Une mutation de la protéine c-src qui induit un codon stop au niveau de la tyrosine 530 rend la protéine c-src constitutivement active, favorise l'activation de STAT3 par l'EGFR et le développement d'adénocarcinome colique (105). Finalement la disparition des protéines Csk, inhibitrices des kinases src, est observée dans les tumeurs coliques et serait corrélée à l'activation de la protéine c-src. De façon identique, dans un modèle d'induction de tumeur colique chez le rat, l'un des premiers événements moléculaires observés est la perte d'expression des protéine Csk qui est corrélée à l'activation de c-src (111;349).

## **B) Effets de STAT3 en tant qu'oncogène**

Le développement d'une tumeur repose sur 4 points : la capacité de proliférer en absence de signaux de prolifération et en présence de signaux inhibiteurs de la prolifération, l'échappement à l'apoptose et à la sénescence induites aussi bien par le stress oncogénique, génomique ou répliatif, et finalement la capacité de proliférer dans un milieu différent du microenvironnement normal.

Des études utilisant notamment des puces à ADN ont confirmé l'activation de différents gènes nécessaires à la progression tumorale par STAT3 (350). On peut par exemple citer l'expression de récepteur aux facteurs de croissance tel que le HGF récepteur et c-met qui vont, comme c-myc ou la cycline D1, faciliter la prolifération cellulaire et la déconnecter des signaux de prolifération.

STAT3 active aussi les protéines survivine et Mcl-1 qui vont avec Bcl-XL permettre à la cellule d'échapper à l'apoptose. Ces protéines permettent d'inhiber la perméabilisation mitochondriale et l'activation des caspases. Une étude récente indique également que STAT3 active l'expression de la protéine AKT (323). AKT permet la survie de la cellule en la déconnectant de signaux essentiels tel que la présence de facteurs de croissance, et

l'attachement à une matrice. De façon similaire, l'activation de la sous unité catalytique de la télomérase par STAT3 permet à la cellule d'échapper à la sénescence réplivative (319).

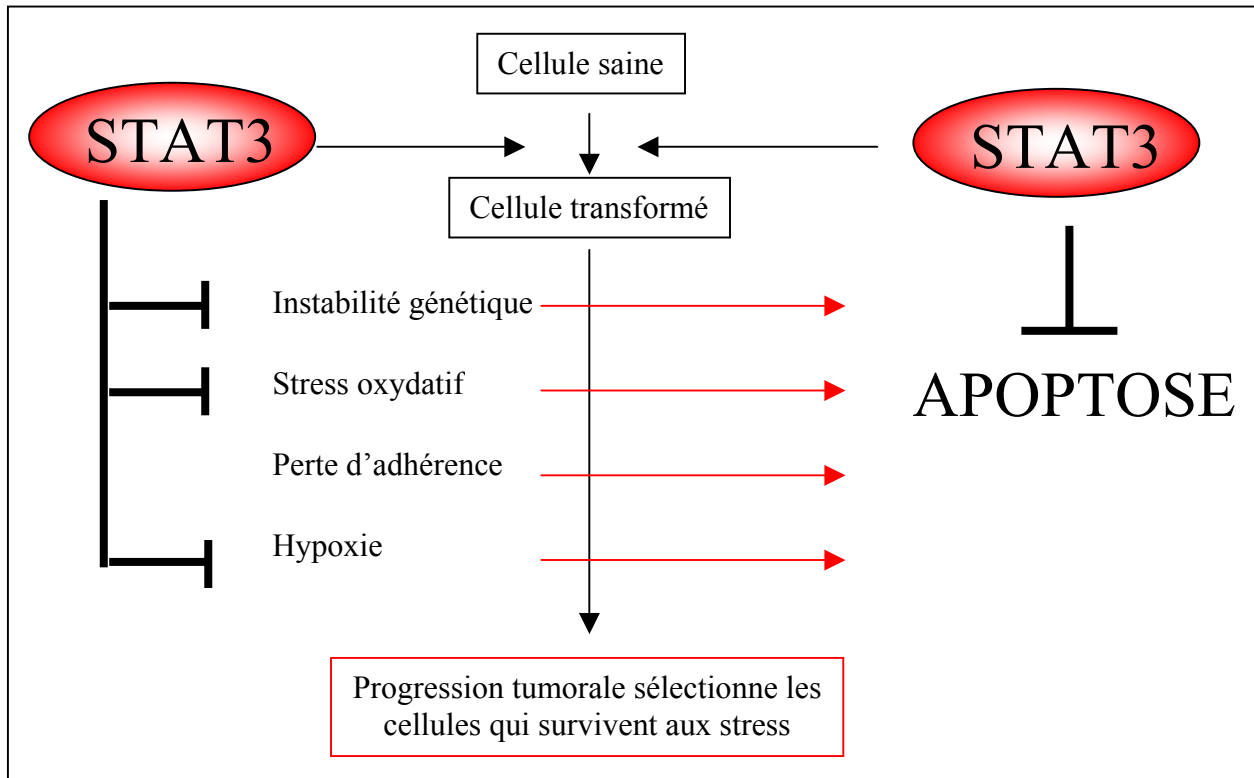
En plus d'inhiber l'apoptose, la survivine participe de manière active à la stabilité du génome en régulant la mitose. La surexpression de la survivine perturbe le processus mitotique et induit l'instabilité génomique. Comme nous l'avons dit, l'instabilité génomique est l'un des moteurs de la tumorigenèse et donc l'activation de la survivine par STAT3 pourrait participer de manière active aux effets oncogéniques de STAT3.

Finalement STAT3 active plusieurs métalloprotéases dont MMP3 et MMP9 qui permettent la dégradation de la matrice extracellulaire (351). STAT3 active également le VEGF, facteur de croissance des cellules endothéliales et la superoxyde dismutase (MnSOD) enzyme participant à la détoxification des radicaux libres de l'oxygène (352;353). Ces différentes protéines permettent aux cellules de migrer à travers la matrice extracellulaire et de supporter l'hypoxie ou le stress oxydatif induits au cours de la tumorigenèse.

Nous pouvons pour conclure, citer une étude intéressante utilisant des puces à ADN qui montre que la signature des gènes activés par STAT3-C lorsqu'il induit la transformation correspond à celle des gènes activés au sein de tumeurs de patient positives pour les formes actives de STAT3 (354). Ainsi il est probable que les mécanismes observés lors de la tumorigenèse induite par STAT3C soient semblables à ceux mis en place lors de l'activation constitutive de STAT3 au sein des tumeurs humaines (355).

### **C) Addiction des tumeurs à l'oncogène STAT3**

Les cellules cancéreuses humaines sont sensibles à la perte d'un ou plusieurs oncogènes acquis au cours de la tumorigenèse selon un mécanisme appelé l'addiction des tumeurs aux oncogènes. La synthèse d'une série d'inhibiteurs de STAT3 a permis d'étudier l'importance de ce mécanisme dans le cas de STAT3. Parmi ces inhibiteurs on peut citer les ARN interférents dirigés contre STAT3, des leurres oligonucléotidiques qui inhibent la liaison de STAT3 sur ses promoteurs cibles et des petites molécules synthétiques (peptides ou autres) capables d'inhiber la liaison à l'ADN de STAT3 en se fixant dans le domaine de liaison à l'ADN (356). L'inhibition de STAT3 au niveau cellulaire mais également chez la souris induit la réversion du phénotype transformant (357) et plus souvent l'apoptose de ces cellules (324). Ceci signifie que même après l'induction de la transformation, STAT3 est encore nécessaire au maintien du phénotype transformé (figure 27).



**Figure 27 :** *Addiction des tumeurs aux oncogènes STAT3*

Au cours de la progression tumorale, les cellules deviennent progressivement insensibles à l'apoptose car elles doivent supporter les stress associés à l'oncogenèse. L'oncogène STAT3 est l'un des facteurs qui peut permettre aux cellules de supporter ces stress en les limitant et surtout en inhibant l'apoptose. Les cellules tumorales où STAT3 est actif sont ainsi particulièrement sensibles aux inhibiteurs de STAT3.

Dans les tumeurs, l'activation de STAT3 est souvent corrélée à celle de Bcl-XL et de la survivine. L'inhibition de l'apoptose est donc sans doute importante dans l'addiction aux oncogènes STAT3. La survivine est particulièrement intéressante car elle inhibe l'apoptose à un stade tardif, après l'activation de la perméabilité mitochondriale. De plus la survivine joue un rôle important au cours de la mitose et sa surexpression pourrait permettre à la cellule de supporter l'instabilité génomique lié à l'oncogenèse (358). De façon résumée, les stress accumulés au cours de la progression tumorale sélectionnent les cellules capables de les supporter et STAT3 pourrait être l'un des facteurs de résistance à ces stress. D'une part les différents gènes activés par STAT3 peuvent limiter ces stress et d'autre part STAT3 empêche l'activation de l'apoptose induit par ces stress. Cette addiction à l'oncogène STAT3 fait de ce facteur de transcription une cible thérapeutique de choix. Au sein du tissu sain non soumis à ces stress les voies apoptotiques sont peu activées et la protection antiapoptotique de STAT3 n'est pas nécessaire. En revanche, au niveau de la tumeur STAT3 est absolument essentiel et son inhibition entraîne la mort de la cellule sans pour autant toucher la cellule saine.

## **D) Impact de STAT3 sur l'environnement tumoral**

STAT3 perturbe l'environnement tumoral de trois façons. Il favorise la dégradation de la matrice extracellulaire, il inhibe la communication entre les cellules épithéliales et le stroma et il favorise l'angiogénèse.

Dans un système d'induction de tumeur mammaire chez la souris, STAT3 perturbe l'attachement des cellules épithéliales mammaires à la lame basale, facilitant la destruction de cette lame basale, l'infiltration de ces cellules au niveau du stroma et la formation de métastases lymphatiques (359). L'inhibition de STAT3 permet de reformer les jonctions serrées présentes normalement entre ces cellules épithéliales et les jonctions d'adhérence avec la lame basale. De façon similaire, STAT3 confère un profil invasif à des cellules issues de choriocarcinome bloquant TIMP1, un inhibiteur général des métalloprotéines (360). Comme nous l'avons déjà dit, STAT3 induit également l'activation de nombreuses métalloprotéinases qui vont permettre la dégradation de la matrice extracellulaire. L'activation de ces métalloprotéases est nécessaire à l'activité transformante de STAT3C et l'analyse des tumeurs de patients atteint de cancer du sein montre une corrélation entre l'activation de STAT3 et la présence de MMP9. L'étude de cellules épithéliales pulmonaire (361) a aussi montré que STAT3 induisait l'activation des protéines de la famille des serpinines tel que l'Urokinase-type plasminogen activator (uPA) et son récepteur uPAR. La liaison de uPA sur uPAR à la surface cellulaire permet de diriger l'activité protéolytique de la cellule (362) induite par les métalloprotéinases en induisant le clivage des différentes métalloprotéinases présentes à la surface de la cellule qui vont alors pouvoir dégrader la lame basale puis la matrice extracellulaire. On voit d'après ces différentes études que STAT3 met en place tous les systèmes nécessaires à l'activation des métalloprotéinases, ce qui confère un phénotype invasif aux tumeurs exprimant STAT3.

L'activation constitutive de STAT3 perturbe aussi la communication entre les cellules épithéliales et les fibroblastes du stroma. La prolifération des cellules épithéliales est soumise à un fort contrôle de la part du stroma. En condition normale, les fibroblastes sécrètent des quantités importantes de TGF $\beta$  qui vont inhiber la prolifération des cellules épithéliales adjacentes. STAT3 va permettre de désensibiliser les cellules épithéliales à ce signal via l'activation de Smad7, un facteur de transcription inhibiteur de la voie de signalisation du TGF $\beta$ . Dans des cellules colorectales et en condition normale, le TGF $\beta$  inhibe la prolifération des cellules épithéliales. Lors de progression tumorale, les lymphocytes infiltrés répondent au

TGF $\beta$  par une production d'IL6, qui va alors activer STAT3 au niveau des cellules épithéliales et inhiber la réponse normale de ces cellules au TGF $\beta$  (363).

Finalement, STAT3 participe à l'angiogénèse et à la néovascularisation de la tumeur. Lors de la progression tumorale, le développement de la masse tumorale nécessite l'apparition de nouveaux vaisseaux capables d'infiltrer la tumeur et de répondre à ses besoins en oxygène et nutriment. Ce processus engage la prolifération et la migration de cellules endothéliales ou la transdifférenciation de cellules tumorales en pseudo cellules endothéliales (361). STAT3 active le VEGF et l'ANGPTL4, facteur de croissance des cellules endothéliales et facteur de migration. STAT3 active Epas1, un facteur de transcription impliqué dans le stress hypoxique. Epas1 coordonne le métabolisme cellulaire avec la quantité disponible d'O<sub>2</sub> et promeut l'angiogénèse via l'activation du VEGF, de Flt1 (VEGFR1), Flt2 (VEGFR2) et de Tie2, le récepteur à l'angiopoïétine (364). Epas1 permet donc l'activation de tous les protagonistes nécessaires à la formation de nouveaux vaisseaux.

En conclusion, l'activation constitutive de STAT3 permet l'activation des gènes capables d'altérer l'homéostasie d'un tissu soumis à la progression tumorale. STAT3 perturbe l'attachement des cellules épithéliales entre-elles, et l'attachement des cellules sur la lame basal et le stroma. STAT3 dégrade la matrice extracellulaire et finalement favorise l'invasion du stroma et du tissu tumoral par de nouveaux vaisseaux. STAT3 facilite ainsi la progression tumorale en permettant le développement d'un microenvironnement moins défavorable à la tumeur ou en favorisant la migration des cellules tumorales vers un environnement plus favorable à leur développement.

## Chapitre III : STAT3 dans la réponse aux chimiothérapies

### A) Régulation de STAT3 en réponse aux chimiothérapies

Les agents de chimiothérapies ne sont donc de prime abord des agents capables d'activer STAT3. Cependant plusieurs études ont décrit des modulations des phosphorylations de STAT3 ou de l'EGFR en réponse à ces chimiothérapies. Il apparaît ainsi que des composés tel que le cisplatine, la doxorubicine et l'irinotecan induisent l'activation de l'EGFR et la phosphorylation de la sérine 727 de STAT3 (204;206;365). La radiothérapie induit également la phosphorylation de cette sérine. Des expériences de gel-retard confirmées au laboratoire ont montré qu'après un traitement à l'irinotecan STAT3 n'était plus capable de se lier à l'ADN et que la phosphorylation de la tyrosine 705 était inhibée (366). Les différents traitements de chimiothérapie induisent l'apparition d'un phénotype similaire à celui de cellules sénescentes ou l'apoptose. Les kinases ERK, RSK2 cdk5 ou la PKC $\delta$  sont des kinases activées lors de la sénescence ou lors de la mort cellulaire qui sont toutes capables de phosphoryler STAT3 sur la sérine 727 (367-369). Il est alors probable que l'activation constitutive de la sérine 727 de STAT3 empêche l'activation normale de STAT3 sur la tyrosine par des facteurs de croissance que ou des cytokines.

Cependant, la phosphorylation de la tyrosine 705 de STAT3 par les traitements de chimiothérapie est controversée. Des travaux montrent que STAT3 peut être phosphorylé après traitement notamment en raison d'un stress oxydatif (370). Le mécanisme d'activation de la phosphorylation de STAT3 n'est pas véritablement compris mais pourrait impliquer l'oxydation et l'inhibition de phosphatases impliquées dans la déphosphorylation de cette tyrosine ou dans l'inhibition des kinases JAKs. Plusieurs traitements de chimiothérapie présentent des propriétés intrinsèquement oxydatives même si elles sont souvent observées à des doses trop importantes qui ne sont pas reliées à l'utilisation clinique (274). La perturbation de la réplication induit aussi un stress oxydatif (371) et les agents de chimiothérapie qui inhibe la réplication pourrait induire la phosphorylation de la tyrosine 705 de STAT3. Finalement, au moins en clinique, la chimiothérapie est généralement couplée à la radiothérapie qui induit un fort stress oxydatif et qui pourrait alors induire la phosphorylation de la tyrosine 705 de STAT3.

Le second mécanisme par lequel la phosphorylation de STAT3 sur la tyrosine 705 peut être activée en réponse aux chimiothérapies est l'activation directe ou indirecte de la voie de l'EGFR. Le cisplatine, la doxorubicine et le sn38 ont ainsi été décrits comme des activateurs



de l'EGFR (202;372). Le sn38 active les métalloprotéases ADAM à la surface de la cellule via l'activation de la PKC $\delta$  ou de p38. Ces protéines permettent alors le clivage de l'ectodomaine de l'EGF maintenu précédemment à la surface cellulaire entraînant l'activation de l'EGFR. De façon identique, les inhibiteurs de topoisomérase II induisent l'activation de l'EGFR via l'activation de ces mêmes métalloprotéinases et selon un processus similaire (373). Cette voie correspond en réalité à une voie de stress beaucoup plus générale activé par les stress oxydatifs ou osmotiques.

En conclusion, la régulation de STAT3 par les différents agents de chimiothérapie est donc complexe et dépend de plusieurs facteurs. Il est vraisemblable que coexiste différentes sous populations de STAT3 en fonction de leur localisation initiale au début du traitement: phosphorylée sur la tyrosine et la sérine quand associée avec l'EGFR et c-src par exemple ou proche d'une source de ROS ; ou seulement phosphorylée sur la sérine quand diffus sous la membrane plasmique, lors de l'apoptose ou de la sénescence associée aux dommages de l'ADN par exemple.

## **B) Effets de STAT3 sur la réponse cellulaire aux chimiothérapies**

Le rôle de STAT3 au cours de la tumorigenèse prédit l'impact de cette protéine sur la réponse aux chimiothérapies. Comme nous l'avons dit, l'expression de STAT3 dans la tumeur permet aux cellules cancéreuses de résister aux stress induits lors de l'oncogenèse. Ces cellules sont donc particulièrement résistantes à divers mécanismes comme le stress oxydatif, et les dommages de l'ADN. La plupart des agents de chimiothérapie ciblent spécifiquement ces voies de stress pour induire la mort des cellules et donc on s'aperçoit que les cellules possédant une activité constitutive de STAT3 pourraient être intrinsèquement résistantes à ces agents.

Parmi les protéines spécifiquement activées par STAT3 au cours de la tumorigenèse et susceptibles d'induire une résistance aux agents de chimiothérapie, on trouve bien-sûr les gènes antiapoptotiques tels Bcl-XL ou le gène de la survivine (324;374). L'expression de la survivine a ainsi été corrélée avec celle de STAT3 dans les tumeurs du sein et son expression est de mauvais pronostic. D'autres gènes régulés par STAT3 sont sans doute important dans la réponse aux chimiothérapies, notamment ceux impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. STAT3 inhibe par exemple l'expression de p53 et diminue ainsi la réponse aux chimiothérapies (375). Il est également probable que STAT3 module la réponse de p53 via STAT1. STAT1 permet d'orienter la réponse de p53 vers une réponse apoptotique (100).

L'interaction de STAT3 avec STAT1 inhibe la formation du dimère de STAT1 et donc probablement l'activité apoptotique de p53. L'adaptation des cellules au stress oxydatif au cours de la tumorigenèse participe sans doute également à leur résistance contre les agents de chimiothérapie et radiothérapie. Comme nous l'avons dit, STAT3 active la superoxyde dismutase qui détoxifie la cellule des radicaux libres de l'oxygène. Finalement, il est probable que STAT3, à l'instar du facteur de transcription STAT5, régule certains gènes impliqués dans la réparation de l'ADN. Le facteur de transcription STAT5 induit par exemple la transcription du gène Rad51 (376). Ce dernier point a été peu étudié, cependant il est sans doute important car comme nous l'avons vu dans la partie 2, la réparation des dommages de l'ADN est peut-être le point le plus prédictif de la réponse aux agents de chimiothérapie.

In vitro, la résistance des cellules qui expriment STAT3 aux agents de chimiothérapie est bien établie. Les premières études impliquant STAT3 comme facteur de résistance se sont basées sur le fait que l'IL-6 et l'IL-10, deux cytokines qui activent STAT3, induisent un phénotype de résistance sur des tumeurs rénales. Dans les myélomes multiples et le foie, l'activation de STAT3 induit une résistance à l'apoptose induite par FAS. Finalement, les cellules cancéreuses résistantes au paclitaxel surexpriment STAT3 et l'inhibition de STAT3 par ARN interférant sensibilise ces cellules aux traitements.

Enfin, d'un point de vue clinique, la corrélation entre l'activation de STAT3 et la réponse aux chimiothérapies a pour l'instant été peu étudiée. Des xénogreffes de cellules colorectales dans un modèle murin montre que l'inhibition de STAT3 améliore la réponse à l'irinotecan (366). D'autres expériences utilisant des xénogreffes de fibrosarcomes montre que la localisation nucléaire de STAT3 était un facteur de réponse négative à la doxorubicine (377). Des études d'immunohistochimie ont montré que chez des patients atteints de cancer du sein, la phosphorylation de STAT3 sur la tyrosine est associée avec un taux de réponse plus faible à la doxorubicine, et corrélée à l'expression de la survivine et à la phosphorylation de la protéine src (374). Cette étude est assez remarquable car elle se superpose de manière surprenante aux résultats obtenus in vitro. Dans un modèle de lymphome, l'activation de STAT3 par la protéine de fusion NPM-ALK est là encore un facteur de mauvais pronostic et d'un faible taux de réponse à la doxorubicine (378). Cette dernière étude ne précise pas cependant si la localisation nucléaire de STAT3 est un facteur de mauvais pronostic en soi indépendamment du traitement à la doxorubicine. Finalement, plusieurs études d'immunohistochimie à partir d'adénome et d'adénocarcinome de colon ont montré que l'activation de STAT3 est là encore associée avec la progression de la tumeur et un facteur de mauvaise réponse aux chimiothérapies utilisant l'irinotecan ou l'oxaliplatine (379).

Les résultats cliniques confirment ainsi les données in vitro et permettent de proposer un modèle selon lequel la transformation des cellules par STAT3 induirait une résistance intrinsèque des cellules cancéreuses aux traitements de chimiothérapie.

### **C) Implication de STAT3 dans les réponses cellulaires et cliniques aux chimiothérapies couplées aux thérapies ciblant l'EGFR**

Depuis quelques années de nouveaux traitements de chimiothérapie sont venus compléter l'arsenal utilisé qui reposait essentiellement sur des agents capables d'inhiber la réplication ou la mitose. Ces nouveaux traitements utilisent des agents dirigés là plupart du temps contre une protéine kinase ou un récepteur membranaire. Parmi ces agents, on trouve ceux dirigés contre l'EGFR. Deux grandes classes d'inhibiteurs sont utilisées, les anticorps monoclonaux (cetuximab) et les inhibiteurs du domaine tyrosine kinase (Iressa). Ces agents sont utilisés dans le cadre du cancer colorectal métastatique selon le protocole irinotecan plus cetuximab, et dans le cadre du cancer du poumon de grade III Iressa plus docetaxel (taxane) (380). D'autres études cliniques sont en cours pour utiliser les inhibiteurs de l'EGFR avec d'autres agents de chimiothérapie en associant par exemple le cetuximab et l'oxaliplatine (381).

Le rôle de STAT3 dans la réponse à ces nouvelles thérapie n'est pas bien compris et a été peu étudié. L'expression de l'EGFR a été associée à l'activation de STAT3 dans certains cancers du sein (382). De plus, l'inhibition de l'EGFR, dans un modèle murin de xénogreffes de cellules cancéreuses du sein, a montré que le cetuximab augmentait l'efficacité de ce traitement (383). Ainsi, une étude clinique de phase I est en cours pour utiliser le cetuximab en association avec le paclitaxel, un autre membre de la famille des taxanes, traitement classique de ces tumeurs (384). L'activation de l'EGFR a été associée à celle de STAT3 dans le cancer du poumon et à un très faible taux de cellules apoptotiques par rapport aux cancers ne présentant pas d'activation de STAT3 (385). Chez des patients atteints de cancer du poumon, la présence de mutation de l'EGFR conférant une activité constitutive au récepteur a également été corrélée à l'activation de STAT3 (348). Ces patients présentent généralement un meilleur taux de réponse à l'Iressa et donc l'inhibition de STAT3 et de ses activités antiapoptotiques pourrait être un facteur important (386). Dans les cancers de la tête et du cou, l'augmentation du nombre de copies du gène de l'EGFR est corrélée avec une plus grande sensibilité au cetuximab et à l'Iressa (387). Il est intéressant de noter que l'augmentation du nombre de copies est également corrélée à l'activation de STAT3 et au phénotype

indifférencié de ces tumeurs (388). Ces différents exemples montrent que dans les différents cancers où le cetuximab et l'Iressa sont efficaces, STAT3 est activé en même temps que l'EGFR.

Ceci est confirmé in vitro dans des lignées cellulaires de cancer de la tête et du cou et dans des modèles animaux. Les résultats montrent que l'inhibition de l'EGFR réprime la phosphorylation de STAT3 sur la tyrosine 705 et induit l'apoptose de ces cellules (389). De façon similaire, des fibroblastes transformés par des formes constitutivement actives de l'EGFR présentent une activation constitutive de STAT3 et une sensibilité accrue aux inhibiteurs du récepteur de l'EGF (390).

D'après ces résultats, on peut conclure que STAT3 est sans doute important non seulement dans la réponse aux chimiothérapie classiques, mais également dans celles plus ciblées qui sont basées sur l'inhibition de l'EGFR.

## PROJET DE THESE

L'activation de STAT3 dans de nombreuses tumeurs et ses effets sur la prolifération et la survie suggèrent fortement que cette protéine est impliquée à la fois dans la transformation cellulaire et dans l'échappement aux traitements classiques de chimiothérapie.

Au cours de ma thèse, nous nous sommes donc intéressés aux différents aspects impliquant STAT3 dans la réponse de lignées cellulaires aux agents de chimiothérapie, et plus particulièrement aux inhibiteurs de topoisomérase. L'objectif de cette étude était d'identifier les différents mécanismes mis en jeu par STAT3 en réponse aux stress génotoxiques. Nous avons ainsi analysé l'interaction fonctionnelle de STAT3 avec différentes protéines impliquées dans l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire et la mise en place de la sénescence comme p21 et Rb. Ceci nous a ensuite permis de mesurer l'effet d'une activation constitutive de STAT3 par l'oncogène v-src sur la réponse cellulaire aux inhibiteurs de topoisomérase II ou au stress oxydatif. Finalement, dans une démarche inverse nous avons étudié les effets d'agents qui permettent d'inhiber l'activation de STAT3, en particulier le cetuximab, anticorps monoclonal dirigé contre l'EGFR et utilisé contre le cancer colorectal. La réponse de lignées colorectales aux inhibiteurs de topoisomérase I et au cetuximab a ainsi été mesurée.

## Résultats

Partie 1 : p21 réprime l'activité  
transcriptionnelle de STAT3 et E2F1 sur la  
voie c-myc cdc25A

Une étude réalisée au sein du laboratoire suggérait que l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 est capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle de STAT3 dans des expériences de gènes rapporteurs. Nous avons souhaité confirmer ces premiers résultats. Nous souhaitons analyser la régulation de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription par p21 et la présence de p21 sur le promoteur des gènes cibles de STAT3. De plus, nous étions intéressés par l'étude du rôle de p21 lors de son activation par des drogues antitumorales telles que les inhibiteurs de topoisomérase I et II.

Pour réaliser cette étude nous avons utilisé dans un premier temps une lignée de fibrosarcome HT1080 transfectée par un vecteur inducible à l'IPTG codant la protéine p21. L'induction de p21 inhibe la transcription et l'expression du gène de myc dans ces cellules, en croissance et en réponse à l'Interleukine 6.

Dans un second temps, l'analyse par immunoprécipitation de chromatine du promoteur de c-myc montre que l'induction de p21 induit son recrutement sur le promoteur. Ceci était associé à une inhibition du recrutement de l'histone acétyltransférase p300 et à la déacétylation des histones H4. De plus, lors de l'induction de p21, la forme élongatrice de l'ARNpolymérase II n'était plus détectée sur les exons de c-myc. Ainsi, le recrutement de p21 sur le promoteur de c-myc modifie le complexe transcriptionnel recruté par STAT3 ou E2F1 et induit l'inhibition de la transcription de c-myc.

Nous avons ensuite voulu déterminer si p21 induisait l'inhibition d'autres gènes impliqués dans la transition G1/S et nous avons testé l'effet de p21 sur l'expression de cdc25A et cdk4. L'expression de p21 inhibe seulement la transcription de cdc25A et induit son recrutement sur le promoteur. Comme sur le promoteur de c-myc, p21 empêche le recrutement de p300 et l'acétylation des histones.

Ces différentes expériences ont été réalisées grâce à l'activation de p21 de façon exogène. Nous avons voulu alors déterminer l'impact de ces résultats dans un modèle plus physiologique d'induction de p21 par les dommages de l'ADN. Pour cela, nous avons utilisé deux drogues, le sn38 (métabolite actif de l'irinotecan) et la doxorubicine, inhibant respectivement les topoisomérases I et II. L'incubation des cellules HT1080 avec ces drogues induit l'expression de p21 et inhibe celle de cdc25A et c-myc. L'induction de p21 est associée avec son recrutement sur les promoteurs de c-myc et cdc25A, recrutement induisant des effets comparables à ceux observés lors de l'activation de p21 par le vecteur inducible.

Nous répétons ensuite ces expériences dans la lignée colorectale HCT116 et la même lignée où le gène de p21 a été inactivé par recombinaison homologue. L'induction des dommages de l'ADN induit une forte répression de c-myc dans la lignée sauvage et le



recrutement de p21 sur le promoteur de c-myc. En revanche cette répression n'est que modérée dans la lignée inactivée pour le gène de p21. L'absence de p21 dans la lignée colorectale HCT116 perturbe donc la régulation transcriptionnelle de c-myc en réponse aux cassures de l'ADN induites par les inhibiteurs de topoisomérases. Cette réponse anormale pourrait participer à la dérégulation du point de contrôle induit par les dommages de l'ADN conduisant à la polyploïdisation de ces cellules. Ce phénomène ne s'observe pas dans la cellule contrôle.

Dans les résultats supplémentaires nous montrons finalement que le recrutement de p21 par STAT3 implique une interaction directe des deux protéines et l'inhibition spécifique du domaine d'activation transcriptionnel de STAT3. Des résultats similaires ont été obtenus entre le facteur E2F et p21 par l'équipe de La Thangue NB (391). De plus ces effets sont observables dans différents systèmes cellulaires tel que les hépatocarcinomes HepG2 et les fibroblastes NIH3T3. Finalement, nous avons montré que la surexpression de p21 pouvait en plus d'inhiber l'activité transcriptionnelle de STAT3 perturber sa liaison à l'ADN sans altérer son import dans le noyau.

En résumé nous avons montré que l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 est recruté directement par plusieurs facteurs de transcription tel que STAT3 et E2F1 sur les promoteurs de la voie c-myc-cdc25A. L'activité de ces facteurs de transcription permet la prolifération incontrôlée de diverses cellules cancéreuses et la voie c-myc cdc25A participe à l'induction de la réplication. Le recrutement de p21 est quant à lui associé avec l'inhibition de ces gènes, notamment dans le contexte où p21 est induit par les dommages de l'ADN. Ainsi nous proposons qu'en plus de réguler les complexes cyclines cdk, l'activité transcriptionnelle de p21 participe à l'inhibition du cycle cellulaire en réponse aux dommages de l'ADN induits par les inhibiteurs de topoisomérase I et II. Ces différents résultats sont schématisés figure 32.

# The Cell Cycle Inhibitor p21<sup>waf1</sup> Binds to the *myc* and *cdc25A* Promoters upon DNA Damage and Induces Transcriptional Repression\*

Received for publication, March 16, 2006, and in revised form, August 4, 2006. Published, JBC Papers in Press, August 21, 2006, DOI 10.1074/jbc.M602492200

Arnaud Vigneron, Julia Cherier, Benjamin Barré, Erick Gamelin, and Olivier Coqueret<sup>1</sup>

From INSERM U564, Cancer Center Paul Papin, 49033 Angers, France

In addition to its function as a cyclin-dependent kinase (cdk) inhibitor, p21<sup>waf1</sup> fulfills additional roles involved in DNA replication and transcriptional regulation that could also contribute to cell cycle arrest. In this study, we have shown that p21<sup>waf1</sup> functions as a transcriptional repressor of the *myc* and *cdc25A* genes. Ectopic expression of the cell cycle inhibitor down-modulates *myc* and *cdc25A* transcription but has no effect on cdk4 levels. Using chromatin immunoprecipitation, we found that p21<sup>waf1</sup> is recruited to the promoters of these two genes together with the STAT3 and E2F1 transcription factors. Its presence on DNA is associated with an inhibition of the recruitment of the p300 histone acetylase and with a down-regulation of histone H4 acetylation. The same effect was also observed following DNA damage because topoisomerase inhibitors such as sn38 or doxorubicin also induce the association of p21<sup>waf1</sup> with DNA. Following transcriptional repression of the *myc* and *cdc25A* genes, cells were arrested in the fraction with 4 N DNA content. By contrast, the expression of these two genes remains elevated in the absence of the cell cycle inhibitor, and p21<sup>waf1</sup><sup>-/-</sup> cells re-replicate their DNA and become polyploid. In light of these results, we propose that p21<sup>waf1</sup> simultaneously targets cdk and transcriptional regulators to prevent the expression of oncogenic pathways upon DNA damage.

Cell cycle progression relies on the activation of cyclin-dependent kinases (cdk)<sup>2</sup> that are controlled in part by cyclins and by two classes of cdk inhibitors that bind to and inactivate these kinases (1). The first class of inhibitors includes the INK4 proteins such as p16, which targets cdk4 and hampers its binding to D-type cyclins. The second class is composed of the Cip/Kip proteins, p21<sup>waf1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>, and p57<sup>Kip2</sup>, which bind to and inhibit all cyclin-Cdk complexes. p21<sup>waf1</sup> was originally identified as a transcriptional target of the p53 tumor suppressor

gene, a cdk inhibitor and a protein induced upon senescence (2, 3). The essential role of p21<sup>waf1</sup> relies upon its well known ability to inhibit cyclin-dependent kinases and DNA replication (4, 5), thereby inducing cell cycle arrest. Gene inactivation studies have also demonstrated essential roles of p21<sup>waf1</sup> upon DNA damage, mediating G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> arrest as well as tetraploidy checkpoints (6, 7).

Besides its classical roles, p21<sup>waf1</sup> is also involved in a number of other specific functions that may also contribute to growth arrest. Beyond its involvement with cyclin/cdks, p21<sup>waf1</sup> functions as a transcriptional cofactor that regulates the activity of various DNA-binding proteins such as NF-κB, Myc, E2F, STAT3, and estrogen receptor (8–10). Interestingly, through a combined regulation of apoptosis and cell cycle progression, most of these transcription factors participate in cell transformation and induce carcinogenesis when constitutively activated. Given that p21<sup>waf1</sup> binds to these transcription factors to regulate their activities, it is tempting to speculate that p21<sup>waf1</sup> simultaneously targets growth-promoting genes and cdk activity to induce cell cycle arrest (8).

cDNA microarray analysis has demonstrated that the up-regulation of p21<sup>waf1</sup> is correlated with the transcriptional repression of genes involved in cell cycle progression, DNA replication, and mitosis entry. For instance, p21<sup>waf1</sup> can inhibit the expression of cdk1 as well as a set of genes involved in mitosis and DNA segregation such as the polo-like kinase I and the topoisomerase IIα (11, 12). In addition, it has been proposed that the cell cycle inhibitor modulates the activity of p300/CBP proteins (13–15). These proteins are essential coactivators that stimulate gene expression through their acetyl transferase activity or through their ability to interact with components of the transcriptional machinery (16, 17). For instance, it has been recently shown on the *Wnt4* promoter that p21<sup>waf1</sup> prevents the recruitment of p300, causing histone hypoacetylation and transcriptional repression of the *Wnt4* gene (18). Upon estradiol signaling, p21<sup>waf1</sup> has also been shown to form a ternary complex with estrogen receptor and CBP to regulate the expression of the progesterone receptor (10). Interestingly, a general correlation has been observed between CDE-CHR sequences and the p21<sup>waf1</sup> inhibitory effects (19). Cell cycle-dependent element (CDE) and cell cycle gene homology region (CHR) are DNA sequences involved in cell cycle-dependent transcriptional regulation (20). These DNA sequences have been found in some promoters that are inhibited by p21<sup>waf1</sup>, such as *PLK1*, cyclin B1, or *TopoIIα*. In addition, mutating the CDE-CHR sequences prevents the transcriptional inhibition of *PLK1* and

\* This work was supported by a fellowship from Inserm-Pays de Loire (to J. C.) and by a fellowship (to A. V.) and a grant from the Ligue Pour la Recherche Sur le Cancer, Comité Départemental de Maine et Loire. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed: Centre Régional de Lutte Contre le Cancer Paul Papin, INSERM U564, 2 Rue Moll, 49033 Angers, France. Tel.: 33-2-41-35-27-00 (ext. 2564); Fax: 33-2-41-48-31-90; E-mail: olivier.coqueret@univ-angers.fr.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: cdk, cyclin-dependent kinase; IPTG, isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside; IL, interleukin; ChIP, chromatin immunoprecipitation; CBP, cAMP-response element-binding protein-binding protein.

*cdk1* by p21<sup>waf1</sup>. Therefore, one can speculate that the effects of p21<sup>waf1</sup> are probably related to the inhibition of the transcription factors that bind to the CDE-CHR sequences. Determining the composition of these complexes and the associated role of CBP/p300 acetylases will be an important step in understanding the transcriptional functions of p21<sup>waf1</sup>.

Following mitogenic stimulation of quiescent cells, the Cdc25A phosphatase is activated by DNA-binding proteins involved in cell cycle progression such as Myc, STAT3, or E2F1 (21–23). It has been proposed that Myc binds to the *cdc25A* promoter to up-regulate its expression, thereby activating the cyclin E-CDK2 complexes. To ascertain the physiological relevance of p21<sup>waf1</sup> transcriptional functions, we characterized the effects of the cell cycle inhibitor on the Myc-*cdc25A* pathway. Using chromatin immunoprecipitation experiments, we have observed that p21<sup>waf1</sup> is recruited to the *myc* and *cdc25* promoters and that this binding is correlated with the inhibition of p300 recruitment and with the down-regulation of histone H4 acetylation. As a consequence, the ectopic expression of p21<sup>waf1</sup>, with an isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG)-inducible vector, induced a down-regulation of the Myc and *cdc25A* mRNAs. Importantly, this effect was also shown when cells were treated with DNA-damaging drugs, indicating that p21<sup>waf1</sup> not only binds to cyclin-cdk complexes but also to the promoter of cell cycle genes upon DNA damage. We therefore propose that kinase inhibition and transcriptional repression are both necessary for p21<sup>waf1</sup> to prevent cell cycle progression in response to genomic insults.

## MATERIALS AND METHODS

**Antibodies, Cell Lines, and Cell Stimulation**—Antibodies against STAT3 (C20), E2F1 (C20), p21<sup>waf1</sup> (C19), c-Myc (N262), and p53 (FL393) were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Anti- $\alpha$ -tubulin (T9026) was obtained from Sigma. The fibrosarcoma cells used in this study correspond to the HT1080 p21<sup>-/-</sup> cell line that carries p21<sup>waf1</sup> in an IPTG-inducible vector as previously described (11). Note that this cell line (referred to in the text as HT1080) is p16<sup>INK4</sup> deficient and expresses wild-type Rb and p53. These cells were a kind gift from Dr. I. B. Roninson. All cells were maintained in RPMI medium supplemented with 10% serum and were not used beyond 25–30 passages. Drugs were resuspended in Me<sub>2</sub>SO and used diluted at the indicated concentrations. The human colorectal cancer cell line HCT116 wild type and its p21<sup>-/-</sup> derivative cell line in which both p21<sup>waf1</sup> alleles have been deleted by homologous recombination were a kind gift from Dr. B. Vogelstein. Where indicated, cells were serum starved for 2 days. IPTG was then added for 24 h to induce the expression of p21<sup>waf1</sup>, and IL-6 (20 ng/ml) or serum (10%) was finally added for the last 12 h.

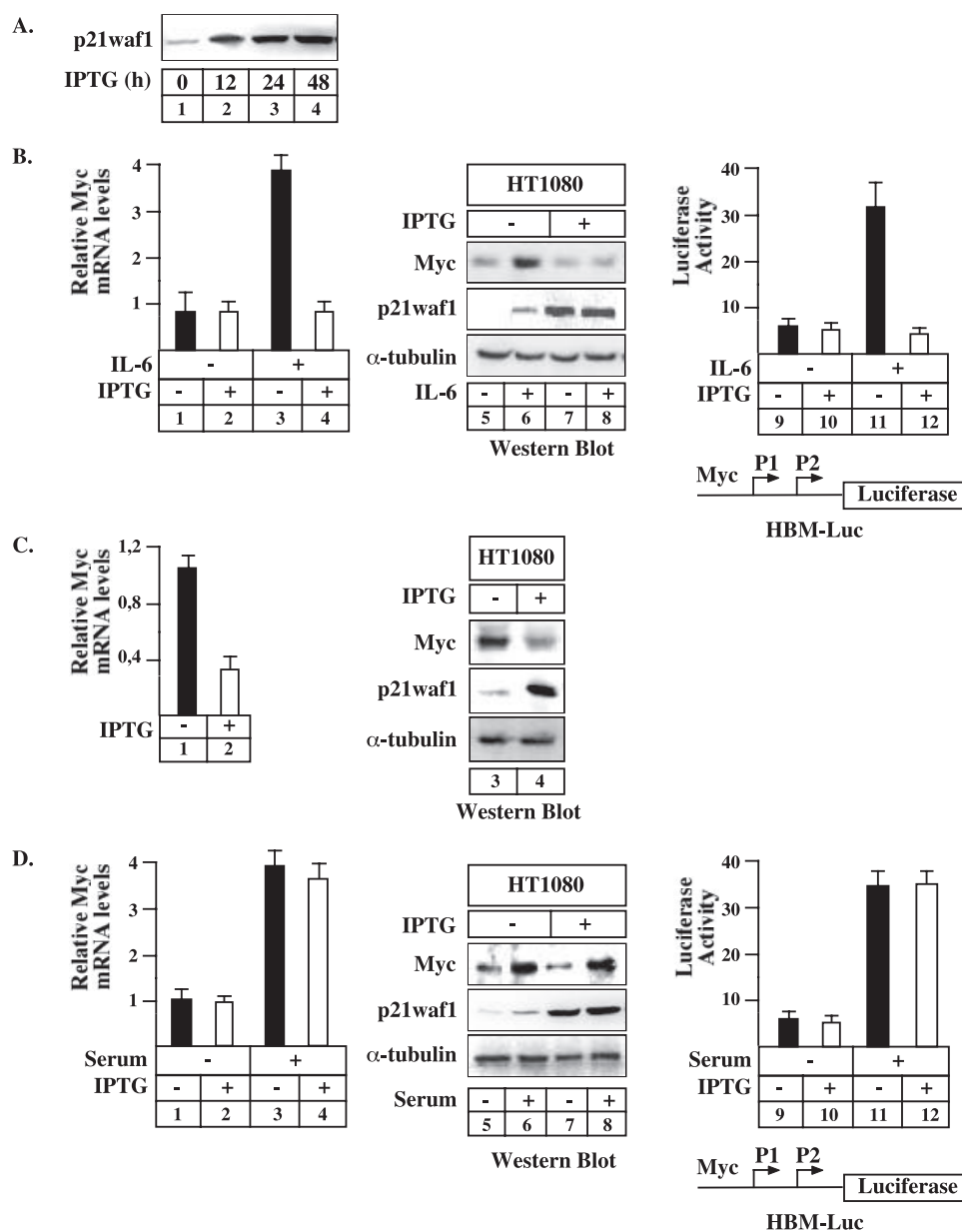
**Cell Extracts and Immunoblotting**—All experiments were performed on attached cells. For total cell extracts, 200  $\mu$ l of extraction buffer (10 mM Hepes, pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1 mM dithiothreitol) were added to the plates. After a 15-min incubation on ice, total extracts were recovered by centrifugation at 12,000 rpm for 5 min, and the extracts were either used immediately or frozen and stored at -80 °C. Protein

concentrations were measured, and 50–100  $\mu$ g of protein lysate were separated by SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane. The membrane was probed with the indicated antibodies and developed with the ECL system.

**Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay**—Attached cells were washed and cross-linked with 1% formaldehyde at room temperature for 10 min. Cells were washed sequentially two times with one ml of ice-cold phosphate-buffered saline, centrifuged, resuspended in 0.5 ml of lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 1  $\mu$ g/ml aprotinin), and sonicated three times for 15 s each at the maximum setting. Supernatants were then recovered by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min at 4 °C, diluted two times in dilution buffer (1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1), and subjected to one round of immunoclearing for 2 h at 4 °C with 2  $\mu$ g of sheared salmon sperm DNA, 2.5  $\mu$ g of preimmune serum, and 20  $\mu$ l of protein A-Sepharose (of 50% slurry). Immunoprecipitation was performed overnight with specific antibodies, and then 2  $\mu$ g of sheared salmon sperm DNA and 20  $\mu$ l of protein A-Sepharose (of 50% slurry) were further added for 1 h at 4 °C. Immunoprecipitates were washed sequentially for 10 min each in TSE I (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 150 mM NaCl) and TSE II (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 500 mM NaCl), and buffer III (0.25 M LiCl, 1% Nonidet P-40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.1). Bead precipitates were then washed three times with TE buffer and eluted two times with 1% SDS, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>. Eluates were pooled, heated at 65 °C for 6 h to reverse the formaldehyde cross-linking, and DNA was precipitated using classical procedures. For PCR, 10  $\mu$ l from a 100- $\mu$ l DNA preparation were used for 25–30 cycles of amplifications. The following regions were amplified: region -223/-40 (p21<sup>waf1</sup>, STAT3, E2F1 and ets), -16/+204 (H4 and p300, corresponding to the first exon) of the *myc* promoter, -222/+58 of the *cdc25A* promoter, and -162/+27 of the *cdk4* promoter. Primers are available upon request. To detect the association of RNA pol II on the Myc promoter, note that the ChIP experiments were performed on the third exon of this gene since the polymerase is always present on the *myc* initiation site.

**Real-time PCR**—For quantification, PCR was performed with 5  $\mu$ l of DNA and 5 pM primers diluted in a final volume of 5  $\mu$ l of reaction mix LightCycler (2239264; Roche Applied Science) and 4 mM MgCl<sub>2</sub>. Fluorescent products were monitored by real-time PCR using a LightCycler. The PCR reactions were carried out in a 10- $\mu$ l volume containing 1 $\times$  LightCycler Fast-start DNA master SYBR Green 1 (Roche Applied Science), 5 pmol for each forward and reverse primer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, and 5  $\mu$ l of the cDNA diluted 10-fold. After an initial denaturation step at 95 °C for 10 min, each cycle consisted of a denaturation step at 95 °C for 15 s, an annealing step at 55 °C for 11 s, and an elongation step at 72 °C for 22 s. A total of 40 cycles were performed. The fluorescent signal was acquired at the end of each elongation step. A fusion curve was performed at the end of the PCR cycle to determine the specificity of the primers. Data analysis was performed as indicated by Roche Applied Science

## p21<sup>waf1</sup> Binds to the *myc* and *cdc25A* Promoters



**FIGURE 1. p21<sup>waf1</sup> down-regulates *myc* expression.** *A*, growing HT1080 cells were left untreated or treated with IPTG (50  $\mu$ M) for the indicated times. Overexpression of p21<sup>waf1</sup> was verified by Western blot analysis. *B*, HT1080 cells were serum starved, left untreated or treated with IPTG (24 h, 50  $\mu$ M), and then stimulated with IL-6 (20 ng/ml, last 12 h) as indicated. Total RNA was prepared and Myc mRNA levels were analyzed by real-time PCR (lanes 1–4). The expression of *myc* was then analyzed by Western blot, and tubulin expression was monitored as a control (lanes 5–8). In parallel, cells were transfected with the HBM-Luc reporter gene (5  $\mu$ g), starved, and treated or not with IPTG for 24 h, in the presence or absence of IL-6 for the last 12 h. Cytoplasmic extracts were then prepared and processed to measure luciferase activity (lanes 9–12); the mean of five transfections  $\pm$  S.D. is shown. *C*, asynchronously growing HT1080 cells were either left untreated or treated with IPTG (24 h, 50  $\mu$ M), and the expression of *myc* was analyzed as described in panel *B* by real-time PCR (lanes 1–2) or Western blot (lanes 3–4). *D*, HT1080 cells were serum starved for 2 days, left untreated or treated with IPTG (24 h, 50  $\mu$ M), and then stimulated or not with 10% serum for the last 12 h. The expression of *myc* was analyzed by real-time PCR (lanes 1–4), Western blot (lanes 5–8), or reporter gene experiments (lanes 9–12); the mean of five transfections  $\pm$  S.D. is shown.

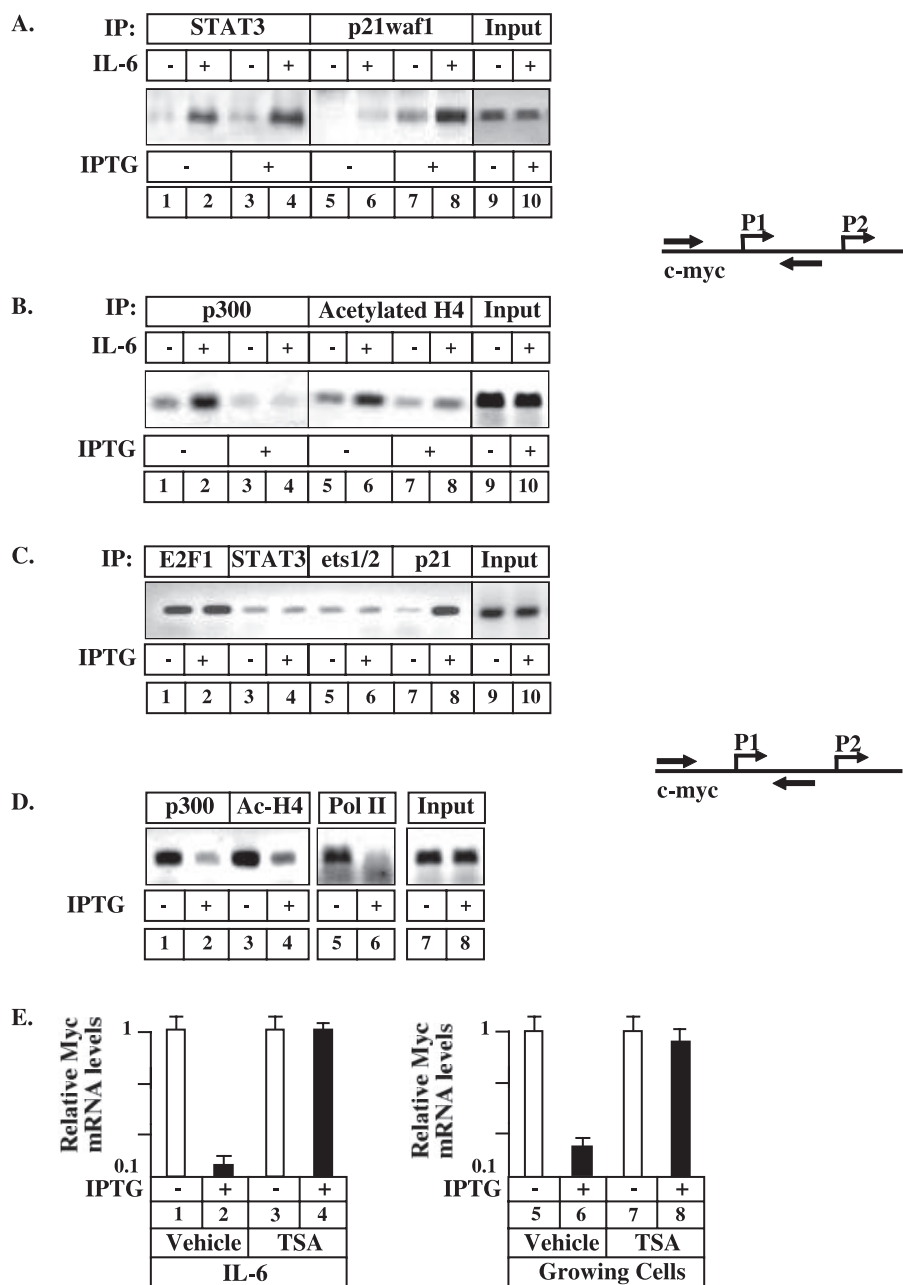
using the “Fit Point Method” in the LightCycler software 3.3. The relative quantification of gene expression was performed using the comparative  $C_T$  method, with normalization of the target gene to the endogenous housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. The induction factor was determined for the three reverse transcriptions, and an average induction factor was then calculated.

**Flow Cytometry Analysis**—For DNA content analysis,  $2 \times 10^5$  cells were washed twice with phosphate-buffered saline and fixed in 70% ethanol. Cells were treated with 100 units/ml Ribonuclease A for 20 min at 37  $^{\circ}$ C, resuspended in phosphate-buffered saline containing 50  $\mu$ g/ml propidium iodide, and immediately analyzed by flow cytometry (BD Biosciences).

## RESULTS

### p21<sup>waf1</sup> Suppresses *myc* Gene Transcription

In addition to inhibiting cyclin/cdks, p21<sup>waf1</sup> participates in several protein-protein interactions to prevent cell cycle progression and DNA replication. In particular, p21<sup>waf1</sup> binds to transcription factors and coactivators to regulate their functions (8, 9). An attractive possibility could be that p21<sup>waf1</sup> inhibits cell proliferation through transcriptional inhibition of cell cycle genes. To test this hypothesis, the effect of the cell cycle inhibitor was investigated on the expression of *myc*, a well known inducer of G<sub>0</sub>–G<sub>1</sub> progression. The HT1080 fibrosarcoma cell line used in the present study (p21–9) (11) carries p21<sup>waf1</sup> in an IPTG-inducible vector (Fig. 1A, lanes 1–4). Up-regulation of p21<sup>waf1</sup> was detected as early as 12 h after IPTG induction and remained constant for the next 48 h. A 24-h stimulation was used for the following experiments. To determine whether p21<sup>waf1</sup> regulates *myc* expression, cells were either maintained in serum (Fig. 1C) or serum starved and stimulated with two different mitogens, IL-6 or 10% serum (Fig. 1, B and D, respectively). Results presented in Fig. 1B indicate that p21<sup>waf1</sup> prevents *myc* induction in response to IL-6 stimulation. Treatment of cells with IPTG suppressed Myc mRNA as shown by quantitative real-time PCR and protein expression by Western blotting (Fig. 1B, lanes 3–4 and 7–8). In addition, p21<sup>waf1</sup> prevented the IL-6-mediated induction of the Myc HBM-Luc promoter (24), confirming its inhibitory functions at the transcriptional level (Fig. 1B, lanes 11 and 12). By contrast, no effect was observed in the absence of cytokine stimulation. Interestingly, the same effects were also observed in growing cells, where p21<sup>waf1</sup> was found to



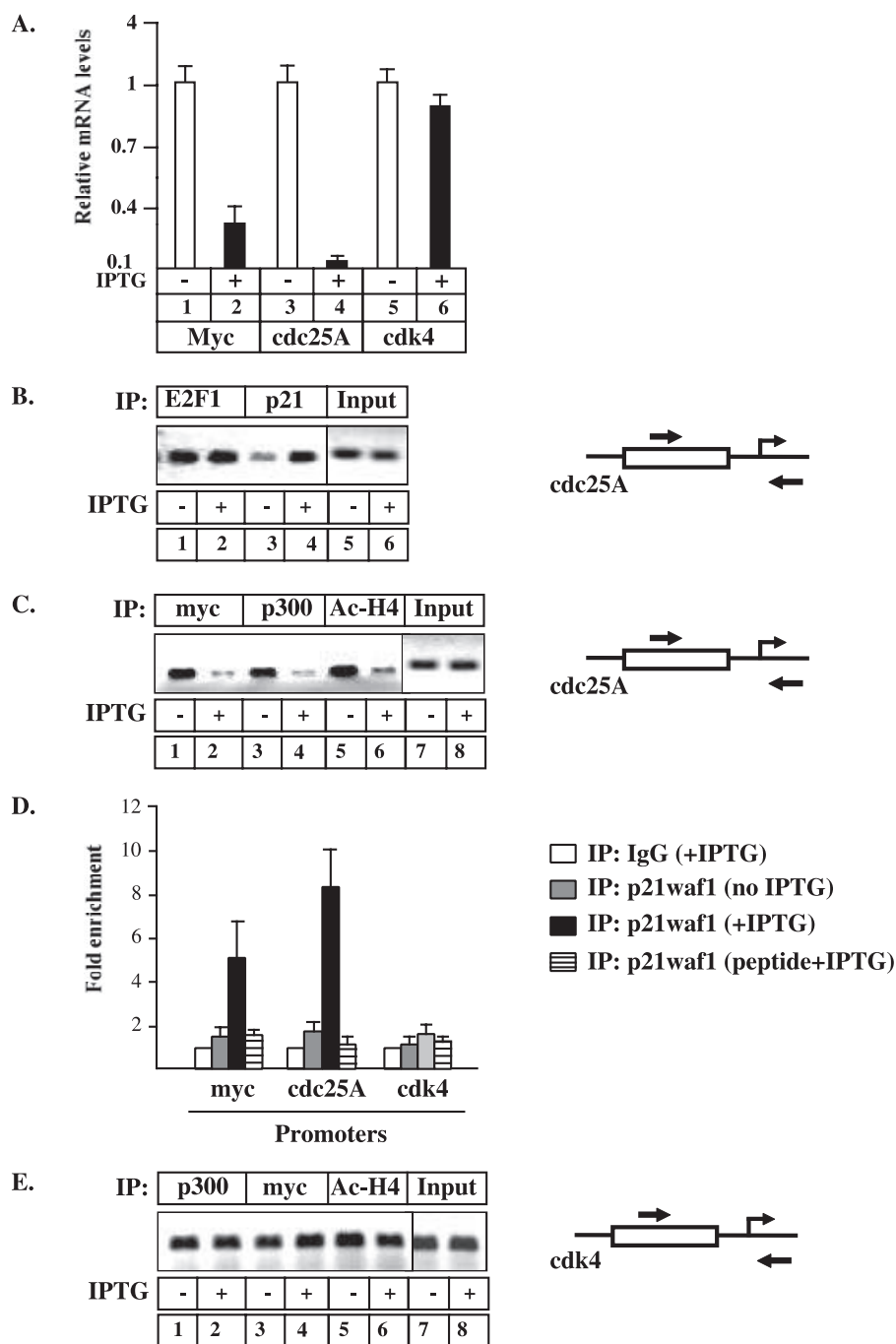
**FIGURE 2. Inhibition of p300 recruitment and histone H4 acetylation upon p21<sup>waf1</sup> induction.** A and B, ChIP analysis of the recruitment of STAT3, p21<sup>waf1</sup>, and p300 and of histone H4 acetylation on the *myc* promoter. Cells were serum starved for 2 days, treated with IPTG (24 h, 50  $\mu$ M), and stimulated with IL-6 for 1 h. Soluble chromatin was immunoprecipitated with the corresponding antibodies, and DNA samples were then amplified using pairs of primers that cover the proximal *myc* promoter. C and D, ChIP analysis of the recruitment of E2F1, ets1/2, STAT3, p21<sup>waf1</sup>, and p300 and of histone H4 acetylation (Ac-H4) on the *myc* promoter in growing cells. Asynchronously growing cells were either left untreated or treated with IPTG (24 h, 50  $\mu$ M), and ChIPs were performed as described above. E, cells were serum starved for 2 days and treated with IPTG (24 h) and IL-6 (last 12 h) in the presence or absence of trichostatin A (TSA, 100 nM) as indicated. Myc mRNA levels were analyzed by real-time PCR (lanes 1–4). The effect of TSA was also analyzed on Myc mRNA levels in growing cells (lanes 5–8).

inhibit the expression of the steady-state level of Myc mRNA and its corresponding protein (Fig. 1C). The same experiments were also performed using serum-starved cells that were restimulated with 10% serum (Fig. 1D). In contrast, p21<sup>waf1</sup> had no effect on *myc* mRNA (Fig. 1D, lanes 1–4), protein (lanes 5–8), or promoter (lanes 9–12) under these conditions, further confirming the specificity of its transcriptional functions.

*p21<sup>waf1</sup> Binds to the myc Promoter to Prevent Histone H4 Acetylation*—One proposed mechanism whereby p21<sup>waf1</sup> can specifically regulate transcription is through physical association with transcription factors that could provide a bridge with the initiation complex. We and others have previously shown that p21<sup>waf1</sup> interacts with E2F1 or STAT3 to prevent their transcriptional activity (25, 26). To assess whether p21<sup>waf1</sup> binds to the *myc* proximal promoter in association with these two transcription factors, ChIP experiments were performed following IL-6 stimulation or in growing cells. Upon cytokine stimulation, results demonstrated binding of endogenous STAT3 to the proximal Myc promoter, whereas no binding was detected in the control region (Fig. 2A, lanes 1–4 and data not shown). In parallel, the ChIPs assay also showed that p21<sup>waf1</sup> binds specifically to this region of the *myc* gene upon IPTG induction (Fig. 2A, lanes 5–8). As expected, STAT3 DNA binding was associated with the recruitment of p300 and with histone H4 acetylation on the *myc* proximal promoter (Fig. 2B, lanes 2 and 6). ChIP assays showed a significant down-modulation of p300 binding as well as a reduction of H4 acetylation upon p21<sup>waf1</sup> induction (Fig. 2B, compare lanes 2, 4 and 6, 8). The same effects were also observed in growing cells, where p21<sup>waf1</sup> was also found to inhibit *myc* expression (Fig. 1C). Under these conditions, p21<sup>waf1</sup> bound to the *myc* promoter upon IPTG induction (Fig. 2C, lanes 7 and 8). Confirming the above results, down-modulation of p300 binding as well as inhibition of histone H4 acetylation in p21<sup>waf1</sup>-expressing cells was shown. As a consequence, the association of the elongating form of the RNA polymerase with DNA was also inhibited (Fig. 2D, lanes 1–8). In growing cells, only E2F-1 was recruited to the *myc* promoter because neither STAT3 nor ets1/2 was detected on DNA (Fig. 2C, lanes 1–6). We also observed that the DNA binding activities of E2F-1 and STAT3 were unaffected by increased p21<sup>waf1</sup> expression (Fig. 2A, lane 4, and 2C, lane 2). To confirm that p21<sup>waf1</sup> down-

modulation of p300 binding as well as inhibition of histone H4 acetylation in p21<sup>waf1</sup>-expressing cells was shown. As a consequence, the association of the elongating form of the RNA polymerase with DNA was also inhibited (Fig. 2D, lanes 1–8). In growing cells, only E2F-1 was recruited to the *myc* promoter because neither STAT3 nor ets1/2 was detected on DNA (Fig. 2C, lanes 1–6). We also observed that the DNA binding activities of E2F-1 and STAT3 were unaffected by increased p21<sup>waf1</sup> expression (Fig. 2A, lane 4, and 2C, lane 2). To confirm that p21<sup>waf1</sup> down-

*p21<sup>waf1</sup>* Binds to the *myc* and *cdc25A* Promoters



**FIGURE 3. *p21<sup>waf1</sup>* inhibits the expression of *cdc25A*.** *A*, asynchronously growing HT1080 cells were either left untreated or treated with IPTG (24 h, 50  $\mu$ M), and the expression of the *Myc*, *cdc25A*, and *cdk4* mRNAs was analyzed by real-time PCR. *B* and *C*, soluble chromatin was prepared from asynchronously growing HT1080 cells treated or not with IPTG for 24 h and immunoprecipitated with antibodies directed against E2F1, *p21<sup>waf1</sup>* (*B*), or *Myc*, p300, and the acetylated form of histone H4 (*C*). The final DNA extractions were amplified using pairs of primers that cover the proximal *cdc25A* promoter. *D*, soluble chromatin was prepared from asynchronously growing HT1080 cells treated or not with IPTG for 24 h and immunoprecipitated with antibodies directed against *p21<sup>waf1</sup>* or a control IgG in the presence or absence of the corresponding *p21<sup>waf1</sup>* immunogenic peptide as indicated. Final DNA extractions were amplified using pairs of primers that cover the proximal *myc*, *Cdc25A*, and *cdk4* promoters and were analyzed by real-time PCR. Quantification represents the average  $\pm$  S.D. of three independent experiments. *E*, ChIP analysis of the recruitment of p300 and *Myc* and of histone H4 acetylation of the *cdk4* promoter was performed as described in panel *B*.

