

La kinase Aurora A comme nouvelle cible des agents chimiothérapeutiques Application aux traitements des cancers colorectaux

Julia Cherier

▶ **To cite this version:**

Julia Cherier. La kinase Aurora A comme nouvelle cible des agents chimiothérapeutiques Application aux traitements des cancers colorectaux. Biochimie [q-bio.BM]. Université d'Angers, 2008. Français. NNT : . tel-00449418

HAL Id: tel-00449418
https://theses.hal.science/tel-00449418

Submitted on 21 Jan 2010

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.

UNIVERSITÉ D'ANGERS Année 2008

Thèse N°901

La kinase Aurora A comme nouvelle cible des agents chimiothérapeutiques
Application aux traitements des cancers colorectaux

Thèse de Doctorat

Spécialité Biologie Cellulaire et Moléculaire

ÉCOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement

Le 25 avril 2008

à Angers

par Julia CHERIER

Devant le jury ci-dessous :

Sophie BARILLE-NION, Chargée de recherche INSERM, Nantes	Rapporteur
Claude PRIGENT, Directeur de recherche CNRS, Rennes	Rapporteur
Erick GAMELIN, Professeur, Faculté de médecine d'Angers	Examinateur
Philippe JUIN, Directeur de recherche INSERM, Nantes	Examinateur
Olivier COQUERET, Professeur, Faculté des sciences d'Angers	Examinateur

Directeur de thèse : Pr. Olivier COQUERET

U892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes Angers

Centre Régional de Lutte Contre le Cancer CRLCC Paul PAPIN

2 rue Moll

49033 Angers cedex 09

Remerciements

Je tiens tout particulièrement à adresser mes remerciements au Professeur Erick Gamelin pour avoir accepté de participer à ce jury et pour m'avoir accueillie au sein du Centre Régional de Lutte Contre le Cancer, Paul Papin.
Je tiens à exprimer ma reconnaissance au Docteur Michèle Boisdron-Celle ainsi qu'aux Professeurs Olivier Coqueret, Alain Morel et Erick Gamelin pour m'avoir intégrée à l'équipe, il y a trois ans déjà.

Je suis très sensible à la présence dans ce jury des Docteurs Sophie Barillé-Nion et Claude Prigent, et au temps qu'ils ont consacré à l'étude de ce manuscrit.

Je suis également sensible à la présence dans ce jury du Docteur Philippe Juin.

Je souhaite aussi remercier les Docteurs Isabelle Valo, Agnès Chassevant, Catherine Guette, Véronique Verrièle et Michèle Boisdron-Celle, ainsi que le Professeur Alain Morel pour leur disponibilité et les différentes connaissances qu'ils ont su m'apporter.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Professeur Olivier Coqueret, pour avoir encadré ce travail avec compétence, disponibilité et pour sa pédagogie dans la transmission d'une partie de ses connaissances. Je le remercie également pour la confiance qu'il m'a témoignée et qu'il m'a transmise.

Mes remerciements vont également au Rotary Club d'Angers pour leur soutien financier, sans lequel il m'aurait été difficile de mener à bien ce travail.

Je tiens à remercier le Docteur Sandrine Giraud, mon Maître Jedi, pour ses recommandations technologiques, sa patience dans mon apprentissage des ChIPs, son soutien permanent tout au long de ce parcours et pour les journées de vulgarisation scientifique auxquelles elle m'a permis de participer avec l'École de l'ADN.

Je remercie le Docteur Isabelle Valo et Brigitte, pour leur patience lors de la mise au point du marquage d'Aurora A et pour m'avoir laissée entrer dans la peau d'un paparazzi avec des modèles cellulaires pas toujours très coopératifs…

Merci aussi à Ernoux, Miss Protéomix, pour notre fascination commune des évadés de prison. Au fait, t'aurais pas perdu un pari récemment…

Merci à Andreea, notre « hirrrrondelle » venue de l'Est et ses adaptations étranges de la langue française. « Faudrait que je regarde le bouquin de la jungle avec plus de sériosité la prochaine fois… »

Merci à Sory notre statisticien et futur champion olympique de ski. Va falloir de l'entraînement et pas choper des maladies étranges (je ne suis donc pas la seule…) !

Je remercie également l'ensemble des locataires de la pièce « petits chinois ».
Sandy pour les ChIPs de dernière minute, Sophie la fausse rebelle végétarienne, Hélène, mon jeune Padawan, Anne-Charlotte pour ses histoires de « cuoer » croustillantes, Anne-Lise, la statisticienne, Clotilde pour m'avoir emmenée au poste de police. Les précédents lauréats, Arnaud et sa biblio, Benjamin et ses super inventions, Agnès qui restera ma référence en matière de Q-PCR…Et les derniers arrivés dont les prénoms m'échappent déjà.

Je salue également tous les membres du bâtiment Monteclaire ainsi que les membres des laboratoires d'Anatomopathologie, de Cytométrie en flux et d'Oncopharmacologie du Centre Paul Papin qui m'ont apporté leur soutien et leur amitié.
J'adresse également ma sympathie à tous les membres de l'École de l'ADN des Pays de Loire et de la Plateforme de Formation Technologique d'Angers pour nos midis récréatifs.

Merci également à Ficus, Do et aux Toulousains, Ma Blonde et son Chabal, l'Américain et Monsieur réalité virtuelle.
A Flo la Franco-Suisso-Québéquoise. Faudra que tu choisisses un jour !
A Linda pour nos épuisantes séances de natation et les dîners qui suivaient, pas toujours très diététiques.
A Simon pour m'avoir laissée gagner quelques parties de squash.

A Loulou et Zaza. Pour la rénovation de la maison, il va falloir vous trouver d'autres ouvriers. Quand vous viendrez à Toulouse faudra penser à emmener le UNO, on va bien rigoler ! Et sinon, j'ai quelques peintures à faire pour vous changer les idées…
A Chacha et Mimi : Toulouse, c'est quasiment sur la route de Milan, vous ferez bien une petite halte, et cette fois je serai plus décemment habillée, c'est promis.
A Flo et Auré pour nos soirées pas toujours sobres mais toujours drôles, nos aventures sur la rivière sauvage et nos séances de jeu, attention au tête à queue...
PS : le téléphone rose et les menottes se sont très bien adaptés à leur nouvel environnement.

Enfin, un immense merci,

A Michèle, Marine et la famille Marie pour les week-ends inoubliables au moulin de Mesnil et à Pornichet.

A mes Grands-Parents pour m'avoir accueillie à Angers il y a dix ans, pour ma première année de Fac, pour les week-ends à La Breille, les petits plats du mercredi et les séances de gousi-gousis.

A ma petite sœur Lydie, Pepette pour les intimes, pour m'avoir rejoint à Angers, et avec qui j'ai partagé les meilleures années d'étude. Toi aussi tu vas finir par en voir le bout.

A mes parents, Patricia et Jean-Charles. La peur n'évite pas le danger, c'est un peu le dicton de la famille. Vous avez toujours su m'encourager quand je reculais, me relever quand je tombais, m'orienter quand je me perdais. Je crois que j'ai réussi, avec plus ou moins de style, à descendre cette piste noire (c'est encore l'époque du ski !). Je sais que d'autres viendront plus tard, mais merci pour votre soutien inconditionnel depuis 28 ans.

Pierre, merci de m'avoir accompagnée et soutenue dans cette aventure. Ce ne fut pas toujours facile, mais dans la vie, seul le chemin compte, et avec toi, il prend un doux parfum d'amour.

Sommaire

Contexte scientifique ____ *11*

Chapitre I : Tumorogenèse et cycle cellulaire ____ **13**
I Tumorogenèse ____ 13
I.1 Activation des oncogènes et inhibition des gènes suppresseurs de tumeurs, éléments de la tumorogenèse ____ 14
I.1.a Oncogènes ____ 14
I.1.b Gènes suppresseurs de tumeurs ____ 20
I.2.Instabilité génétique et progression tumorale ____ 32
I.2.a L'instabilité microsatellite MSI ____ 32
I.2.b L'instabilité de type chromosomique CIN ____ 33
II Les kinases mitotiques ____ 38
II.1 Les différentes étapes de la mitose et le cycle du centrosome ____ 39
II.2 Les protéines kinases régulant la mitose ____ 42
II.2.a Le complexe MPF : cycline B/cdk1 ____ 42
II.2.b Les protéines kinases de type Polo, Plks ____ 44
II.2.c Les protéines kinases de types NIMA, Neks ____ 46
II.2.d Les protéines kinases Aurora ____ 47

Chapitre II : La protéine Aurora A ____ **53**
I Expression et régulation d'Aurora A ____ 53
I.1 Régulation de la synthèse de l'ARNm d'Aurora A ____ 53
I.2 Profil d'expression et localisation subcellulaire de la protéine Aurora A ____ 54
I.3 Régulation par modifications post-traductionnelles ____ 55
I.4 Inhibition d'Aurora A par les phosphatases PP1 et PP2A ____ 56
I.5 Activation par TPX2 et Ajuba ____ 57
I.6 Inhibition d'Aurora A par p53 ____ 57
I.7 Dégradation d'Aurora A par APC/C cdh1 ____ 58
II Rôles de la kinase Aurora A ____ 59
II.1 Aurora A régule le cycle du centrosome ____ 59
II.2 Aurora A régule le complexe cycline B/cdk1 ____ 61
II.3 Aurora A régule le déroulement de la mitose ____ 61
III Aurora A, instabilité chromosomique, aneuploïdie et cancer ____ 64
III.1 Aurora A contrôle la ploïdie des cellules ____ 64
III.2 Implication d'Aurora A dans les cancers ____ 65
III.2.a Surexpression d'Aurora A et amplification des centrosomes ____ 65
III.2.b Aurora A comme cible thérapeutique ____ 67
III.2.c Aurora A, polymorphisme, diagnostic et thérapie antitumorale ____ 69
III.2.d Les nouvelles voies de régulation impliquant Aurora A ____ 70

Chapitre III : Thérapie anti-tumorale ____ **72**
I Le cancer colorectal, épidémiologie et traitement ____ 72
II Inhibitions des topoisomérases I ____ 73
II.1 Les topoisomérases I ____ 73
II.2 Les inhibiteurs de topoisomérases I ____ 74
II.3 Les thérapies ciblées associées aux inhibiteurs de topoisomérases ____ 75
II.4 Conséquences de l'inhibition des topoisomérases 1 ____ 77
III Réponses au traitement ____ 78
III.1 Détection des cassures : le système ATR/ATM ____ 78
III.2 Activation du point de contrôle : Chk1/Chk2 ____ 80
III.3 Conséquences de l'activation de la voie ATM/ATR et Chk1/Chk2 ____ 81
III.3.a Arrêt du cycle cellulaire ____ 82
III.3.b Induction de la mort cellulaire ____ 82

Objectifs des travaux ____ **87**

Les inhibiteurs de Topoisomérases I inhibent l'expression d'Aurora A par l'intermédiaire du facteur de transcription c-myc ___ *88*

Matériels et méthodes ___ **89**
I Culture cellulaire et réactifs ___ 89
II Synchronisation cellulaire et analyse par cytométrie de flux ___ 91
II.1 Synchronisation cellulaire ___ 91
II.2 Analyse par cytométrie de flux de la quantité d'ADN ___ 91
III Préparation des lysats cellulaires pour une analyse par western blot ___ 91
IV Extraction d'ARN, rétrotranscription et PCR quantitative ___ 92
V Expérience d'immuno-précipitation de chromatine (ChIP) ___ 93
VI Immunofluorescence et microscopie ___ 94

Résultats ___ **95**
I Etude de l'expression d'Aurora A au cours du cycle cellulaire ___ 95
II Effet d'un traitement au sn38 sur l'expression d'Aurora A ___ 97
III Effet des dommages de l'ADN induit par le sn38 sur les centrosomes ___ 99
IV Les protéines p53 et p21 ne sont pas impliquées dans la diminution d'expression d'Aurora A _ 101
V Le facteur de transcription c-myc est responsable de la diminution d'expression d'Aurora A lors de dommages de l'ADN induits par le sn38 ___ 106
VI Régulation du promoteur d'Aurora A par le facteur de transcription c-myc ___ 110
VII Analyse de l'expression de la kinase Aurora A et de c-myc chez des patients atteints de cancers colorectaux ___ 114
VIII La surexpression d'Aurora A induit-elle une résistance des cellules colorectales au traitement par sn38 ? ___ 116
IX La surexpression d'Aurora A est elle associée dans les tumeurs colorectales à la résistance au traitement ? ___ 117
X Effet de la surexpression de Ras sur Aurora A dans les cellules tumorales colorectales ___ 122

Résultats complémentaires ___ **155**
L'inhibiteur du cycle cellulaire p21 se lie aux promoteurs de c-myc et cdc25A lors de dommages de l'ADN et induit leur répression ___ 155

Discussion et perspectives ___ **167**
I Les inhibiteurs des Topoisomérases I inhibent l'expression d'Aurora A par l'intermédiaire du facteur de transcription c-myc ___ 167
II Effet de la surexpression de Ras sur Aurora A dans les cellules tumorales colorectales ___ 177

Conclusion ___ **181**

Bibliographie ___ ***183***

Tables des illustrations

Figure 1 : Voies de signalisation activées par la protéine Ras. 16
Figure 2 : Implication de pRb dans la progression du cycle cellulaire. 22
Figure 3 : Régulation de l'activation de p53. 24
Figure 4 : Activation de l'apoptose par p53. 26
Figure 5 : Inhibition de la progression cellulaire lors de l'induction de la protéine p16. 29
Figure 6 : Activation de la sénescence par les oncogènes comme Ras. 31
Figure 7 : Systèmes de réparation des cassures double brin par recombinaison homologue (HR) et jonctions des extrémités non homologues (NHEJ). 34
Figure 8 : Point de contrôle du fuseau mitotique. 36
Figure 9 : Evolution de l'observation des cellules en mitose. 39
Figure 10 : Comparaison des phases traditionnelles de la mitose et des différentes transitions proposées par Pines et Rieder. 41
Figure 11 : Régulation de la transition G2/M et de l'activité de cycline B/cdk1. 43
Figure 12 : Fonctions de deux kinases mitotiques Plk1 et Nek2. 45
Figure 13 : Observation de cellules de cerveaux de larves de drosophiles mutées sur Aurora A. 48
Figure 14 : Structure des kinases de la famille Aurora chez l'Homme. 49
Figure 15 : Observation par immunofluorescence des différentes répartitions subcellulaires d'Aurora A et B dans les cellules HeLa. 50
Figure 16 : Fonctions d'Aurora B. 51
Figure 17 : Localisation d'Aurora A au cours du cycle cellulaire. 54
Figure 18 : Domaines fonctionnels d'Aurora A d'origine humaine. 55
Figure 19 : Aurora A et maturation des centrosomes. 60
Figure 20 : Fonctions et régulateurs d'Aurora A. 63
Figure 21 : Implication de la surexpression d'Aurora A dans la tumorogenèse. 68
Figure 22 : Mode d'action des topoisomérases de types 1. 74
Figure 23 : Activations distinctes des kinases ATM/ATR lors de dommages de l'ADN induisant des cassures doubles brins. 79
Figure 24 : Activation de la voie ATM/ATR, Chk1/Chk2 et ses conséquences. 81
Figure 25 : Induction de l'apoptose lors des dommages de l'ADN par une voie dépendante et indépendante de p53. 83
Figure 26 : La catastrophe mitotique, mort des cellules tumorales par apoptose durant une mitose imparfaite. 85
Figure 27 : Expression d'Aurora A au sein de la lignée tumorale colorectale HCT116 au cours du cycle cellulaire. 96
Figure 28 : Accumulation en G2/M et inhibition de l'expression d'Aurora A après traitement des cellules colorectales HCT116 au sn38. 98
Figure 29 : Inhibition d'Aurora A après traitement des cellules colorectales HCT116 au sn38. 100
Figure 30 : Les dommages de l'ADN induits par le sn38 entraînent l'activation de p53 et p21. 101
Figure 31 : Expression de la protéine Aurora A au sein de la lignée tumorale colorectale HT29 au cours du cycle cellulaire. 102
Figure 32 : La diminution d'expression d'Aurora A après traitement au sn38 est indépendante de p21 et de p53. 103
Figure 33 : Expression de la protéine Aurora A au sein de la lignée tumorale colorectale HCT116 p21-/- au cours du cycle cellulaire. 104
Figure 34 : Les dommages de l'ADN induits par le sn38 entraînent la phosphorylation du facteur de transcritpion STAT3 sur la sérine 727. 106
Figure 35 : L'expression du facteur de transcription c-myc est inhibée lors d'un traitement au sn38. 107
Figure 36 : Le promoteur proximal d'Aurora A est inhibé lors d'un traitement au sn38. 108
Figure 37 : Localisation des sites potentiels de fixation des facteurs de transcription c-myc (A.) et STAT3 (B.) sur le promoteur du gène d'Aurora A. 109
Figure 38 : Le facteur de transcription c-myc se fixe au promoteur d'Aurora A en absence de dommages de l'ADN. 110
Figure 39 : L'inhibition de l'expression du facteur de transcription c-myc induit une diminution d'expression de la kinase Aurora A. 111
Figure 40 : Régulation du promoteur d'Aurora A par le facteur de transcription c-myc dans les cellules LS174T. 113

Figure 41 : Analyse de l'expression des ARNm d'Aurora A et de c-myc dans les tumeurs de patients atteints de cancers colorectaux. 115
Figure 42 : Expression des ARNm d'Aurora A et de c-myc dans les tumeurs par rapport au au tissu sain. 116
Figure 43 : Résistance des cellules à l'irinotecan induite par la surexpression d'Aurora A. 117
Figure 44 : Détection d'Aurora A dans les tissus sains et les tumeurs de l'œsophage et du sein. 118
Figure 45 : Détection d'Aurora A par immunohistochimie dans les tissus sains et les tumeurs du colon. 119
Figure 46 : Expression d'Aurora A et de l'antigène Ki-67 dans les tissus sains et tumoraux colorectaux. 120
Figure 47 : Expression d'Aurora A et de l'antigène nucléaire Ki-67 dans les tumeurs colorectales. 121
Figure 48 : L'induction de l'oncogène Ras dans les cellules colorectales déficientes en p53. 123
Figure 49 : L'induction de l'oncogène Ras dans les cellules colorectales induit la diminution d'expression de la kinase Aurora A..... 125
Figure 50 : Expression de l'ARNm de p21 lors de l'induction de l'oncogène Ras. 126
Figure 51 : Recrutement de c-myc sur le promoteur d'Aurora A dans les cellules HT29R1/Ras. 127
Figure 52 : Etude de la survie des cellules surexprimant Ras lors d'un traitement au sn38. 129
Figure 53 : Modèle de régulation du promoteur d'Aurora A lors de dommages de l'ADN. 170
Figure 54 : Modèle d'inhibition des dimères c-myc/max sur le promoteur d'Aurora A lors de dommages de l'ADN par p14/ARF. 172
Figure 55 : Modèle de l'arrêt de l'inhibition des dimères c-myc/max sur le promoteur d'Aurora A lors de la transition G2/M du cycle cellulaire. 172
Figure 56 : Modèle d'oscillation du recrutement des dimères c-myc/max et mad/max sur le promoteur d'Aurora A au cours du cycle cellulaire. 173
Figure 57 : Schéma d'une crypte normale montrant l'expression de la kinase Aurora A et de l'antigène Ki-67. 176
Figure 58 : Modèle d'inhibition de la kinase Aurora A lors de la surexpression de Ras. 178
Figure 59 : Induction de la sénescence par l'oncogène Ras faisant intervenir l'activation de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 et l'inhibition de la protéine kinase Aurora A. 181

Tableau 1 : Exemples de syndromes humains associés à une instabilité chromosomique de structure. 35
Tableau 2 : Anticorps commerciaux utilisés et leurs applications. 90
Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées en RT-PCR quantitative. 92
Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées lors des expériences de ChIP. 94

Abréviations-Lexique

5FU : 5-FluoroUracile
Acides aminés : **A** (Alanine, Ala), **C** (Aspartate, Asp), **E** (Glutamate, Glu), **K** (Lysine, Lys), **N** (Asparagine, Asn), **Q** (Glutamine, Gln), **R** (Arginine, Arg) **S** (Serine, Ser), **T** (Thréonine Thr), **Y** (Tyrosine, Tyr)
ADN : Acide désoxyribonucléique (ADNg pour génomique)
AIK : Aurora/IPL1 related kinase 1
AP-1 : Activator protein 1
Apaf-1 : Apoptosis protease-activating factor 1
APC/C : Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
ARF : Alternate Reading Frame
ARK1 : Aurora Related Kinase 1
ARN Acide RiboNucléique (ARNm pour messager)
ARN Pol II : Acide Ribonucléique Polymérase II
ASPP : Apoptosis-Stimulating Protein of p53
ATCC : American Type Culture Collection
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated gene
ATP : Adénosine Triphosphate
ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3 related gene
ATRIP : ATR Interacting Protein
Bak : Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bcl-2 : B-cell lymphoma gene 2
BclXL : B-cell lymphoma gene XL
BER : Base Excision Repair
BH3 : Bcl-2 Homologous domain 3
bHLH : basic Helix Loop Helix
Bid : BH3 interacting domain death agonist
Bmi : B lymphoma Mo-MLV insertion region gene
BRCA1/2 : Breast cancer early onset gene
BTAK : Breast tumor amplified kinase
BTG2 : B-cell translocation gene 2
Bub1/3 : Budding uninhibited by benzimidazoles 1/3 yeast homolog gene
CAK : Cdk activating kinase
cdc : cell division cycle
CDE/CHR : Cell cycle Dependent Element/ Cell cycle genes Homology Region
cdh1 : Cdc20 homolog 1
cdk : cyclin dependent kinase
CENP-E/A : Centromere protein E/A
ChIP : Chromatin immunoprecipitation
Chk 1/2 : Checkpoint kinase 1/2
CIN : Chromosomal instability
CIP : Cdk interacting protein
CKI : Cyclin kinase inhibitor
C-Nap1 : Centrosomal Nek2-associated protein 1
CPT-11 : 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonylox ycamptothecin
CRLCC : Centre Régional de Lutte Contre le Cancer
DAPI : Di aminido phenyl indol
DISC : Death inducing signaling complex
DMP1 : DNA methyltransferase 1
DNA-PKcs : DNA-PK catalytic subunit
DNA-PK : DNA activated protein kinase
DNMT1 : DNA methyltransferase 1
DO : Densité optique
D-TACC : Transforming acidic coiled-coil protein
E2F : E2 promoter binding factor
EGF : Epidermal growth factor
EGFR : EGR receptor
EIF4E : Eukaryotic translation initiation factor 4E
ERCC1 : Excision repair cross-complementing
ERK : Extracellular signal related kinase
ETS : v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog
FoxM1 : Forkhead box M1
GADD45/153 : Growth arrest and DNA-damage inducible
GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GFP : Green fluorescent protein
GSK-3β: Glycogen synthase kinase 3β

GTP : Guanosine triphosphate
GTPase : Guanosine triphosphatase
γ-TURC : γ-Tubulin Ring Complex
H3 : Histone 3
HAT : Histone acétyltransférase
HDAC : Histone déacétylase
Hdm2 : Human double minute 2
HNPCC : Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer
HP1 : Heterochromatin protein 1
HPC2 : Histone promoter control protein 2
HR : Homologus recombinaison
I-2 : Inhibitor 2
Id1 : Inhibitor of differentiation 1
INCENP : Inner Centromere Protein
INK4 : Inhibitory cyclin associated kinase
IPTG : Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside
J.-C. : Jésus Christ
JMY : Junction-mediating and regulatory protein
KIP : Kinase inhibitor protein 1
LFS : Li-Fraumeni syndrome
LV : Leucovorine
Mad1/2 : Mitotic arrest deficient-like 1/2
MAPK : Mitogen activated protein kinase
MCAK : Mitotic Centromere Associated Kinesin
Mcl1 : Myeloid cell leukemia sequence 1
Mdm2 : Mouse double minute 2
MEK : Map-erk kinase
MKlp2 : Mitotic kinesin-like protein 2
MLH1 : MutL homolog 1
MMR : Mismatch repair
MPF : Maturation Promoting Factor
Mre11 : Meiotic recombination 11 yeast homolog
MRN : Mre11 Rad50 NBS1 complex
MSH2 : mutS homolog 2
MSI : Microsatellite instability
MTOC : Microtubule organisation center
MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
Nbs1 : Nijmegen breakage syndrome gene
Nek : NIMA Related Kinases
NHEJ : Non homologous end-joining
NIMA : Never in mitosis A
Nlp1 : Ninein like protein
NuMA : Nuclear mitotic apparatus protein 1
OH-U : Hydroxyurée A
PcG : Polycomb group
PCM : Pericentriolar matrix
PI3kinase : Phosphatidyl inositol 3 kinase
PIKK : Phosphatidil-Inisitol 3 Kinase like Kinase
PKC : Protein kinase C
Plk : Polo-like kinases
Plkk : Polo-like kinase kinase
PMS2 : DNA mismatch repair protein
PP1 : Protéine Phosphatase 1
PP2A : Protéine Phosphatase 2 A
pRb et Rb : Retinoblastome protein
Puma : p53 upregulated modulator of apoptosis
RCC1 : Regulator for Chromosome Condensation 1
RISC : RNA Induced Silencing Complex
RNAi : Ribonucleotide acid inhibitor
RPA : Replication protein A
RT-PCR : Retrotranscription Polymerase chain reaction
SAHFs:Senescence-associated heterochromatin foci
SCF : Skp1-cullin-Fbox
STAT3 : Signal transducter and activator of transcription
STK 6/15 : Serine/threonine kinase 15
SVF : Sérum de veau foetal
TERT : Telomerase reverse transcriptase
TFIID : Transcription factor complex D for gene class II
TGF-β : Transforming growth factor β
TPX2 : Target Protein for *Xenopus* kinesin-like protein 2
TRRAP : Transformation/transcription domain-associated protein
VEGF : Vascular endothelial growth factor

Contexte scientifique

La compréhension des phénomènes biologiques a connu une avancée considérable depuis le début du 19ème siècle. En effet, les observations cellulaires initiales au moyen des premiers microscopes datent de 1665 ; Robert Hook observe alors des cellules dans du liège puis dans toutes les plantes. Cependant il faut attendre deux siècles pour voir apparaître la théorie cellulaire de Theodor Schwann et Matthias Schleiden, qui proposent la cellule comme unité de base de développement. En 1858, Rudolf Virchow affirme quant à lui que toute cellule provient d'une autre cellule par la formule célèbre « omni cellula e cellula ». Cette théorie a conduit à l'idée de multiplication cellulaire par division.

La division cellulaire est le processus fondamental par lequel une cellule mère donne deux cellules filles rigoureusement identiques. Tous les organismes complexes sont formés d'un nombre considérable de cellules (environ 10^{13} chez l'être humain) provenant toutes par divisions successives d'une cellule unique, l'ovocyte fécondé. A taille adulte, les divisions cellulaires se poursuivent pour permettre le renouvellement des cellules endommagées ou vieillissantes, notamment au niveau de l'épiderme et du tube digestif. Au cours des vingt dernières années, de nombreuses études ont permis de poser les bases de la régulation du cycle cellulaire. L'attribution en 2001 du prix Nobel de Physiologie et Médecine à Leland Hartwell, Paul Nurse et Thomas Hunt pour l'ensemble de leurs découvertes initia un intérêt grandissant pour l'étude de la régulation du cycle cellulaire.

La première définition du cancer fut donnée par Hippocrate ; appelée alors « carcinome » ou « squirre », la tumeur se définit comme « un gonflement dur, non inflammatoire, ayant tendance à récidiver et se généraliser jusqu'à la mort ». Cependant, des descriptions de tumeurs sont déjà rapportées par les égyptiens en 3500 avant J.-C.. Au cours des dernières années, l'utilisation de modèles cellulaires a permis de mettre en évidence des anomalies du cycle cellulaire et de sa surveillance, lors de l'oncogenèse. L'étude toujours plus fine des mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus permet d'envisager l'utilisation de nouvelles thérapies dans le traitement de cette maladie.

Chapitre I : Tumorogenèse et cycle cellulaire

I Tumorogenèse

Il existe donc des mécanismes biologiques régulant cette prolifération normale. Les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs, assurent un équilibre entre prolifération et mort cellulaire. Des mutations successives de ces gènes rompent cet équilibre, entraînant une prolifération excessive des cellules qui deviennent alors tumorales. Au sein des tissus, seules quelques cellules se divisent et participent au renouvellement cellulaire, ce sont les cellules souches. L'initiation de la transformation pourrait avoir lieu dans les tissus adultes au niveau de ces cellules et le risque de mutation des proto-oncogènes en oncogènes pourrait être augmenté dans ces cellules. Ces mutations ponctuelles apparaissent du fait de divers stress, comme l'arrivée sur les cellules d'agents génotoxiques mais également de radiations ou encore de virus ou de la réplication de l'ADN. En effet, malgré l'existence de systèmes de détection et de réparation des anomalies au niveau de l'ADN, l'ADN polymérase induit un taux d'erreurs d'environ 1 base sur 10^6 (Kunkel and Bebenek 2000).

La progression tumorale s'accompagne presque toujours de larges réarrangements chromosomiques impliquant la perte de chromosomes et la présence de chromosomes surnuméraires. Ainsi, certaines cellules cancéreuses à un stade très avancé peuvent présenter de 60 à 90 chromosomes. De plus, de nombreux oncogènes ne présentent pas de mutation mais une surexpression due à une amplification génique, parfois en de multiples copies. L'oncogène ErbB2 présente ainsi entre 10 et 15 copies de son gène dans 30 % des cancers du sein. De nombreux gènes suppresseurs de tumeur sont également inactivés par délétion d'au moins un de leurs deux allèles (Rajagopalan, Nowak et al. 2003).

Plusieurs grands types de modifications génétiques peuvent altérer les proto-oncogènes : les mutations, les translocations et les amplifications géniques. Dans tous les cas, un produit hyperactif est obtenu qui stimule la division cellulaire et participe à l'échappement des cellules à la régulation normale. L'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs peut également être observée suite à des mutations, des translocations ou encore des insertions. Toutes ces mutations peuvent se localiser dans les séquences codantes des gènes, dans les séquences introniques ou régulatrices. Ainsi, les modifications des promoteurs sont également associées à l'activation ou à l'inactivation de gènes.

I.1 Activation des oncogènes et inhibition des gènes suppresseurs de tumeurs, éléments de la tumorogenèse

I.1.a Oncogènes

Les proto-oncogènes sont des gènes normaux codant pour des protéines participant à la régulation positive de la prolifération cellulaire. Ces protéines peuvent être des facteurs de croissance, des facteurs de transcription, des protéines impliquées dans la prolifération, des récepteurs membranaires, des protéines régulant la mort cellulaire, etc. Leur modification en oncogène entraîne alors la prolifération incontrôlée des cellules, qui peut se traduire par la formation de tumeurs. La mutation d'un seul des deux allèles du gène suffit à imposer son activité permanente à la protéine sauvage. Lorsqu'ils sont introduits dans les cellules saines, certains de ces oncogènes induisent la transformation des cellules et permettent l'acquisition d'un phénotype malin (Vogelstein and Kinzler 2004). Nous illustrerons l'activation et les effets des oncogènes en utilisant deux protéines oncogéniques, Ras et c-myc, très souvent retrouvées suractivées dans les tumeurs humaines.