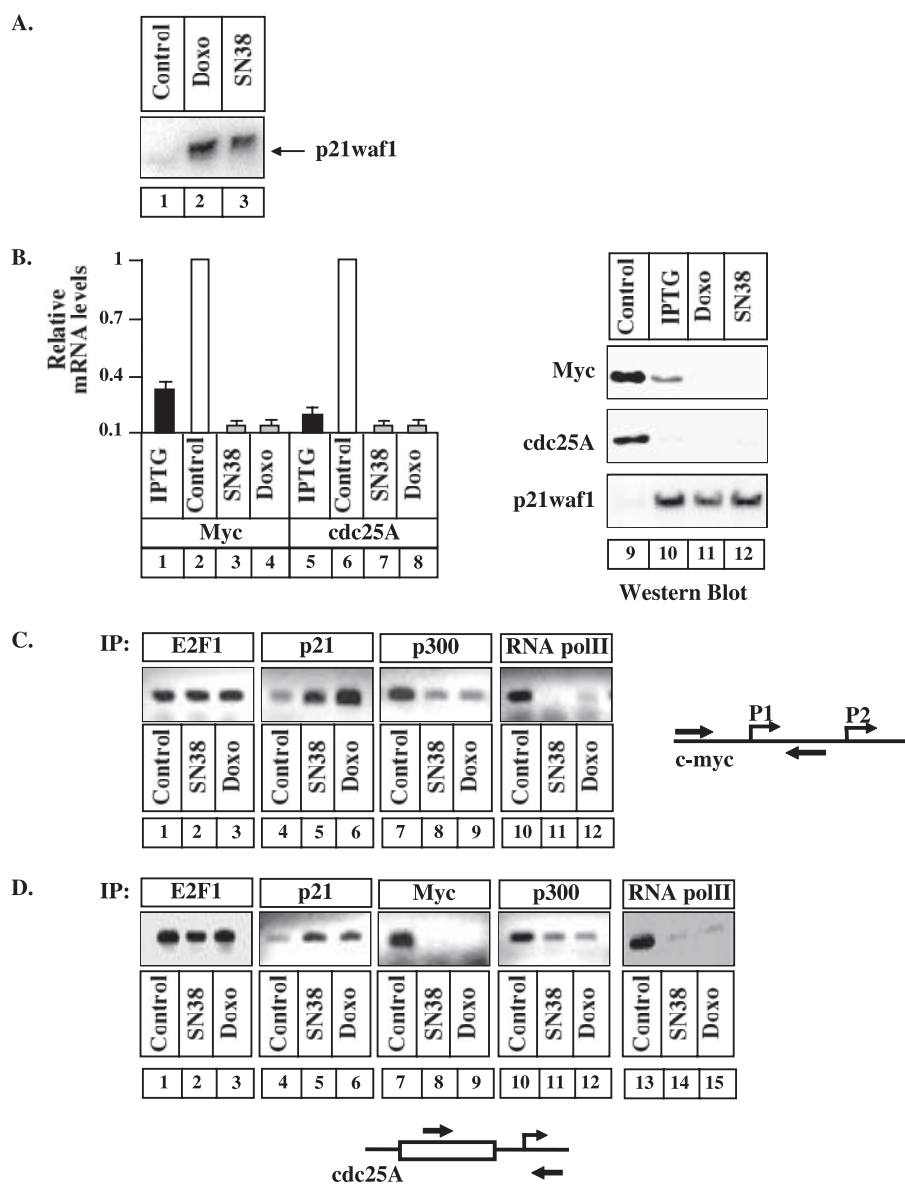
regulates transcription through histone deacetylation, cells were pretreated with trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor. Under these conditions, the ability of *p21<sup>waf1</sup>* to down-modulate endogenous *Myc* mRNA expression was

inhibited. This effect was observed in growing cells or upon cytokine stimulation (Fig. 2*E*, lanes 3–4 and 7–8). To this end, we focused on the expression of *cdk4* and *cdc25A*, two genes involved in S-phase progression and previously shown to be directly regulated by *Myc* (21, 22, 27). Results presented in Fig. 3*A* indicate that the up-regulation of *p21<sup>waf1</sup>* effectively prevents the expression of *cdc25A* mRNA. As a control, *Myc* steady-state levels were also inhibited under these conditions (Fig. 3*A*, lanes 1–4). Surprisingly, *p21<sup>waf1</sup>* did not affect the expression of *cdk4* (Fig. 3*A*, lanes 5 and 6). It has been shown previously that *Myc* and E2F1 regulate the expression of the *cdc25A* gene (21–23). Using ChIP experiments, we observed that the two transcription factors were present on the *cdc25A* promoter in growing cells (Fig. 3*B* and 3*C*, lane 1). As expected, p300 binding and histone H4 acetylation were also detected (Fig. 3*C*, lanes 3 and 5). Upon IPTG addition, *p21<sup>waf1</sup>* was recruited to the *cdc25A* promoter, probably in association with E2F1, still bound on the DNA (Fig. 3*B*, lanes 3 and 4). As expected, *Myc* binding was inhibited upon *p21<sup>waf1</sup>* loading (Fig. 3*C*, lanes 1 and 2). Down-modulation of p300 binding and inhibition of histone H4 acetylation were also observed in the presence of the cell cycle inhibitor (Fig. 3*C*, lanes 4 and 6).

As stated above, there was no significant effect of *p21<sup>waf1</sup>* on *cdk4* expression. In addition, we were unable to detect any association of E2F1 with the *cdk4* promoter (data not shown). To determine whether *p21<sup>waf1</sup>* was recruited to the *cdk4* promoter, we then used real-time PCR to compare by a quantitative assessment the ChIP signals obtained on the *myc*, *cdc25A*, and *cdk4* promoters (Fig. 3*D*). As expected, *p21<sup>waf1</sup>* was not recruited to DNA in the absence of IPTG, but real-time

*Transcriptional Regulation of myc Target Genes by p21<sup>waf1</sup>*—Having shown that *p21<sup>waf1</sup>* down-regulates *Myc* expression, we investigated whether the cell cycle inhibitor also prevents the expression of *Myc* target genes involved in cell cycle progression. To this end, we focused on the expression of *cdk4* and *cdc25A*, two genes involved in S-phase progression and previously shown to be directly regulated by *Myc* (21, 22, 27). Results presented in Fig. 3*A* indicate that the up-regulation of *p21<sup>waf1</sup>* effectively prevents the expression of *cdc25A* mRNA. As a control, *Myc* steady-state levels were also inhibited under these conditions (Fig. 3*A*, lanes 1–4). Surprisingly, *p21<sup>waf1</sup>* did not affect the expression of *cdk4* (Fig. 3*A*, lanes 5 and 6). It has been shown previously that *Myc* and E2F1 regulate the expression of the *cdc25A* gene (21–23). Using ChIP experiments, we observed that the two transcription factors were present on the *cdc25A* promoter in growing cells (Fig. 3*B* and 3*C*, lane 1). As expected, p300 binding and histone H4 acetylation were also detected (Fig. 3*C*, lanes 3 and 5). Upon IPTG addition, *p21<sup>waf1</sup>* was recruited to the *cdc25A* promoter, probably in association with E2F1, still bound on the DNA (Fig. 3*B*, lanes 3 and 4). As expected, *Myc* binding was inhibited upon *p21<sup>waf1</sup>* loading (Fig. 3*C*, lanes 1 and 2). Down-modulation of p300 binding and inhibition of histone H4 acetylation were also observed in the presence of the cell cycle inhibitor (Fig. 3*C*, lanes 4 and 6).

As stated above, there was no significant effect of *p21<sup>waf1</sup>* on *cdk4* expression. In addition, we were unable to detect any association of E2F1 with the *cdk4* promoter (data not shown). To determine whether *p21<sup>waf1</sup>* was recruited to the *cdk4* promoter, we then used real-time PCR to compare by a quantitative assessment the ChIP signals obtained on the *myc*, *cdc25A*, and *cdk4* promoters (Fig. 3*D*). As expected, *p21<sup>waf1</sup>* was not recruited to DNA in the absence of IPTG, but real-time



**FIGURE 4. p21<sup>waf1</sup> functions as a transcriptional repressor upon DNA damage.** A, asynchronously growing HT1080 cells were treated or not with SN38 (5 ng/ml) or doxorubicin (30 nM) for 36 h, and the up-regulation of p21<sup>waf1</sup> was verified by Western blot analysis. B, asynchronously growing HT1080 cells were treated or not with SN38 (5 ng/ml) or doxorubicin (30 nM) for 36 h, and the expression of the Myc and cdc25A mRNAs was analyzed by real-time PCR (lanes 1–8). In parallel, the expression of the Myc, cdc25A, and p21<sup>waf1</sup> proteins was analyzed by Western blot (lanes 9–12). C and D, soluble chromatin was prepared from asynchronously growing HT1080 cells treated or not with SN38 or doxorubicin and immunoprecipitated with the indicated antibodies. Final DNA extractions were amplified using a pair of primers that cover the proximal promoters of *myc* (C) or *cdc25A* (D).

PCR analysis indicated that the cell cycle inhibitor could be found associated with the *myc* and *cdc25A* promoters upon induction. By contrast, p21<sup>waf1</sup> was not detected on the *cdk4* promoter (Fig. 3D). As a control, no amplification was detected in the presence of a control IgG antibody or when immunoprecipitations were performed in the presence of the p21<sup>waf1</sup> immunogenic peptide. In addition, we observed that despite Myc down-regulation, residual levels of the transcription factor were still found associated with the *cdk4* promoter upon IPTG addition (Fig. 3E, lanes 3 and 4). Accordingly, p300 binding and histone H4 acetylation were not affected by the up-regulation of the cell cycle inhibitor (Fig. 3E). This indicates that the tran-

scriptional effects of p21<sup>waf1</sup> are specific to the Myc-cdc25A pathway and do not affect the expression of *cdk4*.

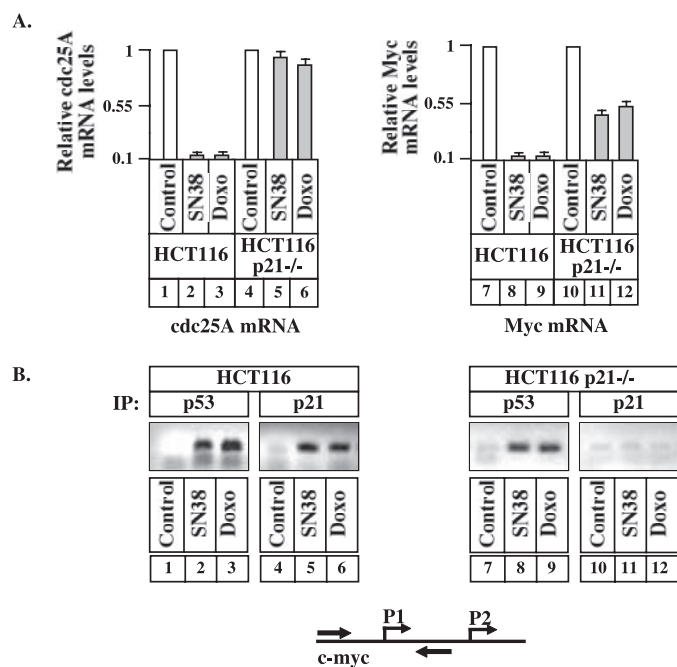
**p21<sup>waf1</sup> Binds to the myc and cdc25A Promoters upon DNA Damage**—We then studied whether p21<sup>waf1</sup> also binds to the *myc* and *cdc25A* promoters upon DNA damage. To this end, cells were exposed to moderate doses of two topoisomerase I/II inhibitors, sn38 (the active metabolite of irinotecan) or doxorubicin, two genotoxic drugs that induce the expression of p21<sup>waf1</sup> (Fig. 4A, lanes 1–3). Using real-time PCR analysis, we observed that the steady-state levels of the Myc and cdc25A mRNAs in growing cells were inhibited upon drug treatment (Fig. 4B, lanes 1–4 and 5–8). As expected, the same effect was also observed when IPTG was used as a control to up-regulate p21<sup>waf1</sup>. Western blot analysis also confirmed that these treatments induce the down-regulation of the Myc and cdc25A proteins (Fig. 4B, lanes 9–12). Note that the two drugs induce the expression of the cell cycle inhibitor to the same extent as IPTG.

Importantly, ChIP experiments indicated that both drugs induced a significant association of p21<sup>waf1</sup> with the *myc* and *cdc25A* promoters (Fig. 4C and 4D, lanes 4–6). Confirming the above results, we also observed that the recruitment of p21<sup>waf1</sup> to DNA was associated with a down-modulation of p300 and RNA polymerase binding to the *myc* gene (Fig. 4C, lanes 7–9 and 10–12). On the *cdc25A* promoter, the loading of the cell cycle inhibitor was also correlated with an inhibition of

Myc and p300 binding. In addition, p21<sup>waf1</sup> prevented the elongating form of the polymerase from reaching the 3' part of the gene (Fig. 4D, lanes 7–9, 10–12, and 13–15).

To confirm this result, we then used the human colorectal cancer cell line HCT116 and its p21<sup>-/-</sup> derivative cell line in which both p21<sup>waf1</sup> alleles have been deleted by homologous recombination (6). Whereas sn38 and doxorubicin reduced cdc25A mRNAs in parental cells, real-time PCR showed that this down-regulation was not observed in HCT116 p21<sup>-/-</sup> cells (Fig. 5A, lanes 1–6). Interestingly, Myc was only partially repressed in the absence of p21<sup>waf1</sup> (Fig. 5A, lanes 7–12). It has been recently demonstrated that p53 binds to the Myc promoter to repress its expression (28).

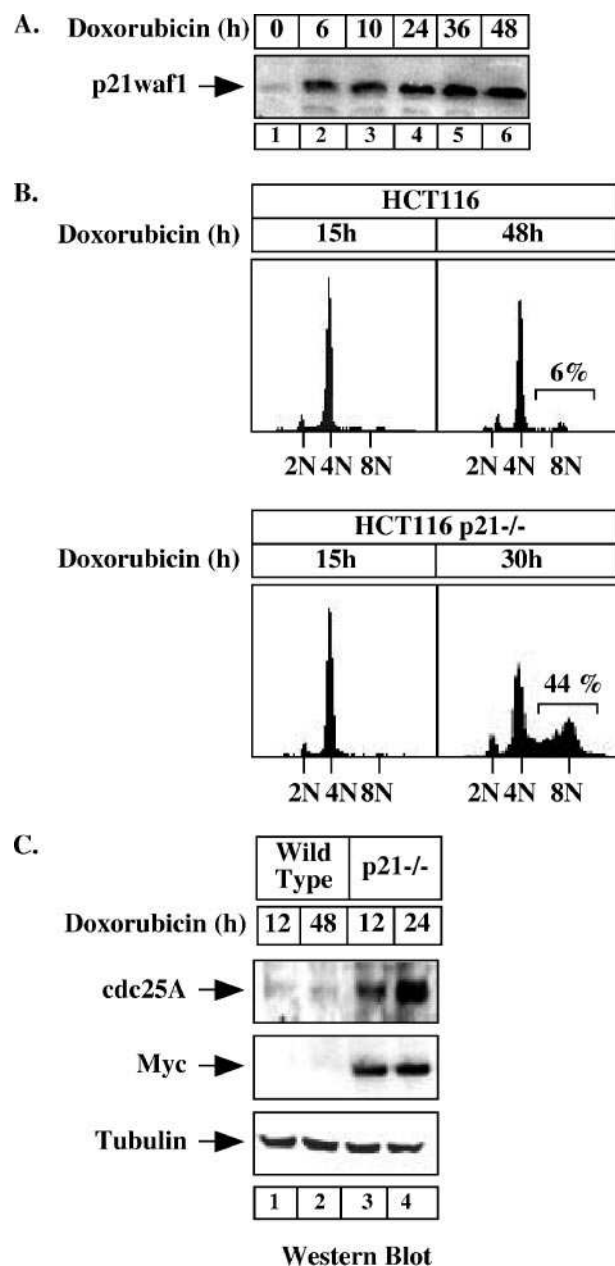
## *p21<sup>waf1</sup>* Binds to the *myc* and *cdc25A* Promoters



**FIGURE 5. Regulation of *myc* and *cdc25A* expression in cells lacking *p21<sup>waf1</sup>*.** *A*, HCT116 wild-type cells or their *p21<sup>-/-</sup>* derivative were treated with SN38 (5 ng/ml) or doxorubicin (30 nM) for 36 h, and the expression of the *cdc25A* (lanes 1–6) and *myc* (lanes 7–12) mRNAs was analyzed by real-time PCR. *B*, soluble chromatin was prepared from asynchronously growing HT1080 cells treated or not with SN38 (5 ng/ml) or doxorubicin (30 nM) for 36 h. ChIP experiments were performed to analyze the recruitment of *p21<sup>waf1</sup>* and p53 to the proximal *myc* promoter in parental (lanes 1–6) or *p21<sup>-/-</sup>* cells (lanes 7–12).

Using ChIP experiments, we effectively found in wild-type or *p21<sup>-/-</sup>* cells that p53 was recruited to the Myc promoter upon drug treatment (Fig. 5*B*, lanes 1–3 and 7–9). Although additional studies are required to confirm these findings, these results suggest that the residual repression of Myc in *p21<sup>-/-</sup>* cells was probably due to p53 binding.

*p21<sup>waf1</sup>* Prevents Aneuploidy upon Genotoxic Treatment—The effect of doxorubicin was also studied on HCT116 wild-type or *p21<sup>-/-</sup>* cells. To this end, cells were synchronized in  $G_1/S$  with hydroxyurea, released, and further treated with 30 nM doxorubicin for 15–48 h. This treatment is well known to induce the expression of *p21<sup>waf1</sup>* in HCT116 cells, which remained growth arrested with a 4 N DNA content (Fig. 6*A* and 6*B*, top panel) (6, 7). As previously shown (29), most of the *p21<sup>waf1</sup>* cells started to float and died by apoptosis under these conditions (data not shown). However, 30 h after synchronization, a substantial fraction of these cells remained attached to the plastic dish and became polyploid (30–40%). By 30 h, 44% of these surviving cells were detected with a DNA content between 4 and 8 N (Fig. 6*B*, bottom panel), suggesting that these cells re-replicate their DNA. Accordingly, a significant expression of the Myc and *cdc25A* mRNAs was detected in this attached *p21<sup>-/-</sup>* subpopulation. By contrast, most of the HCT116 control cells were still arrested within 48 h in the fraction with 4 N DNA content (Fig. 4*B*, top panel). Additionally, we were not able to detect the expression of *myc* and *cdc25A* in these cells even after 48 h. Although further experiments are needed to fully demonstrate this point, these results suggest



**FIGURE 6. HCT116-attached cells lacking *p21<sup>waf1</sup>* become polyploid upon genotoxic treatment.** *A*, HCT116 wild-type cells were synchronized with hydroxyurea and released in serum in the presence of doxorubicin (30 nM) for the indicated times. Cellular extracts were then subjected to immunoblotting for *p21<sup>waf1</sup>*. *B*, HCT116 wild-type or *p21<sup>-/-</sup>* cells were treated as described in panel *A* for the indicated times. Attached cells were harvested, fixed, and stained with propidium iodide and then analyzed by flow cytometry. *C*, HCT116 wild-type or *p21<sup>-/-</sup>* cells were treated as described in panel *A* for the indicated times. The expression of *myc* and *cdc25A* was analyzed on attached cells by Western blotting using tubulin as a control.

that the presence of *p21<sup>waf1</sup>* prevents polyploidization through the down-regulation of cell cycle genes.

## DISCUSSION

Cell cycle progression relies on the activation of cyclins and cyclin-dependent kinases (cdk) that successively act in  $G_1$  to initiate S-phase and in  $G_2$  to initiate mitosis. To prevent abnormal proliferation, cyclin-cdk complexes are precisely regulated by cell cycle inhibitors that block their catalytic activity. Among

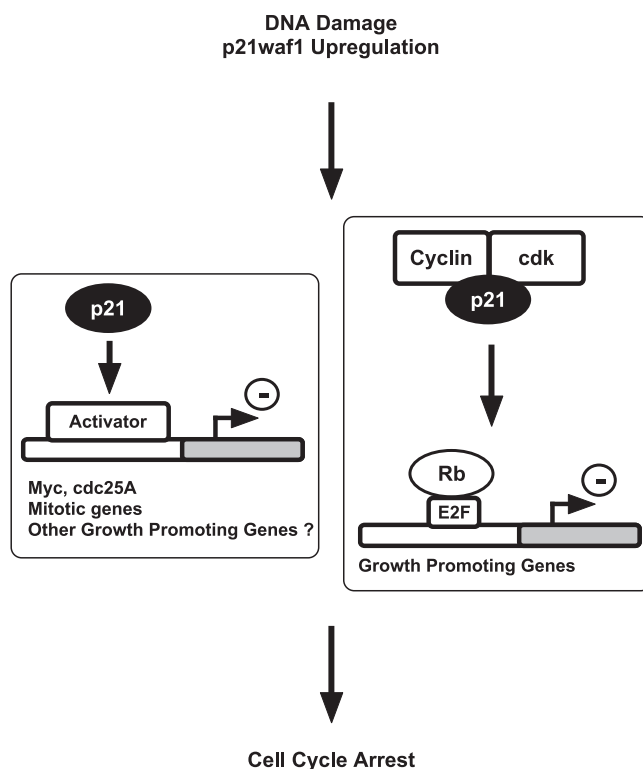


these inhibitors, p21<sup>waf1</sup> is induced by p53-dependent and -independent mechanisms to bind all cyclin-cdk complexes and prevent cell cycle progression. This protein is therefore well known to inhibit E2F function through cdk2 inhibition and Rb dephosphorylation, but it can also prevent DNA replication through proliferating cell nuclear antigen binding and DNA replication inhibition (2, 4). Besides these classical functions, several studies have shown that p21<sup>waf1</sup> also interacts with various DNA-binding proteins involved in cell cycle progression. This has led to the hypothesis that p21<sup>waf1</sup> might simultaneously target cdks and transcriptional regulators to inhibit the expression of growth-promoting genes (8, 9).

In this study, we have shown that p21<sup>waf1</sup> functions as a transcriptional regulator that physically associates with the promoter of the *myc* and *cdc25A* genes. By ChIP assays, we found that p21<sup>waf1</sup> binds the same region of these promoters as STAT3 or E2F1, consistent with a model whereby these two transcription factors provide a bridging mechanism to targeted promoters (25, 26). Determining whether these two transcription factors are the only targets of p21<sup>waf1</sup> will be an important issue to resolve. Several cyclin-cdk complexes are involved in transcriptional regulation, and one can speculate that the cell cycle inhibitor might also be recruited to DNA through cyclin-cdk bridges. For instance, the transcriptional functions of p21<sup>waf1</sup> have been initially correlated to the inhibition of p300-associated cdk2 activity (30). In addition, cdk7 and cdk9 phosphorylate the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase, a critical mechanism in the regulation of pre-mRNA elongation (31–33). Importantly, we have recently shown STAT3 regulates the elongation of transcription through its interaction with cdk9 (34). Therefore, these observations suggest that p21<sup>waf1</sup> might also interact with proximal promoters through cyclin-cdk bridges. Serial ChIP analysis as well as RNA interference should help to evaluate the relative contributions of STAT3, E2F1, and cyclin-cdks in the transcriptional functions of the cell cycle inhibitor.

Although overexpressed p21<sup>waf1</sup> prevents both *Myc* and *cdc25A* mRNA expression, *cdk4* levels were unaffected by the cell cycle inhibitor. Accordingly, p21<sup>waf1</sup> binding does not occur at the *cdk4* promoter, indicating that the transcriptional functions of this protein are promoter specific. Although this remains to be fully demonstrated, our results also indicate that p21<sup>waf1</sup> might prevent the recruitment of the p300 histone acetylase to inhibit histone H4 acetylation. We speculate that this finally prevents the loading of the initiation complex, converting the *myc* and *cdc25A* promoters from a transcriptionally active state to an inactive one. Future experiments will determine whether the presence of the cell cycle inhibitor is associated with a decreased accessibility of these promoters through chromatin remodeling.

Through activation and/or repression of its target genes, up-regulation of the *Myc* oncogene leads to hyperproliferation, tumorigenesis, and genomic instability (35, 36). It is well known that tumor suppressor genes, such as p53, p16<sup>INK4</sup>, p19<sup>ARF</sup>, or p21<sup>waf1</sup>, prevent the effects of *Myc* on cell cycle progression through Rb dephosphorylation and E2F inactivation. However, recent results have also shown that p19<sup>ARF</sup> binds to the activation domain of *Myc* to prevent its transcriptional functions



**FIGURE 7. Proposed model for the p21-mediated cell cycle arrest upon DNA damage.** Upon DNA damage, p21<sup>waf1</sup> is induced by p53-dependent mechanisms and binds to cyclin-cdk complexes. As a consequence, Rb is dephosphorylated, and this protein binds to E2F to prevent cell cycle progression. In addition, p21<sup>waf1</sup> is recruited to the promoters of *myc* and *cdc25A* to inhibit their activation. The same effect has also been reported on mitotic genes to prevent inappropriate chromosome segregation upon DNA damage (11, 12).

(37). As a consequence, the tumor suppressor blocked the ability of *Myc* to transactivate the telomerase reverse transcriptase promoter. Interestingly, p19<sup>ARF</sup> does not inhibit the ability of *Myc* to induce apoptosis or repress transcription, suggesting that its inhibitory functions are directed against growth-promoting genes. In addition, p53 can repress *myc* expression (28). Chromatin immunoprecipitation experiments have shown that p53 binds to the *myc* promoter to prevent its expression. This effect is associated with histone H4 deacetylation and recruitment of the mSin3a corepressor. Although this remains to be demonstrated for p16<sup>INK4</sup>, it therefore appears that p53, p19<sup>ARF</sup>, and p21<sup>waf1</sup> have transcriptional functions that also control the effect of *Myc* on tumorigenesis.

Recent results have suggested that the balance between *Myc* and p21<sup>waf1</sup> plays an important role in cell cycle regulation. For instance, the cell cycle inhibitor binds to the activation domain of *Myc* to prevent the formation of the *Myc*-Max heterodimer and repress its transcriptional activity (38). Conversely, *Myc* can be recruited to the p21<sup>waf1</sup> promoter by Myz-1 to inhibit its expression and prevent cell cycle arrest (39, 40). Through recruitment of the Dnmt3a corepressor, the *Myc*-Myz complex leads to DNA methylation and subsequent silencing of the p21<sup>waf1</sup> promoter (41). Therefore, it appears that p21<sup>waf1</sup> can inhibit cell cycle arrest through *Myc* down-regulation but also that *Myc* prevents p21<sup>waf1</sup> expression to induce proliferation. In line with this observation, we have recently shown that the

## p21<sup>waf1</sup> Binds to the myc and cdc25A Promoters

expression of p21<sup>waf1</sup> is lost in glioblastoma cells, whereas myc levels remain unaltered (42).

Recent observations have demonstrated that the up-regulation of p21<sup>waf1</sup> leads to the down-regulation of multiple genes, most of which are involved in chromatin assembly and mitosis. As illustrated Fig. 7, we now propose that in addition to p53 and p19<sup>ARF</sup>, p21<sup>waf1</sup> functions as a transcriptional inhibitor of the Myc-cdc25A pathway. Therefore, in addition to its ability to inhibit cyclin-dependent kinases and DNA replication, the transcriptional functions of p21<sup>waf1</sup> might also play an important role in the control of DNA damage and tumorigenesis.

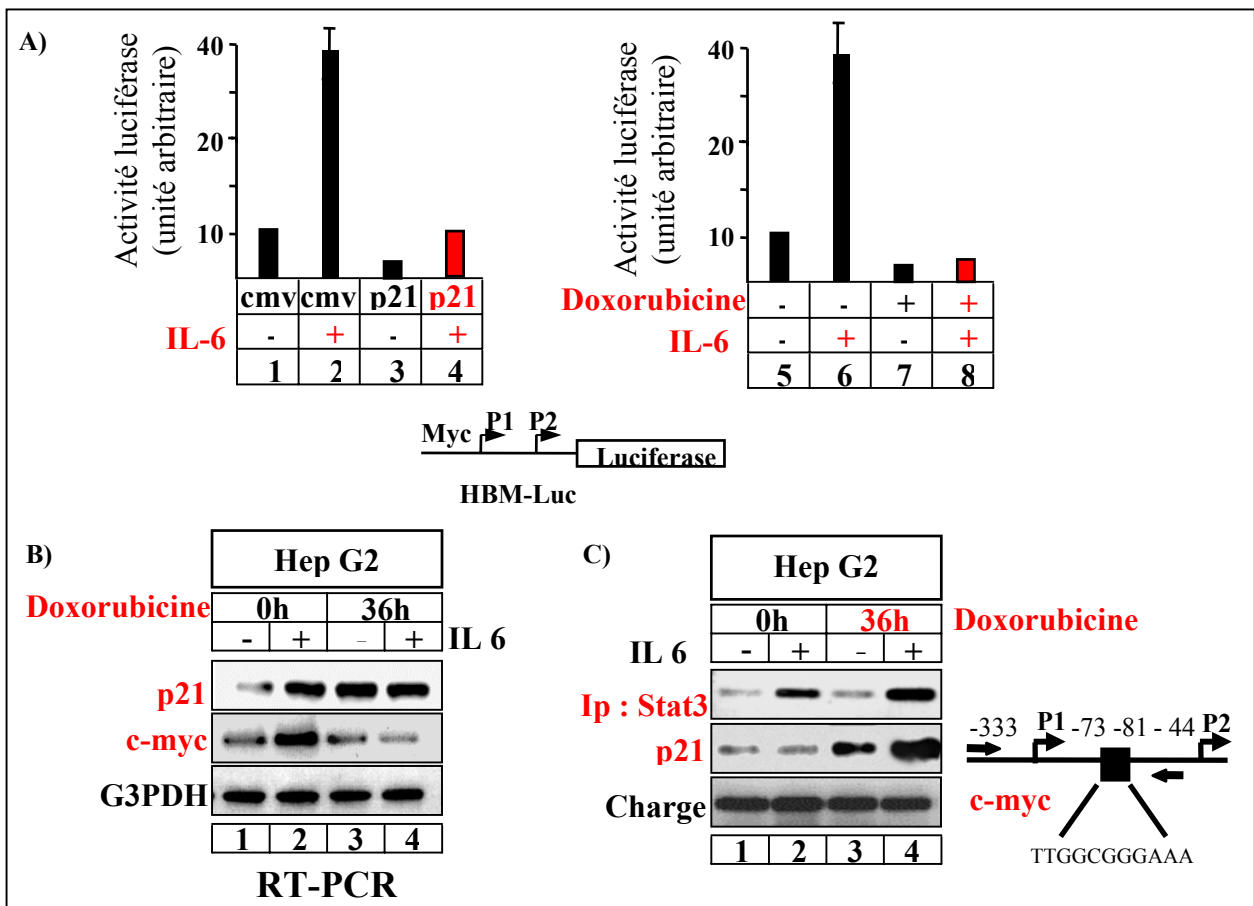
*Acknowledgments*—We thank B. Vogelstein and I. Roninson for the gift of HCT116 and HT1080 cell lines and Adrienne Choma and Salvatore Salamone for correcting the manuscript.

### REFERENCES

- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (2004) *Genes Dev.* **18**, 2699–2711
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993) *Cell* **75**, 817–825
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S. J. (1993) *Cell* **75**, 805–816
- Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., and Stillman, B. (1994) *Nature* **369**, 574–578
- Chuang, L. S., Ian, H. I., Koh, T. W., Ng, H. H., Xu, G., and Li, B. F. (1997) *Science* **277**, 1996–2000
- Waldman, T., Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1996) *Nature* **381**, 713–716
- Andreassen, P. R., Lacroix, F. B., Lohez, O. D., and Margolis, R. L. (2001) *Cancer Res.* **61**, 7660–7668
- Coqueret, O. (2003) *Trends Cell Biol.* **13**, 65–70
- Perkins, N. D. (2002) *Cell Cycle* **1**, 39–41
- Fritah, A., Saucier, C., Mester, J., Redeuilh, G., and Sabbah, M. (2005) *Mol. Cell Biol.* **25**, 2419–2430
- Chang, B. D., Watanabe, K., Broude, E. V., Fang, J., Poole, J. C., Kalinichenko, T. V., and Roninson, I. B. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4291–4296
- Chang, B. D., Broude, E. V., Fang, J., Kalinichenko, T. V., Abdryashitov, R., Poole, J. C., and Roninson, I. B. (2000) *Oncogene* **19**, 2165–2170
- Snowden, A. W., Anderson, L. A., Webster, G. A., and Perkins, N. D. (2000) *Mol. Cell Biol.* **20**, 2676–2686
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O. A., Thain, A., Anderson, L. A., Snowden, A. W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N. D., and Hay, R. T. (2003) *Mol. Cell* **11**, 1043–1054
- Gregory, D. J., Garcia-Wilson, E., Poole, J. C., Snowden, A. W., Roninson, I. B., and Perkins, N. D. (2002) *Cell Cycle* **1**, 343–350
- Martinez-Balbas, M. A., Bannister, A. J., Martin, K., Haus-Seuffert, P., Meisterernst, M., and Kouzarides, T. (1998) *EMBO J.* **17**, 2886–2893
- Nakajima, T., Uchida, C., Anderson, S. F., Lee, C. G., Hurwitz, J., Parvin, J. D., and Montminy, M. (1997) *Cell* **90**, 1107–1112
- Devgan, V., Mammucari, C., Millar, S. E., Briskin, C., and Dotto, G. P. (2005) *Genes Dev.* **19**, 1485–1495
- Zhu, H., Chang, B. D., Uchiyama, T., and Roninson, I. B. (2002) *Cell Cycle* **1**, 59–66
- Lucibello, F. C., Truss, M., Zwicker, J., Ehlert, F., Beato, M., and Muller, R. (1995) *EMBO J.* **14**, 132–142
- Galaktionov, K., Chen, X. C., and Beach, D. (1996) *Nature* **382**, 511–517
- Vigo, E., Muller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M. C., and Helin, K. (1999) *Mol. Cell Biol.* **19**, 6379–6395
- Barré, B., Vigneron, A., and Coqueret, O. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 15673–15681
- Facchini, L. M., Chen, S., Marhin, W. W., Lear, J. N., and Penn, L. Z. (1997) *Mol. Cell Biol.* **17**, 100–114
- Delavaie, L., and La Thangue, N. B. (1999) *Oncogene* **18**, 5381–5392
- Coqueret, O., and Gascan, H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 18794–18800
- Hermeking, H., Rago, C., Schuhmacher, M., Li, Q., Barrett, J. F., Obaya, A. J., O'Connell, B. C., Mateyak, M. K., Tam, W., Kohlhuber, F., Dang, C. V., Sedivy, J. M., Eick, D., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 2229–2234
- Ho, J. S., Ma, W., Mao, D. Y., and Benchimol, S. (2005) *Mol. Cell Biol.* **25**, 7423–7431
- Le, H. V., Minn, A. J., and Massague, J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 32018–32025
- Perkins, N. D., Felzien, L. K., Betts, J. C., Leung, K., Beach, D. H., and Nabel, G. J. (1997) *Science* **275**, 523–527
- Buratowski, S. (2003) *Nat. Struct. Biol.* **10**, 679–680
- Shin, C., and Manley, J. L. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 727–738
- Calvo, O., and Manley, J. L. (2003) *Genes Dev.* **17**, 1321–1327
- Giraud, S., Hurlstone, A., Avril, S., and Coqueret, O. (2004) *Oncogene* **23**, 7391–7398
- Secombe, J., Pierce, S. B., and Eisenman, R. N. (2004) *Cell* **117**, 153–156
- Vafa, O., Wade, M., Kern, S., Beeche, M., Pandita, T. K., Hampton, G. M., and Wahl, G. M. (2002) *Mol. Cell* **9**, 1031–1044
- Qi, Y., Gregory, M. A., Li, Z., Brousal, J. P., West, K., and Hann, S. R. (2004) *Nature* **431**, 712–717
- Kitaura, H., Shinshi, M., Uchikoshi, Y., Ono, T., Iguchi-Arigo, S. M., and Ariga, H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 10477–10483
- Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., Frohme, C., Beul, D., Hillukkala, T., Syvaaja, J., Saluz, H. P., Haenel, F., and Eilers, M. (2002) *Mol. Cell* **10**, 509–521
- Seoane, J., Le, H. V., and Massague, J. (2002) *Nature* **419**, 729–734
- Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Lorient, A., Vire, E., De Smet, C., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T., Pelicci, P. G., Amati, B., Kouzarides, T., de Launoit, Y., Di Croce, L., and Fuks, F. (2005) *EMBO J.* **24**, 336–346
- Barré, B., Avril, S., and Coqueret, O. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 2990–2996

**1) p21 inhibe l'activité transcriptionnelle de STAT3 sur le promoteur de c-myc dans les hépatocarcinomes HepG2.**

Afin de confirmer les résultats obtenus dans les fibrosarcomes HT1080, les mêmes expériences ont été réalisées dans les hépatocarcinomes HepG2.



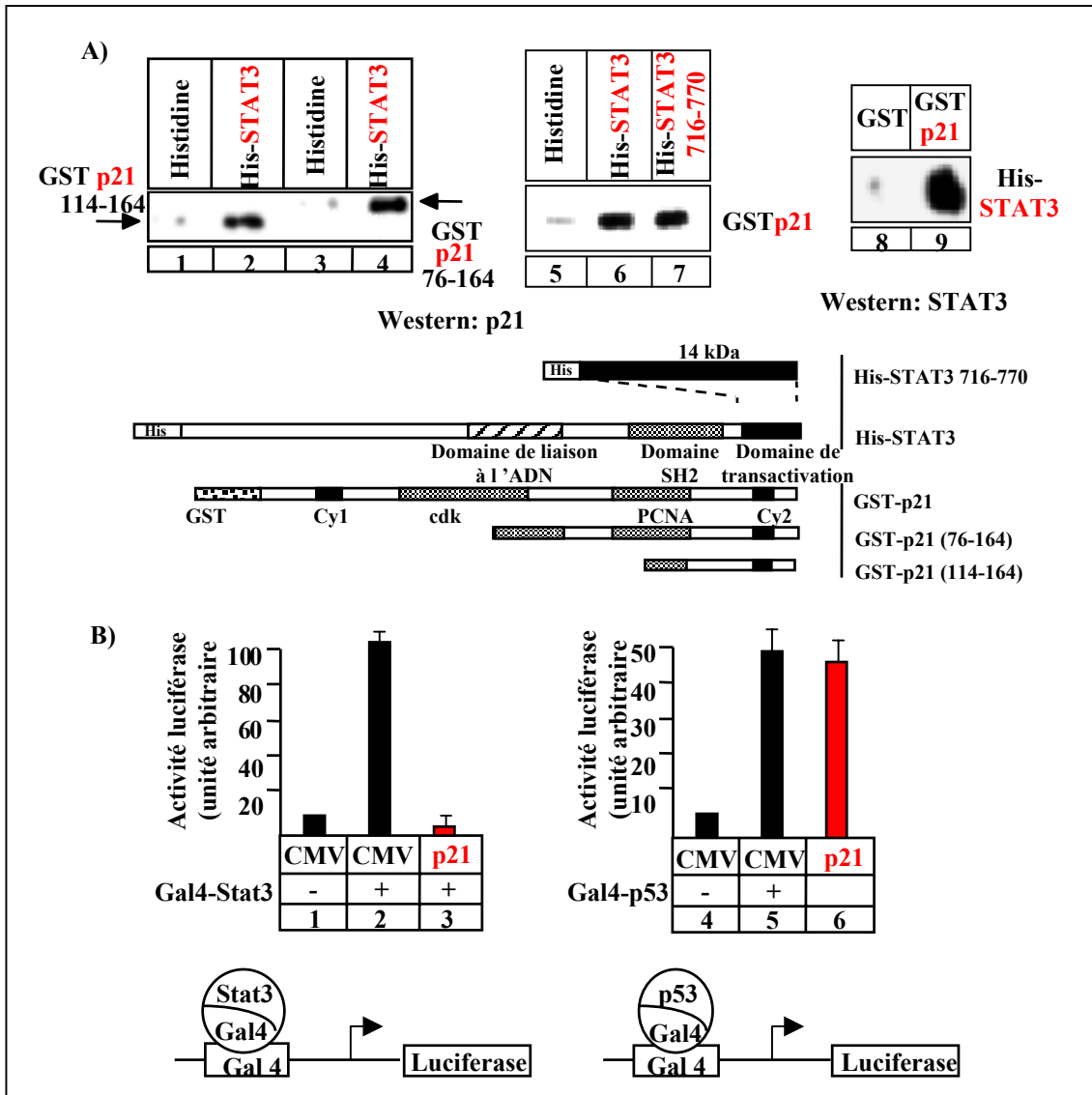
**Figure 28 : p21 inhibe la transcription de c-myc induite par l'IL-6 dans les hépatocarcinome HepG2**

- Les cellules sont transfectées avec 500ng de vecteur contenant le promoteur de c-myc fusionné au gène de la luciférase en présence ou en absence d'un vecteur d'expression pour p21 (ligne 1-4). Alternativement les cellules sont prétraitées ou non par de la doxorubicine durant 36h (ligne 5-8). Après 24h de transfection les cellules sont stimulées à l'IL-6 (20ng/ml) pendant 12h. Des extraits cytoplasmiques sont alors réalisés et analysés pour leur activité luciférase. La moyenne de quatre transfections est montrée.
- Des cellules HepG2 prétraitées 36h à la doxorubicine sont stimulées à l'IL-6 durant 2h. La quantité d'ARNm c-myc est alors mesurée par RT-PCR sur des extraits d'ARN.
- Des cellules HepG2 prétraitées 36h à la doxorubicine sont stimulées 1 heure à l'IL-6. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine avec des anticorps dirigés contre STAT3 et p21 sont alors réalisées sur les séquences de liaison à l'ADN de STAT3 du promoteur de c-myc.

Des expériences de gènes rapporteurs et de RT-PCR montrent que l'expression de p21 par un vecteur plasmidique ou son activation par un poison des topoisomérase II inhibe l'activité transcriptionnelle de STAT3 sur le promoteur de c-myc dans les cellules HepG2 (figure 28A-B). De plus p21 est recruté en association avec STAT3 sur le promoteur de c-myc après un traitement à l'IL-6 sur des cellules HepG2 prétraitées à la doxorubicine (figure 28C). L'induction de p21 par un agent génotoxique tel que la doxorubicine empêche ainsi l'activation de c-myc par le facteur de transcription STAT3. Ces expériences montrent que dans un modèle cellulaire différents de celui des HT1080, l'activation de p21 par les dommages de l'ADN n'inhibe pas seulement l'activité du facteur de transcription E2F1 sur le gène de c-myc mais également celle du facteur de transcription STAT3.

## **2) p21 interagit de manière directe avec le domaine d'activation transcriptionnel de STAT3 et inhibe son activité**

Nous souhaitons ensuite déterminer si p21 était capable d'interagir directement avec STAT3. Des expériences de pull down nous ont ainsi permis de caractériser une interaction directe entre le domaine d'activation transcriptionnel de STAT3 et le domaine c-terminal de p21 (figure 29A). Dans un second temps nous voulions connaître l'effet de cette interaction sur l'activité de STAT3. Pour cela, nous avons eu recours à des expériences de gène rapporteur utilisant un vecteur portant les séquences de fixation du facteur de transcription Gal4 fusionné au gène de la luciférase, et un vecteur codant une protéine de fusion entre le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 et le domaine d'activation transcriptionnel de STAT3. Ces expériences ont alors mis en évidence que p21 inhibait spécifiquement le domaine d'activation transcriptionnel de STAT3 mais pas celui de p53 (figure 29B). p21 est donc capable d'inhiber l'activité de STAT3 indépendamment de la liaison à l'ADN de STAT3. Ces expériences suggèrent ainsi que le recrutement direct de p21 sur le domaine d'activation transcriptionnel de STAT3 lié à l'ADN induit l'inhibition de STAT3.

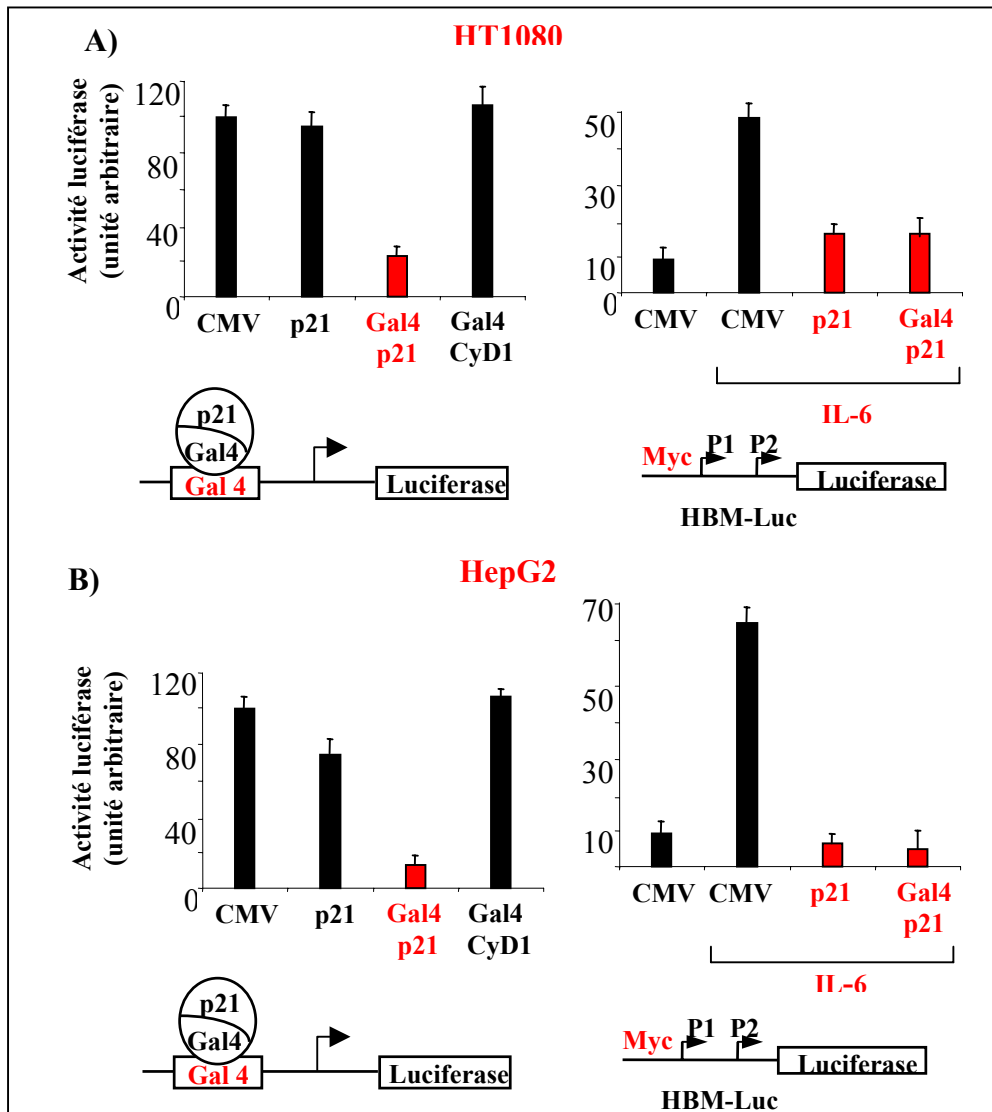


**Figure 29 :** *p21* réprime et interagit avec le domaine d'activation transcriptionnelle de *STAT3*

- A. 50ng des protéines de fusion GSTp21, GST p21(76-164) ou GST p21(114-164) sont incubées avec des billes de Ni-NTA agarose liées à 50ng de protéines Histidine-STAT3, Histidine-STAT3 (716-770) ou Histidine seule. Les billes sont récupérées par centrifugation et on analyse la présence des protéines GST-p21 par un anticorps dirigé contre p21. Les mêmes expériences sont réalisées avec les protéines GST p21 fixées sur des protéines de Glutathione Sépharose et un anticorps dirigé contre STAT3. Les différentes protéines de fusion utilisées sont représentées avec leur domaine fonctionnel
- B. Les cellules sont transfectées avec 500ng de vecteur contenant le promoteur Gal4 fusionné au gène de la luciférase en présence ou en absence d'un vecteur d'expression codant la protéine de fusion Gal4STAT3 ou GAL4p53 auquel on ajoute ou pas un vecteur d'expression codant p21. Des extraits cytoplasmiques sont réalisés 24heures après et analysés pour leur activité luciférase. La moyenne de quatre transfections est montrée.

### 3) Le recrutement de p21 sur l'ADN inhibe la transcription d'un gène rapporteur

Les données présentées précédemment suggèrent que le recrutement de p21 sur l'ADN par divers facteurs de transcription tel que E2F1 ou STAT3 est capable d'induire une inhibition générale de la transcription. Nous souhaitons alors savoir si p21 pouvait être considéré comme un inhibiteur général de la transcription.



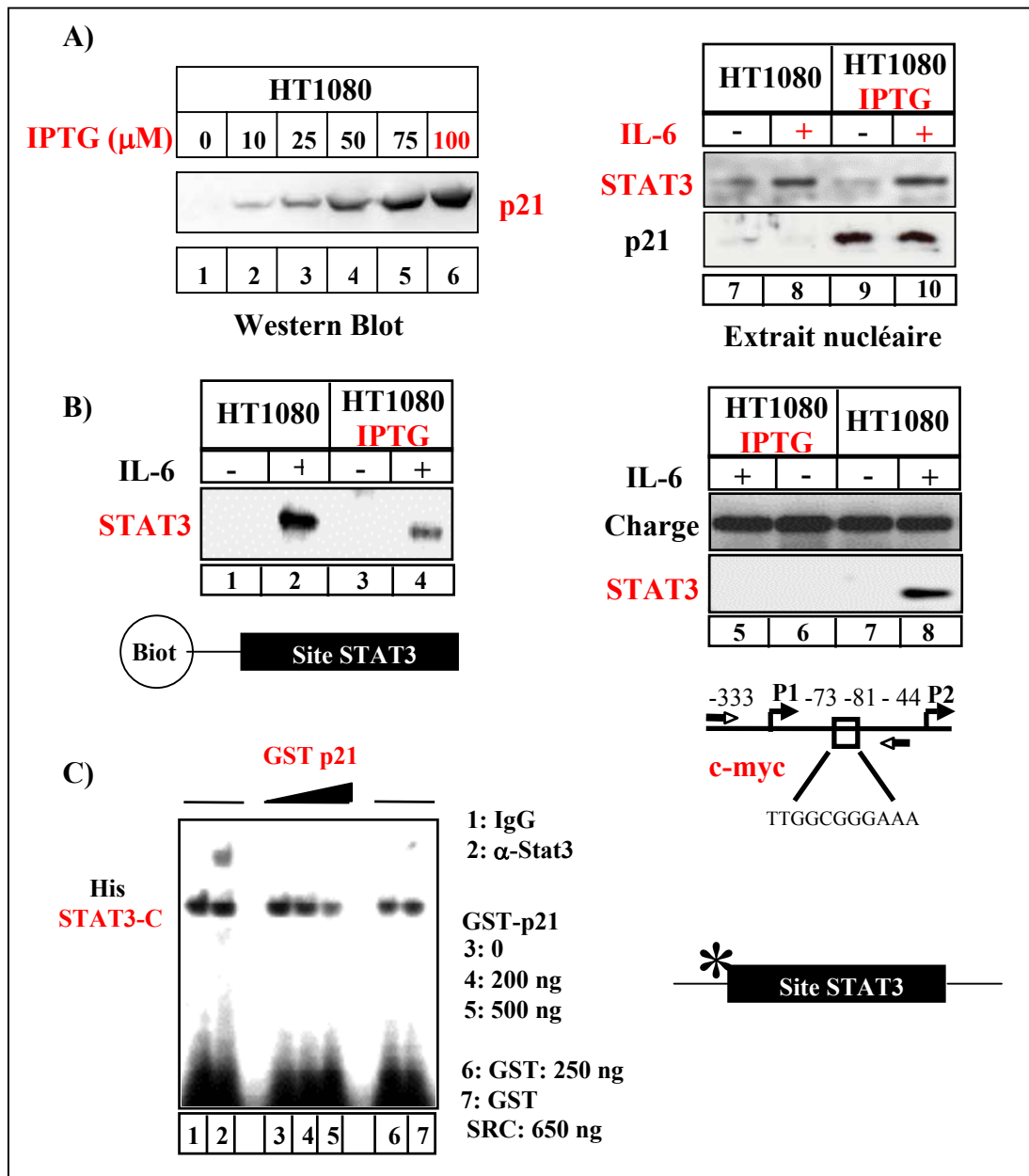
**Figure 30 : p21 inhibe l'activité basale d'un gène rapporteur**

- A. Les cellules HT1080 sont transfectées avec 500ng de vecteur contenant le promoteur Gal4 fusionné au gène de la luciférase en présence ou en absence d'un vecteur d'expression codant la protéine de fusion Gal4p21 ou Gal4cycline D1 en contrôle. Des extraits cytoplasmiques sont réalisés 24heures après et analysés pour leur activité luciférase. La moyenne de quatre transfections est montrée. La fonctionnalité de la protéine Gal4p21 est testée dans une expérience de gène rapporteur utilisant le protocole décrit dans la figure 29A.
- B. Les cellules HepG2 sont transfectées avec 500ng de vecteur contenant le promoteur Gal4 fusionné au gène de la luciférase en présence ou en absence d'un vecteur d'expression codant la protéine de fusion Gal4p21 ou Gal4cycline D1 en contrôle. Des extraits cytoplasmiques sont réalisés 24heures après et analysés pour leur activité luciférase. La moyenne de quatre transfections est montrée. La fonctionnalité de la protéine Gal4p21 est testée dans une expérience de gène rapporteur utilisant le protocole décrit dans la figure 29A.

Des expériences de gène rapporteur utilisant un vecteur contenant les séquences de fixation à Gal4 fusionnées au gène de la luciférase, et un vecteur codant la protéine de fusion entre le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 et la protéine p21, ont été réalisées. L'expression de Gal4 p21 induit une répression du gène rapporteur dans les deux types cellulaires étudiés HT1080 et HepG2 (figure 30A-B). Ces expériences confirment ainsi le rôle de p21 comme inhibiteur général de la transcription.

#### **4) Une forte expression de p21 inhibe la liaison à l'ADN de STAT3**

Les premières expériences effectuées à l'aide du modèle HT1080 ont été réalisées en induisant l'expression de p21 par 50  $\mu$ M d'IPTG. A cette concentration le gène inductible est induit de manière efficace mais l'expression de p21 n'est cependant pas maximale. Nous avons choisi cette concentration car elle permet d'inhiber la prolifération cellulaire de ces cellules de manière significative (>90% d'inhibition). Nous avons voulu cependant déterminer les effets d'une forte concentration de p21 intracellulaire sur l'activité de STAT3. Pour cela p21 a été induit à l'aide d'une concentration de 100 $\mu$ M d'IPTG. Cette concentration permet une très forte expression de p21 mais n'empêche pas l'activation de STAT3 par l'IL-6 (figure 31A). Dans ces conditions nous montrons que p21 inhibe la liaison de STAT3 à une sonde biotinylée comportant le site de fixation de STAT3. Ces expériences ont été confirmées par des expériences d'immunoprécipitation de chromatine avec un anticorps dirigé contre STAT3. L'induction de p21 empêchait ici le recrutement de STAT3 sur le promoteur de c-myc (figure 31B). Enfin des expériences de gel retard in vitro utilisant une sonde radioactive comportant les sites de fixations de STAT3 montrent que la protéine de fusion GSTp21 inhibe la liaison à l'ADN de la protéine His STAT3-C (forme constitutivement dimérisée de STAT3) (figure 31C). D'après ces expériences, nous concluons qu'en présence d'une concentration importante de p21, la liaison à l'ADN de STAT3 est inhibée. Des expériences de gel-filtration non présentées suggèrent que l'inhibition de la liaison à l'ADN de STAT3 nécessite la présence d'au moins deux protéines p21 sur le dimère de STAT3.

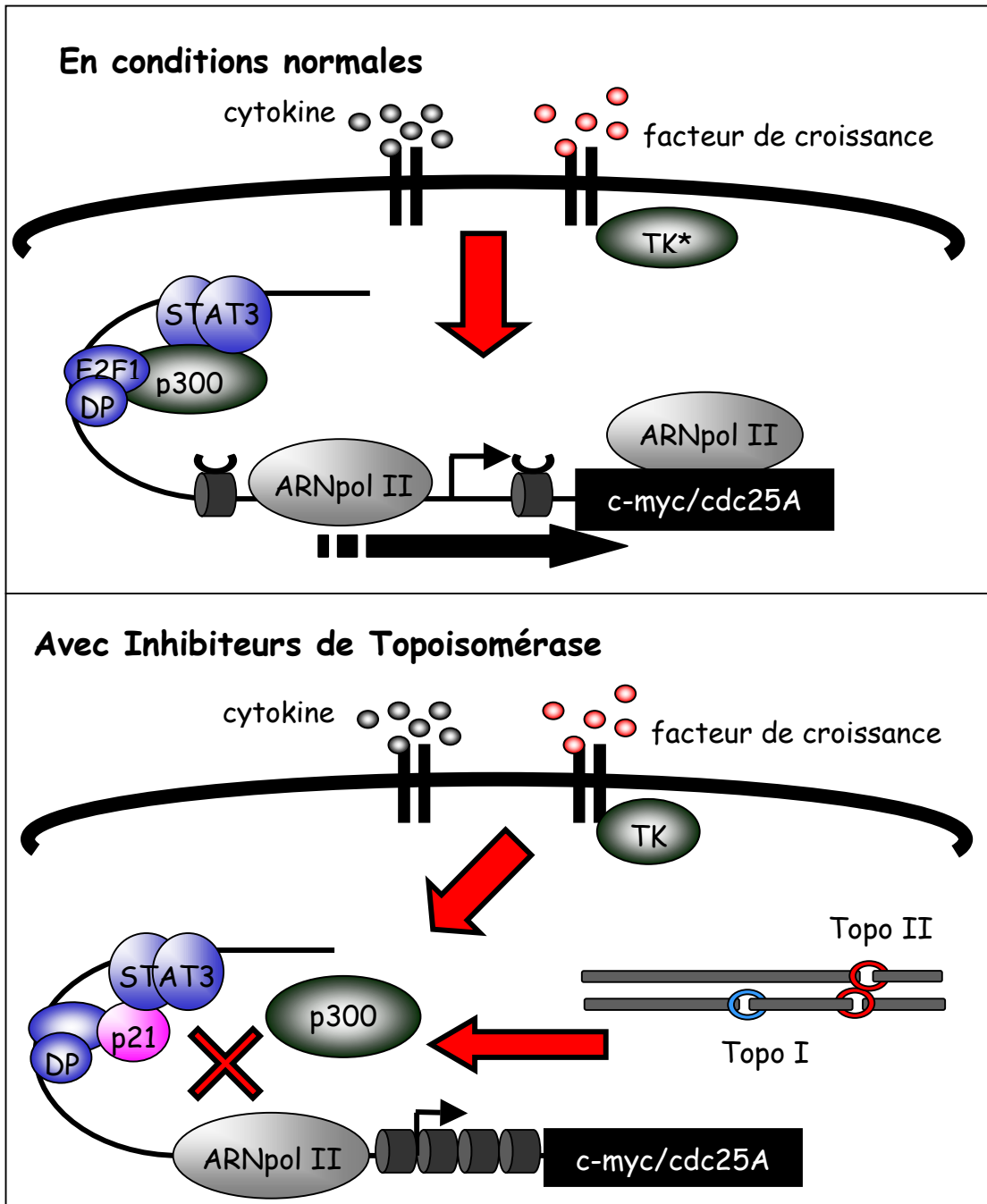


**Figure 31 :** Une forte surexpression de p21 inhibe la liaison à l'ADN de STAT3

- A. Des extraits totaux de cellules HT1080 traitées avec des concentrations croissantes d'IPTG sont réalisés et analysés par western blot avec un anticorps dirigé contre p21 (ligne 1-6). Des extraits nucléaires de cellules HT1080 prétraitées ou non avec 100 $\mu$ M d'IPTG et stimulées ou non 15 minutes à l'IL-6 (20ng/ml) sont analysés par western blot avec des anticorps dirigés contre STAT3 et p21 (ligne 7-10).
- B. Des extraits nucléaires de cellules HT1080 prétraitées ou non avec 100 $\mu$ M d'IPTG et stimulées ou non à l'IL-6(20ng/ml) sont incubés avec une sonde d'ADN biotylée (40pmol) comportant le site consensus de STAT3 (ligne 1-4). La sonde est précipitée avec des billes de streptavidine agarose et soumise ensuite à un western blot dirigé contre STAT3.. Dans un second temps, des cellules HT1080 traitées de la même façon. sont soumises à des expériences d'immunoprécipitation de chromatines avec des anticorps dirigés contre STAT3 sur les séquences de liaison à l'ADN de STAT3 du promoteur de c-myc (ligne5-8).
- C. Des protéines de fusion His STAT3 C (100ng) sont incubées avec une sonde d'ADN radioactive (10pg) en présence ou en absence de protéines GSTp21 ou GST SRC. La liaison à l'ADN de His STAT3-C est alors testée par gel retard (ligne 3-7). Un supershift de His-STAT3-C est réalisé avec l'addition de 2 $\mu$ g d'anticorps dirigés contre STAT3 (ligne 2).



**Schéma conclusion de la première partie :**



**Figure 32 :** Modèle de régulation de la transcription des gènes de la voie *c-myc cdc25A* par l'inhibiteur du cycle cellulaire p21.

\* : TK : Tyrosine kinase (c-src par exemple)

*Partie 2 : Le complexe STAT3-Rb réprime la  
transcription de cdc25A*

L'activation de c-myc par le facteur de transcription STAT3 est un mécanisme connu depuis longtemps. L'activation de cdc25A par c-myc est nécessaire à l'initiation de la réplication par ce facteur de transcription. Ainsi de façon indirecte STAT3 est impliqué dans l'activation de cdc25A et de la réplication. Nous avons souhaité déterminer si STAT3 pouvait avoir un rôle plus direct sur la régulation de cdc25A. Afin d'étudier ce rôle nous avons analysé le rôle de STAT3 dans un cadre d'activation classique par l'IL-6 et lors de son activation par un stress oxydatif induisant également des cassures de l'ADN.

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé un modèle cellulaire d'hépatocarcinome HepG2. Nous avons montré dans un premier temps par des expériences d'immunoprécipitation de chromatine que les facteurs de transcription STAT3 et c-myc sont recrutés sur le promoteur de cdc25A après une stimulation à l'IL-6. Ce recrutement est associé à une activation de cdc25A, activation détectée par RT-PCR et Western Blot. D'un point de vue cinétique, on peut noter le recrutement de STAT3 de manière précoce sur le gène tandis que celui de c-myc est plus tardif nécessitant vraisemblablement l'augmentation de son expression en réponse à l'IL-6 et STAT3.

Nous avons ensuite utilisé un modèle de cellules colorectales LS174T possédant un vecteur stable inductible à la tétracycline et codant pour des ARN interférents dirigés contre c-myc. L'induction du vecteur empêche l'activation de cdc25A par l'IL-6 et STAT3, ce qui confirme le rôle essentiel du facteur de transcription c-myc pour l'activation de cdc25A par STAT3. Avec le même modèle nous avons ensuite déterminé par des expériences d'immunoprécipitation de chromatine quels étaient les cofacteurs recrutés respectivement par STAT3 et le complexe STAT3 c-myc. Ces expériences nous ont ainsi permis de montrer que c-myc est indispensable au recrutement de la kinase cdk9 et de l'ARN polymérase de type II.

Dans un second temps, nous avons voulu étudier le rôle de STAT3 sur le promoteur de cdc25A en réponse au stress oxydatif. Ce stress active STAT3 et induit des dommages de l'ADN. Dans des cellules HepG2 en croissance, le stress oxydatif induit la translocation nucléaire de STAT3 et sa liaison au promoteur de cdc25A, résultat observé grâce à des expériences de Western Blot et d'immunoprécipitation de chromatide. Le stress oxydatif induit également la liaison de la protéine Rb au promoteur de cdc25A. Le recrutement de STAT3 et de Rb dans ces conditions n'induit pas une activation de cdc25A mais au contraire réprime la transcription du gène et l'expression de la protéine. La liaison de STAT3 et de Rb sur le promoteur de cdc25A s'oppose au recrutement de c-myc, expliquant la répression observée du gène cdc25A.

Des expériences de d'immunoprécipitation de chromatine et de RT-PCR ont ensuite été réalisées dans des cellules d'ostéosarcomes Saos-2. Ces cellules n'expriment pas naturellement la protéine Rb et des expériences de RT-PCR montrent que l'expression de Rb dans ces cellules grâce à un vecteur exogène est absolument nécessaire à l'inhibition de cdc25A lors d'un stress oxydatif. Cette inhibition est une nouvelle fois associée au recrutement de Rb et de STAT3 sur le promoteur de cdc25A.

Finalement des expériences d'immunoprécipitation de chromatine en présence d'un dominant négatif de STAT3 et des expériences de pull down nous ont permis de mettre en évidence une interaction directe entre le domaine c-terminal et Rb. Ce domaine est nécessaire au recrutement de Rb sur la chromatine par STAT3 et à l'inhibition de cdc25A

En résumé, nous avons montré que STAT3 est un régulateur transcriptionnel de cdc25A. L'interaction fonctionnelle entre STAT3 et c-myc permet l'activation de cdc25A tandis que l'interaction physique et fonctionnelle entre STAT3 et Rb permet l'inhibition du gène. Ainsi, la régulation de STAT3 sur le gène de cdc25A par Rb et c-myc est susceptible de réguler la prolifération des cellules soumises à un stress oxydatif ou aux cytokiniques de la famille de l'IL-6. Ces deux phénomènes sont vraisemblablement importants pour la progression tumorale et pour la thérapie, en particulier celle du colon. L'IL-6 peut être à l'origine de la prolifération observée au sein de ces tumeurs (363) tandis que le stress oxydatif est une constante retrouvée dans tous les tissus tumoraux. Finalement, les agents de chimiothérapie et la radiothérapie sont également générateurs de stress oxydatifs. Ainsi la perturbation de ces mécanismes pourrait participer au développement tumoral et à l'inefficacité des thérapies. Les résultats présentés en figure supplémentaire suggèrent ainsi que l'activation oncogénique de STAT3 empêche la répression de cdc25A et l'inhibition de la prolifération induite par un stress oxydatif. Ces différents résultats sont schématisés figure 34.

## The STAT3 Transcription Factor Is a Target for the Myc and Riboblastoma Proteins on the *Cdc25A* Promoter\*

Received for publication, November 23, 2004, and in revised form, January 24, 2005  
Published, JBC Papers in Press, January 26, 2005, DOI 10.1074/jbc.M413203200

Benjamin Barré, Arnaud Vigneron, and Olivier Coqueret‡

From the INSERM U564, Cancer Center Paul Papin, 49033 Angers, France

The STAT3 (signal transducer and activator of transcription) transcription factor functions as downstream effector of growth factor signaling. Whereas STAT3 activation is transient in normal cells, constitutively activated forms of the transcription factor have been detected in several cancer cell lines and primary tumors. Through the up-regulation of cell cycle and survival genes, STAT3 plays important roles in cell growth, anti-apoptosis, and cell transformation yet the molecular basis for this behavior is poorly understood. In this study, we show that STAT3 and its transcriptional cofactors are recruited to the promoter of the *Cdc25A* gene to activate its expression. Using chromatin immunoprecipitations, we observed that Myc is recruited to this promoter following STAT3 DNA binding. Moreover, small interfering RNA-mediated knockdown of Myc specifically inhibits the STAT3-mediated activation of *Cdc25A*. Reduction in Myc protein level results in defective recruitment of the CREB-binding protein, Cdk9, and RNA polymerase complexes, indicating that Myc is necessary for STAT3 transcription. Surprisingly, the association of STAT3 with the *Cdc25A* promoter does not necessarily lead to transcriptional induction because this protein also functions as a transcriptional repressor of the *Cdc25A* gene. Following hydrogen peroxide stimulation, STAT3 forms a repressor complex with the retinoblastoma (Rb) tumor suppressor to occupy the *Cdc25A* promoter and block its induction. In coimmunoprecipitations and ChIP experiments, Rb was found to associate with STAT3 on DNA and we provide evidence that Rb binds directly to the transcription factor. Thus, we propose that Myc and STAT3 cooperate to induce the expression of *Cdc25A* and that their transcriptional activity is normally regulated by the Rb tumor suppressor gene.

Cell cycle progression relies on the activation of cyclins and cyclin-dependent kinases (Cdk),<sup>1</sup> which successively act in G<sub>1</sub> to initiate S phase and in G<sub>2</sub> to initiate mitosis. Two classes of

cyclins get activated during the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle, D-type cyclins and cyclin E that assemble with their catalytic partner (Cdk4 or Cdk6 for cyclin D and Cdk2 for cyclin E) (1, 2). Active cyclin/Cdk complexes phosphorylate members of the pocket protein family (Rb, p107, and p130) to release and activate the E2F transcription factor and induce cell cycle progression. Cyclin/Cdk complexes are inhibited by phosphorylation at two sites (Thr-14 and Tyr-15 in Cdk2) that are dephosphorylated by members of the Cdc25 phosphatase family. There are three members of this family designated Cdc25A, Cdc25B, and Cdc25C that can be distinguished by their activity throughout the cell cycle and that positively regulate cell cycle progression by activating successive Cdks. Whereas Cdc25B or Cdc25C regulates the G<sub>2</sub>-M transition through Cdk1 dephosphorylation, Cdc25A mainly activates Cdk2 and induces progression from G<sub>1</sub> to S phase (3). Microinjection of Cdc25A antibodies arrests cells prior to S phase, whereas ectopic expression of the phosphatase shortens the G<sub>1</sub> phase and accelerates cell cycle progression. Further confirming these functions, Cdc25A has been described as an oncogene because the protein is overexpressed in a wide variety of tumors and cooperates with Ras to induce cell transformation and tumors in mice (4, 5).

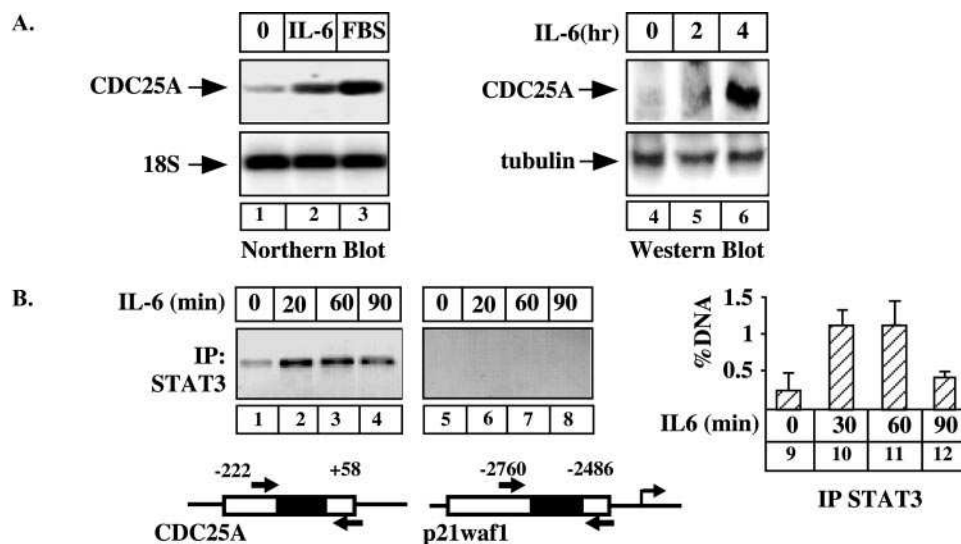
Following mitogen stimulation of quiescent cells, Cdc25A gets activated by E2F but also by other DNA-binding proteins involved in cell cycle progression such as STAT3. STAT proteins are a family of transcription factors that are normally inactive within the cytoplasm and that accumulate in the nucleus upon growth factor stimulation. Whereas STAT3 activation is transient in normal cells, the transcription factor is persistently activated in a large number of tumors as a consequence of aberrant growth factor or tyrosine kinase signaling (6–9). *In vivo*, it has been recently suggested that the transcription factor plays an important role in epithelial carcinogenesis because STAT3-deficient mice are resistant to skin tumor (10). In addition, a constitutively active form of the transcription factor induces cell transformation of human breast epithelial cells and rodent fibroblasts (11, 12). Through a combined inhibition of apoptosis and activation of cell cycle progression, this protein is believed to play a critical role in cell oncogenesis (8, 12–15). The transcription factor activates several genes involved in cell cycle progression such as *fos*, *cyclin D*, or *myc*. It up-regulates anti-apoptotic genes such as *Bcl-2* and *Bcl-XL* (12–14, 16, 17), and it also induces the expression of genes involved in invasion and metastasis such as the matrix metalloproteinase-9 (11). Using the *p21waf1* and *myc* genes as a model, we have recently shown that STAT3 recruits histone acetyltransferases such as NCoA1/SRC-1a or CBP. In addition, it also associates with BRG1, the ATPase subunit of the SWI/

riboblastoma; GST, glutathione S-transferase; ChIP, chromatin immunoprecipitation assay.

\* This work was supported by a fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie (to B. B.) and by a fellowship (to A. V.) and a grant from the Ligue Pour la Recherche Sur le Cancer, Comité Départemental de Maine et Loire. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ To whom correspondence should be addressed: Centre Régional de Lutte Contre le Cancer Paul Papin, INSERM U564, 2 rue Moll, 49033 Angers, France. Tel.: 33-2-41-35-27-00 (ext. 2564); Fax: 33-2-41-48-31-90; E-mail: olivier.coqueret@univ-angers.fr.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: Cdk, cyclin-dependent kinase; STAT, signal transducers and activators of transcription; RT, reverse transcription; CREB, cAMP-response element-binding protein; CBP, CRB-binding protein; IL, interleukin; ROS, reactive oxygen species; Rb,



**FIG. 1. STAT3 regulates the expression of *Cdc25A*.** *A*, HepG2 cells were serum-starved for 2 days and stimulated with IL-6 (20 ng/ml) or 10% fetal bovine serum (FBS) as indicated. Total RNA was prepared, and 20  $\mu$ g of RNA was subjected to Northern blot analysis using a human cDNA probe (lanes 1–3). The membrane was stripped and reprobed with a 18 S oligonucleotide (18S, bottom panel). In parallel (lanes 4–6), HepG2 cells were serum-starved for 48 h and stimulated with IL-6 (20 ng/ml, lanes 2 and 4) for 15 h. Following stimulation, cell extracts were prepared and *Cdc25A* expression was analyzed by Western blot with polyclonal antibodies directed against the protein. Membranes were stripped, and equal loading was verified using tubulin antibodies. *B*, soluble chromatin was prepared from cells treated with IL-6 or not for as indicated and immunoprecipitated (IP) with STAT3 antibodies. Final DNA extractions were amplified using two pairs of primers that cover either the proximal *Cdc25A* promoter (lanes 1–4) or a distal region of the *p21waf1* promoter (lanes 5–8). In parallel (lanes 9–12), ChIP assays were analyzed by real-time PCR and the percentage of immunoprecipitated DNA was calculated by comparison to input signals. Quantification represents the average of three independent experiments.

SNF chromatin-remodeling complex, and with Cdk9, the elongation kinase of the P-TEFb complex (18–20).

Despite our current understanding (21), the STAT3-mediated regulation of the *Cdc25A* promoter remains to be elucidated. In this study, we have found that STAT3 and its transcriptional cofactors are recruited to the *Cdc25A* promoter upon IL-6 stimulation. Interestingly, this cytokine also induced the association of Myc with this promoter. Moreover, small interfering RNA-mediated down-regulation of Myc prevented the activation of *Cdc25A* by STAT3, suggesting that the two transcription factors synergize to induce the expression of the phosphatase. Surprisingly, we found that the association of STAT3 with the *Cdc25A* promoter does not necessarily lead to transcriptional induction. Whereas cytokine stimulation leads to the activation of the gene, reactive oxygen species (ROS) activate STAT3 DNA binding but down-regulates the expression of *Cdc25A*. Under these conditions, we surprisingly observed that the retinoblastoma protein Rb associates with STAT3 on DNA to form a repressor complex. Thus, we propose that Myc and STAT3 cooperate to induce the expression of *Cdc25A* and that this effect is inhibited by the Rb tumor suppressor gene to prevent cell cycle progression.

#### MATERIALS AND METHODS

**Antibodies**—Polyclonal anti-STAT3 (C20), anti-phospho-STAT3-Tyr705 (B7), anti-CBP (A-22), anti-Rb (C15), c-Myc (N262), anti-Cdk9 (C20), and type II RNA polymerase (N-20) were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Anti- $\alpha$ -tubulin (T9026) was obtained from Sigma.

**Luciferase Assays**—Transient transfections were done using the calcium phosphate precipitation method and repeated at least five times. Cells were plated at a density of  $8 \times 10^4$  in 6-well plates 24 h prior to transfection. After 36–48 h post-transfection, cells were stimulated with 500  $\mu$ M hydrogen peroxide for 6 h and washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline and 300  $\mu$ l of lysis buffer was added (0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.8, 0.1% Triton X-100). Luciferase activity was normalized based on protein concentrations and then measured using a Packard Topcount scintillation counter.

**Immunoprecipitation and Western Blot Analysis**—Immunoprecipitations were performed overnight at 4  $^\circ\text{C}$  with nuclear or whole cell extracts (1–5 mg) in the presence of 1% Nonidet P-40. Cell extracts were precleared with 40  $\mu$ l of protein A-Sepharose (10% slurry in phosphate-

buffered saline) for 2 h at 4  $^\circ\text{C}$ , and cleared extracts were immunoprecipitated with 1  $\mu$ g of the indicated antibodies overnight at 4  $^\circ\text{C}$  followed by the addition of 20  $\mu$ l of protein A-Sepharose for 1 h at 4  $^\circ\text{C}$ . Immunoprecipitates were washed three times in lysis buffer (25 mM HEPES, pH 7.9, 300 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1 mM dithiothreitol) and one time with 20 mM Tris, pH 8, prior to the addition of sample buffer. Following electrotransfer, membranes were analyzed by Western blot with the indicated antibodies diluted in Tris-buffered saline buffer (10 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl). Western blot and luciferase assays were performed as described previously (18). Northern blot were performed with 20  $\mu$ g of RNA using human cDNA probes labeled with [ $^{32}\text{P}$ ]dCTP using the random-priming labeling kit from Amersham Biosciences.

**Pull-down Experiments**—Pull-down reactions were performed by incubating purified histidine, His-STAT3 full length, or His-STAT3<sup>716–770</sup> (200 ng) with purified GST or GST-Rb proteins (200 ng) in binding buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 1% Brij 96). After a 30-min incubation at 4  $^\circ\text{C}$ , the beads were washed once with binding buffer, twice with binding buffer containing 0.5 M NaCl, and once with 20 mM Tris-HCl, pH 8. Samples were then analyzed by Western blot.

**Chromatin Immunoprecipitation Assay (ChIP)**—Cells grown to 60% confluence were serum-starved for 2 days. Following stimulation, cells were washed and then cross-linked with 1% formaldehyde at room temperature for 10 min. Cells were washed sequentially twice with 1 ml of ice-cold phosphate-buffered saline, centrifuged, and then resuspended in 0.5 ml of lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 1  $\mu$ g/ml aprotinin) and sonicated three times for 15 s each. Supernatants then were recovered by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min at 4  $^\circ\text{C}$ , diluted 3–10 times in dilution buffer I (1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1), and subjected to one round of immunoclearing for 2 h at 4  $^\circ\text{C}$  with 2  $\mu$ g of sheared salmon sperm DNA, 2.5  $\mu$ g of preimmune serum, and 20  $\mu$ l of protein A-Sepharose (of 50% slurry). Immunoprecipitation was performed overnight with specific antibodies and then 2  $\mu$ g of sheared salmon sperm DNA and 20  $\mu$ l of protein A-Sepharose (of 50% slurry) were further added for 1 h at 4  $^\circ\text{C}$ . Note that the immunoprecipitations are performed in the presence of 1% Nonidet P-40. Immunoprecipitates were washed sequentially for 10 min each in TSE I (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 150 mM NaCl), TSE II (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 500 mM NaCl), and buffer III (0.25 M LiCl, 1% Nonidet P-40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.1). Bead precipitates then were washed three times with Tris

FIG. 2. Myc is recruited to the *Cdc25A* promoter upon IL-6 stimulation.

A, HepG2 were stimulated as described in the legend to Fig. 1A. mRNA levels were analyzed by RT-PCR with primers specific for the Myc, *Cdc25A*, or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) mRNAs. B, ChIP analysis of the recruitment of Myc on the *Cdc25A* promoter. Soluble chromatin was immunoprecipitated (IP) with Myc antibodies, and DNA samples were amplified using two pairs of primers that cover either the proximal *Cdc25A* promoter (lanes 1–4) or a distal region of the *p21waf1* promoter (lanes 5–8). In parallel (lanes 9–12), ChIP assays were analyzed by real-time PCR as described in Fig. 1B, quantification represents the average of three independent experiments.

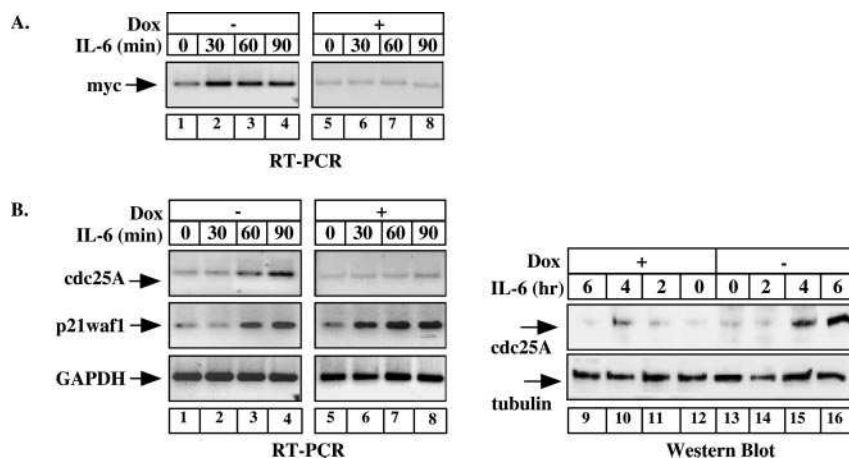
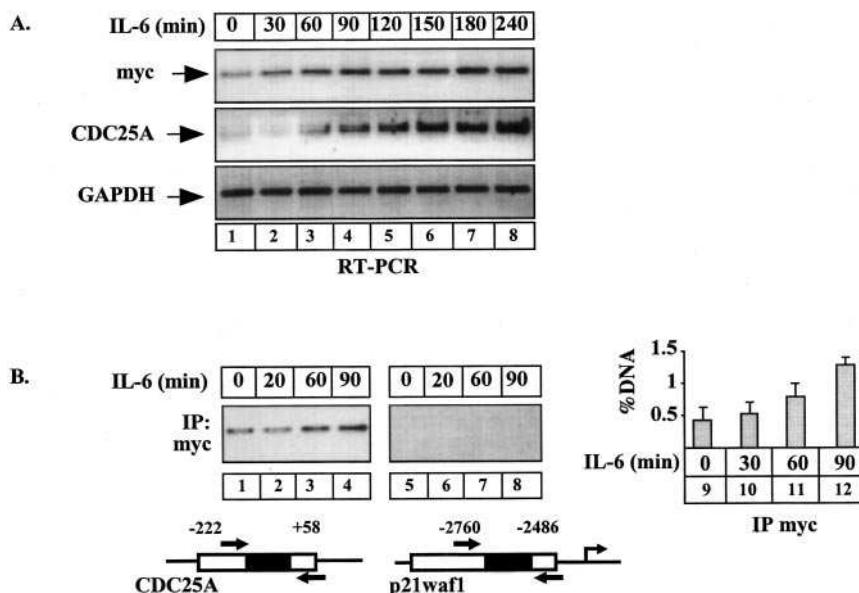


FIG. 3. Myc is essential for the STAT3-mediated activation of *Cdc25A*. A, LS174T cells were serum-starved in the absence (lanes 1–4) or presence of doxycycline (Dox) (lanes 5–8) and then stimulated with IL-6. Myc expression then was analyzed by RT-PCR. B, RT-PCR (lanes 1–8) and Western blot analysis (lanes 9–16) of the expression of *Cdc25A* and *p21waf1* following IL-6 stimulation of cells treated with (lanes 5–12) or without doxycycline (lanes 1–4 and 13–16). *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

borate-EDTA buffer and eluted three times with 1% SDS, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>. Eluates were pooled and heated at 65 °C overnight to reverse the formaldehyde cross-linking. Supernatants then were incubated for 1 h at 45 °C with proteinase K (80 µg each), and DNA was precipitated using classical procedures. 5–10 µl from a 50-µl DNA preparation were used for 25–30 cycles of PCR amplifications. The following primers were used: region –2760/–2486, 5'-TTGTGCCACTGCTGACTTTGTC-3' and 5'-AGCCTGAAGAAGGAGGATGTGAGG-3', of the *p21waf1* promoter; regions –222/–203, 5'-ATTTTGTATCCCCGCTCTTCT-3', and +39/+58, 5'-GAAAACCAAGCCGACCTACA-3', of the *Cdc25A* promoter; regions +29362/+29384, 5'-GAAGACCTGAAGAAGTTCCGCAC-3', and +29541/+29562, 5'-CCCCTCTCCAAATGTCACACAG-3', of the *Cdc25A* promoter.

**Serial ChIP Experiment**—Following immunoprecipitation with the first Rb antibody, beads precipitates were prepared as described above and eluted during 4 h at 4 °C with 500 µl of dilution buffer II (1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 mM NaF, 5–10 µg of a purified GST-Rb fusion protein corresponding to amino acids 379–926). This fusion protein is recognized by the C15 antibody and competes with the endogenous Rb complexes. The supernatants were diluted 1–2 times in dilution buffer I, and immunoprecipitation was done overnight with the second specific antibody. 2 µg of sheared salmon sperm DNA and 20 µl of protein A-Sepharose (of 50% slurry) were further added for 1 h at 4 °C. Immunoprecipitates and beads then were washed as described above, eluates were pooled and heated at 65 °C overnight to reverse the formaldehyde cross-linking, and DNA then was precipitated.

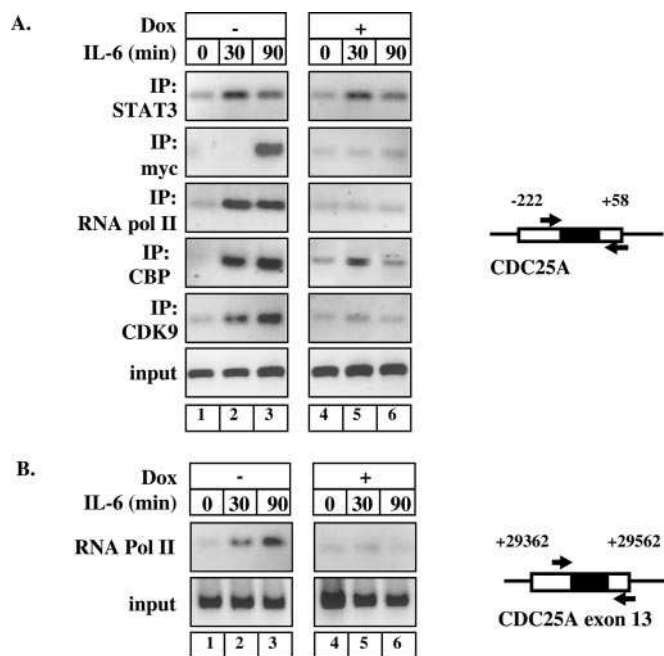
**Real-time PCR**—For ChIP quantification, PCR was performed with 5 µl of DNA and 5 pM primers diluted in a final volume of 5 µl of reaction mixture LightCycler (2239264, Roche Diagnostics GmbH) and 4 mM

MgCl<sub>2</sub>. Accumulation of fluorescent products was monitored by real-time PCR using a LightCycler. Each PCR reaction generated only the expected specific amplicon as shown by the melting temperature profiles of final products (dissociation curve automatically measured by the LightCycler) and by gel electrophoresis of test PCR reactions.

## RESULTS

**STAT3 and Myc Are Recruited to the *Cdc25A* Promoter upon IL-6 Stimulation**—To determine the effect of STAT3 on *Cdc25A*, HepG2 cells were serum-starved and left untreated or stimulated with IL-6 for 4 h. As described previously (21), Northern blot analysis showed that cytokine or serum stimulation induced the expression of the *Cdc25A* mRNA (Fig. 1A, lanes 1–3). In parallel, Western blot analysis also indicated that IL-6 up-regulates the expression of the *Cdc25A* protein (Fig. 1A, lanes 4–6). Because several STAT3 binding sites are located within the *Cdc25A* proximal promoter, ChIP experiments were then performed. As compared with untreated cells, ChIP experiments indicated that STAT3 was recruited to the proximal *Cdc25A* promoter upon IL-6 stimulation (Fig. 1B, lanes 1–4). Using real-time PCR analysis, we found that DNA binding reached a maximum after 30 min and then gradually declined (Fig. 1B, lanes 9–12). As a control of DNA sonication efficiency, PCR analysis did not detect any occupancy of a control region located on the *p21waf1* promoter (Fig. 1B, lanes 5–8).

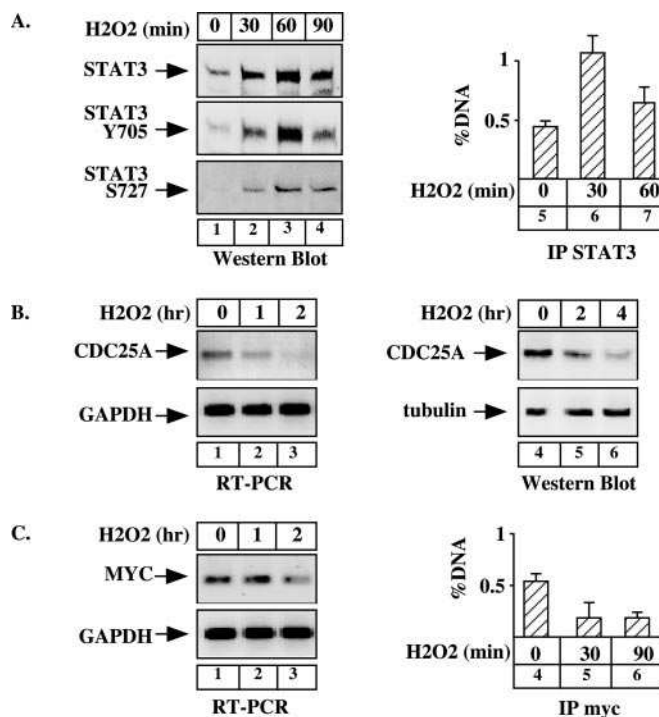
During the course of these experiments, we noticed that Myc



**FIG. 4. Recruitment of STAT3 and its transcriptional coactivators to the *Cdc25A* promoter.** A, soluble chromatin was prepared from cells treated with IL-6 or not for 30–90 min in the absence (lanes 1–3) or presence of doxycycline (Dox) (lanes 4–6) and immunoprecipitated (IP) with the indicated antibodies. Final DNA extractions were amplified using a pair of primers that covers the proximal promoter of *Cdc25A*. B, ChIP analysis of the recruitment of the polymerase on the coding region of the *Cdc25A* gene. DNA was amplified using a pair of primers that covers the exon 13 of *Cdc25A*. pol II, polymerase II.

was also induced by IL-6 and that its mRNA became apparent as early as 30 min after cytokine stimulation. By contrast, the *Cdc25A* mRNA was significantly expressed only after 90–120 min (Fig. 2A, compare middle and top panels). Because Myc binds to the *Cdc25A* promoter to induce its expression (22, 23), this result suggested to us that this transcription factor was involved in the STAT3-mediated activation of *Cdc25A*. Effectively, ChIP experiments indicated that IL-6 induced the association of Myc with the *Cdc25A* promoter (Fig. 2B, lanes 1–4). As a control, PCR analysis did not detect any occupancy of the control region (Fig. 2B, lanes 5–8). Importantly, real-time PCR analysis indicated that Myc DNA binding reached a maximum after 90 min when STAT3 binding and nuclear expression had already declined (compare Figs. 1B and 2B, lanes 9–12). We have been unable to detect any association between STAT3 and Myc, further suggesting that the two proteins are not associated on DNA. Altogether, these results indicate that STAT3 and Myc are both recruited to the *Cdc25A* promoter to induce its activation.

**Myc Is Involved in the STAT3-mediated Activation of *Cdc25A***—We then investigated the effect of Myc knockdown on the IL-6-mediated activation of *Cdc25A*. To this end, we used a doxycycline-inducible expression vector that drives Myc small interfering RNA expression in the LS174T colorectal cell line (24). As expected, IL-6 induced the expression of Myc in this cell line but this effect was inhibited upon the addition of doxycycline (Fig. 3A, lanes 1–8). To evaluate the effect of Myc on the activation of *Cdc25A*, LS174T cells were serum-starved, treated or not with doxycycline, and further stimulated with IL-6. Under these conditions, reverse transcription (RT)-PCR and Western blot analysis indicated that IL-6 had no significant effect on the expression of *Cdc25A* in the absence of Myc (Fig. 3B, lanes 1–8 and 9–16). Importantly, the expression of p21waf1 was slightly enhanced, indicating that the inhibition

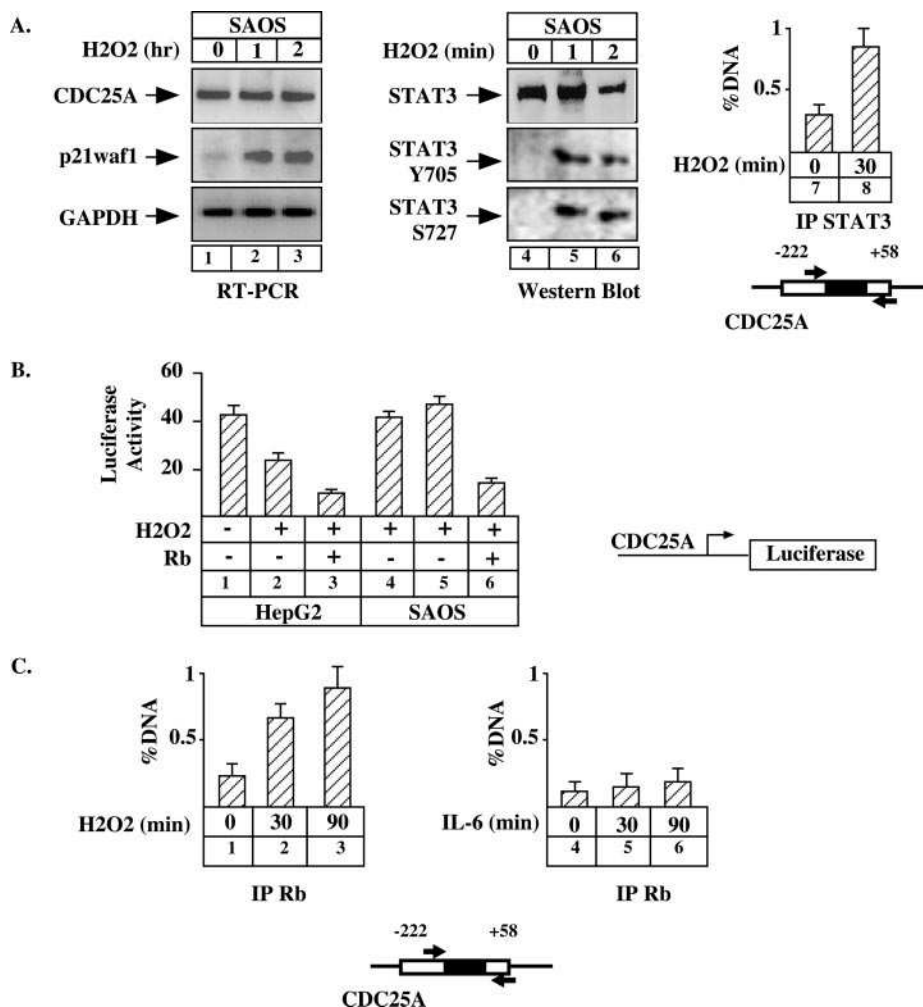


**FIG. 5. Hydrogen peroxide activates STAT3 but represses *Cdc25A*.** A, HepG2 cells were treated for the indicated times with hydrogen peroxide. Nuclear cell extracts were prepared, and the activation of STAT3 was analyzed using antibodies directed against STAT3 or its Tyr-705- and Ser-727-phosphorylated forms as indicated. In parallel (lanes 5–7), the association of STAT3 with the *Cdc25A* promoter was analyzed by ChIP assays and real-time PCR. The percentage of immunoprecipitated (IP) DNA was calculated by comparison to input signals, and quantification represents the average of three independent experiments. B, HepG2 cells were treated for the indicated times with hydrogen peroxide, and mRNA levels were analyzed by RT-PCR with primers specific for the *Cdc25A* or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) genes. In parallel (lanes 4–6), the expression of *Cdc25A* was determined by Western blot analysis using tubulin level as a control. C, the expression of Myc was evaluated by RT-PCR (lanes 1–3) as described above, and ChIP experiments were performed to analyze by real-time PCR the recruitment of Myc to the *Cdc25A* promoter (lanes 4–6).

was specific to the *Cdc25A* gene and confirming that Myc is involved in the down-regulation of the cell cycle inhibitor (Fig. 2B, lanes 1–8, middle panel) (25).

We have previously reported that STAT3 activates its target genes through its association with the CBP coactivator and the recruitment of the RNA polymerase and the Cdk9-elongating kinase (18, 19). To determine whether Myc affects the association of these proteins with the *Cdc25A* promoter, their recruitment was analyzed by ChIP in LS174T cells pretreated or not with doxycycline. In control conditions, STAT3 DNA binding was associated with the recruitment of Myc, CBP, Cdk9, and RNA polymerase II (Fig. 4A, lanes 1–3). As expected, the association of Myc with the *Cdc25A* promoter was inhibited when cells were pretreated with doxycycline (Fig. 4A, lanes 4–6). Whereas Myc down-regulation did not affect STAT3 DNA binding, the association of CBP, Cdk9, and RNA polymerase II with the *Cdc25A* promoter was significantly inhibited (Fig. 4A, lanes 4–6). Moreover, using a pair of primers that covers the exon 13 of the gene, we observed that Myc down-regulation prevented the elongating form of the polymerase from reaching the 3' region of the gene (Fig. 4B, compare lanes 1–3 and 4–6). In each condition, no occupancy of a control region of the promoter was observed (data not shown). Taken together, these results suggest that the binding of Myc to the *Cdc25A* promoter is necessary for STAT3 to induce the activation of this gene.





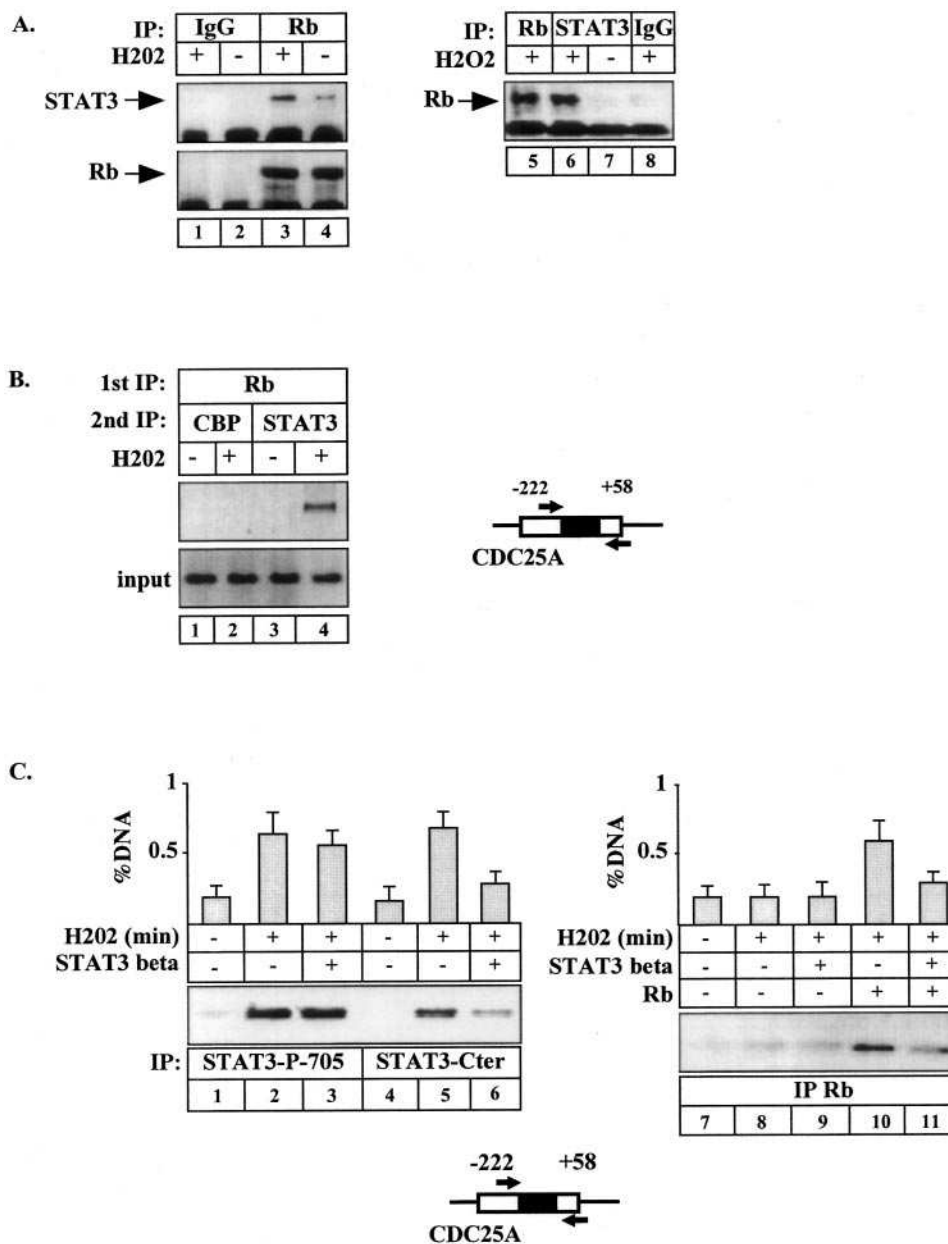
**FIG. 6. Rb is recruited to the *Cdc25A* promoter upon oxidative stress.** *A*, Saos-2 cells were treated for the indicated times with hydrogen peroxide, and the *Cdc25A*, p21waf1, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) mRNA levels were analyzed by RT-PCR (lanes 1–3). The activation of STAT3 was analyzed by Western blot using antibodies directed against STAT3 or its Tyr-705- and Ser-727-phosphorylated forms (lanes 4–6). In parallel, the recruitment of STAT3 to the *Cdc25A* promoter was analyzed by ChIP (lanes 7–8). *B*, cells were transfected with 500 ng of a vector encoding the *Cdc25A* promoter linked to a luciferase reporter gene in the presence or absence of a Rb expression plasmid as indicated. Following 48 h, cells were treated with hydrogen peroxide for 6 h and cytoplasmic extracts were prepared and processed to measure luciferase activity. The mean of five transfections  $\pm$  S.D. is shown. *C*, ChIP analysis of the recruitment of Rb on the proximal promoter of the *Cdc25A* gene after hydrogen peroxide treatment (lanes 1–3) or IL-6 stimulation (lanes 4–6). Results were analyzed by real-time PCR as described above and represents the average of three independent experiments. *IP*, immunoprecipitation.

**STAT3 Does Not Activate the *Cdc25A* Gene upon Oxidative Stress**—To extend our results, we then determined whether the STAT3-mediated activation of *Cdc25A* was only related to IL-6 stimulation or whether this effect could also be observed with other signaling pathways that induce STAT3 activation. Besides cytokines and growth factors, ROS also function as signal transducers in several systems and can also trigger STAT3 phosphorylation and nuclear translocation (26, 27). To determine whether the transcription factor activates *Cdc25A* upon oxidative stress, asynchronously growing HepG2 cells were treated with hydrogen peroxide, nuclear extracts were prepared, and STAT3 activation was analyzed. As expected, ROS induced the nuclear translocation of STAT3 and its phosphorylation on the Tyr-705 and Ser-727 residues (Fig. 5A, lanes 1–4). Moreover, ChIP experiments and real-time PCR analysis indicated that STAT3 binds to the *Cdc25A* promoter upon ROS stimulation (Fig. 5A, lanes 5–7). However, opposite to the effect of IL-6, we surprisingly observed that hydrogen peroxide induced a down-regulation of the *Cdc25A* mRNA and protein (Fig. 5B, lanes 1–3 and 4–6). Because Myc is involved in the regulation of *Cdc25A*, we also characterized the effect of ROS on its expression. As expected, Myc was expressed in growing cells but its mRNA was down-regulated by hydrogen peroxide (Fig. 5C, lanes 1–3). Consequently, ChIP experiments indicated that Myc was not associated with the *Cdc25A* proximal promoter upon oxidative stress (Fig. 5C, lanes 4–6). Thus, we concluded from these results that the binding of STAT3 to the *Cdc25A* promoter does not necessarily lead to transcriptional activation.

**Rb Is Recruited to the *Cdc25A* Promoter to Down-regulate Its Expression**—During the course of these experiments, we were

able to confirm the effect of IL-6 or ROS on *Cdc25A* expression in several cell lines such as glioblastoma or colorectal cancer cells (data not shown). However, we noticed that oxidative stress did not inhibit the expression of *Cdc25A* in human osteosarcoma Saos-2 cells (Fig. 6A, lanes 1–3). Importantly, ROS stimulation induced the phosphorylation of STAT3 and its recruitment to the proximal *Cdc25A* promoter in this cell line (Fig. 6A, lanes 4–6 and 7–8). Moreover, p21waf1 was induced as expected under these conditions, indicating that this effect was specific to the *Cdc25A* gene (Fig. 6A, lanes 1–3, bottom panel).

Because Saos-2 cells lack a functional Rb protein, these results suggested to us that Rb might be involved in the down-regulation of the *Cdc25A* promoter. To verify this finding, HepG2 or Saos-2 cells were cotransfected with a reporter construct containing the *Cdc25A* promoter (28) in the presence or absence of a vector expressing Rb. Following transfection, cells were treated or not with hydrogen peroxide for 8 h and luciferase activity was measured on cytoplasmic extracts. In HepG2 cells, ROS induced a 2-fold decrease in reporter gene activity, which was further repressed in the presence of Rb (Fig. 6B, lanes 1–3). Interestingly, when hydrogen peroxide was added to Saos-2 cells, no repression of the *Cdc25A* promoter was observed. By contrast, a significant down-regulation of reporter gene activity was noticed in the presence of Rb (Fig. 6B, lanes 4–6). ChIP experiments then were performed to determine whether this protein is associated with the proximal *Cdc25A* promoter upon oxidative stress. Effectively, real-time PCR analysis indicated that Rb was recruited to DNA when HepG2 cells were treated with hydrogen peroxide. Importantly, this

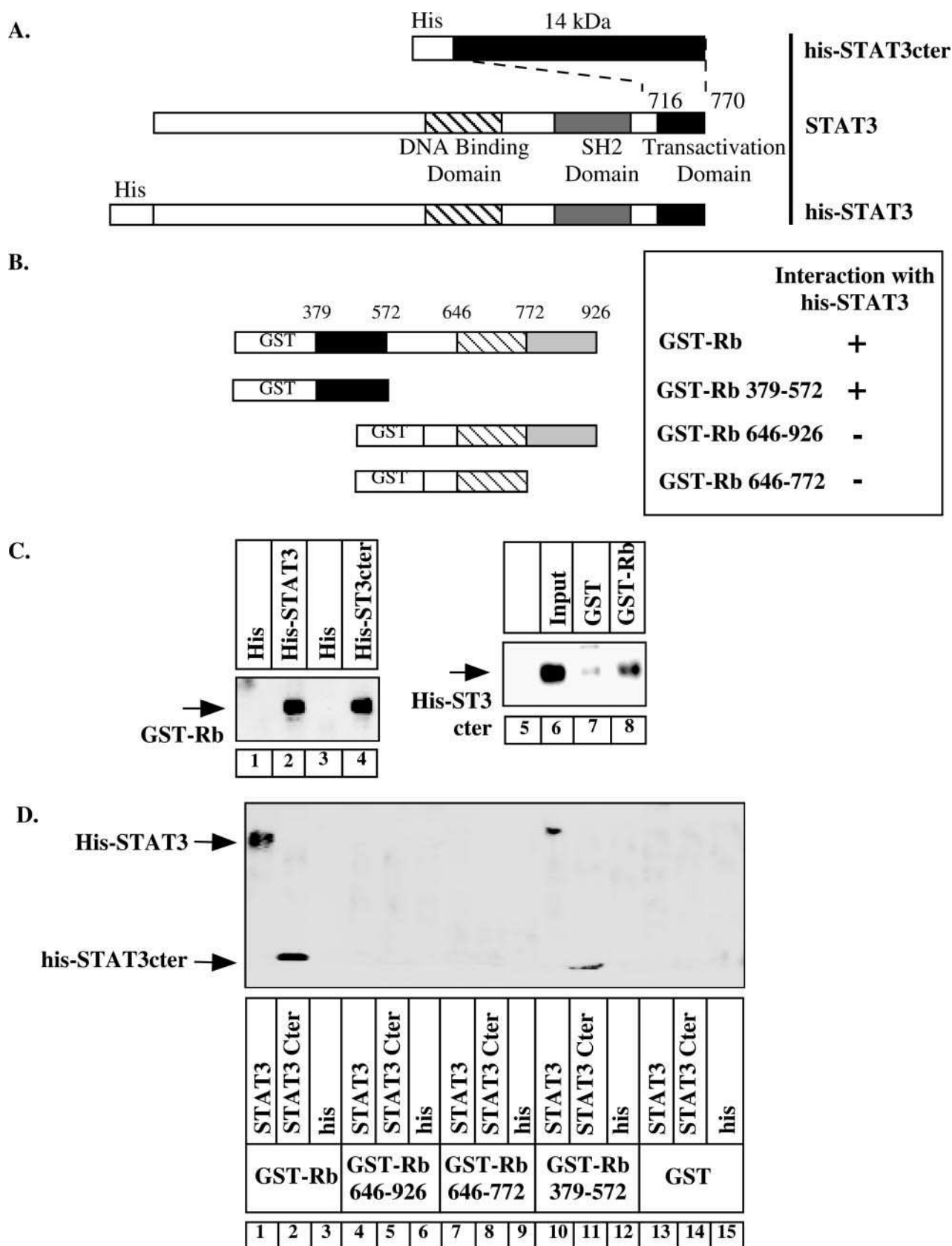


**FIG. 7. Rb is recruited by STAT3 to the *Cdc25A* promoter.** *A*, HepG2 cells were treated with hydrogen peroxide for 30 min or left untreated. Nuclear cell extracts were immunoprecipitated (IP) with polyclonal antibodies directed against Rb proteins (lanes 3–4) or a control serum (lanes 1–2). Samples then were separated by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose filter, and probed with polyclonal antibodies directed against STAT3 proteins (lanes 1–4, top panel) or Rb (lanes 1–4, bottom panel). Reciprocal immunoprecipitations were performed with polyclonal antibodies directed against Rb (lane 5), STAT3 proteins (lanes 6–7), or a control serum (lane 8) followed by membranes blotting with polyclonal antibodies directed against Rb (lanes 5–8). Note that the lower bands correspond to the IgG signal. *B*, soluble chromatin was prepared from HepG2 cells treated or not with hydrogen peroxide for 30 min and immunoprecipitated (1st IP and 2nd IP) with the indicated antibodies. The final DNA extractions were amplified using a pair of primer that covers the proximal *Cdc25A* promoter. *C*, Saos-2 cells were transfected with vectors encoding Rb or STAT3- $\beta$  expression vectors as indicated. Following 48 h, cells were treated with hydrogen peroxide for 30 min and soluble chromatin was prepared and immunoprecipitated with STAT3 (lanes 1–6) or Rb antibodies (lanes 7–11). STAT3 antibodies were either directed against the tyrosine-phosphorylated form of the protein (lanes 1–3) and hence recognized STAT3 and STAT3- $\beta$  or directed against the C-terminal (Cter) domain of the transcription factor (lanes 4–6) and recognized only STAT3. Results were analyzed by real-time PCR as described above and represent the average of three independent experiments.

effect was not observed when cells were stimulated with IL-6, suggesting that the binding of Rb to the *Cdc25A* promoter is ROS-specific (Fig. 6C, compare lanes 1–3 and 4–6). Taken together, these results indicate that Rb is recruited to the *Cdc25A* promoter to repress its activity upon oxidative stress.

**Rb Interacts with STAT3 on the *Cdc25A* Promoter**—Because Rb associates with several DNA-binding proteins, we asked whether the tumor suppressor interacts with STAT3 upon ROS stimulation. To this end, HepG2 cells were treated with hydrogen peroxide, nuclear extracts were recovered, and coimmuno-

precipitations were performed using polyclonal antibodies directed against Rb or STAT3. In each condition, the endogenous proteins were found to coimmunoprecipitate upon hydrogen peroxide stimulation (Fig. 7A, lanes 3–4 and 6–7). To determine whether the two proteins are associated on DNA, a serial ChIP experiment then was performed. To do this, the soluble chromatin was immunoprecipitated with Rb antibodies (Fig. 7, 1st IP), the immune complexes were released, and the chromatin was further divided into two aliquots and reimmunoprecipitated with CBP or STAT3 antibodies (2nd IP). Under these



**FIG. 8. Rb interacts directly with STAT3.** *A* and *B*, schematic representation of the various fusion proteins used in the pull-down experiments and their interaction with His-STAT3. *C*, purified GST-Rb proteins (50 ng) were incubated with histidine, His-tagged STAT3 C-terminal domain (STAT3ctcr), or the constitutively activated form of STAT3 (His-STAT3) immobilized on nickel-agarose beads (100 ng). Samples then were separated on polyacrylamide gels, and Rb binding was detected by Western blot using anti-Rb polyclonal antibodies (lane 1–4). His-tagged STAT3 fusion proteins corresponding to the activation domain of STAT3 (His-STAT3ctcr, 100 ng) were tested for binding to GST or to GST-Rb (50 ng) immobilized on Sepharose beads (lanes 5–8). Samples were then separated on polyacrylamide gels, and STAT3 binding was detected by Western blot using anti-STAT3 polyclonal antibodies (lanes 5–8). *D*, the binding of his-STAT3 or His-STAT3ctcr was tested by pull-down experiments using various fragments of Rb immobilized on Sepharose beads as described in *C*.

conditions, STAT3 antibodies were able to immunoprecipitate the *Cdc25A* promoter, whereas this was not the case with the CBP antibody (Fig. 7B, lanes 1–4). In each condition, PCR analysis did not detect any occupancy of a control DNA region (data not shown).

To extend this result, we made use of a dominant negative form of STAT3, STAT3 $\beta$ , a splice variant that functions in a competitive manner to block STAT3 DNA binding (13, 29, 30). Transient transfectants of Saos-2 cells were generated, and ChIP experiments were conducted to determine whether the inhibition of STAT3 DNA binding also prevents the association of Rb with DNA. As expected, we observed that STAT3 $\beta$  prevents the association of the endogenous STAT3 with the *Cdc25A* promoter upon ROS stimulation (Fig. 7C, lanes 4–6). Note that two different antibodies were used. One (lanes 1–3) is directed against the tyrosine-phosphorylated form of STAT3 and recognizes both STAT3 and STAT3 $\beta$ , and the second (lanes 4–6) binds to the activation domain of STAT3 and does not recognize STAT3 $\beta$ . Confirming the above results, ROS induced the association of transfected Rb with the *Cdc25A* promoter upon ROS stimulation of Saos-2 cells. However, this binding was significantly inhibited in the presence of STAT3 $\beta$  (Fig. 7C, lanes 10–11).

We then investigated which domain(s) in Rb mediated the interaction with STAT3. To this end, pull-down experiments were performed using various forms of GST-Rb or His-STAT3 proteins expressed in bacteria (Fig. 8, A and B). Results indicated that GST-Rb interacts with His-STAT3 and C-terminal His-STAT3 but not with histidine alone (Fig. 8C, lanes 2 and 4). Additionally, His-STAT3Cter interacts with GST-Rb but not with GST alone (Fig. 8C, lanes 7–8). Using various fragments of Rb, we also observed that STAT3 did not interact with amino acids 646–926 of GST-Rb or with the 646–772 fragment. By contrast, the transcription factor was able to bind to amino acids 379–572 of Rb (Fig. 8D, lanes 10–12). Taken together, these results suggest that Rb binds directly to STAT3 and is recruited by the transcription factor to the *Cdc25A* promoter to repress its expression.

#### DISCUSSION

The results presented in this study extend the functions of STAT3 and indicate that Myc and Rb regulate the activity of the transcription factor. We have found that STAT3 cooperates with Myc to induce the expression of *Cdc25A* and that the association of Myc with the phosphatase promoter is necessary for STAT3 to activate this gene. Importantly, STAT3 is probably not directly involved in the recruitment of Myc because the association of this transcription factor with the *Cdc25A* promoter is maximal when STAT3 DNA binding starts to decline. Moreover, we were not able to detect any association between the two transcription factors. Although the two proteins did not interact, RNA interference experiments clearly indicate that Myc activation is an essential step in the STAT3-*Cdc25A* pathway. Therefore, further experiments are needed to understand the molecular mechanisms by which Myc regulates the transcriptional activity of STAT3 on the *Cdc25A* promoter. On the cyclin D2 promoter, recent results have reported that Myc is probably not involved in the formation of the preinitiation complex containing the RNA polymerase and the TFIID/TFIIB complexes (31). In our hands, we also observed that the CBP and RNA polymerase proteins were recruited by STAT3 before Myc DNA binding, suggesting that this protein is not involved in the initial steps of the preinitiation complex loading. Interestingly, it has been reported that Myc is necessary for the loading of TFIID, Cdk9, and mediator complexes on its target promoters (31, 32). In addition, Myc interacts with the TIP60 histone acetyltransferase and with the INI1 subunit of the

SWI/SNF complex (32–34). Therefore, one potential explanation is that the STAT3-CBP complex might be involved in the loading of the RNA polymerase on the *Cdc25A* promoter, whereas Myc may confer a permissive state on chromatin, allowing the recruitment of the P-TEFb complex and transcriptional elongation. In line with this hypothesis, we have recently shown that STAT3 regulates chromatin remodeling and transcriptional elongation through its interaction with BRG1 and Cdk9 (19).

These results also indicate that STAT3 may function not only as a transcriptional coactivator but also as a transcriptional repressor when associated with the Rb tumor suppressor gene. The interaction between STAT3 and Rb is probably not only induced by ROS stimulation but also by other signaling pathways that relies on STAT3 to repress cell proliferation. For instance, oncostatin M, an interleukin-6 family cytokine, inhibits cell cycle progression through STAT3 activation, yet the molecular basis for this behavior remains to be characterized. It will be interesting to determine whether this cytokine induces the association between Rb and STAT3 to repress the expression of cell cycle genes. It is well known that Rb is associated with proteins such as histone deacetylases or methyltransferases to repress the E2F family of transcription factors (35). Thus, these corepressors are probably also recruited by Rb to the STAT3-dependent promoters and one hypothesis would be that Rb prevents STAT3 activity by recruiting remodeling factors such as HDAC1, DNMT1, and members of the SWI/SNF complex (36–38). This would lead to transcriptional repression of STAT3 target genes, thereby inhibiting the effect of the oncogene on cell proliferation. Because the capacity of Rb to repress transcription is a function of its phosphorylation state, these observations also raise the interesting hypothesis that its interaction with STAT3 might be regulated by cyclin/Cdk and that it could fluctuate during cell cycle progression. Because STAT3 is present in the nucleus in early G<sub>1</sub> and since we have previously shown that the transcription factor interacts with cyclin D1 (39), we speculate that Cdk4 and not Cdk2 might regulate the interaction between these two proteins.

Besides their normal functions, the STAT3 and Myc transcription factors play an important role in tumorigenesis (10, 12, 40). Myc has already been reported to cooperate with an activated Ras allele in cell transformation (41, 42), and our results indicate that this protein might also cooperate with the STAT3 oncogene. Although previous results have already reported that Myc is required for the transforming activity of STAT3 (43), it remains to be determined whether there is a significant overlap between the set of target genes activated by the two transcription factors. A comprehensive analysis of their common targets should give insights into the genes that are necessary for the two proteins to induce cell transformation, and our results already suggest that *Cdc25A* is one of these important targets. Therefore, we propose that the STAT3-Myc oncogenic pathway induces the expression of *Cdc25A* to allow cell transformation and that this is normally controlled by the Rb tumor suppressor gene. This result extends previous studies by our laboratory and others (44, 45), showing that both p53 and p21waf1 prevent STAT3 activation. This leads us to propose a model by which the two main tumor suppressor pathways, p53 and INK4, prevent the effect of STAT3 and Myc on cell transformation through the activation of p21 and Rb. The frequent inactivations of p53 or Rb observed in cancer cells might therefore not only induce cell cycle progression but also favor STAT3 transcriptional activity toward the activation of growth-promoting genes such as *Cdc25A*.

*Acknowledgments*—We thank H. Clevers for the gift of the Myc RNAi-expressing cell lines, K. Helin for the *Cdc25A*-Luc reporter gene,

and T. Kouzarides for the GST-Rb expression vectors. We also thank M. Barbado and A. Basseville for advice during the real-time PCR experiments.

## REFERENCES

- Morgan, D. O. (1997) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 261–291
- Matsushime, H., Ewen, M. E., Strom, D. K., Kato, J. Y., Hanks, S. K., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (1992) *Cell* **71**, 323–334
- Hoffmann, I., Draetta, G., and Karsenti, E. (1994) *EMBO J.* **13**, 4302–4310
- Cangi, M. G., Cukor, B., Soung, P., Signoretti, S., Moreira, G., Jr., Ranashinge, M., Cady, B., Pagano, M., and Loda, M. (2000) *J. Clin. Investig.* **106**, 753–761
- Galaktionov, K., Lee, A. K., Eckstein, J., Draetta, G., Meckler, J., Loda, M., and Beach, D. (1995) *Science* **269**, 1575–1577
- Bromberg, J. F., Horvath, C. M., Besser, D., Latham, W. W., and Darnell, J. E. J. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2553–2558
- Turkson, J., Bowman, T., Garcia, R., Caldenhoven, E., De Groot, R. P., and Jove, R. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2545–2552
- Bromberg, J. (2002) *J. Clin. Investig.* **109**, 1139–1142
- Yu, H., and Jove, R. (2004) *Nat. Rev. Cancer* **4**, 97–105
- Chan, K. S., Sano, S., Kiguchi, K., Anders, J., Komazawa, N., Takeda, J., and DiGiovanni, J. (2004) *J. Clin. Investig.* **114**, 720–728
- Dechow, T. N., Pedranzini, L., Leitch, A., Leslie, K., Gerald, W. L., Linkov, I., and Bromberg, J. F. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10602–10607
- Bromberg, J., Wrzeszczynska, M., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R., Albanese, C., and Darnell, J. (1999) *Cell* **98**, 295–303
- Catlett-Falcone, R., Landowski, T. H., Oshiro, M. M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernández-Luna, J. L., Nuñez, G., Dalton, W. S., and Jove, R. (1999) *Immunity* **10**, 105–115
- Shirogane, T., Fukada, T., Muller, J. M., Shima, D. T., Hibi, M., and Hirano, T. (1999) *Immunity* **11**, 709–719
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., and Jove, R. (2000) *Oncogene* **19**, 2474–2488
- Kiuchi, N., Nakajima, K., Ichiba, M., Fukada, T., Narimatsu, M., Mizuno, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1999) *J. Exp. Med.* **189**, 63–73
- Ivanov, V. N., Bhoumik, A., Krasilnikov, M., Raz, R., Owen-Schaub, L. B., Levy, D., Horvath, C. M., and Ronai, Z. (2001) *Mol. Cell* **7**, 517–528
- Giraud, S., Bienvenu, F., Avril, S., Gascan, H., Heery, D. M., and Coqueret, O. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 8004–8011
- Giraud, S., Hurlstone, A., Avril, S., and Coqueret, O. (2004) *Oncogene* **23**, 7391–7398
- Barré, B., Avril, S., and Coqueret, O. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 2990–2996
- Fukada, T., Ohtani, T., Yoshida, Y., Shirogane, T., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1998) *EMBO J.* **17**, 6670–6677
- Galaktionov, K., Chen, X. C., and Beach, D. (1996) *Nature* **382**, 511–517
- Santoni-Rugiu, E., Falck, J., Mailand, N., Bartek, J., and Lukas, J. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3497–3509
- van de Wetering, M., Oving, I., Muncan, V., Pon Fong, M. T., Brantjes, H., van Leenen, D., Holstege, F. C., Brummelkamp, T. R., Agami, R., and Clevers, H. (2003) *EMBO Rep.* **4**, 609–615
- Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., Frohme, C., Beul, D., Hillukkala, T., Syvaoja, J., Saluz, H. P., Haenel, F., and Eilers, M. (2002) *Mol. Cell* **10**, 509–521
- Carballo, M., Conde, M., El Bekay, R., Martín-Nieto, J., Camacho, M. J., Monteseirin, J., Conde, J., Bedoya, F. J., and Sobrino, F. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 17580–17586
- Benhar, M., Engelberg, D., and Levitzki, A. (2002) *EMBO Rep.* **3**, 420–425
- Vigo, E., Muller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M. C., and Helin, K. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6379–6395
- Caldenhoven, E., van Dijk, T. B., Solari, R., Armstrong, J., Raaijmakers, J. A. M., Lammers, J. W. J., Koenderman, L., and de Groot, R. P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 13221–13227
- Schaefer, T. S., Sanders, L. K., Park, O. K., and Nathans, D. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5307–5316
- Bouchard, C., Marquardt, J., Bras, A., Medema, R. H., and Eilers, M. (2004) *EMBO J.* **23**, 2830–2840
- Eberhardy, S. R., and Farnham, P. J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 48562–48571
- Frank, S. R., Parisi, T., Taubert, S., Fernandez, P., Fuchs, M., Chan, H. M., Livingston, D. M., and Amati, B. (2003) *EMBO Rep.* **4**, 575–580
- Cheng, S. W., Davies, K. P., Yung, E., Beltran, R. J., Yu, J., and Kalpana, G. V. (1999) *Nat. Genet.* **22**, 102–105
- Zhang, H. S., and Dean, D. C. (2001) *Oncogene* **20**, 3134–3138
- Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le Villain, J. P., Troalen, F., Trouche, D., and Harel-Bellan, A. (1998) *Nature* **391**, 601–605
- Robertson, K. D., Ait-Si-Ali, S., Yokochi, T., Wade, P. A., Jones, P. L., and Wolffe, A. P. (2000) *Nat. Genet.* **25**, 338–342
- Trouche, D., Le Chalony, C., Muchardt, C., Yaniv, M., and Kouzarides, T. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 11268–11273
- Bienvenu, F., Gascan, H., and Coqueret, O. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 16840–16847
- Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, G. I. (2002) *Cell* **109**, 321–334
- Land, H., Parada, L. F., and Weinberg, R. A. (1983) *Nature* **304**, 596–602
- Orsulic, S., Li, Y., Soslow, R. A., Vitale-Cross, L. A., Gutkind, J. S., and Varmus, H. E. (2002) *Cancer Cell* **1**, 53–62
- Bowman, T., Broome, M. A., Sinibaldi, D., Wharton, W., Pledger, W. J., Sedivy, J. M., Irby, R., Yeatman, T., Courtneidge, S. A., and Jove, R. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 7319–7324
- Coqueret, O., and Gascan, H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 18794–18800
- Lin, J., Jin, X., Rothman, K., Lin, H. J., Tang, H., and Burke, W. (2002) *Cancer Res.* **62**, 376–380

Vol. 280 (2005) 15673–15681

**The STAT3 transcription factor is a target for the Myc and retinoblastoma proteins on the *Cdc25A* promoter.**

*Benjamin Barré, Arnaud Vigneron, and Olivier Coqueret*

**Page 15673:** “Retinoblastoma” in the title and abbreviation footnote of the paper was printed as “riboblastoma.” The correct title is listed above.