Exemple de Ras

Un des proto-oncogènes muté dans de nombreux cancers humains est le gène Ras. Ras appartient à la famille des petites GTPases. Celle-ci comporte trois isoformes d'environ 21kDa, codées par trois gènes différents, K-Ras, N-Ras et H-Ras. L'isoforme K-ras présente deux formes d'épissage différentes, notées K-Ras4A et K-Ras4B. Ces protéines présentent une extrémité NH2 terminale comportant un domaine catalytique très conservé. Cependant, leur extrémité carboxy-terminale est constituée d'un domaine hypervariable dans lequel le motif CAAX est retrouvé et permet de distinguer ces trois isoformes. Ce domaine hypervariable est constitué des acides aminés pouvant comporter de nombreuses modifications post-traductionnelles. Il est également impliqué dans la localisation membranaire de ces protéines (Willumsen, Christensen et al. 1984). Malgré leurs interactions avec des effecteurs et des transducteurs communs, ces protéines présentent des fonctions bien distinctes, sans doute grâce aux modifications portées par le domaine hypervariable. L'analyse de l'expression de ces protéines montre des variations au niveau tissulaire, mais également lors du développement embryonnaire. Ainsi chez les souris, l'ARNm de H-Ras est surtout exprimé dans le cerveau, le tissu musculaire, la peau, et est faiblement exprimé dans le foie. Au contraire K-Ras est lui exprimé au niveau de l'estomac, du tissu pulmonaire et du

thymus. L'ARNm de N-Ras se localise plus particulièrement au niveau du tissu testiculaire et du thymus (Leon, Guerrero et al. 1987). N-Ras présente un pic d'expression à partir du 10ème jour, tandis que l'expression de K-Ras diminue progressivement à la fin de la gestation (Muller, Slamon et al. 1983). De plus, l'étude des modèles murins dans lesquels les différentes isoformes sont inactivées montre que le gène de K-RAS est essentiel au développement embryonnaire à la différence de N et H-Ras (Esteban, Vicario-Abejon et al. 2001). Les souris dans lesquelles les gènes de H-Ras ou N-Ras sont inactivés ne présentent aucune modification de leur phénotype durant leur développement alors que les souris présentant une inactivation de K-Ras meurent prématurément entre le 12 et le 14ème jour de gestation. De plus, elles présentent des modifications au niveau du foie et une forte anémie (Johnson, Greenbaum et al. 1997).

Sous sa forme non mutée, Ras constitue un intermédiaire entre un récepteur activé et une voie de signalisation sous-membranaire aboutissant entre autres à la régulation de la prolifération, de la survie, mais également de la différenciation. Cette protéine oscille entre un état inactif, où elle est liée au GDP, et un état actif dans lequel la protéine Ras est associée au GTP (Ras-GDP et Ras-GTP) (Boguski and McCormick 1993). La liaison d'un facteur de croissance à la surface des cellules, par l'intermédiaire d'un récepteur qui lui est spécifique, est suivie d'une modification des domaines intracellulaires du récepteur. Celle-ci s'accompagne alors du recrutement, par l'intermédiaire des protéines adaptatrices, de protéines de la famille SOS. Ces protéines favorisent l'échange du GDP en GTP sur la protéine Ras. Le complexe Ras-GTP est inactivé en présence de protéines de type GAP qui favorisent l'hydrolyse du GTP en GDP. Ras-GTP interagit avec plus de vingt effecteurs. Il peut se lier à Raf activant alors la voie Ras-Raf-MEK-ERK (Repasky, Chenette et al. 2004). Il existe trois sérine/thréonine Raf phosphorylant et activant les kinases MEK-ERK. Cette cascade de phosphorylations permet l'activation du facteur de transcription AP-1. Ce facteur de transcription se fixe ensuite sur le promoteur des gènes régulant la progression du cycle cellulaire, comme celui de la cycline D (Pruitt and Der 2001). Ras active également la voie de la PI3kinase/Akt (Rodriguez-Viciana, Warne et al. 1994) et participe à l'activation des gènes de survie des cellules et de différenciation. La kinase Akt phosphoryle et inactive des protéines proapoptotiques comme Bad ou les facteurs de transcription de type Forkhead (Vivanco and Sawyers 2002). Ras est également impliqué dans l'activation de la voie Rac régulant l'organisation du cytosquelette et participant à la transformation induite par l'oncogène Ras (Malliri, van der Kammen et al. 2002). Ras régule également le transport des vésicules à travers le cytoplasme en activant la voie RALGDS (Wolthuis and Bos 1999). Ras régule également la voie du calcium phosphate.

En effet, Ras active la phospholipase C, entraînant un relargage du calcium et l'activation de la PKC (Kelley, Reks et al. 2001; Song, Hu et al. 2001).

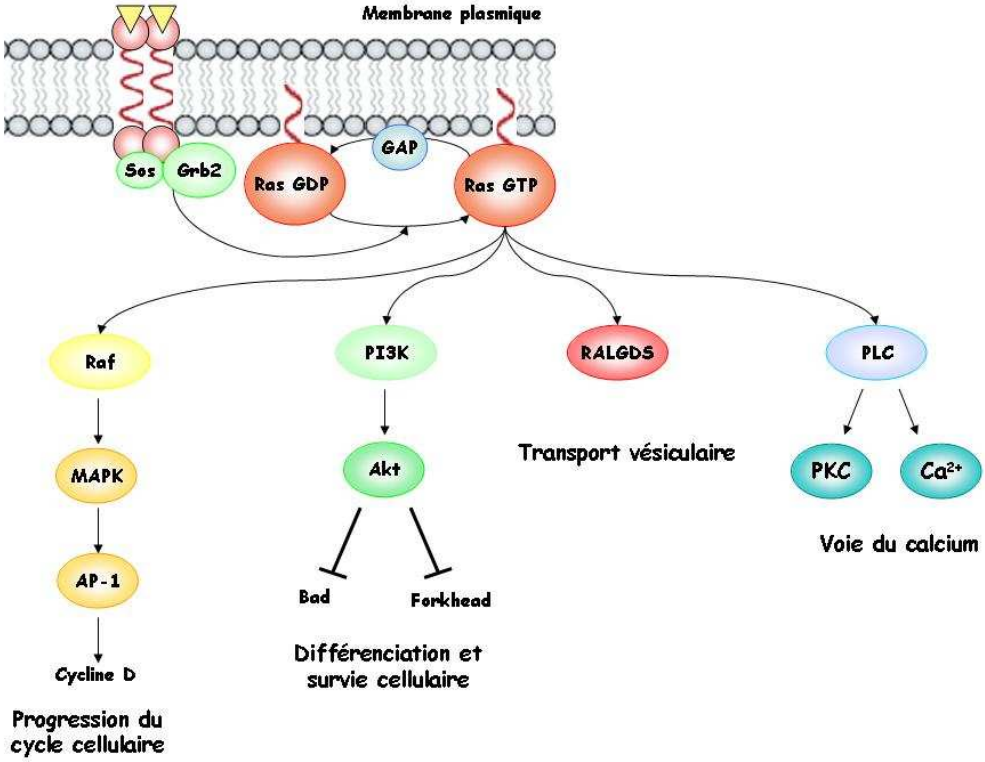


Figure 1 : Voies de signalisation activées par la protéine Ras.
(Downward 2003).

Sous sa forme mutée, le gène Ras oncogénique code une protéine qui stimule la multiplication cellulaire indépendamment de tout facteur de croissance. Les trois isoformes de Ras peuvent porter des mutations somatiques sur les acides aminés 12, 13 et 61 (Bos 1989). K-Ras constitue l'isoforme la plus fréquemment mutée dans les cancers et environ 30% à 45% des cancers colorectaux portent une mutation somatique de K-Ras (Downward 2003; Schubbert, Shannon et al. 2007). Elles entraînent toutes l'activation constitutive de Ras. Les glutamines 12 et 13 sont localisés dans la boucle P responsable de la liaison du GTP, et la glutamine 61 participe à l'hydrolyse du GTP. Ainsi la mutation d'un de ces acides aminés bloque l'activité GTPase de Ras et entraîne sa résistance aux protéines GAPs (Trahey and McCormick 1987). L'apparition d'une protéine Ras oncogénique entraîne la dérégulation de l'ensemble des effecteurs sous jacents et confère à la cellule des fonctions anormales. L'activation des voies PI3kinase et Raf-MEK-ERK est essentielle à la transformation induite par Ras (White, Nicolette et al. 1995; Khosravi-Far, White et al. 1996; Rodriguez-Viciana, Warne et al. 1997; Downward 2006).

Ainsi, la protéine Ras constitue un transducteur entre un récepteur activé et une voie de signalisation sous-membranaire régulant à la fois la prolifération la différenciation et la survie. Les tumeurs humaines présentent fréquemment une mutation de Ras entraînant son activation constitutive et une altération des voies sous membranaires qu'elle régule.

Exemple de myc

L'oncogène myc est lui aussi très souvent dérégulé dans plusieurs cancers et constitue un autre exemple de proto-oncogène. Sa surexpression *in vitro* et *in vivo* favorise l'apparition des tumeurs (Adams, Harris et al. 1985). La famille des gènes de myc comprend sept membres dont les plus étudiés sont c-myc, L-myc et N-myc. L'oncogène c-myc fut le premier découvert par homologie avec l'oncogène viral v-myc (Vennstrom, Sheiness et al. 1982). L-myc et N-myc furent également découverts par homologie avec l'oncogène viral comme des régions amplifiés du génome, respectivement dans les tumeurs du poumon et de neuroblastome (Schwab, Alitalo et al. 1983; Nau, Brooks et al. 1985).

Ce facteur de transcription active différents gènes, en partie grâce à son partenaire max. L'extrémité carboxy-terminale de c-myc contient un domaine bHLH permettant sa liaison à max. L'hétérodimère myc/max est capable de se lier à l'ADN sur des régions spécifiques des gènes présentant la séquence consensus canonique CACGTG (Blackwood and Eisenman 1991). L'extrémité amino-terminale de myc comprend deux sites très conservés impliqués dans la transactivation des gènes et permettant le recrutement de protéines adaptatrices comme TRRAP ou des Histone Acétyl Transférases (HAT) comme TIP60 (McMahon, Wood et al. 2000) (Amati, Frank et al. 2001).

Il est difficile d'établir une carte précise des effets de myc puisqu'il semble réguler entre 10 et 15% des gènes cellulaires (Fernandez, Frank et al. 2003; Dang, O'Donnell et al. 2006). Néanmoins, l'inactivation de ce gène se traduit par une mort précoce entre le 9ème et le 10ème jour des animaux, supposant alors l'implication de myc dans le contrôle de la croissance cellulaire et le développement embryonnaire (Davis, Wims et al. 1993). Durant cette période c-myc est exprimé dans les cellules proliférantes, et sa diminution d'expression est observée lors de la différenciation cellulaire ou de l'arrêt des mitoses (Schmid, Schulz et al. 1989).

Ce facteur de transcription régule la progression du cycle cellulaire (Eilers 1999). Dans les cellules quiescentes, c-myc n'est pas détectable. En revanche, lors de la stimulation des cellules avec un mitogène ou en présence de sérum, l'expression de l'ARNm et la protéine de

myc augmente et entraîne l'entrée des cellules en phase G1. Puis, l'expression de l'ARNm et la protéine diminue progressivement. Si le sérum ou les mitogènes sont éliminés de la culture, le taux de c-myc chute brutalement et les cellules stoppent leur progression dans le cycle cellulaire (Waters, Littlewood et al. 1991). c-myc régule également la progression de la phase G1 à la phase S en contrôlant l'expression de plusieurs protéines comme la cycline D1, ou encore cdc25A (Galaktionov, Chen et al. 1996; Bouchard, Thieke et al. 1999). L'activation de la cycline D par c-myc en réponse à des mitogènes induit la progression du cycle cellulaire et l'activation des gènes de la phase S. Ces gènes sont sous la dépendance des facteurs de transcription de la famille E2F (Trimarchi and Lees 2002). La protéine Rb associée à E2F au début de la phase G1, empêche l'activation transcriptionnelle des gènes assurant la progression du cycle cellulaire. La phosphorylation séquentielle de Rb par les complexes cycline D/cdk4/6 induit une activation partielle de E2F qui peut ainsi activer différents gènes dont celui de la cycline E. Celle-ci est tout d'abord associée à p27 qui l'inhibe. Cependant lorsque la concentration en cycline E libre devient plus importante, elle s'associe à cdk2 et phosphoryle à son tour la protéine Rb. Rb est alors totalement inhibée. La protéine p27 est elle-même phosphorylée par le complexe cycline E/cdk2 et devient en conséquence la cible du protéasome. Les facteurs de transcription E2Fs sont libérés et régulent l'expression des protéines impliquées dans la transition G1/S, et activent également l'ensemble des gènes de la phase S comme la cycline A (Lees, Faha et al. 1992). Cette dernière s'associe à cdk2 et le séquestre, empêchant alors sa fixation sur la cycline E. La cycline E est à son tour dégradée par ubiquitination. Des études montrent également que c-myc augmenterait l'activité de cycline E/cdk2 de façon indirecte. En fait, la cycline D2 et cdk4 semblent être des cibles transcriptionnelles de c-myc et la formation des dimères cyclines D2/cdk4 entraînent la séquestration de p27 (Perez-Roger, Kim et al. 1999). Le dimère cycline E/cdk2 est ainsi libre et peut donc phosphoryler Rb.

c-myc peut également réprimer plusieurs gènes comme celui de p15, p27 ou p21 (Herold, Wanzel et al. 2002; Gartel and Shchors 2003). Les dimères myc/max empêchent alors le recrutement de miz sur leur promoteur, entraînant ainsi la répression des gènes (Staller, Peukert et al. 2001).

D'autre part, c-myc induit la transcription de gènes participant directement à la réplication de l'ADN comme l'ornithine décarboxylase, impliquée dans la synthèse des bases azotées (Pena, Reddy et al. 1993). Il active également la machinerie traductionnelle et transcriptionnelle nécessaire à l'expression des histones (Schmidt 2004), l'ARN polymérase III, le facteur de

traduction EIF4E, de nombreuses protéines ribosomales et des protéines facilitant l'assemblage des ribosomes (Obaya, Mateyak et al. 1999).

La protéine c-myc régule également des événements apoptotiques. Plusieurs études semblent montrer l'implication de c-myc dans l'induction de l'apoptose. En absence de facteurs de croissance, cet oncogène active le programme de mort cellulaire (Evan, Wyllie et al. 1992). Cette induction se fait certainement par une voie dépendante de p53/mdm2/ARF. Des études menées dans des fibroblastes de souris (MEFs) démontrent en effet que l'absence de p53 ou de ARF diminue l'apoptose induite par c-myc (Zindy, Eischen et al. 1998). Suite à un signal apoptotique, p53 serait ainsi capable de répondre immédiatement en induisant ses gènes cibles comme Puma et Noxa impliqués dans l'induction de l'apoptose (Oda, Ohki et al. 2000; Nakano and Vousden 2001). De plus, p53 active également la protéine p21 favorisant ainsi l'arrêt du cycle (el-Deiry, Tokino et al. 1993). Parallèlement, c-myc réprime l'expression de p21 favorisant ainsi l'induction de l'apoptose plutôt que l'arrêt du cycle cellulaire.

Le facteur de transcription myc est également dérégulé dans de nombreux cancers. Plusieurs modifications des gènes de myc aboutissant à leur activation sont rapportées, comme les amplifications, les translocations, des insertions (Dalla-Favera, Wong-Staal et al. 1982; Payne, Bishop et al. 1982; Magrath 1990). Les amplifications géniques correspondent à l'augmentation du nombre de copies d'un proto-oncogène. Dans les cellules de neuroblastome, plusieurs centaines de copies du gène N-myc sont ainsi générées (Brodeur 2003). Dans les lymphomes de Burkitt, une translocation entre le chromosome 8 correspondant à la région chromosomique codant pour c-myc et l'un des trois gènes codant pour les immunoglobulines est rapportée (Spencer and Groudine 1991). Cette surexpression de myc induit la tumorogenèse en altérant l'expression de ses nombreux gènes cibles. Cependant, c-myc sensibilise les cellules à l'apoptose et l'inhibition d'une des voies proapoptotiques est nécessaire pour la formation de tumeurs. L'inactivation de p53 et la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 sont très souvent retrouvées favorisant alors le développement des tumeurs présentant l'oncogène c-myc. Des mutations de myc sont également associées à la tumorogenèse. En effet, myc est phosphorylé sur la sérine 62 via la voie des MAPK induite par Ras, stabilisant alors la protéine. La phosphorylation sur un second résidu, la thréonine 58 par GSK-3β, entraîne sa dégradation via le protéasome (Sears 2004). La cotransfection de Ras et d'un mutant de myc sur la thréonine 58, montre une augmentation de l'activité oncogénique de myc. La mutation de myc serait un élément essentiel de la tumorogenèse. La mutation de l'acide aminé 58 est également retrouvée dans le syndrome de Burkitt se traduisant par une augmentation de la stabilité de myc en plus de

l'augmentation de myc d'un point de vue quantitatif (Bahram, von der Lehr et al. 2000; Gregory and Hann 2000).

Le facteur de transcription c-myc est donc impliqué dans la progression du cycle cellulaire en régulant l'expression de la cycline D et cdk4 en sortie de quiescence. Il participe à la mise en place du complexe réplicatif lors de la phase S et active également la machinerie traductionnelle. Il réprime également plusieurs inhibiteurs du cycle cellulaire comme p21 ou p27. Il est souvent dérégulé dans de nombreux cancers et entraîne ainsi la prolifération incontrôlée des cellules.

I.1.b Gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont des gènes exprimés normalement par les cellules. Contrairement aux oncogènes, ce sont des freins à la prolifération cellulaire. Lors de cancers, les gènes suppresseurs de tumeurs perdent leurs fonctions. Seuls les gènes suppresseurs de tumeurs Rb, p53 et le locus INK4/ARF seront développés ici.

Exemple de pRb :

Le premier gène suppresseur de tumeurs fut découvert en 1988 grâce à l'étude du rétinoblastome (Yokota, Akiyama et al. 1988). Cette maladie rare et héréditaire, apparaissant chez les enfants avant l'âge de 5 ans, se traduit par le développement d'une tumeur maligne au niveau de la rétine. Chez ces patients, la perte d'une région chromosomique au niveau du chromosome 13 est observée. La perte d'hétérozygotie, c'est-à-dire l'inactivation des deux allèles du gène, s'accompagne du développement de la maladie (Cairns, Proctor et al. 1991). Knudson proposa le premier cette hypothèse en 1971. Il suggéra alors l'existence d'un gène, noté Rb pour rétinoblastome, inhibant le développement de tumeurs au niveau de l'œil et se localisant au niveau du chromosome 13 (Knudson 1971). D'autre part, la perte d'un seul des deux allèles (hétérozygotie) du gène entraîne une augmentation du risque de développer un cancer. Depuis, des mutations du gène de Rb ont été décrites dans d'autres cancers comme celui du poumon, ou de la vessie (Yokota, Akiyama et al. 1988; Cairns, Proctor et al. 1991).

Les protéines pRb, p107, et p130, de la famille du rétinoblastome sont connues pour réguler négativement la croissance cellulaire en inhibant les gènes impliqués lors de la transition G1/S et la phase S (Grana, Garriga et al. 1998). Leur expression est différentielle au cours du cycle

cellulaire. Tandis que la concentration de pRb reste constante, l'expression de p130 diminue progressivement et celle de p107 augmente pour atteindre un pic en phase S. Les complexes cyclines/cdks interagissent avec les protéines du rétinoblastome par l'intermédiaire de leur domaine de poche et phosphorylent ces dernières (Calbo, Parreno et al. 2002). Ils modulent en conséquence leur association avec d'autres protéines cellulaires. Seules les protéines du rétinoblastome hypophosphorylées sont capables de lier les facteurs de transcription E2Fs et la sous unité associée DP (Stevens and La Thangue 2003). Il existe chez les mammifères six facteurs E2F, E2F1-E2F6. Ces facteurs peuvent être subdivisés en trois groupes selon leurs propriétés transcriptionnelles et leurs interactions avec les protéines de poche. E2E1, E2F2 et E2F3 constituent le premier groupe de facteurs de transcription activateurs. Ils se lient à pRb qui les inhibe. E2F4 et E2F5 composent le deuxième groupe, et sont des répresseurs transcriptionnels et se lient à p107 et p130. Enfin E2F6 agit en tant que répresseur transcriptionnel et ne lie aucune protéine Rb (Trimarchi and Lees 2002).

Rb est impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques. Tout d'abord, Rb participe à la progression du cycle cellulaire en sortie de quiescence et en phase G1/S du cycle cellulaire en présence d'un mitogène. Il régule en effet l'expression coordonnée des gènes de la phase G1 et de la phase S en bloquant les facteurs de transcription E2F et en permettant le recrutement de protéines de remodelage de la chromatine (Harbour and Dean 2000). La protéine Rb est associée au début de la phase G1 avec E2F et DNMT1 (DNA Methyltransferase 1). Cette protéine est une méthyltransférase agissant au niveau des îlots CpG et est associée à l'inactivation de gènes par remodelage de la chromatine. Rb en interagissant avec DNMT1, favorise l'inhibition des promoteurs présentant des sites de fixation pour les facteurs de transcription E2Fs (Robertson, Ait-Si-Ali et al. 2000). De plus Rb est également associé à d'autres co-répresseurs, notamment des histones désacétylases (HDAC) (DePinho 1998). L'activation du complexe cycline D/cdk4 lors d'une stimulation mitogénique permet la libération de ces co-répresseurs et l'ouverture de la molécule d'ADN. Suite à l'activation de cycline E/cdk2, les facteurs de transcription E2Fs sont libérés et régulent l'expression des protéines impliquées dans la transition G1/S, permettant la mise en place du complexe pré-réplicatif. Les facteurs E2Fs activent également l'ensemble des gènes de la phase S comme la cycline A (Lees, Faha et al. 1992)

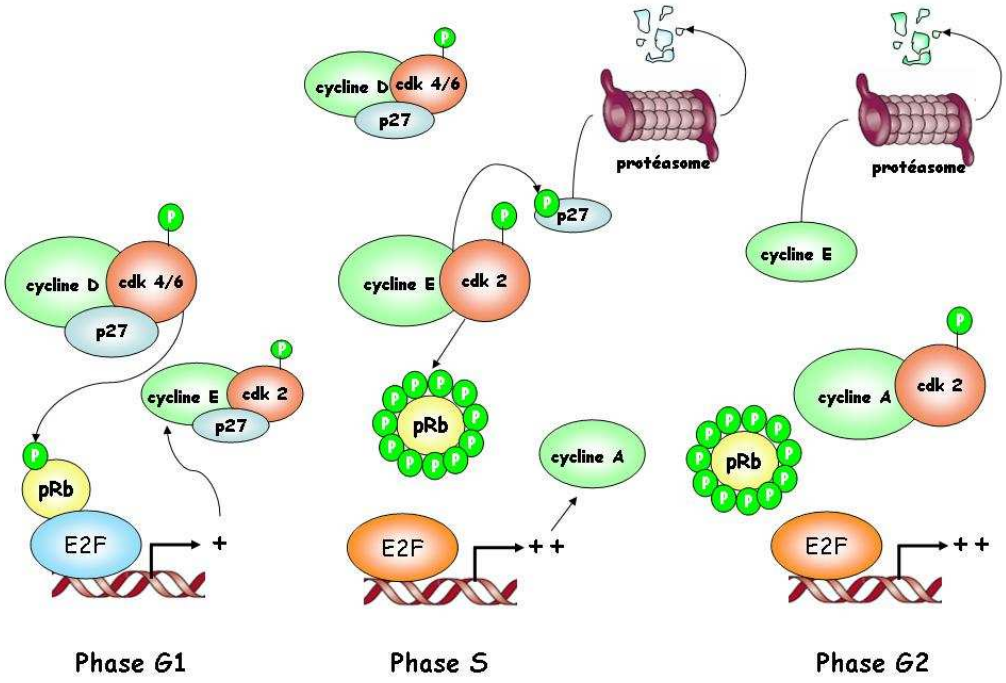


Figure 2 : Implication de pRb dans la progression du cycle cellulaire.

Rb est également impliqué dans la transition G2/M et inhibe les gènes de cycline A et cdk1, grâce au recrutement de protéines comme HPC2 (Histone promoter control protein 2) (Dahiya, Wong et al. 2001). Des études récentes ont également montré son implication dans la régulation de la réparation et le contrôle du fuseau mitotique (Polager, Kalma et al. 2002; Ren, Cam et al. 2002). Ainsi, la protéine Mad2 est régulée par E2F1, et l'élimination de Rb des cellules suffit à augmenter l'expression de ce régulateur clé du fuseau mitotique (Ishida et al. 2001).

Rb participe également à l'hétérochromatinisation des gènes associé à la sénescence, SAHFs (Narita, Nunez et al. 2003). Ces SAHFs sont des zones de l'ADN transcriptionnellement inactives et extrêmement stables dans le temps. Dans ces foci sont localisés les gènes cibles de E2F. La sénescence correspond donc potentiellement à la compaction et à l'extinction définitive des gènes nécessaires à la prolifération sous la dépendance des facteurs de transcription E2F. Dans un cadre normal de prolifération, Rb permet la déacétylation des lysines 9 des histones H3 en recrutant les protéines HDACs et inhibe la transcription des gènes de la phase S par fermeture de la chromatine. Lors de l'induction de la sénescence, Rb recrute également la protéine Suv39, responsable de la méthylation de ces résidus (Rea, Eisenhaber et al. 2000). La méthylation des gènes est un processus plus stable que la déacétylation et permet donc une inhibition des gènes à long terme (Bannister, Schneider et al. 2002). La méthylation de ces résidus permet également le recrutement de la protéine linker

HP1 (Bannister, Zegerman et al. 2001; Lachner, O'Carroll et al. 2001) participant à la compaction de la chromatine et à l'hétérochromatinisation des gènes de la phase S (Zhang, Chen et al. 2007). Ceux-ci sont alors incapables d'être activés, même en présence de signaux prolifératifs, induisant un arrêt définitif de la prolifération cellulaire (Nielsen, Schneider et al. 2001).

Rb est donc une protéine centrale dans la progression des cellules au travers du cycle cellulaire. Elle est également associée au programme de mort cellulaire puisqu'elle est impliquée dans l'induction de la sénescence. Elle constitue donc une barrière au développement tumoral. Rb est ainsi fréquemment inactivée dans les cellules cancéreuses.

Exemple de p53 :

La famille de protéine p53 comprend trois membres p53, p63 et p73. Alors que la protéine p63 semble plutôt impliquée dans le développement normal des cellules (Irwin and Kaelin 2001), les protéines p53 et p73 sont activées en réponse à différents stress cellulaires comme des mutations de l'ADN, l'hypoxie ou encore l'arrivée de signaux hyperprolifératifs à la surface de la membrane cellulaire. Nous ne détaillerons ici que les fonctions de p53. Ce facteur de transcription tétramérique régule un grand nombre de gènes aboutissant soit à un arrêt temporaire du cycle cellulaire, permettant aux cellules de réparer les erreurs, soit un arrêt définitif avec initiation du programme de différentiation, soit la mort cellulaire par apoptose ou sénescence. Elle est donc indispensable au bon déroulement du cycle cellulaire, entrant dans la composition de plusieurs points de contrôle et remplissant alors le rôle de « gardienne du génome » (Balint and Vousden 2001).

La quantité de protéine p53 est soumise à une régulation très fine. Tout d'abord, l'activation de p53 implique une régulation traductionnelle par la stabilisation de son ARNm. En absence de stress, l'ARNm de p53 est pris en charge par la nucléoline. Cette protéine inhibe la prise en charge de l'ARNm par les ribosomes, inhibant ainsi la production de la protéine. Lors de l'arrivée d'un stress, la protéine ribosomale L26 déstabilise la liaison entre l'ARNm de p53 et la nucléoline favorisant alors sa traduction (Takagi, Absalon et al. 2005).

D'autre part, une régulation post-traductionnelle de la protéine permet également son activation (figure 3). En absence de stress, la protéine p53 est associée dans le noyau à plusieurs ubiquitines ligases dont Hdm2. L'ubiquitination de p53 entraîne son export du noyau ainsi que sa dégradation par le protéasome. Les ubiquitines ligases sont elles-mêmes

contrôlées par la protéine p14/ARF. En effet, p14/ARF est capable de lier Hdm2 et d'inhiber son activité ubiquitine ligase (Michael and Oren 2003). Lors d'un stress oncogénique comme l'activation de c-myc, ou de l'activation de E2F, l'expression de la protéine p14/ARF est augmentée et l'association entre p53 et les ubiquitines ligases est inhibée, permettant ainsi l'augmentation de la demi-vie de p53. L'existence d'une boucle de rétrocontrôle permettant à p53 de limiter sa propre activation est également avancée. Ainsi, Hdm2, p14/ARF et c-myc constituent des cibles transcriptionnelles de p53 (Wu, Bayle et al. 1993; Stott, Bates et al. 1998; Ho, Ma et al. 2005). Des études réalisées sur des modèles murins, semblent également montrer que p19/ARF séquestre mdm2 dans le nucléole, libérant ainsi p53 (Weber, Kuo et al. 2000).

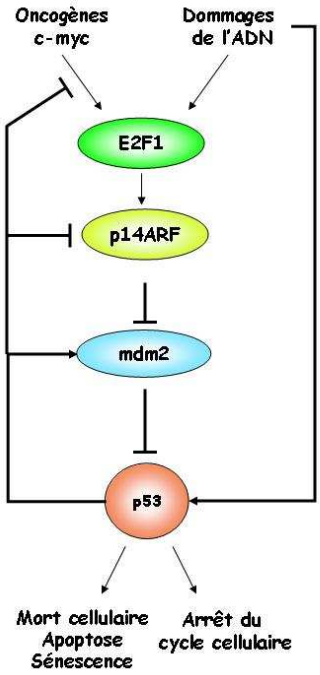


Figure 3 : Régulation de l'activation de p53.
c-myc constitue l'un des oncogènes capable d'induire l'expression de p14/ARF. p14/ARF antagonise ensuite mdm2 pour stabiliser p53. p53 régule également l'expression des protéines impliquées dans son activation, comme mdm2, p14/ARF ou encore c-myc (Gil and Peters 2006).

L'expression de p14/ARF est codée par le locus INK4/ARF codant également pour p16 et p15. Il existe sur ce locus, plusieurs promoteurs permettant la synthèse de ces trois protéines (Quelle, Zindy et al. 1995). L'expression de p14/ARF est contrôlée par les facteurs E2Fs. En absence de stress, son promoteur est occupé par le facteur E2F3b qui réprime la transcription du gène. Lors d'une activation oncogénique, génotoxique ou cytotoxique, le facteur de transcription E2F1 est recruté à la place de E2F3b et induit une forte activation de la voie

p14/ARF aboutissant à la stabilisation de p53 (Aslanian, Iaquinta et al. 2004). Parallèlement à la voie de signalisation faisant intervenir p14/ARF, la protéine p53 peut-être stabilisée par des altérations de l'ADN engendrées par l'arrivée d'un oncogène, indépendamment de p14/ARF. En effet, il existe au sein du domaine d'activation transcriptionnel de la protéine de nombreux sites de phosphorylation. Les sérines 15 et 20 de p53 sont phosphorylées par les kinases ATM/ATR et chk1/chk2 (Bode and Dong 2004). Ces modifications permettent la phosphorylation d'autres résidus dans la région NH2 terminale de p53, dont la sérine 9 ou la thréonine 18. 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 (Dumaz and Meek 1999).

p53 est un facteur de transcription tétramérique impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques. p53 induit notamment l'arrêt du cycle cellulaire en activant les gènes de p21, BTG2 ou 14.3.3σ et GADD45. La protéine p53 se fixe directement sur le promoteur du gène de p21, par l'intermédiaire de séquences consensus. p21 inhibe les complexes cyclines/cdks, et plus particulièrement les complexes impliquant cdk2, et induit alors l'arrêt des cellules en phase G1 (el-Deiry, Tokino et al. 1993). p53 peut également activer le gène de BTG2 (Rouault, Falette et al. 1996). Ce gène est actuellement considéré comme un gène suppresseur de tumeurs, il inhibe en effet l'expression des cyclines D et E. D'autre part, GADD45 et 14.3.3σ seraient impliquées dans l'inhibition de la cycline B/cdk1, induisant plutôt un arrêt en phase G2. La protéine 14.3.3σ séquestre cdc25C et la cycline B dans le cytoplasme, empêchant alors l'activation du complexe cycline B/cdk1 (Peng, Graves et al. 1997). GADD45 empêcherait quant à lui la formation de ce complexe en se liant directement à cdk1 (Zhan, Antinore et al. 1999).

p53 module l'induction du programme apoptotique et favorisant la sortie du cytochrome c de la mitochondrie (figure 4). p53 régule l'expression de plusieurs gènes proapoptotiques comme Bax (Miyashita and Reed 1995), Noxa (Oda, Ohki et al. 2000), Puma (Nakano and Vousden 2001) ou encore Apaf-1 (Moroni, Hickman et al. 2001). D'autre part, elle stimule l'expression de protéines antiapoptotiques comme BclXL en réponse aux radiations ionisantes (Zhan, Alamo et al. 1996). La balance des facteurs pro et antiapoptotiques régule l'entrée des cellules en apoptose.