Vol. 280 (2005) 16227–16234

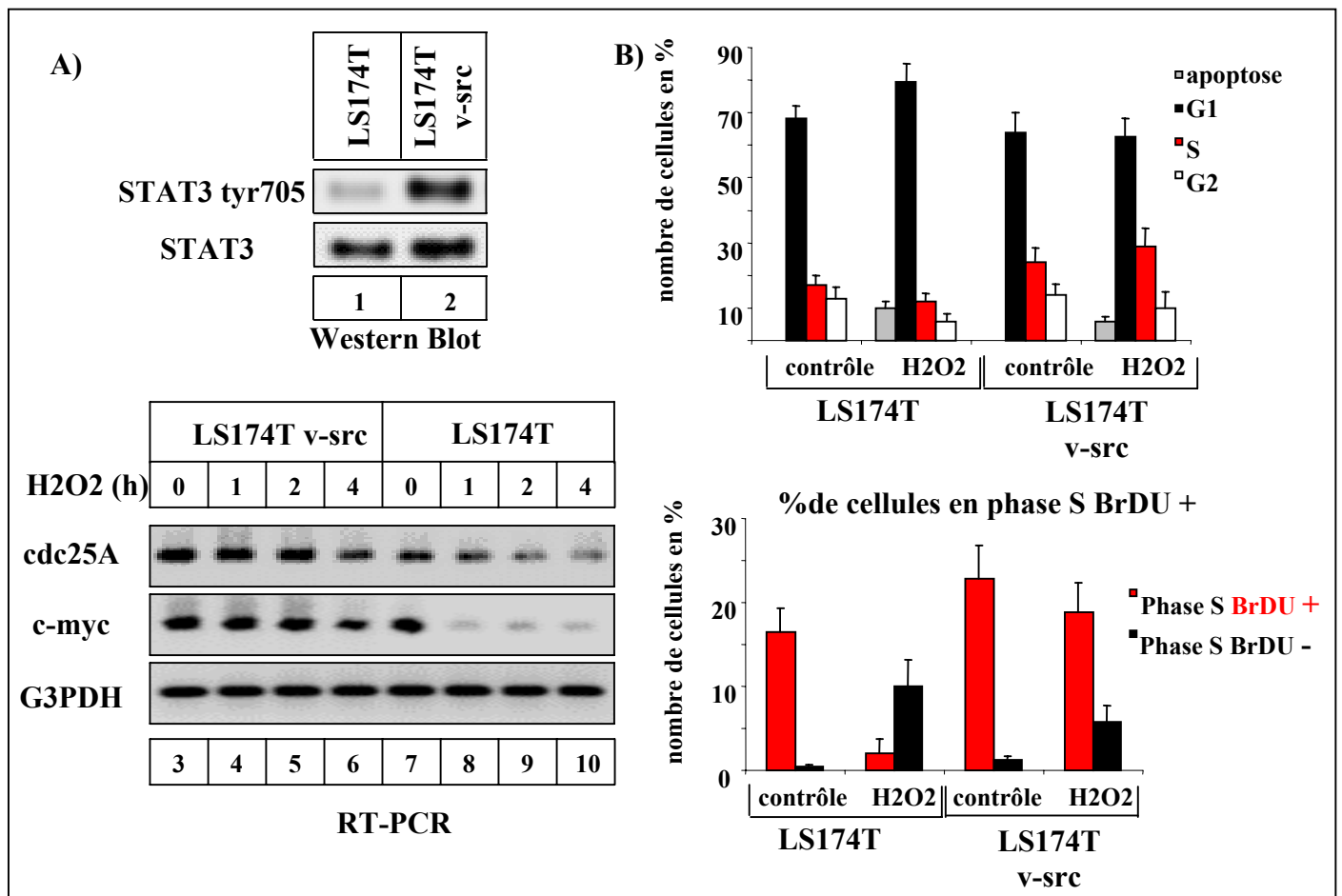
**Effect of ganglioside and tetraspanins in microdomains on interaction of integrins with fibroblast growth factor receptor.**

*Marcos S. Toledo, Erika Suzuki, Kazuko Handa, and Senitiroh Hakomori*

**Page 16228, under “Materials and Methods”:** The following, which is the second to last sentence in the right column, is incorrect and should be deleted: “The sequence for CD81 knock-down was taken from Zhang *et al.* (31).”

Résultats supplémentaires non publiés :

Afin d'étudier l'effet d'un stress oxydatif dans un modèle d'activation oncogénique de STAT3, nous avons inséré de manière stable un vecteur codant l'oncogène v-src dans la lignée LS174T. Cette lignée exprime alors l'oncogène et présente une forte activation de STAT3 détectée par un western blot dirigé contre la forme active de STAT3 (phosphorylation de la tyrosine 705). Cette lignée est alors traitée par un stress oxydatif de façon similaire à la lignée contrôle (lignée stable pour un vecteur vide).



**Figure 33 :** L'activation oncogénique de STAT3 limite la répression de *cdc25A* et l'inhibition de la réplication induite par un stress oxydatif

- A. Des extraits totaux sont réalisés à partir de cellules en croissance transfectées ou non par un vecteur codant l'oncogène v-src. Les extraits sont ensuite analysés par western blot avec un anticorps dirigé contre la forme active de STAT3 (tyrosine 705 phosphorylée) et un anticorps dirigé contre la région c-terminale de STAT3 (ligne 1-2) Ces mêmes cellules sont ensuite traitées par du peroxyde d'hydrogène durant les temps indiqués et l'expression des ARNm de *cdc25A* et *c-myc* est mesurée par RT-PCR.
- B. Les mêmes cellules sont traitées ou non par du peroxyde d'hydrogène durant 6h, et incubées avec du BrDU durant les 30 dernière minutes. Le cytogramme et l'incorporation du BrDU sont alors déterminés par cytométrie de flux. L'ADN est marqué par l'iodure de propidium et le BrDU par un anticorps couplé au FITC. Les résultats représentent la moyenne de quatre expériences.

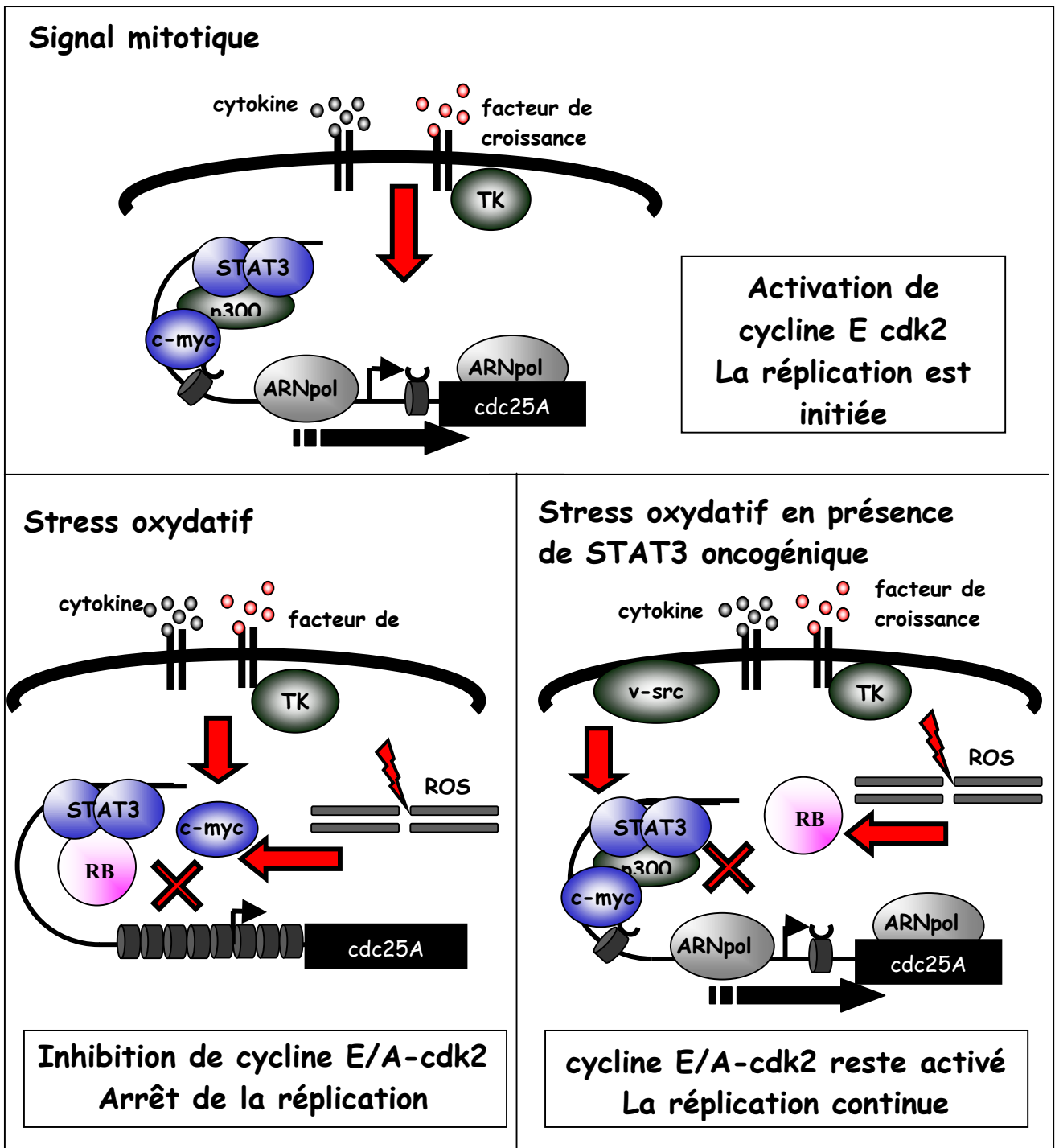
Le traitement au peroxyde d'hydrogène induit une répression significative de la transcription des protéines c-myc et cdc25A dans la lignée contrôle dès deux heures de traitement. En revanche, l'inhibition n'est pas significative dans les cellules exprimant l'oncogène v-src même après quatre heures de traitement (figure 33A).

Nous analysons ensuite le cycle cellulaire et la réplication de ces deux lignées en réponse au stress oxydatif (figure 33B). En condition contrôle, les deux lignées présentent un cytogramme classique et un taux de cellules en phase S avoisinant respectivement 15% et 20% pour la lignée contrôle et la lignée exprimant v-src. Les cellules en phase S incorporent le BrDU, montrant ainsi que la réplication est active. Après un traitement de 6h par du peroxyde d'hydrogène, le pourcentage de cellules contrôles en G1 augmente légèrement mais de façon significative à chaque expérience. De façon similaire le taux de cellules en phases S diminue légèrement. En revanche, l'analyse au BrDU montre que, dans leur majorité, ces cellules ne répliquent plus activement leur ADN (seulement 25% des cellules en phase S incorporent encore le BrDU). L'analyse des cellules exprimant l'oncogène v-src révèle un tout autre phénotype : le pourcentage de cellules en phase G1 n'est pas augmenté tandis que celui en phase S est légèrement relevé, de façon significative cependant. Finalement une large proportion de ces cellules répliquent activement leur ADN (environ 60% des cellules en phase S).

Ces résultats suggèrent que l'activation constitutive de STAT3 s'oppose à l'inhibition de la transcription de c-myc et cdc25A en réponse au stress oxydatif et aux dommages de l'ADN qu'il induit. Il est ainsi possible que la voie oncogénique STAT3 c-myc cdc25A maintienne l'activité de la kinase cdk2 en empêchant l'activation de Rb et sa liaison à STAT3 malgré la présence des dommages de l'ADN. Ce mécanisme expliquerait l'inhibition du point de contrôle de la phase S observée dans la figure 33.



Schéma conclusion de la seconde partie :



**Figure 34 :** Régulation de la transcription de *cdc25A* par l'interaction fonctionnelle entre *STAT3 c-myc* et *STAT3 Rb*

\* TK : Tyrosine kinase c-src par exemple

Partie 3 : La voie oncogénique SRC-STAT3  
inhibe la sénescence induite par la  
doxorubicine

Les études précédentes montrent que l'activité transcriptionnelle de STAT3 est régulée par les inhibiteurs du cycle cellulaire p21 et Rb lors de leur activation par les dommages de l'ADN. Le recrutement direct de ces deux protéines sur le domaine transcriptionnel de STAT3 inhibe son activité et induit au contraire une répression de la transcription des gènes *c-myc* et *cdc25A*. Cependant, dans la seconde partie, nous avons montré que l'activation oncogénique de STAT3 par l'oncogène *v-src* perturbe cette régulation et s'oppose à l'activité de Rb favorisant alors la réplication de ces cellules en dépit des dommages de l'ADN. Nous avons alors souhaité déterminer si l'activité oncogénique de STAT3 perturbait également l'activité de p21 en réponse aux dommages de l'ADN.

Afin de comprendre ces mécanismes, nous avons étudié l'impact de l'oncogène *v-src* sur un traitement inhibiteur des topoisomérase II et induisant des cassures de l'ADN. Pour cela, nous avons utilisé la lignée HT1080 décrite précédemment. Dans un test de clonogénicité (capacité d'une cellule traitée à former une colonie) la cellule exprimant l'oncogène *v-src* est plus résistante au traitement que la cellule exprimant un vecteur vide pbabe. Le traitement à la doxorubicine induit un phénotype assimilable à de la sénescence dans les cellules HT1080. Ce phénotype est en revanche peu observé même à de fortes concentrations de doxorubicine dans les cellules exprimant l'oncogène *v-src*.

L'activation de p21 par le vecteur inductible induit également un phénotype assimilable à la sénescence et nous a donc permis de tester la fonctionnalité de ce programme dans les cellules exprimant *v-src*. L'induction de p21 induit dans les deux types cellulaires le programme de sénescence et inhibe la prolifération. Dans les cellules exprimant *v-src*, l'induction de p21 est associée au recrutement de p21 sur STAT3 lié au promoteur de *c-myc*. Ceci inhibe la transcription de *c-myc*. p21 est donc capable d'inhiber l'activité oncogénique de la voie Src-STAT3 de façon similaire à l'inhibition de la voie IL-6 STAT3. De plus, ces expériences montrent que le programme de sénescence est fonctionnel dans les cellules exprimant *v-src*.

La résistance des cellules exprimant *v-src* est associée à un changement de leur ploïdie caractérisé par l'analyse de leur cytogramme après 48h de traitement à la doxorubicine (les cellules deviennent tétraploïdes). Au cours du traitement, ces cellules sont capables d'entrer rapidement en mitose. Cette mitose est cependant anormale et génère des cellules à 4N chromosomes possédant 1 noyau anormalement grand (38%) ou deux noyaux (54%) (Figure 9). Ces cellules possèdent aussi fréquemment des micronoyaux qui correspondent à des petits fragments chromosomiques. L'incorporation de BrDU dans ces cellules montre qu'une proportion non négligeable d'entre elles sont capables de re-répliquer leur ADN après cette

catastrophe mitotique. L'analyse du cytogramme des cellules ayant survécu 4 semaines après le traitement montre que ces cellules tétraploïdes sont très instables génétiquement et produisent des clones aneuploïdes compris entre 2 et 4N chromosomes (résultats non montrés).

Les cellules HT1080 contrôles présentent un tout autre phénotype. L'analyse de l'index mitotique montre que ces cellules activent le point de contrôle de la phase G2 durant les 36 premières heures de traitement. Les cellules qui entrent ensuite en mitose subissent une catastrophe mitotique et sont incapables de re-répliquer leur ADN. Ces cellules présentent un phénotype assimilable à celui observé dans des cellules sénescents et l'analyse du complexe cycline E-cdk2 révèle la présence de p21. Ces cellules possèdent des caractéristiques cytologiques comparables à celles des cellules exprimant v-src avec cependant de façon générale un nombre de micronoyaux inférieurs et la présence non négligeable de cellules à 2N chromosomes. Ce mécanisme pourrait être du à la présence de dommages de l'ADN plus importants au moment de la mitose dans la cellule exprimant v-src par rapport à la cellule contrôle. Ceci est à vérifier et pourrait impliquer l'entrée plus rapide en mitose des cellules exprimant v-src (pas de réparation de l'ADN au cours de la phase G2, réplication incomplète des sites commun de fragilités, décaténation des chromatides sœurs incomplètes) par rapport aux cellules contrôles.

Afin d'expliquer ces mécanismes, des expériences de Western blot et de RT-PCR ont été réalisées afin de tester l'expression des protéines c-myc et p21. De façon constitutive, le facteur de transcription c-myc est surexprimé dans les cellules exprimant l'oncogène v-src à travers son activation transcriptionnelle par STAT3 (figure 35). Le traitement à la doxorubicine induit l'activation de p21 dans les cellules contrôles mais pas dans les cellules exprimant v-src. De façon diamétralement opposée, le facteur de transcription c-myc est réprimé dans les cellules contrôles mais pas dans celles exprimant v-src. Ainsi de façon similaire aux résultats observés dans la première partie, l'activation de p21 par les dommages de l'ADN est associée à l'inhibition de la transcription de c-myc.

Nous analysons ensuite les protéines présentes au niveau du promoteur de p21 par des expériences d'immunoprécipitation de chromatines. Ces expériences montrent qu'après un traitement à la doxorubicine, le facteur de transcription p53 est recruté sur le promoteur de p21 dans les deux types cellulaires. De façon similaire le facteur de transcription Miz1 est recruté sur l'INR de p21. En revanche au niveau de cet INR, ces expériences montrent que le facteur de transcription c-myc est seulement recruté dans les cellules exprimant v-src. Le recrutement du complexe Miz- Myc empêche l'activation du gène p21 par p53 et explique

l'absence d'induction de p21 par les dommages de l'ADN dans les cellules exprimant l'oncogène v-src.

Finalement, nous montrons que l'expression de v-src n'augmente pas l'apoptose induite par la doxorubicine. La catastrophe mitotique peut induire l'apoptose, en particulier lorsque p53 n'est pas fonctionnel (275). L'inhibition de p21 était donc susceptible d'activer l'apoptose dans ces cellules. Nous mesurons l'expression de gènes anti-apoptotiques et montrons que les cellules exprimant v-src ont un fort taux d'ARNm codant la protéine Bcl-XL. Il est probable que STAT3 soit à l'origine de ce phénotype car Bcl-XL est l'un des gènes cibles de STAT3. Ainsi ces résultats suggèrent que l'activation de Bcl-XL par la voie Src-STAT3 supprime l'induction de l'apoptose induite par la catastrophe mitotique.

En résumé, ces travaux montrent que p21 contrôle l'activité oncogénique de STAT3 en réprimant son activité transcriptionnelle sur des gènes comme c-myc. Cependant l'activation constitutive de c-myc par STAT3 peut inhiber l'activation de p21 par les dommages de l'ADN, facilitant ainsi la résistances de ces cellules à des drogues antitumorales comme les inhibiteurs de topoisomérase II. Ces mécanismes sont à l'origine d'une instabilité génomique accrue engendrée par l'échappement au traitement. Ces différents points sont schématisés figure 38.

# Src Inhibits Adriamycin-Induced Senescence and G<sub>2</sub> Checkpoint Arrest by Blocking the Induction of p21waf1

Arnaud Vigneron,<sup>1</sup> Igor B. Roninson,<sup>2</sup> Erick Gamelin,<sup>1</sup> and Olivier Coqueret<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale U564, Cancer Center Paul Papin, Angers, France and

<sup>2</sup>Ordway Research Institute, Albany, New York

## Abstract

**DNA-damaging drugs stop tumor cell proliferation by inducing apoptosis, necrosis, or senescence. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21waf1 is an important regulator of these responses, promoting senescence and preventing aberrant mitosis that leads to cell death. Because tumors expressing oncogenic tyrosine kinases are relatively resistant to DNA-damaging agents, the effects of Src on cellular responses to anticancer drug Adriamycin were investigated. Src expression increased drug survival in HT1080 fibrosarcoma cells, as measured by the colony formation assay, and strongly inhibited Adriamycin-induced senescence. Src also decreased the number of apoptotic cells while increasing the fraction of cells dying through necrosis. In addition, Src inhibited the G<sub>2</sub> and G<sub>1</sub> tetraploidy checkpoints of Adriamycin-treated cells, permitting these cells to proceed into mitosis and subsequently double their DNA content. Inhibition of senescence and G<sub>2</sub>-G<sub>1</sub> checkpoints in Src-expressing cells was associated with the failure of these cells to up-regulate p21waf1 in response to Adriamycin. The failure of p21waf1 induction, despite increased expression of p53 and its binding to p21waf1 promoter, was mediated by the up-regulation of c-Myc, a negative regulator of p21waf1 transcription. Conversely, ectopic expression of p21waf1 inhibited Myc transcription in Src-expressing cells, an effect that was associated with the interaction of p21waf1 with the STAT3 transcription factor at the Myc promoter. These results reveal a complex effect of Src on cellular drug responses and provide an explanation for the effect of this oncogene on cellular drug resistance.** (Cancer Res 2005; 65(19): 8927-35)

## Introduction

The response of tumor cells to DNA-damaging anticancer drugs is determined by many proteins and pathways that regulate drug uptake or efflux, drug-DNA interactions, damage repair, or cellular responses to unrepaired DNA damage. The latter responses include the activation of G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> cell cycle checkpoints, which provide cells with the time to repair damage and prevent the entry of damaged cells into mitosis, the critical phase of the cell cycle. Damage-induced checkpoint arrest, however, may also lead to permanent cessation of cell division associated with phenotypic changes originally associated with replicative senescence. In contrast to replicative senescence, however, damage-induced

senescence (sometimes termed stress or aberrant signaling induced senescence or STASIS) is not mediated by telomere shortening (1). Cells that enter mitosis after DNA damage frequently undergo aberrant mitosis (mitotic catastrophe), which may lead either to cell death through apoptosis or necrosis or to senescence, apparently as a result of stabilization of the G<sub>1</sub> tetraploidy checkpoint. In the present article, we use the term senescence rather than STASIS, because this term has become established in the description of drug effects. The relationships among different cellular responses to DNA damage are illustrated in Fig. 1 (modified from ref. 1).

The role of different cellular responses in drug resistance can be studied by comparing the survival of drug-treated cells where genes regulating different responses are up-regulated or down-regulated by genetic manipulations. Such analysis has been frequently carried out through the overexpression of apoptosis-inhibiting genes. Inhibition of apoptosis was shown to diminish treatment response in some cases (such as hematopoietic malignancies), but it had little effect on drug or radiation survival as measured by clonogenic assays in many cell lines derived from human solid tumors. Under these conditions, increased induction of senescence or mitotic catastrophe compensated for the inactivation of the apoptotic program, resulting in undiminished antiproliferative effect of drug treatment (2).

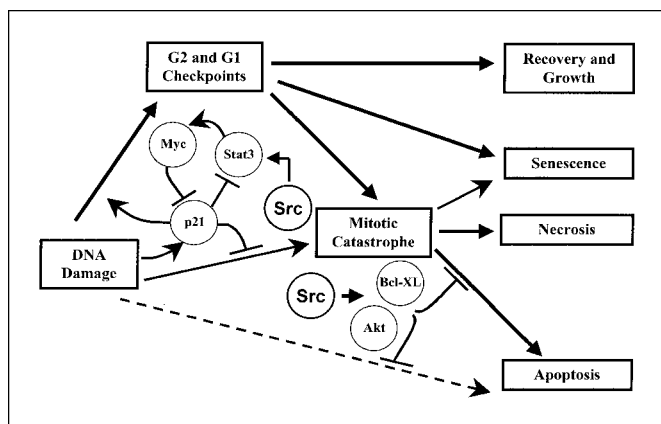
Cell cycle effects of DNA damage are determined to a large extent by the tumor suppressor p53, which is activated in response to the damage, and by the cyclin/cyclin-dependent kinase (cdk) inhibitor p21waf1, which is transcriptionally induced by p53 and by p53-independent mechanisms. In the absence of p53 or p21waf1, tumor cells do not undergo G<sub>1</sub> arrest and show diminished G<sub>2</sub> checkpoint and G<sub>1</sub> tetraploidy checkpoint, resulting in abnormal mitosis that leads to polyploidization and cell death (3–6). Inactivation of p53 or p21waf1 also strongly diminishes the induction of senescence in drug-treated cells (4). Finally, p53 inactivation also weakens in most cases the apoptosis response, whereas p21waf1 knockout can have an opposite, proapoptotic effect. As a result of these complex effects, the effect of p53 inactivation on the survival of treatment varies greatly depending on the cell line and the damaging agent (2, 7). p21waf1 inactivation has been much less frequently analyzed, and although p21waf1 mutations are rare, its inhibitory functions can be down-regulated in tumor cells through promoter methylation or cytoplasmic relocalization (8–11). This down-regulation should affect the response of tumor cells to DNA-damaging drugs.

Tumors expressing oncogenic tyrosine kinases, such as Src or Bcr/Abl, are relatively resistant to therapeutic drugs that induce DNA damage (12). Although this has been linked to an enhanced expression of survival proteins and apoptosis escape (13), these signaling pathways may also modulate other cell cycle responses to DNA damage to induce chemoresistance. In the present study, we

**Requests for reprints:** Olivier Coqueret, Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale U564, Cancer Center Paul Papin, 2 rue Moll, 49033 Angers, France. Phone: 33-2-41-35-27-00, ext. 2564; Fax: 33-2-41-48-31-90; E-mail: olivier.coqueret@univ-angers.fr.

©2005 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0461



**Figure 1.** Cellular responses to DNA damage (modified from ref. 1) and the effects of Src-regulated proteins (see Discussion).

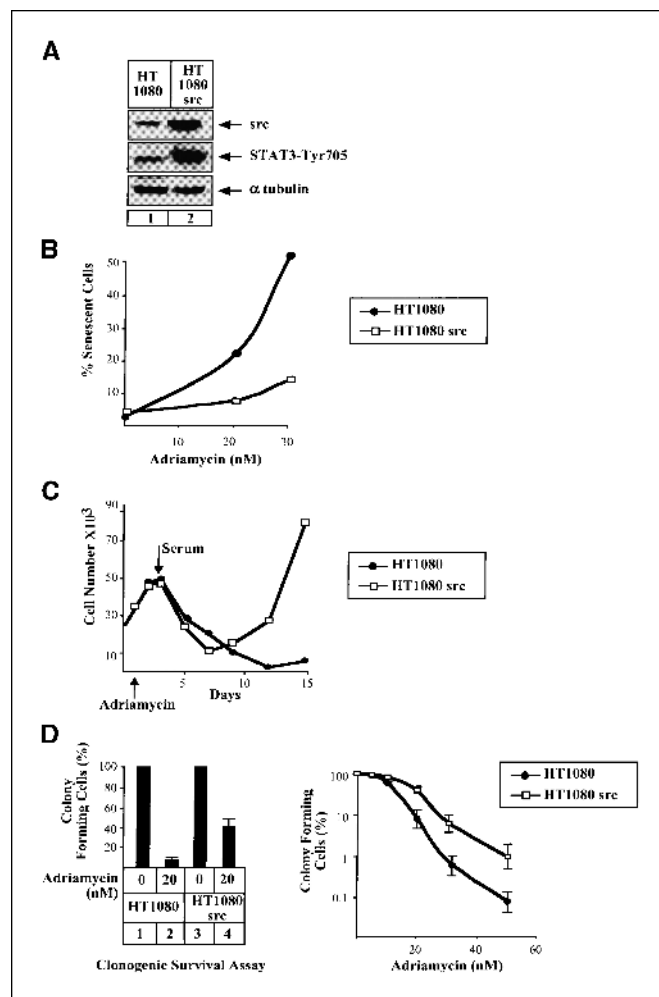
have investigated the effects of Src expression on the response to DNA-damaging drug Adriamycin (doxorubicin) in human HT1080 fibrosarcoma cells that are relatively resistant to damage-induced apoptosis (14, 15). As shown previously, Adriamycin-treated HT1080 cells undergo both cell death (as a consequence of mitotic catastrophe) and senescence (4). These responses to Adriamycin are regulated to a large extent by p21waf1. In particular, inhibition of p53-dependent p21waf1 induction diminishes Adriamycin-induced senescence while increasing mitotic catastrophe and apoptosis, and overexpression of p21waf1 produces the senescent phenotype (4). In the present study, we found that Src expression in HT1080 cells increased cellular resistance to Adriamycin. This effect was associated with a strong decrease in drug-induced senescence and G<sub>2</sub> checkpoint arrest as well as a diminution in apoptosis and an increase in necrosis. The effects of Src on cell cycle checkpoints and senescence were associated with the prevention of p21waf1 induction in drug-treated cells due to transcriptional inhibition of p21waf1 by the Myc protein, which is induced by Src. We have also found that p21waf1 inhibits Myc transcription through its interaction with the STAT3 transcription factor at the Myc promoter. These results reveal a new network of transcriptional interactions that has a profound effect on tumor cell responses to chemotherapy.

## Materials and Methods

**Antibodies and cell lines.** Antibodies against STAT3 (C20), Src (B-12), p21waf1 (C19), Miz-1 (H190), c-Myc (N262), p53 (FL393), cyclin E (M20), cyclin D1 (H295), and phospho-histone H3 (Ser<sup>10</sup>) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Antibodies against phospho-STAT3-Tyr<sup>705</sup> were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Anti- $\alpha$ -tubulin (T9026) was obtained from Sigma (St. Louis, MO). The fibrosarcoma cells used in this study correspond to the HT1080 p21-9 cell line that carries p21waf1 in an isopropyl-L-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG)-inducible vector as described previously (4). Note that this cell line (referred in the text as HT1080) is p16INK4 deficient and expresses wild-type Rb and p53 (4, 16).

**Cell culture, colony formation assay, synchronization, and extract preparation.** For colony formation assay (Fig. 2D),  $1.5 \times 10^6$  cells were plated per 10 cm plate and treated with different doses of Adriamycin for 48 hours. Cells were then washed, trypsinized, and replated in drug-free medium in six-well plates (diluted 100,000-100 cells per well) and allowed to form colonies for 14 days. For synchronization experiments, growing HT1080 cells were treated with 1 mmol/L hydroxyurea for 14 hours, washed, and further grown in RPMI with 10% fetal bovine serum for the

indicated times. The percentage of senescent cells was determined by staining SA- $\beta$ -gal activity using X-gal at pH 6.0; positive cells were then counted by bright-field microscopy after scoring 100 to 1,000 cells for each sample. Nuclear extracts were prepared as described before (17). For total cell extracts, 200  $\mu$ L extraction buffer [10 mmol/L HEPES (pH 7.9), 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1  $\mu$ g/mL leupeptin, 1  $\mu$ g/mL aprotinin, 1 mmol/L DTT] was added to the plates. After a 15-minute incubation on ice, total extracts were recovered by centrifugation at 12,000 rpm for 5 minutes, and extracts were either used immediately or frozen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Senescence was evaluated by measuring SA- $\beta$ -gal activity as described previously (16).



**Figure 2.** Src inhibits Adriamycin-induced senescence and confers resistance to Adriamycin. *A*, HT1080 cells were stably transfected with an expression vector encoding for the activated form of v-Src (HT1080-Src) or the corresponding parental plasmid (babe). Following G418 selection of 40 to 50 pooled clones, overexpression of Src was analyzed by Western blot and polyclonal antibodies against the protein (lanes 1 and 2, top). Membranes were stripped and probed with a control antibody directed against the Tyr<sup>705</sup>-phosphorylated form of STAT3 or against  $\alpha$ -tubulin as indicated. *B*, growing cells were left untreated or treated with Adriamycin for 72 hours, fixed, and then stained with X-gal. The percentage of senescent cells was evaluated as the number of cells expressing SA- $\beta$ -gal activity (representative of three experiments). *C*, cells were treated with Adriamycin (30 nmol/L) for 24 hours, washed, and then grown in 10% serum for the indicated times (representative of three experiments). *D*, HT1080 cells expressing Src or not were treated with Adriamycin for 2 days, washed, replated, and further grown for 14 days in drug-free medium as described in Materials and Methods. Colony formation was then counted using an inverted microscope, and for each cell line (expressing Src or not), growth of nontreated cells was set up at 100%. Clonogenic survival was then plotted as a fraction relative to these untreated cells.

**Chromatin immunoprecipitation assay.** Cells were washed and cross-linked with 1% formaldehyde at room temperature for 10 minutes. Cells were washed sequentially twice with 1 mL ice-cold PBS, centrifuged, and then resuspended in 0.5 mL lysis buffer [1% SDS, 10 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.1), 1 mmol/L PMSF, 1 µg/mL leupeptin, 1 µg/mL aprotinin] and sonicated thrice for 15 seconds each at the maximum setting. Supernatants were then recovered by centrifugation at 12,000 rpm for 10 minutes at 4°C, diluted twice in dilution buffer [1% Triton X-100, 2 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.1)], and subjected to one round of immunoclearing for 2 hours at 4°C with 2 µg sheared salmon sperm DNA, 2.5 µg preimmune serum, and 20 µL protein A-Sepharose (of 50% slurry). Immunoprecipitation was done overnight with specific antibodies; then, 2 µg sheared salmon sperm DNA and 20 µL protein A-Sepharose (of 50% slurry) were further added for 1 hour at 4°C. Immunoprecipitates were washed sequentially for 10 minutes each in TSE I [0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mmol/L EDTA, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.1), 150 mmol/L NaCl], TSE II [0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mmol/L EDTA, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.1), 500 mmol/L NaCl], and buffer III [0.25 mol/L LiCl, 1% NP40, 1% deoxycholate, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.1)]. Beads precipitates were then washed thrice with TE buffer and eluted twice with 1% SDS, 0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub>. Eluates were pooled and heated at 65°C for 6 hours to reverse the formaldehyde cross-linking, and DNA was precipitated using classic procedures. For PCR, 10 µL from a 100 µL DNA preparation were used for 30 cycles of amplifications. The following regions were amplified: regions -2760/-2486, -262/-70, and -105/+25 of the p21waf1 promoter and -223/-40 (relative to P2) region of the Myc promoter.

**Serial chromatin immunoprecipitation assay experiment.** Following immunoprecipitation with the first STAT3 antibody, beads precipitates were prepared as described above and eluted during 4 hours at 4°C with 500 µL dilution buffer II [1% Triton X-100, 2 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.1), 1 mmol/L PMSF, 5 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 mmol/L NaF, 5-10 µg purified His-STAT3 fusion protein corresponding to amino acids 716-770]. This fusion protein is recognized by the C20 antibody and competes with the endogenous STAT3 complexes. The supernatants were diluted once to twice in dilution buffer I and immunoprecipitation was done overnight with the second specific antibody. Two micrograms of sheared salmon sperm DNA and 20 µL protein A-Sepharose (of 50% slurry) were further added for 1 hour at 4°C. Immunoprecipitates and beads were then washed as described above, eluates were pooled and heated at 65°C overnight to reverse the formaldehyde cross-linking, and DNA was then precipitated.

**Flow cytometry analysis.** For DNA content analysis,  $2 \times 10^5$  cells were washed twice with PBS and fixed in 70% ethanol. Cells were treated with 100 units/mL RNase A for 20 minutes at 37°C, resuspended in PBS containing 50 µg/mL propidium iodide (PI), and immediately analyzed by flow cytometry. For DNA replication analysis,  $2 \times 10^5$  cells were incubated with 50 µmol/L bromodeoxyuridine (BrdUrd) for 30 minutes. Cells were fixed in 70% ethanol and BrdUrd incorporation was determined by flow cytometric analysis using an anti-BrdUrd-FITC conjugate (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) according to the manufacturer's protocol. For mitotic index analysis, fixed cells were incubated for 30 minutes with anti-phospho-histone H3 antibodies, washed thrice with PBS, and incubated 30 minutes with an anti-rabbit-FITC conjugate. Cells were then processed for DNA content analysis.

**Confocal microscopy.** Cells grown on coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes and permeabilized in 70% ethanol. Cells were treated with 100 units/mL RNase A in PBS and then stained in PBS containing 50 µg/mL PI for 10 minutes. After washing, the coverslips were mounted on slides in 50% PBS/50% glycerol. Images were analyzed by confocal microscopy using a Olympus (Rungis, France) Fluoview microscope.

## Results

**Src inhibits Adriamycin-induced senescence and confers resistance to Adriamycin.** To determine if Src confers resistance to genotoxic drugs, expression vectors encoding the oncogene (or

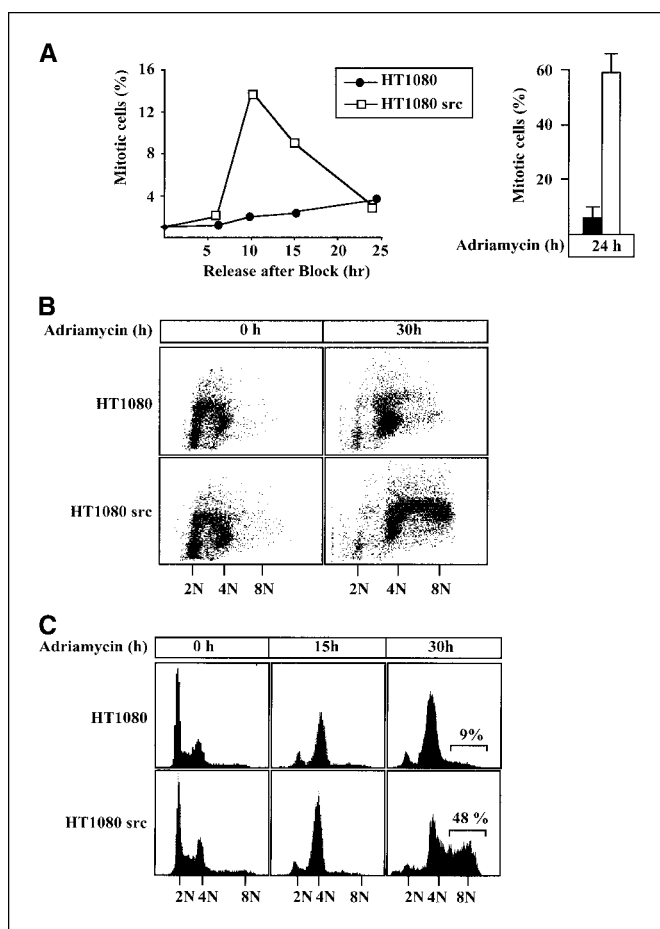
the vector parental form pBabe) were stably transfected into HT1080 fibrosarcoma cells that were then exposed to moderate doses of Adriamycin (10-30 nmol/L). This widely used anticancer drug produces DNA damage by stabilizing an intermediate complex formed by topoisomerase II in the process of DNA segregation. Overexpression of Src was first verified by Western blot analysis (Fig. 2A, lanes 1 and 2). Because it is well established that Src activates the STAT3 transcription factor (18, 19), we verified that STAT3 was effectively phosphorylated on its Tyr<sup>705</sup> residue in Src-transduced cells (Fig. 2A, lanes 1 and 2). As reported previously (15), Adriamycin induced SA-β-gal activity, a specific marker of cells that do not divide or form colonies, in control cells. About 50% of the attached cells became senescent after 3 days of Adriamycin treatment (Fig. 2B). Surprisingly, the fraction of SA-β-gal-positive cells was greatly reduced in the Src-expressing population (Fig. 2B), indicating that Src inhibits drug-induced senescence. Importantly, the number of attached cells after 3 days of Adriamycin treatment was the same in Src-expressing cells and in control cells.

To analyze the effect of Src on cellular resistance to Adriamycin, we have carried out two assays. In the first assay, cells were treated with 30 nmol/L Adriamycin for 48 hours, washed, and then grown in drug-free medium for 15 days, and the cell count was determined (Fig. 1C). On transfer into drug-free medium, the number of both control and Src-expressing cells decreased to a similar degree up to day 7, indicating the death of cells on release from the drug. On subsequent days, the number of control cells decreased further without significant recovery, and almost all the cells remaining at the late time points displayed the senescent phenotype. In contrast, Src-expressing cells recovered and resumed proliferation by days 10 to 15 after release from the drug (Fig. 2C). In the second assay, we have measured colony formation after 2-day exposure to different doses of Adriamycin (Fig. 2D). In the clonogenic assay, Adriamycin showed an IC<sub>50</sub> of 12 nmol/L in control cells and 18 nmol/L in the presence of the oncogene. Moreover, we also compared the exponential shapes and initial shoulder regions of the two survival curves using the two variables,  $D_0$ , the slope of the exponential region, and  $N$ , the extrapolational number (20).  $D_0$  values of HT1080 and HT1080 Src were 2 and 6 nmol/L, respectively, whereas  $N$  values were 2 and 3 ( $P = 0.01$ ). These observations suggest that Src should not be considered only as a purely dose-modifying factor but that this oncogene is probably also involved in recovery after sublethal damage. Altogether, we concluded from these results that Src confers Adriamycin resistance in HT1080 cells.

**Src-expressing cells progress into mitosis and become polyploid.** To characterize the effect of Src on Adriamycin-activated cell cycle checkpoints, we examined the cell cycle profile of Src-expressing cells by flow cytometry analysis. To this end, cells were arrested with hydroxyurea, released, and further treated with 30 nmol/L Adriamycin for 5 to 25 hours. Whereas control cells remained growth arrested, 15% of Src-expressing cells had already progressed into mitosis by 10 hours (Fig. 3A, left). To confirm this result, cells were treated as described above and accumulated at metaphase by nocodazole treatment. Under these conditions, 60% of Src-expressing cells accumulated into mitosis 24 hours after release, whereas control cells remained growth arrested (Fig. 3A, right). Hence, Src expression inhibits Adriamycin-induced G<sub>2</sub> checkpoint.

To determine if Src-expressing cells exit mitosis to undergo an additional round of DNA replication, we did BrdUrd incorporation experiments. To this end, cells were arrested as described above





**Figure 3.** Src-expressing cells proceed into mitosis and become polyploid. **A**, cells were presynchronized with hydroxyurea, washed, and then either left untreated or further treated with 30 nmol/L Adriamycin for the indicated times. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis was then done on the indicated attached cells using an antibody directed against the phosphorylated form of histone H3. The same experiment was repeated in parallel, except that 20 nmol/L nocodazole was added with Adriamycin to accumulate mitotic cells (*right*). **B**, two-dimensional analysis of BrdUrd incorporation (*Y axis*, 30-minute pulse) and DNA content (*X axis*) by flow cytometry. HT1080 cells were presynchronized with hydroxyurea and treated or not with 30 nmol/L Adriamycin as indicated. **C**, cells were arrested with hydroxyurea and further treated with 30 nmol/L Adriamycin for the indicated times. FACS analysis was then done on the indicated attached cells after PI staining.

and released in the presence or absence of Adriamycin for 30 hours. As expected, most of the control cells were arrested in the fraction with 4N DNA content (Fig. 3*B, top*). By contrast, BrdUrd incorporation was seen in the Src population with DNA content between 4N and 8N, suggesting that these cells exit mitosis and then re-replicate their DNA (Fig. 3*B, bottom*). Using PI staining, we then determined if polyploid cells arose by abnormal DNA re-replication. Whereas control cells accumulated with 4N DNA content (except for ~10% of preexisting cells with >4N DNA content, note that this fraction was not modified by Adriamycin), a significant fraction (48%) of apparently polyploid nuclei was observed in Src-expressing cells (Fig. 3*C, 3*).

Altogether, we concluded from these results that the Src-expressing cells escape from G<sub>2</sub> arrest to proceed into mitosis, re-replicate their DNA, and become polyploid.

**Src promotes mitotic catastrophe but not apoptosis.** Adriamycin-induced mitotic catastrophe in HT1080 cells results

in the appearance of cells with multiple micronuclei (4, 15); such cells may proceed to apoptosis, necrosis, or senescence (Fig. 1). Interestingly, one notable feature of Src-expressing cells is an increase in the number of multinucleated cells after Adriamycin treatment. Images obtained by confocal microscopy indicated that ~80% of Src-expressing cells showed features of mitotic catastrophe at the 24-hour time point, whereas only 5% control cells were multinucleated (Fig. 4*A, left*). The control cells reached the same high level of multinucleation only after 80 hours. It has been recently proposed that abnormal chromosome segregation triggers apoptosis during the metaphase/anaphase transition and the G<sub>1</sub> tetraploidy checkpoint (21). Using PI/Annexin V staining, we observed that cell death occurred in 20% to 25% of cells 3 days after release (Fig. 4*A, right*). Although cell death occurred more rapidly in the presence of Src, no significant difference was observed between the two cell lines at 60 hours. To extend this result, cells were arrested with hydroxyurea and further treated with Adriamycin for 70 hours and the percentage of necrotic, apoptotic, or senescent cells was determined. Confirming the results presented in Fig. 2*B*, ~70% of control cells became senescent 3 days after release. In contrast, only 20% to 30% of Src-expressing cells stop proliferating and 40% to 50% were actively dividing in the presence of the drug (Fig. 4*B*). Interestingly, we observed that apoptosis occurred only within a minority of cells and that ~20% of Src-expressing cells were necrotic at the 70-hour time point. To further investigate the effect of Src on apoptosis, reverse transcription-PCR (RT-PCR) analysis was done to analyze the expression of proapoptotic genes. Effectively, we observed that Adriamycin treatment induced the expression of Puma and Noxa in both control and Src-expressing cells (Fig. 4*C, top*). However, the survival gene Bcl-XL was also constitutively activated in Src-expressing cells (Fig. 4*C*). In addition, Src also induced the constitutive activation of the Akt kinase, a well-known regulator of cell survival (Fig. 4*D, compare lanes 1 and 2 and lanes 3 and 4*). By contrast, neither Bcl-XL nor Akt were found activated in control cells.

Altogether, we concluded from these results that Src-mediated G<sub>2</sub> checkpoint inhibition promotes mitotic catastrophe and the resultant cell death but that constitutive activation of Akt and Bcl-XL probably inhibits apoptosis in Src-expressing cells.

**Src does not prevent cell cycle arrest by p21waf1 but inhibits its expression.** Following Adriamycin treatment and detection of DNA damage, G<sub>2</sub> and G<sub>1</sub> tetraploidy checkpoint arrest is induced with the participation of p21waf1 (Fig. 1). As described previously (4), HT1080 cell line used in the present study (p21-9) carries p21waf1 in an IPTG-inducible vector. To determine if Src might prevent the effect of this cell cycle inhibitor on cell proliferation, we therefore induced p21waf1 by IPTG (Fig. 5*A*). As expected, Src enhanced cell proliferation and allowed growth of HT1080 cells in soft agar (Fig. 5*B, lanes 3 and 7*). Treatment of Src-expressing cells with IPTG to induce p21waf1 suppressed both cell proliferation and anchorage-independent growth (Fig. 5*B, lanes 4 and 8*). Because HT1080 cells develop morphologic markers of senescence on p21waf1 induction (4, 16), senescence induction was also analyzed in control and Src-expressing cells. To this end, cells were stained for SA- $\beta$ -gal activity at pH 6. As expected, IPTG treatment efficiently induced SA- $\beta$ -gal activity in control cells and this effect was observed to the same extent in the presence of Src (Fig. 5*B, lanes 9-12*). Hence, Src expression does not interfere with the induction of growth arrest or the senescent phenotype by p21waf1.

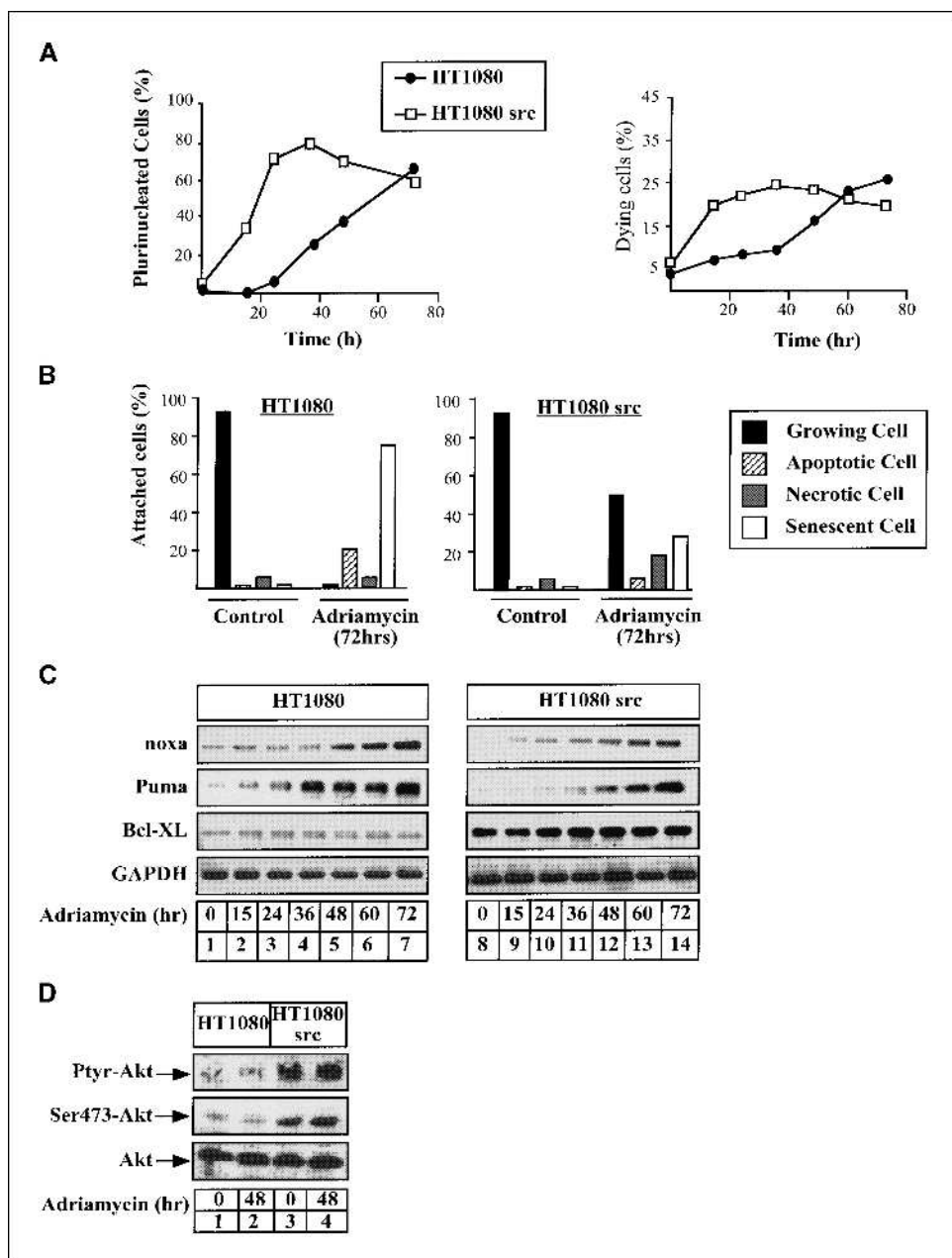
Because these findings indicated that Src does not act downstream of p21waf1, we then determined if p21waf1 was expressed to the same extent on Adriamycin treatment of control or Src-expressing cells. As expected, RT-PCR analysis indicated that p21waf1 accumulated in control cells 36 to 72 hours after drug treatment (Fig. 5C, lanes 1-8). Surprisingly, p21waf1 was not significantly expressed in Src-expressing cells (Fig. 5C, lanes 9-16). To determine if this cell cycle inhibitor binds to cyclin-cdk complexes, cells were treated with Adriamycin as described above, nuclear extracts were recovered and coimmunoprecipitations were done with polyclonal antibodies directed against p21waf1. Proteins present in the immunoprecipitates were then revealed by immunoblotting with cyclin E antibodies (Fig. 5D, lanes 1-6). In control cells and after 48 hours, we observed that p21waf1 interacts with cyclin E, suggesting that cdk2 was inhibited. As expected, no interaction was observed between cyclin E and

p21waf1 in Src-expressing cells (Fig. 5D, lanes 1-6), suggesting that cdk2 remains active despite tetraploidy of these cells. Altogether, we concluded from these results that Src prevents p21waf1 induction by DNA damage, which can explain the effects of Src on cell cycle checkpoints and senescence.

**The Myc-Miz complex counteracts p21waf1 induction by p53 in Src-expressing cells.** We then determined if Src prevents the expression of p21waf1 through p53, which is responsible for p21waf1 induction in drug-treated HT1080 cells (4). Using Western blot analysis, we first observed that Adriamycin induced the expression of p53 to the same extent in control and Src-expressing cells (Fig. 6A, lanes 1-4, top). Moreover, chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) experiments indicated that p53 was recruited to the p21waf1 promoter on drug treatment in both cell lines (Fig. 6A, lanes 5-8). No amplification of a control DNA sequence unrelated to p21 was noticed (data not shown). Confirming the results of RNA analysis,

**Figure 4.** Adriamycin does not induce apoptosis in Src-expressing cells. A, HT1080 cells expressing Src or not were arrested by hydroxyurea, released, and further treated or not with 30 nmol/L Adriamycin for the indicated times.

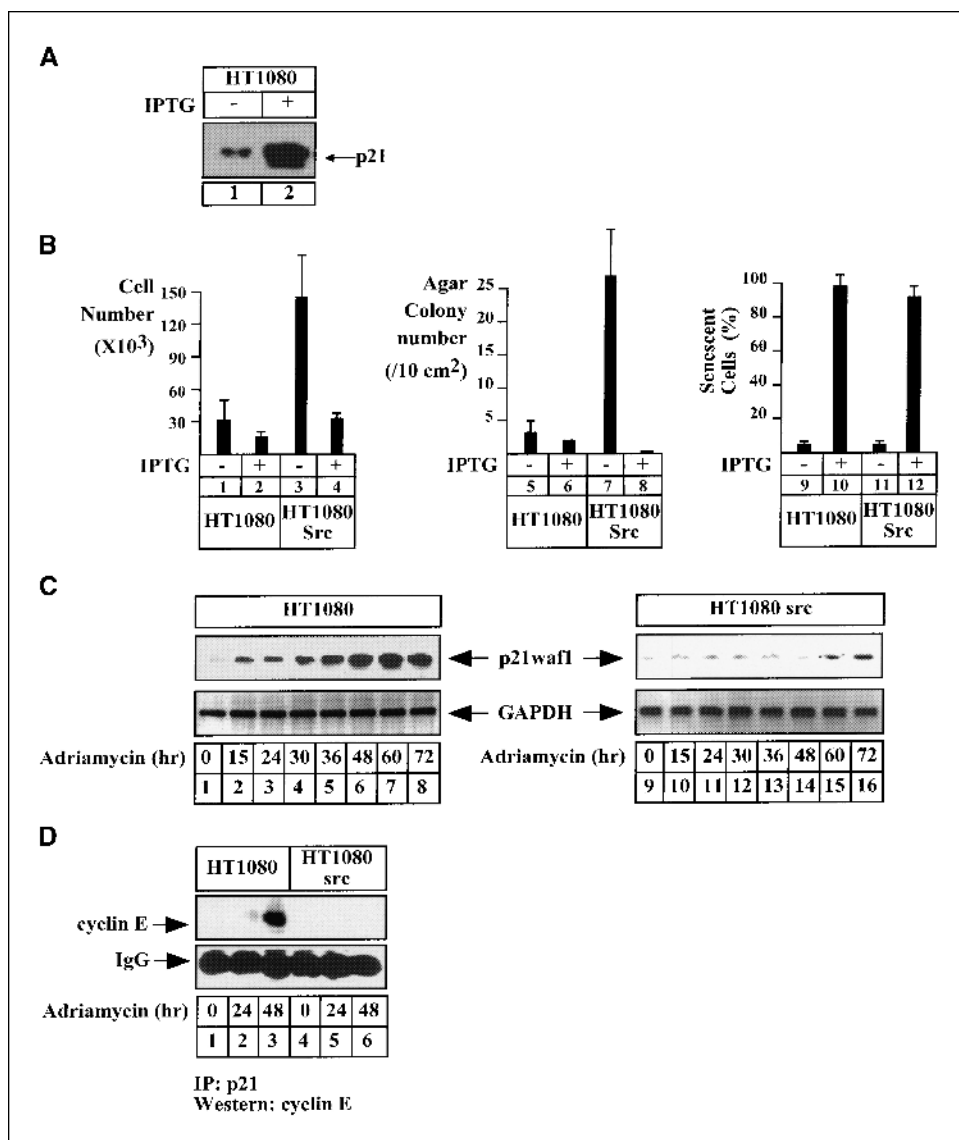
The percentage of cells with multiple micronuclei was determined by confocal microscopy analysis (left), whereas cell death (apoptosis + necrosis) was evaluated in parallel by FACS analysis and Annexin V staining (right). B, cells were treated as described in (A) and the percentage of senescent cells was evaluated as the number of cells expressing SA- $\beta$ -gal activity. In parallel, the number of necrotic cells (PI positive, Annexin negative) and apoptotic cells (PI negative or positive, Annexin positive) was analyzed by FACS analysis using PI/Annexin V staining. Growing cells are defined as the fraction that is neither apoptotic nor necrotic nor senescent. C, RT-PCR analysis of the expression of the Noxa, Puma, and Bcl-XL mRNAs on Adriamycin treatment of control cells (lanes 1-7) or Src-expressing cells (lanes 8-14). D, cells were arrested and treated as above and the activation of Akt was evaluated by Western blot analysis using antibodies directed against the kinase (bottom) or its Ser<sup>473</sup>-phosphorylated form (middle). In parallel, extracts were immunoprecipitated with a phospho-tyrosine antibody and analyzed by Western blotting to detect the tyrosine-phosphorylated form of the kinase (top).



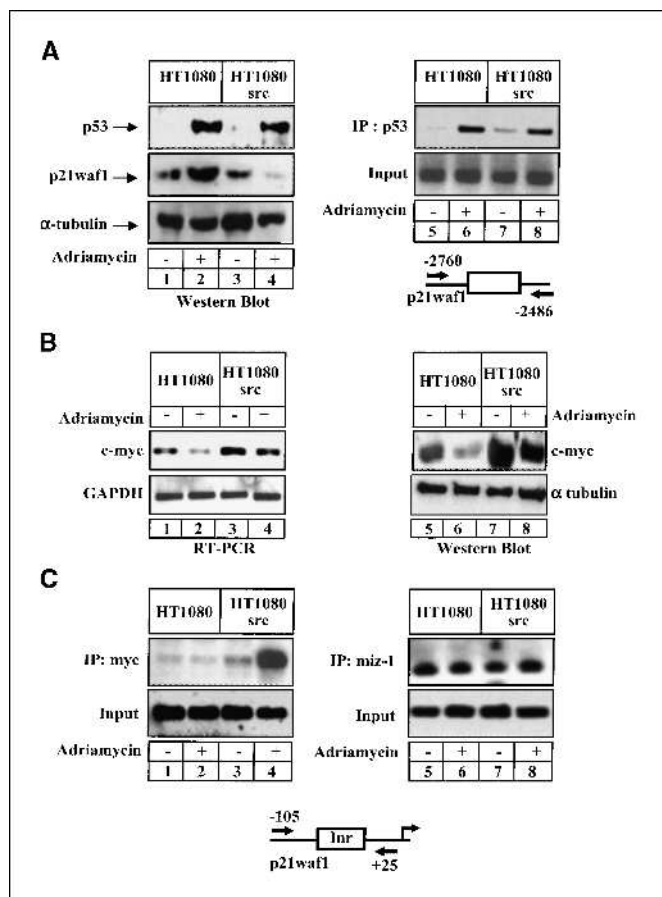
although p53 was normally activated, p21waf1 protein was not induced in the presence of Src (Fig. 6A, lanes 1-4, middle).

We then determined if Myc is involved in the inhibition of the p21waf1 gene because this protein is well known to be activated by the Src-STAT3 pathway (19). Moreover, Myc has been shown to bind to the p21waf1 promoter to block its activation on DNA damage (22, 23). We first characterized the effect of Adriamycin on Myc expression using RT-PCR (Fig. 6B, lanes 1-4) or Western blot experiments (Fig. 6B, lanes 5-8). Although Myc expression was inhibited as expected in control cells, the gene was not significantly affected by Adriamycin in the presence of Src (Fig. 6B, lanes 3-4 and 7-8). In addition, ChIP experiments indicated that Adriamycin induced a significant association of Myc with the proximal p21waf1 promoter in Src-expressing cells (Fig. 6C, lanes 1-4). By contrast, Myc was not detected on DNA of control cells. As reported previously (24), Miz-1 (the partner of Myc) was constitutively associated with DNA and the drug slightly enhanced its DNA-binding activity (Fig. 6C, lanes 5-8). Therefore, we concluded from these results that Src inhibited p21waf1 expression by inducing the binding of Myc to its promoter.

**p21waf1 prevents the expression of Myc.** Because Src induces cell proliferation through STAT3 activation and Myc up-regulation (19), we then determined the effect of p21waf1 on the expression of this gene. Remarkably, Myc was strongly down-regulated when Src-expressing cells were treated with IPTG to induce ectopic p21waf1 (Fig. 7A, lanes 1-4). To confirm these results at the transcriptional level, we monitored the effect of p21waf1 on the Src-mediated induction of the Myc promoter. To this end, the HBM-Luc promoter (25) was transfected into HT1080 cells together with vectors expressing Src and p21waf1. Inclusion of a Src-expressing vector in the transfection mixture led to a 8- to 10-fold increase in reporter gene expression, but this activation was repressed by p21waf1 (Fig. 7B, lanes 1-3). Because it is well established that the STAT3 transcription factor mediates the up-regulation of Myc by Src (18, 19), we verified using ChIP experiments that STAT3 was effectively recruited to the Myc promoter and that IPTG-induced p21 did not significantly affect its DNA-binding activity (Fig. 7C, lanes 3 and 4). Interestingly, these experiments also indicated that p21waf1 was recruited to the Myc promoter in Src-expressing cells (Fig. 7C, lanes 1 and 2). Because we have shown previously that



**Figure 5.** Src attenuates the G<sub>1</sub> tetraploid checkpoint through p21waf1 down-regulation. **A**, overexpression of p21waf1 on IPTG induction was verified in HT1080 cells by Western blot analysis. **B**, HT1080 cells expressing Src or not were seeded in six well-plates (20 × 10<sup>3</sup>) and their proliferation rate (lanes 1-4) and their ability to grow in soft agar (lanes 5-8) were evaluated after 4 and 10 days of culture, respectively. p21waf1 was induced on IPTG addition as indicated. In parallel, cells expressing Src or not were treated with IPTG for 24 hours, fixed, and stained with X-gal. The percentage of senescent cells was evaluated as the number of cells expressing SA-β-gal activity (lanes 9-12). **C**, RT-PCR analysis of p21waf1 expression in HT1080 cells expressing or not Src. Cells were presynchronized with hydroxyurea and further treated or not with Adriamycin for the indicated times. **D**, nuclear cell extracts were immunoprecipitated with polyclonal antibodies directed against p21waf1 proteins, separated by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose filter, and probed with polyclonal antibodies directed against cyclin E.



**Figure 6.** Adriamycin induced the association of the Myc-Miz complex with the p21waf1 promoter. *A*, asynchronously growing cells expressing (lanes 3 and 4) or not Src (lanes 1 and 2) were either left untreated or treated with Adriamycin for 48 hours (30 nmol/L). The expression of p53 was then evaluated by Western blot analysis (lanes 1-4) using polyclonal antibodies directed against the protein. Membranes were stripped and reprobed with a control antibody directed against p21waf1 or  $\alpha$ -tubulin as indicated. In parallel, soluble chromatin was prepared from the indicated cells grown in 10% serum and treated or not with Adriamycin for 48 hours. Following immunoprecipitations with antibodies directed against p53, DNA was amplified using one pair of primers that covers the p53-binding site of the p21waf1 promoter (lanes 5-8). *B*, the indicated cells were left untreated or treated with Adriamycin for 48 hours and the expression of Myc was then analyzed by RT-PCR (lanes 1-4) or Western blot (lanes 5-8). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and tubulin expressions were monitored as controls in each experiment. *C*, soluble chromatin was prepared from the indicated cells grown in 10% serum and treated or not with Adriamycin for 48 hours. Following immunoprecipitations with antibodies directed against Myc (lanes 1-4) or Miz-1 (lanes 5-8), DNA was amplified using one pair of primers that covers the proximal p21waf1 promoter.

p21waf1 interacts with STAT3 to inhibit its activity (26), we did a serial ChIP experiment to determine if the two proteins are associated on DNA. For this, we divided the soluble chromatin derived from Src-expressing cells into two aliquots. One was immunoprecipitated with STAT3 antibodies followed by release of the immune complexes and reimmunoprecipitated with p21waf1 antibodies. The other was first immunoprecipitated with STAT3 antibodies followed by release and reimmunoprecipitated with control IgG antibodies. Under these conditions, subsequent reimmunoprecipitations with p21waf1 antibodies were able to immunoprecipitate the Myc promoter on IPTG addition, whereas this was not the case with the control IgG (Fig. 7C, lanes 5-8). In each condition, PCR analysis did not detect any occupancy of a control DNA region (data not shown).

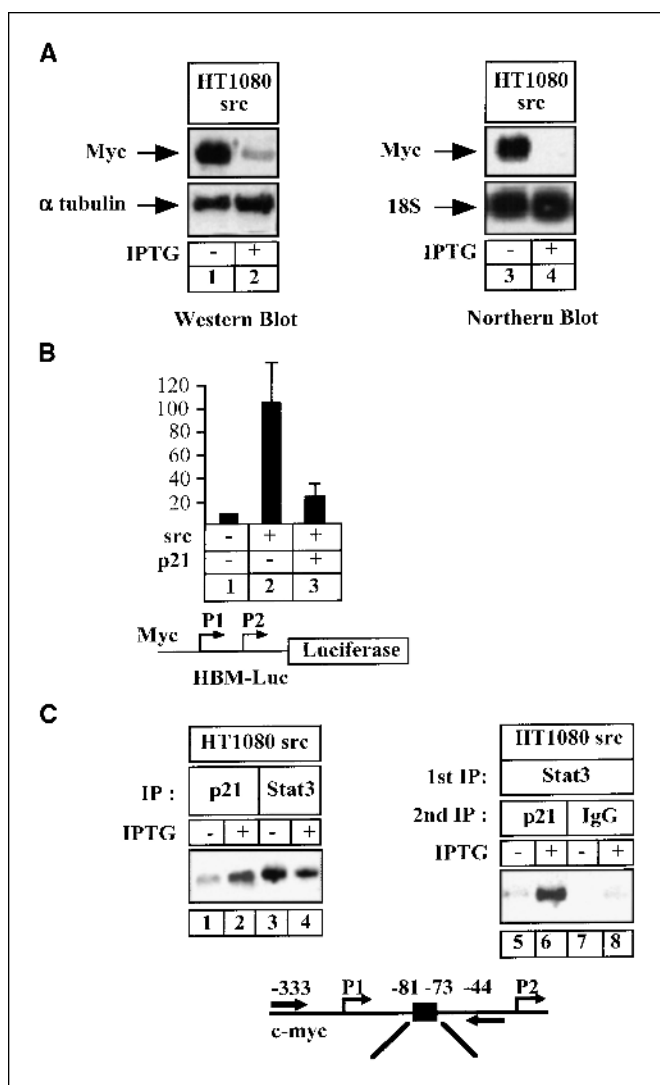
Altogether, these results indicated that p21waf1 inhibits Myc expression, most probably by binding and inhibiting STAT3 on the Myc promoter.

## Discussion

It has been proposed that certain oncogenes may provide cancer cells with an inherent mechanism of resistance to anticancer drugs (27, 28). In this study, we showed that Src oncogene has profound effects on the response of HT1080 fibrosarcoma cells to Adriamycin, and we identified the molecular mechanism of these effects. Src expression produced a substantial increase in drug resistance in these cells as measured by the colony formation assay. This overall effect was associated with a drastic decrease in the induction of senescence in drug-treated cells. On the other hand, Src abrogated drug-induced G<sub>2</sub> checkpoint arrest and promoted cell entry into mitosis in the presence of Adriamycin, which resulted in a more rapid onset of mitotic catastrophe, although the extent of mitotic catastrophe (as measured by the fraction of micronucleated cells) was not significantly altered in the long term. As reported by others (13), Src also diminished the apoptotic response. The antiapoptotic effect of Src, however, is counterbalanced by an increase in the fraction of cells dying through necrosis. Altogether, these results suggest that the inhibition of the senescence response is likely to be primarily responsible for increased drug resistance of Src-expressing cells.

The effects of Src on cellular drug responses and their molecular mechanisms revealed in the present study are schematized in Fig. 1. The most drastic effects of Src (i.e., the inhibition of senescence and of G<sub>2</sub> and G<sub>1</sub> tetraploidy checkpoints) can be explained by the failure of Src-expressing cells to induce p21waf1, a protein that was shown previously to be a key mediator of both G<sub>2</sub> (3) and G<sub>1</sub> tetraploidy checkpoints and drug-induced senescence (4-6). Although p21waf1 induction in response to damage in HT1080 cells is the result of transcriptional activation by p53 (4), Src expression does not affect damage-induced up-regulation of p53 or its binding to the p21waf1 promoter. In addition, several damage responses seem to be equal in control or Src-expressing cells, suggesting that Src does not diminish Adriamycin-induced DNA damage. Instead, we have found that Src prevents p21waf1 induction by activating the expression of Myc and its binding to the p21waf1 promoter, where Myc is known to act as a negative regulator of p21waf1 transcription (22, 23). Src was shown previously to induce Myc via the STAT3 transcription factor (18, 19), and here, we have confirmed that Src stimulates the binding of STAT3 to the Myc promoter.

Remarkably, we have also found that p21waf1 inhibits the expression of Myc, an effect that is apparently mediated by p21-STAT3 interactions at the Myc promoter. On cytokine stimulation, we have shown recently that STAT3 activates its target genes through its binding to histone acetyltransferases, such as NCoA1/SRC-1a or CBP. In addition, this transcription factor also associates with BRG1, the ATPase subunit of the SWI/SNF chromatin-remodeling complex, and with cdk9, the elongating kinase of the P-TEFb complex (29-31). p21waf1 is known to inhibit transcription of multiple genes through a variety of indirect mechanisms (32) and we speculate that the STAT3-p21waf1 complex confers a repressive state on chromatin to prevent the recruitment of the initiation complex and inhibit transcriptional elongation. Inhibition of Myc transcription by



**Figure 7.** The expression of Myc is inhibited by p21waf1. A, asynchronously growing cells expressing Src were either left untreated or treated with IPTG as indicated. The expression of Myc was then analyzed by Western blot analysis (lanes 1 and 2) and tubulin expression was monitored as a control. In parallel, total RNA was prepared and 20  $\mu$ g RNA was subjected to Northern blot analysis (lanes 3 and 4) using a human Myc cDNA probe. The membrane was striped and reprobbed with a 18S oligonucleotide (bottom). B, HT1080 control cells were transfected with the HBM-Luc reporter gene (500 ng) in the presence or absence of vectors expressing p21waf1 or Src (500 ng). Cytoplasmic extracts were then prepared and processed to measure luciferase activity (the mean of five transfections  $\pm$  SD is shown). C, soluble chromatin was prepared from asynchronously growing cells treated or not with IPTG for 8 hours and immunoprecipitated with the indicated antibodies. The final DNA extractions were amplified using a pair of primer that covers the Myc proximal promoter.

p21waf1 is likely to augment p21waf1-induced cell cycle arrest, whereas inhibition of p21waf1 induction by Myc provides a positive feedback loop that amplifies the effect of the Src-Myc pathway (Fig. 1).

Figure 1 also shows that Src inhibits the apoptotic response by activating antiapoptotic proteins Bcl-XL and Akt kinase (and possibly some other proteins that were not assayed here). Although apoptosis is only a minor response to DNA damage in wild-type HT1080 cells (14, 15), the induction of antiapoptotic proteins by Src may be important to counterbalance the proapoptotic effect of Myc. Despite lower apoptosis, the overall

extent of drug-induced cell death is similar in Src-expressing and control cells, with higher levels of necrosis compensating for the decrease in apoptosis in Src-expressing cells. It is interesting to compare the effects of Src on drug response in HT1080 cells with the previously described effect of p53 inhibition, which also prevents p21waf1 induction by drug treatment (4). Although p53 inhibition also drastically decreased the induction of senescence by Adriamycin, it also produced an increase in apoptosis and overall cell death. The antiapoptotic effects of Src explain why the overall amount of cell death was not significantly enhanced, and as a result, the antisenesescence activity increased the overall clonogenic survival.

The effects of Src on cell cycle checkpoints are of special interest. Adriamycin arrests HT1080 cells preferentially in G<sub>2</sub>, an effect that can be explained either by the induction of G<sub>2</sub> checkpoint arrest as a consequence of drug-induced DNA damage or by the inhibition of topoisomerase II, the target of Adriamycin, which is required for DNA segregation during late S and G<sub>2</sub>. Because Src-expressing cells efficiently enter mitosis in the presence of Adriamycin, drug interaction with topoisomerase II is insufficient for G<sub>2</sub> arrest. The progression into mitosis of Src-expressing cells can be explained by the failure of drug-treated cells to induce p21waf1, an important contributor to the G<sub>2</sub> checkpoint (3). On the other hand, we have not investigated whether Src may also affect the ATM/ATR pathways, the other key regulators of the G<sub>2</sub> checkpoint. Remarkably however, this mitosis does not result in successful cell division and Src-expressing cells reenter the interphase without dividing and subsequently re-replicate DNA, doubling their ploidy. In normal cells, such re-replication is prevented by the G<sub>1</sub> tetraploidy checkpoint, which is regulated by p53 and p21waf1 (5). Besides the abrogation of the G<sub>2</sub> checkpoint, the effect of Src on p21waf1 expression could therefore also contribute to the failure of G<sub>1</sub> tetraploidy checkpoint.

An important correlation exists between STAT3 activation and oncogenic transformation by Src (18, 33, 34). Because other oncoproteins also activate the STAT3-Myc signaling pathway, our results suggest that cancer cells expressing the v-Abl, Lck, or v-Fps kinases might also be resistant to DNA-damaging drugs. Interestingly, we have already observed that the expression of p21waf1 is inhibited in glioblastoma cells (31) and the same effect has also been reported during progression of human malignant melanomas (35). Because Myc is highly expressed in glioblastoma cells due to STAT3 activation, we speculate that p21waf1 down-regulation leads to decreased senescence and increased drug resistance in these cell lines. If correct, this hypothesis would suggest that the Myc and STAT3 oncogenes cooperate to induce not only cell transformation but also drug resistance.

## Acknowledgments

Received 2/10/2005; revised 6/26/2005; accepted 7/13/2005.

**Grant support:** Ligue Pour la Recherche Sur le Cancer, Comite Departemental de Maine et Loire grant (O. Coqueret), Ligue Nationale Pour la Recherche Sur le Cancer fellowship (A. Vigneron), and NIH grants RO1 CA89636 and RO1 AG17921 (L.B. Roninson).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank Drs. J. Bromberg and S. Ait-Si-Ali for the gift of expression vectors and antibodies and Robert Filmon and the Service Commun d'Imageries et d'Analyses Microscopiques de l'Universite d'Angers for technical assistance in confocal microscopy.

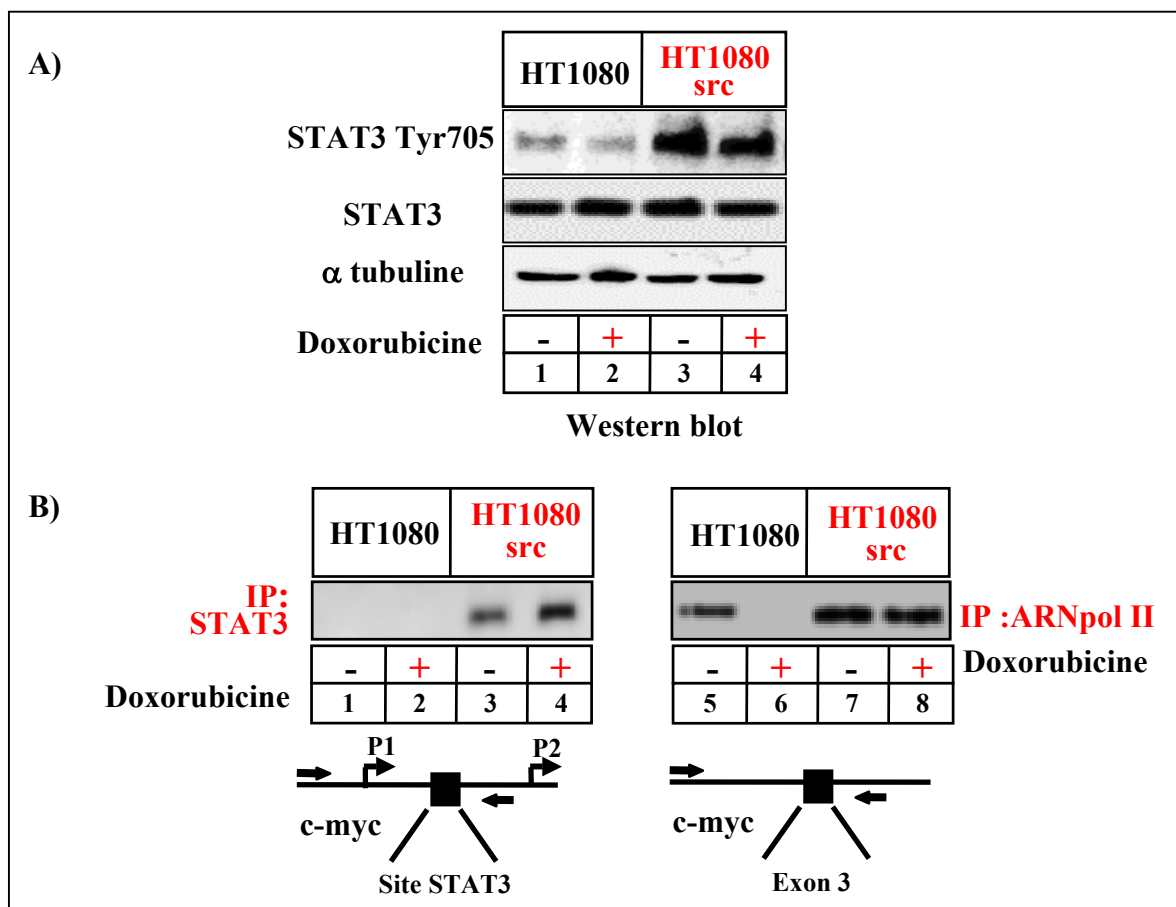
## References

1. Shay JW, Roninson IB. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* 2004;23:2919–33.
2. Brown JM, Wilson G. Apoptosis genes and resistance to cancer therapy: what does the experimental and clinical data tell us? *Cancer Biol Ther* 2003;2:477–90.
3. Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature* 1996;381:713–6.
4. Chang BD, Xuan Y, Broude EV, et al. Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene* 1999;18:4808–18.
5. Andreassen PR, Lacroix FB, Lohez OD, Margolis RL. Neither p21WAF1 nor 14-3-3 $\sigma$  prevents G<sub>2</sub> progression to mitotic catastrophe in human colon carcinoma cells after DNA damage, but p21WAF1 induces stable G<sub>1</sub> arrest in resulting tetraploid cells. *Cancer Res* 2001;61:7660–8.
6. Andreassen PR, Lohez OD, Margolis RL. G<sub>2</sub> and spindle assembly checkpoint adaptation, and tetraploidy arrest: implications for intrinsic and chemically induced genomic instability. *Mutat Res* 2003;532:245–53.
7. Gudkov AV, Komarova EA. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:117–29.
8. Roman-Gomez J, Castillejo JA, Jimenez A, et al. 5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21(CIP1/WAF1/SDI1) gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99:2291–6.
9. Allan LA, Duhig T, Read M, Fried M. The p21(WAF1/CIP1) promoter is methylated in Rat-1 cells: stable restoration of p53-dependent p21(WAF1/CIP1) expression after transfection of a genomic clone containing the p21(WAF1/CIP1) gene. *Mol Cell Biol* 2000;20:1291–8.
10. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/*neu*-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* 2001;3:245–52.
11. Westbrook TF, Nguyen DX, Thrash BR, McCance DJ. E7 abolishes Raf-induced arrest via mislocalization of p21(Cip1). *Mol Cell Biol* 2002;22:7041–52.
12. Slupianek A, Schmutte C, Tomblin G, et al. BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol Cell* 2001;8:795–806.
13. Johnson D, Agochiya M, Samejima K, Earnshaw W, Frame M, Wyke J. Regulation of both apoptosis and cell survival by the v-Src oncoprotein. *Cell Death Differ* 2000;7:685–96.
14. Pellegata NS, Antoniono RJ, Redpath JL, Stanbridge EJ. DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a reevaluation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:15209–14.
15. Chang BD, Broude EV, Dokmanovic M, et al. A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res* 1999;59:3761–7.
16. Chang BD, Watanabe K, Broude EV, et al. Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:4291–6.
17. Bienvenu F, Gascan H, Coqueret O. Cyclin D1 represses STAT3 activation through a Cdk4-independent mechanism. *J Biol Chem* 2001;276:16840–7.
18. Bromberg JF, Horvath CM, Besser D, Lathem WW, Darnell JEJ. Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol* 1998;18:2553–8.
19. Bowman T, Broome MA, Sinibaldi D, et al. Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:7319–24.
20. McKenna WG, Weiss MC, Endlich B, et al. Synergistic effect of the v-myc oncogene with H-ras on radioresistance. *Cancer Res* 1990;50:97–102.
21. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, et al. Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene* 2004;23:4362–70.
22. Seoane J, Le HV, Massague J. Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 2002;419:729–34.
23. Herold S, Wanzel M, Beuger V, et al. Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol Cell* 2002;10:509–21.
24. Gartel AL, Ye X, Goufman E, et al. Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:4510–5. Epub 2001 Mar 27.
25. Facchini LM, Chen S, Marhin WW, Lear JN, Penn LZ. The Myc negative autoregulation mechanism requires Myc-Max association and involves the c-myc P2 minimal promoter. *Mol Cell Biol* 1997;17:100–14.
26. Coqueret O, Gascan H. Functional interaction of STAT3 transcription factor with the cell cycle inhibitor p21WAF1/CIP1/SDI1. *J Biol Chem* 2000;275:18794–800.
27. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002;108:153–64.
28. Lee S, Schmitt CA. Chemotherapy response and resistance. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:90–6.
29. Giraud S, Bienvenu F, Avril S, Gascan H, Heery DM, Coqueret O. Functional interaction of STAT3 transcription factor with the coactivator NcoA/SRC1a. *J Biol Chem* 2002;277:8004–11.
30. Giraud S, Hurlstone A, Avril S, Coqueret O. Implication of BRG1 and cdk9 in the STAT3-mediated activation of the p21waf1 gene. *Oncogene* 2004;23:7391–8.
31. Barré B, Avril S, Coqueret O. Opposite regulation of *myc* and p21waf1 transcription by STAT3 proteins. *J Biol Chem* 2003;278:2990–6.
32. Perkins ND. Not just a CDK inhibitor: regulation of transcription by p21(WAF1/CIP1/SDI1). *Cell Cycle* 2002;1:39–41.
33. Yu CL, Meyer DJ, Campbell GS, et al. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* 1995;269:81–3.
34. Turkson J, Bowman T, Garcia R, Caldenhoven E, De Groot RP, Jove R. Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol Cell Biol* 1998;18:2545–52.
35. Florenes VA, Lu C, Bhattacharya N, et al. Interleukin-6 dependent induction of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 is lost during progression of human malignant melanoma. *Oncogene* 1999;18:1023–32.

Résultats supplémentaires non publiés :

**1) STAT3 n'est pas inhibé par la doxorubicine dans les cellules exprimant v-src**

STAT3 est constitutivement activée dans les cellules exprimant v-src par rapport aux cellules contrôles. Nous souhaitons déterminer si un inhibiteur des topoisomérase II modulait l'activité de STAT3 dans ces cellules. L'analyse par western blot de STAT3 montre que le traitement n'inhibe pas l'activation de STAT3. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine nous ont permis de détecter STAT3 sur le promoteur de c-myc en association avec la forme élongatrice de l'ARN polymérase II. Ainsi ces résultats suggèrent que STAT3 permet de maintenir l'expression de c-myc en présence du traitement à la doxorubicine.

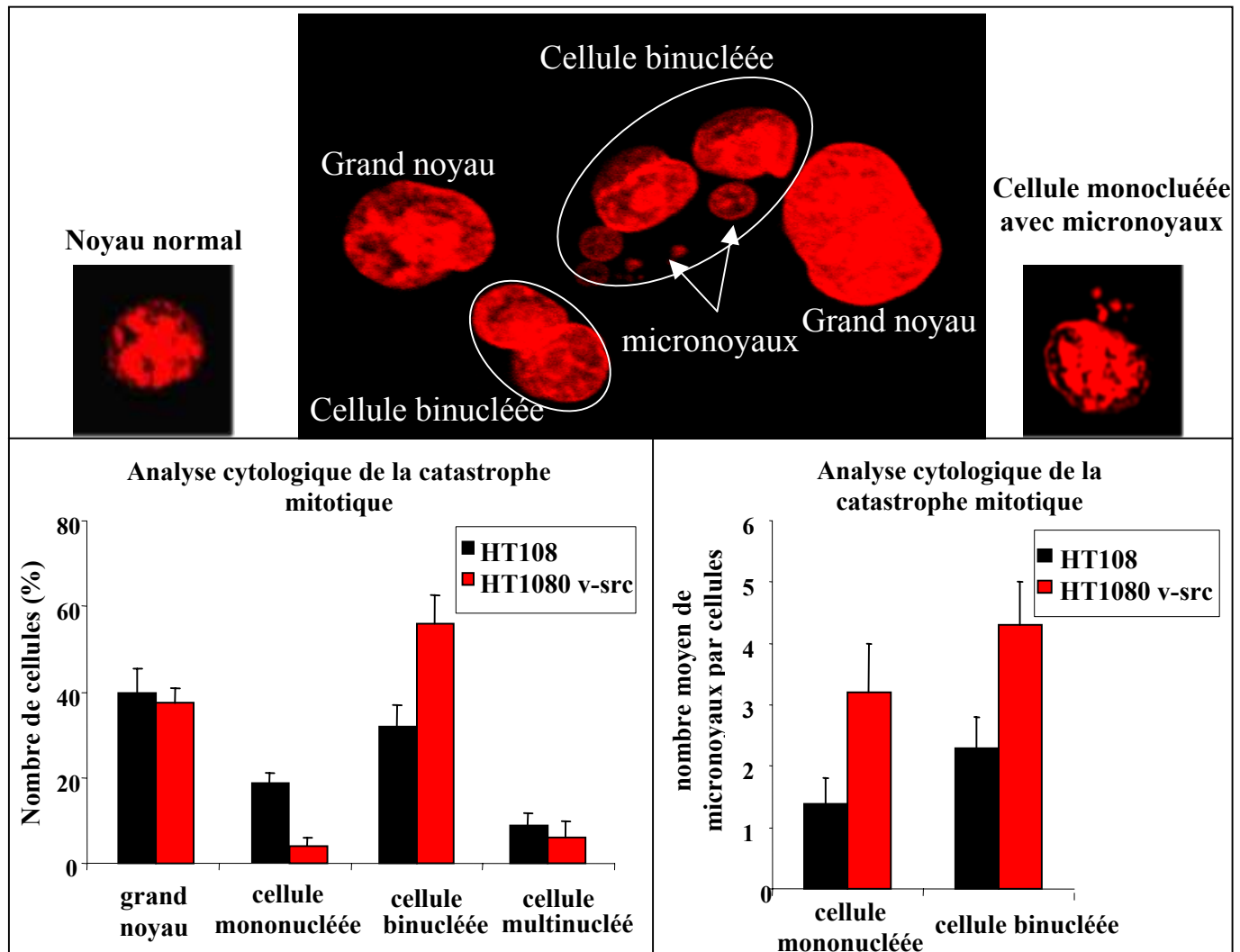


**Figure 35 :** STAT3 est actif sur le promoteur de c-myc dans les cellules exprimant v-src lors d'un traitement à la doxorubicine

- A. Des extraits totaux sont réalisés à partir de cellules contrôles et exprimant l'oncogène v-src traitées ou non à la doxorubicine pendant 36h. Les extraits sont analysés par Western blot avec des anticorps dirigés contre la forme phosphorylée de STAT3 sur la tyrosine 705, le domaine C-terminal de STAT3 ou l'α tubuline.
- B. Les mêmes cellules traitées de façon identique sont soumises à des expériences d'immunoprécipitation de chromatine avec des anticorps dirigés contre STAT3 et l'ARN polymérase II respectivement sur le promoteur de c-myc (ligne1-4) et sur le dernier exon du gène (ligne5-8)

**2) L'analyse cytologique des cellules HT1080 et HT1080 v-src suggère que ces dernières entrent en mitose avec un plus grand nombre de dommage sur l'ADN.**

L'entrée en mitose des cellules traitées par la doxorubicine induit une catastrophe mitotique caractérisée ici par la présence de cellules binucléées, micronucléées et multinucléées et par des cellules présentant un noyau anormalement grand. Nous avons quantifié le nombre de chaque type observable dans la lignée contrôle et la lignée exprimant l'oncogène v-src.



**Figure 36 :** La structure nucléaire des cellules exprimant l'oncogène v-src est plus altérée que celle des cellules contrôles lors de la catastrophe mitotique.

Les cellules HT1080 exprimant v-src et les cellules contrôles sont cultivées sur lame de verre et traitées ou non à la doxorubicine respectivement durant 36h et 72h, permettant d'observer la cytologie des cellules ayant subi une catastrophe mitotique. Après une déshydratation à l'éthanol, les noyaux sont marqués par l'Iodure de propidium. La morphologie générale du ou des noyaux et le nombre de micronoyaux par cellule sont alors analysés. 200 noyaux ayant subi une catastrophe mitotique de chaque type cellulaire sont analysés par expérience, les résultats présentés étant une moyenne de trois expériences.



Les cellules binucléées sont produites au cours de la mitose lorsqu'un chromosome ou un morceau de chromosome est présent au niveau du sillon de division et empêche la cytotélière. Les chromatides sœurs des chromosomes fusionnés, mal répliqués ou mal décaténés ne peuvent ainsi être dissociés au cours de l'anaphase, et produisent des cellules binucléées. Les micronoyaux quant à eux correspondent à de petits morceaux de chromosomes issus de cassures doubles brins de l'ADN générées par l'inhibiteur des topoisomérases II, les intermédiaires de recombinaison (action des endonucléases) ou les tensions s'exerçant sur les chromatides incapables d'être ségrégués. Finalement, les cellules à grand noyau sont vraisemblablement des cellules ayant adapté le point de contrôle du fuseau mitotique sans anaphase et cytokinèse. Ces cellules ne présentent pas généralement de micronoyaux.

Les résultats présentés figure 36 montrent que le nombre de cellules binucléées est plus important dans les cellules exprimant l'oncogène v-src que dans les cellules contrôles. L'analyse du nombre de micronoyaux dans les cellules mononucléées à noyau normal et dans les binucléées montrent également que le nombre de micronoyaux par cellule est plus important dans les cellules surexprimant v-src que dans les fibrosarcomes contrôles. Ces résultats suggèrent qu'au moment où ces cellules sont entrées en mitose, les problèmes structurels de l'ADN étaient plus importants dans les cellules exprimant v-src que dans les cellules contrôles. L'entrée rapide en mitose des cellules v-src pourrait s'accompagner d'un grand nombre de régions mal répliquées et mal décaténées tel que les sites communs de fragilité nécessitant l'activité des topoisomérases II. Dans les cellules contrôles, le point de contrôle de la phase G2 est en revanche susceptible de permettre la résolution de ces problèmes au moins de façon partielle (la cellule a plus de temps pour répliquer ces sites).

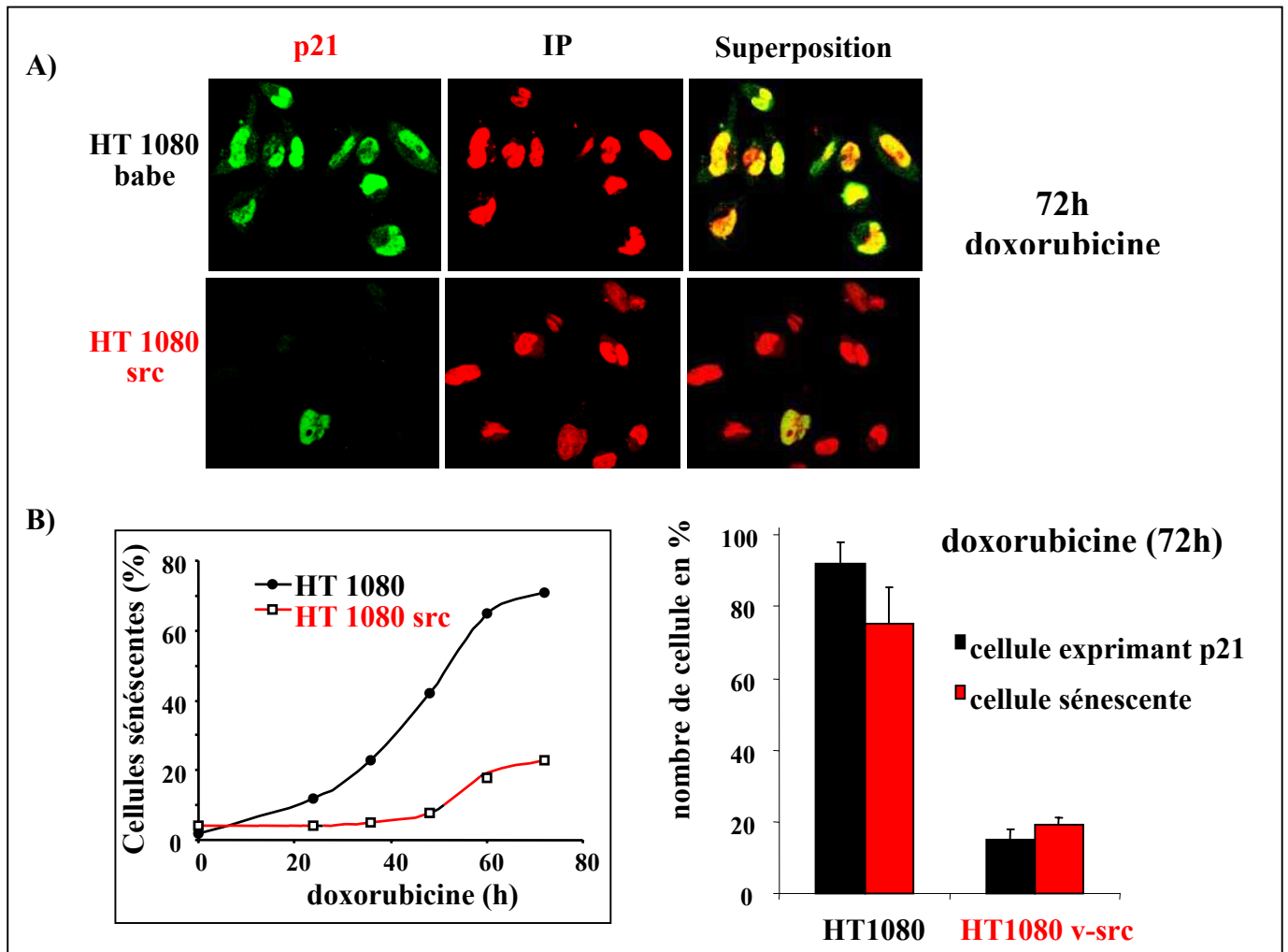
Le dernier point à mentionner est le rôle que pourrait avoir le point de contrôle du fuseau mitotique. La formation d'une cellule binucléée nécessite au préalable l'activation de l'anaphase. La présence de chromatides incapables d'être ségrégués empêche théoriquement l'activation de l'anaphase. Ainsi l'analyse cytologique des cellules v-src peut aussi être interprétée comme une dérégulation du point de contrôle du fuseau mitotique. Cette hypothèse est plausible car des travaux du laboratoire montrent que le facteur de transcription c-myc (constitutivement actif dans les cellules exprimant v-src) induit une dérégulation de la protéine Aurora A, protéine impliquée dans le contrôle du fuseau mitotique.

### **3) L'activation de p21 et du programme de sénescence dans les cellules exprimant v-src n'est pas supprimée mais limitée à quelques cellules.**

Les expériences de western blot montrent que p21 n'est pas activé de manière efficace dans les cellules HT1080 v-src traitées à la doxorubicine. Cependant l'analyse de l'activité  $\beta$  galactosidase à pH 6 indique qu'une proportion non négligeable de ces cellules sont quand même capables d'adopter le phénotype sénescence. De plus l'activation de p21 de manière exogène induit également ce phénotype dans ces cellules. A partir de ceci, nous souhaitons déterminer si l'activation de p21 était faible de façon homogène dans toutes les cellules ou si au contraire la majorité des cellules ne l'exprimait pas tandis qu'une minorité l'exprimait de façon normale expliquant de ce fait l'apparition du phénotype sénescence dans ces cellules.

L'analyse par immunofluorescence de l'expression de p21 dans les deux types cellulaires traitées à la doxorubicine montre que p21 est présent de façon importante dans le noyau des cellules contrôles. Dans les cellules exprimant v-src, p21 n'est absolument pas détectable dans la majorité des cellules. En revanche quelques cellules l'expriment de façon normale par rapport aux cellules contrôles (figure 37A). Ce résultat suggère ainsi une relation d'exclusivité entre la répression de c-myc et celle de p21. Dans les cellules v-src, dans la majorité des cellules, c-myc empêche l'expression de p21 par les mécanismes décrits précédemment. Cependant une diminution de l'expression de c-myc même modérée permet sans doute l'induction limitée de p21 dans un premier temps qui inhibe STAT3 et facilite alors la répression transcriptionnelle de myc, ce qui permet d'amplifier l'activation de p21 par p53 et de mettre en place le programme de sénescence. Le taux de cellules capables d'activer p21 est ainsi extrêmement bien corrélé à celui des cellules rendues sénescence dans la lignée exprimant v-src (figure 37B).

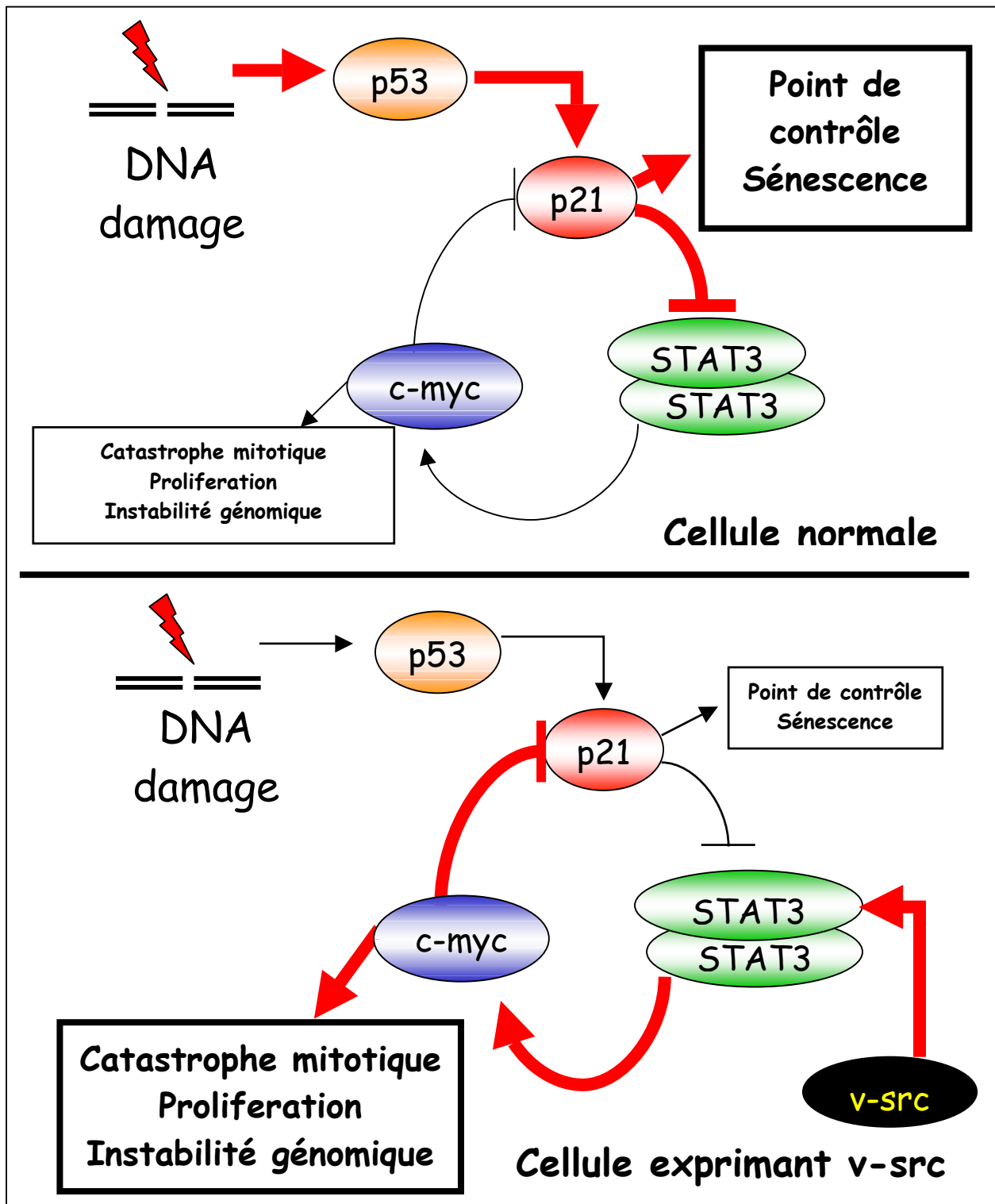
L'autre hypothèse est que les cellules exprimant v-src capables d'induire p21 sont des cellules ayant perdu le vecteur codant l'oncogène v-src. Cependant cette hypothèse est peu probable car une analyse par immunofluorescence des cellules HT1080 v-src, avec un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de STAT3, révèle que les cellules exprimant p21 possèdent toujours une forme constitutivement active de STAT3 (résultat non montré).



**Figure 37 :** La sénescence et p21 sont activées par la doxorubicine dans une minorité des cellules exprimant v-src

- A. Les deux types cellulaire traités 72h à la doxorubicine (30nM) sont analysés par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre p21 et avec l'Iodure de propidium comme marqueur de l'ADN.
- B. Les mêmes cellules sont traitées durant 72 heures à la doxorubicine (30nM). A intervalle de temps régulier la proportion de cellules sénéscentes est quantifiée par analyse de l'activité endogène de la  $\beta$  galactosidase à pH 6. Le taux de cellules sénéscentes à 72h de traitement est alors mis en relation avec le taux de cellules exprimant p21.

**Schéma conclusion de la troisième partie :**



*Figure 38 : La voie oncogénique Src-STAT3 inhibe la réponse aux dommages de l'ADN et induit l'instabilité génomique des cellules traitées par les inhibiteurs de topoisomérases II.*

Partie 4 : L'inhibition de la voie EGFR c-src  
réduit la réparation des dommages de  
l'ADN.

Le cetuximab est un anticorps monoclonal dirigé contre l'EGFR approuvé comme traitement contre les cancers colorectaux métastatiques. Il est utilisé en combinaison avec l'irinotecan, un inhibiteur des topoisomérases I qui induit un blocage de la réplication et des cassures de l'ADN. Les lignées colorectales HT29 et HCT116 sont peu sensibles au cetuximab. L'inhibition de la protéine tyrosine kinase c-src dans ces cellules en association avec le cetuximab les sensibilise au sn38, métabolite actif de l'irinotecan. Nous montrons alors que l'inhibition de la voie EGFR c-src limite l'activation du facteur de transcription STAT3 et des kinases ERKs en réponse au sn38 et que l'activation de STAT3 par le sn38 induit son recrutement sur les promoteurs du gène EME1. STAT3 active ce gène qui favorise alors la réparation des dommages de l'ADN induit par le sn38. L'inhibition de la voie EGFR c-src s'oppose donc à ce mécanisme, limitant ainsi la réparation des dommages de l'ADN. Ces données indiquent que l'activation de c-src peut être un facteur important dans la réponse au traitement associant le cetuximab et l'irinotecan. Son inhibition, qui limite la réparation des dommages de l'ADN pourrait alors augmenter l'efficacité d'un tel traitement.

## **INTRODUCTION**

Le cancer colorectal est l'un des plus problématiques, autant en terme de morbidité que de mortalité. La réponse au traitement des cancers de haut grade, notamment métastatiques reste ainsi très faible avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 10% chez les patients présentant des métastases (392).

La plupart des cancers colorectaux métastatiques présentent des taux et une activité anormalement élevés de la protéine c-src (51). c-src est une protéine tyrosine kinase impliquée dans la transduction du signal émis des récepteurs aux facteurs de croissance, en particulier l'EGFR (345). c-src permet le recyclage du récepteur à la membrane et favorise ainsi l'activation des différentes protéines cibles de l'EGFR comme les MAPK ERK, la voie des PI3K AKT ou la PLC $\gamma$  (51). Plus spécifiquement, c-src permet l'activation des facteurs STAT3 par l'EGFR en phosphorylant la tyrosine 845 de l'EGFR lors de son activation. Cette phosphorylation permet le recrutement de STAT3 au niveau de l'EGFR et son activation par les activités kinases de l'EGFR ou de c-src (393).

L'expression anormale de l'EGFR a été reportée dans un nombre important de tumeurs épithéliales, base sur laquelle le développement d'inhibiteur spécifique de l'EGFR s'est appuyé (394). Ces inhibiteurs et plus précisément le cetuximab, un anticorps monoclonal

dirigé contre l'EGFR, sont approuvés pour le traitement des cancer colorectaux métastatiques en association avec l'irinotecan, un inhibiteur des topoisomérases I. En dépit d'un taux de réponse objectif chez une petite fraction de patient (192), les effets précis du cetuximab sur la réponse à l'irinotecan et les facteurs importants pour cette réponse ne sont pas clairement déterminés (197).

Le traitement à l'irinotecan induit un complexe stable entre le sn38, métabolite actif de la drogue, l'ADN coupé sur un brin, et la topoisomérase I (184). Ce complexe appelé complexe ternaire induit un blocage de la réplication cellulaire et des cassures doubles brins de l'ADN responsables de son activité antitumorale (395). La réparation des dommages est l'un des éléments déterminants dans la capacité des cellules à survivre au traitement. Les endonucléases Mus81-Eme1 ont ainsi un rôle sans doute important car des mutants de ces protéines chez la levure sont hypersensibles aux inhibiteurs de topoisomérase I (396). L'un des modes d'action possible de l'EGFR est l'inhibition des systèmes de réparation de l'ADN bien que ceci ne soit pas encore démontré pour les dommages induits par le sn38.

D'après ces informations, nous avons souhaité analyser les effets de l'inhibition de c-src sur la réponse au traitement couplant le sn38 et le cetuximab. Nous avons réalisé cette étude dans deux lignées cellulaires colorectales HCT116 et HT29. Nous choisissons ces lignées car elles présentent des caractéristiques très différentes. La première est de phénotype MIN et déficiente pour la protéine p16 . La lignée HT29 à l'inverse est de phénotype CIN et ne possède pas d'activité associée à p53 . Nous montrons que l'inhibition de c-src sensibilise ces deux lignées au traitement associant le cetuximab et le sn38. La caractérisation de cet effet nous a conduit à montrer que l'inhibition de la voie EGFR c-src limite la réparation des dommages de l'ADN induits par le sn38 en réprimant l'activation transcriptionnelle des endonucléases Eme1-Mus81 par le facteur de transcription STAT3.

## RESULTATS

### *L'inhibition de c-src sensibilise les lignées colorectales à un traitement associant le cetuximab et un inhibiteur de topoisomérase I (Src kinase inhibitor I (SKI))*

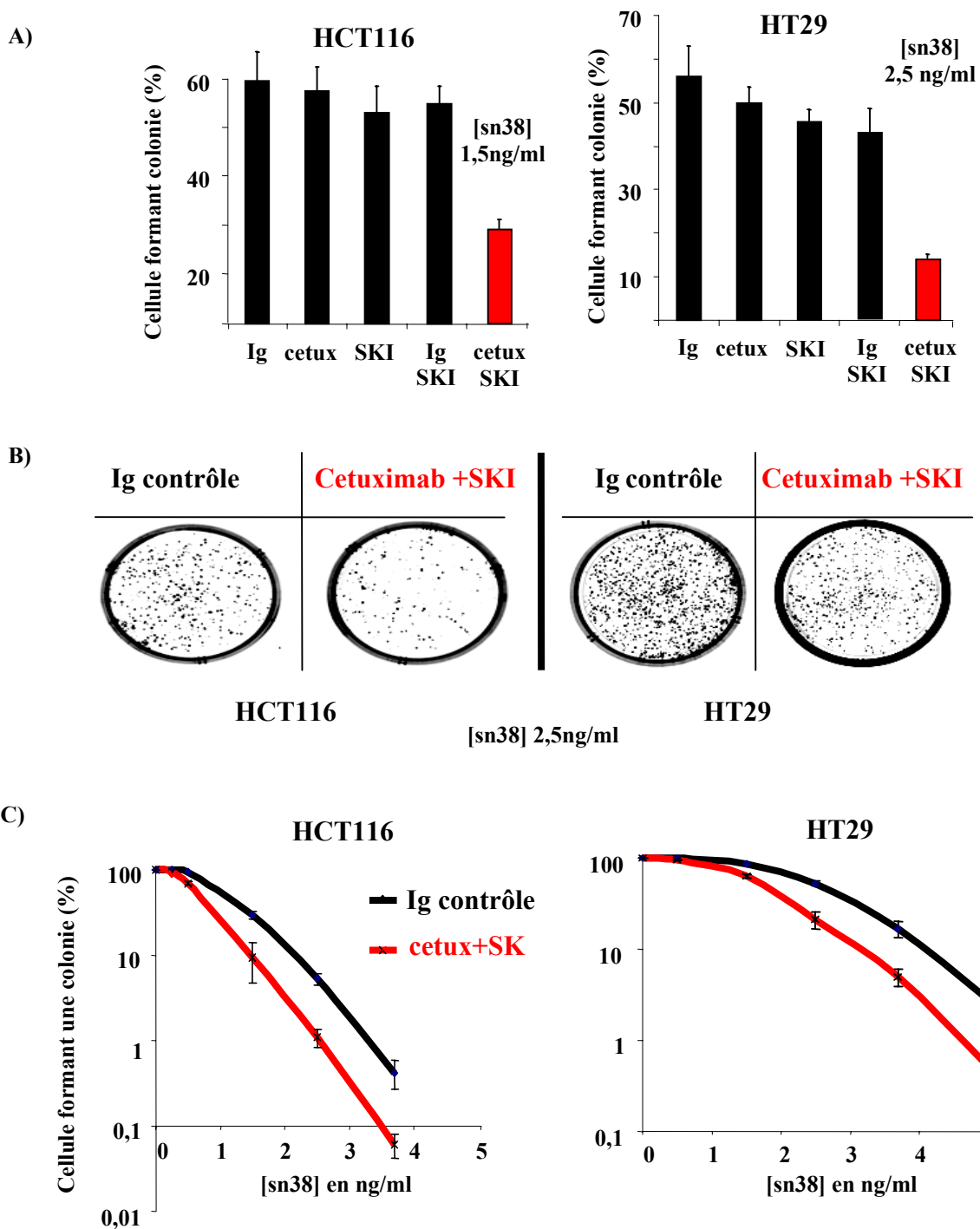
Afin d'analyser les effets du cetuximab et de l'inhibiteur de c-src sur la réponse au sn38, un test de clonogénicité est réalisé dans les cellules colorectales HCT116 et HT29. Le test de clonogénicité permet de déterminer les effets du traitement en tenant compte des effets cytostatiques et cytotoxiques à long terme du sn38 et est donc plus relevant qu'un test classique de mesure d'apoptose.

Le traitement au sn38 inhibe la clonogénicité des deux types cellulaires de façon dose-dépendante, mais la lignée HCT116 présente une sensibilité accrue au traitement (figure 39A et 39C). Ces résultats sont en accord avec ceux indiquant que les lignées colorectales de types MIN sont hypersensibles à un traitement par les camptothécines (397). Le même traitement en présence de cetuximab ou d'inhibiteur de src induit des effets similaires et ne modifie pas les résultats du test (figure 39A). En revanche, un traitement couplant le cetuximab, l'inhibiteur de src et le sn38 réduit de façon non négligeable la clonogénicité des deux lignées cellulaires par rapport à celle mesurée lors d'un traitement au sn38 seul (figure 39A-C). D'après ces résultats nous concluons que le cetuximab et l'inhibiteur de src utilisés de façon cumulée augmentent la sensibilité des cellules HCT116 et HT29 au sn38.

### *Régulation de la voie EGFR- c-src par le sn38, le cetuximab et l'inhibiteur de c-src*

Afin de comprendre les effets du cetuximab et de l'inhibiteur de c-src sur les deux lignées, nous avons souhaité analyser l'activation et l'expression des différentes protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'EGFR1. Le traitement au sn38 induit les phosphorylations activatrices de l'EGFR1 sur les tyrosines 845 et 1173 (figure 40A) dans les deux lignées. La tyrosine 1173 phosphorylée active la phosphatase SHP1 impliquée dans l'activation des protéines kinases ERK et c-src tandis que la tyrosine 845 est spécifiquement phosphorylée par la kinase src (398;399). Le sn38 induit donc l'activation de la protéine c-src, activation détectée par la phosphorylation de la tyrosine 418 (figure 40B). Le cetuximab et l'inhibiteur de c-src utilisés seul inhibent modérément les effets du sn38, en revanche utilisés de façon cumulée, ils inhibent complètement les deux phosphorylations activatrices de l'EGFR1 (figure 40A).





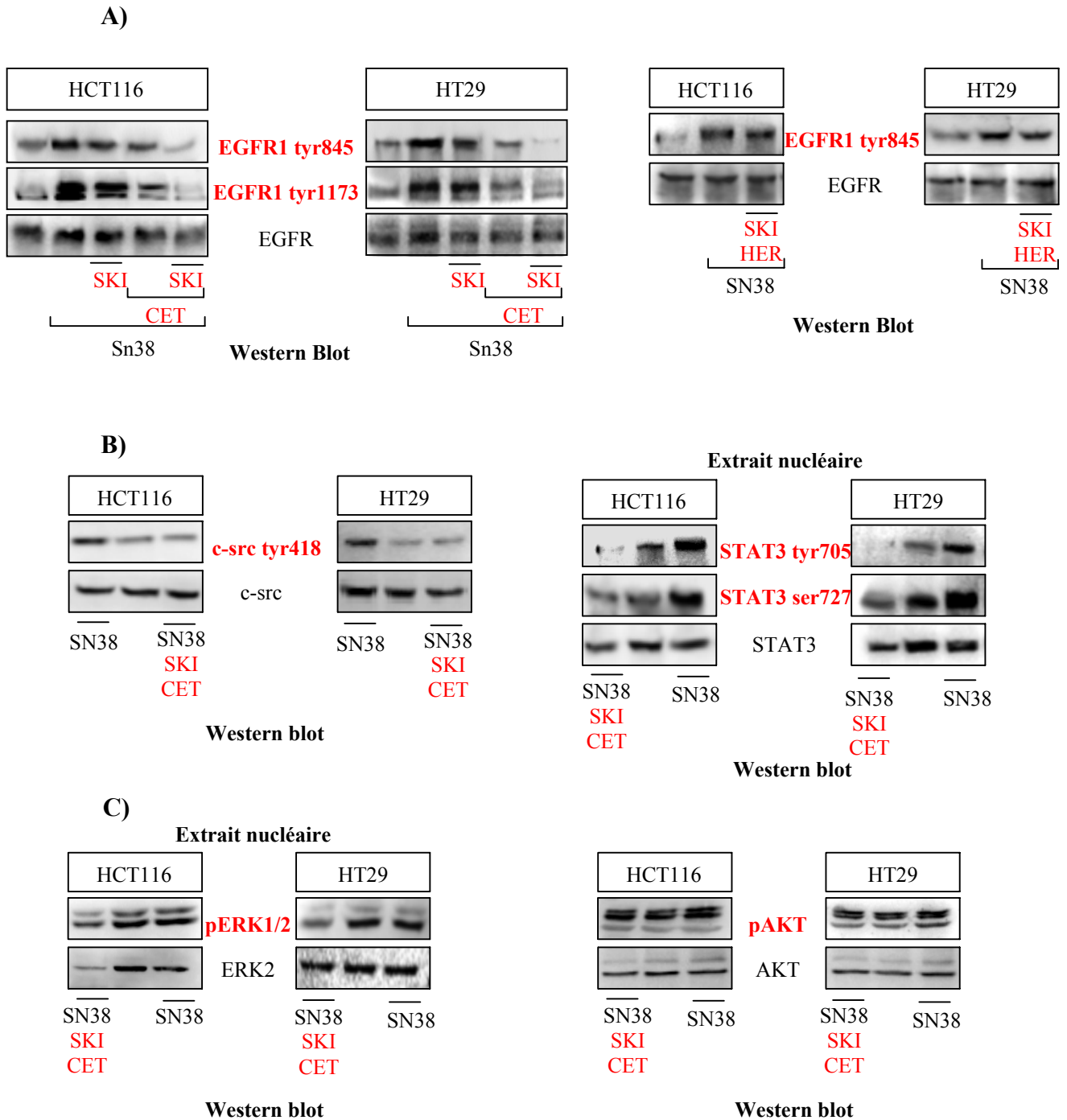
**Figure 39 : L'association cetuximab SKI sensibilise les lignées HCT116 HT29 au sn38**

- A. 10000 cellules des lignées HCT116 et HT29 sont mises en culture et incubées 48h avec les doses indiquées de sn38 auquel on ajoute, ou pas, une Ig contrôle, le cetuximab et le SKI. Après 48h le milieu de culture est remplacé par un milieu sans sn38 contenant, ou pas, du cetuximab et le SKI. 10 jours plus tard, les cellules ayant formé une colonie sont alors comptabilisées, après marquage de leur ADN au BET, grâce au logiciel Quantity One (Biorad). Leur nombre est rapporté à celui de cellules n'ayant pas subi de traitement et les résultats représentent la moyenne de trois expériences.
- B. Images prises grâce au logiciel Quantity one représentative de l'expérience précédente
- C. Les mêmes expériences sont réalisées avec une gamme de concentration de sn38 allant de 0 à 5 ng/ml. Les résultats sont présentés sous forme de courbe semi-logarithmique et représentent la moyenne de trois expériences

De façon analogue, l'activation par le sn38 de la protéine c-src est inhibée par un traitement au cetuximab et à l'inhibiteur de c-src (figure 40B). Afin de tester la spécificité du traitement par le cetuximab et l'inhibiteur de c-src, nous réalisons les mêmes expériences en présence d'Herceptin, un anticorps monoclonal dirigé contre l'EGFR2. Contrairement aux résultats obtenus en présence de cetuximab, le traitement des cellules par l'Herceptin et l'inhibiteur de c-src n'empêche pas l'activation de l'EGFR1 par le sn38.

Nous décidons alors d'analyser les effets du traitement couplant le cetuximab et l'inhibiteur de c-src sur la voie de signalisation induite lors de l'activation des kinases EGFR-c-src par le sn38 dans les cellules HCT116 et HT29. Parmi les protéines activées spécifiquement par le couple EGFR-c-src on trouve les facteurs de transcription STAT3. Le traitement au sn38 augmente les formes nucléaires phosphorylées sur la sérine 727 et la tyrosine 705 de STAT3 (figure 40B). Le traitement au sn38 induit également la phosphorylation de la sérine 727 au niveau du cytoplasme, en particulier dans les cellules HCT116 (résultats non montré). En revanche, le même traitement en présence de cetuximab et d'inhibiteur de c-src n'induit pas l'apparition des formes nucléaires phosphorylées de STAT3 (figure 40B) tandis qu'il induit toujours la phosphorylation cytoplasmique de la sérine 727 de STAT3 (résultat non montré). D'après ces résultats nous concluons que l'inhibition de la voie EGFR-c-src empêche l'activation de STAT3 par le sn38.

Finalement afin d'étudier la spécificité des effets observés sur STAT3, nous analysons l'expression des protéines ERK et AKT lors d'un traitement au sn38 en présence de cetuximab et d'inhibiteur de c-src. Le traitement par le sn38 augmente la phosphorylation des kinases ERK au niveau du cytoplasme, en particulier dans les cellules HCT116 (résultat non montré) et n'a pas d'effet sur la phosphorylation d'AKT (figure 40C). En présence de cetuximab et d'inhibiteur de c-src, la phosphorylation des kinases ERK est réduite au sein du noyaux (figure 40C), mais pas au niveau du cytoplasme (résultat non montré). Enfin la phosphorylation des protéines AKT n'est pas modifiée. Ces résultats montrent ainsi que le cetuximab et l'inhibiteur de c-src empêchent de manière spécifique l'induction par le sn38 des phosphorylations activatrices des kinases ERK et des facteurs de transcription STAT3 au sein du noyau.



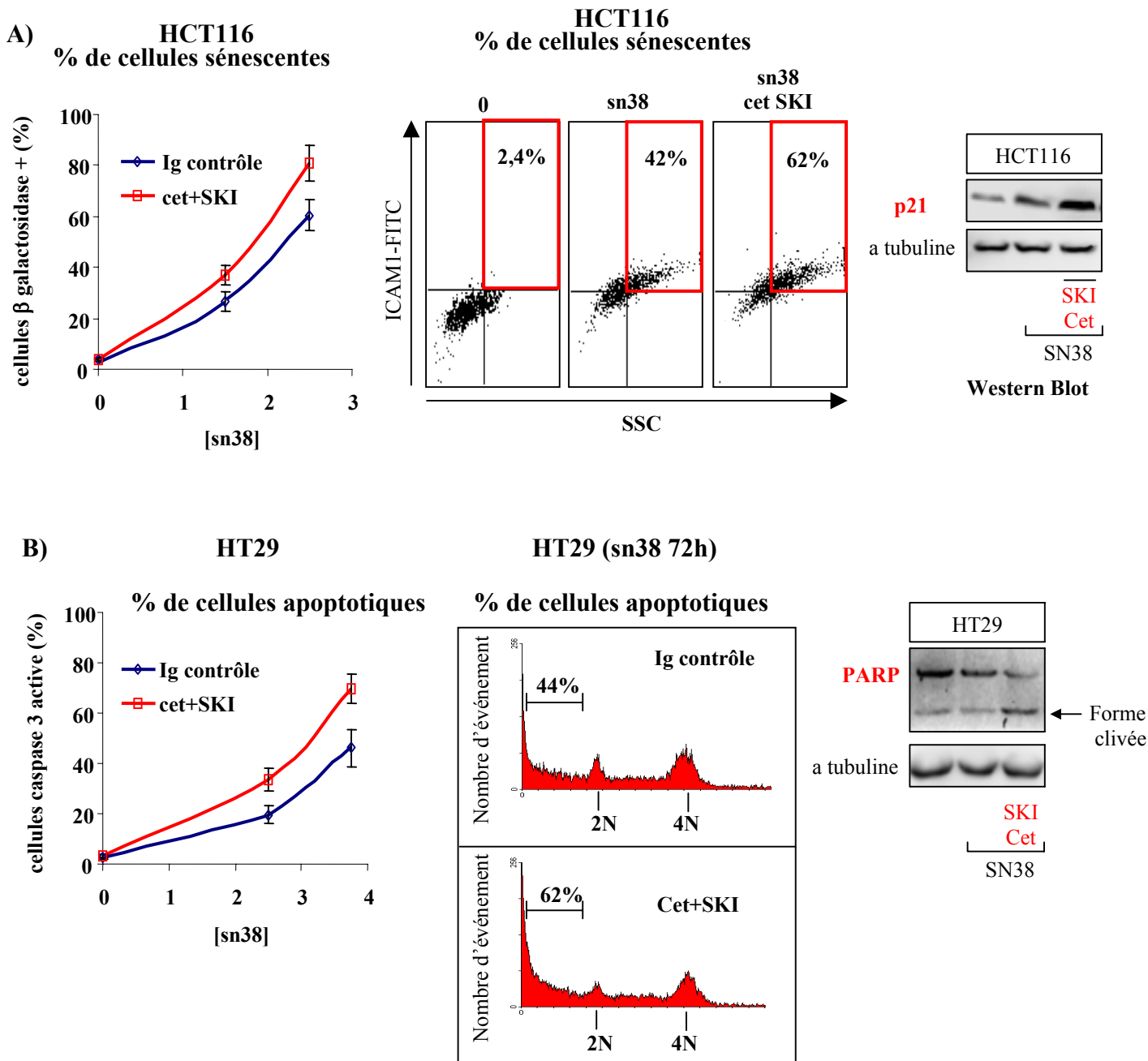
**Figure 40 :** L'association cetuximab SKI inhibe l'activation de l'EGFR par le sn38

- Des extraits protéiques totaux sont réalisés à partir de cellules HCT116 et HT29 traitées ou non 24h au sn38 auquel on ajoute ou pas, une Ig contrôle, le cetuximab et le SKI. Les extraits sont ensuite analysés par Western blot avec des anticorps dirigés contre deux formes phosphorylées de l'EGFR1 et l'EGFR1 total. La même expérience est ensuite réalisée en remplaçant le cetuximab par de l'herceptin, un anticorps monoclonal dirigé contre l'EGFR2
- Des extraits totaux ou nucléaires (chromatine + nucleoplasme) sont réalisés à partir des mêmes cellules traitées ou non 24h au sn38 en présence d'une Ig contrôle ou du cetuximab plus l'inhibiteur de c-src. Les extraits totaux et nucléaires sont respectivement analysés par Western blot avec des anticorps dirigés contre les protéines phosphorylées (tyrosine 418) ou totales de c-src et les protéines phosphorylées (sérine727 et tyrosine 705) ou totales de STAT3.
- Les mêmes extraits nucléaires et totaux sont respectivement analysés par Western blot contre les formes phosphorylées ou totales des protéines ERK1/2 et contre les formes phosphorylées ou non des protéines AKT.

*Le cetuximab et l'inhibiteur de c-src augmente la sénescence des HCT116 et l'apoptose des HT29 induites par le sn38*

Des études ont montré que les camptothécines induisent en fonction du type cellulaire analysé la sénescence associée aux dommages de l'ADN ou l'apoptose (263). Nous testons ainsi l'activation de ces phénotypes dans les cellules HCT116 et HT29. Le traitement au sn38 induit principalement de la sénescence dans les cellules HCT116 tandis qu'il induit l'apoptose de manière tardive dans les cellules HT29 (figure 41A-B). La sénescence est mesurée après 72 heures de traitement grâce à l'activité  $\beta$ galactosidase à pH 6,0. Les résultats obtenus sont ensuite confirmés par la mesure par cytométrie de flux de la granulosité cellulaire et l'expression de Icam-1, facteurs associés à la sénescence (400;401). En présence d'inhibiteur de c-src, de cetuximab et de sn38, la proportion de cellules HCT116 qui possèdent une activité  $\beta$ galactosidase ou une surexpression membranaire d'Icam-1 couplée à une granulosité importante augmente par rapport à un traitement au seul sn38 (figure 41A). Pour confirmer ces résultats, nous analysons l'expression de p21 qui active la sénescence cellulaire. Les résultats montrent que le cetuximab et l'inhibiteur de c-src augmentent l'expression de p21 induite par le sn38. D'après ces résultats, nous concluons que le cetuximab et l'inhibiteur de c-src augmentent l'activation de la sénescence induite par le sn38, dans la lignée HCT116, à travers l'activation de p21.

L'apoptose est analysée dans les cellules HT29 après 72 heures de traitement grâce à l'activité de la caspase 3 mesurée par cytométrie de flux. Les résultats sont ensuite confirmés par l'analyse en cytométrie de flux des cellules possédant une quantité d'ADN en SubG1. En présence d'inhibiteur de c-src de cetuximab et de sn38, l'activité de la caspase 3 et la proportion de cellules en SubG1 augmentent par rapport à celle détectée lors d'un traitement au seul sn38 (figure 41B). Pour confirmer ces résultats nous analysons le clivage de la protéine PARP par l'activité intracellulaire des caspases. Le sn38 induit effectivement le clivage de PARP, clivage augmenté lors du même traitement en présence de cetuximab et d'inhibiteur de c-src. D'après ces résultats nous concluons que le cetuximab et l'inhibiteur de c-src augmentent l'apoptose induite dans la lignée HT29 par un traitement au sn38.