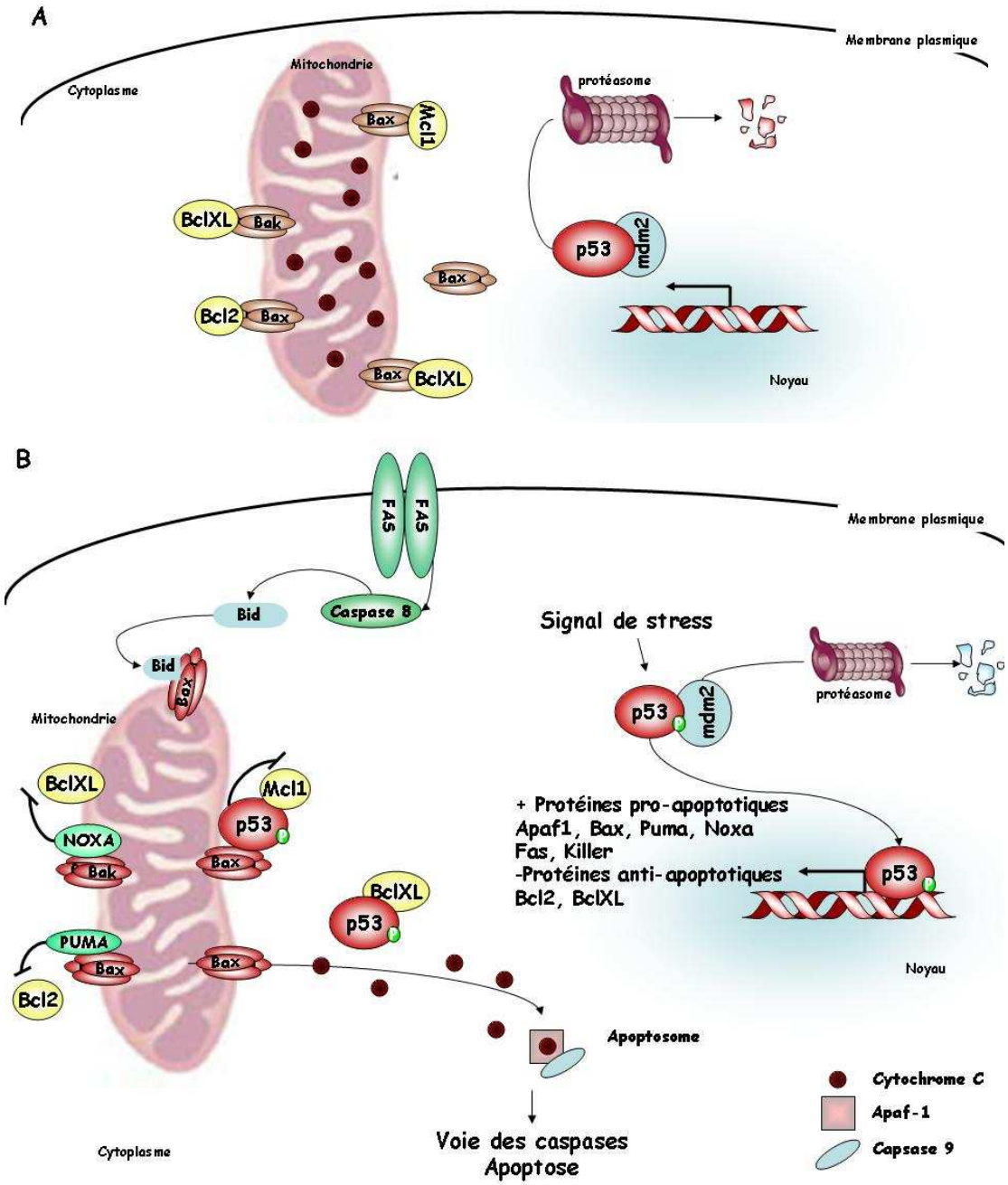


Figure 4 : Activation de l'apoptose par p53.

A. En absence de stress, la protéine p53 est ubiquitinilée par mdm2, entraînant sa dégradation par le protéasome. Les protéines proapoptotiques comme Bax et Bak sont inhibées par les protéines Bcl2 ou BclXL, empêchant la sortie du cytochrome c de la mitochondrie.

B. L'arrivée d'un signal de stress entraîne la stabilisation de p53 qui peut alors activer les gènes proapototiques. Les différentes protéines ainsi produites interagissent directement avec les protéines Bak ou Bax, induisant leur oligomérisation, ou inhibent les protéines antiapoptotiques. La protéine p53 présente également des fonctions cytoplasmiques. Elle peut en effet interagir avec les protéines antiapoptotiques comme Mcl1 ou BclXL et inhiber leur activité. Les protéines Bax et Bak entraînent alors la dépolarisation de la membrane mitochondriale ainsi que la sortie du cytochrome c.

Dans les cellules non apoptotiques, les membres proapoptotiques de la famille Bcl2 comme Bax ou Bak, sont inhibés par les membres antiapoptotiques Bcl2 ou BclXL.

En réponse à un stimulus apoptotique, les protéines « BH3-seulement » comme Bid, Bad, Bim, Puma ou Noxa, sont activées par régulation transcriptionnelle, relocalisation subcellulaire, déphosphorylation, ou protéolyse. Elles peuvent alors soit inhiber l'action anti-apoptotique de Bcl2 et BclXL, soit directement induire un changement de conformation des protéines Bax et Bak, conduisant à leur oligomérisation et à leur insertion dans la membrane mitochondriale où elles forment des pores permettant la libération des facteurs proapoptotiques, dont le cytochrome c (Cartron, Juin et al. 2003).

La protéine p53 stimule également l'apoptose sans induire la transcription de gènes. En effet, elle peut interagir avec des protéines de la surface mitochondriale induisant la dépolarisation de la mitochondrie, nécessaire à la sortie du cytochrome c.

Une étude montre que lors d'un stress cellulaire, p53 interagit avec Bak, empêchant l'interaction de cette dernière avec Mcl1 et inhibant ainsi l'effet anti-apoptotique de Mcl1 (Leu, Dumont et al. 2004). La sortie du cytochrome c de la mitochondrie assure la formation d'un complexe appelé apoptosome, constitué des protéines Apaf-1, cytochrome c et caspase 9 (Lipton and Bossy-Wetzel 2002). La caspase 9 est activée par oligomérisation et entraîne le clivage et l'activation des caspases effectrices comme les caspases 3 ou 7 (Thornberry and Lazebnik 1998). Celles-ci dégradent alors de nombreuses protéines et activent la nucléase CAD responsable de la dégradation internucléosomale de la chromatide (Samejima, Tone et al. 1998).

La protéine p53 participe également à la régulation des événements situés en aval de la mitochondrie. Elle régule l'apoptose médiée par les récepteurs de mort en stimulant la synthèse de récepteurs comme KILLER (Wu, Burns et al. 1997), ou Fas (Owen-Schaub, Zhang et al. 1995). La liaison des différents ligands sur leurs récepteurs respectifs induit l'activation du complexe de mort DISC, et l'activation de la caspase 8. La caspase 8 induit le clivage de la protéine Bid, protéine à domaine BH3 qui induit alors l'activation de Bax et la libération de cytochrome c (Budihardjo, Oliver et al. 1999).

La protéine p53 est donc impliquée dans l'induction de deux processus physiologiques, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose mettant en jeu des mécanismes distincts. Le choix entre arrêt du cycle et apoptose est encore mal compris. Les premières études suggérant une implication différente de p53 à la fois dans l'induction de l'apoptose et dans l'arrêt du cycle cellulaire montrent que les mutants de p53, retrouvés au sein des tumeurs de patients atteints de cancers, sont capables de bloquer les cellules en phase du cycle cellulaire mais échouent à stopper la

transformation induite par différents oncogènes (Crook, Marston et al. 1994; Rowan, Ludwig et al. 1996).

Ces mutants échouent à induire l'apoptose par absence d'induction des gènes cibles de p53 (Friedlander, Haupt et al. 1996; Ludwig, Bates et al. 1996). Plusieurs théories tentent d'expliquer cette distinction. La première met en avant l'existence de différence d'affinité de p53 pour certains promoteurs. Dans ce contexte, les mutants de p53 pourraient se lier aux sites de forte affinité des promoteurs des gènes régulant l'arrêt du cycle cellulaire comme p21 tandis qu'ils seraient incapables de lier les sites de faible affinité des promoteurs codant pour les gènes régulant l'apoptose comme Bax ou Noxa. Cette hypothèse s'appuie également sur l'activation de l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules exprimant une faible concentration de p53 et l'induction d'apoptose suivie de l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules exprimant de forte concentration de p53 (Chen, Ko et al. 1996). Cependant, tous les gènes impliqués dans l'apoptose et régulés par p53 ne possèdent pas de promoteur de faible affinité. Ainsi, l'affinité de p53 pour le promoteur de p21 est la même que pour Puma. Une autre met en avant l'existence des modifications post-traductionnelles de 53 entraînant le stabilisation de p53 et l'activation des gènes proapoptotiques (Espinosa and Emerson 2001). Elles permettent également à p53 de recruter des protéines indispensables à l'activation des gènes proapototiques comme JMY (Junction-mediating and regulatory protein) ou ASPP (Apoptosis-stimulating protein of p53) (Shikama, Lee et al. 1999; Samuels-Lev, O'Connor et al. 2001). Ainsi, les mutations retrouvées sur la protéine p53 pourraient empêcher l'ajout de ces différentes modifications post-traductionnelles entraînant alors l'absence d'induction d'apoptose.

Environ 90 % des mutations de p53 sont des mutations ponctuelles qui correspondent à la modification d'une seule base sur la séquence de TP53. Certains acides aminés sont plus fréquemment mutés que d'autres, six d'entre eux présentent une fréquence de mutation de 28 %. Seul 5 % de ces mutations apparaissent dans le domaine de régulation de la protéine tandis que 95 % se localisent au niveau de la région centrale responsable de la liaison de la protéine à l'ADN (Sigal and Rotter 2000). Ces mutations sont associées à l'inactivation de la protéine mais également à la modification de ces cibles transcriptionnelles (Blandino, Levine et al. 1999; Sigal and Rotter 2000).

Ainsi, p53 est impliqué dans la régulation de l'homéostasie cellulaire. Cette protéine peut stopper la progression du cycle cellulaire en induisant p21. Parallèlement elle peut induire les

programmes de mort cellulaire. D'autre part, elle est inactivée dans de nombreux cancers participant ainsi à la formation des tumeurs.

Locus INK4/ARF :

Ce locus INK4/ARF localisé au niveau du chromosome 9 chez l'Homme code pour deux protéines appartenant à la famille des inhibiteurs de la kinase 4 (INK4) p16 et p15 et pour une protéine notée p14/ARF (p19/ARF chez la souris). Ces trois protéines participent à la suppression des tumeurs et sont donc inhibées dans de nombreux cancers (Sharpless 2005). Elles sont impliquées dans des processus variés comme l'apoptose, la sénescence ou encore l'inhibition du cycle cellulaire. L'activation de p14/ARF induit la stabilisation de p53 et a déjà été développé dans ce manuscrit.

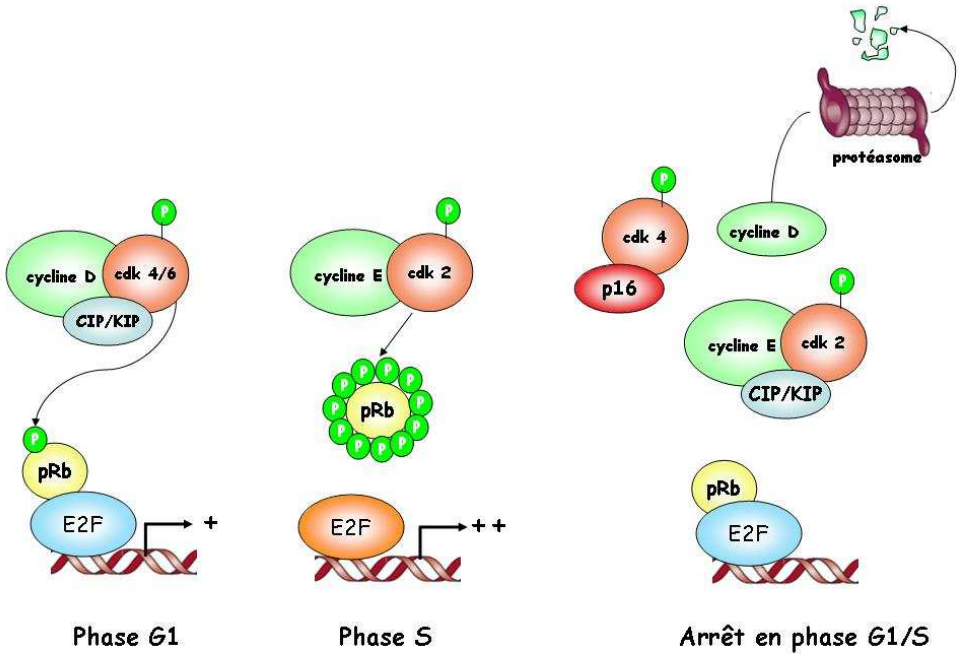


Figure 5 : Inhibition de la progression cellulaire lors de l'induction de la protéine p16.

Les protéines p16 et p15 possèdent des propriétés de suppression de tumeurs en inhibant, durant la transition G1/S du cycle cellulaire, l'activité des cdks. En se liant directement à cdk4 et cdk6, les protéines de la famille INK4 inhibent l'assemblage des complexes cyclines D/cdks (Pavletich 1999). Dans la plupart des cellules, la cycline D est associée à d'autres inhibiteurs des complexes cyclines/cdks de la famille des CIP/KIP, p21 ou p27, qui n'inhibent pas l'activité des complexes. Ainsi, les complexes cycline D/cdk4/6 séquestrent les protéines p21 et p27 empêchant alors celles-ci d'inhiber les autres complexes cyclines/cdks, et assurant ainsi la progression des cellules à travers le cycle cellulaire. Les INK4 entraînent la dissociation des complexes cycline D/cdk4/6 et libèrent les CIP/KIP. Ces derniers sont alors

disponibles pour inhiber les autres complexes notamment les dimères cycline E/cdk2 et cycline A/cdk2 (Sherr 2000). L'augmentation d'expression des INK4 entraîne l'arrêt du cycle cellulaire dépendant de l'hypo-phosphorylation de Rb (figure 5).

Les protéines p16 et p15 sont également impliquées dans l'induction de la sénescence. Observée pour la première fois en 1965, la sénescence est tout d'abord décrite comme le nombre limité de division que peut effectuer une cellule en culture (Hayflick 1965). Le raccourcissement des télomères constitue la première explication à l'activation de la sénescence réplicative des cellules en culture (Harley, Futcher et al. 1990). Les télomères sont de courtes séquences répétées, qui protègent les extrémités des chromosomes. La télomérase assure le renouvellement de ces extrémités lors de la réplication grâce à son activité catalytique « Telomerase Reverse Transcriptase » TERT (d'Adda di Fagagna, Teo et al. 2004). Cependant, la plupart des cellules normales présentent une activité TERT très faible ne pouvant empêcher le raccourcissement des télomères (Masutomi, Yu et al. 2003). La sénescence est donc une réponse physiologique de la cellule à la présence de signaux prolifératifs trop importants. A la différence de l'apoptose qui induit une destruction cellulaire, la sénescence correspond plutôt à un arrêt définitif du cycle cellulaire sans pour autant stopper l'activité métabolique de la cellule (Di Leonardo, Linke et al. 1994). Les cellules restent viables même après une longue période de culture, mais aucune division n'est observée.

Les cellules sénescentes présentent une expression de gènes caractéristiques. Ainsi, deux inhibiteurs clés du cycle cellulaire p21 et p16 sont exprimés par les cellules sénescentes (Mason, Jackson et al. 2004; Jackson and Pereira-Smith 2006). Ces deux protéines participent à l'inhibition de la tumorogenèse contrôlée respectivement par p53 et pRb. Ces deux voies de signalisation sont impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire caractéristique des cellules sénescentes. La protéine p21 est directement induite par p53, permettant l'inhibition de la progression du cycle cellulaire en inhibant les complexes cyclines/cdks (Jackson and Pereira-Smith 2006) alors que l'activation de p16 reste encore mal comprise.

L'activation de la protéine Ras suite à une activation prolongée par un mitogène ou du sérum, induit la transcription de p16. En effet, l'activation de la voie Raf-MEK-ERK entraîne la phosphorylation et l'activation de facteurs de transcription ETS2 responsable de la régulation du promoteur du gène INK4 (Ohtani, Zebedee et al. 2001). Le locus INK4/ARF est également inhibé par la protéine Bmi 1. Cette protéine fait partie d'un complexe multiprotéique appelé Polycomb group (PcG) PRC1. Elle participe à l'hétérochromatinisation de l'ADN ainsi qu'à l'inactivation de nombreux gènes. Le gène Bmi 1 est réprimé par p53 au cours de la mise en

place de la sénescence permettant ainsi l'expression de p16 (Guney, Wu et al. 2006). Parallèlement, les kinases de stress p38 limitent l'interaction de Bmi 1 en avec l'ADN (Voncken, Niessen et al. 2005). D'autre part, la kinase p38 réprime un inhibiteur de p16, le facteur Id1 (Kang, Chen et al. 2003). L'activation des kinases de stress et l'inhibition de Bmi par p53 participent à l'activation de p16. L'activation de p16 se traduit par l'inhibition des complexes cycline D/cdk4/6 et l'absence de phosphorylation de Rb. D'autre part, Rb bloque les gènes de la phase S via le recrutement de la méthyltransférase Suv39H favorisant ainsi l'hétérochromatinisation de ces gènes par méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (Nielsen, Schneider et al. 2001). Ainsi ces gènes sont incapables d'être activés même en présence de signaux prolifératifs, induisant un arrêt définitif de la prolifération cellulaire. La figure 6 qui suit représente le schéma d'activation de la sénescence par un oncogène.

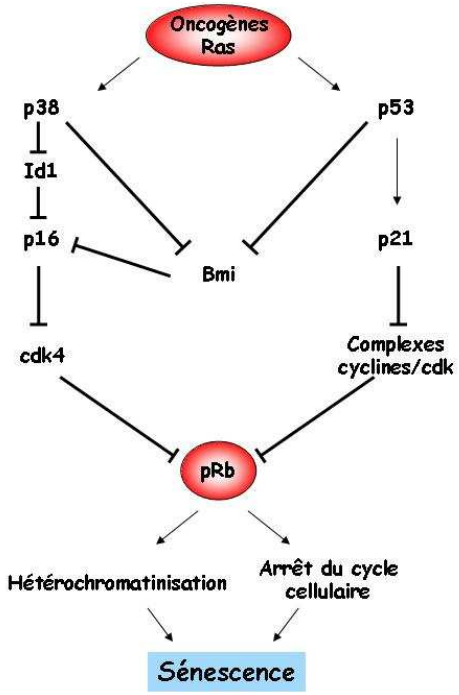


Figure 6 : Activation de la sénescence par les oncogènes comme Ras.

L'activation d'oncogènes comme Ras induit l'activation de p38 et de p53. La protéine p38 active la protéine p16 en inhibant son répresseur Id1. Parallèlement elle inhibe également de façon indirecte Bmi, un inhibiteur du gène de p16. La protéine p16 ainsi synthétisée et stabilisée inhibe la kinase cdk4 entraînant l'arrêt du cycle cellulaire par hypo-phosphorylation de pRb. La protéine p53 induit la protéine p21 qui peut alors inhiber les autres complexes cyclines/cdks. Parallèlement, pRb permet la méthylation de l'ADN entraînant son hétérochromatinisation. L'arrêt du cycle cellulaire ainsi que la condensation de l'ADN constitue une marque essentielle des cellules sénescentes (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007).

Au cours de l'oncogenèse, les différents gènes suppresseurs de tumeurs coopèrent afin de limiter l'apparition des tumeurs et induisent différents programmes de mort cellulaire comme

l'apoptose et la sénescence. L'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs associée à la suractivation des oncogènes est donc un élément essentiel du développement tumoral. Cependant, le taux de mutation d'une cellule ne semble pas suffisant pour expliquer l'accumulation d'autant d'erreurs au niveau des gènes cellulaires. D'autre part, de nombreux oncogènes ne présentent pas de mutation mais une surexpression due à une amplification génique parfois en de multiples copies, le gène codant pour l'oncogène N-myc est par exemple amplifié dans les neuroblastomes. De plus certaines cellules tumorales présentent des caryotypes profondément altérés. L'accumulation de mutations ne constitue pas le seul processus associé à la tumorogenèse et l'instabilité génétique est proposée comme un des processus associé à la progression tumorale

I.2.Instabilité génétique et progression tumorale

L'instabilité génétique est issue de l'incapacité des cellules à transmettre une copie intacte de leur génome lors de la division cellulaire. Elle peut être subdivisée en deux catégories, l'instabilité chromosomique ou CIN et l'instabilité microsatellite MSI (Rajagopalan, Nowak et al. 2003)

I.2.a L'instabilité microsatellite MSI

L'instabilité microsatellite MSI correspond à la perte de bases au niveau de courtes séquences répétées, les séquences microsatellites, et joue un rôle important dans le développement de plusieurs cancers. La MSI est principalement dûe à l'absence de certains processus de réparation (Kolodner 1995; Modrich 1997) Elle participerait notamment au développement de 15% des cancers colorectaux sporadiques (Boland, Thibodeau et al. 1998). La modification du système de réparation des mésappariements (Mismatch repair, MMR) se traduit par la perte d'activité des gènes MLH1, MSH2, ou PMS2, par introduction de mutations inactivantes dans la séquence codante ou hyperméthylation du promoteur des gènes.
La simple inactivation des gènes de réparation n'est pas suivie de la transformation des cellules, d'autres mutations sont nécessaires pour voir apparaître des tumeurs. Ces mutations du système MMR favorisent en revanche l'apparition d'autres mutations à un taux extrêmement rapide, entraînant la cancérisation de ces cellules. Des mutations du récepteur de type 2 du TGFβ sont retrouvées lors de cancers colorectaux associant une MSI (Akiyama, Iwanaga et al. 1996; Samowitz and Slattery 1997). Les MSI sont également associées à

l'inactivation de Bax, protéine pro-apoptotique de la famille de Bcl2. La présence de mutations de Bax semble favoriser l'apparition des cancers présentant une MSI, indiquant que l'existence de mutations dans ce gène est de plus mauvais pronostic pour les patients (Ionov, Yamamoto et al. 2000).

I.2.b L'instabilité de type chromosomique CIN

L'instabilité de type chromosomique CIN se manifeste par des aberrations du caryotype, comprenant des altérations du nombre de chromosomes mais également de leur structure (Zhivotovsky and Kroemer 2004).

L'instabilité chromosomique de structure résulte d'un défaut d'activation de protéines participant à la détection des dommages de l'ADN, comme ATM/ATR, Chk1/Chk2. Le rôle de ces kinases sera développé dans un prochain chapitre. La réparation des dommages induit également des réarrangements chromosomiques pouvant entraîner une instabilité de structure. La réparation des altérations de l'ADN est assurée par plusieurs systèmes de réparation : pour les altérations spontanées, le système de réparation par excision de base (BER) et le système de réparation des mésappariements (MR); pour les mutations induites par des agents exogènes, le système de réparation par excision de nucléotide (NER), le système de réparation par jonctions des extrémités non homologues (NHEJ) et enfin la recombinaison homologue (HR). Ces deux derniers processus de réparation, HR et NHEJ, sont associés à l'apparition de l'instabilité chromosomique de structure et sont présentés dans la figure qui suit.
La détection des extrémités libres de l'ADN, dûes aux cassures doubles brins, dans le système de réparation NHEJ est réalisée par l'hétérodimère Ku70-Ku80. Celui-ci recrute la sous unité catalytique des kinases dépendantes de l'ADN, DNA-PKcs, permettant alors le recrutement d'autres protéines au niveau du site de la lésion. L'hétérodimère XRCC4-ligase IV relie les deux extrémités de l'ADN double brin en une seule étape (Valerie and Povirk 2003). Ainsi, le NHEJ induit la ligature des brins d'ADN avec pertes de séquence (Chu 1997). Malgré sa faible fidélité et l'introduction de microdélétions, ce système extrêmement rapide prédomine pour la réparation des cassures doubles brins dans les cellules de mammifères.

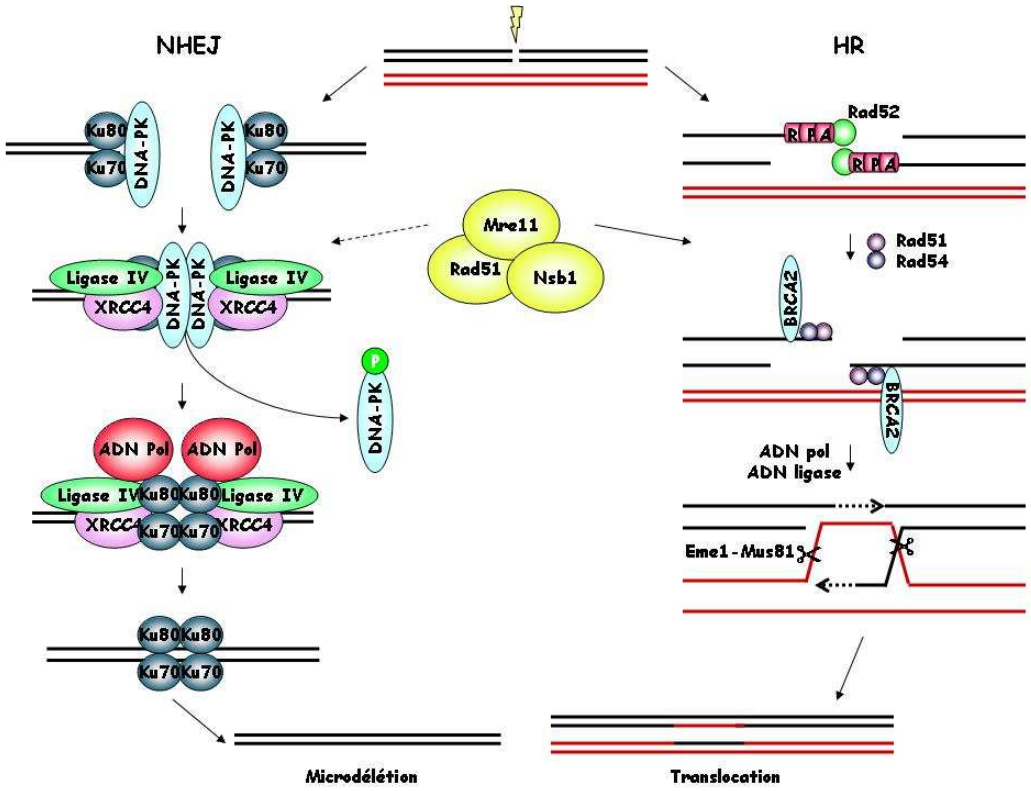


Figure 7 : Systèmes de réparation des cassures double brin par recombinaison homologue (HR) et jonctions des extrémités non homologues (NHEJ).

Malgré l'introduction de microdélétions et sa faible fidélité, le système NHEJ est le principal mécanisme permettant la réparation des cassures doubles brins de l'ADN tout au long du cycle cellulaire. Le système de réparation par recombinaison homologue est quant à lui très fidèle mais n'a lieu qu'après la réplication et induit des translocations. Le complexe MRN, constitué des protéines Mre11, Rad51 et Nbs1 participe à l'activation de la recombinaison homologue. Son implication dans le système NHEJ semble moindre (Lobrich and Jeggo 2007).

Le système de réparation par HR est quant à lui très fidèle mais n'a lieu qu'après la réplication. La détection de la brèche est assurée ici par le complexe nucléase MNR composé des protéines Mre11-Rad50-Nsb1. Rad52 génère des extrémités simple brin qui sont alors prises en charge par Rad51 et BRCA2. Rad54 est également recruté et s'associe à la chromatide sœur présentant la séquence homologue nécessaire à la recombinaison. Les protéines Rad54 permettent de dérouler la double hélice au niveau de la chromatide soeur afin de permettre la recherche d'homologie. Une ADN polymérase et une ADN ligase comblent ensuite la brèche, puis les jonctions sont ensuite séparées grâce aux endonucléases Eme-1 et Mus 81 (Lobrich and Jeggo 2007). Le système HR, induit l'échange de matériel génétique d'un chromosome à un autre, et un défaut de son fonctionnement peut donc être impliqué dans l'instabilité chromosomique structurale.

Plusieurs syndromes humains se caractérisent par la présence de mutations au sein des protéines impliquées dans ces systèmes de réparation, et sont présentés dans le tableau qui suit. Les patients porteurs de ces mutations développent un nombre anormalement élevé de tumeurs confirmant le rôle de ces systèmes dans la prévention de la tumorogenèse.

Tableau 1 : Exemples de syndromes humains associés à une instabilité chromosomique de structure. (Shiloh 2003).

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	Vieillissement et tumeur précoce, chromosome instable	BLM
werner syndrome	Vieillissement et tumeur précoce, chromosome instable	WRN
Rothmund–Thomson syndrome	Vieillissement et tumeur précoce, chromosome instable	RECQL4

L'instabilité chromosomique de nombre est dûe quant à elle, à un défaut de fonctionnement du point de contrôle du fuseau mitotique (Zhivotovsky and Kroemer 2004). La progression mitotique et la séparation des chromatides sœurs sont contrôlées par l'ubiquitine ligase E3 APC/C (Anaphase Promoting Complexe/Cyclosome), et constituent une barrière au développement de l'instabilité chromosomique. L'activité de APC/C nécessite la présence de cdc20 pour la reconnaissance des différents substrats. Ce complexe cible plus particulièrement la cycline mitotique B et la sécurine (Peters 2002). Ainsi, la dégradation de la sécurine mène à l'activation de la séparase et à la séparation des chromatides sœurs. La dégradation de la cycline B mène quant à elle à l'inhibition de l'activité de cdk1 et initie la sortie de mitose. Ces événements protéolytiques sont contrôlés par un ensemble de protéines permettant de prévenir les cellules d'une mauvaise séparation des chromatides sœurs (Musacchio and Hardwick 2002). Le signal détecté lors de ce point de contrôle est l'attachement des chromosomes aux microtubules par l'intermédiaire des kinétochores. En effet, après la réplication, les chromosomes sont constitués de deux chromatides sœurs unis au niveau de leurs centromères par la cohésine. Durant la prométaphase, les chromosomes s'attachent au réseau de microtubules emmenant des centrosomes par l'intermédiaire des kinétochores fixés au niveau des centromères. La liaison directe, au niveau des kinétochores, de la protéine CENP-E à son partenaire BubR1, active l'activité kinase de ce dernier permettant alors le recrutement de Mad1 et Mad2 (Mao, Abrieu et al. 2003). Le complexe

BubR1-Mad2 s'associe à cdc20 et le séquestre, empêchant alors l'activation de l'APC/C et la dégradation par ubiquitination de la cycline B et de la sécurine (Sudakin, Chan et al. 2001).