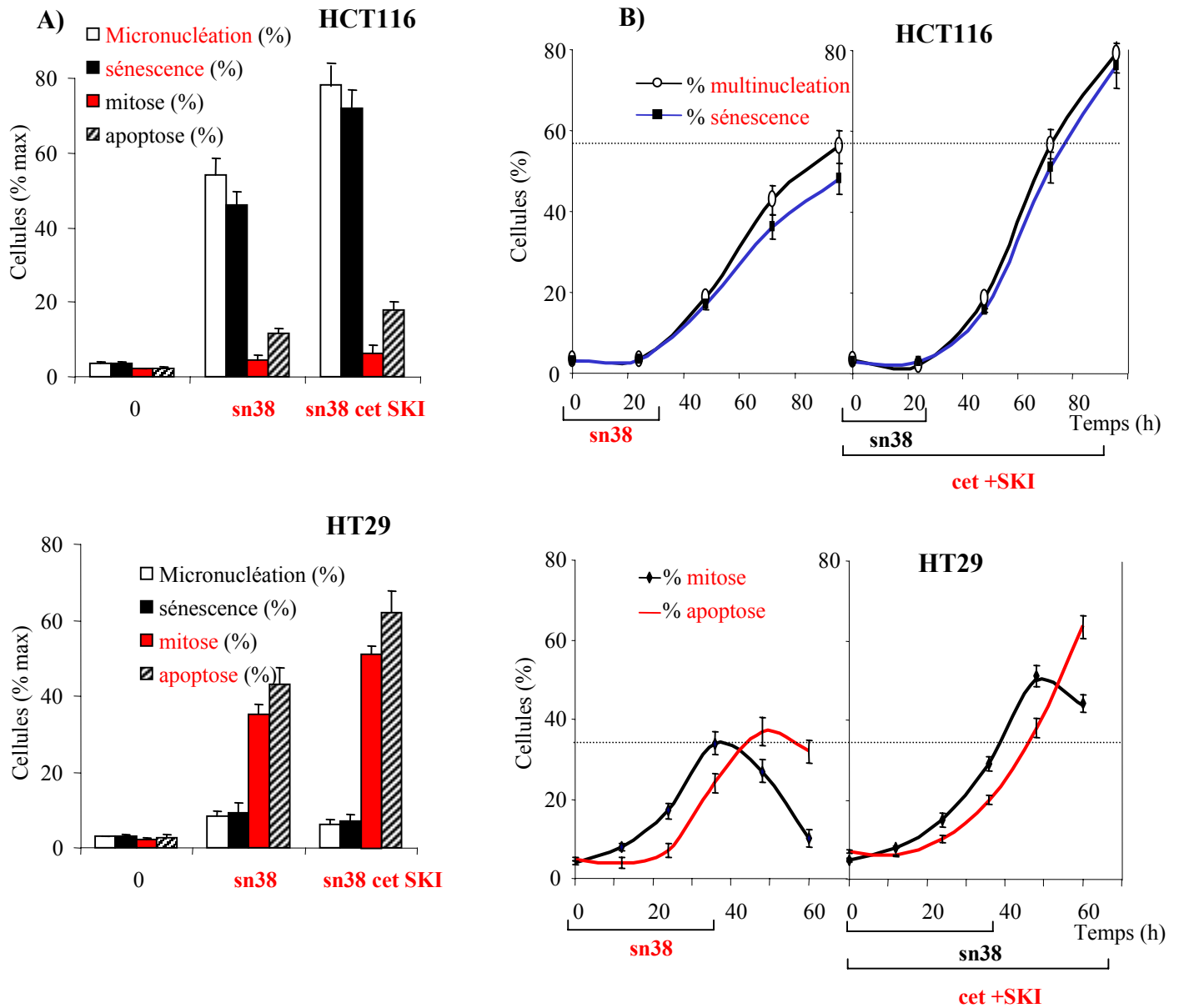
**Figure 41 :** Activation de la sénescence ou de l'apoptose par le cetuximab et l'inhibiteur de c-src

- A. L'activité  $\beta$ galactosidase de cellules HCT116 traitées 72h avec des doses croissantes de sn38 en présence ou non d'inhibiteur de c-src et de cetuximab est mesurée à pH 6,0. Environ 500 cellules sont analysées et les résultats présentés représentent la moyenne de trois expériences. Des cellules HCT116 subissant les mêmes traitements sont ensuite marquées par un anticorps couplé au FITC dirigé contre le récepteur membranaire Icam-1. La granulométrie (SSC) et la fluorescence associée à Icam-1 d'environ 5000 cellules sont alors mesurées simultanément par cytométrie de flux. Finalement l'expression de p21 est analysée dans ces mêmes cellules par Western blot.
- B. L'activité de la caspase 3 est mesurée par cytométrie de flux dans les cellules HT29 traitées selon le même protocole que celui utilisé ci-dessus pour la lignée HCT116. La proportion de cellules possédant une quantité d'ADN inférieure à 2N (Sub G1) est également mesurée par cytométrie de flux après marquage de l'ADN à l'Iodure de propidium. Enfin le clivage de la protéine PARP par l'activité des caspases est analysé par Western Blot.

*L'inhibiteur de c-src et le cetuximab augmente la catastrophe mitotique induite par le sn38*

La sénescence ou l'apoptose induite par le sn38 sont associées à la catastrophe mitotique subie par les cellules qui entrent en mitose malgré la présence de dommages importants dans leur ADN. Nous analysons alors la présence de telles mitoses ou les cellules multinucléées générées par ces mitoses. Les cellules en mitose sont détectées après marquage de la sérine 10 phosphorylée de l'Histone H3 par cytométrie de flux. Les résultats montrent que les cellules HT29 déficientes pour la protéine p53 entrent rapidement en mitose (36 heures) malgré le traitement au sn38 et activent sans doute le point de contrôle du fuseau mitotique car la proportion de cellules en mitose augmente de façon dramatique au cours du traitement (figure 42A). A l'inverse nous ne détectons pas de telles augmentations au sein des cellules HCT116. En revanche, après un temps assez long (72heures), nous détectons dans ces cellules la présence en quantité importante de cellules multinucléées (binucléation et micronucléation) au sein de la population, ce qui indiquent que ces cellules sont entrées en mitose, mais sans activation du point de contrôle du fuseau mitotique (figure 42A). Ces cellules sont par contre très peu présentes au sein de la lignée HT29. En présence de cetuximab et d'inhibiteur de c-src, ces effets du sn38 sont exacerbés.

Finalement afin de mettre en relation la catastrophe mitotique et l'apoptose ou la sénescence selon le type cellulaire étudié, nous réalisons une cinétique d'induction de la catastrophe mitotique au sein des deux lignées que nous comparons avec la cinétique d'induction de l'apoptose ou de la sénescence. Les résultats présentés figure 42B montrent que l'apparition des cellules apoptotiques suit l'apparition des cellules mitotiques au sein de la lignée HT29. Ainsi ces résultats suggèrent que l'activation du point de contrôle du fuseau mitotique plus importante en présence de cetuximab et d'inhibiteur de c-src est responsable de l'activation de l'apoptose plus importante en présence de ces mêmes inhibiteurs. De façon analogue, l'apparition au sein de la lignée HCT116 des cellules multinucléées est corrélée à la détection des cellules sénescents, ce qui suggère encore une fois que les effets des inhibiteurs de la voie EGFR-c-src sont dus à l'augmentation de la catastrophe mitotique (figure 42B).



**Figure 42 :** Les inhibiteurs du complexe EGFR c-src augmentent la catastrophe mitotique induite par le sn38.

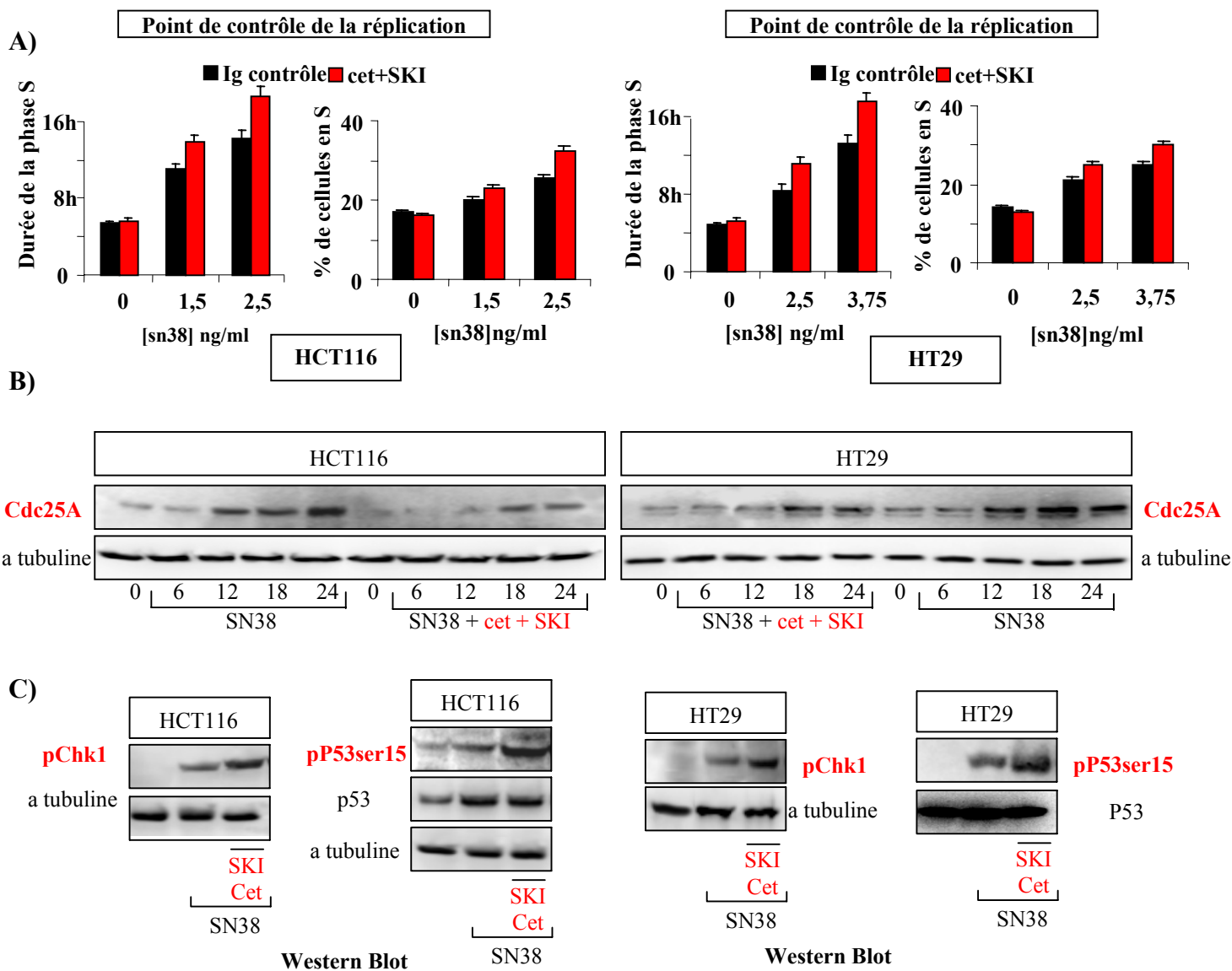
- A. Les cellules HCT116 HT29 sont traitées au sn38 en présence ou en absence de cetuximab et d'inhibiteur de c-src. Les cellules sont alors alternativement marquées par un anticorps fluorescent dirigé contre la forme phosphorylée de l'histone H3 sur la sérine 10, par un inhibiteur de la caspase 3 active, par cytochimie ou par analyse de l'activité  $\beta$ galactosidase. Ces quatre marqueurs permettent de mettre respectivement en évidence la mitose, l'apoptose, la multinucléation et la sénescence. Les résultats représentent les pourcentages maximum obtenus indépendamment du temps auquel ils ont été mesurés. Ces résultats sont moyennés par rapport à trois expériences indépendantes
- B. Les cellules HCT116 HT29 sont traitées au sn38 selon une cinétique allant de 0 à 96 heures, en présence ou en absence de cetuximab et d'inhibiteur de c-src. Les mêmes marquages que précédemment sont réalisés et les différents pourcentages obtenus sont mis en relation avec le temps de traitement.

*Effet des inhibiteurs de c-src EGFR sur l'activation du point de contrôle de la réplication induit par le sn38*

Après avoir testé les effets des inhibiteurs de la voie EGFR-c-src sur l'activation de la catastrophe mitotique par le sn38, nous souhaitons de façon similaire tester leurs effets sur l'activation du point de contrôle de la réplication. Nous mesurons alors, par la méthode de Begg et McNally (402), la durée de la phase S au cours du traitement des lignées HCT116 et HT29. La réplication de l'ADN est brièvement (30 min) mesurée par incorporation du BrDU dans l'ADN. La progression des cellules marquées à travers la phase S est alors mesurée. Le traitement au sn38 induit ainsi une augmentation importante du temps nécessaire à la réplication des deux lignées (figure 43A). Le même traitement en présence de cetuximab et d'inhibiteur de c-src augmente encore le temps nécessaire à la réplication. De façon attendue, la proportion de cellule en phase S augmente lors du traitement au sn38, augmentation légèrement accentuée par le cetuximab et l'inhibiteur de c-src.

Nous décidons alors d'analyser l'expression des protéines impliquées dans le point de contrôle de la phase S dans les deux lignées. Nous analysons tout d'abord, l'expression de la protéine cdc25A qui est dégradée lors de l'activation du point de contrôle. L'expression de cdc25A augmente au cours du traitement par le sn38 reflétant sans doute l'augmentation de la proportion de cellule en phase S. Cependant en présence de cetuximab et d'inhibiteur de c-src, l'augmentation de cdc25A est réduite par rapport à celle observée en présence du seul sn38 (figure 43B). Sachant que la proportion de cellule en phase S est plus importante dans ces conditions, la diminution d'expression de cdc25A suggère que la protéine est activement dégradée par le point de contrôle de la réplication. Afin de confirmer ces résultats, nous analysons par Western blot la phosphorylation des protéines chk1 et de la sérine 15 de p53. Ces phosphorylations sont spécifiques des protéines kinases ATR activées par l'inhibition de la réplication. De plus chk1 induit la dégradation des cdc25A. Les résultats montrent que le sn38 induit ces phosphorylations dans les deux lignées cellulaires (figure 43C). En présence des inhibiteurs d'EGFR c-src, ces phosphorylations sont activées de façon plus importantes, ce qui confirme et explique les résultats précédents. Ainsi, le cetuximab et l'inhibiteur de src renforcent l'activation du point de contrôle de la phase S induit par le sn38.





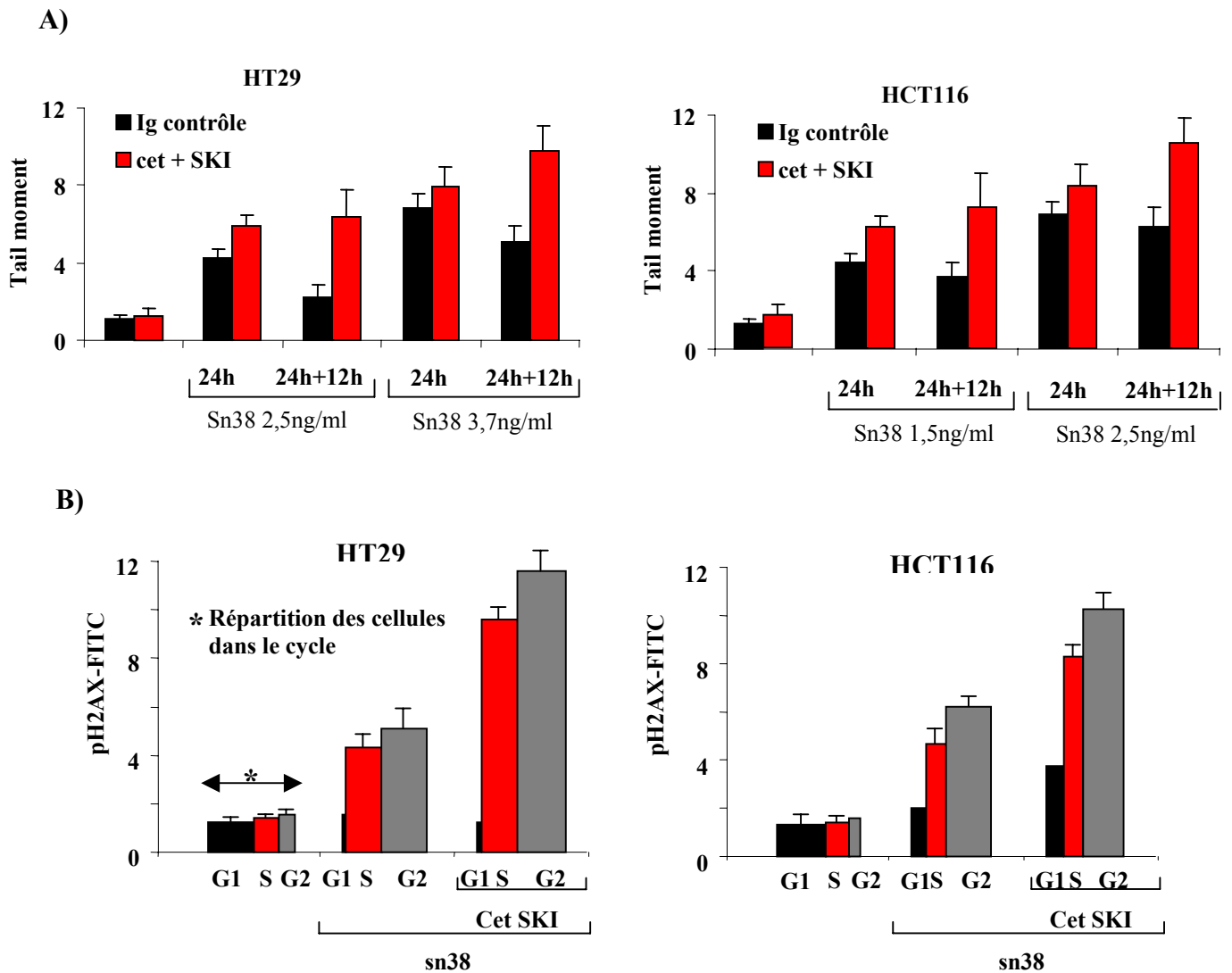
**Figure 43 :** Le cetuximab et l'inhibiteur de c-src renforcent l'activation du point de contrôle de la réplication induit par le sn38

- Les cellules HT29 ou HCT116 traitées au sn38 selon les doses indiquées en présence ou en absence de cetuximab et d'inhibiteur de c-src sont incubées 30 min avec du BrdU. Les cellules sont ensuite analysées immédiatement ou quatre heures plus tard par cytométrie de flux après marquage de l'ADN au Iodure de propidium. La durée de la phase S est alors calculée selon la méthode de Begg et Mc Nelly. La proportion de cellule en phase S est également déterminée.
- Des extraits cellulaires totaux sont réalisés à partir des cellules HCT116 ou HT29 traitées par le sn38 durant les temps indiqués, en présence ou en absence de cetuximab et d'inhibiteur de c-src. Les extraits sont alors analysés par Western blot avec un anticorps dirigé contre cdc25A ou l' $\alpha$  tubuline comme contrôle de charge.
- Des extraits cellulaires totaux sont réalisés à partir des cellules HCT116 ou HT29 traitées 24 heures par le sn38, en présence ou en absence de cetuximab et d'inhibiteur de c-src. Les extraits sont alors analysés par Western blot avec des anticorps dirigés contre les formes phosphorylées de chk1 et de la sérine 15 de p53 ou contre les formes totales de ces protéines.

### *Le cetuximab et l'inhibiteur de c-src augmentent les dommages de l'ADN induits par le sn38*

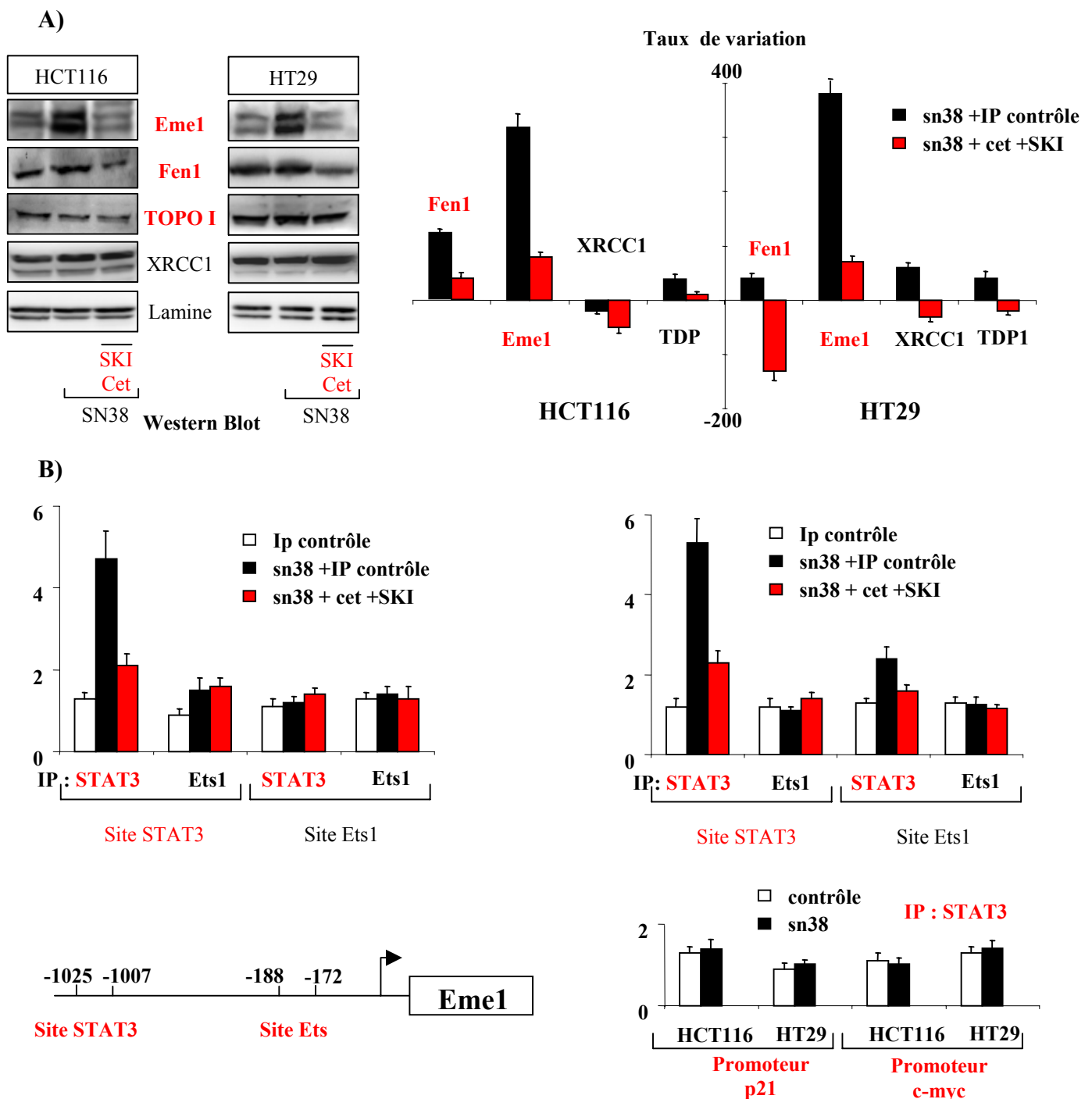
L'un des facteurs qui régule l'activation du point de contrôle de la réplication et la catastrophe mitotique est la quantité de dommages de l'ADN produits par le sn38. Les résultats des figures 42 et 43 laissent ainsi supposer que le cetuximab et l'inhibiteur de c-src augmentent ces dommages de l'ADN. Afin de tester ceci, nous quantifions les dommages de l'ADN grâce au test du comète en condition alcalin-neutre. Les cellules sont enfermées puis lysées dans de l'agarose. L'ADN est alors soumis à une électrophorèse au cours de laquelle l'ADN endommagé migre plus rapidement que le reste du noyau. La quantité d'ADN endommagé marqué par un intercalant fluorescent peut alors être quantifiée par rapport à l'ADN intègre resté au sein du noyau. Les résultats présentés figure 44A montrent qu'un traitement au sn38 de 36 heures induit l'apparition de dommages de l'ADN dans les deux lignées HCT116 et HT29, dommages peu augmentés par la présence de cetuximab et d'inhibiteur de c-src. 12 heures après lavage du milieu de culture, on remarque que le taux de dommages de l'ADN diminue dans les lignées HCT116 et HT29. En revanche, après lavage, la quantité de dommages de l'ADN continue à augmenter dans les deux lignées en présence des inhibiteurs de la voie EGFR c-src. Ces résultats suggèrent que ces inhibiteurs perturbent plutôt la réparation des dommages de l'ADN que leur induction. Il est ainsi probable que ces inhibiteurs altèrent la réparation des fourches de réplication effondrées à cause de la présence du sn38, plutôt que la régulation des complexes de clivages induit par le sn38.

Afin de confirmer ces résultats, nous quantifions la phosphorylation de H2AX sur la sérine 139 induite par le sn38 dans les deux lignées. Cette phosphorylation est spécifique des cassures doubles brins générées lors de l'effondrement des fourches de réplication (395). Le sn38 induit bien la phosphorylation de H2AX dans les deux types cellulaires. La présence de cetuximab et d'inhibiteur de c-src n'induit pas de modification importante de ceci (résultat non montré) confirmant le fait que ces inhibiteurs n'agissent pas en amont de l'effondrement de la fourche de réplication au niveau du complexe de clivage. En revanche, 12 heures après lavage du milieu de culture, la quantité de pH2AX détectée continue d'augmenter en présence d'inhibiteur de la voie EGFR-c-src tandis qu'elle tend à diminuer en leur absence (figure 44B). On peut remarquer que la phosphorylation de H2AX est associée avec la progression des cellules de la phase G1 vers la phase G2, ce qui est cohérent avec le modèle qui prédit que H2AX est phosphorylée lors de l'effondrement des fourches de réplication au cours de la phase S et qui confirme l'hypothèse selon laquelle le cetuximab et l'inhibiteur de c-src perturbent la réparation des fourches de réplication effondrées.



**Figure 44 :** Le cetuximab et l'inhibiteur de c-src empêchent la réparation des fourches de réplication effondrées par le sn38

- A. Les cellules HCT116 ou HT29 sont traitées ou non par le sn38 en présence ou en absence de cetuximab et d'inhibiteur de c-src durant 24 heures ou durant 24 heures puis 12 heures sans sn38. Les cellules sont mélangées avec de l'agarose et soumises à une électrophorèse. Après marquage de l'ADN au SYBR green, le « tail moment » est calculé grâce au logiciel COMET assay IV.
- B. Les mêmes cellules sont traitées 24 heures au sn38 en présence ou en absence de cetuximab et d'inhibiteur de c-src, puis 12 heures sans sn38. Les cellules sont alors marquées, par un anticorps fluorescent dirigé contre la sérine 139 phosphorylée de H2AX, et par un marqueur de l'ADN (Iodure de propidium). Le cycle cellulaire et la phosphorylation de H2AX sont alors analysés par cytométrie de flux.



*Le cetuximab et l'inhibiteur de c-src empêchent l'activation transcriptionnelle de la protéine Eme1 par STAT3*

Si l'EGFR et la protéine c-src ne perturbent pas la formation du complexe ternaire par le sn38, l'expression des protéines impliqués dans ce mécanisme ne doit pas être altérée par l'inhibition de ces kinases. Nous mesurons alors l'expression de la topoisomérase I dans les lignées cellulaires HCT116 et HT29. Le traitement au sn38 seul ou avec les inhibiteurs de l'EGFR c-src ne modifie pas l'expression de la topoisomérase ce qui constitue une indication confortant l'hypothèse que ces inhibiteurs ne régulent pas la formation des complexes ternaires (figure 45A).

Dans un second temps, nous mesurons l'expression des protéines XRCC1, TDP1, Eme1 et Fen1. Nous choisissons ces protéines pour deux raisons. La première est que l'inhibition de ces protéines induit une hypersensibilité aux camptothécines chez la levure. La seconde est que ces systèmes permettent de supprimer le complexe ternaire en particulier au niveau des fourches de réplication effondrées et peuvent donc être responsables des effets observés sur la figure 44. Les protéines XRCC1-TDP1-Fen1 agissent dans un même complexe tandis que Eme1 est complexée à l'endonucléase Mus81 et permet de l'activer (221;403). Les résultats obtenus par Western Blot et RT-PCR montrent que le sn38 active la transcription et l'expression de la protéine Eme 1 dans les deux types cellulaires, activation en revanche limitée par l'inhibiteur de c-src et le cetuximab (figure 45A). L'expression des autres protéines étudiées n'est pas radicalement altérée par le sn38 dans les deux types cellulaires. Cependant l'expression de Fen1 est légèrement réprimée dans les HT29 par le traitement au cetuximab et l'inhibiteur de c-src. De plus, ces mêmes agents empêchent la légère activation d'expression de Fen1 observée dans les HCT116.

Les résultats indiquant clairement une régulation de Eme1, nous choisissons d'analyser l'occupation du promoteur de Eme1 par divers facteurs de transcriptions. Nous sélectionnons deux régions sur le promoteur susceptible d'être occupées par les facteurs de transcription STAT3 et Ets1-2. Ces deux facteurs sont analysés car les résultats présentés précédemment montrent clairement que STAT3 est régulé par le traitement au sn38 tandis que Ets1 pourrait être régulé via la modulation des MAPK ERKs. (figure 40B-C). Les expériences d'immunoprécipitation de chromatine indiquent que STAT3 est spécifiquement recruté sur le promoteur de Eme1 lors d'un traitement de 24h au sn38. En revanche nous ne sommes pas capables de détecter la présence de Ets-1 (Figure 45B). La régulation de STAT3 par le sn38 semble être très spécifique car d'autres promoteurs cibles de STAT3 ne sont pas occupés par

le facteur de transcription lors du traitement. Ainsi nous ne sommes pas capables de détecter la présence de STAT3 sur le promoteur de c-myc ou sur le promoteur de p21.

Enfin le traitement au sn38 en présence d'inhibiteur de c-src et de cetuximab n'induit plus le recrutement de STAT3. Ces résultats indiquent donc que le cetuximab et l'inhibiteur de c-src empêchent l'activation de Eme1 par le sn38 en inhibant l'activation et le recrutement de STAT3 sur le promoteur du gène (figures 40B et 45B).

Ces effets du cetuximab et de l'inhibiteur de c-src peuvent expliquer les résultats montrant que les lignées HCT116 et HT29 ne peuvent réparer de manière efficace les fourches de réplication effondrées et sont du coup plus sensibles à un traitement au sn38.

## **DISCUSSION**

L'inhibition de l'EGFR est une nouvelle stratégie permettant de combattre le développement tumoral chez le patient, en particulier celui du colon. Les protéines EGFR-c-src toutes les deux surexprimées dans les cancers du colon et nous avons montré que le sn38 induit la phosphorylation spécifique des tyrosines de l'EGFR impliquées dans la voie de signalisation EGFR c-src, ce qui suggérait que l'utilisation d'une combinaison cetuximab inhibiteur de c-src pouvait être intéressante. Nous avons ainsi montré dans ces travaux que l'inhibition de la protéine kinase c-src et de l'EGFR permet de sensibiliser de façon synergique deux lignées colorectales HCT116 et HT29 à un traitement basé sur l'inhibition de la topoisomérase I.

Les travaux présentés montrent que ces inhibiteurs empêchent l'activation et le recrutement spécifique de STAT3 sur le gène de Eme1 par le sn38. Le recrutement de STAT3 étant associé à l'activation d'Eme1, ces inhibiteurs empêchent l'activation de Eme1 par le sn38 et STAT3. Il est intéressant d'observer que STAT3 n'est pas recruté sur certains de ses gènes cibles comme c-myc ou p21. Il est possible que l'activation de STAT3 par le sn38, l'EGFR et c-src soit particulière. Par exemple des travaux ont récemment mis en évidence un complexe STAT3 EGFR sur l'ADN capable de réguler le gène iNOS (404). La présence de l'EGFR dans le complexe transcriptionnel formé par STAT3 pourrait modifier de façon drastique les gènes cibles de STAT3. Des résultats préliminaires montrent ainsi que l'EGFR est présent au sein du noyau après un traitement au sn38 dans les deux lignées cellulaires, et que le cetuximab et l'inhibiteur de c-src inhibent ceci. Ces résultats sont en accord avec les travaux montrant que le cetuximab inhibe la translocation nucléaire de l'EGFR (405)

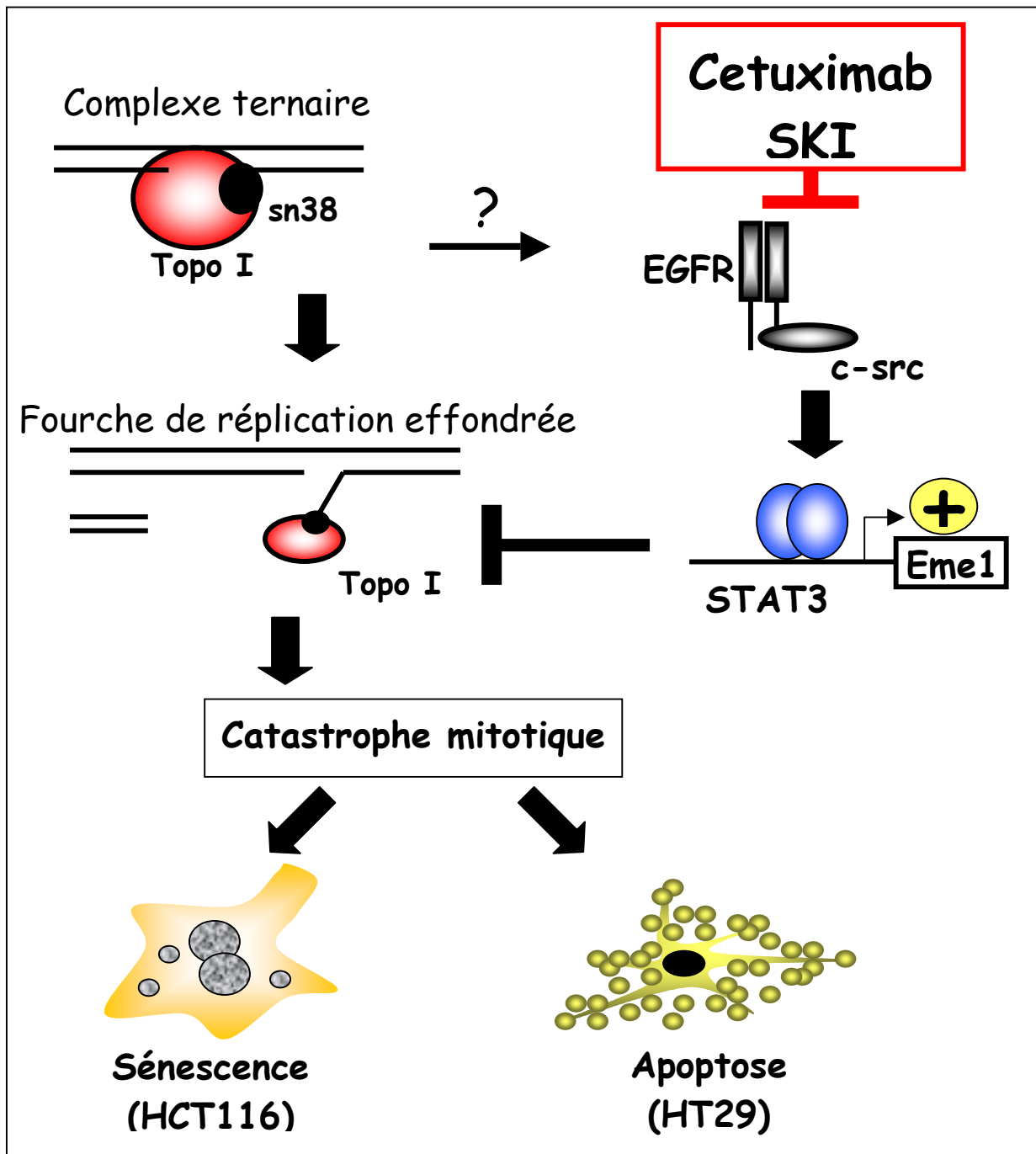
L'inhibition de Eme1 par le cetuximab et l'inhibiteur de c-src est sans doute déterminante dans les effets observés de ces inhibiteurs sur la réponse au sn38 des deux

lignées cellulaires. Eme1 est indispensable à l'activation du complexe endonucléase Eme1-Mus81. Ce complexe permet de supprimer le complexe ternaire des fourches de réplication effondrées, étape indispensable au redémarrage de la réplication par recombinaison homologue. Ainsi, l'inhibition d'Eme1 empêche sans doute le redémarrage de la réplication, et augmente la persistance des cassures doubles brins présentes lors du traitement, la phosphorylation de H2AX étant le témoin de ces événements. La persistance des cassures doubles brins explique bien les résultats montrant que le cetuximab et l'inhibiteur de c-src renforcent le point de contrôle de la réplication induit par le sn38. Il est possible que la légère inhibition d'expression de Fen1 participe à ces événements en inhibant un autre complexe TDP1/XRCC1/Fen1 capable de supprimer le complexe ternaire. La structure 3'FLAP présente au niveau des fourches effondrées, laisse cependant supposer que Eme1-Mus81 a un rôle prépondérant car elle reconnaît de façon très spécifique cette structure (184).

Il est remarquable d'observer que dans les deux types cellulaires, l'inhibition de la réparation des dommages de l'ADN modifie de façon similaire la réponse globale au sn38, indépendamment de la réponse moléculaire. Ainsi, bien que la réponse cellulaire des HCT116 soit plutôt orientée vers la sénescence et la réponse des HT29 orientée vers l'apoptose, les deux inhibiteurs sensibilisent de façon identique les deux lignées. Le point central pourrait être l'induction de la catastrophe mitotique par les dommages de l'ADN. Il est vraisemblable que l'augmentation des dommages de l'ADN présents au cours de la mitose favorise les altérations chromosomiques produites au cours de la catastrophe mitotique entraînant la mort des cellules indépendamment du mode de mort utilisé. Les résultats montrent ainsi que la catastrophe mitotique induite par le sn38 est plus importante en présence des inhibiteurs de la voie EGFR src. On peut à partir de ceci proposer un modèle expliquant les effets du cetuximab et de l'inhibiteur de c-src sur la réponse au sn38 dans les deux types cellulaires (figure 46)

Le dernier point important de ces travaux est la relevance qu'ils ont pour l'utilisation du cetuximab en thérapie clinique. Le cetuximab pourrait ne pas être efficace en présence d'une surexpression de c-src. La détection de c-src serait ainsi prédictive de l'efficacité du traitement. Alternativement, l'inhibition ici de c-src pourrait sensibiliser les patients aux traitements basés sur la combinaison cetuximab sn38. Finalement dans un même ordre d'idée, la détection des protéines impliquées de manière spécifique dans la réparation des dommages de l'ADN serait sans doute plus prédictive que celles impliquées dans le type de réponse induit par le sn38. Le fait que des protéines tel que p53 ou Bcl2 ne prédisent pas bien la réponse au sn38 est en accord avec cette hypothèse (266).

Schéma conclusion de la quatrième partie :

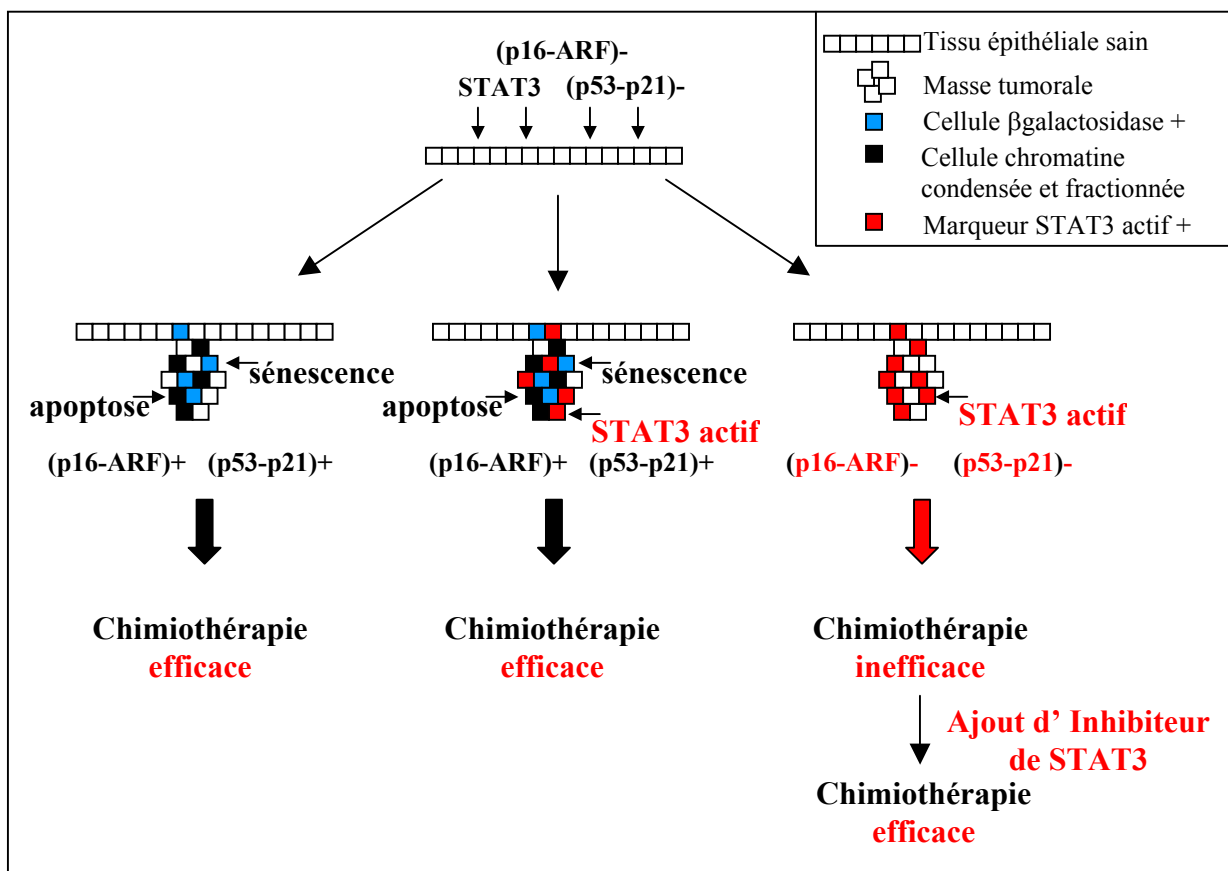


*Figure 46 : Le cetuximab et l'inhibiteur de c-src sensibilisent les lignées colorectales au sn38 en inhibant la réparation des fourches de réplication effondrées.*



Partie 5 : L'oncogène STAT3 comme marqueur  
prédictif de la résistance aux drogues  
antitumorales

La revue présentée dans cette dernière partie résume les différents effets observés de STAT3 au cours de la tumorigenèse, en particulier ceux impliquant l'inhibition de l'apoptose et des différents points de contrôle du cycle cellulaire. D'après nos travaux et ceux de plusieurs autres équipes, nous proposons que les cellules ayant perdu ces différents points de contrôle basés sur les voies p53-p21 ou p16-p14ARF, et exprimant des formes constitutivement actives de STAT3 seraient intrinsèquement résistantes aux divers agents de chimiothérapie. L'implication de ceci est discutée en terme de prédiction de réponse objective aux traitements de chimiothérapie des tumeurs exprimant STAT3, ainsi qu'en terme d'intérêt à utiliser des inhibiteurs spécifiques de STAT3 en complément des chimiothérapies classiques. L'hypothèse issue de cette discussion est schématisée ci-dessous.



**Figure 47 :** Le facteur de transcription STAT3 en tant que marqueur prédictif des réponses aux chimiothérapies

La figure représente les différents profils pouvant être obtenus lors d'un marquage d'une tumeur par immunohistochimie de l'apoptose, la sénescence et STAT3. Nous proposons l'hypothèse selon laquelle la conjugaison de ces trois marqueurs peut prédire la réponse aux chimiothérapies et permettre la sélection des patients susceptibles d'être traités par un inhibiteur spécifique de STAT3.



# The *STAT3* oncogene as a predictive marker of drug resistance

Benjamin Barré<sup>1</sup>, Arnaud Vigneron<sup>3</sup>, Neil Perkins<sup>1</sup>, Igor B. Roninson<sup>2</sup>, Erick Gamelin<sup>3</sup> and Olivier Coqueret<sup>3</sup>

<sup>1</sup> School of Life Sciences, Division of Gene Regulation and Expression, Dundee, DD1 5EH, Scotland, UK

<sup>2</sup> Cancer Center, Ordway Research Institute, Albany, New York, NY 12208, USA

<sup>3</sup> Cancer Center Paul Papin, INSERM U564, Angers 49033, France

**Constitutive activation of *STAT3* (signal transducer and activator of transcription) has been reported in several primary cancers and tumor cell lines where it induces cell transformation through a combined inhibition of apoptosis and cell-cycle activation. Several studies have suggested that *STAT3* prevents cell-cycle arrest and cell death through upregulation of survival proteins and downregulation of tumor suppressors. As a consequence of anti-apoptotic and proliferative lesions, we propose that this oncogenic pathway is also involved in intrinsic drug resistance and that *STAT3*-expressing tumors are resistant to chemotherapeutic agents. If this hypothesis is correct, the detection of the activated form of this protein should help to define subsets of tumors that fail to respond to chemotherapy. Furthermore, interfering with the *STAT3* oncogenic pathway might restore the sensitivity to anticancer drugs.**

## The *STAT3* oncogene

Signal transducer and activator of transcription 3 (*STAT3*) proteins are cytoplasmic transcription factors that translocate into the nucleus following cytokine activation. Binding of growth factors to their receptors activates intracellular kinases such as Janus or SRC that then phosphorylate *STAT3* on a tyrosine residue (705). Although it was initially believed that dimerization is induced by phosphorylation, this long-standing view might be incorrect because recent studies have shown that *STAT* proteins are probably dimerized before cell stimulation and that phosphorylation induces a conformational change in the dimer [1,2]. At the molecular level, *STAT3* proteins act as transcriptional activators and activate their target genes through their association with several coactivator complexes such as steroid receptor coactivator 1a (*NCOA*)–*SRC1a*, cyclin-dependent kinase 9 (*CDK9*) or Brahma-related gene 1 (*BRG1*) [3–5]. These proteins induce local chromatin remodeling at target promoters to enable the loading of the initiation complex. Among the seven *STAT* genes, *STAT3* is the only one that, when ablated causes embryonic lethality and, in adults, its conditional ablation yields important defects in hepatocytes, macrophages, keratinocytes and thymic or mammary epithelial cells [6,7]. Accordingly, *STAT3* has important roles in several

biological responses such as proliferation, differentiation and apoptosis.

In addition to its classic functions, *STAT3* is important in tumorigenesis. In contrast to normal cells where *STAT3* phosphorylation is only transient, its constitutive activation has been reported in several primary cancers, in tumors cell lines and in many oncogene-transformed cells [7–9]. Although naturally occurring mutations of *STAT3* have not been reported, constitutive activation of this transcription factor depends on dysregulated oncogene kinases such as SRC, break cluster region (*BCR*)–*abelson* (*ABL*) or *MET*, or viral oncogenes such as large T [10–12]. Direct evidence that *STAT3* signaling pathway is oncogenic comes from studies that reported that *STAT3* inactivation leads to the inhibition of v-src-mediated cell transformation and that a constitutively activated form of this transcription factor induces tumors in nude mice [11,13]. Recent genetic studies using a *STAT3* conditional knockout have shown that its inactivation is sufficient to prevent induction of skin tumors [14,15]. Using transgenic mouse models, it has also been shown that *STAT3* is required for tumors that are induced by the nucleophosmin (*NPM*)–*anaplastic lymphoma kinase* (*ALK*) oncogene [16]. Furthermore, selection of genetic suppressor elements (*GSEs*), transcriptome-derived transdominant inhibitors that arrest cell growth, highlighted *STAT3* as one of the top genes that gives rise to multiple *GSEs*, indicating that *STAT3* is a key determinant of breast-carcinoma cell proliferation [17]. Although this is not the case in every cell lineages [18–21], *STAT3* has been reported to be dispensable for normal cell growth in fibroblasts [22]. If confirmed, this observation would suggest that therapeutic approaches that target *STAT3* signaling might destroy tumor cells without affecting every normal cell.

At the molecular level, *STAT3* participates in cell transformation through the activation of several genes involved in cell-cycle progression, such as cyclin D1, *MYC* or cell division cycle 25A (*CDC25A*) [23,24]. *STAT3* also upregulates survival genes, such as B-cell CLL/lymphoma (*BCL*)2 and *BCL-XL* [13,25–28], and it induces the expression of genes that are involved in invasion and metastasis, such as the matrix metalloproteinase 9 (*MMP9*) [29]. In addition, *STAT3* prevents telomere shortening through the activation of the catalytic subunit of human telomerase reverse transcriptase gene (*hTERT*) [30]. *MYC*, cyclin D1 and *CDC25A* are crucial mediators

Corresponding author: Coqueret, O. (olivier.coqueret@univ-angers.fr). Available online xxxxxx.

of cell proliferation and cell transformation that get activated during the G1 phase of the cell cycle. Active cyclin-CDK complexes phosphorylate members of the pocket protein family, such as the retinoblastoma protein (RB), to activate E2F transcription factors and induce cell proliferation. Importantly, complete cell-cycle progression relies on the dephosphorylation of CDK2 by the CDC25a phosphatase, and we have recently shown that STAT3 cooperates with MYC to induce the expression of the *CDC25A* gene [23]. Therefore, through a combined upregulation of MYC, cyclin D1 and CDC25A, STAT3 induces S-phase progression through E2F activation and upregulation of DNA replication genes (Figure 1). However, it is important to note that the STAT3 transcriptome is probably cell type and tumor specific. Specifically, it is probable that STAT3-target genes are not the same after cytokine stimulation or in response to oncogenic signaling. For example, although STAT3 binds to the cyclin D1 or survivin promoters in oncogene-transformed cells, this, and its relation with gene activation, remain to be shown upon cytokine stimulation. In addition, it is well known that transcription relies on the association of several DNA-binding proteins, which altogether form an enhanceosome [31]. Despite recent elegant studies [27,32,33], these enhanceosomes remain mostly uncharacterized in the case of STAT3. The association with these DNA-binding partners is likely to depend on the different cell lineages and on the type of stimulation, cytokines or oncogenic kinases. For these reasons, we speculate that the transcriptional activity of STAT3 is reprogrammed during its oncogenic activation and its cancer target genes are not necessarily the same as in normal conditions.

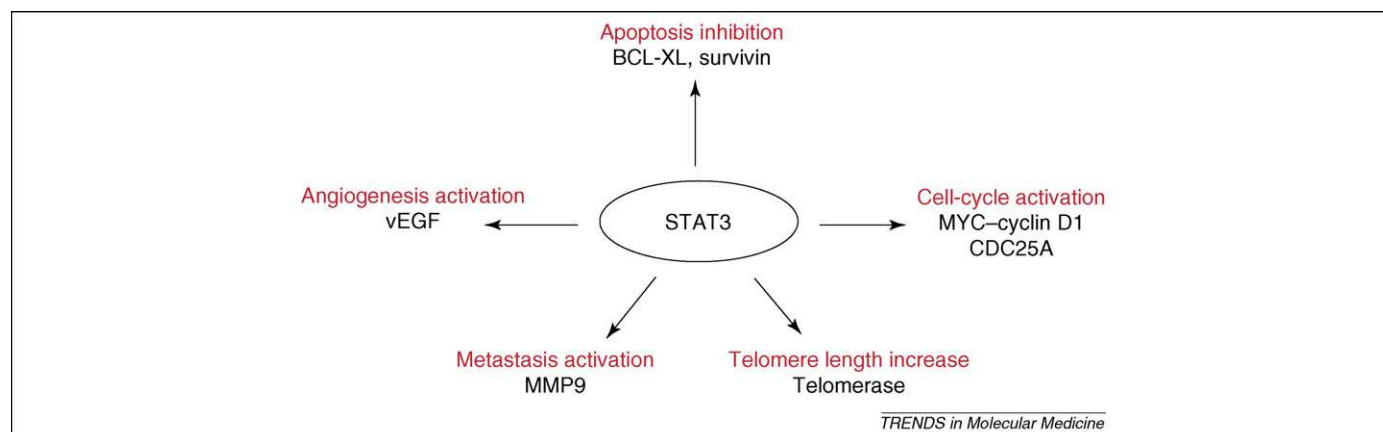
All signaling pathways that drive abnormal cell proliferation harbor intracellular sensors that normally activate apoptosis or senescence. Thus, the STAT3 oncogenic signaling is normally restrained to prevent inappropriate cell-cycle progression. Consequently, the downregulation of tumor-suppressor networks is probably a prerequisite for this oncogene to induce cell transformation. If this hypothesis is correct, this would suggest that STAT3 provides cancer cells with an enhanced ability to survive genotoxic treatments as an indirect consequence

of the inactivation of cell-death pathways. Because one essential question of cancer treatment is to understand why tumors fail to respond to chemotherapy, determining whether the STAT3 oncogenic pathway is involved in drug resistance is therefore an important issue to resolve. Although this might depend on the cell type, we propose that the activation of cell-cycle genes and survival proteins might enable STAT3-expressing cells to escape from conventional chemotherapies.

### The ARF-p53 tumor suppressor network, cell death and senescence

One of the most important sensor of these tumor suppressor networks is the p53 transcription factor, which is induced by oncogenes to prevent cell transformation. Among the numerous proteins that regulate p53 functions, p14ARF (p19Arf in mouse, ARF hereafter, standing for alternate reading frame product of the *INK4* gene) seems to be one of the essential components of the p53 tumor-surveillance pathway. In normal conditions, ARF is not expressed because its promoter is downregulated by E2F3b, a variant of E2F3 that functions as a transcriptional repressor [34]. Aberrant mitogenic signals enable the activating forms of E2F to bind to the *ARF* promoter to induce its expression. It has been proposed that ARF is expressed only when an E2F signaling threshold is exceeded following oncogenic activation.

The main activity of ARF is its ability to bind to p53 inhibitors and to control ribosome biogenesis. Human double minute (HDM2) [mouse double minute 2 (Mdm2) in mouse] and ARF-protein binding 1 (BP1)/Mule are two specific E3 ubiquitin ligases that mediate p53 degradation through ubiquitination. Following its interaction with ARF-BP1/Mule, ARF inhibits its E3 ligase enzymatic activity to induce p53 stabilization [35]. As for ARF-BP1/Mule, ARF can directly inhibit Mdm2 ligase activity [36]. However, this is complicated by the fact that ARF might localize in the nucleolus, which is the site of ribosomal RNA (rRNA) processing. Because p53 and HDM2 are present in the nucleoplasm, it has also been proposed that ARF sequesters HDM2 in the nucleolus [37] to prevent its interaction with p53. However, this issue remains



**Figure 1.** Essential role of STAT3 during cell transformation. As previously proposed [86], tumorigenesis is a multistep process that relies on the successive dysregulation of several molecular components. Through the upregulation of genes that are involved in cell-cycle progression and cell-death evasion, in addition to activation of metastasis and angiogenesis, STAT3 transcription factor enables cancer cells to acquire the hallmarks capabilities of tumorigenesis.

controversial because non-nucleolar forms of ARF might be unstable and difficult to detect. Accordingly, forms of ARF that do not localize to the nucleolus are still able to stabilize p53 [38,39]. In addition, ARF has also been reported to control ribosomal biogenesis [40] through the proteasomal degradation of B23, a nucleolar ribonuclease involved in the maturation of rRNA [41]. Therefore, p53 activation and inhibition of ribosomal subunit assembly provide two mechanisms by which ARF prevents abnormal proliferation in response to oncogenic insult.

Following its stabilization in response to ARF, the p53 transcription factor activates its target genes to prevent abnormal proliferation. These genes can be divided in three classes: one that controls cell-cycle arrest and senescence, one that controls apoptosis and one that regulates glucose metabolism and autophagy [42]. p53 is essentially known as a pro-apoptotic transcription factor that upregulates the expression of proteins such as BCL2-associated X protein (BAX), p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) or NOXA. These two BH3-only proteins interact with BCL2 survival proteins to induce mitochondria-dependent cell death. In addition, p53 also induces the expression of other components of the apoptotic or death-receptor signaling such as apoptotic peptidase activating factor 1 (APAF1), caspase 6 or FAS.

Besides apoptosis, p53 is also involved in the induction of senescence, an antitumor mechanism that prevents abnormal cell proliferation. Senescence corresponds to an irreversible proliferative arrest induced by several types of stress such as oncogene expression, telomere shortening or chemotherapeutic drugs [43]. The association of this protective pathway with pre-malignant lesions strongly suggests that its inactivation is an important step during malignant progression [44]. Senescence induction involves the combined activities of p53–p21WAF, p16INK4 and, in some cases, of RB, which induces heterochromatin formation at specific sites in the genome [45]. This alteration of chromatin morphology is associated with transcriptional repression of promoters of proliferation-associated genes and with permanent cell-cycle arrest.

Although their relative contributions vary depending on the cell type, cellular senescence and apoptosis are essential mechanisms of tumor suppression that need to be inactivated during cell transformation. Recent results indicate that the *STAT3* oncogene inactivates these tumor-suppressor mechanisms to enable survival and proliferation of cancer cells.

### Inactivation of tumor-suppressor pathways by the *STAT3* oncogene

Using dominant-negative proteins, antisense oligonucleotides or RNA interference (RNAi), several studies have shown that *STAT3* contributes to malignancy by inactivating the two main pathways involved in apoptosis induction. The intrinsic apoptotic pathway relies on the release of cytochrome *c* from mitochondria and on the activation of caspases. In a wide range of tumor cells, *STAT3* has been shown to induce the expression of BCL-XL and myeloid cell leukemia sequence 1 (MCL1), two BCL2-prosurvival proteins that prevent cytochrome *c* release and inhibit mitochondria-dependent cell death

[13]. In addition, *STAT3* upregulates the expression of survivin, a member of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family. IAPs act as endogenous inhibitors of caspases, and survivin can bind to caspase 9 to prevent its activity [46]. Importantly, the expression of survivin correlates with *STAT3* activation in breast tumors, and the inhibition of this signaling pathway induces apoptosis [47,48]. Finally, it has also been shown that *AKT* is a direct target gene of *STAT3*, which binds directly to its promoter to enhance its expression [49]. Because *AKT* is a well-known positive mediator of cell survival, its upregulation is likely to contribute to *STAT3* anti-apoptotic function [49].

*STAT3* is also able to prevent cell death through inhibition of the extrinsic apoptotic pathway. This pathway is activated upon binding of extracellular ligands such as FAS ligand (FAS-L) to cell-surface death receptors. Upon interaction with FAS-L, the FAS death receptor induces cell death through caspase-8 activation and truncation of the death agonist BID. Downregulation of FAS expression is a common event during tumor progression and has been correlated with resistance to radiation or drug-induced cell death. Importantly, *STAT3* binds directly to the *FAS* promoter in association with JUN to suppress the transcription of the death receptor. The inhibition of this oncogenic cooperation re-induces the expression of the death receptor and restores the sensitivity to FAS-L-mediated apoptosis [27,50]. In addition to its interaction with JUN, *STAT3* cooperates with the non-canonical nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway to regulate apoptosis [51]. *STAT3* facilitates the processing of the p52 subunit from its p100 precursor and interacts with p52 on DNA. Consequently, the cooperation between these two transcription factors prevents cell death in response to genotoxic drugs. Future experiments will be important to determine whether *STAT3* and NF- $\kappa$ B function co-operatively in oncogenesis and cell survival.

Besides apoptosis, *STAT3* inhibits cell-cycle arrest and senescence through inactivation of p53 and p21WAF1. This has been initially reported in myeloma cells where the interleukin-6 (IL-6)–*STAT3* signaling pathway inhibits the expression of p21WAF1 [52], and has been further confirmed in melanoma cells where *STAT3*-mediated expression of p21WAF1 is lost in advanced metastatic lesions [53]. Furthermore, we have recently observed in glioma and breast-cancer cells that constitutive activation of *STAT3* is also associated with a reduced expression of p21WAF1 [54,55]. In these cells, *STAT3* and cyclin D1 associate to form a transcriptional repressor complex that binds to the promoter of the cell-cycle inhibitor p21WAF1 to downregulate its expression. *STAT3* can also cooperate with *AKT* or *MYC* to downregulate p21WAF1 expression and prevent cell-cycle arrest or senescence [55,56]. Interestingly, it has also been recently shown that the SRC–*STAT3* oncogenic pathway might inhibit the expression of the *p53* gene. Following its activation by the SRC kinase, *STAT3* binds to the promoter of the tumor suppressor gene and prevents its expression. Accordingly, small interfering (si)RNA-mediated inhibition of *STAT3* signaling enhances the steady-state levels of p53 [57]. These results expand previous data that showed that SRC-induced DNA

synthesis requires the inhibition of a p53-dependent pathway [58] and that STAT3 downregulates the p53 promoter in breast-cancer cells [59]. However, these studies require further support, and it will be important to determine whether the detection of the activated form of STAT3 in tumor samples correlates with the downregulation of p53 expression.

Altogether, these results indicate that STAT3 downregulates the expression of p53 and p21WAF1. Importantly, other molecules such as p16INK4 are probably also involved in the induction of permanent cell-cycle arrest. Because disruption of p16INK4 enables escape from RAS-induced senescence [60], it will be important to determine whether STAT3 can also regulate the expression of this cell-cycle inhibitor.

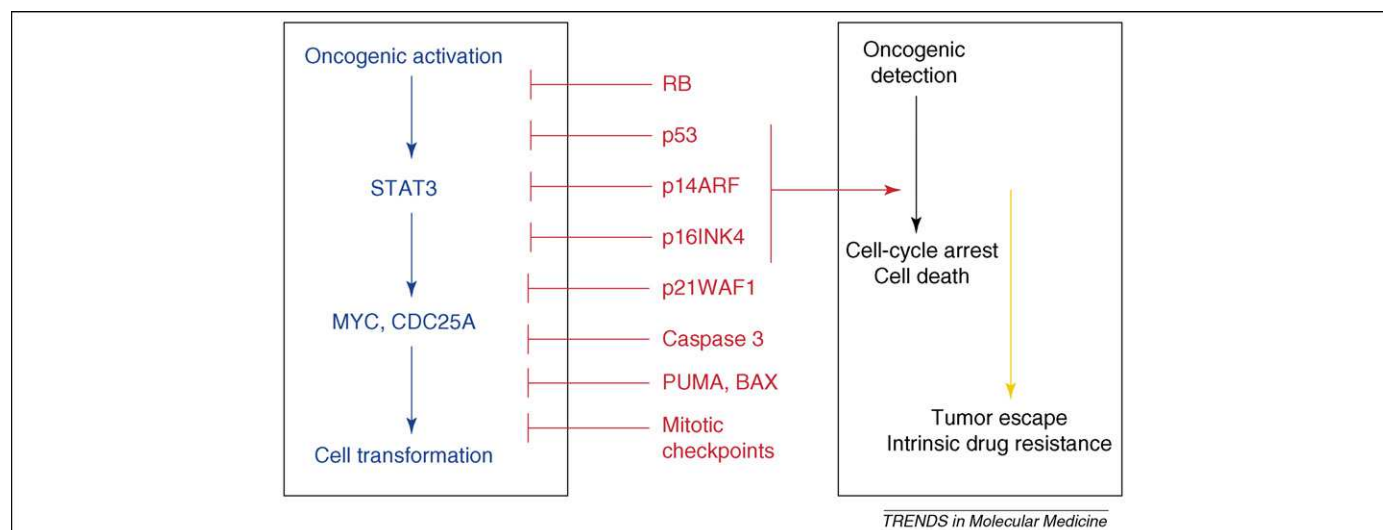
Besides escape from cell death and senescence, abnormal proliferation of tumors cells has also been linked to telomerase expression. Under normal conditions, chromosome ends shorten to limit the proliferation state of somatic cells, eventually leading to replicative senescence. To prevent deregulated proliferation, tumor suppressor mechanisms downregulate the expression of hTERT [61] so that this protein is normally not expressed in somatic cells. Consequently, several oncogenes re-induce the expression of hTERT to maintain telomere length and prevent replicative senescence [62]. Interestingly, STAT3 can directly bind to the *hTERT* promoter to upregulate its expression [30]. In addition, siRNA-mediated inactivation of hTERT induces cell death in STAT3-expressing cells, suggesting that upregulation of the telomerase has an important role in STAT3-mediated transformation.

These observations strongly indicate that STAT3 contributes to malignancy by inhibiting cell death, cell-cycle arrest and senescence. As stated above, this is probably not true for the normal functions of STAT3 because it might not be necessary for normal cell growth, at least in certain cell types [22]. How a single transcription factor can mediate such different responses is an important issue to be resolved, but cell transformation is probably related to

the upregulation of a specific set of activated genes. This leads to the hypothesis that oncogenic activation shifts the normal spectrum of STAT3 transcriptional activity towards the activation of growth-promoting genes at the expense of cell death and cell-cycle inhibitory proteins. This provides STAT3-expressing cells with intrinsic proliferative and survival advantages that might enable these cells to escape the effects of anticancer drugs (Figure 2).