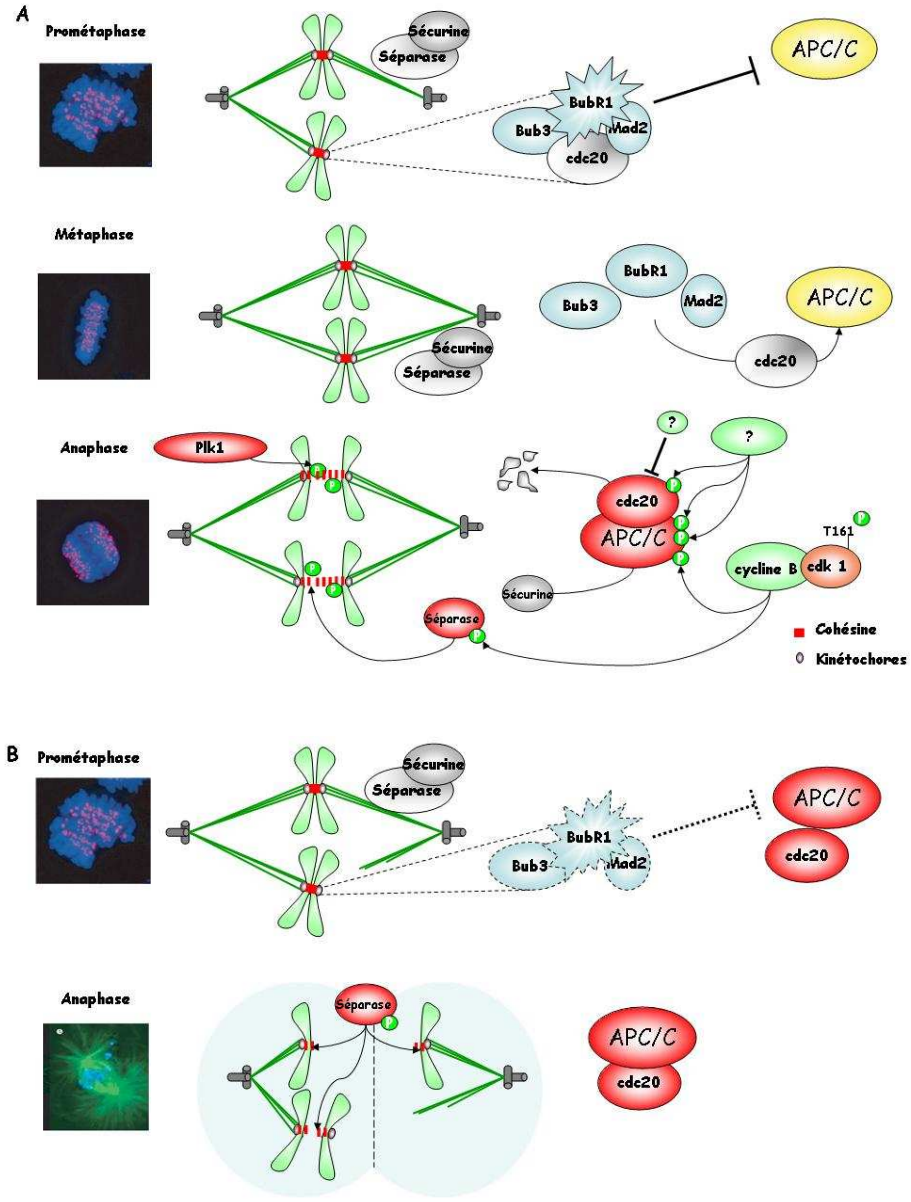


Figure 8 : Point de contrôle du fuseau mitotique.

A. Conditions normales. Lors de la prométaphase, la cohésine retient ensemble les deux chromatides sœurs, les chromosomes ne sont pas tous attachés aux microtubules émanant des centrosomes. Les kinases BubR1 et Mad2 sont donc actives et séquestrent cdc20. En métaphase, lorsque tous les chromosomes sont alignés sur la plaque équatoriale, la liaison entre les kinétochores et les microtubules inhibe l'activité kinase de BubR1 et Mad2 qui libèrent alors cdc20 et activent l'ubiquitine ligase APC/C. Celle-ci libère alors la séparase de la sécurine. La séparase dégrade la cohésine et libère les deux chromatides sœurs.

B. Déficience du point de contrôle du fuseau mitotique dans les cancers. Les mutations des protéines du point de contrôle du fuseau mitotique entraînent l'activation prématurée d'APC/C cdc20 s'accompagnant d'une mauvaise séparation des chromosomes lors de l'anaphase (Kops, Weaver et al. 2005).

Lors de la métaphase, toutes les chromatides sœurs sont attachées par l'intermédiaire des protéines CENP-E du kinétochore au réseau de microtubules. Ceci se traduit par la perte d'activité kinase de BubR1 et la libération de Mad2. Le complexe APC/C cdc20 n'est donc plus inhibé et dégrade la sécurine lors de l'anaphase. La séparase se retrouve libre et dégrade alors la cohésine au niveau des centromères des chromosomes aboutissant à la séparation des chromatides sœurs. L'ensemble de cette régulation est présenté dans la figure 8 A.

Ce point de contrôle est donc essentiel pour la transmission parfaite de deux lots de chromosomes rigoureusement identiques aux deux cellules filles lors de la mitose. En absence d'attachement correct des chromosomes à chaque microtubule, la séparation des chromosomes et la sortie de mitose normale sont inhibées en partie grâce à l'activation de BubR1, Mad2 et Bub1 qui maintient alors l'APC/C sous forme inactive et permet au complexe cycline B/cdk1 de rester actif. Les cellules sortent alors prématurément de la mitose au moment de la transition métaphase/anaphase. En effet, le complexe cycline B/cdk1 actif est capable d'induire directement la perméabilisation de la mitochondrie en phosphorylant Bad, déstabilisant ainsi sa prise en charge par la protéine 14.3.3σ (Konishi, Lehtinen et al. 2002). La protéine proapoptotique Bad est alors transloquée à la mitochondrie où elle active les protéines proapototiques de la famille de Bax ou antagonise les protéines antiapoptotiques de la famille Bcl2 (Debatin, Poncet et al. 2002). Le programme apoptotique est alors induit indépendamment de l'activation de p53 (Letai, Bassik et al. 2002). L'activation prolongée du dimère cycline B/cdk1 peut également induire de façon indirecte l'activation de p53 et entraîner la transactivation des gènes proapoptotiques Puma, ou Bax. Cette induction de l'apoptose survenant lors de la mitose est appelée catastrophe mitotique et sera développé dans un prochain chapitre.

Des altérations des protéines directement impliquées dans le point de contrôle du fuseau mitotique sont à l'origine de l'instabilité chromosomique (figure 8 B). En effet, des altérations d'expression de protéines du point de contrôle du fuseau mitotique comme Mad2, BubR1, Bub1 Bub3, Mad1 et Mps1 ont été reportées dans plusieurs tumeurs et lignées cellulaires (Grabsch, Takeno et al. 2003; Shin, Baek et al. 2003). D'autre part, des mutations germinales Bub1 sont retrouvées dans des cas de cancers familiaux. Ces mutations localisées pour la plupart dans le domaine kinase de la protéine altèrent certainement sa fonction dans le contrôle de la séparation des chromosomes et se caractérisent par la présence de cellules au caryotype profondément altéré et survenant chez l'enfant sous forme de rhabdomyosarcome et de leucémie (Hanks, Coleman et al. 2004). De plus, l'inactivation du gène de BubR1 ou de

son activité kinase entraîne des aberrations chromosomiques avec des pertes de chromosomes entiers (Kops, Foltz et al. 2004).
Enfin, des mutations somatiques ont aussi été mises en évidence au niveau des séquences codantes des gènes de Mad2, BubR1, Bub1 et Mad1 (Kops, Weaver et al. 2005). L'effet de ces mutations sur la régulation du point de contrôle du fuseau mitotique reste encore à déterminer, à l'exception d'un des mutants de Mad1 (Tsukasaki, Miller et al. 2001). Ce mutant semblerait moins capable d'induire le point de contrôle du fuseau mitotique et pourrait donc entraîner une altération de la séparation des chromosomes.
Ainsi, le défaut de fonctionnement du point de contrôle du fuseau mitotique entraînant une mauvaise séparation des chromosomes, peut-être l'un des processus menant au développement de tumeurs aneuploïdes à forte instabilité génétique.

Une étude récente semble montrer l'existence d'une signature protéique associée à l'instabilité chromosomique de nombre. La plupart des gènes appartenant à cette signature sont des kinases mitotiques régulant le cycle du centrosome comme Aurora A ou encore Nek2, mais également des protéines régulant la formation ou la stabilisation du fuseau mitotique comme Aurora B, ou encore TPX2. La surexpression de ces protéines est associée à un mauvais pronostic clinique dans les tumeurs présentant une instabilité chromosomique (Carter, Eklund et al. 2006). Il semble donc que les kinases mitotiques jouent un rôle essentiel dans le contrôle de l'instabilité génétique. L'instabilité des microtubules et l'amplification des centrosomes sont également proposés comme un des processus pouvant mener à l'aneuploïdie.

II Les kinases mitotiques

Le cycle cellulaire est divisé en deux étapes successives, l'interphase et l'étape de division. Il présente une durée variable selon les types cellulaires étudiés. L'interphase est la période du cycle cellulaire permettant aux cellules de préparer leur division. Elle se caractérise d'un point de vue morphologique par un accroissement du volume cellulaire, correspondant à la phase de duplication de l'ADN. Lors de la mitose, le matériel génétique ainsi répliqué peut alors se répartir de façon équivalente entre les deux cellules filles.
L'interphase est classiquement découpée en plusieurs phases G0, G1, S, G2 et présente peu de modifications morphologiques. La phase G0 (Gap 0) ou phase quiescente ne fait pas vraiment partie du cycle cellulaire. Elle correspond en effet à une période de veille cellulaire réversible,

pendant laquelle la cellule attend l'arrivée de signaux extérieurs. La plupart des cellules différenciées constituant les tissus d'un organisme adulte se trouvent dans cette phase. Lors de l'arrivée d'un mitogène, l'entrée en phase G1 (Gap 1) n'induit aucune modification morphologique. Néanmoins, cette phase est indispensable au bon déroulement du cycle cellulaire. Au cours de cette phase, la cellule passe le point de restriction (R) à partir duquel la cellule est irréversiblement engagée dans le cycle. Cette étape permet également la préparation de la réplication. Les protéines nécessaires à la duplication de la molécule d'ADN, comme l'ADN polymérase sont synthétisées. La duplication de l'ADN a lieu au cours de la phase S (Synthèse). Ce mécanisme semi conservatif associe à chaque brin parental un brin néosynthétisé assurant ainsi la transmission de l'information génétique. La phase G2 (Gap 2) du cycle cellulaire prépare la cellule à sa future division. La plupart des protéines nécessaires à cette étape sont alors synthétisées, comme certaines protéines histones ou les protéines du centrosome. La répartition des chromosomes dupliqués dans les deux cellules filles grâce à la formation du fuseau mitotique se fait au cours de la phase M (Mitose), et correspond à une phase où de nombreuses modifications morphologiques sont observables.

II.1 Les différentes étapes de la mitose et le cycle du centrosome

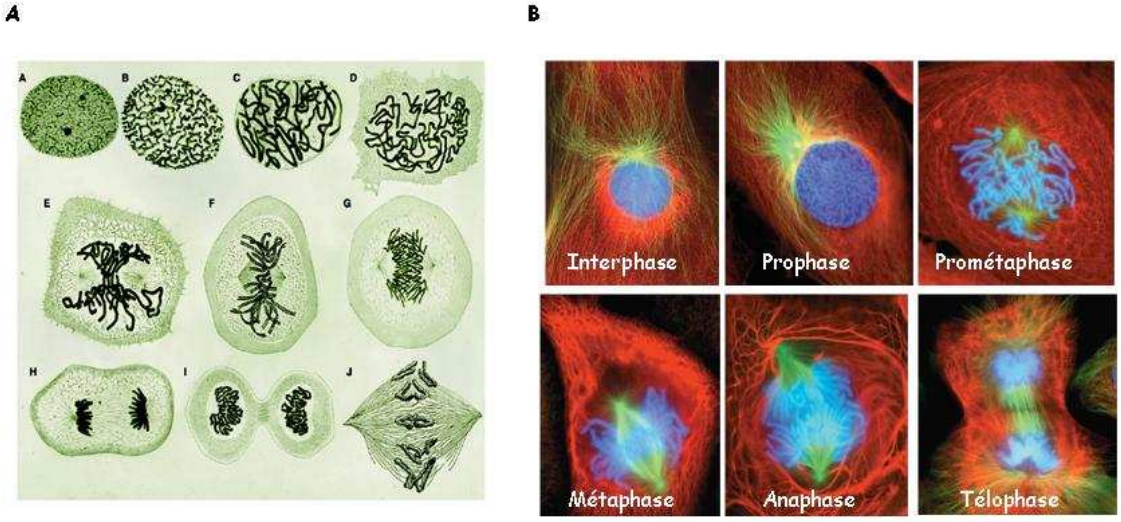


Figure 9 : Evolution de l'observation des cellules en mitose.

A. Dessin de cellules en mitose réalisé par Walter Fleming en 1882, A à C cellules en prophase ; D à F, cellules en métaphase ; G et H cellule en anaphase, I cellule en télophase et cytokinèse ; J réseau de microtubules lors de l'anaphase (Rieder and Khodjakov 2003).

B. Observation de cellules Hela en mitose par immunofluorescence, en rouge réseau de microfilaments d'actine, en bleu l'ADN et en vert le réseau de microtubules.

http://www.lifesci.utexas.edu/faculty/sjasper/images/12.5.jpg

La division cellulaire constitue la dernière étape du cycle cellulaire. Elle mène à la synthèse de deux cellules filles à partir d'une seule cellule mère. Les premières descriptions de cellules en division de Walter Flemming datent de 1882 et sont basées sur les modifications morphologiques du cytoplasme et du noyau des cellules. L'ensemble de ces modifications morphologiques a permis de définir plusieurs phases lors de la mitose : prophase, prométaphase, métaphase, anaphase, télophase et cytokinèse, observables dans la figure 9.

Toutes ces phases sont mises en place et se succèdent grâce à l'existence d'une entité indispensable, le centrosome. Chez les vertébrés, le centrosome est une organelle intracellulaire d'environ 1µm de diamètre. Il est composé d'une paire de centrioles orientés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre, reliés par des fibres protéiques. Cette paire de centrioles est entourée d'une matrice protéique péricentriolaire (PCM). Chaque centriole est constitué de neuf triplets de microtubules organisés en un tube cylindrique. Un des centrioles présente une extrémité avec des appendices supplémentaires et se nomme centriole maternel, ou parental, tandis que l'autre est appelé centriole fils. Il constitue le centre organisateur des microtubules (MTOC) et le lieu de nucléation des microtubules dans les cellules de mammifères (Doxsey 2001). Durant la mitose, il est indispensable pour la formation du fuseau bipolaire fonctionnel. Cependant, plusieurs études montrent que les chromosomes semblent être capable d'induire eux-mêmes la nucléation et la croissance des microtubules en absence de centrosomes et de kinétochores (Dogterom, Felix et al. 1996) Bien que les centrosomes ne soient pas indispensables à la formation du fuseau mitotique, ces organelles influencent le nombre de pôles mitotiques formés (Karsenti and Vernos 2001).

Les centrosomes se dupliquent pendant l'interphase en même temps que l'ADN et se séparent en mitose de manière identique aux chromosomes (Nigg 2002). Le cycle du centrosome peut donc être divisé en plusieurs étapes : duplication, maturation, séparation (Meraldi and Nigg 2002). Le mécanisme de duplication des centrosomes est semi conservatif et reste encore mal connu. En fin de phase G1, la duplication des centrioles est stimulée par l'activation des complexes cycline E/cdk2 et cycline A/cdk2. En effet, ces complexes phosphorylent la nucléophosmine B23 qui est alors éliminée des centrioles, entraînant l'initiation de la duplication (Okuda, Horn et al. 2000). La duplication des centrosomes est synchronisée avec l'initiation de la duplication des chromosomes. La maturation des centrosomes fait intervenir les protéines de la famille des Plk1, Aurora et Nek/NIMA, dont les fonctions seront développées plus tard dans ce manuscrit, et consiste au recrutement de complexes protéiques d'anneaux de γ-tubuline, les γ-TuRCs (γ-tubulin ring complex) (Zheng, Wong et al. 1995).

Les deux centrosomes se séparent lors de la transition G2/M et se localisent aux pôles opposés de la cellule lors de la prophase. Ils formeront plus tard le fuseau bipolaire.
Récemment Pines et Rieder ont suggéré une nouvelle subdivision de la mitose (Pines and Rieder 2001). La description de la mitose basée uniquement sur les modifications morphologiques de la cellule leur semble inappropriée de nos jours. La comparaison de cette nouvelle méthode de description de la mitose est présentée dans la figure 10 suivante.

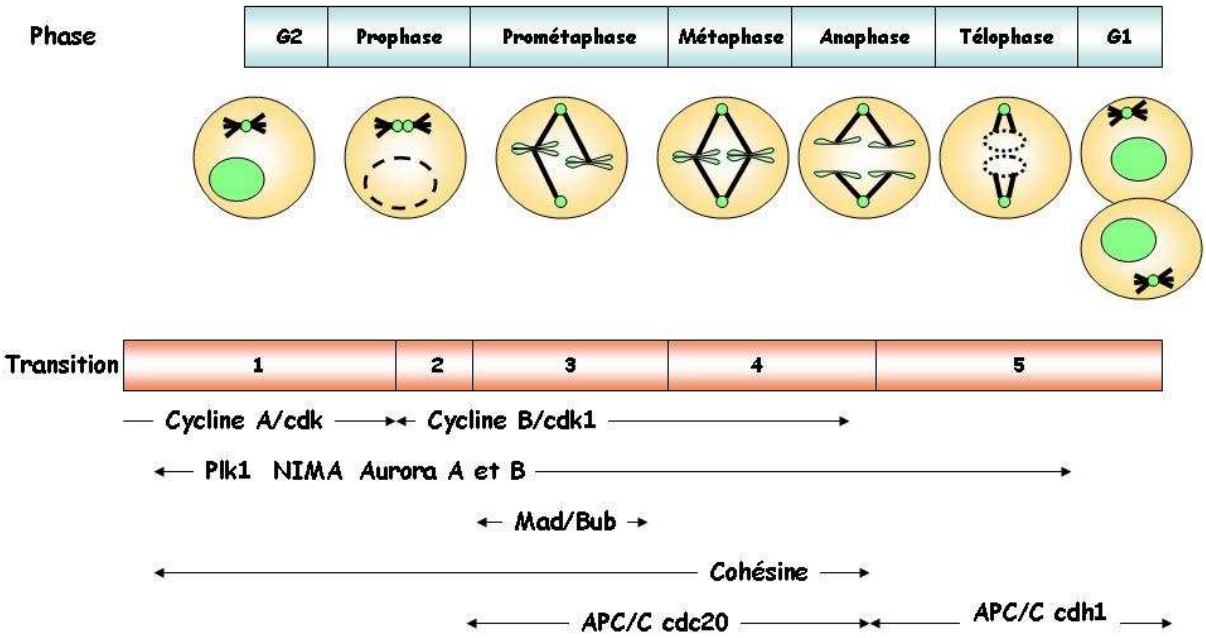


Figure 10 : Comparaison des phases traditionnelles de la mitose et des différentes transitions proposées par Pines et Rieder.
L'ensemble des modifications cellulaires observées chez les vertébrés, utilisées habituellement pour la description de la mitose, ainsi que les différents régulateurs apparaissant au cours de la mitose, sont également représentés (Pines and Rieder 2001).

Certaines de ces modifications observées lors de la mitose ne semblent pas s'appliquer à tous les êtres vivants. Chez certains organismes, par exemple chez *Leishmania*, la condensation des chromosomes n'est pas observable au microscope. D'autre part, chez certaines algues et champignons, l'enveloppe nucléaire ne disparaît pas. Ils proposent donc de définir la mitose en cinq transitions caractérisées par l'apparition de l'activité de différents régulateurs, en particulier l'apparition des cyclines/cdks, des kinases mitotiques et de l'APC/C. La première transition ou antéphase correspond à la fin de la phase G2 et au début de la prophase avant la condensation des chromosomes. Le complexe cycline A/cdk1, les protéines Aurora A et Plk1 sont alors activées. La transition 2 correspond à l'entrée en mitose de façon définitive. Elle est caractérisée par l'activation de cycline B/cdk1 et la rupture de la membrane nucléaire. La

troisième transition correspond parfaitement à la prométaphase. C'est une phase de contrôle qui se traduit par l'activation de APC/C cdc20 et par l'attachement des kinétochores sur les chromosomes. Ce point de contrôle est caractérisé par l'activation de BubR1 et Mad2, et est indispensable au bon déroulement de la séparation des chromosomes. La transition 4 s'étend du début de la métaphase au milieu de l'anaphase et correspond à la dégradation de la sécurine par l'APC/C cdc20, amenant à la séparation des chromatides sœurs de chaque chromosome. La cycline B est également rapidement détruite. La transition 5 correspond au retour à l'interphase, l'APC/C cdc20 est remplacé et dégradé par APC/C cdh1 qui prend alors en charge Aurora A, B ou encore Plk1.

II.2 Les protéines kinases régulant la mitose

Les cinq transitions mitotiques sont contrôlées par un grand nombre de familles de protéines, dont les activités sont interdépendantes et très souvent dérégulées dans les cancers présentant une instabilité génétique. Le déroulement de la mitose est associé en premier lieu spécifiquement à l'activité kinase cdk1, mais d'autres protéines kinases contrôlent également la progression des cellules en mitose : les protéines du point de contrôle mitotique BubR1 et Bub1, les protéines kinases de type Polo (Polo-Like Kinases, Plks), les protéines kinases de type NIMA et enfin les protéines kinases Aurora.

II.2.a Le complexe MPF : cycline B/cdk1

L'induction de l'entrée en mitose est essentiellement régulée par le complexe cycline B/cdk1. Ce complexe fut tout d'abord identifié dans les œufs de xenope comme un facteur capable d'induire leur maturation, d'où sa première dénomination MPF (Maturation Promoting Factor). Il initie la formation du fuseau mitotique en phosphorylant des protéines du centrosome et permet la disparition de la membrane nucléaire en phosphorylant les lamines nucléaires (Dessev, Iovcheva-Dessev et al. 1991).
La cycline B est synthétisée en fin de phase S. Son ARNm semble également être stabilisé en fin de G2. Le dimère cycline B/cdk1 a servi de modèle pour l'étude de la régulation post-traductionnelle de l'activation des complexes cyclines/cdks par les kinases CAK (CDK-activating kinase) et Wee1/Myt1 ainsi que les phosphatases cdc25. Le complexe CAK phosphoryle la thréonine 161 de cdk1 et les thréonines équivalentes des autres cdks. Les kinases Myt1 et Wee1 phosphorylent respectivement la thréonine 14 et la tyrosine 15 de cdk1.

Ces deux phosphorylations inhibent l'activité kinase de la protéine et empêchent l'entrée prématurée en mitose. L'activation des complexes nécessite donc la déphosphorylation des résidus 14 et 15 par une famille de phosphatases, cdc25A, B et C (Coqueret 2002).

En plus des modifications post-traductionnelles modulant l'activation du MPF, il existe également une régulation de la localisation de ce complexe. La plupart des cyclines apparaissent dans le noyau des cellules et y demeurent jusqu'à leur dégradation. La cycline B apparaît dans le cytoplasme mais est transloquée dans le noyau au début de la mitose (Hagting, Karlsson et al. 1998; Yang, Bardes et al. 1998).

Lors de l'entrée en mitose, la phosphorylation de composants importants de la structure cellulaire entraîne des modifications de l'architecture de la cellule. Le complexe cycline B/cdk1 participe à ces nombreuses transformations. Ce dimère modifie par phosphorylation le réseau microtubulaire, les microfilaments d'actine et les lamines nucléaires (Lamb, Fernandez et al. 1990; Dessev, Iovcheva-Dessev et al. 1991). Ainsi il phosphoryle Eg5 (Blangy, Lane et al. 1995), une kinésine impliquée dans l'établissement du fuseau bipolaire permettant la formation du fuseau mitotique. Il phosphoryle aussi les lamines nucléaires participant alors à la disparition de l'enveloppe nucléaire (Peter, Nakagawa et al. 1990; Dessev, Iovcheva-Dessev et al. 1991). En fin de mitose, le dimère cycline B/cdk1 est pris en charge par le système ubiquitine ligase, permettant la dégradation de la cycline B et le recyclage de cdk1. L'ensemble de cette régulation est présenté dans la figure 11 suivante.

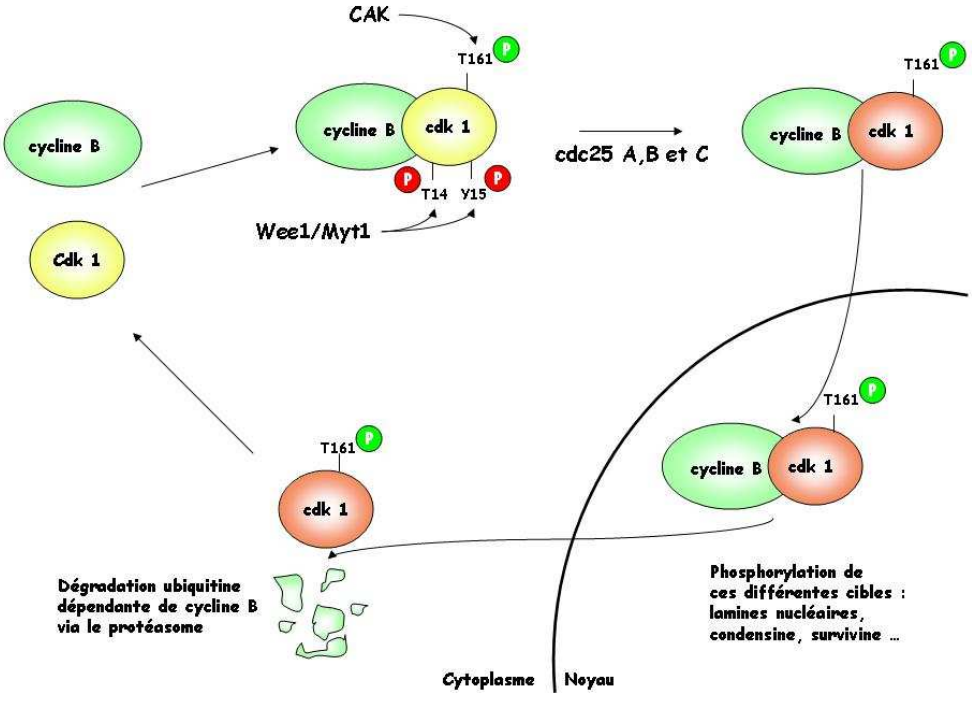


Figure 11 : Régulation de la transition G2/M et de l'activité de cycline B/cdk1.

II.2.b Les protéines kinases de type Polo, Plks

Ces protéines, localisées à la fois au niveau du centrosome, du fuseau mitotique et de l'anneau de cytokinèse, semblent jouer un rôle important dans le cycle du centrosome, ainsi que dans la formation du fuseau mitotique bipolaire et la séparation des chromosomes.

Cette famille de sérine/thréonine kinases fut mise en évidence chez des mutants de *Drosophila melanogaster* (polo) et *Saccharomyces cerevisiae* (cdc5) ne pouvant effectuer une division mitotique correcte (Sunkel and Glover 1988; Kitada, Johnson et al. 1993). Il existe chez les mammifères quatre protéines Plks (Plk1, Plk2, Plk3 et Plk4) présentant une architecture identique. Comme beaucoup d'autres protéines du cycle cellulaire, les Plks sont régulées par phosphorylation. Chez les vertébrés, la phosphorylation d'un résidu thréonine conservé de la boucle T entraîne son activation (thréonine 210 chez l'homme) (Jang, Ma et al. 2002). Des études chez le xénope montrent, *in vitro*, que ces phosphorylations peuvent être attribuées à la protéine kinase A et à Plkk1 (Polo like kinase kinase 1) (Ellinger-Ziegelbauer, Karasuyama et al. 2000; Kelm, Wind et al. 2002). Enfin, en sortie de mitose, les Plks sont prises en charge par le complexe APC/C cdh1 et dégradées par protéolyse (Lindon and Pines 2004).

Chez les mammifères, cette protéine participe à la fois à la transition G2/M mais également à la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse. L'ensemble des fonctions de la kinase Plk1 est illustré dans la figure 12 qui suit. Plk1 participe à la maturation des centrosomes en favorisant le recrutement de γ-tubuline et en augmentant ainsi le phénomène de nucléation des centrosomes (Lane and Nigg 1996). Plk1 module également le recrutement de protéines au niveau des centrosomes. Une fois phosphorylée par Plk1, la protéine Nlp1 (Ninein like protein) se dissocie du centrosome probablement pour permettre le recrutement d'autres protéines comme les γ-TuRCs (Casenghi, Meraldi et al. 2003; Casenghi, Barr et al. 2005).

D'autre part, Plk1 participe à l'activation du complexe kinase essentiel à la mitose, le complexe cycline B/cdk1. Plk1 phosphoryle et active tout d'abord cdc25C et entraîne sa localisation nucléaire (Toyoshima-Morimoto, Taniguchi et al. 2002). Plk1 phosphoryle aussi la cycline B sur la serine 147 et favoriserait ainsi la localisation nucléaire de cette dernière (Toyoshima-Morimoto, Taniguchi et al. 2001).

Dans les cellules en mitose, Plk1 régule la séparation des chromosomes et la cytokinèse. Elle est associée à la fois au fuseau bipolaire et aux kinétochores, mais l'ensemble de ses substrats n'est pas encore identifié (Arnaud, Pines et al. 1998). Plk1 phosphoryle ainsi la cohésine sur les sérines localisées au niveau des sites de clivage de la séparase et faciliterait ainsi sa

dégradation par cette dernière (Alexandru, Uhlmann et al. 2001; Sumara, Vorlaufer et al. 2002). De plus, Plk1 régule avec cdk1 l'activité du complexe APC/C (Brassac, Castro et al. 2000; Kraft, Herzog et al. 2003). Cette sérine/thréonine kinase contribuerait aussi à la cytokinèse en phosphorylant des protéines comme MKlp2 (Mitotic Kinesin-like protein 2) (Neef, Preisinger et al. 2003).

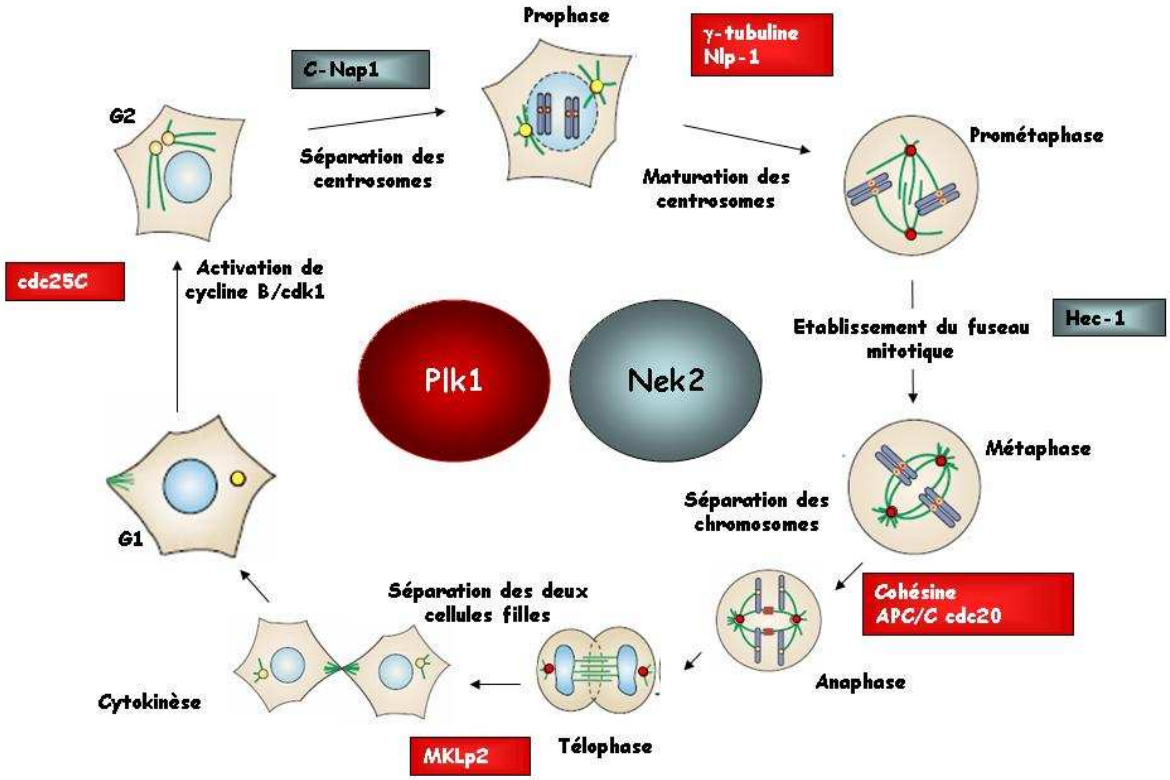


Figure 12 : Fonctions de deux kinases mitotiques Plk1 et Nek2.

Plk1 participe à l'activation du complexe cycline B/cdk1 en activant cdc25C. Le recrutement de la γ-tubuline ainsi que de Nlp-1 participe à la maturation des centrosomes. La phosphorylation de la cohésine et l'activation d'APC/C cdc20 participent à la séparation des chromosomes lors de l'anaphase. Enfin, Plk1 participe à la cytokinèse en phosphorylant la protéine MKLp2.

Nek2 participe à la séparation des centrosomes en phosphorylant C-Nap1, ainsi qu'à l'établissement du fuseau mitotique en phosphorylant Hec-1.

La kinase Plk1 semble également être impliquée dans la tumorogenèse. Cette sérine/thréonine kinase est surexprimée dans de nombreux cancers, notamment dans le cancer colorectal (Macmillan, Hudson et al. 2001; Takahashi, Sano et al. 2003). et serait associée à un mauvais pronostic dans les cancers colorectaux (Kneisel, Strebhardt et al. 2002; Weichert, Kristiansen et al. 2005). D'autre part, sa surexpression dans les fibroblastes NIH3T3 entraîne l'apparition de tumeurs lorsque les cellules sont introduites dans des souris nudes. Cette surexpression

serait également associée à une dérégulation de la formation du fuseau mitotique (Smith, Wilson et al. 1997). Ainsi, son implication dans la séparation des chromosomes et la formation du fuseau mitotique bipolaire et sa surexpression dans de nombreux cancers sont certainement corrélées à une forte instabilité chromosomique et au développement de tumeurs (Eckerdt, Yuan et al. 2005).

II.2.c Les protéines kinases de types NIMA, Neks

Cette famille de sérine/thréonine kinase constitue un autre régulateur de la mitose. Elle participe également à la séparation des centrosomes et à la formation du fuseau mitotique. Une étude récente portant sur six tumeurs d'origines différentes montrent que cette famille de protéine serait impliquée dans l'instabilité chromosomique de nombre (Carter, Eklund et al. 2006).

Les protéines NIMA ont été décrites pour la première fois chez des mutants thermosensibles d'*Aspergillus nidulans* incapables d'induire l'entrée en mitose, « nim » pour « never in mitosis » (Fry and Nigg 1995; Osmani and Ye 1996). Chez les vertébrés, on distingue onze protéines s'apparentant aux protéines NIMA, Neks 1-11. La protéine Nek2 semble être la protéine de la famille la plus homologue aux protéines NIMA et également la mieux caractérisée. Il existe trois variants d'épissage de Nek2 notés Nek2A, Nek2B et enfin Nek2A-T d'environ 48 kDa.

Pendant la phase G1, aucun des variants de Nek2 n'est détectable. Cependant, lors de la transition G1/S, une augmentation d'expression des variants est observée, qui se poursuit jusqu'en G2. Alors que le taux de Nek2A diminue ensuite rapidement lors de la mitose, celui de Nek2B reste constant et ne diminue qu'au début de la phase G1 suivante (Hames and Fry 2002). Ces variations d'expression lors du cycle cellulaire seraient le fruit du recrutement sur le promoteur du gène de Nek2 de facteurs de transcription de la famille E2F (Ren, Cam et al. 2002). En effet, E2F4 serait un régulateur du gène de Nek2 et permettrait l'inhibition de ce gène en phase G1 grâce au recrutement de protéines de la famille Rb, p107 et p130. Des études récentes montrent également que les protéines Neks seraient régulées par les facteurs de transcription de la famille FoxM1 (Laoukili, Kooistra et al. 2005). En effet, la surexpression de ce facteur de transcription dans les cellules d'ostéosarcome U2OS entraîne une augmentation significative du taux d'ARNm de Nek2. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent que l'augmentation d'expression de Nek2 est régulée par FoxM1 jusqu'en G2/M. En phase G1, le gène serait inhibé par les facteurs de type E2F4.

Cette sérine/thréonine kinase fait partie intégrante du centrosome et participe à la régulation de son cycle. L'ensemble des fonctions de la kinase Nek2 est présenté dans la figure 12. Nek2 participe à la séparation des centrosomes en se liant et phosphorylant notamment C-Nap1 (Centrosomal Nek2-Associated Protein 1) (Fry, Mayor et al. 1998). Cette protéine de 280kDa participe à l'élaboration d'un pont existant entre les centrosomes en phase G2. La phosphorylation de C-Nap1 par Nek2 déplace C-Nap1 du centrosome et la destruction de la liaison entre les deux centrosomes permet ainsi leur séparation en début de mitose (Mayor, Stierhof et al. 2000; Mayor, Hacker et al. 2002). Enfin, Nek2 participe également à l'élaboration du fuseau mitotique. Nek2 phosphoryle une protéine associée au centromère, Hec1 (Highly Expressed in Cancer) (Chen, Riley et al. 2002). Cette phosphorylation permet le recrutement de Mad1 et Mad2, protéines du kinétochore indispensables au point de contrôle du fuseau mitotique. Nek2 participe alors à la régulation de la ségrégation des chromosomes et du point de contrôle du fuseau mitotique (Lou, Yao et al. 2004).

Nek2 participe à la fois à la séparation des centrosomes au début de la mitose et à la ségrégation des chromosomes en fin de mitose. Ainsi, sa dérégulation dans les cancers pourrait favoriser l'apparition de cellules présentant des caryotypes endommagés caractéristiques de l'instabilité génétique.

II.2.d Les protéines kinases Aurora

La famille des kinases Aurora représente une autre famille de sérine/thréonine kinase impliquée dans la régulation de la mitose. La signature protéique associée à l'instabilité chromosomique de nombre semble également impliquer les kinases Aurora (Carter, Eklund et al. 2006). Ces kinases participent à la fois à la régulation du cycle du centrosome et à la mise en place du fuseau mitotique. La première kinase Aurora fut décrite chez des mutants de la drosophile (Glover, Leibowitz et al. 1995). Le phénotype de ces larves est assez caractéristique et ressemble étrangement à une aurore boréale. La figure 13 suivante illustre cette organisation.

Depuis, d'autres homologues ont été identifiés chez différentes espèces, notamment chez *Saccharomyces cerevisiae* qui ne possède qu'une seule kinase de cette famille : Ipl1 (Goffeau, Barrell et al. 1996; Hunter and Plowman 1997). On dénombre deux kinases Aurora chez *Caenorhabditis elegans*, et *Drosophila melanogaster*, ou encore chez le xénope, et trois pour les mammifères notés Aurora A, B et C depuis la publication de Nigg 2001 qui proposa une seule nomenclature pour l'ensemble de cette famille.

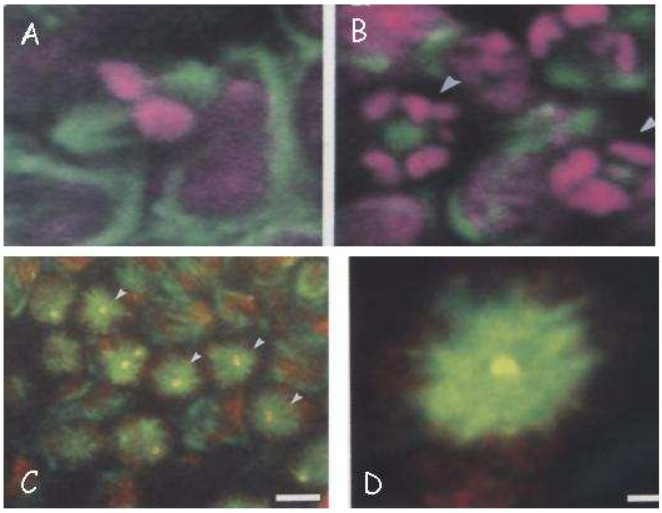


Figure 13 : Observation de cellules de cerveaux de larves de drosophiles mutées sur Aurora A.

A. Fuseaux bipolaires normaux observés dans les cellules de cerveaux de drosophiles sauvages pour le gène Aurora A en rouge l'ADN et en vert les microtubules.

B. Fuseaux monopolaires observés au niveau des cellules de cerveaux de drosophiles mutées sur Aurora A, en rouge les chromosomes, en vert les microtubules.

C et D. Organisation des fuseaux monopolaires, en jaune les centrosomes, en vert les microtubules (Glover, Leibowitz et al. 1995).

Chez l'Homme, elles sont codées par trois gènes différents : STK6 (appelé aussi STK15, Aurora 2, AIK1, BTAK, et ARK1) code pour Aurora A et est localisé sur le chromosomes 20 en q13.2-q13.3. Ce gène produit une protéine qui se localise ou niveau des centrosomes et des pôles mitotiques de la cellule. Elle fût également à l'origine de la découverte de cette famille de sérine/thréonine kinase ; STK12 code pour Aurora B (Aurora 1, ARK2 et AIK2) et se localise en 17q13 ; enfin, le dernier membre de la famille, STK13 code pour Aurora C encore appelée Aurora 3, AIE2, AIK3 et ARK3, et est localisé en 19q13.3 (Nigg 2001).

Ces trois kinases présentent deux domaines, un domaine régulateur en NH2 terminal et un domaine catalytique en COOH terminal. Elles divergent dans leur partie régulatrice mais présentent un domaine catalytique très conservé avec 71% d'identité entre Aurora A et Aurora B. Le domaine catalytique comprend une séquence de destruction D et la partie NH2 terminale expose une séquence A, ou DAD, responsable de la dégradation de ces protéines par APC/C cdh1 (Castro, Arlot-Bonnemains et al. 2002; Crane, Kloepfer et al. 2004).

Les différences de structure des trois membres de cette famille de sérine/thréonine kinase sont présentées dans la figure 14 suivante.

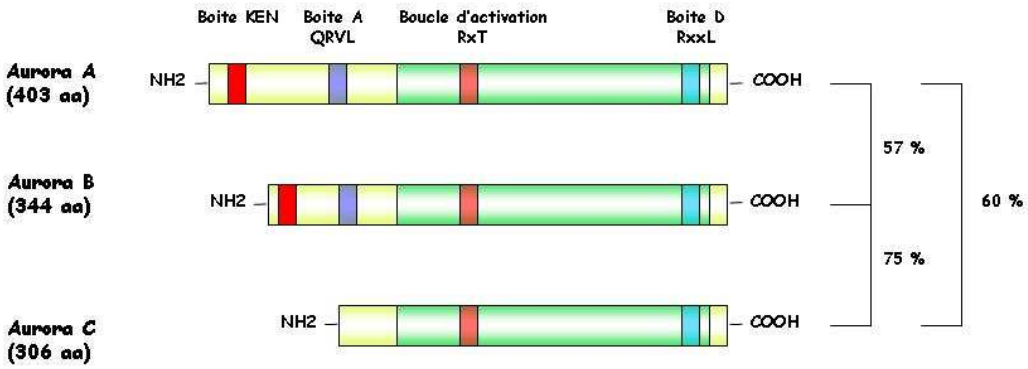


Figure 14 : Structure des kinases de la famille Aurora chez l'Homme.

Les protéines Aurora A, B et C présentent un domaine catalytique (en vert) et un domaine régulateur (en jaune). Le domaine catalytique est très conservé entre les trois membres de cette famille. L'autophosphorylation de la thréonine dans la boucle d'activation ou boucle T (motif RxT) est indispensable à l'activation de l'activité kinase. La boîte de destruction D (motif RxxL) localisée dans la partie carboxy-terminale catalytique de l'enzyme permet leur prise en charge par le protéasome. Aurora A et B présentent une boîte A ou DAD (motif QRVL) responsable de la régulation de leur dégradation. Les pourcentages d'identité des kinases entre elles et leurs tailles sont également représentés (Keen and Taylor 2004; Marumoto, Zhang et al. 2005).

Malgré leur homologie de séquence et de structure, les kinases de la famille Aurora présentent une distribution subcellulaire très différente (figure 15). Alors qu'Aurora A se localise dans le matériel péricentriolaire depuis la fin de la phase S et jusqu'à la phase G1 suivante, Aurora B reste nucléaire et colonise ensuite les centromères. Elle régule à la fois l'alignement des chromosomes et leur ségrégation. Alors que l'inhibition d'Aurora A, chez la drosophile ou dans les cellules humaines, est associée à l'apparition d'une morphologie anormale des pôles (Glover, Leibowitz et al. 1995; Marumoto, Honda et al. 2003), l'inhibition d'Aurora B entraîne un mauvais alignement des chromosomes ainsi qu'une cytokinèse incomplète (Tatsuka, Katayama et al. 1998; Adams, Maiato et al. 2001; Hauf, Cole et al. 2003) impliquant ainsi ces protéines à la fois dans la régulation des centrosomes, la séparation des chromatides sœurs et la cytokinèse.

Aurora B fait partie des protéines passagères qui comptent entre autres INCENP (Inner Centromere Protein) et survivine (Terada, Tatsuka et al. 1998). Elle se localise plus particulièrement au niveau des centromères des chromosomes, de la prophase jusqu'à la transition métaphase/anaphase (Kunitoku, Sasayama et al. 2003). Elle se localise ensuite durant l'anaphase au niveau de la partie centrale du fuseau mitotique, puis au niveau de l'anneau de division des cellules filles (Gruneberg, Neef et al. 2004). Des études montrent également que la localisation d'Aurora B est dynamique durant la mitose ; ainsi il existerait

une partie cytoplasmique de cette protéine permettant un flux continu vers les chromosomes (Murata-Hori and Wang 2002).

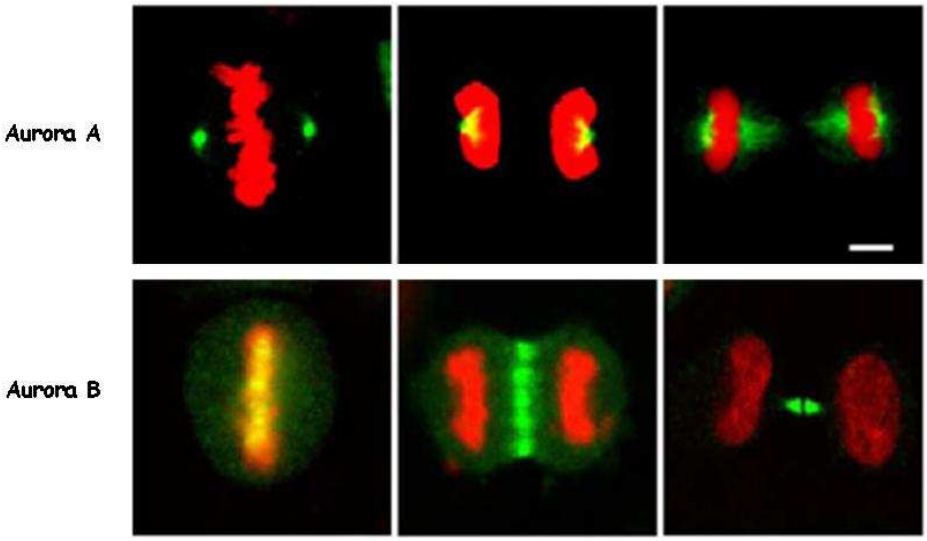


Figure 15 : Observation par immunofluorescence des différentes répartitions subcellulaires d'Aurora A et B dans les cellules HeLa.
En vert, Aurora A ou B ; en rouge l'ADN ; barre 5µm (Scrittori, Skoufias et al. 2005).

Aurora B participe tout d'abord à la régulation de la séparation des chromatides sœurs. Celle-ci n'a lieu que lorsque chaque kinétochore est solidement attaché à un microtubule de chaque pôle du fuseau mitotique. Lorsque les kinétochores sont attachés de façon bipolaire, Aurora B phosphoryle et inhibe la protéine MCAK (Mitotic Centromere Asssociated Kinesin). MCAK se localise au niveau des centromères des chromosomes et participe au mouvement de congression des chromosomes ainsi qu'à la formation du fuseau bipolaire. Elle évalue la tension exercée par les microtubules sur les centromères des chromosomes. Si celle-ci n'est pas équivalente de part et d'autre des centromères, MCAK dépolymérise les microtubules permettant ainsi à d'autres microtubules de venir s'attacher sur les kinétochores libres (Andrews, Ovechkina et al. 2004; Lan, Zhang et al. 2004; Ohi, Sapra et al. 2004). Les auteurs montrent que l'introduction de mutations au niveau des sites de phosphorylation de MCAK augmente le nombre de chromosomes mal attachés. Un phénotype identique est observable lors de l'inhibition par RNAi d'Aurora B indiquant que MCAK est un substrat clé de Aurora B.

Aurora B régule également des protéines impliquées dans la condensation de la chromatine. Elle phosphoryle l'histone H3 sur les sérines 10 et 28 durant la mitose et serait responsable de la condensation de la chromatine (Goto, Yasui et al. 2002). Des auteurs montrent aussi que la

phosphorylation de H3 sur la sérine 10 serait responsable de la dissociation de HP1 au niveau de l'hétérochromatine des centromères (Fischle, Tseng et al. 2005; Hirota, Lipp et al. 2005). Le rôle de HP1 lors de la mitose ne semble pas encore élucidé, néanmoins la dissociation de HP1 pourrait décondenser la chromatine favorisant ainsi l'accès à d'autres protéines et permettant la séparation des chromosomes (Murzina, Verreault et al. 1999).

Aurora B régule également le point de contrôle du fuseau mitotique. Des travaux récents ont montré que le maintien de l'association de Mad2 et BubR1 avec les kinétochores nécessite l'activité de Aurora B (Ditchfield, Johnson et al. 2003). En effet, Aurora B est directement impliqué dans le recrutement des protéines du kinétochores comme Bub1, CENP-E, Bub3, Mad1 et Mad2 (Vigneron, Prieto et al. 2004). Il semblerait aussi qu'Aurora B active directement le point de contrôle du fuseau mitotique lorsque les kinétochores ne sont pas correctement attachés aux microtubules (Pinsky, Kung et al. 2006).

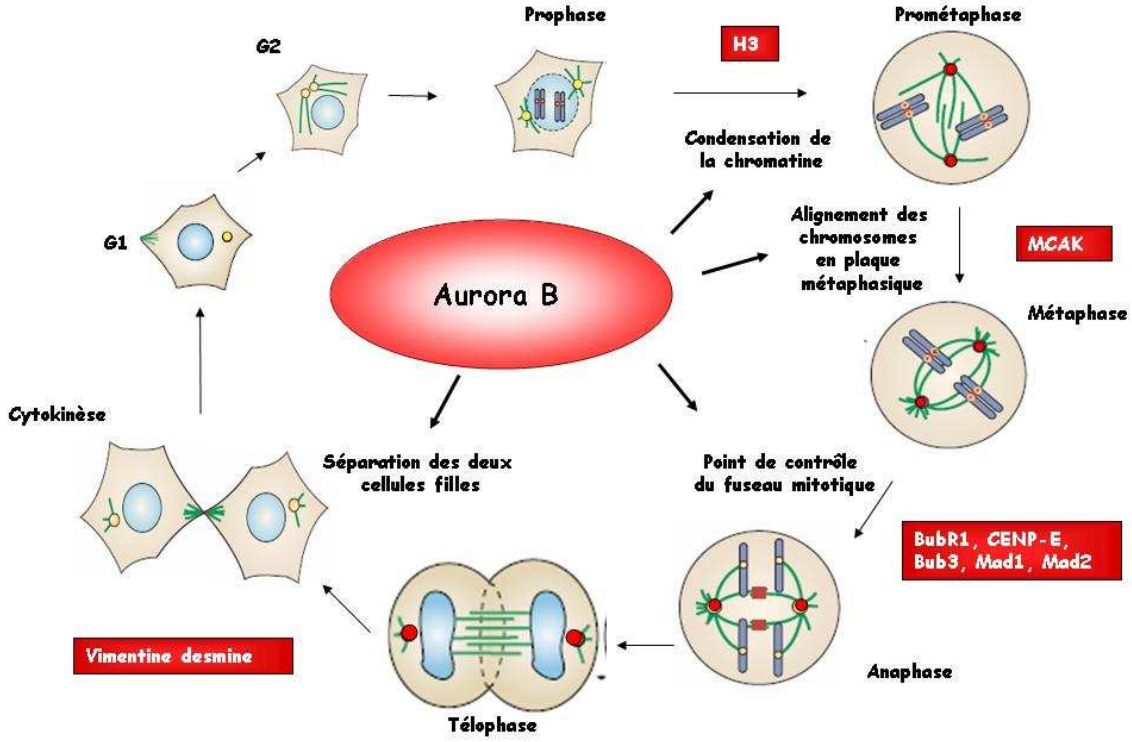


Figure 16 : Fonctions d'Aurora B.

La protéine kinase Aurora B régule la condensation des chromosomes en participant à la phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10. Elle régule également l'alignement des chromosomes en plaque métaphasique en inhibant MCAK. Elle participe à la séparation des chromosomes puisqu'elle régule le recrutement des protéines du point de contrôle du fuseau mitotique. Lors de la cytokinèse, elle participe à la destruction du réseau de protéines du fuseau central.

Enfin Aurora B est nécessaire à la cytokinèse. Elle phosphoryle plusieurs protéines dont les filaments intermédiaires, comme la vimentine ou la desmine, du corps intermédiaire, et

d’autres protéines du fuseau (Goto, Yasui et al. 2003; Kawajiri, Yasui et al. 2003). En phosphorylant ces substrats, Aurora B entraîne la destruction du réseau de filament et permet la séparation des deux cellules filles. Aurora B régule directement la cytokinèse.
La kinase Aurora B est donc directement impliquée dans la séparation des chromosomes en phosphorylant MCAK, et en activant directement les protéines responsables du point de contrôle du fuseau mitotique lorsque les kinétochores ne sont pas correctement attachés. Elle régule également la condensation de la chromatine en phosphorylant l’histone H3. Elle participe également à la cytokinèse en phosphorylant les protéines du corps intermédiaire. La figure 16 illustre les différentes fonctions d’Aurora B. Sa dérégulation pourrait donc être associée à l’apparition de cellules multinucléées et à la formation de tumeurs présentant une instabilité chromosomique.

Peu de données sont actuellement disponibles concernant le troisième membre de cette famille de sérine/thréonine kinase, Aurora C. Celle-ci est découverte pour la première fois dans le sperme de souris puis dans les œufs (Tseng, Chen et al. 1998). Bien que particulièrement exprimée dans les testicules, elle est également détectée dans d’autres types cellulaires. De plus, elle est surexprimée dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales. Son expression est faible durant l’interphase, un pic d’expression est observé lors de la mitose (Kimura, Matsuda et al. 1999). La régulation de cette kinase reste peu connue. Elle participerait d’autre part, durant la spermatogenèse, à la formation du fuseau méiotique (Hu, Chuang et al. 2000). Elle se localiserait au niveau des centrosomes de l’anaphase à la cytokinèse. Cependant une autre étude semble plutôt l’associer aux protéines passagères avec Aurora B et INCENP, ou la survivine (Li, Sakashita et al. 2004; Sasai, Katayama et al. 2004; Yan, Cao et al. 2005). Ainsi, comme Aurora B, la dérégulation d’Aurora C pourrait être impliquée dans la mauvaise séparation des chromosomes lors de la méiose.

Chapitre II : La protéine Aurora A

La kinase Aurora A fût découverte pour la première fois chez les mammifères en 1994 comme le produit d'un gène très souvent amplifié dans les cancers du sein et fut donc nommée BTAK (Breast Tumor Activated Kinase) (Tanner, Tirkkonen et al. 1994; Sen, Zhou et al. 1997). Aurora A fut ensuite retrouvée, en 1995, chez des mutants de la drosophile incapables d'induire une mitose correcte, par Glover et ses collaborateurs (Glover, Leibowitz et al. 1995). Depuis de nombreux homologues ont été découverts dans d'autres espèces, et le terme Aurora A a été retenu pour nommer cette nouvelle protéine kinase. Bien que ne participant pas directement à la cytokinèse, Aurora A participe en revanche à la mise en place des pôles et du fuseau mitotiques indispensables à la séparation des chromosomes.

I Expression et régulation d'Aurora A

I.1 Régulation de la synthèse de l'ARNm d'Aurora A

Le gène de cette protéine est localisé en 20q13 et code pour une protéine de 403 acides aminés dont le poids moléculaire est estimé à 45,8 kDa. Les cellules proliférantes comme les cellules embryonnaires ou germinales actives sont très riches en transcrits de ce gène. D'autre part, il existe une régulation transcriptionnelle de ce gène au cours du cycle cellulaire. En effet, les quantités d'ARNm et de protéine Aurora A sont très faibles durant les phases G1 et S de l'interphase. Elles atteignent ensuite un pic en phase G2 et M puis disparaissent en fin de mitose. L'activité sérine/thréonine kinase suit le même profil d'activation (Kimura, Kotani et al. 1997). La variation du taux d'ARNm est le fruit d'une régulation très fine du gène mais reste à l'heure actuelle mal connue. Il existe au sein du promoteur d'Aurora A deux éléments régulateurs, un site Ets activateur et des sites CDE/CHR inhibiteurs (Cell cycle Dependent Element/ Cell cycle genes Homology Region) (Tanaka, Ueda et al. 2002). Ces éléments CDE/CHR assurent en partie l'oscillation de transcription du gène durant le cycle cellulaire. Ils sont également retrouvés dans de nombreux autres promoteurs comme celui de cycle A ou encore cdc25C. Le facteur de transcription E4TF1 se lie de façon ubiquitaire au promoteur d'Aurora A et permettrait une activation continue du gène. Il serait cependant inhibé grâce

aux éléments CDE/CHR. L'activation spécifique de ce gène lors de la phase G2/M serait dûe à l'arrêt de cette inhibition (Tanaka, Ueda et al. 2002).

I.2 Profil d'expression et localisation subcellulaire de la protéine Aurora A

La localisation d'Aurora A dépend de la phase du cycle cellulaire dans laquelle est engagée la cellule. Aurora A n'est détectée par immunofluorescence indirecte que lorsque les centrosomes sont dupliqués, c'est à dire à partir de la fin de la phase S jusqu'au début de la phase G1 suivante, lorsque Aurora A est dégradée (Dutertre, Descamps et al. 2002; Sugimoto, Urano et al. 2002). Des expériences de photo-blanchiment montrent aussi qu'Aurora A est rapidement renouvelée au niveau des centrosomes grâce à un pool cytoplasmique de protéines (Berdnik and Knoblich 2002; Stenoien, Sen et al. 2003). En fin de phase G2, elle se colocalise avec la γ-tubuline dans les cellules de mammifères, indiquant sa présence dans le centrosome (Gopalan, Chan et al. 1997; Kimura, Kotani et al. 1997; Roghi, Giet et al. 1998). Enfin, Aurora A reste associée aux centrosomes lors de la formation du fuseau bipolaire, mais s'associe également un peu plus tard aux microtubules émanant des centrosomes, dans leur partie proximale (Dutertre, Descamps et al. 2002).
La localisation d'Aurora A et les fonctions qui lui sont associées reposent probablement en grande partie sur les interactions de la kinase avec ses régulateurs ou ses substrats. La figure suivante illustre la localisation d'Aurora A au cours du cycle cellulaire.

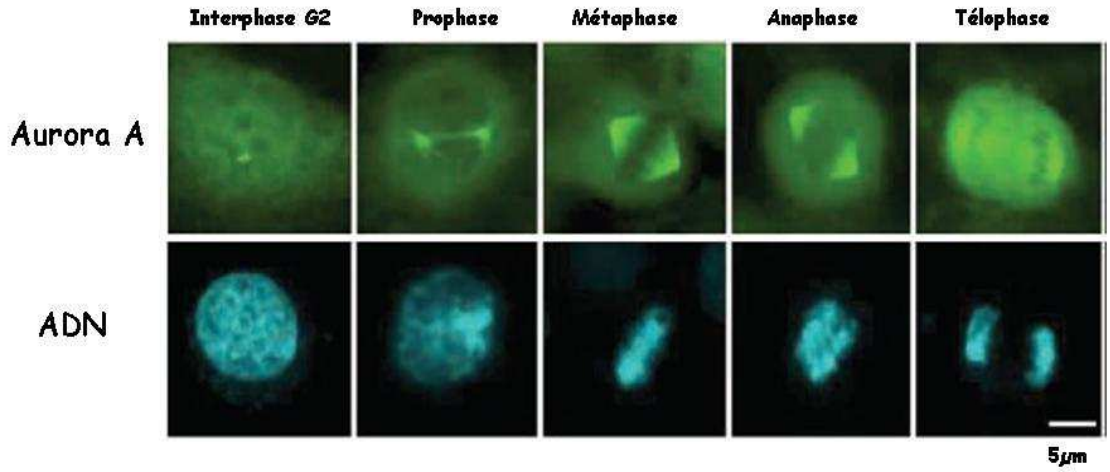


Figure 17 : Localisation d'Aurora A au cours du cycle cellulaire.
Images d'immunofluorescence de cellules HeLa transfectées avec Aurora A-GFP, l'ADN est marqué au DAPI (Fu, Bian et al. 2007).

I.3 Régulation par modifications post-traductionnelles

Dans les cellules somatiques, la quantité de protéine Aurora A et l'activité kinase de l'enzyme présentent un pic lors de la mitose. Cependant, dans les premiers cycles de division des cellules embryonnaires, la quantité d'Aurora A reste stable alors que son activité kinase varie. L'utilisation de ce modèle permettrait l'étude de l'activation de cette protéine tout en s'affranchissant des cycles de synthèse et dégradation de la protéine (Littlepage and Ruderman 2002). Des études précédentes sur le xénope ont permis de mettre en évidence que l'activation de cette kinase dépendait de plusieurs phosphorylations (Andresson and Ruderman 1998). Trois sites de phosphorylations ont été identifiés chez l'homme : la sérine 51, la thréonine 288 et la sérine 342 (figure 18). La phosphorylation sur la sérine 53 du xénope (équivalent à la sérine 51 chez l'homme) se localise dans la région NH2 terminale non catalytique de l'enzyme et empêche la dégradation de la protéine (Littlepage and Ruderman 2002).

La thréonine 288 se localise au niveau de la boucle d'activation et sa mutation abolit l'activité kinase de l'enzyme. D'autre part, l'introduction d'une mutation inactivante bloque la capacité d'Aurora A à transformer les cellules en culture et à induire des tumeurs. Ceci suggère donc que cet acide aminé est impliqué dans l'activation de l'activité kinase d'Aurora A (Walter, Seghezzi et al. 2000).