### The STAT3 signaling pathway as a predictive marker of drug resistance

One essential question of cancer treatment is to understand why tumors fail to respond to chemotherapy. Delineating which oncogenic signaling is implicated in tumor resistance and which target is predictive of tumor relapse is an essential goal of future chemotherapy. Chemoresistance was initially linked to a reduced concentration of the drug via efflux pumps, to detoxification enzymes or to an enhanced DNA repair activity. It is now clear that tumor cells also escape cytotoxic treatments by reprogramming their survival pathways. Because apoptosis inhibition is necessary to provide cancer cells with the ability to survive in a stressful environment, it has been proposed that oncogenes provide cancer cells with intrinsic resistance capacities. Because many chemotherapeutic treatments activate cell death through apoptosis, the same program that prevents carcinogenesis, drug resistance might be a corollary of tumorigenesis [63]. Importantly, anticancer drugs induce different modes of cell death, and apoptosis should not be considered as the only consequence of chemotherapeutic treatment [43,64–66]. As stated above, senescence is a key determinant of tumor response to therapy *in vitro* and *in vivo* [44,67]. Recent results on human tumor biopsies have demonstrated that senescence acts as a tumor-suppressor mechanism in pre-malignant lesions [68–70]. Consequently, the inactivation of this protective pathway is probably an important step during malignant progression [43], and tumors with a low senescence index might have a worse prognosis compared with



**Figure 2.** STAT3 and tumor suppressor networks. Oncogenic signaling is normally restrained by tumor suppressor networks that induce cell-cycle arrest and cell death in response to abnormal cell proliferation. The successive inactivation of suppressor genes is necessary for cancer-cell propagation. Because cell-death inactivation is probably an intrinsic by-product of tumorigenesis, we propose that the STAT3 oncogenic pathway might be considered as a predictive marker of drug resistance.

tumors where this signaling pathway is still functional [44]. In addition, many types of abnormal mitosis that are due to chromosomal damage induce cell death either during mitosis or after (mitotic catastrophe). Mitotic checkpoints are essential to prevent segregation of abnormal DNA that would otherwise lead to asymmetric division and aneuploidy [71].

It is becoming increasingly clear that chemotherapeutic treatments induce cell-cycle arrest and cell death through the upregulation of apoptosis, senescence or mitotic catastrophe. In parallel, inactivation of the intrinsic or extrinsic apoptotic pathways, inhibition of senescence and downregulation of the mitotic checkpoint are probably essential events of cellular transformation. Because STAT3 enhances the expression of survival proteins and prevents cell-cycle arrest and senescence, we propose that this oncogenic pathway is not only involved in cell transformation but also in intrinsic drug resistance. Indeed, several recent studies have suggested that the STAT3 oncogenic pathway is associated with intrinsic drug resistance.

This was initially proposed when it was demonstrated that IL-6 and IL-10, two cytokines that are known to activate STAT3, confer a drug-resistant phenotype in renal carcinomas, which was subsequently confirmed in different cancer cell lines such as multiple myeloma [72,73]. Several studies have further suggested that the upregulation of STAT3 directly confers a drug-resistance phenotype. For example, overexpression of this transcription factor protects epidermal keratinocytes or cervical carcinoma cells from ultraviolet radiation (UV)-induced apoptosis [74,75]. In addition, STAT3 deficiency sensitizes keratinocytes to UV-induced apoptosis. Interestingly, a simple application of a naked STAT3 plasmid on the skin is sufficient to prevent the effect of irradiation. This protective effect was also confirmed in colorectal cancer cell lines where STAT3 inactivation also enhances UV-induced cell death [57]. In multiple myeloma, the aberrant activation of STAT3 has also been shown to confer resistance to FAS-mediated apoptosis [28]. The inhibition of STAT3 signaling downregulates the expression of survival proteins and restores the sensitivity to cell-death receptors. Furthermore, a constitutively activated form of STAT3 has been shown *in vivo* to protect liver cells from FAS-mediated apoptosis and necrosis [76]. This has been related to an enhanced expression of anti-apoptotic proteins such as FLICE-inhibitory protein (FLIP), BCL2, or BCL-XL and a downregulation of FADD-like interleukin-1  $\beta$ -converting enzyme (FLICE) and caspase 3. Finally, recent studies have shown that paclitaxel-resistant ovarian cancer cell lines show an abnormal increase of STAT3 activity and that the RNAi-mediated downregulation of the transcription factor reduced paclitaxel resistance [77]. Importantly, a higher activation of STAT3 was correlated with a drug-resistant profile of recurrent ovarian tumors.

STAT3 is also implicated in the survival of chronic myelogenous leukemia (CML) cells where this transcription factor is probably constitutively activated by the BCR-ABL kinase. Although the BCR-ABL kinase inhibitor imatinib mesylate (Gleevec) is efficient in chronic-phase CML, the development of drug resistance finally leads to

disease progression. The combination of flavopiridol, a CDK inhibitor, and bortezomib, a proteasome inhibitor, has been recently shown to induce cell death in leukemia cells that are otherwise resistant to imatinib mesylate [78]. Interestingly, this effect has been linked to STAT3 inactivation, suggesting that this transcription factor might be a key determinant of drug resistance in leukemia cells. Extending these results to lung cancers, it has been recently shown that STAT3 activity is downregulated by small-molecule inhibitors of the epidermal growth factor (EGF) receptor such as gefitinib (Iressa) [79]. The EGF receptor-STAT3 signaling pathway probably limits the efficiency of current chemotherapeutic treatments, and the inhibition of STAT3 is likely to be involved in the improved therapeutic effects of gefitinib.

The activation of the STAT3 signaling pathway has also been correlated with a poor clinical outcome of survivin-expressing anaplastic large-cell lymphoma. In these tumors, STAT3 activation was correlated with a cytoplasmic localization of survivin and with a less favorable clinical outcome of doxorubicin-based chemotherapy [80,81]. Although the initial role of survivin has been linked to mitotic checkpoints, a pool of survivin can localize to the mitochondria to prevent apoptosis [82]. Thus, the STAT3-survivin pathway might prevent doxorubicin-induced cell death if survivin is present in the cytoplasm. Furthermore, we have recently shown that SRC-STAT3 signaling also increases survival of fibrosarcoma cells in response to doxorubicin [56]. As measured by the colony formation assay, this pathway strongly inhibits doxorubicin-mediated senescence and increases drug survival. In addition, SRC-STAT3 downregulates the tetraploidy checkpoints, enabling segregation of damaged chromosome and allowing cancer cells to re-replicate their DNA and become polyploid. Although this remains to be demonstrated, these observations suggest that doxorubicin treatment of SRC-expressing tumors might select for more-malignant cells with an enhanced genomic instability that will be more resistant to subsequent rounds of therapy [63].

Altogether, these results indicate that STAT3 gives cancer cells an enhanced ability to survive genotoxic treatments. So far, the cellular effects of this oncogene have been characterized only in regard to cell-cycle arrest, apoptosis and senescence. Therefore, it remains to be determined whether STAT3 is directly involved in the regulation of the mitotic checkpoint. In particular, it will be important to characterize the links between this transcription factor, the spindle checkpoint and mitotic cell death. Because disruption of mitotic checkpoint can lead to genomic instability [71,83], STAT3 might be a driving force leading to aneuploidy. Interestingly, it is well known that STAT3 activates the expression of MYC, and it has been shown that the upregulation of MYC induces DNA damage and genomic instability [84]. Although this remains to be demonstrated, the STAT3-MYC pathway might induce genetic alterations such as gains, losses or rearrangements of chromosomes that might be linked to drug resistance and clinical outcome.

Because drug-resistant clones can be selected during chemotherapy or result from acquired alterations, it will

**Table 1. Hypothetical classification of tumor samples based on the STAT3 oncogenic pathway<sup>a,b</sup>**

	C1 classification	C2 classification	C3 classification
<b>Molecular markers</b>	STAT3 negative	Oncogenic kinase STAT3 activated p53–p21 (++) p14ARF (++) p16INK4 (++)	STAT3 activated p53–p21 (–) p14ARF (–) p16INK4 (–) STAT3 activated
<b>Apoptosis</b>	Functional	Activated	Inactivated
<b>Senescence</b>	Functional	Activated	Inactivated
<b>Treatment</b>	Classic	Classic	Classic plus targeted

<sup>a</sup>If our hypothesis is correct, we propose that STAT3-expressing tumors might be stratified on two classes, depending on the inactivation of tumor-suppressor networks. Samples that show evidence of intact-cell death pathways should respond to classic genotoxic treatments. By contrast, tumors that have inactivated apoptotic and senescence signaling should benefit from targeted therapies directed against the STAT3 oncogenic pathway.

<sup>b</sup>C1, C2 and C3 indicate three hypothetical classifications. ++ indicate that the pathway is activated, whereas – indicates that the pathway is inactivated.

also be important to determine whether STAT3 is only involved in the initial steps of carcinogenesis or whether this signaling pathway is also targeted by drug treatments. Several studies indicate that STAT3 is phosphorylated following genotoxic treatments such as irradiation or topoisomerase inhibition [85]. These results lead to an interesting hypothesis that the transcriptional activity of STAT3 might be reprogrammed not only during the initial step of tumorigenesis but also during chemotherapy. In that case, the transcriptional targets of STAT3 would not only depend on the cell type and be tumor specific but also rely on the type of genotoxic drugs used. If this is true, this reprogramming might lead to the expression of genes that would prevent the effect of genotoxic drugs so that treatment of STAT3-expressing cells might induce DNA damage without cell death and select for more-malignant cells with an enhanced genomic instability.

### Concluding remarks and future directions

Oncologists have to face two major obstacles when treating patients with cancer: chemotherapy drug-induced toxic side-effects and tumor-cell resistance. Both of them have an important impact on the patient quality of life and survival. Because STAT3 proteins are emerging as important targets for cancer therapy [9], STAT3 inhibitors are considered as cytotoxic drugs. We propose that these inhibitors might be used in combination with common chemotherapeutic drugs to sensitize drug-resistant tumors to cell death. In addition, the detection of the activated form of this protein, together with the corresponding anti-apoptotic and proliferative lesions, should help to determine the drug-resistance profile of individual tumors and define in advance the subsets of tumors that fail to respond to chemotherapy (Table 1). One essential question is how to choose and select patients in which inhibition of STAT3 activity will provide a therapeutic improvement compared

with conventional anticancer treatments. We propose that cancer cells expressing STAT3 together with inactivated p53–p21/WAF1 signaling and upregulated survival pathways will not respond to conventional chemotherapy. If this is true, future chemotherapeutic regimens might benefit from combining conventional drugs with new targeted therapies that interfere with the STAT3 signaling pathway. For these reasons, we believe that further describing the role of STAT3 in drug resistance is important for future research (Box 1), and that a more precise characterization is necessary because this might make a difference in patient care.

### Acknowledgements

Due to space limitations, we apologize to authors whose contributions are not listed, and we would therefore appreciate inputs on relevant information that might have been overlooked. Work in O.C. and E.G. laboratory is supported by grants from the Ligue Nationale Pour la Recherche Sur le Cancer; N.P. is funded in part by a programme grant from Cancer Research UK (C1443/A5435) and I.B.R. by NIH grants R01 CA62099 and R01 AG17921.

### References

- Mao, X. *et al.* (2005) Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding. *Mol. Cell* 17, 761–771
- Zhong, M. *et al.* (2005) Implications of an antiparallel dimeric structure of nonphosphorylated STAT1 for the activation–inactivation cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3966–3971
- Giraud, S. *et al.* (2002) Functional interaction of STAT3 transcription factor with the coactivator NcoA/SRC1a. *J. Biol. Chem.* 277, 8004–8011
- Giraud, S. *et al.* (2004) Implication of BRG1 and cdk9 in the STAT3-mediated activation of the *p21waf1* gene. *Oncogene* 23, 7391–7398
- Nakashima, K. *et al.* (1999) Synergistic signaling in fetal brain by STAT3–Smad1 complex bridged by p300. *Science* 284, 479–482
- Chapman, R.S. *et al.* (1999) Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of *Stat3*. *Genes Dev.* 13, 2604–2616
- Levy, D.E. and Lee, C.K. (2002) What does Stat3 do? *J. Clin. Invest.* 109, 1143–1148
- Bromberg, J. (2002) Stat proteins and oncogenesis. *J. Clin. Invest.* 109, 1139–1142
- Yu, H. and Jove, R. (2004) The STATs of cancer – new molecular targets come of age. *Nat. Rev. Cancer* 4, 97–105
- Vultur, A. *et al.* (2005) Stat3 is required for full neoplastic transformation by the Simian Virus 40 large tumor antigen. *Mol. Biol. Cell* 16, 3832–3846
- Bromberg, J.F. *et al.* (1998) Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2553–2558
- Zhang, Y.W. *et al.* (2002) Requirement of Stat3 signaling for HGF/SF-Met mediated tumorigenesis. *Oncogene* 21, 217–226
- Bromberg, J. *et al.* (1999) *Stat3* as an oncogene. *Cell* 98, 295–303
- Pedrazzini, L. *et al.* (2004) Stat3 is required for the development of skin cancer. *J. Clin. Invest.* 114, 619–622

### Box 1. Outstanding questions

- Which tumor suppressor networks are inactivated by the STAT3 oncogenic pathway?
- Is the STAT3 oncogenic pathway associated with intrinsic drug resistance and in which tumors?
- Through the detection of STAT3 and its associated deregulations on tumor samples, can we define in advance the subsets of tumors that will fail to respond to chemotherapy?
- Will STAT3-targeted therapies restore the sensitivity to conventional chemotherapies?



- 15 Chan, K.S. *et al.* (2004) Disruption of Stat3 reveals a critical role in both the initiation and the promotion stages of epithelial carcinogenesis. *J. Clin. Invest.* 114, 720–728
- 16 Chiarle, R. *et al.* (2005) Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. *Nat. Med.* 11, 623–629
- 17 Primiano, T. *et al.* (2003) Identification of potential anticancer drug targets through the selection of growth-inhibitory genetic suppressor elements. *Cancer Cell* 4, 41–53
- 18 McLemore, M.L. *et al.* (2001) STAT-3 activation is required for normal G-CSF-dependent proliferation and granulocytic differentiation. *Immunity* 14, 193–204
- 19 Lee, C.K. *et al.* (2002) STAT3 is a negative regulator of granulopoiesis but is not required for G-CSF-dependent differentiation. *Immunity* 17, 63–72
- 20 Laouar, Y. *et al.* (2003) STAT3 is required for Flt3L-dependent dendritic cell differentiation. *Immunity* 19, 903–912
- 21 Taub, R. (2003) Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway. *J. Clin. Invest.* 112, 978–980
- 22 Schlessinger, K. and Levy, D.E. (2005) Malignant transformation but not normal cell growth depends on signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Res.* 65, 5828–5834
- 23 Barré, B. *et al.* (2005) The STAT3 transcription factor is a target for the Myc and retinoblastoma proteins on the *Cdc25A* promoter. *J. Biol. Chem.* 280, 15673–15681
- 24 Leslie, K. *et al.* (2006) Cyclin D1 is transcriptionally regulated by and required for transformation by activated signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Res.* 66, 2544–2552
- 25 Kiuchi, N. *et al.* (1999) STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the *c-myc* gene. *J. Exp. Med.* 189, 63–73
- 26 Shirogane, T. *et al.* (1999) Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity* 11, 709–719
- 27 Ivanov, V.N. *et al.* (2001) Cooperation between STAT3 and c-jun suppresses Fas transcription. *Mol. Cell* 7, 517–528
- 28 Catlett-Falcone, R. *et al.* (1999) Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10, 105–115
- 29 Dechow, T.N. *et al.* (2004) Requirement of matrix metalloproteinase-9 for the transformation of human mammary epithelial cells by Stat3-C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10602–10607 Epub 12004 Jul 10612
- 30 Konnikova, L. *et al.* (2005) Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in human cancer and primary cells. *Cancer Res.* 65, 6516–6520
- 31 Agalioti, T. *et al.* (2000) Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN- $\beta$  promoter. *Cell* 103, 667–678
- 32 Lerner, L. *et al.* (2003) STAT3-dependent enhanceosome assembly and disassembly: synergy with GR for full transcriptional increase of the  $\alpha$  2-macroglobulin gene. *Genes Dev.* 17, 2564–2577
- 33 Yoo, J.Y. *et al.* (2001) Synergistic activity of STAT3 and c-Jun at a specific array of DNA elements in the  $\alpha$  2-macroglobulin promoter. *J. Biol. Chem.* 276, 26421–26429
- 34 Aslanian, A. *et al.* (2004) Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics. *Genes Dev.* 18, 1413–1422
- 35 Chen, D. *et al.* (2005) ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* 121, 1071–1083
- 36 Honda, R. and Yasuda, H. (1999) Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J.* 18, 22–27
- 37 Weber, J.D. *et al.* (1999) Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat. Cell Biol.* 1, 20–26
- 38 Llanos, S. *et al.* (2001) Stabilization of p53 by p14ARF without relocation of MDM2 to the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* 3, 445–452
- 39 Rodway, H. *et al.* (2004) Stability of nucleolar versus non-nucleolar forms of human p14(ARF). *Oncogene* 23, 6186–6192
- 40 Sugimoto, M. *et al.* (2003) Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing. *Mol. Cell* 11, 415–424
- 41 Itahana, K. *et al.* (2003) Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol. Cell* 12, 1151–1164
- 42 Bensaad, K. *et al.* (2006) TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126, 107–120
- 43 Roninson, I.B. (2003) Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res.* 63, 2705–2715
- 44 Collado, M. and Serrano, M. (2006) The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat. Rev. Cancer* 6, 472–476
- 45 Narita, M. *et al.* (2003) Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703–716
- 46 O'Connor, D.S. *et al.* (2000) Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13103–13107
- 47 Diaz, N. *et al.* (2006) Activation of stat3 in primary tumors from high-risk breast cancer patients is associated with elevated levels of activated SRC and survivin expression. *Clin. Cancer Res.* 12, 20–28
- 48 Gritsko, T. *et al.* (2006) Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 12, 11–19
- 49 Park, S. *et al.* (2005) Molecular cloning and characterization of the human *AKT1* promoter uncovers its up-regulation by the Src/Stat3 pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 38932–38941
- 50 Ivanov, V.N. *et al.* (2002) Regulation of Fas expression by STAT3 and c-Jun is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling. *J. Biol. Chem.* 277, 4932–4944
- 51 Nadiminty, N. *et al.* (2006) Stat3 activation of NF- $\kappa$ B p100 processing involves CBP/p300-mediated acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7264–7269
- 52 Urashima, M. *et al.* (1997) Interleukin-6 overcomes p21WAF1 upregulation and G1 growth arrest induced by dexamethasone and interferon- $\gamma$  in multiple myeloma cells. *Blood* 90, 279–289
- 53 Florenes, V.A. *et al.* (1999) Interleukin-6 dependent induction of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 is lost during progression of human malignant melanoma. *Oncogene* 18, 1023–1032
- 54 Bienvenu, F. *et al.* (2005) Transcriptional regulation by a DNA-associated form of cyclin D1. *Mol. Biol. Cell* 16, 1850–1858
- 55 Barré, B. *et al.* (2003) Opposite regulation of myc and p21waf1 transcription by STAT3 proteins. *J. Biol. Chem.* 278, 2990–2996
- 56 Vigneron, A. *et al.* (2005) Src inhibits adriamycin-induced senescence and G2 checkpoint arrest by blocking the induction of p21waf1. *Cancer Res.* 65, 8927–8935
- 57 Niu, G. *et al.* (2005) Role of Stat3 in regulating p53 expression and function. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7432–7440
- 58 Furstoss, O. *et al.* (2002) c-Abl is an effector of Src for growth factor-induced c-myc expression and DNA synthesis. *EMBO J.* 21, 514–524
- 59 Zhang, F. *et al.* (2003) Delineating an oncostatin M-activated STAT3 signaling pathway that coordinates the expression of genes involved in cell cycle regulation and extracellular matrix deposition of MCF-7 cells. *Oncogene* 22, 894–905
- 60 Schmitt, C.A. *et al.* (2002) A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 109, 335–346
- 61 Lin, S.Y. and Elledge, S.J. (2003) Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell* 113, 881–889
- 62 Hahn, W.C. *et al.* (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400, 464–468
- 63 Johnstone, R.W. *et al.* (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108, 153–164
- 64 Brown, J.M. and Attardi, L.D. (2005) The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat. Rev. Cancer* 5, 231–237
- 65 Brown, J.M. and Wilson, G. (2003) Apoptosis genes and resistance to cancer therapy: what does the experimental and clinical data tell us? *Cancer Biol. Ther.* 2, 477–490
- 66 Brown, J.M. and Wouters, B.G. (1999) Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res.* 59, 1391–1399
- 67 Roninson, I.B. (2003) Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res.* 63, 2705–2715
- 68 Collado, M. *et al.* (2005) Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642
- 69 Braig, M. *et al.* (2005) Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436, 660–665
- 70 Chen, Z. *et al.* (2005) Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of *Pten*-deficient tumorigenesis. *Nature* 436, 725–730

- 71 Weaver, B.A. and Cleveland, D.W. (2005) Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: the mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell* 8, 7–12
- 72 Mizutani, Y. *et al.* (1995) Sensitization of human renal cell carcinoma cells to *cis*-diamminedichloroplatinum(II) by anti-interleukin 6 monoclonal antibody or anti-interleukin 6 receptor monoclonal antibody. *Cancer Res.* 55, 590–596
- 73 Alas, S. and Bonavida, B. (2003) Inhibition of constitutive STAT3 activity sensitizes resistant non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma to chemotherapeutic drug-mediated apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 9, 316–326
- 74 Sano, S. *et al.* (2005) Signal transducer and activator of transcription 3 is a key regulator of keratinocyte survival and proliferation following UV irradiation. *Cancer Res.* 65, 5720–5729
- 75 Shen, Y. *et al.* (2001) Constitutively activated Stat3 protects fibroblasts from serum withdrawal and UV-induced apoptosis and antagonizes the proapoptotic effects of activated Stat1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 1543–1548
- 76 Haga, S. *et al.* (2003) Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. *J. Clin. Invest.* 112, 989–998
- 77 Duan, Z. *et al.* (2006) Signal transducers and activators of transcription 3 pathway activation in drug-resistant ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 12, 5055–5063
- 78 Dai, Y. *et al.* (2004) Bortezomib and flavopiridol interact synergistically to induce apoptosis in chronic myeloid leukemia cells resistant to imatinib mesylate through both Bcr/Abl-dependent and -independent mechanisms. *Blood* 104, 509–518
- 79 Alvarez, J.V. *et al.* (2006) Signal transducer and activator of transcription 3 is required for the oncogenic effects of non-small-cell lung cancer-associated mutations of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 66, 3162–3168
- 80 Schlette, E.J. *et al.* (2004) Survivin expression predicts poorer prognosis in anaplastic large-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 22, 1682–1688
- 81 Khoury, J.D. *et al.* (2003) Differential expression and clinical significance of tyrosine-phosphorylated STAT3 in ALK<sup>+</sup> and ALK<sup>-</sup> anaplastic large cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 9, 3692–3699
- 82 Dohi, T. *et al.* (2004) Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* 114, 1117–1127
- 83 Jallepalli, P.V. and Lengauer, C. (2001) Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat. Rev. Cancer* 1, 109–117
- 84 Vafa, O. *et al.* (2002) c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol. Cell* 9, 1031–1044
- 85 Lim, C.P. and Cao, X. (1999) Serine phosphorylation and negative regulation of Stat3 by JNK. *J. Biol. Chem.* 274, 31055–31061
- 86 Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70

## *Discussion*

Les facteurs de transcription STAT3 sont aujourd'hui fortement impliqués dans la tumorigenèse. Les formes actives de ce facteur de transcription ont été détectées dans de nombreux types tumoraux différents, et l'utilisation de modèles murins a montré que STAT3 était essentiel à la survie et à la progression de certaines tumeurs. Le traitement du cancer a radicalement changé au cours de ces dernières années avec l'arrivée d'un nouvel arsenal thérapeutique non plus basé sur l'inhibition de la réplication de l'ADN mais sur l'inhibition des cibles moléculaires impliquées de manière spécifique dans le développement de la tumeur et sa résistance aux traitements conventionnels. Ceci n'est possible et efficace qu'à la condition d'être capable de comprendre la spécificité et le fonctionnement des voies de signalisation activées ou au contraire altérées au cours de la tumorigenèse. Il était donc intéressant d'étudier et de comprendre les différents mécanismes mis en jeu par STAT3 lors de son activation oncogénique afin de déterminer les différents paramètres permettant d'envisager une thérapie ciblant l'activation de STAT3 ou les cibles de ces facteurs de transcription.

Nous avons principalement étudié les effets de STAT3 sur la réponse cellulaire aux stress génotoxiques induits par les agents de chimiothérapie couramment utilisés en clinique, les inhibiteurs de topoisomérase, ou induits par un stress oxydatif, stress généré notamment par la radiothérapie et certains agents de chimiothérapie. Nous avons tout d'abord montré que ces différents stress induisaient un contrôle spécifique de ce facteur de transcription. L'activation des protéines p21 et Rb impliquées dans l'inhibition du cycle cellulaire induit leur recrutement direct sur les facteurs STAT3 activés par un oncogène viral v-src ou par une stimulation cytokinique. Ce recrutement est associé à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de STAT3 et induit au contraire la répression des promoteurs contactés par ces complexes. p21 et Rb permettent ainsi d'inhiber spécifiquement les gènes c-myc et cdc25A, gènes importants pour la prolifération cellulaire. Les traitements de chimiothérapie permettent ainsi dans les cellules où les voies d'activation de p21 et Rb sont fonctionnelles de réprimer l'activité oncogénique de STAT3, ce qui peut participer aux effets cytostatiques et cytotoxiques de ces agents. Sur ce dernier point, il serait intéressant d'analyser les effets de ces chimiothérapies sur l'activation par STAT3 des protéines antiapoptotiques telle que Bcl-XL ou la survivine. Le fait que ces agents inhibent l'activation de STAT3 par l'oncogène et par la stimulation à l'IL-6 est important car l'inflammation présente au niveau des tumeurs solides est vraisemblablement un catalyseur de la tumorigenèse et de la résistance aux traitements induits par les oncogènes. L'inhibition de STAT3 permet donc de bloquer de

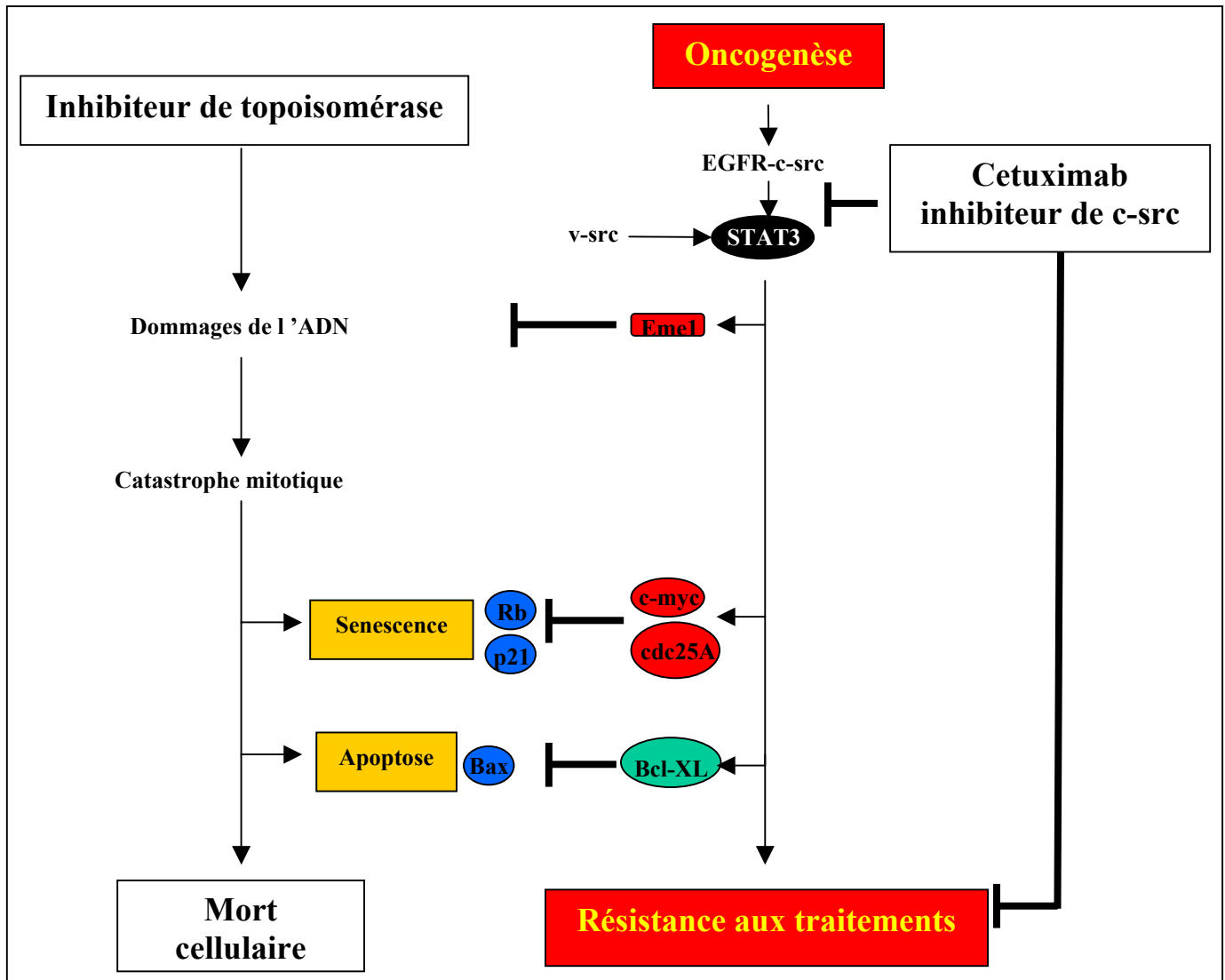
façon simultanée deux processus très délétères pour le contrôle et la suppression de la tumeur par la thérapie.

Dans un second temps nous avons montré que l'activation oncogénique de STAT3 pouvait permettre d'augmenter la survie des cellules traitées par les agents de chimiothérapie. Les cassures doubles brins de l'ADN induites par le stress oxydatif ou les inhibiteurs de topoisomérase II inhibent normalement la réplication. Ces effets ont été observés dans deux lignées, des fibrosarcomes et une lignée colorectale LS174T. Quand ces lignées surexpriment l'oncogène v-src qui induit une activation constitutive de STAT3, la réplication n'est plus inhibée de manière correcte, réplication associée à l'expression des gènes c-myc et cdc25A. Dans le cadre des inhibiteurs de topoisomérase II, nous avons montré en fait que l'activation de la protéine c-myc par STAT3 empêchait l'activation de p21 et la mise en place du programme de la sénescence. Bien que non testé il est vraisemblable que des effets similaires s'observent avec Rb qui est lui-même sous le contrôle de p21. En résumé nous avons donc caractérisé le fait que l'activation oncogénique de STAT3 peut induire un échappement au point de contrôle du cycle cellulaire et à la sénescence induite par les dommages de l'ADN et mise en place par les protéines p21-Rb.

Finalement, dans la dernière partie, nous montrons que l'inhibition spécifique de STAT3 permet de sensibiliser des cellules colorectales aux inhibiteurs de topoisomérase I. Afin de s'approcher le plus possible d'une utilisation future en clinique, nous étudions l'effet du cetuximab, un anticorps monoclonal dirigé contre l'EGFR, et un inhibiteur pharmacologique de c-src. Ceci avait un double intérêt, comprendre le fonctionnement du cetuximab qui permet chez certain patients de sensibiliser la tumeur colorectale aux inhibiteurs de topoisomérase I, et analyser les mécanismes mis en jeu lors de l'activation de STAT3 par le complexe EGFR-c-src actif dans un grand nombre de tumeur colorectale. Nous montrons que l'inhibition du complexe permet de supprimer l'activation de STAT3. L'inhibition de STAT3 renforce l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire, la catastrophe mitotique, la sénescence ou l'apoptose en fonction du type cellulaire colorectal étudié, ce qui augmente la sensibilité des cellules aux inhibiteurs de topoisomérase I. Finalement nous montrons qu'en fait, les effets observés lors de l'inhibition de STAT3 sont dus à la répression du gène Eme1, activateur du complexe endonucléase Eme1-Mus81, et à l'inhibition de la réparation des fourches de réplication effondrée qui en résulte. Le bilan de ces différents résultats est schématisé dans la figure 48.

A partir de ces différents points nous proposons l'hypothèse selon laquelle STAT3 pourrait être un facteur important lors du choix thérapeutique à mettre en place et, dans le

futur, une cible intéressante chez des patients possédant une tumeur présentant des caractéristiques spécifiques qui suggèrent une incapacité à contrôler le facteur oncogénique STAT3.



**Figure 48 :** Schéma bilan des différents travaux présentés dans ce manuscrit

Les inhibiteurs de topoisomérase induisent des dommages de l'ADN qui entraînent la catastrophe mitotique et la mort des cellules par apoptose ou sénescence. L'activation de STAT3 au cours de l'oncogénèse induit une résistance intrinsèque des tumeurs contre ces agents via l'inhibition des dommages de l'ADN, de la sénescence et de l'apoptose, résistance qui peut être levée par l'inhibition spécifique des protéines impliquées dans l'activation de STAT3.

Les travaux présentés soulèvent cependant différents points nécessitant un éclaircissement si l'on veut dans le futur envisager de mettre en pratique cette dernière hypothèse. Nous présentons ci-dessous ces différents points :

### ***La résistance intrinsèque des tumeurs aux traitements de chimiothérapie***

Au cours de nos travaux, nous avons montré que l'activation constitutive de STAT3 induit une certaine résistance aux inhibiteurs de topoisomérases. Cette résistance est due à l'inhibition des différents points de contrôle mis en place normalement en présence de dommages de l'ADN. On touche ici l'un des problèmes majeurs de la cancérologie. Au cours de la progression tumorale, la cellule traverse tout un ensemble de stress qui vont progressivement la rendre complètement insensible aux différents paramètres qui contrôlent sa survie et sa prolifération. Des études ont ainsi montré que lors de l'initiation de l'oncogenèse, la cellule doit supporter un stress génomique détecté dans la tumeur par la phosphorylation de l'histone H2AX (406). Ce stress génomique active normalement les points de contrôle du cycle cellulaire, la sénescence ou l'apoptose. Dans les premiers stades de la carcinogenèse, on détecte effectivement la sénescence et l'apoptose qui doivent alors permettre de contrôler la croissance de la tumeur (406;407). Cependant à des stades plus avancés, ces processus ne sont plus détectés efficacement, ce qui traduit le fait que la progression tumorale s'est accompagnée de l'échappement des cellules à ces mécanismes.

Cet échappement au stress induit par l'oncogène pourrait être responsable de la résistance intrinsèque des cellules tumorales aux traitements conventionnels de chimiothérapie. En effet ces traitements ne sont finalement que des agents générateurs de stress similaires à ceux produits par l'oncogène. L'oncogène induit des dommages de l'ADN, les chimiothérapies aussi, l'oncogène induit un stress oxydatif, les chimiothérapies aussi, l'oncogène perturbe la mitose, les chimiothérapies aussi. Ainsi la population cellulaire tumorale qui doit supporter ces stress possède certainement en son sein des cellules résistantes aux agents de chimiothérapie avant même d'avoir été traitées.

L'activation constitutive de STAT3 qui réprime les différents points de contrôle de la tumorigenèse peut donc sans doute participer à l'échappement aux stress induits par l'oncogène et donc à la résistance intrinsèque des tumeurs aux chimiothérapies. STAT3 active cdc25A et inhibe le point de contrôle de la réplication, STAT3 inhibe l'activation de p21 et la sénescence et STAT3 active des protéines comme Bcl-XL qui vont empêcher l'apoptose. En plus de nos travaux d'autres montrent que STAT3 active également des gènes tel que la télomérase, la cycline D1 et la survivine qui vont toutes favoriser la progression tumorale

mais également favoriser la résistance de la tumeur aux agents de chimiothérapie (318;319;324). Les cellules qui expriment des formes actives de STAT3 capables d'échapper aux différents processus qui contrôlent la tumorigenèse sont celles qui vont survivre au stress oncogénique et ensuite être capables de résister efficacement aux agents de chimiothérapie tels que les inhibiteurs de topoisomérase.

### ***L'interaction entre STAT3 et les points de contrôles de l'oncogenèse***

Bien que STAT3 participe à l'inhibition des points de contrôle du cycle cellulaire, nous avons montré qu'à l'inverse son activité potentiellement oncogénique était sous le contrôle des protéines p21 et Rb qui participent aux barrières antioncogéniques. Dans la cellule saine, il est donc probable que ces mécanismes inhibent spécifiquement l'activation oncogénique de STAT3 au moins au premier stade de la carcinogenèse. En fait, l'activation oncogénique de STAT3 induit sans doute directement ces différentes barrières. L'activation de protéines tel que c-myc, la cycline D et cdc25A permet probablement l'activation du complexe cycline E cdk2 de façon anarchique. L'activation incontrôlée de ce complexe altère les processus contrôlant la réplication, induit les différents points de contrôle du cycle cellulaire et active les programmes de sénescence ou d'apoptose (406). L'activation des protéines p21 et Rb par ces processus doit alors pouvoir réprimer l'activité transcriptionnelle de STAT3 de façon similaire à celle que nous avons présentée. La question qui se pose alors est pourquoi ces barrières antioncogéniques n'ont pu bloquer l'activation constitutive de STAT3 au sein des tumeurs présentant des formes constitutivement actives de STAT3. Les protéines p16 et p14ARF, dont nous n'avons pas parlées, jouent sans doute un rôle déterminant. Ces deux protéines participent à l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire et à la mise en place de la sénescence ou de l'apoptose lorsque la cellule subit un stress oncogénique (407;408). Dans nos modèles, nous montrons que l'oncogène v-src, qui active STAT3, inhibe l'activation de l'apoptose et de la sénescence induite par les dommages de l'ADN. Cependant il faut savoir que les lignées cellulaires utilisées n'exprimaient pas les protéines p14ARF et p16. Il est probable que l'activation de ces protéines participent à la mise en place de la sénescence ou de l'apoptose et renforce les points de contrôle du cycle cellulaire induits par l'oncogène. Ainsi, l'initiation de l'oncogenèse par STAT3 nécessite vraisemblablement au préalable l'altération d'une des protéines p53, p14ARF ou p16, altération présente dans la majorité des tumeurs diagnostiquées.

Si ces mécanismes s'avèrent exacts, l'un des moyens de bloquer la progression tumorale induite par STAT3 mais de façon plus générale par les oncogènes qui nécessitent



l'activation de STAT3 serait de réinduire ces barrières antioncogéniques qui limitent l'activité de STAT3 diminuant alors la résistance des cellules aux traitements de chimiothérapie classique. Ceci pose cependant un problème car les techniques permettant de réexprimer un gène ne sont pour l'instant absolument pas efficace et très difficile à cibler.

### ***La reprogrammation de l'activité de STAT3 au cours de l'oncogenèse***

La résistance intrinsèque des cellules aux traitements de chimiothérapie et la difficulté de réinduire les barrières antioncogéniques que nous venons de détailler implique le développement d'un nouvel arsenal thérapeutique non plus basé sur la réplication de l'ADN mais sur l'inhibition des facteurs spécifiques de cette résistance sensibilisant ainsi les cellules tumorales aux traitements conventionnels de chimiothérapie.

Ce développement ne peut se faire qu'à la condition de comprendre les rôles spécifiquement liés à la tumorigenèse des protéines impliquées dans ce processus et nécessaires à la survie et à la prolifération des cellules tumorales. L'addiction des tumeurs à l'oncogène STAT3 fait de ce facteur un très bon candidat, addiction qui doit reposer d'après nos travaux sur l'inhibition de la sénescence, de l'apoptose et des différents points de contrôle du cycle cellulaire. Le fonctionnement physiologique normal de STAT3 commence à être bien caractérisé. Il reste aujourd'hui cependant à déterminer les mécanismes transcriptionnels précis mis en place par STAT3 au cours de l'oncogenèse. Plusieurs données indiquent en effet que la signature transcriptionnelle de STAT3 est modifiée au fur et à mesure de la tumorigenèse. Des exemples précis comme la cycline D1 confirment ceci. L'activation cytokinique normale de STAT3 ne semble pas induire le gène de la cycline D1 tandis que dans un contexte tumorale STAT3 active le gène (318). Comme tous les facteurs de transcription, STAT3 fonctionne au sein d'un enhanceosome regroupant divers facteurs et cofacteurs de la transcription. Le gain ou la perte d'un de ces facteurs permet de moduler l'activité de STAT3 et la reprogrammation des activités transcriptionnelles de STAT3 observée est probablement le fruit de la sélection cellulaire s'opérant au cours de l'oncogenèse. Par exemple, la protéine Brm est fréquemment réprimée au cours de la transformation (409). Des études du laboratoire montrent que l'induction de p21 par STAT3 nécessite le recrutement du complexe Brg/Brm (303) et donc STAT3 pourrait ainsi ne plus activer correctement p21 au sein d'une cellule transformée. De façon similaire au cours de la tumorigenèse, en particulier dans les cancers du sein et du colon, les gènes de la famille de l'EGFR sont amplifiés ou les récepteurs sont constitutivement activés (341). Ceci est associé avec la présence du récepteur au sein du noyau et son engagement dans divers complexes

transcriptionnels en particulier ceux mis en place par STAT3 (404). La présence de l'EGFR pourrait ainsi rediriger STAT3 vers des promoteurs qui ne sont normalement pas occupés par ce facteur de transcription. Dans notre étude nous montrons par exemple la présence de STAT3 sur le promoteur de Eme1 mais nous ne savons pas si ce gène est une cible physiologique normale de STAT3 ou si l'activation du complexe EGFR c-src par les dommages de l'ADN dans un cadre oncogénique est responsable du recrutement de STAT3 sur Eme1. L'intérêt de ceci est qu'en déterminant les cofacteurs spécifiques des facteurs STAT3 activés dans un cadre oncogénique et non physiologique, nous aurions un moyen spécifique de combattre les tumeurs dépendantes de STAT3 sans altérer les fonctions normales de STAT3.

### ***L'activation de STAT3 au cours de l'oncogenèse et sa détection en thérapie***

L'autre paramètre important à comprendre si l'on souhaite utiliser STAT3 comme cible thérapeutique est son mode d'activation au cours de l'oncogenèse. Comme pour la plupart des oncogènes, des processus préviennent l'activation oncogénique de STAT3. Les premiers mécanismes permettant d'inhiber l'activation oncogénique de STAT3 sont ceux impliqués dans son rétrocontrôle. Les protéines SOCS, par exemple, inhibent l'activation de STAT3 par les récepteurs cytokiniques en entrant en compétition avec STAT3 pour la liaison aux tyrosines phosphorylées du récepteur (410). Les protéines CSK et c-cbl permettent respectivement d'inhiber l'activation des protéines c-src et d'induire la dégradation de c-src et du récepteur à l'EGF, ce qui bien sûr empêche l'activation de STAT3 par le complexe EGFR-c-src. Les protéines c-cbl sont ainsi spécifiquement activées par l'EGFR afin de limiter l'activation du récepteur (411). Au cours de l'oncogenèse, ces différents rétrocontrôles sont vraisemblablement perdus. Le gène des protéines SOCS est ainsi méthylé en particulier dans les tumeurs coliques, tandis que les protéines CSK ne sont plus exprimées (111;412). A l'inverse, les protéines c-cbl sont surexprimées. Cependant, il existe des formes mutées de la protéine qui sont oncogéniques, agissent comme des dominants négatifs et augmentent l'activation de l'EGFR. La surexpression de c-cbl est ainsi associée à la progression tumorale (413). Ces différents exemples nous montrent qu'au cours de l'oncogenèse la régulation normale de STAT3 est altérée, ce qui explique la présence des formes constitutivement actives de STAT3. Au cours de nos travaux nous avons utilisé un oncogène viral pour étudier l'activation constitutive de STAT3. Afin de confirmer les processus décrits, il serait intéressant de reprendre ces études dans des modèles où STAT3 est activé par les mêmes mécanismes que ceux présents dans les tumeurs des patients.

D'un point de vue clinique, la détection des protéines impliquées dans l'activation ou le contrôle de STAT3 pourrait permettre de classer les patients en fonction du degré d'altération des voies de régulation de STAT3. Ceci est important car la détection des formes constitutives de STAT3 risque d'être problématique. In vitro, l'activation de STAT3 se caractérise par sa phosphorylation sur la tyrosine 705 et sa présence au sein du noyau. La phosphorylation de la sérine 727 au niveau du noyau est également un indicateur de l'activité de STAT3. Ces critères se basent cependant sur des cellules cultivées en deux dimensions, le plus souvent privées de facteur de croissance durant plusieurs heures, et stimulées toutes en même temps par une cytokine ou un facteur de croissance comme l'EGF capable d'activer STAT3. Au sein de la tumeur du patient, il est probable que l'activation de STAT3 soit beaucoup plus hétérogène que celle observée in vitro, et donc, la phosphorylation et la localisation de STAT3 détectées par immunohistochimie comme seul critère de son activation risque de ne pas être satisfaisante. En revanche, ces paramètres couplés à la détection des protéines activatrices et inhibitrices de STAT3 pourraient permettre de prédire de façon optimale l'activité de STAT3 au sein de la tumeur. De plus, ces protéines pourraient être détectées par des moyens plus aisés à utiliser que ceux détectant la phosphorylation de STAT3, notamment ceux mesurant les méthylations ou les mutations, spécifiques d'un gène, survenues au cours de l'oncogenèse.

Finalement, il pourrait être plus facile de cibler l'activation de STAT3 que STAT3 lui-même. Par exemple, l'inhibition des domaines kinases ATP dépendant est aujourd'hui une manière efficace et relativement spécifique d'inhiber une voie de signalisation impliquée dans la tumorigenèse. L'inhibition de c-src est ainsi en phase d'étude dans le traitement de certaines leucémies.

### ***L'activation de STAT3 par les chimiothérapies***

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de STAT3 permettant de supprimer la résistance des cellules tumorales aux agents de chimiothérapie classiques nécessite également de comprendre l'impact du stress oncogénique, et de ces thérapies, sur le fonctionnement de STAT3. Au cours de la tumorigenèse, deux voies complémentaires peuvent induire l'activation de STAT3. STAT3 peut-être à l'origine de l'oncogenèse, et est dans ce cas activé par les mécanismes dont nous avons parlé dans le paragraphe précédent, mais STAT3 peut aussi être activé par le stress lié à l'oncogenèse. Des indices suggèrent ainsi que les dommages de l'ADN, par exemple, induisent une activation de STAT3. Nos travaux, confirmés par ceux d'autres équipes, montrent ainsi que les chimiothérapies basées sur

l'utilisation des inhibiteurs de topoisomérase I induisent l'activation de STAT3 (202). De façon identique, des traitements au cisplatine et la radiothérapie induisent l'activation de STAT3 (204). Nos travaux suggèrent que l'activation du complexe EGFR c-src pourrait être un des facteurs responsables de l'activation de STAT3 par les dommages de l'ADN. L'activation des protéines ADAM/TACE par le sn38 est l'un des mécanismes pouvant expliquer l'activation de l'EGFR par clivage de ses ligands à la surface cellulaire (202). Cependant, les mécanismes précis impliqués dans l'activation de ces différentes protéines ne sont pas compris. Un intermédiaire intéressant pourrait être la tyrosine kinase c-abl. c-abl est une protéine nucléaire ou cytoplasmique, activée par les dommages de l'ADN, qui interagit directement avec les protéines BRCA1 et TopBP1, et dont l'activité tyrosine kinase est augmentée via sa phosphorylation par ATM (414;415). c-abl est également impliquée dans l'activation des protéines p38 et de la PKC $\delta$  (416;417), kinases capables d'activer les métalloprotéinases ADAM/ TACE . Ainsi, il est possible que la détection des dommages de l'ADN soit directement connectée à la production de facteurs de survie par les cellules tumorales capables par ce moyen d'activer les récepteurs aux facteurs de croissance comme l'EGFR, et du même coup STAT3.

L'autre élément à noter est que l'activation de STAT3 par les traitements de chimiothérapie ou par les dommages de l'ADN liés à l'oncogenèse pourrait être particulière. La PKC $\delta$  peut par exemple phosphoryler la sérine 727 de STAT3. De façon similaire, la kinase cdk5, activée lors de la mise en place du programme de sénescence, active la phosphorylation de STAT3 sur cette même sérine (368;418). Nous avons ainsi détecté en particulier dans la lignée colorectale HCT116 la phosphorylation cytoplasmique de STAT3 sur la sérine 727 après un traitement à la doxorubicine ou à l'irinotecan. Le rôle de STAT3 phosphorylé sur la sérine n'est pas bien compris, cependant cette phosphorylation inhibe celle de la tyrosine quand STAT3 est cytoplasmique. Il est probable que ces formes particulières de STAT3 participent d'une manière spécifique à l'activation de la transcription de certains gènes. Des études ont montré par exemple que la surexpression de formes mutées de STAT3, incapables d'être phosphorylées sur la tyrosine 705, induit une régulation transcriptionnelle spécifique différente de celle observée par une forme plus conventionnelle de STAT3 (298).

Ces différents mécanismes compliquent ainsi un peu plus la détection des formes actives de STAT3 au sein des tumeurs issues de patients et donc, sans leur compréhension précise, il sera certainement difficile d'utiliser les différentes phosphorylations de STAT3 comme marqueur de son activité. En revanche, une nouvelle fois ces régulations de STAT3 induites par les traitements de chimiothérapie pourraient être utilisées dans le traitement des

tumeurs qui utilisent l'activation de STAT3 en réponse aux dommages de l'ADN comme moyen de résistance.

### ***Le rôle clef des dommages de l'ADN et de la catastrophe mitotique***

L'autre point sur lequel nous voulons insister est le rôle de STAT3 sur la régulation des dommages de l'ADN et sur l'importance de cette régulation pour le traitement des patients par chimiothérapie. Nous avons présenté les différents effets de STAT3 sur l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire, cependant, nous l'avons déjà évoqué, ces points de contrôle ne sont peut-être pas déterminant pour la réponse tumorale aux agents conventionnels de chimiothérapie qui endommagent l'ADN. La plupart des cellules tumorales ont perdu un ou plusieurs gènes essentiels à l'activation des différents points de contrôle, ce qui participe à la résistance intrinsèque des tumeurs aux agents tumoraux. La contre partie de cela est que ces cellules, soumises à ces agents, ont une tendance naturelle à rentrer en mitose avec de l'ADN endommagé et subissent alors une catastrophe mitotique. En absence des processus de sénescence et d'apoptose, le point clef permettant de tuer ces cellules serait la quantité de dommages de l'ADN présent au moment de la mitose, dommages qui s'ils sont importants, entraînent la perte de matériel chromosomique incompatible avec la vie de la cellule (269).

Le problème majeur posé ici est que les cellules tumorales s'adaptent au cours de la tumorigenèse aux dommages de l'ADN induit par ce processus. Il est ainsi fréquent d'observer au sein de ces cellules des systèmes de réparation spécifiques suractivés tandis que d'autres, qui ont permis le développement de la tumorigenèse, sont absents (le mismatch repair par exemple pour les cellules colorectales MIN). Déterminer et cibler les facteurs de réparation serait ainsi plus efficace que de cibler les facteurs antiapoptotiques ou activateurs des points de contrôle du cycle cellulaire.

Nous montrons ainsi que STAT3 participe à la régulation d'une protéine Emel impliquée dans la réparation des fourches de réplication. D'autres facteurs STAT activent des gènes de réparation comme STAT5 qui active la protéine Rad51 (376). Il est donc possible qu'au cours de l'oncogenèse, la reprogrammation de STAT3 favorise l'activation de gène impliqué dans la réparation de l'ADN. La découverte d'autres gènes de ce type pourrait permettre de dresser le bilan des systèmes de réparation sous le contrôle de STAT3 présents dans les cellules tumorales afin de mieux cibler l'agent de chimiothérapie à utiliser pour contourner ces systèmes de réparation ou inhiber leur activation par STAT3 pour réinduire la sensibilité de ces cellules. La détection de ces protéines par immunohistochimie, mise en

relation avec les différentes voies activatrices de STAT3, pourrait permettre alors de sélectionner les patients les plus susceptibles d'être traités par un inhibiteur de STAT3 et un agent conventionnel de chimiothérapie, choisi en fonction du système de réparation activé par STAT3.

### ***Le traitement des patients par l'EGFR et un inhibiteur de c-src.***

Le cetuximab est un anticorps monoclonal dirigé contre l'EGFR, utilisé en clinique contre les cancers colorectaux et du poumon métastatiques. Nos travaux suggèrent que de manière fortuite, l'un des mécanismes d'action du cetuximab serait d'inhiber spécifiquement l'activation des facteurs STAT3 par l'EGFR en réponse aux dommages de l'ADN. Ce mécanisme ne fonctionnerait qu'en présence d'une activité basale de c-src, car nous montrons que ceci ne fonctionne pas dans des cellules tumorales colorectales exprimant des formes actives de c-src. Il est intéressant de rappeler que le mécanisme serait basé sur l'inhibition de la réparation des fourches de réplication, fourches endommagées par un traitement de chimiothérapie conventionnel inhibant les topoisomérase I. D'autres études ont montré que le cetuximab induisait également l'inhibition de l'activité catalytique de la protéine DNA-PK, protéine impliquée dans la réparation des dommages induits par la radiothérapie (405). Ces données sont en accord avec l'hypothèse présentée dans le paragraphe précédent, à savoir que l'inhibition de la réparation des dommages de l'ADN est peut-être un point essentiel pour le traitement des tumeurs.

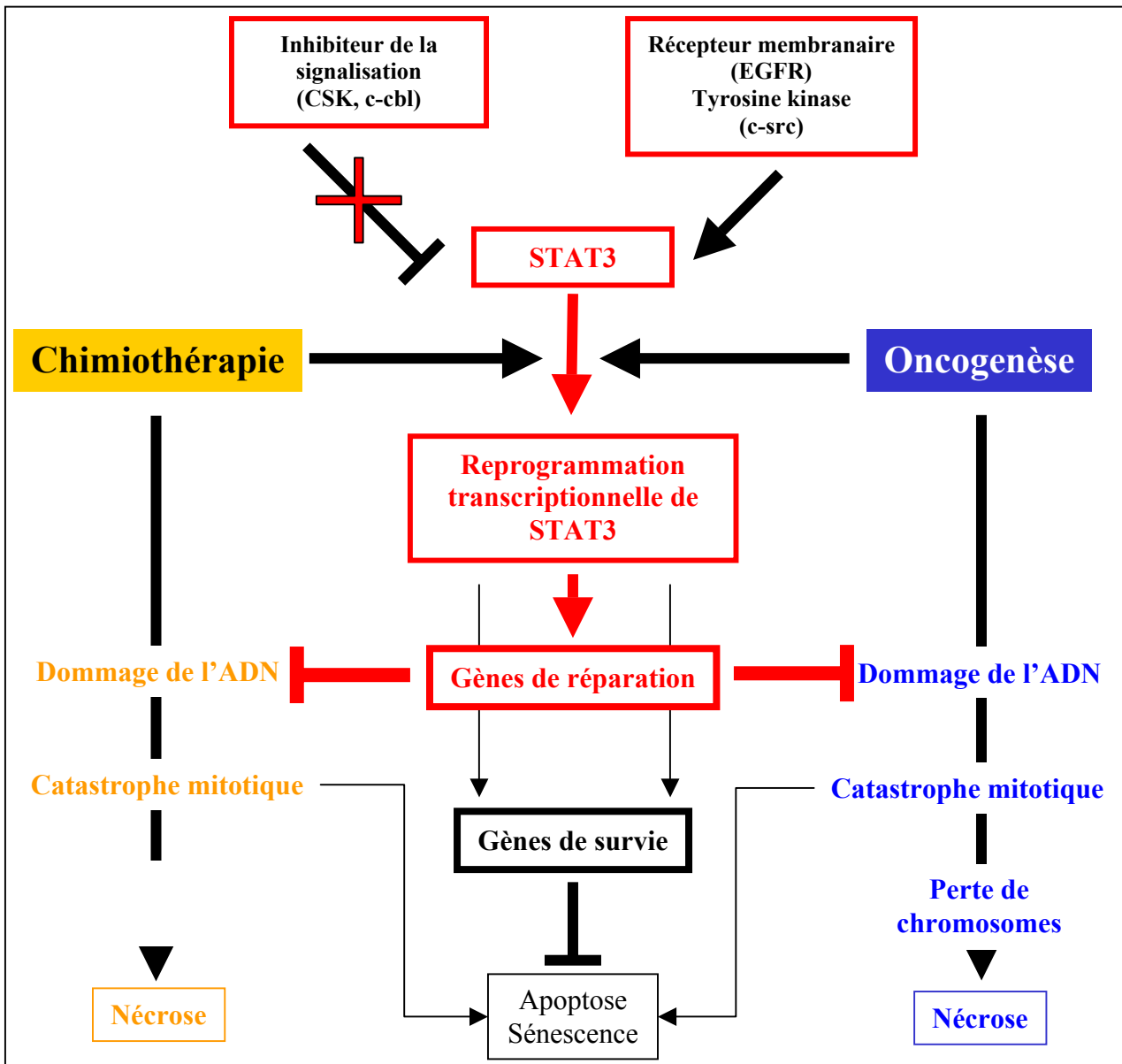
Savoir déterminer l'activité des protéines EGFR, c-src et STAT3 en tenant compte des problèmes soulevés précédemment pourrait permettre de cibler au mieux les patients susceptibles d'être traités par le cetuximab. La détection des différentes protéines régulatrices de cette voie de signalisation comme CSK ou c-cbl pourrait ainsi être optimale pour sélectionner ces patients. Finalement, l'utilisation d'un inhibiteur de c-src pourrait renforcer l'efficacité du cetuximab chez les patients possédant des formes actives de c-src. Différents inhibiteurs des kinases src sont aujourd'hui en cours de développement, le dasatinib par exemple, montre une efficacité importante contre les patients atteints de leucémie myéloïde chronique induite par BCR-Abl et résistante au gleevec (419). Il vient d'être approuvé par la FDA contre le traitement de cette pathologie et est globalement bien supporté par les patients. Ceci laisse entrevoir la possibilité de traiter les patients par le cetuximab et ce type d'agent.

### ***Le développement d'agent spécifiquement dirigé contre STAT3***

Une dernière question qui se pose est l'importance de développer des agents plus spécifiques uniquement dirigés contre STAT3. Différentes stratégies ont été envisagées. Des peptides ou des leurres oligonucléotidiques dirigés contre le domaine de liaison à l'ADN de STAT3 ont ainsi été conçus. Des oligonucléotides antisens ont aussi été dirigés contre l'ARN de STAT3. Finalement des quadruplex d'oligodeoxynucleotide G ont été utilisés et bloquent là encore la liaison à l'ADN de STAT3 (356). Ces derniers sont particulièrement intéressants car ils sont facilement administrables, franchissent aisément la membrane plasmique quand ils sont conjugués au polyéthylèneimine et sont spécifiques de STAT3 (ils n'inhibent pas STAT1 par exemple).

Aujourd'hui, les thérapies ciblées reposent toutes sur l'inhibition de récepteurs membranaires ou sur celle de domaines tyrosines kinases. Le développement d'inhibiteur spécifique de facteur de transcription offrirait ainsi un tout nouveau champ thérapeutique non utilisé aujourd'hui. L'intérêt de cibler un facteur de transcription est d'être beaucoup plus spécifique qu'avec une tyrosine kinase, qui va induire l'activation de plusieurs facteurs. Ceci permettrait notamment, comme nous l'avons vu, de cibler précisément l'addiction des tumeurs à certains oncogènes comme STAT3 qui ne sont pas indispensables aux cellules saines, à la différence des protéines kinases qui sont essentielles au fonctionnement normal de plusieurs types cellulaires. L'autre intérêt est que les tyrosines kinases sont souvent redondantes entre elles. Bien que non prouvé, ceci pourrait ne pas être le cas pour les facteurs de transcription, en particulier au cours de l'oncogenèse, quand ils acquièrent des fonctions très spécifiques. La contre partie de ceci est que le ciblage d'un facteur de transcription risque dans certain cas d'être moins efficace que celui de la tyrosine kinase ou du récepteur qui l'active qui eux, induisent l'activité de plusieurs facteurs de transcription. Par exemple l'EGFR peut induire l'activation des facteurs STAT3, STAT5, des MAPK qui vont activer le facteur AP-1, la protéine AKT etc. En résumé, le ciblage d'un facteur de transcription comme STAT3 sera certainement efficace à la condition d'être capable de différencier efficacement, les tumeurs qui possèdent des formes actives de STAT3 essentielles aux différentes fonctions associées à la tumorigenèse et à la résistance aux traitements de chimiothérapie, de celles qui présentent des formes actives de STAT3 redondantes avec d'autre voies de signalisation susceptibles de compenser l'inhibition de STAT3.

Pour finir, si l'on intègre les différents mécanismes que nous venons d'évoquer, dont la compréhension est nécessaire à l'optimisation d'un traitement de chimiothérapie auquel on ajouterait un inhibiteur de STAT3, on peut dresser un schéma permettant de mieux cerner l'interaction entre ces différents mécanismes, afin de les appréhender de manière globale et peut-être plus efficacement. Un schéma de ce type est représenté sur la figure 49.



**Figure 49 :** Les mécanismes impliquant STAT3 comme cible thérapeutique

La voie de signalisation présentée en jaune représente la voie majoritairement induite dans les tumeurs traitées par la chimiothérapie conventionnelle. Nous pensons que la voie de signalisation présentée en rouge représente les points essentiels à détecter au sein de la tumeur des patients afin d'utiliser au mieux des agents susceptibles d'inhiber STAT3 et capables de sensibiliser la tumeur au traitement classique. Accessoirement la présence des gènes de prolifération et de survie activés par STAT3 et l'absence de gènes suppresseurs de tumeur pourraient renforcer les effets d'un inhibiteur de STAT3.



## **CONCLUSION :**

Les travaux présentés dans ce manuscrit montrent que l'activation du facteur de transcription STAT3, en particulier au sein des tumeurs colorectales peut être un facteur de résistance aux traitements des tumeurs par des agents de chimiothérapie basés sur l'inhibition des topoisomérases. STAT3 permet en particulier d'inhiber l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire et facilite la réparation des dommages de l'ADN. Cibler ces fonctions pourrait permettre de mieux combattre la progression tumorale et des agents déjà utilisés en clinique, tel que le cetuximab, semblent utiliser en partie au moins ce mécanisme pour inhiber cette progression. Ces données suggèrent que STAT3 pourrait être l'un des facteurs prédictifs de la réponse aux thérapies basées sur l'inhibition d'un récepteur membranaire comme l'EGFR et un agent de chimiothérapie classique comme les inhibiteurs de topoisomérase. Ces données suggèrent également que l'inhibition de c-src qui participe à l'activation de STAT3 ou l'inhibition de STAT3 lui-même pourrait renforcer ces thérapies et offrir un nouvel arsenal thérapeutique pour traiter les patients. Des agents inhibiteurs de c-src comme le dasatinib déjà approuvé par la FDA contre certaines pathologies malignes ou des inhibiteurs spécifiques de STAT3 comme les quadruplex d'oligodeoxynucleotide G en étude préclinique pourraient ainsi être rapidement utilisés contre le cancer de tumeur solide, comme le cancer colorectal, exprimant des formes constitutivement actives de l'EGFR, c-src ou STAT3, à condition d'être capable de sélectionner correctement les patients susceptibles d'être traités par ces agents.