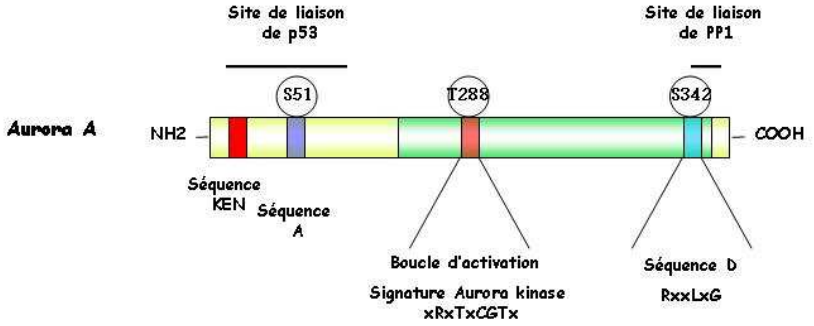


Figure 18 : Domaines fonctionnels d'Aurora A d'origine humaine.

La protéine Aurora A présente un domaine catalytique (en vert) et un domaine régulateur (en jaune). L'autophosphorylation de la thréonine 288 dans la boucle d'activation ou boucle T (motif RxT) est indispensable à l'activation de l'activité kinase. La séquence de destruction D (motif RxxL) localisée dans la partie carboxy terminale catalytique de l'enzyme permet leur prise en charge par le protéasome. La phosphorylation de la sérine 342 dans cette séquence bloque l'activité kinase de l'enzyme. Aurora A présente une séquence A ou DAD (motif QRVL) responsable de la régulation de sa dégradation. La phosphorylation d'Aurora A sur la sérine 51 dans cette séquence bloque la dégradation de la protéine (Crane, Gadea et al. 2004).

La sérine 342 participerait à la régulation négative (Littlepage and Ruderman 2002). En effet, sa mutation en alanine chez le xénope n'entraîne pas de modification de l'activité kinase de l'enzyme. En revanche, sa mutation en acide aspartique qui mime la phosphorylation de ce site, abolit totalement son activité. D'autre part, sa localisation proche du site de fixation de PP1, un régulateur négatif clé d'Aurora A, laisse à penser que la sérine 342 régulerait de façon indirecte cette kinase (Katayama, Zhou et al. 2001).

I.4 Inhibition d'Aurora A par les phosphatases PP1 et PP2A

L'équipe de Katayama a montré qu'Aurora A et la protéine phosphatase 1 pouvaient se lier entre elles, et se réguler réciproquement (Katayama, Zhou et al. 2001). En effet, il existe deux sites de liaison pour PP1 sur Aurora A, le premier site est localisé dans le domaine catalytique de l'enzyme et le deuxième se situe proche de la sérine 342 impliquée dans l'inhibition de l'activité kinase. Cette équipe démontre également l'existence d'un lien directe entre Aurora A et PP1 durant la mitose. D'autre part, lors de la mutation de sites de liaison de PPI sur Aurora A, Aurora A est hyperphosphorylée, suggérant ainsi que PP1 régule négativement Aurora A en déphosphorylant au moins un des résidus impliqués dans son activation. *In vitro,* Aurora A peut également phosphoryler PP1 et l'inhiber. La phosphorylation de la sérine 342 inhiberait la liaison de PP1 à Aurora A et protégerait l'enzyme de la déphosphorylation notamment au niveau de la thréonine 288 ou sur d'autres sites indispensables à l'activité kinase de la protéine.

Aurora A peut aussi se lier à l'Inhibiteur 2 (I-2) (Satinover, Leach et al. 2004). Cette liaison entraîne l'augmentation d'activité de Aurora A, sans augmenter la phosphorylation de la thréonine 288. En effet, I-2 est un inhibiteur direct de PP1, empêchant alors son action sur Aurora A.

Une autre étude montre également qu'Aurora A est régulé par PP2A, une autre protéine phosphatase (Horn, Thelu et al. 2007). Cette protéine colocalise avec Aurora A au niveau des centrosomes lors de la mitose. De plus elle semble se lier à Aurora A via la sérine 51 localisée dans la boîte A. Cette liaison permettrait à PP2A de déphosphoryler Aurora A sur la sérine 51 et entraînerait sa prise en charge par le protéasome.

I.5 Activation par TPX2 et Ajuba

Des études récentes de double hybride ont permis de mettre en évidence un activateur d'Aurora A, la protéine Ajuba (Hirota, Kunitoku et al. 2003). Cette protéine impliquée dans la maturation des centrosomes interagit avec Aurora A en phase G2 du cycle cellulaire. *In vitro,* la protéine Ajuba stimule l'autophosphorylation d'Aurora A sur la thréonine 288. D'autre part, son inhibition prévient l'activation d'Aurora A dans les centrosomes en fin de phase G2 et empêche l'entrée en mitose. L'activation d'Aurora A par Ajuba semble constituer la première phase d'activation de la protéine, elle permet également l'activation du complexe cycline B/cdk1 au niveau des centrosomes. En effet, Aurora A phosphoryle cdc25B au niveau des centrosomes sur la sérine 353 et l'active (Dutertre, Cazales et al. 2004). La phosphatase cdc25B peut alors éliminer la phosphorylation de la thréonine 15 du complexe cycline B/cdk1 entraînant alors son activation (De Souza, Ellem et al. 2000).

TPX2 (Target Protein for *Xenopus* kinesin-like protein 2) est une protéine associée aux microtubules indispensable à la stabilisation du fuseau mitotique, et à la localisation d'Aurora A au niveau du centrosome (Wittmann, Wilm et al. 2000; Gruss, Wittmann et al. 2002; Kufer, Sillje et al. 2002). Des études sur le xénope montrent que TPX2 stimule l'autophosphorylation d'Aurora A sur la thréonine 295 (équivalente à la thréonine 288 chez l'Homme). En absence de TPX2, la thréonine 288 d'Aurora A est accessible à PP1, qui peut alors la déphosphoryler. La fixation de TPX2 sur Aurora A entraîne une réorganisation de la boucle d'activation se traduisant par l'internalisation du résidu 288, devenant ainsi moins accessible à PP1 (Bayliss, Sardon et al. 2003; Eyers, Erikson et al. 2003).

I.6 Inhibition d'Aurora A par p53

Le gène suppresseur de tumeurs p53 joue un rôle important dans le maintien de la stabilité du gènome. Ce facteur de transcription est capable d'induire différentes protéines participant à plusieurs points de contrôle notamment en phase G1 et G2. Il semble également indispensable au déroulement de la mitose (Hofseth, Hussain et al. 2004). Aussi, p53 se localise au niveau des centrosomes lors de la mitose. L'absence ou l'inhibition de celle-ci entraîne l'apparition de cellules avec de multiples centrosomes et des fuseaux anormaux (Fukasawa, Choi et al. 1996; Tarapore and Fukasawa 2002). Ce phénotype caractéristique est également celui observé lors de la surexpression d'Aurora A et est d'autant plus marqué dans les cellules ne présentant pas p53 (Meraldi, Honda et al. 2002).

Chez l'homme, p53 interagit spécifiquement avec Aurora A et l'inhibe (Chen, Chang et al. 2002). In vitro, p53 interagit avec la partie NH2 terminale de l'enzyme et inhibe son activité kinase. Cette liaison supprimerait ainsi la capacité d'Aurora A à induire l'amplification des centrosomes et la transformation des cellules.

I.7 Dégradation d'Aurora A par APC/C cdh1

Le protéasome est une structure macromoléculaire multiprotéique permettant la dégradation spécifique de protéines par fixation de courts peptides d'ubiquitine, de 8 kDa sur les chaînes latérales des lysines. L'ubiquitination est un phénomène dépendant de l'ATP, nécessitant l'action conjuguée d'au moins trois complexes enzymatiques (Hershko and Ciechanover 1998).

Deux complexes ubiquitine ligases différents interviennent dans la régulation du cycle cellulaire. Le complexe SCF (Skip-cullin-F-Box) intervient plus particulièrement pour la dégradation des protéines interphasiques. Le complexe APC/C est quant à lui actif de la fin de la phase G2, au début de la phase G1 suivante (Vodermaier 2004). Il a donc principalement pour substrat des protéines mitotiques. Cdc20 et cdh1 sont les protéines adaptatrices permettant la reconnaissance des substrats (Pfleger, Lee et al. 2001). Elles reconnaissent les protéines présentant des boîtes de destruction D constituées d'une séquence consensus de quelques nucléotides RxxLxxxxN reconnue par cdc20 et cdh1, ou d'une séquence KEN présentant la séquence consensus KENxxxN reconnu uniquement par cdh1 (Pfleger and Kirschner 2000; Castro, Bernis et al. 2005). La fenêtre d'activité de ces deux complexes est distincte. L'activité de cdc20 apparaît à partir du début de la mitose et jusqu'en anaphase alors que cdh1 régule la dégradation de protéine de la fin de la mitose au début de phase G1 (Harper, Burton et al. 2002). Alors que cdc20 cible plus particulièrement la sécurine et les protéines de l'anaphase, cdh1 vise plutôt la protéine cdc20 elle-même, mais également Aurora A et B ou encore Plk1.

Des études réalisées sur le xénope et sur des cellules humaines montrent que la destruction d'Aurora A est dépendante de l'ubiquitine ligase APC/C cdh1 (Castro, Arlot-Bonnemains et al. 2002; Littlepage and Ruderman 2002; Crane, Kloepfer et al. 2004). Cdh1 reconnaît deux séquences spécifiques : la séquence KEN et la séquence D de destruction. Ces deux motifs sont présents à la fois sur Aurora A et B. Dans les œufs de xénope, cdh1 n'est pas exprimé et la quantité d'Aurora A ne varie donc pas au cours du cycle cellulaire. L'introduction de cdh1 dans ces œufs induit alors sa dégradation. La surexpression de cdh1 dans les cellules COS se

traduit par une diminution d'Aurora A (Taguchi, Honda et al. 2002). De plus dans les cellules Hela, l'introduction d'un dominant négatif de cdh1 induit une augmentation d'Aurora A (Crane, Kloepfer et al. 2004). La séquence A contient la sérine 51 qui est phosphorylée durant la mitose et empêche la destruction d'Aurora A jusqu'en fin de mitose. Cette phosphorylation maintient certainement la protéine sous une forme tridimensionnelle, rendant inaccessible la protéine pour le protéasome (Horn, Thelu et al. 2007).

II Rôles de la kinase Aurora A

Actuellement, Aurora A posséderait environ une quinzaine de substrats *in vitro*. Cependant, la phosphorylation de certaines de ces protéines ne semble encore pas très bien établie *in vivo* et reste à confirmer.

II.1 Aurora A régule le cycle du centrosome

Aurora A apparaît au niveau des centrosomes à la fin de la phase S. Les centrosomes sont alors composés de quatre centrioles liés entre eux. Aurora A ne semble pas directement impliquée dans la duplication des centrosomes. Cependant, sa surexpression dans des cellules humaines ou murines entraîne une amplification du nombre de centrosomes. Aurora A pourrait donc être engagée dans le contrôle du nombre de centrioles après leur duplication. L'activité kinase de l'enzyme ne semble pas impliquée dans l'amplification des centrosomes, puisque l'introduction ectopique d'une enzyme non fonctionnelle est aussi associée à une augmentation du nombre de centrosomes (Zhou, Kuang et al. 1998; Meraldi, Honda et al. 2002).

Lors de la transition G2/M, les centrosomes migrent ensuite chacun à un pôle de la cellule pour établir un fuseau mitotique bipolaire. L'introduction d'un RNAi ou d'un anticorps bloquant dirigé contre Aurora A dans les cellules HeLa entraîne l'apparition de cellules monopolaires et l'absence de séparation des centrosomes (Marumoto, Honda et al. 2003). Des études réalisées sur d'autres modèles comme le xénope ou *Caenorhabditis elegans* aboutissent aux mêmes observations (Roghi, Giet et al. 1998; Hannak, Kirkham et al. 2001). Les mécanismes moléculaires impliquant Aurora A dans la séparation des centrosomes sont encore mal connus. Une équipe propose qu'Aurora A pourrait collaborer avec Nek2 pour

phosphoryler et dissocier C-Nap1 des centrosomes et permettre ainsi leur séparation en début de mitose (Faragher and Fry 2003).

Une fois dupliqués et séparés, les centrosomes s'engagent ensuite dans un processus de maturation. De nombreuses protéines sont alors recrutées, assurant la structure de ce dernier, mais aussi ses fonctions durant toute la mitose et jusqu'à la phase G1 suivante. L'implication d'Aurora A dans la maturation des centrosomes a été démontrée à la fois chez *Caenorhabditis elegans* et chez *Drosophila melanoglaster* (Hannak, Kirkham et al. 2001; Berdnik and Knoblich 2002; Giet, McLean et al. 2002). Ainsi, en absence d'Aurora A, les centrosomes sont incapables de recruter les composants de la matrice protéique péricentriolaire comme la γ-tubuline et la masse du fuseau diminue de 60 %. La morphologie des pôles est également affectée. Aurora A permettrait le recrutement au niveau des centrosomes de la centrosomine, protéine indispensable pour la liaison de la γ-tubuline (Terada, Uetake et al. 2003). Des études récentes semblent montrer que l'interaction entre Aurora A et D-TACC (Transforming Acidic Coiled-Coil). La phosphorylation de D-TACC par Aurora A permettrait son recrutement au niveau du centrosome à un stade précoce de la mitose (Barros, Kinoshita et al. 2005; Kinoshita, Noetzel et al. 2005). La mobilisation de D-TACC stabiliserait le réseau de microtubules autour des pôles en recrutant notamment des protéines associées aux microtubules, comme Msps/XMAP215. La figure 19 illustre l'implication d'Aurora A dans la maturation des centrosomes.

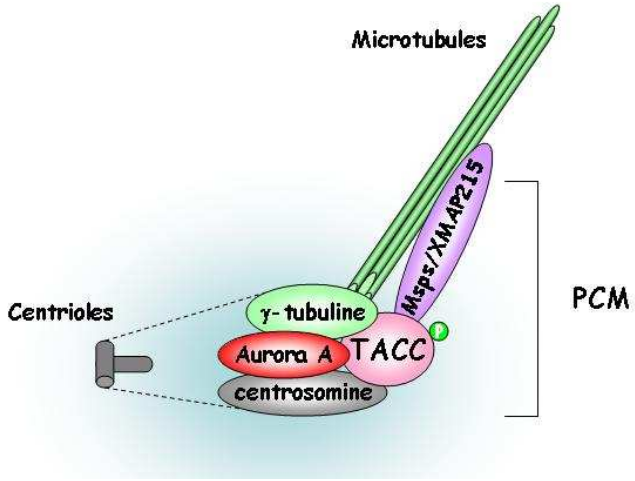


Figure 19 : Aurora A et maturation des centrosomes.

Aurora A recrute tout d'abord la centrosomine au niveau des centrosomes, puis D-TACC est phosphorylée, permettant l'association de Msps/XMAP215. Ces protéines entraînent l'assemblage rapide des microtubules à partir des deux centrioles et du matériel péricentriolaire, PCM. Au cours de la mitose, la maturation des centrosomes est assurée grâce au recrutement de la γ-tubuline et des protéines péricentriolaires, augmentant ainsi la capacité de nucléation des centrosomes pour l'établissement du fuseau mitotique (Marumoto, Zhang et al. 2005).

Aurora A est donc une protéine essentielle au cycle du centrosome. Bien que participant peu à la duplication de ces derniers, elle est cependant impliquée dans la nucléation des microtubules en recrutant ou en phosphorylant directement des composants du centrosome et participe ainsi à l'assemblage des pôles mitotiques.

II.2 Aurora A régule le complexe cycline B/cdk1

En utilisant un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée sur la thréonine 288 d'Aurora A comme marqueur de son activité, Hirota et ses collaborateurs mettent en évidence la présence d'Aurora A active dans les centrosomes durant la phase G2. D'autre part, l'équipe montre que l'activation du complexe d'Aurora A apparaît avant celle du complexe cycline B/cdk1 et que cette activation est pré requise pour l'activation initiale de cycline B/cdk1 au niveau des centrosomes (Hirota, Kunitoku et al. 2003). L'activation de cdk1 par Aurora A semble être médiée par la phosphorylation de cdc25B sur la sérine 353 au niveau des centrosomes, par Aurora A elle-même (Dutertre, Cazales et al. 2004). La phosphorylation de cdc25B par Aurora A entraîne ensuite la déphosphorylation de cdk1 et son activation (De Souza, Ellem et al. 2000). La protéine Ajuba est un activateur, mais également un substrat d'Aurora A. En effet, la forme phosphorylée d'Ajuba peut interagir avec Aurora A et l'active en phase G2 au niveau des centrosomes en favorisant son autophosphorylation sur la thréonine 288 (Hirota, Kunitoku et al. 2003).
Ainsi l'activation d'Aurora A par Ajuba permet la phosphorylation de cdc25B. Elle participe à l'activation de cdk1 au niveau des centrosomes et est donc un élément important dans la progression vers la mitose.

II.3 Aurora A régule le déroulement de la mitose

Aurora A régule tout d'abord la formation du fuseau de microtubules lors de la mitose. Après la rupture de la membrane nucléaire, Aurora A est impliquée dans l'élongation des extrémités proximales des microtubules par l'intermédiaire de la voie de signalisation Ran. Ran est une petite GTPase impliquée dans le transport nucléocytoplasmique et dans de nombreux phénomènes mitotiques. Ran est lié au GDP dans le cytoplasme des cellules puis, lors de son entrée dans le noyau, le GDP est échangé en GTP par RCC1 (Regulator for Chromosome Condensation 1), protéine associée aux chromosomes. Lors de la formation du fuseau et malgré la rupture de la membrane nucléaire, la protéine RCC1 génère ainsi un gradient de

Ran-GTP. Ran-GTP entraîne la dissociation de l'importine en se liant à la sous unité α de cette dernière. Les facteurs impliqués dans la formation du fuseau, comme TPX2 et NuMA, liés et inhibés par l'importine α/β, sont alors libérés (Clarke and Zhang 2001). La protéine TPX2 interagit avec les microtubules et Aurora A. Cette interaction limite l'effet de PP1 sur Aurora A et permet donc son autoactivation par phosphorylation sur la thréonine 288. Aurora A peut alors phosphoryler ces cibles, TPX2 lui-même mais aussi des protéines engagées dans la formation du fuseau comme Eg5 (Giet, Uzbekov et al. 1999; Cochran, Sontag et al. 2004) ou les protéines D-TACC (Barros, Kinoshita et al. 2005; Kinoshita, Noetzel et al. 2005). Aurora A semble donc importante pour l'établissement du fuseau mitotique.

Aurora A régule également avec Aurora B la condensation des chromosomes. Plusieurs études montrent que ces deux protéines coopèrent pour phosphoryler H3 sur la serine 10 au début de la mitose (Scrittori, Hans et al. 2001; Crosio, Fimia et al. 2002).

De nombreuses études impliquent Aurora B dans l'alignement des chromosomes en plaque métaphasique et dans leur ségrégation. Cependant, Aurora A semble également impliquée dans ces processus. En effet, au niveau des kinétochores, l'histone H3 est remplacée par un variant nommé CENP-A (Choo 2001). L'absence de CENP-A entraîne l'apparition de centromères non fonctionnels et de kinétochores mal localisés (Blower, Sullivan et al. 2002). Ce variant participe donc à l'organisation et à la fonctionnalité des kinétochores. Aurora A phosphoryle de façon spécifique CENP-A en NH2 terminal sur la sérine 7. Cette phosphorylation est indispensable pour l'organisation des microtubules au niveau des kinétochores, et donc pour l'alignement et la ségrégation des chromosomes. La phosphorylation de cette sérine est ensuite maintenue par Aurora B en fin de prophase et jusqu'en métaphase (Kunitoku, Sasayama et al. 2003; Marumoto, Honda et al. 2003). Ainsi, Aurora A coopère avec Aurora B pour l'alignement des chromosomes et pour leur prise en charge par les microtubules.

Aurora A régule également la cytokinèse. Des travaux ont montré que l'introduction d'un anticorps bloquant dirigé contre Aurora A dans les cellules lors de la mitose, après séparation complète des centrosomes et formation du fuseau bipolaire, empêche la division complète et entraîne l'apparition de cellules multinucléées (Marumoto, Honda et al. 2003). De plus, la surexpression d'Aurora A mène également à l'absence de cytokinèse, entraînant la formation de cellules binucléées (Zhang, Hirota et al. 2004). La réduction de la quantité d'Aurora A dans les cellules en fin de mitose est le fruit de sa dégradation par le protéasome APC/C cdh1 (Honda, Mihara et al. 2000). Ainsi, cette dégradation rapide d'Aurora A semble ainsi être

importante dans la séparation des deux cellules filles. La figure 20 qui suit présente les différents substrats et régulateurs d'Aurora A.

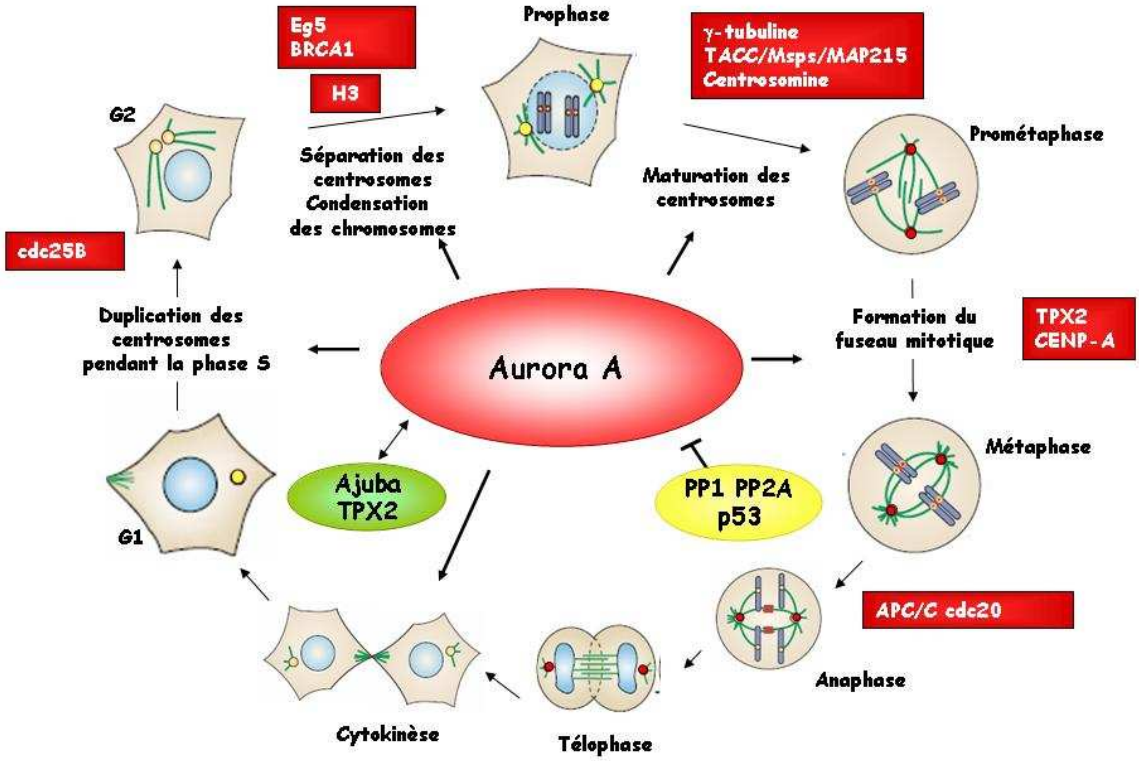


Figure 20 : Fonctions et régulateurs d'Aurora A.
Aurora A régule l'activation du complexe cycline B/cdk1 en phosphorylant la phosphatase cdc25B. Elle participe peu à la duplication des centrosomes, mais régule leur séparation. La phosphorylation de H3 sur la sérine 10 par Aurora A permet d'initier la condensation des chromosomes. La maturation des centrosomes est également assurée par Aurora A et permet notamment le recrutement de la centrosomine et la γ-tubuline. Elle participe aussi à l'émergence des microtubules des centrosomes grâce à l'activation de D-TACC et au recrutement des protéines associées aux microtubules. Aurora A régule la formation du fuseau mitotique grâce à TPX2 et la séparation des chromatides sœurs en phosphorylant CENP-A au niveau des centromères. Enfin, la dégradation d'Aurora A lors de la cytokinèse permet la séparation des deux cellules filles.

La kinase Aurora A, activée dans un premier temps par Ajuba, est localisée au niveau des centrosomes et des microtubules proximaux émanant de ce dernier. Aurora A constitue un activateur clé de la transition G2/M, elle phosphoryle et active en effet cdc25B responsable de l'activation de cycline B/cdk1 au niveau des centrosomes. Elle phosphoryle l'histone H3 responsable de la condensation de la chromatine en début de mitose. Elle ne semble pas impliquée directement dans la duplication des centrosomes, mais participe à la séparation de ces derniers. Elle phosphorylerait les protéines liant les centrosomes, comme C-Nap1, favorisant ainsi leur dégradation. Elle régule également l'établissement et le nombre des

fuseaux mitotiques en favorisant la nucléation des microtubules. Enfin, sa dégradation en fin de mitose par APC/cdh1 semble indispensable à la séparation des cellules filles.

III Aurora A, instabilité chromosomique, aneuploïdie et cancer

III.1 Aurora A contrôle la ploïdie des cellules

La plupart des tumeurs solides sont caractérisées par une instabilité chromosomique (CIN) générant une perte ou un gain de chromosomes et à l'apparition de chromosomes altérés. Longtemps présentées comme des événements tardifs de progression des tumeurs, les CIN et l'aneuploïdie pourraient au contraire être impliqués dans le développement de tumeurs pré malignes, notamment dans les cancers du sein, de la vessie et de la prostate (Greene, Taylor et al. 1991; Visscher, Wallis et al. 1996; Krause, Feil et al. 2004). Boveri fut le premier à proposer en 1914 que l'apparition de cellules avec plus de deux centrosomes entraînerait une mauvaise ségrégation des chromosomes, dûe à l'apparition de plusieurs fuseaux mitotiques (McKusick 1985).

En l'absence d'Aurora A, les cellules sont incapables de former un fuseau bipolaire fonctionnel. En effet, son inhibition par introduction d'un RNAi dans les cellules entraîne un arrêt en G2/M, des fuseau anormaux, une tétraploïdisation ainsi que l'induction de l'apoptose (Du and Hannon 2004). Les cellules deviennent tétraploïdes du fait de leur arrêt pendant la mitose avant la cytokinèse. L'arrêt des cellules en G2/M est en fait temporaire, elles entrent en phase G1 avec deux noyaux et deux centrosomes non séparés. En phase G1, elles sont ensuite stoppées par un point de contrôle post-mitotique impliquant p53 et pRb (Di Leonardo, Khan et al. 1997; Lanni and Jacks 1998). Bien que p53 et Rb puissent participer à l'arrêt des cellules en phase G1, le mécanisme impliqué dans cet arrêt du cycle cellulaire reste encore à déterminer. De plus, d'autres auteurs montrent l'existence d'une induction d'apoptose lors d'une tétraploïdie par activation de Bax indépendante ou dépendant de p53. L'activation de Bax entraîne la sortie du cytochrome c de la mitochondrie et le déclenchement de l'apoptose mitotique (Castedo, Coquelle et al. 2006).

La surexpression de la kinase Aurora A mène également à des modifications du nombre de centrosomes et à la tétraploïdie. Dans les cellules HeLa, la surexpression de la protéine fonctionnelle ou sans activité kinase entraîne l'apparition de cellules avec deux noyaux et plusieurs centrosomes (Meraldi, Honda et al. 2002). Cependant, dans d'autres modèles,

l'activité kinase de l'enzyme semble indispensable pour induire la tétraploïdie (Anand, Penrhyn-Lowe et al. 2003). En effet, la surexpression de la protéine inactive dans les MEFs induit un arrêt en G1, avec apparition d'un fuseau mitotique anormal et l'induction de l'apoptose. Lorsque la kinase Aurora A est active, elle phosphoryle p53 sur les sérines 215 et 315, induisant respectivement l'inhibition de son activité transcriptionnelle et sa déstabilisation par mdm2. p53 est alors prise en charge par le système ubiquitine ligase pour être dégradée (Katayama, Sasai et al. 2004; Liu, Kaneko et al. 2004). Ainsi, dans les cellules où la protéine p53 est inhibée par Aurora A, ou absente, le point de contrôle post-mitotique n'est plus fonctionnel, la tétraploïdie des cellules n'est donc pas détectée et les cellules continuent leur progression dans le cycle cellulaire, redupliquent leur ADN et leur centrosome, menant alors à l'aneuploïdie et à l'amplification des centrosomes (Meraldi, Honda et al. 2002; Fujiwara, Bandi et al. 2005).

La surexpression d'Aurora A dans les fibroblastes NIH3T3 ou Rat1 induit bien la transformation des cellules. Lorsque les cellules sont introduites dans des souris nudes, elles induisent la formation de tumeurs. (Bischoff, Anderson et al. 1998; Zhou, Kuang et al. 1998; Littlepage, Wu et al. 2002). L'étude des modèles murins transgéniques surexprimant Aurora A montrent la formation de tumeurs mammaires après un long moment d'attente (Wang, Zhou et al. 2006). L'inactivation de p53 dans ces souris amplifie ce phénotype. Ainsi, la surexpression d'Aurora A est associée à la tumorogenèse et l'inactivation de p53 favorise ce phénomène. L'observation de coupes histologiques de tumeurs hépatiques a permis de confirmer ces résultats et met en évidence la surexpression d'Aurora A corrélée à la présence de TP53, la forme mutée non fonctionnelle de p53 (Jeng, Peng et al. 2004).

III.2 Implication d'Aurora A dans les cancers

III.2.a Surexpression d'Aurora A et amplification des centrosomes

Les kinases Aurora sont surexprimées dans de nombreux cancers. La kinase Aurora A fut mise en évidence pour la première fois comme le produit d'un gène surexprimé dans les cellules de cancer du sein d'où sa première dénomination BTAK. Ce gène est localisé dans la région chromosomique 20q13. Plusieurs observations ont permis de mettre en évidence une amplification de ce gène dans de nombreuses tumeurs primaires de colon, de sein, mais également dans plusieurs lignées cellulaires tumorales de sein, de colon, de l'ovaire, de

prostate et de neuroblastome (Sen, Zhou et al. 1997; Bischoff, Anderson et al. 1998; Zhou, Kuang et al. 1998).

D'autre part, une surexpression de l'ARNm et de la protéine est également détectée; cette augmentation n'est pas forcement corrélée avec l'augmentation du nombre de copies du gène. En effet, dans les carcinomes hépatocellulaires, l'amplification du gène n'est observée que dans 3 % des cas, alors que la surexpression de l'ARNm et de la protéine est retrouvée dans 60 % des tumeurs hépatiques analysées (Jeng, Peng et al. 2004). Il en est de même dans les cancers mammaires, gastriques ou ovariens (Zhou, Kuang et al. 1998; Sakakura, Hagiwara et al. 2001; Gritsko, Coppola et al. 2003). Ainsi, la surexpression d'Aurora A pourrait être régulée par plusieurs mécanismes différents, la suractivation transcriptionnelle, l'amplification génique, mais aussi l'inhibition de la protéolyse. En effet, une étude a permis de mettre en évidence l'interaction de la forme sauvage d'Aurora A au niveau de la phénylalanine 31, avec une ubiquitine ligase. La forme mutée (la phénylalanine est remplacée par une isoleucine) d'Aurora A n'est plus capable d'interagir avec l'ubiquitine ligase laissant alors supposer la diminution de son ubiquitination et la persistance de son activité (Ewart-Toland, Briassouli et al. 2003).

Les observations de cellules en culture montrent qu'Aurora A est uniquement exprimée en phase G2 et pendant la mitose, au niveau des centrosomes et du fuseau mitotique. Contrairement à ces observations, l'analyse des coupes de tumeurs suggère une expression d'Aurora A diffuse dans le cytoplasme des cellules. De plus, aucune liaison d'expression avec une phase précise du cycle cellulaire n'est observée (Tanaka, Kimura et al. 1999; Gritsko, Coppola et al. 2003). Aurora A pourrait donc participer au développement des tumeurs à la fois en surphosphorylant ces substrats et en phosphorylant de manière non spécifique des protéines présentes tout au long du cycle cellulaire ou dans d'autres compartiments subcellulaires que le centrosome.

La surexpression d'Aurora A est souvent associée à l'amplification du nombre de centrosomes (Goepfert, Adigun et al. 2002; Meraldi, Honda et al. 2002; Anand, Penrhyn-Lowe et al. 2003). L'amplification des centrosomes se traduit par une augmentation de la taille des centrosomes due à l'accumulation incontrôlée de ces composants et du matériel péricentriolaire comme la γ-tubuline, la centrosomine, le péricentrine. L'augmentation de l'activité de nucléation des centrosomes est également observée (Lingle, Lutz et al. 1998; Li, Weroha et al. 2004). Cette augmentation peut être le fruit de deux mécanismes distincts, la duplication incontrôlée des centrosomes et l'absence de cytokinèse aboutissant à la formation de cellules multipolaires présentant un risque de développement tumoral.

III.2.b Aurora A comme cible thérapeutique

Des études récentes réalisées dans les cellules Hela et U2OS montrent que l'induction du point de contrôle G2/M par l'étoposide, entraîne un arrêt du cycle cellulaire. De plus, l'utilisation d'inhibiteur d'un RNAi dirigé contre Chk1 entraîne l'activation d'Aurora A. La surexpression d'Aurora A dans ces modèles entraîne l'absence d'arrêt des cellules en phase G2/M. Lors de dommages de l'ADN, Chk1 induit donc l'inhibition directe ou indirecte d'Aurora A permettant aux cellules de stopper leur cycle cellulaire avant la mitose. L'inhibition Aurora A pourrait être un élément important impliqué dans le point de contrôle G2/M contrôlant l'état de l'ADN (Cazales, Schmitt et al. 2005; Krystyniak, Garcia-Echeverria et al. 2006).

D'autre part, une étude réalisée dans les cellules HeLa montre que la surexpression d'Aurora A entraîne une absence d'arrêt des cellules lors de la mitose, malgré l'induction du point de contrôle du fuseau mitotique par le taxol. Les cellules entrent en anaphase malgré la formation de fuseaux anormaux et des kinétochores mal attachés aux microtubules. Cette étude souligne également que la présence de Mad2 au niveau des kinétochores persiste jusqu'en anaphase, montrant l'activation du point de contrôle du fuseau mitotique. Ainsi, il est possible qu'Aurora A perturbe l'interaction entre des protéines du point de contrôle et leur cible cdc20, entraînant alors une activation prématurée d'APC/C, permettant aux cellules de terminer la mitose malgré une mauvaise répartition des chromosomes (Anand, Penrhyn-Lowe et al. 2003).

Une deuxième étude montre également que les cellules dans lesquelles p53 est active et surexprimant Aurora A, passent le point de contrôle du fuseau induit par le nocodazole. Les auteurs montrent qu'Aurora A interagit avec cdc20 et l'active. La phosphorylation de cdc20 par Aurora A décrites par l'équipe de Farrugio pourrait peut-être expliquer cette activation prématurée (Farruggio, Townsley et al. 1999). Cette interaction empêche aussi le recrutement des protéines du point de contrôle du fuseau mitotique comme BubR1 ou Mad2, indépendamment de son activité kinase (Jiang, Zhang et al. 2003).

Une troisième étude montre que les cellules surexprimant Aurora A deviennent résistantes à l'induction de l'apoptose dépendante du taxol, supposant alors l'implication d'Aurora A dans les phénomènes de résistance au traitement des tumeurs (Anand, Penrhyn-Lowe et al. 2003).

La figure 21 qui suit illustre l'implication d'Aurora A dans ces différents mécanismes, et dans le développement des tumeurs.

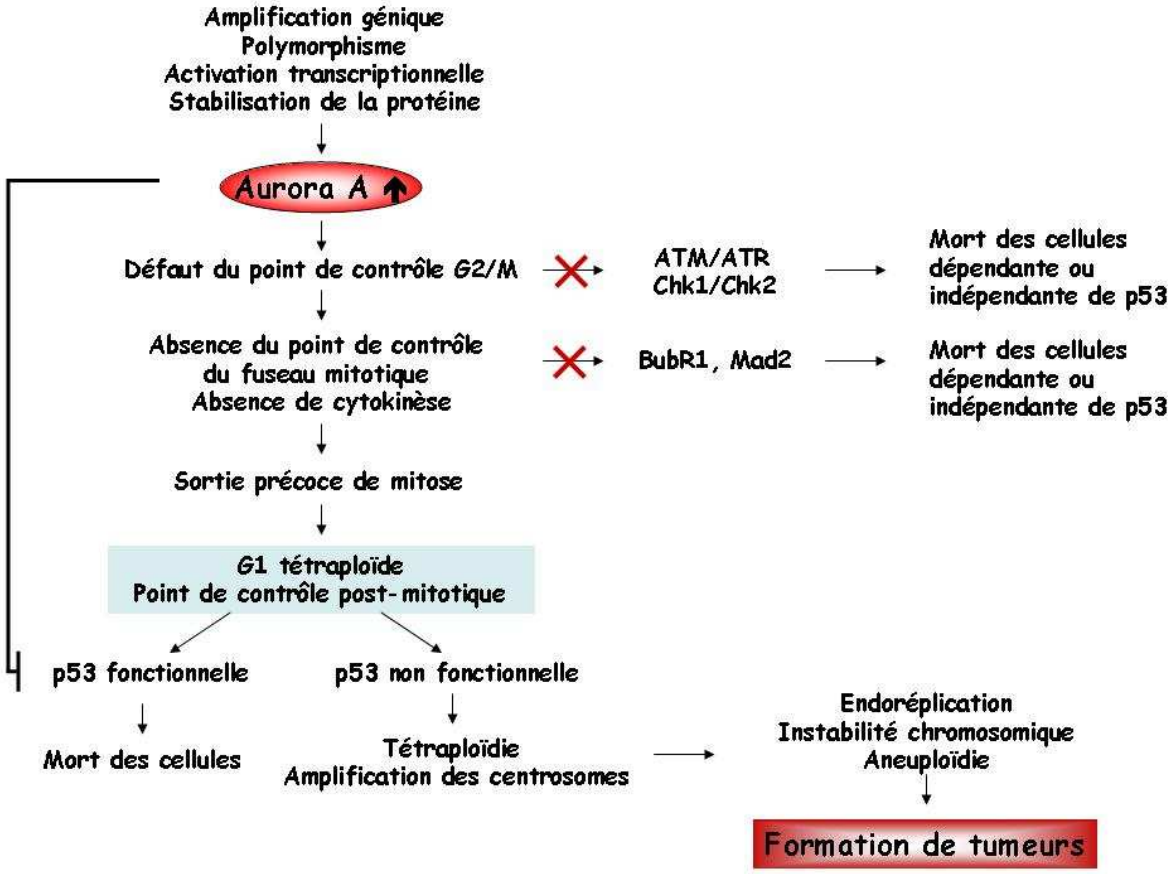


Figure 21 : Implication de la surexpression d'Aurora A dans la tumorogenèse.
L'augmentation d'Aurora A par amplification de son gène, l'augmentation de sa régulation transcriptionnelle, la stabilisation de la protéine ou la présence d'un polymorphisme, entraîne l'absence d'arrêt des cellules lors du point de contrôle de l'état de l'ADN, du point de contrôle du fuseau mitotique ainsi que l'absence de division des cellules. Cette augmentation est associée à l'apparition de cellules tétraploïdes. Si la protéine p53 est active, elle initie normalement l'arrêt des cellules ainsi que l'induction de leur mort par la voie dépendante de Rb. Cependant, Aurora A inactive par phosphorylation p53, rendant alors impossible l'activation de cette voie. De plus, la plupart des tumeurs présentent une inactivation de la protéine p53 entraînant alors l'absence de mort des cellules. Les cellules sont alors tétraploïdes, multipolaires, endorépliquent leur ADN, menant à l'instabilité chromosomique et à la formation de tumeurs (Marumoto, Zhang et al. 2005).

Aurora A semble donc impliquée à la fois dans le point de contrôle de l'état de l'ADN et dans le point de contrôle de l'attachement des chromosomes au fuseau mitotique. De plus, la surexpression d'Aurora A dans les cellules présentant des dommages de l'ADN entraîne une absence d'induction de ces différents points de contrôle. Elle semble également être impliquée dans les phénomènes de résistance aux traitements des cellules tumorales. Ainsi l'inhibition d'Aurora A pourrait constituer une bonne cible thérapeutique, et permettrait de restituer la mort cellulaire induite par les différents points de contrôle.

III.2.c Aurora A, polymorphisme, diagnostic et thérapie antitumorale

L'expression d'Aurora A dans de nombreux cancers, et son implication dans la modulation de nombreux points de contrôle du cycle cellulaire, en font donc une cible de développement pour les traitements antitumoraux. Des inhibiteurs ont été développés, le ZM447439, l'Hesperadine et enfin le VX-680 (Ditchfield, Johnson et al. 2003; Hauf, Cole et al. 2003; Harrington, Bebbington et al. 2004). Ces trois molécules ne sont pas spécifiques de la protéine Aurora A mais ciblent de façon plus large l'ensemble des protéines kinases de la famille Aurora. Ces molécules inhibent l'activité kinase de la protéine en se fixant à la place de l'ATP dans le site catalytique de l'enzyme.

Les cellules traitées avec l'Hesparadine et le ZM447439 présentent une absence de phosphorylation de H3 sur la sérine 10, les chromosomes se condensent et les kinétochores s'attachent aux microtubules du fuseau mitotique en formation. Les cellules sortent cependant prématurément de la mitose en présentant un défaut d'attachement des chromosomes aux microtubules, et une absence d'alignement des chromosomes en plaque métaphasique. Les cellules présentent de plus un point de contrôle du fuseau mitotique endommagé avec une mauvaise localisation de Bub1 et BubR1, et une inhibition de la phosphorylation de BubR1 en présence de ZM447439 (Ditchfield, Johnson et al. 2003; Hauf, Cole et al. 2003). L'effet du VX-680 sur la mitose n'a pas été décrit, il semble cependant être le plus prometteur de ces inhibiteurs. Il permet en effet la régression de tumeurs induites dans les souris nudes et semble le mieux démontrer que les kinases Aurora pourraient être de bonnes cibles thérapeutiques (Harrington, Bebbington et al. 2004; Harrington, Bebbington et al. 2007).

Plusieurs études génétiques ont mis en évidence l'existence de deux polymorphismes au niveau du gène d'Aurora A, notamment au niveau de la phénylalanine 31, Phe31Ile (91T>A) et de la valine 57 Val57Ile (169G>A). Ces mutations se localisent dans la partie NH2 terminale non catalytique de l'enzyme. La mutation Phe31Ile se localise dans une région comprenant la séquence KEN régulant la dégradation de la protéine. La mutation Val57Ile se localise dans une région comprenant la séquence A régulant également la destruction d'Aurora A par le protéasome mais participant également à sa localisation au sein des centrosomes (Honda, Mihara et al. 2000; Pfleger and Kirschner 2000) (Dutertre, Descamps et al. 2002).

L'effet de ces mutations sur la structure, l'activité ou encore l'altération des cibles de la kinase est peu connu. Une étude portant sur la mutation Phe31Ile montre que la forme mutée de la kinase, Ile31, présente une capacité de transformation des cellules Rat1 et U2OS plus

importante que la kinase Aurora A sauvage. L'équipe identifie également une ubiquitine ligase UBE2N capable d'interagir avec la forme sauvage d'Aurora A Phe31 au niveau des centrosomes durant la mitose. Le rôle de cette interaction reste encore à élucider, néanmoins, la mutation Ile31 de la kinase déplace l'ubiquitine UBE2N des centrosomes vers le cytoplasme. Ainsi, la mutation d'Aurora A pourrait donc augmenter sa capacité à induire des tumeurs chez des patients, en empêchant la fixation de l'ubiquitine UBE2N sur la kinase au niveau des centrosomes (Ewart-Toland, Briassouli et al. 2003). Une étude montre également que la forme mutée d'Aurora A Ile 31 potentialise la transformation des cellules induites par Ras que la forme sauvage (Tatsuka, Sato et al. 2005).

La mutation de la phénylalanine 31 en isoleucine est retrouvée préférentiellement dans les tumeurs du colon et des ovaires, la présence des deux polymorphismes de manière constitutionnelle se traduit par une augmentation du risque de cancer du sein (Ewart-Toland, Briassouli et al. 2003; Dicioccio, Song et al. 2004; Egan, Newcomb et al. 2004) mais également du cancer de l'œsophage et du cancer gastrique (Miao, Sun et al. 2004; Kimura, Mori et al. 2005; Ju, Cho et al. 2006). La surexpression d'Aurora A semble être corrélée, pour certains auteurs, avec le stade histologique de la tumeur. Plusieurs études indiquent que la surexpression d'Aurora A est associée avec des tumeurs de haut grade et un faible pronostic (Miyoshi, Iwao et al. 2001; Jeng, Peng et al. 2004). Cependant d'autres études assurent que la surexpression et l'activation de la protéine sont au contraire plus fréquemment détectées lors de stades précoces de cancer de l'ovaire chez l'Homme (Gritsko, Coppola et al. 2003). Aurora A ne semble pas également être un bon marqueur pronostic (Neben, Korshunov et al. 2004; Royce, Xia et al. 2004). D'autres travaux montrent que la surexpression d'Aurora A et la présence de p53 mutée constituent un plus mauvais pronostic que la présence des formes mutantes de p53 seule (Jeng, Peng et al. 2004).

III.2.d Les nouvelles voies de régulation impliquant Aurora A

Des études récentes impliquant Aurora A dans de nouvelles voies de signalisation ont été mises en évidence. Ainsi, dans les cellules tumorales pancréatiques, Aurora A serait une des cibles transcriptionnelle activées par la voie des MAPK. L'activation constitutive de la voie Ras/MAPK, dans les tumeurs porteuses d'une mutation de K-Ras sur le codon 12, pourrait être à l'origine de l'augmentation d'expression d'Aurora A retrouvé dans ce cancer (Furukawa, Kanai et al. 2006). D'autre part, dans le cancer des voies hautes supérieures, la

surexpression d'Aurora A potentialise la transformation des cellules exprimant H Ras. L'équipe montre également que la mutation d'Aurora A Ile31 présente un potentiel transformant supérieur à la forme sauvage d'Aurora A (Tatsuka, Sato et al. 2005). Enfin, dans une forme du cancer de la vessie, la surexpression d'Aurora A serait associée à la mutation de H Ras sur le codon 12 (Tseng, Tzeng et al. 2006). Ainsi, la voie de signalisation impliquant Ras pourrait être à l'origine de la surexpression d'Aurora A.

La kinase Aurora A est donc une protéine centrale pour le déroulement de la mitose. D'autre part, elle est surexprimée dans de nombreux cancers, et sa surexpression est souvent associée à l'apparition de cellules aneuploïde et multinucléées. Malgré les controverses existant sur l'activité oncogénique d'Aurora A, elle est directement impliquée dans l'activation de la mitose et permet l'activation du complexe cycline B/cdk1 au sein des centrosomes, elle régule également la séparation des centrosomes, le nombre de pôles et de fuseaux mitotiques formés. Elle est aussi associée à la cytokinèse, puisque sa dégradation entraîne la séparation des cellules filles en fin de mitose. D'autres études semblent également directement l'impliquer dans le contrôle de l'état de l'ADN en phase G2/M du cycle cellulaire et dans le contrôle du fuseau mitotique. De plus, la surexpression de cette protéine dans de nombreux cancers peut être associée à la résistance aux traitements des cellules tumorales.
Ainsi la surexpression d'Aurora A dans les cancers pourrait être à l'origine de l'apparition de tumeurs présentant des cellules aneuploïdes, multinucléées, et multipolaires, qui sont caractéristiques d'une forte instabilité chromosomique.

Chapitre III : Thérapie anti-tumorale

I Le cancer colorectal, épidémiologie et traitement

En France, les cancers représentent la première cause de mortalité chez l'homme et la deuxième chez la femme après les maladies cardiovasculaires. Avec 36 000 nouveaux cas par an, le cancer colorectal est la deuxième cause de décès par cancer tout sexe confondu. A lui seul il représente 15% des cancers diagnostiqués, et est responsable chaque année de 16 000 décès (Hill and Doyon 2006).

La carcinogenèse colorectale est associée à l'apparition séquentielle de nombreuses mutations au sein des gènes clés régulant l'homéostasie de la cellule, et à l'établissement d'une instabilité génomique microsatellite (MSI) ou chromosomique (CIN). Les cancers colorectaux présentent de façon exclusive l'un ou l'autre de ces phénotypes (Lengauer, Kinzler et al. 1998; Loeb, Loeb et al. 2003). L'instabilité chromosomique toucherait 80 à 85% des cancers colorectaux sporadiques tandis que les MSI seraient plutot associées avec les cancers héréditaires sans polypes du colon HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer) (Bronner, Baker et al. 1994) et représenteraient seulement 10 à 15% des cancers sporadiques (Boland, Thibodeau et al. 1998).

Seule la chirurgie permet une rémission complète des patients atteints de cancers colorectaux, par exérèse de la tumeur et des ganglions lymphatiques voisins. Cependant, dans plus de la moitié des cas, le cancer colorectal est détecté trop tardivement, et est localement avancé ou présente des métastases rendant alors inefficace la chirurgie (Lelong, Moutardier et al. 2004). La chimiothérapie lui est donc associée, la radiothérapie étant uniquement réservée aux cancers du rectum. Une chimiothérapie néo adjuvante est administrée avant la chirurgie afin de diminuer la masse tumorale lorsque celle-ci est trop importante. Une chimiothérapie adjuvante est réalisée après chirurgie et/ou radiothérapie lors des cancers localement avancés afin de traiter les éventuelles métastases non détectables (Giacchetti, Itzhaki et al. 1999; Midgley and Kerr 1999; Simmonds 2000).

Le traitement de référence des cancers colorectaux est le 5 Fluoro-Uracile (5FU) qui constitue un inhibiteur de la thymidylate synthase, enzyme participant à la synthèse du nucléotide thymidine. Il est associé à la leucovorine (5FU/LV), agent bio modulant favorisant les effets du 5FU. Le 5FU/LV est généralement administré avec d'autres molécules chimiques, comme

l'acide folinique ou l'oxaliplatine. Malgré leur grande utilisation, l'efficacité de ces molécules reste modérée. Le taux de réponse au 5FU varie de 10 à 30% (Shah and Schwartz 2001). De plus, ces traitements sont associés avec plusieurs toxicités de grade important III/IV. Les plus fréquentes sont les neutropénies, thrombopénies, anémies, diarrhées et vomissements pouvant entraîner, dans les cas les plus graves, la mort du patient. Avant l'arrivée de traitements plus efficaces, le 5FU/LV en combinaison avec d'autres molécules fut le traitement de base des cancers colorectaux métastatiques pendant plus de 40 ans (Mayer 2000).

II Inhibitions des topoisomérases I

II.1 Les topoisomérases I

Les ADN topoisomérases sont des enzymes qui modifient la structure de l'ADN en générant des coupures transitoires dans l'ADN. Elles jouent un rôle essentiel lors de nombreuses étapes de la vie cellulaire (réplication, transcription, séparation des chromosomes, etc). En fonction de leur mode de coupure, les topoisomérases ont été classées en deux groupes : les ADN topoisomérases de type I (monomériques, ATP indépendantes) qui coupent un seul des deux brins de la double hélice d'ADN ; les topoisomérases de type II (multimériques, ATP dépendantes) qui réalisent une coupure double brin de l'ADN.

Les topoisomérases 1 interviennent pour la relaxation des superenroulements de l'ADN générés lors de la réplication et de la transcription (Bullock, Champoux et al. 1985; Cheng, Kussie et al. 1998). L'avancée des complexes protéiques associés à l'ADN lors de la réplication ou de la transcription nécessite l'ouverture locale et temporaire de la double hélice. Les extrémités de l'ADN sont fixées à la matrice nucléaire empêchant alors toute rotation autour de son axe et l'ADN ne peut alors compenser seul les tensions induites. Les ADN topoisomérases 1 soulagent alors les contraintes de torsion engendrées par ces superenroulements. Du fait de leur implication dans de nombreux processus biologiques, les topoisomérases 1 sont essentielles à tous les organismes vivants, et leur inactivation chez la souris ou la drosophile sont létales (Morham, Kluckman et al. 1996; Zhang, Chen et al. 2000).

Les topoisomérases agissent en aval de l'activité hélicase (permettant l'ouverture du double brin d'ADN) et contribuent au déroulement des brins. Le mécanisme enzymatique des topoisomérases 1 peut être divisé en plusieurs étapes. L'enzyme se lie tout d'abord de façon covalente à l'ADN double brin, puis elle coupe l'un des deux brins par transestérification, et

se lie à l'extrémité 3' de l'ADN ainsi générée. L'ADN simple brin subit alors une rotation libre autour du brin non coupé permettant la relaxation de l'ADN. Pour finir, afin de relier les deux brins d'ADN, l'enzyme réalise une réaction de transestérification (Wang 1996). La figure 22 suivante illustre le fonctionnement des topoisomérases de type 1.

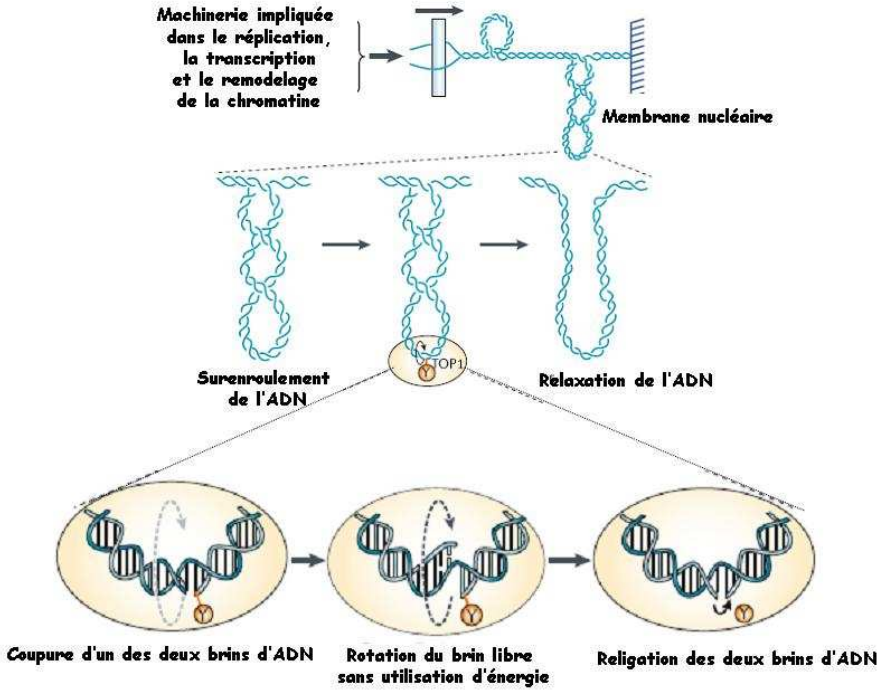


Figure 22 : Mode d'action des topoisomérases de types 1.
(Pommier 2006).

II.2 Les inhibiteurs de topoisomérases I

Les inhibiteurs de topoisomérases sont aujourd'hui un traitement standard de plusieurs pathologies malignes. Les inhibiteurs de topoisomérases I sont des dérivés des camptothécines issus d'une plante se developpant en Chine et au Tibet (*Camptotheca acuminata*) (Kunimoto, Nitta et al. 1987). Ils sont largement utilisés, le plus souvent en seconde ligne de traitement contre des cancers multirésistants.

L'irinotecan est un dérivé des camptothécines et est principalement utilisé dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques. Cet agent cytotoxique présente un métabolisme extrêmement complexe du fait d'un grand nombre d'enzymes impliquées dans son activation et son élimination. Différentes études montrent que la majeure partie de ces réactions enzymatiques se déroule dans le foie. L'irinotecan, ou CPT-11, subit dans un premier temps une bioactivation par des carboxyestérases pour former le sn38. Le sn38, considéré comme

responsable de l'activité biologique, est cent à mille fois plus actif que le CPT-11. Cependant, seul un faible pourcentage de CPT-11 est converti en sn38, environ 2 à 5 %, le reste est rapidement dégradé (Kawato, Aonuma et al. 1991).

Il est le plus souvent administré en combinaison avec l'analogue de base, le 5FU. En effet, des études cliniques montrent que son administration avec du 5FU augmente le taux de réponse objectif des tumeurs au traitement. De plus, la médiane de survie des patients est plus longue et le risque de décès est diminué lors d'un traitement alliant à la fois l'irinotecan et le 5FU comparé au 5FU seul (Douillard, Cunningham et al. 2000; Saltz, Cox et al. 2000). L'irinotecan peut également être administré seul en première ligne de traitement lorsque les patients ne tolèrent pas le 5FU (Ychou, Raoul et al. 2002). Le taux de réponse des patients atteints de cancer colorectal métastatique traités par de l'irinotecan est cependant modéré (25 %,) et la médiane de survie de ces patients ne dépasse pas 12 mois (Garcia-Carbonero and Supko 2002).

D'autres études évaluent également l'efficacité de l'oxaliplatine dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques. Ainsi, une étude dans laquelle la combinaison de l'oxaliplatine et du 5FU est utilisée, montre l'augmentation de l'efficacité du traitement par rapport au traitement 5FU seul (Grothey and Goetz 2004).

II.3 Les thérapies ciblées associées aux inhibiteurs de topoisomérases

L'introduction de nouvelles molécules thérapeutiques permet aujourd'hui d'améliorer l'efficacité du traitement du cancer colorectal métastatique. Ces nouvelles thérapies introduisent des molécules ciblant plus particulièrement l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). En effet, l'EGFR est une cible potentielle pour le traitement des tumeurs solides. Son activation est associée à la prolifération et à la progression tumorale. De plus son expression est détecté dans de nombreuses tumeurs, et 25 à 77 % des tumeurs colorectales expriment l'EGFR (Herbst and Shin 2002). Bien que l'implication de son expression semble être modérée dans sa valeur pronostic pour le traitement des cancers colorectaux (Nicholson, Gee et al. 2001), l'amplification du gène de l'EGFR ainsi que des mutations et des dérégulations de sa voie de signalisation sont cependant rapportées dans de nombreuses tumeurs malignes. Deux types de molécules sont développés, les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs des tyrosines kinases. Les anticorps monoclonaux ciblent le domaine extracellulaire du récepteur, tandis que les inhibiteurs des tyrosines kinases constituent de petites molécules inhibant les domaines intracellulaires.

Récemment approuvé dans le traitement en monothérapie ou en association avec l'irinotecan des cancers colorectaux métastatiques résistants à l'irinotecan (Cunningham, Humblet et al. 2004), le cetuximab (Erbitux) est l'anticorps monoclonal humanisé dont l'étude reste la plus avancée. En effet une étude clinique européenne de phase II a permis de montrer l'intérêt de l'utilisation de cet anticorps en combinaison avec l'irinotecan par rapport à un traitement comportant uniquement cet anticorps. Le traitement irinotecan coupplé au cetuximab induit un taux de réponse global de 22,9 % contre 10,8 % avec le cetuximab en monothérapie. La médiane de survie est également amélioré et passe de 6,9 mois pour le cetuximab seul à 8,6 mois (Cunningham, Humblet et al. 2004). Le cetuximab est également indiqué dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques réfractaires au traitement par irinotecan et oxaliplatine (Lenz, Van Cutsem et al. 2006).

Le cetuximab empêche la fixation de l'ensemble des ligands et la dimérisation du récepteur (Goldstein, Prewett et al. 1995; Li, Schmitz et al. 2005). Il induit également l'internalisation et la dégradation du récepteur aboutissant à sa diminution d'expression à la surface des cellules. Le cetuximab inhibe de façon dose dépendante la prolifération cellulaire de plusieurs lignées cellulaires tumorales, ainsi que de différentes xénogreffes. Pour cela, il bloque les cellules en phase G1 du cycle cellulaire, permet l'induction du programme apoptotique et inhibe l'angiogenèse (Kim, Khuri et al. 2001). Il bloque également le transport de l'EGFR jusque dans le noyau, empéchant alors l'activation du système de réparation comme DNA-PK (Dittmann, Mayer et al. 2005). En effet, l'EGFR favorise la réparation des cassures de l'ADN induite par les traitements de chimiothérapie (Friedmann, Caplin et al. 2006). Actuellement les gènes impliqués ne sont pas clairement définis mais plusieurs gènes du système de réparation NER, comme ERCC1, ou du NHEJ comme les DNA-PKcs, semblent être impliqués (Szumiel 2006). D'autre part, le cetuximab est une IgG1 et active la réponse immunitaire cytotoxique dépendante des anticorps améliorant ainsi son efficacité dans la destruction des cellules tumorales (Mellstedt 2003). D'autres anticorps monoclonaux sont actuellement en essai clinique de phase II/III dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques, comme le panitumumab et le matuzumab. Le plus étudié est le panitumumab, il inhibe comme le cetuximab la liaison du ligand sur le récepteur et entraîne l'internalisation du récepteur et empêche l'activation des domaines tyrosine kinase. Cependant, l'internalisation du récepteur n'est pas suivie de sa dégradation et cet anticorps humain n'induit pas de réaction immunologique (Yang, Jia et al. 2001).

D'autres traitements combinant à la fois le cetuximab et l'irinotecan avec ou sans bevacizumab (Avastin), sont actuellement évalués dans des essais cliniques européens de

phase II. Le bevacizumab est un anticorps dirigé contre le VEGF, protéine impliquée dans l'angigenèse. Une étude précédente, portant sur un nombre restreint de patients résistants au traitement par irinotecan et oxaliplatine et présentant une faible expression de l'EGFR, montre que les pateints traités par irinotecan couplé au cetuximab présentaient une forte inhibition du taux de VEGF circulant. Le traitement avec le cetuximab inhiberait également l'angiogénèse induite dans l'environnement tumoral expliquant l'efficacité de ce traitement, y compris chez des patients où l'EGFR n'est pas exprimé par les cellules tumorales (Vincenzi, Santini et al. 2006). Les premiers résultats semblent encourageants et indiquent que l'utilisation du bevacizumab en combinaison avec le cetuximab et l'irinotecan, est plus efficace que cetuximab/irinotecan seul.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats montre que les traitements combinés sont très certainement l'avenir du traitement du cancer colorectal métastatique. Cependant, malgré leur efficacité, le mode d'action de ces nouvelles thérapies ciblées est actuellement mal compris.

II.4 Conséquences de l'inhibition des topoisomérases 1

L'irinotecan s'associe avec le complexe de clivage ADN/topoisomérase 1. Ce complexe dit ternaire empêche la religation des brins coupés et la libération de l'enzyme générant alors une cassure simple brin de l'ADN. 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 toxicité du sn38 n'apparaît qu'au moment de la phase S lors de la réplication de l'ADN. Ainsi, la génération des cassures simples brins et la collision des fourches de réplication avec les complexes ternaires sont responsables de l'inhibition de la prolifération cellulaire (Carboni and Coderoni 1994). La réplication est irréversiblement stoppée. Elle s'accompagne du décrochage de la machinerie réplicationnelle et de la génération de cassures doubles brins (Strumberg, Pilon et al. 2000) (Pommier 2006).