## *Bibliographie*

## Liste des références

1. Masui, Y. and Markert, C. L. (1971) *J Exp. Zool.* **177**, 129-145
2. Smith, L. D. and Ecker, R. E. (1970) *Curr. Top. Dev. Biol.* **5**, 1-38
3. Culotti, J. and Hartwell, L. H. (1971) *Exp. Cell Res.* **67**, 389-401
4. Nurse, P. and Thuriaux, P. (1980) *Genetics.* **96**, 627-637
5. Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983) *Cell.* **33**, 389-396
6. Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P., and Maller, J. (1988) *Cell.* **54**, 433-439
7. Woo, R. A. and Poon, R. Y. (2003) *Cell Cycle* **2**, 316-324
8. Gaubatz, S., Lees, J. A., Lindeman, G. J., and Livingston, D. M. (2001) *Mol. Cell Biol.* **21**, 1384-1392
9. Mayol, X., Garriga, J., and Grana, X. (1995) *Oncogene.* **11**, 801-808
10. Mayol, X., Garriga, J., and Grana, X. (1996) *Oncogene.* **13**, 237-246
11. Ferreira, R., Magnaghi-Jaulin, L., Robin, P., Harel-Bellan, A., and Trouche, D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 10493-10498
12. Chan, H. M., Smith, L., and La Thangue, N. B. (2001) *Oncogene* **20**, 6152-6163
13. Vaute, O., Nicolas, E., Vandell, L., and Trouche, D. (2002) *Nucleic Acids Res.* **30**, 475-481
14. Fabbriozio, E., El, M. S., Polanowska, J., Paul, C., Cook, J. R., Lee, J. H., Negre, V., Rousset, M., Pestka, S., Le, C. A., and Sardet, C. (2002) *EMBO Rep.* **3**, 641-645
15. Farkas, T., Hansen, K., Holm, K., Lukas, J., and Bartek, J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 26741-26752
16. Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S. W., Ewen, M. E., and Sherr, C. J. (1993) *Genes Dev.* **7**, 331-342
17. Araki, K., Nakajima, Y., Eto, K., and Ikeda, M. A. (2003) *Oncogene* **22**, 7632-7641
18. Trouche, D., Le, C. C., Muchardt, C., Yaniv, M., and Kouzarides, T. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 11268-11273
19. Harbour, J. W., Luo, R. X., Dei, S. A., Postigo, A. A., and Dean, D. C. (1999) *Cell* **98**, 859-869
20. Strobeck, M. W., Knudsen, K. E., Fribourg, A. F., DeCristofaro, M. F., Weissman, B. E., Imbalzano, A. N., and Knudsen, E. S. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 7748-7753
21. Cobrinik, D. (2005) *Oncogene* **24**, 2796-2809
22. it-Si-Ali, S., Ramirez, S., Barre, F. X., Dkhissi, F., Magnaghi-Jaulin, L., Girault, J. A., Robin, P., Knibiehler, M., Pritchard, L. L., Ducommun, B., Trouche, D., and Harel-Bellan, A. (1998) *Nature* **396**, 184-186
23. Morris, L., Allen, K. E., and La Thangue, N. B. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 232-239
24. Pacek, M. and Walter, J. C. (2004) *EMBO J.* **23**, 3667-3676
25. Zou, L., Mitchell, J., and Stillman, B. (1997) *Mol. Cell Biol.* **17**, 553-563

26. Masai, H., Matsui, E., You, Z., Ishimi, Y., Tamai, K., and Arai, K. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 29042-29052
27. Pollok, S., Stoepel, J., Bauerschmidt, C., Kremmer, E., and Nasheuer, H. P. (2003) *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 266-269
28. Brenot-Bosc, F., Gupta, S., Margolis, R. L., and Fotedar, R. (1995) *Chromosoma* **103**, 517-527
29. Alexandrow, M. G. and Hamlin, J. L. (2005) *J. Cell Biol.* **168**, 875-886
30. Koundrioukoff, S., Jonsson, Z. O., Hasan, S., de Jong, R. N., van, d., V, Hottiger, M. O., and Hubscher, U. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 22882-22887
31. Fotedar, A., Cannella, D., Fitzgerald, P., Rousselle, T., Gupta, S., Doree, M., and Fotedar, R. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 31627-31637
32. Chae, H. D., Yun, J., Bang, Y. J., and Shin, D. Y. (2004) *Oncogene* **23**, 4084-4088
33. Johnson, T. K., Schweppe, R. E., Septer, J., and Lewis, R. E. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 36741-36749
34. Major, M. L., Lepe, R., and Costa, R. H. (2004) *Mol. Cell Biol.* **24**, 2649-2661
35. Frontini, M., Imbriano, C., Manni, I., and Mantovani, R. (2004) *Cell Cycle* **3**, 217-222
36. Fung, T. K. and Poon, R. Y. (2005) *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 335-342
37. Nigg, E. A. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 21-32
38. Geley, S., Kramer, E., Gieffers, C., Gannon, J., Peters, J. M., and Hunt, T. (2001) *J. Cell Biol.* **153**, 137-148
39. Rosenwald, I. B. (2004) *Oncogene* **23**, 3230-3247
40. Liang, J. and Slingerland, J. M. (2003) *Cell Cycle* **2**, 339-345
41. Nakayama, K. I., Hatakeyama, S., and Nakayama, K. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 853-860
42. Lolli, G. and Johnson, L. N. (2005) *Cell Cycle* **4**, 572-577
43. Kellogg, D. R. (2003) *J. Cell Sci.* **116**, 4883-4890
44. Boutros, R., Dozier, C., and Ducommun, B. (2006) *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 185-191
45. Ruas, M. and Peters, G. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1378**, F115-F177
46. Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1999) *Genes Dev.* **13**, 1501-1512
47. Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J. A., Fero, M., Roussel, M. F., Roberts, J. M., and Sherr, C. J. (1999) *EMBO J.* **18**, 1571-1583
48. Gorospe, M., Wang, X., and Holbrook, N. J. (1999) *Gene Expr.* **7**, 377-385
49. Dash, B. C. and El-Deiry, W. S. (2005) *Mol. Cell Biol.* **25**, 3364-3387
50. Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M., and Vogt, P. K. (1976) *Nature* **260**, 170-173
51. Yeatman, T. J. (2004) *Nat. Rev. Cancer* **4**, 470-480

52. Lin, P. H., Shenoy, S., Galitski, T., and Shalloway, D. (1995) *Oncogene* **10**, 401-405
53. Maa, M. C., Leu, T. H., McCarley, D. J., Schatzman, R. C., and Parsons, S. J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 6981-6985
54. Bao, J., Gur, G., and Yarden, Y. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 2438-2443
55. Bromberg, J. F., Horvath, C. M., Besser, D., Lathem, W. W., and Darnell, J. E., Jr. (1998) *Mol. Cell Biol.* **18**, 2553-2558
56. Herber, B., Truss, M., Beato, M., and Muller, R. (1994) *Oncogene* **9**, 1295-1304
57. Sharrocks, A. D. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 827-837
58. Adams, J. M., Harris, A. W., Pinkert, C. A., Corcoran, L. M., Alexander, W. S., Cory, S., Palmiter, R. D., and Brinster, R. L. (1985) *Nature* **318**, 533-538
59. Keath, E. J., Caimi, P. G., and Cole, M. D. (1984) *Cell* **39**, 339-348
60. Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J., and Eilers, M. (1999) *EMBO J.* **18**, 5321-5333
61. Galaktionov, K., Chen, X., and Beach, D. (1996) *Nature* **382**, 511-517
62. O'Hagan, R. C., Ohh, M., David, G., de, A., I, Alt, F. W., Kaelin, W. G., Jr., and DePinho, R. A. (2000) *Genes Dev.* **14**, 2185-2191
63. Gartel, A. L. and Shchors, K. (2003) *Exp. Cell Res.* **283**, 17-21
64. Pena, A., Reddy, C. D., Wu, S., Hickok, N. J., Reddy, E. P., Yumet, G., Soprano, D. R., and Soprano, K. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 27277-27285
65. Schmidt, E. V. (2004) *Oncogene* **23**, 3217-3221
66. Zeller, K. I., Haggerty, T. J., Barrett, J. F., Guo, Q., Wonsey, D. R., and Dang, C. V. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 48285-48291
67. Galaktionov, K., Lee, A. K., Eckstein, J., Draetta, G., Meckler, J., Loda, M., and Beach, D. (1995) *Science* **269**, 1575-1577
68. Saha, P., Eichbaum, Q., Silberman, E. D., Mayer, B. J., and Dutta, A. (1997) *Mol. Cell Biol.* **17**, 4338-4345
69. Knudson, A. G., Jr. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **68**, 820-823
70. Cairns, P., Proctor, A. J., and Knowles, M. A. (1991) *Oncogene* **6**, 2305-2309
71. Yokota, J., Akiyama, T., Fung, Y. K., Benedict, W. F., Namba, Y., Hanaoka, M., Wada, M., Terasaki, T., Shimosato, Y., Sugimura, T., and . (1988) *Oncogene* **3**, 471-475
72. Fearon, E. R., Hamilton, S. R., and Vogelstein, B. (1987) *Science* **238**, 193-197
73. Mowat, M., Cheng, A., Kimura, N., Bernstein, A., and Benchimol, S. (1985) *Nature* **314**, 633-636
74. Meloni, A. R., Smith, E. J., and Nevins, J. R. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 9574-9579
75. Nielsen, S. J., Schneider, R., Bauer, U. M., Bannister, A. J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R. E., and Kouzarides, T. (2001) *Nature* **412**, 561-565

76. Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., and Lowe, S. W. (2003) *Cell* **113**, 703-716
77. Bullock, G. J., Green, J. L., and Baron, P. L. (1999) *Am. J. Surg.* **177**, 15-18
78. Munger, K., Scheffner, M., Huibregtse, J. M., and Howley, P. M. (1992) *Cancer Surv.* **12**, 197-217
79. Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S., and Bradley, A. (1992) *Nature* **356**, 215-221
80. Jacks, T., Remington, L., Williams, B. O., Schmitt, E. M., Halachmi, S., Bronson, R. T., and Weinberg, R. A. (1994) *Curr. Biol.* **4**, 1-7
81. Olive, K. P., Tuveson, D. A., Ruhe, Z. C., Yin, B., Willis, N. A., Bronson, R. T., Crowley, D., and Jacks, T. (2004) *Cell* **119**, 847-860
82. Boiko, A. D., Porteous, S., Razorenova, O. V., Krivokrysenko, V. I., Williams, B. R., and Gudkov, A. V. (2006) *Genes Dev.* **20**, 236-252
83. Harms, K., Nozell, S., and Chen, X. (2004) *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 822-842
84. Martin-Caballero, J., Flores, J. M., Garcia-Palencia, P., and Serrano, M. (2001) *Cancer Res.* **61**, 6234-6238
85. Topley, G. I., Okuyama, R., Gonzales, J. G., Conti, C., and Dotto, G. P. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 9089-9094
86. Adnane, J., Jackson, R. J., Nicosia, S. V., Cantor, A. B., Pledger, W. J., and Sefti, S. M. (2000) *Oncogene* **19**, 5338-5347
87. De la, C. E., Garcia-Cao, I., Herranz, M., Lopez, P., Garcia-Palencia, P., Flores, J. M., Serrano, M., Fernandez-Piqueras, J., and Martin-Caballero, J. (2006) *Oncogene* **25**, 4128-4132
88. Imbriano, C., Gurtner, A., Cocchiarella, F., Di, A. S., Basile, V., Gostissa, M., Dobbstein, M., Del, S. G., Piaggio, G., and Mantovani, R. (2005) *Mol. Cell Biol.* **25**, 3737-3751
89. Ho, J. S., Ma, W., Mao, D. Y., and Benchimol, S. (2005) *Mol. Cell Biol.* **25**, 7423-7431
90. Yee, K. S. and Vousden, K. H. (2005) *Carcinogenesis* **26**, 1317-1322
91. Jeffers, J. R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., MacLean, K. H., Han, J., Chittenden, T., Ihle, J. N., McKinnon, P. J., Cleveland, J. L., and Zambetti, G. P. (2003) *Cancer Cell* **4**, 321-328
92. Zou, Z., Gao, C., Nagaich, A. K., Connell, T., Saito, S., Moul, J. W., Seth, P., Appella, E., and Srivastava, S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 6051-6054
93. Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M. A., Vidal, M. N., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., and Vousden, K. H. (2006) *Cell* **126**, 107-120
94. Sengupta, S. and Harris, C. C. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 44-55
95. Vousden, K. H. and Lu, X. (2002) *Nat. Rev. Cancer* **2**, 594-604
96. Coqueret, O. (2003) *Trends Cell Biol.* **13**, 65-70
97. Huang, J., Xu, L. G., Liu, T., Zhai, Z., and Shu, H. B. (2006) *FEBS Lett.* **580**, 940-947
98. Bode, A. M. and Dong, Z. (2004) *Nat. Rev. Cancer* **4**, 793-805

99. Samuels-Lev, Y., O'Connor, D. J., Bergamaschi, D., Trigianti, G., Hsieh, J. K., Zhong, S., Campargue, I., Naumovski, L., Crook, T., and Lu, X. (2001) *Mol. Cell* **8**, 781-794
100. Townsend, P. A., Scarabelli, T. M., Davidson, S. M., Knight, R. A., Latchman, D. S., and Stephanou, A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 5811-5820
101. Shikama, N., Lee, C. W., France, S., Delavaine, L., Lyon, J., Krstic-Demonacos, M., and La Thangue, N. B. (1999) *Mol. Cell* **4**, 365-376
102. Seoane, J., Le, H. V., and Massague, J. (2002) *Nature* **419**, 729-734
103. Barbacid, M. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 779-827
104. Pasqualucci, L., Migliazza, A., Basso, K., Houldsworth, J., Chaganti, R. S., and la-Favera, R. (2003) *Blood* **101**, 2914-2923
105. Irby, R. B., Mao, W., Coppola, D., Kang, J., Loubeau, J. M., Trudeau, W., Karl, R., Fujita, D. J., Jove, R., and Yeatman, T. J. (1999) *Nat. Genet.* **21**, 187-190
106. Daigo, Y., Furukawa, Y., Kawasoe, T., Ishiguro, H., Fujita, M., Sugai, S., Nakamori, S., Liefers, G. J., Tollenaar, R. A., van, d., V, and Nakamura, Y. (1999) *Cancer Res.* **59**, 4222-4224
107. Bartel, F., Harris, L. C., Wurl, P., and Taubert, H. (2004) *Mol. Cancer Res.* **2**, 29-35
108. Solomon, D. A., Wang, Y., Fox, S. R., Lambeck, T. C., Giesting, S., Lan, Z., Senderowicz, A. M., Conti, C. J., and Knudsen, E. S. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 30339-30347
109. Wingate, H., Bedrosian, I., Akli, S., and Keyomarsi, K. (2003) *Cell Cycle* **2**, 461-466
110. Wingate, H., Zhang, N., McGarhen, M. J., Bedrosian, I., Harper, J. W., and Keyomarsi, K. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 15148-15157
111. Kunte, D. P., Wali, R. K., Koetsier, J. L., Hart, J., Kostjukova, M. N., Kilimnik, A. Y., Pyatkin, I. G., Strelnikova, S. R., and Roy, H. K. (2005) *FEBS Lett.* **579**, 3497-3502
112. Sigal, A. and Rotter, V. (2000) *Cancer Res.* **60**, 6788-6793
113. Dahia, P. L. (2000) *Endocr. Relat Cancer* **7**, 115-129
114. Issa, J. P. (2004) *Nat. Rev. Cancer* **4**, 988-993
115. Auerkari, E. I. (2006) *Oral Oncol.* **42**, 5-13
116. Arnold, C. N., Goel, A., Niedzwiecki, D., Dowell, J. M., Wasserman, L., Compton, C., Mayer, R. J., Bertagnolli, M. M., and Boland, C. R. (2004) *Cancer Biol. Ther.* **3**, 960-964
117. Feinberg, A. P., Ohlsson, R., and Henikoff, S. (2006) *Nat. Rev. Genet.* **7**, 21-33
118. Evans, J. P., Skrzynia, C., Susswein, L., and Harlan, M. (2005) *Breast Dis.* **23**, 17-29
119. Taylor, A. M. and Byrd, P. J. (2005) *J. Clin. Pathol.* **58**, 1009-1015
120. Rajagopalan, H., Nowak, M. A., Vogelstein, B., and Lengauer, C. (2003) *Nat. Rev. Cancer* **3**, 695-701
121. Strate, L. L. and Syngal, S. (2005) *Cancer Causes Control* **16**, 201-213
122. Debatisse, M., El, A. E., and Dutrillaux, B. (2006) *Cell Cycle* **5**, 578-581
123. Dutrillaux, A. M., Moulin, S., and Dutrillaux, B. (2006) *Chromosome. Res.* **14**, 549-557

124. Glover, T. W. (2006) *Cancer Lett.* **232**, 4-12
125. Ekholm-Reed, S., Mendez, J., Tedesco, D., Zetterberg, A., Stillman, B., and Reed, S. I. (2004) *J. Cell Biol.* **165**, 789-800
126. Blow, J. J. and Dutta, A. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 476-486
127. Bravou, V., Nishitani, H., Song, S. Y., Taraviras, S., and Varakis, J. (2005) *Int. J. Oncol.* **27**, 1511-1518
128. Karakaidos, P., Taraviras, S., Vassiliou, L. V., Zacharatos, P., Kastrinakis, N. G., Kougiou, D., Kouloukoussa, M., Nishitani, H., Papavassiliou, A. G., Lygerou, Z., and Gorgoulis, V. G. (2004) *Am. J. Pathol.* **165**, 1351-1365
129. Musacchio, A. and Hardwick, K. G. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 731-741
130. Kops, G. J., Weaver, B. A., and Cleveland, D. W. (2005) *Nat. Rev. Cancer* **5**, 773-785
131. Hanks, S., Coleman, K., Reid, S., Plaja, A., Firth, H., Fitzpatrick, D., Kidd, A., Mehes, K., Nash, R., Robin, N., Shannon, N., Tolmie, J., Swansbury, J., Irrthum, A., Douglas, J., and Rahman, N. (2004) *Nat. Genet.* **36**, 1159-1161
132. Baker, D. J., Jeganathan, K. B., Malureanu, L., Perez-Terzic, C., Terzic, A., and van Deursen, J. M. (2006) *J. Cell Biol.* **172**, 529-540
133. Fujiwara, T., Bandi, M., Nitta, M., Ivanova, E. V., Bronson, R. T., and Pellman, D. (2005) *Nature* **437**, 1043-1047
134. Saleh-Gohari, N., Bryant, H. E., Schultz, N., Parker, K. M., Cassel, T. N., and Helleday, T. (2005) *Mol. Cell Biol.* **25**, 7158-7169
135. Honma, M., Izumi, M., Sakuraba, M., Tadokoro, S., Sakamoto, H., Wang, W., Yatagai, F., and Hayashi, M. (2003) *Environ. Mol. Mutagen.* **42**, 288-298
136. Varga, T. and Aplan, P. D. (2005) *DNA Repair (Amst)* **4**, 1038-1046
137. Shimizu, N., Shingaki, K., Kaneko-Sasaguri, Y., Hashizume, T., and Kanda, T. (2005) *Exp. Cell Res.* **302**, 233-243
138. Sieber, O. M., Heinimann, K., and Tomlinson, I. P. (2003) *Nat. Rev. Cancer* **3**, 701-708
139. Mathieu, N., Pirzio, L., Freulet-Marriere, M. A., Desmaze, C., and Sabatier, L. (2004) *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 641-656
140. Vafa, O., Wade, M., Kern, S., Beeche, M., Pandita, T. K., Hampton, G. M., and Wahl, G. M. (2002) *Mol. Cell* **9**, 1031-1044
141. Copeland, W. C., Wachsman, J. T., Johnson, F. M., and Penta, J. S. (2002) *Cancer Invest* **20**, 557-569
142. Hernando, E., Nahle, Z., Juan, G., az-Rodriguez, E., Alaminos, M., Hemann, M., Michel, L., Mittal, V., Gerald, W., Benezra, R., Lowe, S. W., and Cordon-Cardo, C. (2004) *Nature* **430**, 797-802
143. Gunawardena, R. W., Siddiqui, H., Solomon, D. A., Mayhew, C. N., Held, J., Angus, S. P., and Knudsen, E. S. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 29278-29285
144. Lehman, N. L., Verschuren, E. W., Hsu, J. Y., Cherry, A. M., and Jackson, P. K. (2006) *Cell Cycle* **5**, 1569-1573
145. Mathieu, N., Pirzio, L., Freulet-Marriere, M. A., Desmaze, C., and Sabatier, L. (2004) *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 641-656



146. Takagi, M., Absalon, M. J., McLure, K. G., and Kastan, M. B. (2005) *Cell* **123**, 49-63
147. Brooks, C. L. and Gu, W. (2006) *Mol. Cell* **21**, 307-315
148. Gallagher, S. J., Kefford, R. F., and Rizos, H. (2006) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 1637-1641
149. Quelle, D. E., Zindy, F., Ashmun, R. A., and Sherr, C. J. (1995) *Cell* **83**, 993-1000
150. Dimri, G. P., Itahana, K., Acosta, M., and Campisi, J. (2000) *Mol. Cell Biol.* **20**, 273-285
151. Aslanian, A., Iaquinta, P. J., Verona, R., and Lees, J. A. (2004) *Genes Dev.* **18**, 1413-1422
152. Dai, M. S., Zeng, S. X., Jin, Y., Sun, X. X., David, L., and Lu, H. (2004) *Mol. Cell Biol.* **24**, 7654-7668
153. Dai, M. S. and Lu, H. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 44475-44482
154. Zhang, Y., Wolf, G. W., Bhat, K., Jin, A., Allio, T., Burkhart, W. A., and Xiong, Y. (2003) *Mol. Cell Biol.* **23**, 8902-8912
155. Gjerset, R. A. (2006) *J. Mol. Histol.*
156. Brooks, C. L. and Gu, W. (2004) *Cell Cycle* **3**, 895-899
157. Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T. J., Stinson, J. A., Sugimoto, M., Ohashi, Y., Sharrocks, A. D., Peters, G., and Hara, E. (2001) *Nature* **409**, 1067-1070
158. Gil, J., Bernard, D., Martinez, D., and Beach, D. (2004) *Nat. Cell Biol.* **6**, 67-72
159. Park, I. K., Morrison, S. J., and Clarke, M. F. (2004) *J. Clin. Invest* **113**, 175-179
160. Guney, I., Wu, S., and Sedivy, J. M. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 3645-3650
161. Nowak, K., Kerl, K., Fehr, D., Kramps, C., Gessner, C., Killmer, K., Samans, B., Berwanger, B., Christiansen, H., and Lutz, W. (2006) *Nucleic Acids Res.* **34**, 1745-1754
162. Kang, Y., Chen, C. R., and Massague, J. (2003) *Mol. Cell* **11**, 915-926
163. Voncken, J. W., Niessen, H., Neufeld, B., Rennefahrt, U., Dahlmans, V., Kubben, N., Holzer, B., Ludwig, S., and Rapp, U. R. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 5178-5187
164. Zhang, R., Poustovoitov, M. V., Ye, X., Santos, H. A., Chen, W., Daganzo, S. M., Erzberger, J. P., Serebriiskii, I. G., Canutescu, A. A., Dunbrack, R. L., Pehrson, J. R., Berger, J. M., Kaufman, P. D., and Adams, P. D. (2005) *Dev. Cell* **8**, 19-30
165. Wang, X. (2001) *Genes Dev.* **15**, 2922-2933
166. Garcia-Carbonero, R. and Supko, J. G. (2002) *Clin. Cancer Res.* **8**, 641-661
167. ten Bokkel, H. W., Gore, M., Carmichael, J., Gordon, A., Malfetano, J., Hudson, I., Broom, C., Scarabelli, C., Davidson, N., Spaczynski, M., Bolis, G., Malmstrom, H., Coleman, R., Fields, S. C., and Heron, J. F. (1997) *J. Clin. Oncol.* **15**, 2183-2193
168. von, P. J., Schiller, J. H., Shepherd, F. A., Fields, S. Z., Kleisbauer, J. P., Chrysson, N. G., Stewart, D. J., Clark, P. I., Palmer, M. C., Depierre, A., Carmichael, J., Krebs, J. B., Ross, G., Lane, S. R., and Gralla, R. (1999) *J. Clin. Oncol.* **17**, 658-667
169. Beran, M. and Kantarjian, H. (1998) *Semin. Hematol.* **35**, 26-31
170. Hande, K. R. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1400**, 173-184

171. Martincic, D. and Hande, K. R. (2005) *Cancer Chemother. Biol. Response Modif.* **22**, 101-121
172. Hande, K. R. (1998) *Eur. J. Cancer* **34**, 1514-1521
173. Zhang, C. X., Chen, A. D., Gettel, N. J., and Hsieh, T. S. (2000) *Dev. Biol.* **222**, 27-40
174. Champoux, J. J. (1998) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **60**, 111-132
175. Champoux, J. J. (1994) *Adv. Pharmacol.* **29A**, 71-82
176. Borde, V. and Dugué, M. (1998) *Biochimie* **80**, 223-233
177. Wang, J. C. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 430-440
178. Champoux, J. J. (2001) *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 369-413
179. Ju, B. G., Lunnyak, V. V., Perissi, V., Garcia-Bassets, I., Rose, D. W., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (2006) *Science* **312**, 1798-1802
180. Lia, G., Praly, E., Ferreira, H., Stockdale, C., Tse-Dinh, Y. C., Dunlap, D., Croquette, V., Bensimon, D., and Owen-Hughes, T. (2006) *Mol. Cell* **21**, 417-425
181. Strick, T. and Quessada-Vial, A. (2006) *Curr. Biol.* **16**, R287-R289
182. McClendon, A. K., Rodriguez, A. C., and Osheroff, N. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 39337-39345
183. Chang, C. J., Goulding, S., Earnshaw, W. C., and Carmena, M. (2003) *J. Cell Sci.* **116**, 4715-4726
184. Pommier, Y., Redon, C., Rao, V. A., Seiler, J. A., Sordet, O., Takemura, H., Antony, S., Meng, L., Liao, Z., Kohlhagen, G., Zhang, H., and Kohn, K. W. (2003) *Mutat. Res.* **532**, 173-203
185. Stewart, A. F., Herrera, R. E., and Nordheim, A. (1990) *Cell* **60**, 141-149
186. Elsea, S. H., Westergaard, M., Burden, D. A., Lomenick, J. P., and Osheroff, N. (1997) *Biochemistry* **36**, 2919-2924
187. El, A. E., Gerbault-Seureau, M., Muleris, M., Dutrillaux, B., and Debatisse, M. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 18069-18074
188. Shea, M. E. and Hiasa, H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 22747-22754
189. Ralf, C., Hickson, I. D., and Wu, L. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 22839-22846
190. Constantinou, A., Chen, X. B., McGowan, C. H., and West, S. C. (2002) *EMBO J.* **21**, 5577-5585
191. Mao, Y., Desai, S. D., Ting, C. Y., Hwang, J., and Liu, L. F. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 40652-40658
192. Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., Chau, I., and Van, C. E. (2004) *N. Engl. J. Med.* **351**, 337-345
193. Goldstein, N. I., Prewett, M., Zuklys, K., Rockwell, P., and Mendelsohn, J. (1995) *Clin. Cancer Res.* **1**, 1311-1318
194. Li, S., Schmitz, K. R., Jeffrey, P. D., Wiltzius, J. J., Kussie, P., and Ferguson, K. M. (2005) *Cancer Cell* **7**, 301-311
195. Saltz, L. B., Meropol, N. J., Loehrer, P. J., Sr., Needle, M. N., Kopit, J., and Mayer, R. J. (2004) *J. Clin. Oncol.* **22**, 1201-1208

196. Iqbal, S. and Lenz, H. J. (2004) *Cancer Chemother. Pharmacol.* **54 Suppl 1**, S32-S39
197. Chung, K. Y., Shia, J., Kemeny, N. E., Shah, M., Schwartz, G. K., Tse, A., Hamilton, A., Pan, D., Schrag, D., Schwartz, L., Klimstra, D. S., Fridman, D., Kelsen, D. P., and Saltz, L. B. (2005) *J. Clin. Oncol.* **23**, 1803-1810
198. Veronese, M. L., Sun, W., Giantonio, B., Berlin, J., Shults, J., Davis, L., Haller, D. G., and O'Dwyer, P. J. (2005) *Br. J. Cancer* **92**, 1846-1849
199. Ciardiello, F., Bianco, R., Damiano, V., De, L. S., Pepe, S., De, P. S., Fan, Z., Mendelsohn, J., Bianco, A. R., and Tortora, G. (1999) *Clin. Cancer Res.* **5**, 909-916
200. Wild, R., Fager, K., Flefleh, C., Kan, D., Inigo, I., Castaneda, S., Luo, F. R., Camuso, A., McGlinchey, K., and Rose, W. C. (2006) *Mol. Cancer Ther.* **5**, 104-113
201. Vincenzi, B., Santini, D., and Tonini, G. (2006) *J. Clin. Oncol.* **24**, 1957-1958
202. Kishida, O., Miyazaki, Y., Murayama, Y., Ogasa, M., Miyazaki, T., Yamamoto, T., Watabe, K., Tsutsui, S., Kiyohara, T., Shimomura, I., and Shinomura, Y. (2005) *Cancer Chemother. Pharmacol.* **55**, 393-403
203. Blobel, C. P. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 32-43
204. Benhar, M., Engelberg, D., and Levitzki, A. (2002) *Oncogene* **21**, 8723-8731
205. Zhang, Q., Thomas, S. M., Xi, S., Smithgall, T. E., Siegfried, J. M., Kamens, J., Gooding, W. E., and Grandis, J. R. (2004) *Cancer Res.* **64**, 6166-6173
206. Van, S. S., Kyula, J., Kelly, D. M., Karaiskou-McCaul, A., Stokesberry, S. A., Van, C. E., Longley, D. B., and Johnston, P. G. (2006) *Mol. Cancer Ther.* **5**, 1154-1165
207. Johnson, B. E. and Janne, P. A. (2005) *Cancer Res.* **65**, 7525-7529
208. Tsuruta, F., Masuyama, N., and Gotoh, Y. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 14040-14047
209. Boerner, J. L., Demory, M. L., Silva, C., and Parsons, S. J. (2004) *Mol. Cell Biol.* **24**, 7059-7071
210. Friedmann, B. J., Caplin, M., Savic, B., Shah, T., Lord, C. J., Ashworth, A., Hartley, J. A., and Hochhauser, D. (2006) *Mol. Cancer Ther.* **5**, 209-218
211. Hagan, M., Yacoub, A., and Dent, P. (2004) *Clin. Cancer Res.* **10**, 5724-5731
212. Szumiel, I. (2006) *Cell Signal.* **18**, 1537-1548
213. Dittmann, K., Mayer, C., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Raju, U., Milas, L., Chen, D. J., Kehlbach, R., and Rodemann, H. P. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 31182-31189
214. Friedmann, B. J., Caplin, M., Savic, B., Shah, T., Lord, C. J., Ashworth, A., Hartley, J. A., and Hochhauser, D. (2006) *Mol. Cancer Ther.* **5**, 209-218
215. Argasinska, J., Zhou, K., Donnelly, R. J., Hay, R. T., and Lee, C. G. (2004) *J. Mol. Biol.* **341**, 15-25
216. Laine, J. P. and Egly, J. M. (2006) *Trends Genet.* **22**, 430-436
217. Dip, R., Camenisch, U., and Naegeli, H. (2004) *DNA Repair (Amst)* **3**, 1409-1423
218. Mao, Y., Sun, M., Desai, S. D., and Liu, L. F. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 4046-4051

219. Desai, S. D., Li, T. K., Rodriguez-Bauman, A., Rubin, E. H., and Liu, L. F. (2001) *Cancer Res.* **61**, 5926-5932
220. Nitiss, K. C., Malik, M., He, X., White, S. W., and Nitiss, J. L. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 8953-8958
221. Caldecott, K. W. (2003) *DNA Repair (Amst)* **2**, 955-969
222. Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U., and Schwarz, K. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 712-720
223. Weterings, E. and van, G. (2004) *DNA Repair (Amst)* **3**, 1425-1435
224. Lavin, M. F. (2004) *DNA Repair (Amst)* **3**, 1515-1520
225. Lambert, S. and Carr, A. M. (2005) *Biochimie* **87**, 591-602
226. Shechter, D., Costanzo, V., and Gautier, J. (2004) *DNA Repair (Amst)* **3**, 901-908
227. Parrilla-Castellar, E. R., Arlander, S. J., and Karnitz, L. (2004) *DNA Repair (Amst)* **3**, 1009-1014
228. Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H. Y., and Dunphy, W. G. (2006) *Cell* **124**, 943-955
229. Davies, S. L., North, P. S., Dart, A., Lakin, N. D., and Hickson, I. D. (2004) *Mol. Cell Biol.* **24**, 1279-1291
230. Pichierri, P. and Franchitto, A. (2004) *Bioessays* **26**, 306-313
231. Trezn, K., Smith, E., Smith, S., and Costanzo, V. (2006) *EMBO J.* **25**, 1764-1774
232. West, S. C. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 435-445
233. Helleday, T. (2003) *Mutat. Res.* **532**, 103-115
234. Errington, F., Willmore, E., Leontiou, C., Tilby, M. J., and Austin, C. A. (2004) *Cancer Chemother. Pharmacol.* **53**, 155-162
235. Potter, A. J. and Rabinovitch, P. S. (2005) *Mutat. Res.* **572**, 27-44
236. Deming, P. B., Cistulli, C. A., Zhao, H., Graves, P. R., Piwnica-Worms, H., Paules, R. S., Downes, C. S., and Kaufmann, W. K. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 12044-12049
237. Chen, Y. and Sanchez, Y. (2004) *DNA Repair (Amst)* **3**, 1025-1032
238. Jin, J., Shirogane, T., Xu, L., Nalepa, G., Qin, J., Elledge, S. J., and Harper, J. W. (2003) *Genes Dev.* **17**, 3062-3074
239. Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 792-804
240. Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H., and Elledge, S. J. (1997) *Science* **277**, 1497-1501
241. Lindqvist, A., Kallstrom, H., and Karlsson, R. C. (2004) *J. Cell Sci.* **117**, 4979-4990
242. Ahn, J., Urist, M., and Prives, C. (2004) *DNA Repair (Amst)* **3**, 1039-1047
243. Lee, J. M. and Bernstein, A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 5742-5746
244. Chang, E. H., Pirollo, K. F., Zou, Z. Q., Cheung, H. Y., Lawler, E. L., Garner, R., White, E., Bernstein, W. B., Fraumeni, J. W., Jr., and Blattner, W. A. (1987) *Science* **237**, 1036-1039

245. Gao, Y., Ferguson, D. O., Xie, W., Manis, J. P., Sekiguchi, J., Frank, K. M., Chaudhuri, J., Horner, J., DePinho, R. A., and Alt, F. W. (2000) *Nature* **404**, 897-900
246. Al Rashid, S. T., Dellaire, G., Cuddihy, A., Jalali, F., Vaid, M., Coackley, C., Folkard, M., Xu, Y., Chen, B. P., Chen, D. J., Lilge, L., Prise, K. M., Bazett Jones, D. P., and Bristow, R. G. (2005) *Cancer Res.* **65**, 10810-10821
247. Sluss, H. K., Armata, H., Gallant, J., and Jones, S. N. (2004) *Mol. Cell Biol.* **24**, 976-984
248. Saito, S., Goodarzi, A. A., Higashimoto, Y., Noda, Y., Lees-Miller, S. P., Appella, E., and Anderson, C. W. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 12491-12494
249. Dumaz, N. and Meek, D. W. (1999) *EMBO J.* **18**, 7002-7010
250. Chehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M., and Halazonetis, T. D. (2000) *Genes Dev.* **14**, 278-288
251. Hirao, A., Kong, Y. Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S. J., and Mak, T. W. (2000) *Science* **287**, 1824-1827
252. Kamijo, T., Bodner, S., van de, K. E., Randle, D. H., and Sherr, C. J. (1999) *Cancer Res.* **59**, 2217-2222
253. Khan, S. H., Moritsugu, J., and Wahl, G. M. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 3266-3271
254. Khan, S., Guevara, C., Fujii, G., and Parry, D. (2004) *Oncogene* **23**, 6040-6046
255. Liu, G., Parant, J. M., Lang, G., Chau, P., Chavez-Reyes, A., El-Naggar, A. K., Multani, A., Chang, S., and Lozano, G. (2004) *Nat. Genet.* **36**, 63-68
256. Shen, K. C., Heng, H., Wang, Y., Lu, S., Liu, G., Deng, C. X., Brooks, S. C., and Wang, Y. A. (2005) *Cancer Res.* **65**, 8747-8753
257. Waldman, T., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1995) *Cancer Res.* **55**, 5187-5190
258. Waldman, T., Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1996) *Nature* **381**, 713-716
259. Zhan, Q. (2005) *Mutat. Res.* **569**, 133-143
260. Fayolle, C., Pourchet, J., Cohen, A., Pedoux, R., Puisieux, A., de Fromentel, C. C., Dore, J. F., and Voeltzel, T. (2006) *Cell Cycle* **5**,
261. Shao, S., Wang, Y., Jin, S., Song, Y., Wang, X., Fan, W., Zhao, Z., Fu, M., Tong, T., Dong, L., Fan, F., Xu, N., and Zhan, Q. (2006) *J. Biol. Chem.*
262. Furuta, T., Hayward, R. L., Meng, L. H., Takemura, H., Aune, G. J., Bonner, W. M., Aladjem, M. I., Kohn, K. W., and Pommier, Y. (2006) *Oncogene* **25**, 2839-2849
263. Bhonde, M. R., Hanski, M. L., Notter, M., Gillissen, B. F., Daniel, P. T., Zeitz, M., and Hanski, C. (2006) *Oncogene* **25**, 165-175
264. Andreassen, P. R., Lacroix, F. B., Lohez, O. D., and Margolis, R. L. (2001) *Cancer Res.* **61**, 7660-7668
265. Vigneron, A., Roninson, I. B., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2005) *Cancer Res.* **65**, 8927-8935
266. Brown, J. M. and Wilson, G. (2003) *Cancer Biol. Ther.* **2**, 477-490
267. Gudkov, A. V. and Komarova, E. A. (2003) *Nat. Rev. Cancer* **3**, 117-129
268. Brown, J. M. and Wouters, B. G. (1999) *Cancer Res.* **59**, 1391-1399

269. Brown, J. M. and Attardi, L. D. (2005) *Nat. Rev. Cancer* **5**, 231-237
270. Roninson, I. B., Broude, E. V., and Chang, B. D. (2001) *Drug Resist. Updat.* **4**, 303-313
271. Roberson, R. S., Kussick, S. J., Vallieres, E., Chen, S. Y., and Wu, D. Y. (2005) *Cancer Res.* **65**, 2795-2803
272. te Poele, R. H., Okorokov, A. L., Jardine, L., Cummings, J., and Joel, S. P. (2002) *Cancer Res.* **62**, 1876-1883
273. Brown, J. M. and Wouters, B. G. (2001) *Drug Resist. Updat.* **4**, 135-136
274. Gewirtz, D. A. (1999) *Biochem. Pharmacol.* **57**, 727-741
275. Bhonde, M. R., Hanski, M. L., Budczies, J., Cao, M., Gillissen, B., Moorthy, D., Simonetta, F., Scherubl, H., Truss, M., Hagemeyer, C., Mewes, H. W., Daniel, P. T., Zeitz, M., and Hanski, C. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 8675-8685
276. Weaver, B. A., Silk, A. D., and Cleveland, D. W. (2006) *Nature* **442**, E9-10
277. Vogel, C., Kienitz, A., Muller, R., and Bastians, H. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 4025-4028
278. Tao, W., South, V. J., Zhang, Y., Davide, J. P., Farrell, L., Kohl, N. E., Sepp-Lorenzino, L., and Lobell, R. B. (2005) *Cancer Cell* **8**, 49-59
279. Rieder, C. L. and Maiato, H. (2004) *Dev. Cell* **7**, 637-651
280. Brito, D. A. and Rieder, C. L. (2006) *Curr. Biol.* **16**, 1194-1200
281. Shin, H. J., Baek, K. H., Jeon, A. H., Park, M. T., Lee, S. J., Kang, C. M., Lee, H. S., Yoo, S. H., Chung, D. H., Sung, Y. C., McKeon, F., and Lee, C. W. (2003) *Cancer Cell* **4**, 483-497
282. Weaver, B. A. and Cleveland, D. W. (2005) *Cancer Cell* **8**, 7-12
283. Chu, K., Teele, N., Dewey, M. W., Albright, N., and Dewey, W. C. (2004) *Radiat. Res.* **162**, 270-286
284. Erenpreisa, J., Kalejs, M., Ianzini, F., Kosmacek, E. A., Mackey, M. A., Emzinsh, D., Cragg, M. S., Ivanov, A., and Illidge, T. M. (2005) *Cell Biol. Int.* **29**, 1005-1011
285. Sundaram, M., Guernsey, D. L., Rajaraman, M. M., and Rajaraman, R. (2004) *Cancer Biol. Ther.* **3**, 207-218
286. Agarwal, R. and Kaye, S. B. (2003) *Nat. Rev. Cancer* **3**, 502-516
287. Park, S. Y., Lam, W., and Cheng, Y. C. (2002) *Cancer Res.* **62**, 459-465
288. Boulton, S., Kyle, S., and Durkacz, B. W. (2000) *Eur. J. Cancer* **36**, 535-541
289. Tao, Z. F. and Lin, N. H. (2006) *Anticancer Agents Med. Chem.* **6**, 377-388
290. Hotte, S. J., Oza, A., Winqvist, E. W., Moore, M., Chen, E. X., Brown, S., Pond, G. R., Dancey, J. E., and Hirte, H. W. (2006) *Ann. Oncol.* **17**, 334-340
291. Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M., and Stark, G. R. (1994) *Science* **264**, 1415-1421
292. Ma, J., Zhang, T., Novotny-Diermayr, V., Tan, A. L., and Cao, X. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 29252-29260
293. Finbloom, D. S. and Larner, A. C. (1995) *Cell Signal.* **7**, 739-745

294. Zhang, T., Kee, W. H., Seow, K. T., Fung, W., and Cao, X. (2000) *Mol. Cell Biol.* **20**, 7132-7139
295. Zhao, H., Nakajima, R., Kunimoto, H., Sasaki, T., Kojima, H., and Nakajima, K. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 541-548
296. Maritano, D., Sugrue, M. L., Tininini, S., Dewilde, S., Strobl, B., Fu, X., Murray-Tait, V., Chiarle, R., and Poli, V. (2004) *Nat. Immunol.* **5**, 401-409
297. Schaefer, T. S., Sanders, L. K., and Nathans, D. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 9097-9101
298. Yang, J., Chatterjee-Kishore, M., Staugaitis, S. M., Nguyen, H., Schlessinger, K., Levy, D. E., and Stark, G. R. (2005) *Cancer Res.* **65**, 939-947
299. Wang, R., Cherukuri, P., and Luo, J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 11528-11534
300. Yuan, Z. L., Guan, Y. J., Chatterjee, D., and Chin, Y. E. (2005) *Science* **307**, 269-273
301. Schuringa, J. J., Dekker, L. V., Vellenga, E., and Kruijer, W. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 27709-27715
302. Giraud, S., Bienvenu, F., Avril, S., Gascan, H., Heery, D. M., and Coqueret, O. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 8004-8011
303. Giraud, S., Hurlstone, A., Avril, S., and Coqueret, O. (2004) *Oncogene* **23**, 7391-7398
304. Garriga, J. and Grana, X. (2004) *Gene* **337**, 15-23
305. Xiao, H., Chung, J., Kao, H. Y., and Yang, Y. C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 11197-11204
306. Zhang, Q., Wang, H. Y., Woetmann, A., Raghunath, P. N., Odum, N., and Wasik, M. A. (2006) *Blood* **108**, 1058-1064
307. Barre, B., Vigneron, A., and Coqueret, O. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 15673-15681
308. Vigneron, A., Cherier, J., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2006) *J. Biol. Chem.*
309. Lerner, L., Henriksen, M. A., Zhang, X., and Darnell, J. E., Jr. (2003) *Genes Dev.* **17**, 2564-2577
310. Poehlmann, T. G., Fitzgerald, J. S., Meissner, A., Wengenmayer, T., Schleussner, E., Friedrich, K., and Markert, U. R. (2005) *Placenta* **26 Suppl A**, S37-S41
311. Chung, Y. J., Park, B. B., Kang, Y. J., Kim, T. M., Eaves, C. J., and Oh, I. H. (2006) *Blood* **108**, 1208-1215
312. Akira, S. (2000) *Oncogene* **19**, 2607-2611
313. Betz, U. A., Bloch, W., van den, B. M., Yoshida, K., Taga, T., Kishimoto, T., Addicks, K., Rajewsky, K., and Muller, W. (1998) *J. Exp. Med.* **188**, 1955-1965
314. Sano, S., Itami, S., Takeda, K., Tarutani, M., Yamaguchi, Y., Miura, H., Yoshikawa, K., Akira, S., and Takeda, J. (1999) *EMBO J.* **18**, 4657-4668
315. Taub, R. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 836-847
316. Kiuchi, N., Nakajima, K., Ichiba, M., Fukada, T., Narimatsu, M., Mizuno, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1999) *J. Exp. Med.* **189**, 63-73
317. Jenab, S. and Morris, P. L. (1998) *Endocrinology* **139**, 1883-1890

318. Leslie, K., Lang, C., Devgan, G., Azare, J., Berishaj, M., Gerald, W., Kim, Y. B., Paz, K., Darnell, J. E., Albanese, C., Sakamaki, T., Pestell, R., and Bromberg, J. (2006) *Cancer Res.* **66**, 2544-2552
319. Konnikova, L., Simeone, M. C., Kruger, M. M., Kotecki, M., and Cochran, B. H. (2005) *Cancer Res.* **65**, 6516-6520
320. Hodge, D. R., Hurt, E. M., and Farrar, W. L. (2005) *Eur. J. Cancer* **41**, 2502-2512
321. Catlett-Falcone, R., Landowski, T. H., Oshiro, M. M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J. L., Nunez, G., Dalton, W. S., and Jove, R. (1999) *Immunity.* **10**, 105-115
322. Puthier, D., Bataille, R., and Amiot, M. (1999) *Eur. J. Immunol.* **29**, 3945-3950
323. Park, S., Kim, D., Kaneko, S., Szewczyk, K. M., Nicosia, S. V., Yu, H., Jove, R., and Cheng, J. Q. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 38932-38941
324. Gritsko, T., Williams, A., Turkson, J., Kaneko, S., Bowman, T., Huang, M., Nam, S., Eweis, I., Diaz, N., Sullivan, D., Yoder, S., Enkemann, S., Eschrich, S., Lee, J. H., Beam, C. A., Cheng, J., Minton, S., Muro-Cacho, C. A., and Jove, R. (2006) *Clin. Cancer Res.* **12**, 11-19
325. Yahata, Y., Shirakata, Y., Tokumaru, S., Yamasaki, K., Sayama, K., Hanakawa, Y., Detmar, M., and Hashimoto, K. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 40026-40031
326. Coppo, P., Flamant, S., De, M., V, Jarrier, P., Guillier, M., Bonnet, M. L., Lacout, C., Guilhot, F., Vainchenker, W., and Turhan, A. G. (2006) *Br. J. Haematol.* **134**, 171-179
327. Spiekermann, K., Pau, M., Schwab, R., Schmieja, K., Franzrahe, S., and Hiddemann, W. (2002) *Exp. Hematol.* **30**, 262-271
328. Chiarle, R., Simmons, W. J., Cai, H., Dhall, G., Zamo, A., Raz, R., Karras, J. G., Levy, D. E., and Inghirami, G. (2005) *Nat. Med.* **11**, 623-629
329. Bromberg, J. (2002) *J. Clin. Invest* **109**, 1139-1142
330. Chan, K. S., Sano, S., Kiguchi, K., Anders, J., Komazawa, N., Takeda, J., and DiGiovanni, J. (2004) *J. Clin. Invest* **114**, 720-728
331. Jenkins, B. J., Grail, D., Nheu, T., Najdovska, M., Wang, B., Waring, P., Inglese, M., McLoughlin, R. M., Jones, S. A., Topley, N., Baumann, H., Judd, L. M., Giraud, A. S., Boussioutas, A., Zhu, H. J., and Ernst, M. (2005) *Nat. Med.* **11**, 845-852
332. Scheller, J., Ohnesorge, N., and Rose-John, S. (2006) *Scand. J. Immunol.* **63**, 321-329
333. Hanada, T., Kobayashi, T., Chinen, T., Saeki, K., Takaki, H., Koga, K., Minoda, Y., Sanada, T., Yoshioka, T., Mimata, H., Kato, S., and Yoshimura, A. (2006) *J. Exp. Med.* **203**, 1391-1397
334. Cramer, A., Kleiner, S., Westermann, M., Meissner, A., Lange, A., and Friedrich, K. (2005) *J. Cell Biochem.* **95**, 805-816
335. Xi, S., Zhang, Q., Dyer, K. F., Lerner, E. C., Smithgall, T. E., Gooding, W. E., Kamens, J., and Grandis, J. R. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 31574-31583
336. Bromberg, J. F., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G., Albanese, C., and Darnell, J. E., Jr. (1999) *Cell* **98**, 295-303
337. Zhang, Y., Turkson, J., Carter-Su, C., Smithgall, T., Levitzki, A., Kraker, A., Krolewski, J. J., Medveczky, P., and Jove, R. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 24935-24944



338. Sinibaldi, D., Wharton, W., Turkson, J., Bowman, T., Pledger, W. J., and Jove, R. (2000) *Oncogene* **19**, 5419-5427
339. Bowman, T., Broome, M. A., Sinibaldi, D., Wharton, W., Pledger, W. J., Sedivy, J. M., Irby, R., Yeatman, T., Courtneidge, S. A., and Jove, R. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 7319-7324
340. Martin, G. S. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 467-475
341. Hynes, N. E. and Lane, H. A. (2005) *Nat. Rev. Cancer* **5**, 341-354
342. Untawale, S., Zorbas, M. A., Hodgson, C. P., Coffey, R. J., Gallick, G. E., North, S. M., Wildrick, D. M., Olive, M., Blick, M., Yeoman, L. C., and . (1993) *Cancer Res.* **53**, 1630-1636
343. Choi, S. H., Mendrola, J. M., and Lemmon, M. A. (2006) *Oncogene*
344. Quadros, M. R., Peruzzi, F., Kari, C., and Rodeck, U. (2004) *Cancer Res.* **64**, 3934-3939
345. Bromann, P. A., Korkaya, H., and Courtneidge, S. A. (2004) *Oncogene* **23**, 7957-7968
346. Ren, Z. and Schaefer, T. S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 38486-38493
347. Biscardi, J. S., Ishizawar, R. C., Silva, C. M., and Parsons, S. J. (2000) *Breast Cancer Res.* **2**, 203-210
348. Alvarez, J. V., Greulich, H., Sellers, W. R., Meyerson, M., and Frank, D. A. (2006) *Cancer Res.* **66**, 3162-3168
349. Cam, W. R., Masaki, T., Shiratori, Y., Kato, N., Ikenoue, T., Okamoto, M., Igarashi, K., Sano, T., and Omata, M. (2001) *Cancer* **92**, 61-70
350. Alvarez, J. V. and Frank, D. A. (2004) *Cancer Biol. Ther.* **3**, 1045-1050
351. Dechow, T. N., Pedranzini, L., Leitch, A., Leslie, K., Gerald, W. L., Linkov, I., and Bromberg, J. F. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 10602-10607
352. Niu, G., Wright, K. L., Huang, M., Song, L., Haura, E., Turkson, J., Zhang, S., Wang, T., Sinibaldi, D., Coppola, D., Heller, R., Ellis, L. M., Karras, J., Bromberg, J., Pardoll, D., Jove, R., and Yu, H. (2002) *Oncogene* **21**, 2000-2008
353. Terui, K., Enosawa, S., Haga, S., Zhang, H. Q., Kuroda, H., Kouchi, K., Matsunaga, T., Yoshida, H., Engelhardt, J. F., Irani, K., Ohnuma, N., and Ozaki, M. (2004) *J. Hepatol.* **41**, 957-965
354. Alvarez, J. V., Febbo, P. G., Ramaswamy, S., Loda, M., Richardson, A., and Frank, D. A. (2005) *Cancer Res.* **65**, 5054-5062
355. Carragher, N. O., Westhoff, M. A., Riley, D., Potter, D. A., Dutt, P., Elce, J. S., Greer, P. A., and Frame, M. C. (2002) *Mol. Cell Biol.* **22**, 257-269
356. Jing, N. and Tweardy, D. J. (2005) *Anticancer Drugs* **16**, 601-607
357. Sumita, N., Bito, T., Nakajima, K., and Nishigori, C. (2006) *Exp. Dermatol.* **15**, 291-299
358. Altieri, D. C. (2006) *Curr. Opin. Cell Biol.*
359. Guo, W., Pylayeva, Y., Pepe, A., Yoshioka, T., Muller, W. J., Inghirami, G., and Giancotti, F. G. (2006) *Cell* **126**, 489-502
360. Fitzgerald, J. S., Tsareva, S. A., Poehlmann, T. G., Berod, L., Meissner, A., Corvinus, F. M., Wiederanders, B., Pfitzner, E., Markert, U. R., and Friedrich, K. (2005) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 2284-2296

361. Dauer, D. J., Ferraro, B., Song, L., Yu, B., Mora, L., Buettner, R., Enkemann, S., Jove, R., and Haura, E. B. (2005) *Oncogene* **24**, 3397-3408
362. Berger, D. H. (2002) *World J. Surg.* **26**, 767-771
363. Becker, C., Fantini, M. C., Schramm, C., Lehr, H. A., Wirtz, S., Nikolaev, A., Burg, J., Strand, S., Kiesslich, R., Huber, S., Ito, H., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Galle, P. R., Blessing, M., Rose-John, S., and Neurath, M. F. (2004) *Immunity*. **21**, 491-501
364. Henderson, J., Withford-Cave, J. M., Duffy, D. L., Cole, S. J., Sawyer, N. A., Gulbin, J. P., Hahn, A., Trent, R. J., and Yu, B. (2005) *Hum. Genet.* **118**, 416-423
365. Thomas, M., Finnegan, C. E., Rogers, K. M., Purcell, J. W., Trimble, A., Johnston, P. G., and Boland, M. P. (2004) *Cancer Res.* **64**, 8357-8364
366. Ravi, R., Jain, A. J., Schulick, R. D., Pham, V., Prouser, T. S., Allen, H., Mayer, E. G., Yu, H., Pardoll, D. M., Ashkenazi, A., and Bedi, A. (2004) *Cancer Res.* **64**, 9105-9114
367. Emoto, Y., Manome, Y., Meinhardt, G., Kisaki, H., Kharbanda, S., Robertson, M., Ghayur, T., Wong, W. W., Kamen, R., Weichselbaum, R., and . (1995) *EMBO J.* **14**, 6148-6156
368. Fu, A. K., Fu, W. Y., Ng, A. K., Chien, W. W., Ng, Y. P., Wang, J. H., and Ip, N. Y. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 6728-6733
369. Zhang, Y., Cho, Y. Y., Petersen, B. L., Bode, A. M., Zhu, F., and Dong, Z. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 12650-12659
370. Simon, A. R., Rai, U., Fanburg, B. L., and Cochran, B. H. (1998) *Am. J. Physiol* **275**, C1640-C1652
371. Marchetti, M. A., Weinberger, M., Murakami, Y., Burhans, W. C., and Huberman, J. A. (2006) *J. Cell Sci.* **119**, 124-131
372. Winograd-Katz, S. E. and Levitzki, A. (2006) *Oncogene*
373. Fischer, O. M., Hart, S., Gschwind, A., Prenzel, N., and Ullrich, A. (2004) *Mol. Cell Biol.* **24**, 5172-5183
374. Diaz, N., Minton, S., Cox, C., Bowman, T., Gritsko, T., Garcia, R., Eweis, I., Wloch, M., Livingston, S., Seijo, E., Cantor, A., Lee, J. H., Beam, C. A., Sullivan, D., Jove, R., and Muro-Cacho, C. A. (2006) *Clin. Cancer Res.* **12**, 20-28
375. Niu, G., Wright, K. L., Ma, Y., Wright, G. M., Huang, M., Irby, R., Briggs, J., Karras, J., Cress, W. D., Pardoll, D., Jove, R., Chen, J., and Yu, H. (2005) *Mol. Cell Biol.* **25**, 7432-7440
376. Slupianek, A., Schmutte, C., Tomblin, G., Nieborowska-Skorska, M., Hoser, G., Nowicki, M. O., Pierce, A. J., Fishel, R., and Skorski, T. (2001) *Mol. Cell* **8**, 795-806
377. Petterino, C., Martano, M., Cascio, P., Cerruti, F., Martini, M., Morello, E., Bruno, R., Castagnaro, M., and Buracco, P. (2006) *J. Comp Pathol.* **134**, 91-100
378. Khoury, J. D., Medeiros, L. J., Rassidakis, G. Z., Yared, M. A., Tsioli, P., Leventaki, V., Schmitt-Graeff, A., Herling, M., Amin, H. M., and Lai, R. (2003) *Clin. Cancer Res.* **9**, 3692-3699
379. Kusaba, T., Nakayama, T., Yamazumi, K., Yakata, Y., Yoshizaki, A., Inoue, K., Nagayasu, T., and Sekine, I. (2006) *Oncol. Rep.* **15**, 1445-1451
380. Fish-Stegall, A., Searcy, P., and Sipples, R. (2006) *Semin. Oncol. Nurs.* **22**, 10-19
381. Kim, G. P. and Grothey, A. (2005) *Clin. Colorectal Cancer* **5 Suppl 2**, S89-S97

382. Berclaz, G., Altermatt, H. J., Rohrbach, V., Siragusa, A., Dreher, E., and Smith, P. D. (2001) *Int. J. Oncol.* **19**, 1155-1160
383. Nakata, E., Hunter, N., Mason, K., Fan, Z., Ang, K. K., and Milas, L. (2004) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **59**, 1163-1173
384. Modi, S., D'Andrea, G., Norton, L., Yao, T. J., Caravelli, J., Rosen, P. P., Hudis, C., and Seidman, A. D. (2006) *Clin. Breast Cancer* **7**, 270-277
385. Haura, E. B., Zheng, Z., Song, L., Cantor, A., and Bepler, G. (2005) *Clin. Cancer Res.* **11**, 8288-8294
386. Riedel, R. F. and Febbo, P. G. (2005) *Future. Oncol.* **1**, 461-466
387. Erjala, K., Sundvall, M., Junttila, T. T., Zhang, N., Savisalo, M., Mali, P., Kulmala, J., Pulkkinen, J., Grenman, R., and Elenius, K. (2006) *Clin. Cancer Res.* **12**, 4103-4111
388. Hambek, M., Baghi, M., Strebhardt, K., May, A., Adunka, O., Gstottner, W., and Knecht, R. (2004) *Anticancer Res.* **24**, 3881-3886
389. Zhang, X., Chen, Z. G., Choe, M. S., Lin, Y., Sun, S. Y., Wieand, H. S., Shin, H. J., Chen, A., Khuri, F. R., and Shin, D. M. (2005) *Clin. Cancer Res.* **11**, 6261-6269
390. Greulich, H., Chen, T. H., Feng, W., Janne, P. A., Alvarez, J. V., Zappaterra, M., Bulmer, S. E., Frank, D. A., Hahn, W. C., Sellers, W. R., and Meyerson, M. (2005) *PLoS. Med.* **2**, e313
391. Delavaine, L. and La Thangue, N. B. (1999) *Oncogene* **18**, 5381-5392
392. Kelly, H. and Goldberg, R. M. (2005) *J. Clin. Oncol.* **23**, 4553-4560
393. Sato, K., Nagao, T., Iwasaki, T., Nishihira, Y., and Fukami, Y. (2003) *Genes Cells* **8**, 995-1003
394. Arteaga, C. L. (2002) *Oncologist.* **7 Suppl 4**, 31-39
395. Furuta, T., Takemura, H., Liao, Z. Y., Aune, G. J., Redon, C., Sedelnikova, O. A., Pilch, D. R., Rogakou, E. P., Celeste, A., Chen, H. T., Nussenzweig, A., Aladjem, M. I., Bonner, W. M., and Pommier, Y. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 20303-20312
396. Liu, C., Pouliot, J. J., and Nash, H. A. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 14970-14975
397. Jacob, S., Aguado, M., Fallik, D., and Praz, F. (2001) *Cancer Res.* **61**, 6555-6562
398. Sato, K., Sato, A., Aoto, M., and Fukami, Y. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**, 1078-1087
399. Somani, A. K., Bignon, J. S., Mills, G. B., Siminovitch, K. A., and Branch, D. R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 21113-21119
400. Chang, B. D., Broude, E. V., Dokmanovic, M., Zhu, H., Ruth, A., Xuan, Y., Kandel, E. S., Lausch, E., Christov, K., and Roninson, I. B. (1999) *Cancer Res.* **59**, 3761-3767
401. Kletsas, D., Pratsinis, H., Mariatos, G., Zacharatos, P., and Gorgoulis, V. G. (2004) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1019**, 330-332
402. Begg, A. C., McNally, N. J., Shrieve, D. C., and Karcher, H. (1985) *Cytometry* **6**, 620-626
403. Ciccia, A., Constantinou, A., and West, S. C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 25172-25178
404. Lo, H. W., Hsu, S. C., li-Seyed, M., Gunduz, M., Xia, W., Wei, Y., Bartholomeusz, G., Shih, J. Y., and Hung, M. C. (2005) *Cancer Cell* **7**, 575-589

405. Dittmann, K., Mayer, C., and Rodemann, H. P. (2005) *Radiother. Oncol.* **76**, 157-161
406. Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldborg, P., Sehested, M., Nesland, J. M., Lukas, C., Orntoft, T., Lukas, J., and Bartek, J. (2005) *Nature* **434**, 864-870
407. Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J. M., Barbacid, M., Beach, D., and Serrano, M. (2005) *Nature* **436**, 642
408. Efeyan, A., Garcia-Cao, I., Herranz, D., Velasco-Miguel, S., and Serrano, M. (2006) *Nature* **443**, 159
409. Reisman, D. N., Sciarrotta, J., Wang, W., Funkhouser, W. K., and Weissman, B. E. (2003) *Cancer Res.* **63**, 560-566
410. Starr, R., Willson, T. A., Viney, E. M., Murray, L. J., Rayner, J. R., Jenkins, B. J., Gonda, T. J., Alexander, W. S., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Hilton, D. J. (1997) *Nature* **387**, 917-921
411. Swaminathan, G. and Tsygankov, A. Y. (2006) *J. Cell Physiol* **209**, 21-43
412. Fujitake, S., Hibi, K., Okochi, O., Kodera, Y., Ito, K., Akiyama, S., and Nakao, A. (2004) *J. Gastroenterol.* **39**, 120-124
413. Ito, R., Nakayama, H., Yoshida, K., Matsumura, S., Oda, N., and Yasui, W. (2004) *Virchows Arch.* **444**, 324-331
414. Foray, N., Marot, D., Randrianarison, V., Venezia, N. D., Picard, D., Perricaudet, M., Favaudon, V., and Jeggo, P. (2002) *Mol. Cell Biol.* **22**, 4020-4032
415. Zeng, L., Hu, Y., and Li, B. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 29374-29380
416. Choi, S. Y., Kim, M. J., Kang, C. M., Bae, S., Cho, C. K., Soh, J. W., Kim, J. H., Kang, S., Chung, H. Y., Lee, Y. S., and Lee, S. J. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 7049-7059
417. Cong, F. and Goff, S. P. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 13819-13824
418. Alexander, K., Yang, H. S., and Hinds, P. W. (2004) *Mol. Cell Biol.* **24**, 2808-2819
419. Kantarjian, H., Jabbour, E., Grimley, J., and Kirkpatrick, P. (2006) *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 717-718

## **RESUME**

Les facteurs de transcription STAT3 sont activés dans de nombreuses tumeurs et leurs effets sur la prolifération et la survie suggéraient fortement que ces protéines puissent être impliquées à la fois dans la transformation cellulaire et dans l'échappement aux traitements classiques de chimiothérapie.

Nous nous sommes donc intéressés aux différents aspects impliquant STAT3 dans la réponse de lignées cellulaires aux agents génotoxiques de chimiothérapie, et plus particulièrement aux inhibiteurs de topoisomérase. Durant ces traitements, STAT3 interagit avec le répresseur transcriptionnel Rb et l'inhibiteur du cycle cellulaire p21. Ces deux protéines inhibent son activité transcriptionnelle, notamment sur les gènes c-myc et cdc25A, et permettent la mise en place de la sénescence induite par les dommages de l'ADN et la catastrophe mitotique. Cependant, en présence d'une activité constitutive de STAT3 induite par l'oncogène v-src, STAT3 empêche l'activation de Rb et de p21, favorise la résistance des cellules aux inhibiteurs de topoisomérase II, et génère de l'instabilité génomique. Finalement, deux inhibiteurs de STAT3, le cetuximab, un anticorps monoclonal dirigé contre l'EGFR, et un inhibiteur de la tyrosine kinase c-src, sensibilisent des cellules colorectales aux inhibiteurs de topoisomérase I. L'inhibition de STAT3 empêche l'activation du gène Emel qui induit l'expression d'une protéine de réparation de l'ADN.

STAT3 est donc un facteur de résistance aux inhibiteurs de topoisomérase. Sa détection pourrait ainsi permettre de mieux prédire la réponse des patients à ces inhibiteurs, et son inhibition, dans les tumeurs où il est actif, pourrait permettre de les sensibiliser aux inhibiteurs de topoisomérase.

**DISCIPLINE** : Biologie cellulaire et moléculaire

**MOTS-CLEFS** : STAT3, sénescence, stress génotoxique, instabilité génomique, cetuximab, topoisomérase, catastrophe mitotique, p21, Rb, c-src, EGFR, c-myc, cdc25A, oncogénèse

**Centre Paul PAPIN**

**INSERM U564**

2 rue Moll

49933 ANGERS cedex 09