Les topoisomérases de types 1 sont également impliquées dans la régulation de la transcription. Elles éliminent les supertours générés lors de l'élongation. Elles diminuent également l'initiation de la transcription en interagissant avec TFIID indépendamment de son activité sur la topologie de l'ADN (Rossi, Labourier et al. 1996). Elles joueraient également un rôle de cofacteur dans l'épissage des ARNm (Soret, Gabut et al. 2003). De la même manière que lors de la réplication, la formation du complexe ternaire induit l'arrêt de la transcription en cours (Mao, Sun et al. 2000; Desai, Zhang et al. 2003). Ainsi, l'inhibition des topoisomérases de type 1 pourrait à la fois altérer la transcription et la réplication en générant

des cassures simples et doubles brins. La cellule ne tolère pas la présence de ces cassures au sein de la molécule d'ADN, il existe donc des systèmes permettant la détection et la réparation de ces lésions.

III Réponses au traitement

III.1 Détection des cassures : le système ATR/ATM

Lors de l'induction de dommages de l'ADN, une voie de signalisation s'organise au sein de la cellule. La première étape implique la détection de la lésion, puis le signal est transmis aux transducteurs via des médiateurs.

Bien que les détecteurs des cassures de l'ADN ne soient pas encore tous identifiés, de nouvelles avancées ont été réalisées dans la compréhension de l'activation du point de contrôle de l'état de l'ADN. Les protéines ATR/ATM (Ataxia Telangiectasia and RAD3 related/Ataxia Telangiectasia Mutated) sont des kinases essentielles à l'activation de ce point de contrôle ainsi qu'à l'induction des systèmes de réparation ou l'apoptose. La figure 23 illustre l'activation de ces différentes protéines lors de cassures de l'ADN.

ATM est une protéine de 350 kDa appartenant à la famille des PIKKs (Phosphatidil-Inisitol 3 Kinase like Kinase). La mutation de cette protéine chez l'Homme, se traduit par le développement d'une maladie, l'ataxia telangiectasia. Cette maladie, autosomique récessive, se caractérise par une dégénérescence cérébrale, une immunodéficience et une instabilité génétique ainsi qu'une prédisposition aux cancers (Shiloh 1997). Les cellules n'exprimant pas ATM sont viables, les patients et les souris présentant cette mutation survivent, indiquant que cette protéine n'est pas indispensable au cycle normal des cellules, ainsi qu'à leur différentiation (Shiloh and Kastan 2001). En condition physiologique, l'activité de la kinase est peu détectable, elle augmente en revanche lors de l'induction de cassures double brin. Cette réponse rapide semble être dûe à une modification de la topologie de l'ADN au site de la lésion. La phosphorylation intramoléculaire sur la sérine 1981 se traduit par la dissociation des dimères d'ATM. Elle permet également aux monomères d'interagir avec d'autres protéines au site même de la lésion (Bakkenist and Kastan 2003). Chk2 est une des protéines activées au site de la cassure par ATM et est rapidement exportée du noyau (Lukas, Falck et al. 2003). ATM peut également interagir avec d'autres protéines comme BRCA1, Nbs1

(Nijmegen breakage syndrome 1), ou encore p53 (Banin, Moyal et al. 1998; Canman, Lim et al. 1998; Cortez, Wang et al. 1999; Lim, Kim et al. 2000).

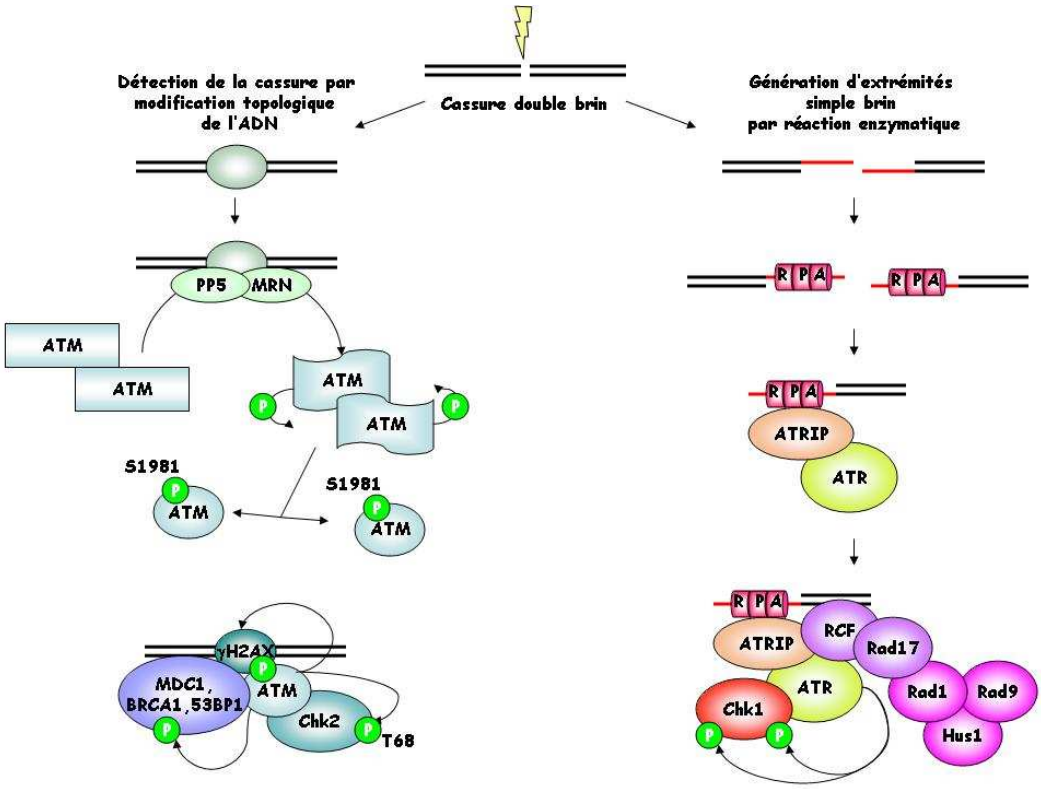


Figure 23 : Activations distinctes des kinases ATM/ATR lors de dommages de l'ADN induisant des cassures doubles brins.

Les cassures doubles brins entraînent l'autophosphorylation d'ATM et son activation. ATM phosphoryle ensuite ces cibles et les active, notamment Chk2. Parallèlement, l'action de divers nucléases peut entraîner la résection d'une des extrémités de la cassure entraînant alors l'apparition de cassures simples brins et permettant l'activation de la voie de signalisation impliquant ATR. Les extrémités simples brins sont stabilisées pas les protéines RPA favorisant le recrutement des dimères ATR/ATRIP. Le recrutement d'autres médiateurs comme Rad1-Rad8-Hus1 permet l'activation de Chk1 (Bartek, Lukas et al. 2004).

Au contraire d'ATM, les souris déficientes pour ATR meurent prématurément au cours de l'embryogenèse (Brown and Baltimore 2000). La mutation de ce gène entraîne une perte partielle d'activité de l'enzyme, également retrouvée chez des patients porteurs du Seckel syndrome (O'Driscoll, Ruiz-Perez et al. 2003). Comme ATM, ATR est capable de phosphoryler des résidus serines et thréonines au sein d'un motif SQ/TQ (Ali, Zhang et al. 2004). Cependant aucune modification de l'activité kinase de ATR n'est observée lors de l'induction de dommages de l'ADN, suggérant plutôt une relocalisation cellulaire de la protéine (Barr, Leung et al. 2003). ATR est impliquée dans la détection des cassures simples brins mais les cassures doubles brins peuvent aussi l'activer. En effet, un raccourcissement

d'une des extrémités de la cassure double brin peut-être observé aboutissant à la formation d'extrémités simple brin au niveau de l'ADN. Les brins libres sont alors pris en charge et recouverts par la protéine RPA (Replication protein A). Cette protéine permettrait ensuite le recrutement des protéines ATR via la fixation d'hétérodimères ATRIP-ATR (ATR Interacting Protein) (Zou and Elledge 2003). Le recrutement d'autres médiateurs permettrait la phosphorylation des substrats d'ATR et l'activation du point de contrôle par l'intermédiaire de Chk1 (Zou and Elledge 2003). La figure qui suit illustre l'activation de façon distincte des protéines ATM et ATR.

Malgré l'absence de données sur les systèmes permettant la détection des dommages de l'ADN, les kinases ATM/ATR apparaissent comme les protéines clés de la transduction du signal et activent différentes voies de signalisation. Les protéines Chk1 et Chk2 sont les effecteurs de ces réponses.

III.2 Activation du point de contrôle : Chk1/Chk2

Les protéines Chk1 et Chk2 sont des protéines sérine/thréonine kinases activées lors de dommages de l'ADN découvertes chez la levure (Walworth, Davey et al. 1993; Murakami and Okayama 1995). Elles sont toutes deux activées par les kinases ATM/ATR.

En réponse aux cassures doubles brins ATM phosphoryle Chk2, dans son domaine de régulation localisé en N terminal, sur la thréonine 68. Cette phosphorylation entraîne l'homodimérisation et l'autophosphorylation de Chk2.

Chk1 est un substrat à la fois pour ATR mais également pour ATM. Ces deux protéines ciblent les sérines 317 et 345 de Chk1, entraînant l'activation directe de cette dernière. D'autres facteurs régulent également son activation optimale comme, BRCA1 (Yarden, Pardo-Reoyo et al. 2002), la claspine (Kumagai and Dunphy 2000) ou encore le complexe Rad9-Rad1-Hus1 et Rad17 (Weiss, Matsuoka et al. 2002; Zou, Cortez et al. 2002).

Ces deux protéines régulent toutes deux des processus communs, comme la réplication (Syljuasen, Sorensen et al. 2005; Liu, Barkley et al. 2006), la réparation, ou le remodelage de la chromatine (Groth, Lukas et al. 2003; Krause, Jonnalagadda et al. 2003). Afin de permettre la propagation rapide du signal à partir du site de la lésion aux autres protéines du point de contrôle, la protéine Chk2 est redistribuée dans tout le noyau après son activation, et elle ne s'accumule pas au niveau des foci de l'ADN, ce qui la distingue de Chk1 (Lukas, Falck et al. 2003; Lukas, Lukas et al. 2004).

Les protéines ATM/ATR sont donc des transducteurs essentiels de la réponse aux dommages de l'ADN. Les protéines Chk1 et Chk2 sont les effecteurs de leur réponse.

III.3 Conséquences de l'activation de la voie ATM/ATR et Chk1/Chk2

La figure 24 qui suit récapitule l'ensemble des conséquences de l'activation de la voie ATM/ATR, Chk1/Chk2. Elle induit ainsi l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose mais également l'activation des systèmes de réparation, le remodelage de la chromatine et l'arrêt de la réplication qui ne seront pas développés ici.

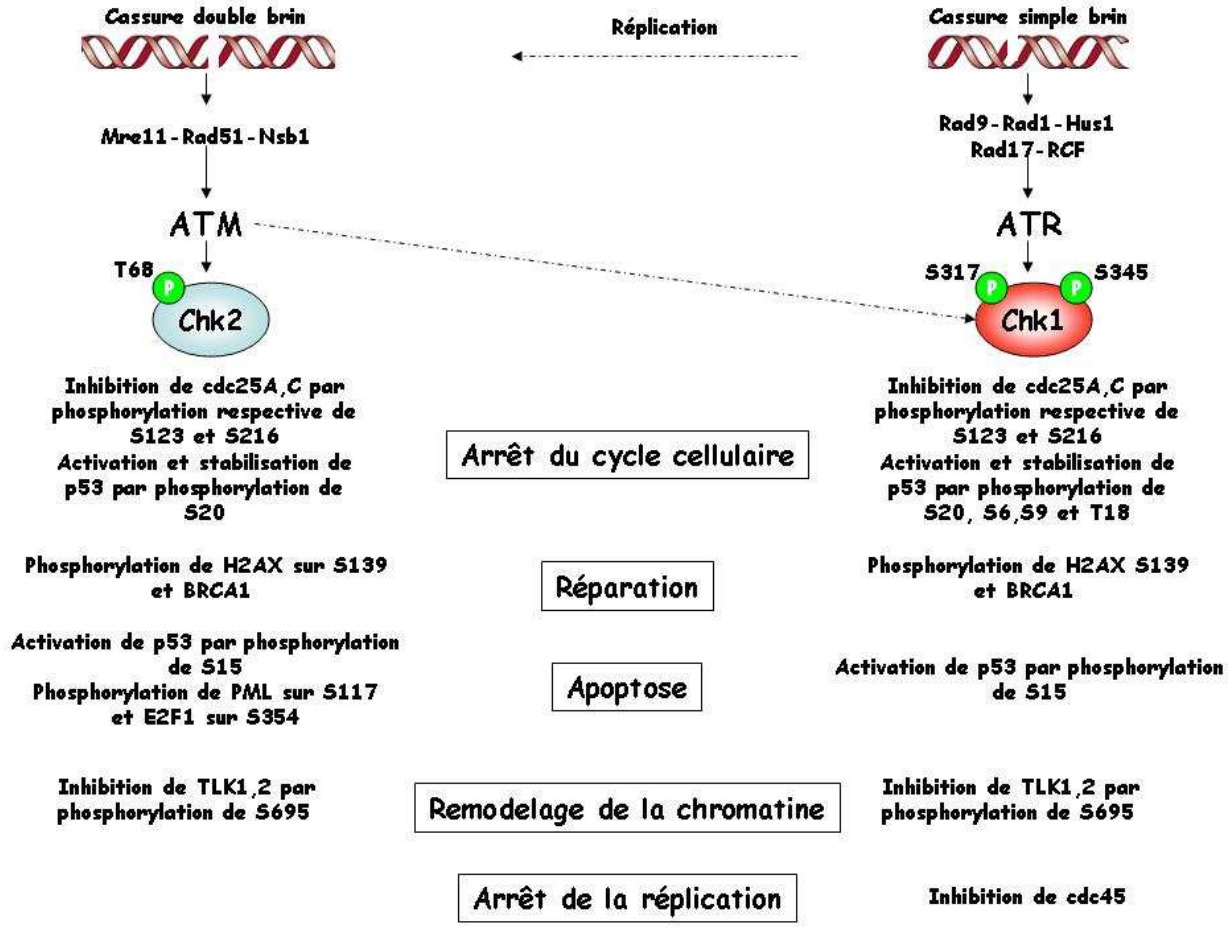


Figure 24 : Activation de la voie ATM/ATR, Chk1/Chk2 et ses conséquences.
Les dommages survenant sur la molécule d'ADN entraînent l'arrêt du cycle cellulaire, de la réplication, et du remodelage de la chromatine. Ils induisent parallèlement l'activation de la réparation et de l'apoptose. (S, sérine), (Zhou and Bartek 2004).

III.3.a Arrêt du cycle cellulaire

Les protéines Chk1, Chk2 et ATM/ATR sont étroitement impliquées dans la réponse aux dommages cellulaires. Ainsi, l'activation de ces différentes protéines se traduit par un arrêt du cycle cellulaire. La protéine Chk1 phosphoryle la protéine cdc25A sur la sérine 123. Cette phosphorylation permet la création d'un site de liaison pour la protéine 14.3.3 qui inhibe l'activité de phosphatase de cdc25A, l'exclue du noyau et favorise sa dégradation par ubiquitination (Chen, Ryan et al. 2003). En conséquence, cdc25A ne peut déphosphoryler cdk2 et cdk1, les cellules s'arrêtent alors en phase G1, S et G2 (Mailand, Falck et al. 2000; Mailand, Podtelejnikov et al. 2002). Chk1 peut également phosphoryler cdc25C sur la sérine 216 et prévient alors son activation en phase G2 entraînant l'absence d'activation de cdk1 (Peng, Graves et al. 1997; Dalal, Schweitzer et al. 1999). Ainsi, l'inhibition de cdc25 par les kinases Chl1/Chk2 induit l'arrêt du cycle cellulaire.

L'arrêt du cycle cellulaire dépend également de l'activation de p53. La présence de dommages au niveau de l'ADN induit sa phosphorylation dans le domaine de transactivation au niveau des sérines 15 et 20 (Chehab, Malikzay et al. 1999). Les protéines Chk1/Chk2 phosphorylent en effet p53 en réponse aux radiations ionisantes sur la sérine 20 (Chehab, Malikzay et al. 1999; Unger, Juven-Gershon et al. 1999). Chk1 peut également phosphoryler p53 sur les sérines 6 et 9 et sur la thréonine 18 (nécessitant préalablement la phosphorylation de p53 sur la serine 15) (Unger, Juven-Gershon et al. 1999; Higashimoto, Saito et al. 2000; Sakaguchi, Saito et al. 2000). Ces phosphorylations empêchent la liaison de mdm2 sur p53 et favorisent ainsi sa stabilisation. Cette stabilisation de p53 est indispensable à l'arrêt du cycle cellulaire induit par les dommages de l'ADN. La protéine p21 est la principale cible de p53, elle entraîne un arrêt un phase G1 ou G2 du cycle cellulaire (Waldman, Lengauer et al. 1996; Andreassen, Lacroix et al. 2001).

Ainsi, les dommages de l'ADN induisent l'arrêt du cycle cellulaire. Ils modulent également l'accessibilité de la chromatine au complexe transcriptionnel et la réplication qui ne seront pas développés ici.

III.3.b Induction de la mort cellulaire

Les cassures de l'ADN activent également le programme apoptotique par l'intermédiaire de p53. ATM et ATR phosphorylent aussi p53 sur la sérine 15 (Tibbetts, Brumbaugh et al. 1999). Cette phosphorylation ne participerait pas directement à la stabilisation de mdm2 mais

est en fait nécessaire pour la phosphorylation d'autres résidus sérines, comme la sérine 46 localisée dans le domaine de transactivation (Tibbetts, Brumbaugh et al. 1999; Saito, Goodarzi et al. 2002). La phosphorylation de p53 sur ces résidus permet de stabiliser p53 sur des promoteurs des gènes pro-apoptotiques comme p53AIP1, et de recruter des HATs et des coactivateurs (Dumaz and Meek 1999). Elles pourraient également permettre à p53 de recruter des protéines indispensables à l'activation des gènes pro-apototiques comme JMY (Junction-mediating and regulatory protein) ou ASPP (Apoptosis-stimulating protein of p53) (Shikama, Lee et al. 1999; Samuels-Lev, O'Connor et al. 2001). La protéine mdm2 peut être phosphorylée par ATM réduisant sa capacité à induire la dégradation de p53 par le protéasome (Maya, Balass et al. 2001). Ainsi l'activation de p53 entraîne l'induction de l'apoptose (figure 25).

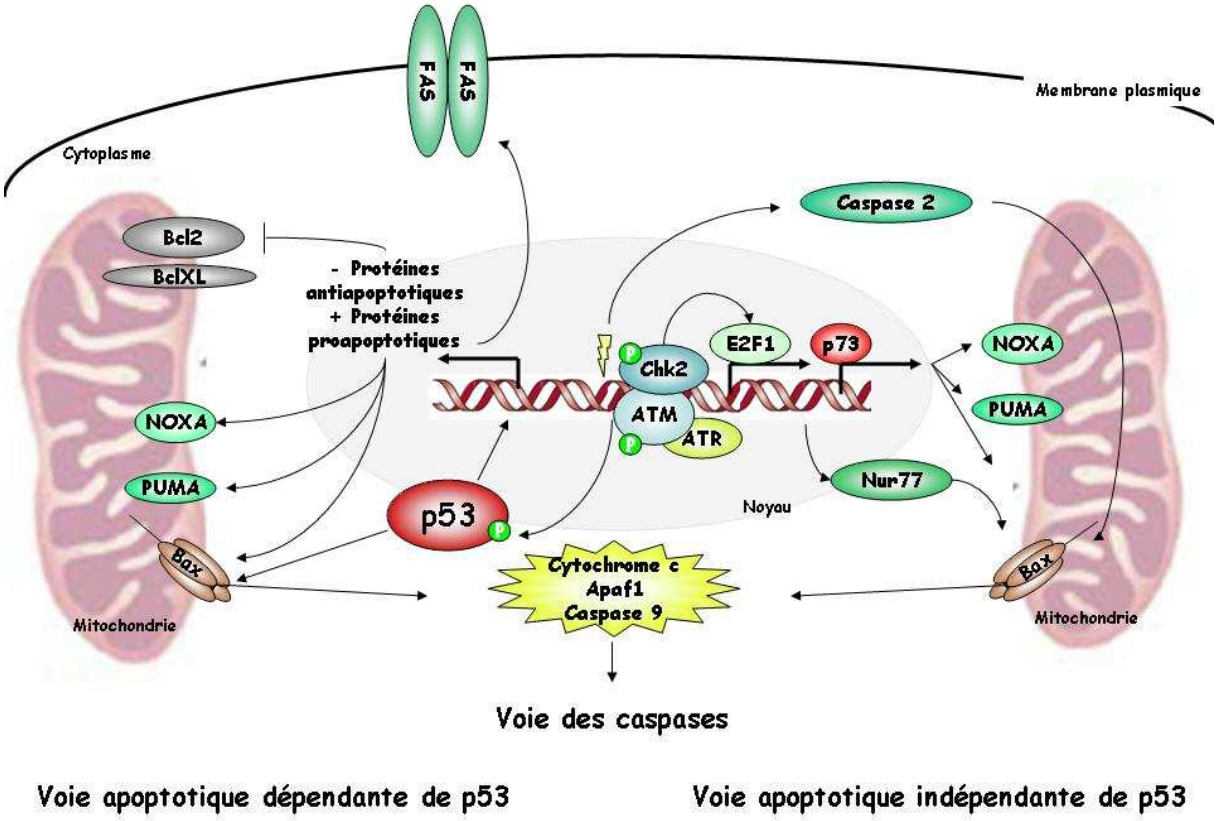


Figure 25 : Induction de l'apoptose lors des dommages de l'ADN par une voie dépendante et indépendante de p53.

La protéine p53 est phosphorylée sur la sérine 15 par ATM/ATR, Chk1/Chk2 et permet sa phosphorylation sur la sérine 46. p53 active alors la transcription des gènes pro-apoptotiques comme Bax, Puma, Noxa ou les récepteurs de mort comme CD95 (FAS). p53 peut également stimuler la mort des cellules indépendamment de son activité transcriptionnelle en interagissant physiquement avec des protéines de la famille Bcl-2, entraînant la neutralisation des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou BclXL et/ou en activant les protéines pro-apoptotiques comme Bax, Bak. L'apoptose peut aussi être induite indépendamment de p53. Cette voie met en jeu la protéine p73, mais également Nur77, et la caspase 2 (Zhivotovsky and Kroemer 2004).

D’autre part, Chk2 activerait l’apoptose indépendamment de p53 en phosphorylant directement des facteurs comme PLM et E2F1 (Yang, Kuo et al. 2002; Stevens, Smith et al. 2003). L’activation de E2F1 active alors la transcription de p73. Cette dernière se fixe ensuite sur le promoteur des gènes pro-apoptotiques comme Puma, Bax ou Noxa entraînant alors le relargage du cytochrome c par l’intermédiaire de Bax. La protéine Nur77, récepteur nucléaire orphelin, serait également impliquée dans l’induction de l’apoptose par une voie indépendante de p53 mais le mode d’activation de cette protéine reste pour l’instant inconnu. Elle régule la transcription de gènes présentant des éléments de réponse pour les facteurs de transcription E2F1. Elle pourrait ainsi favoriser son activité pro-apoptotique. Elle favoriserait également la libération du cytochrome c de la mitochondrie en interagissant avec Bcl-2. Elle modifierait l’activité de Bcl-2, en lui permettrait d’acquérir une activité pro-apoptotique (Lin, Kolluri et al. 2004). La caspase 2, seule pro-caspase présente dans les cellules de façon constitutive et régulée par le facteur E2F1, est également activée lors des dommages de l’ADN et favorise également le relargage du cytochrome c directement, ou en activant les protéines pro-apoptotiques (Lassus, Opitz-Araya et al. 2002; Robertson, Gogvadze et al. 2004).

Contrairement à l’apoptose et à la sénescence qui constituent une réponse des cellules normales aux dommages de l’ADN, la catastrophe mitotique est une réponse des cellules présentant plusieurs points de contrôle défectueux. Sa définition est assez difficile tant sur le point morphologique que sur les protéines impliquées dans sa régulation. La catastrophe mitotique est une forme particulière de mort cellulaire par apoptose survenant lors d’une mitose défectueuse. Elle résulte d’un défaut d’activation de différents points de contrôle, notamment le point de contrôle de l’état de l’ADN intervenant lors de la transition G2/M et le point de contrôle du fuseau mitotique. Elle se caractérise essentiellement d’un point de vue morphologique par l’apparition de micronoyaux et de chromosomes non condensés (Roninson, Broude et al. 2001). La figure 26 qui suit représente toutes les étapes menant à la catastrophe mitotique. La catastrophe mitotique survient lorsque les cellules entrent prématurément en mitose avant la réparation complète des dommages et la fin de la réplication de l’ADN. Cette entrée prématurée en mitose est associée à une mauvaise répartition des chromosomes qui mène à l’activation du point de contrôle du fuseau mitotique. L’activation de BubR1, Mad2 et Bub1 maintient alors l’APC/C sous forme inactive. La séparation des chromosomes et la sortie de mitose normale sont inhibées en partie grâce au maintien du complexe cycline B/cdk1 actif. Les cellules sortent prématurément de la mitose au moment de la transition métaphase/anaphase et induisent le programme apoptotique indépendamment de la présence de p53 menant à des modifications associées à la catastrophe

mitotique. La mort des cellules traduit notamment par l'activation de la caspase 2, la dépolarisation de la membrane mitochondriale, la sortie du cytochrome c et l'activation des caspases 9 et 3 (Castedo, Perfettini et al. 2004).

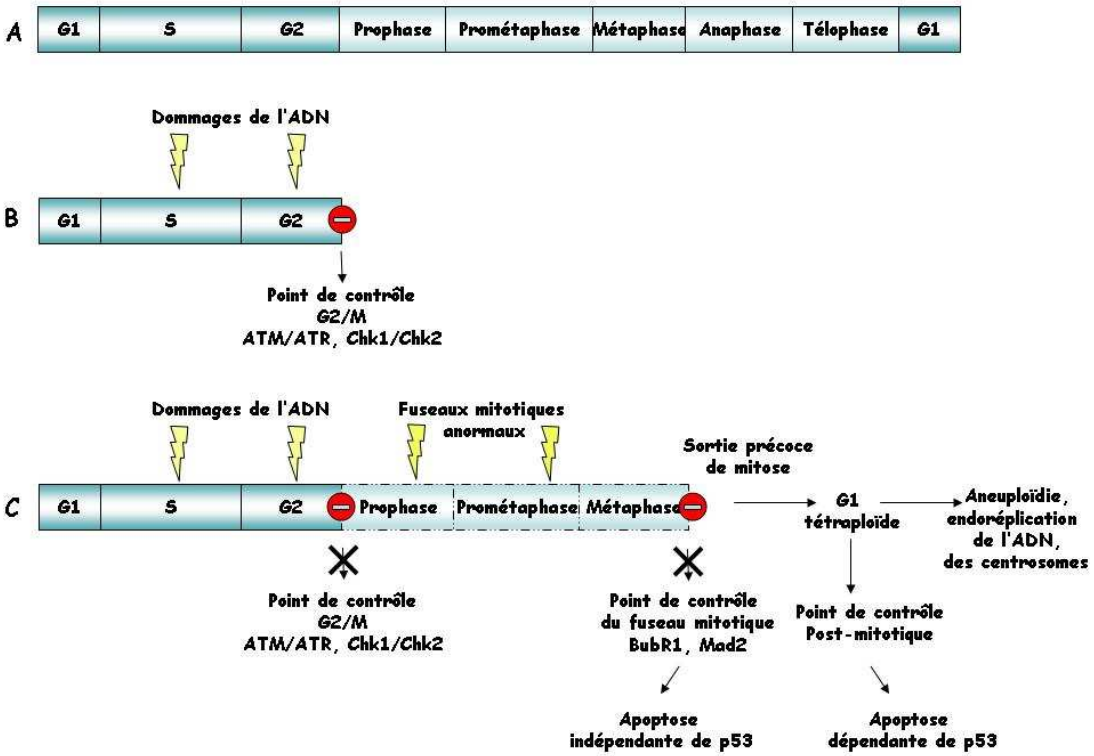


Figure 26 : La catastrophe mitotique, mort des cellules tumorales par apoptose durant une mitose imparfaite.

A. Mitose et interphase en conditions normales.

B. Activation du point de contrôle de l'ADN lors de dommages de l'ADN survenant lors de la réplication.

C. Catastrophe mitotique survenant lors de l'absence du point de contrôle de l'ADN et du point de contrôle du fuseau mitotique (Castedo, Perfettini et al. 2004).

En revanche, l'absence de cette induction lors de l'inhibition de ce point de contrôle du fuseau, aboutit à une séparation asymétrique des chromosomes à l'origine de l'aneuploïdie. Les cellules sont alors soumises au point de contrôle post-mitotique dépendant de p53 ou point de contrôle de tétraploïdie. Ainsi, dans les cellules où p53 est active, l'activation de p21 entraîne un arrêt définitif des cellules en phase G1 empêchant ainsi la propagation des erreurs après la mitose et l'aneuploïdie (Mantel, Braun et al. 1999; Andreassen, Lohez et al. 2001). En absence de p53, les cellules sont donc incapables de stopper le cycle cellulaire. Elles entrent donc de nouveau dans le cycle cellulaire, rerépliquent leur ADN et leurs centrosomes, malgré l'absence de ségrégation des chromosomes au cycle précédant, menant alors à l'aneuploïdie des cellules. Des modifications survenant dans les gènes régulant la catastrophe

mitotique sont donc associées à l'apparition de tumeurs. Ainsi, les modifications des protéines régulant le déroulement de la mitose comme les Plks, les protéines Neks, les kinases Aurora ou les protéines du point de contrôle du fuseau mitotique pourraient être impliquées dans l'absence d'induction de la catastrophe mitotique. Peu de données sont actuellement disponibles sur l'implication de ces protéines dans l'inhibition de la catastrophe mitotique. Néanmoins, comme nous l'avons souligné dans ce manuscrit, la surexpression de la protéine Aurora A, retrouvée dans de nombreux cancers (Sen, Zhou et al. 1997), est associée à un défaut de fonctionnement du point de contrôle G2/M et du point de contrôle du fuseau mitotique menant à l'endoréplication et à l'amplification des centrosomes. De plus, l'inhibition de p53 dans ces cellules augmente ce phénotype, laissant alors supposer l'absence d'induction de la catastrophe mitotique dans ces cellules (Meraldi, Honda et al. 2002).

Objectifs des travaux

Les dommages de l'ADN engendrés par les traitements chimiothérapeutiques induisent un arrêt du cycle cellulaire associé à l'activation d'un programme de mort, l'apoptose, la sénescence ou la catastrophe mitotique. Cependant les cellules tumorales mettent en place de nombreuses modifications pouvant altérer l'induction de ces différentes voies.

Aurora A est une protéine kinase clé impliquée dans le déroulement de la mitose et localisée au niveau des centrosomes. Son expression est dérégulée dans de nombreux cancers notamment dans le cancer colorectal. Sa surexpression semble contribuer à la résistance aux molécules ciblant le point de contrôle du fuseau mitotique, comme le paclitaxel (taxol). La littérature souligne l'importance de la dérégulation de la kinase Aurora A et montre que la surexpression de son ARNm, de la protéine ou l'amplification de son gène sont associées au développement des tumeurs. Quelques études portent sur la régulation de la dégradation de la protéine et semblent ainsi impliquer la stabilisation de la protéine dans sa surexpression. Cependant peu de travaux portent sur la régulation transcriptionnelle du gène. D'autre part quelques études semblent également impliquer cette kinase dans la résistance des cellules tumorales aux traitements. Nous nous sommes donc intéressés à la régulation transcriptionnelle d'Aurora A ainsi qu'à son implication dans la résistance des cellules en réponse à un inhibiteur de topoisomérases I, l'irinotecan (sn38).

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression de la protéine et sa localisation en réponse à un traitement au sn38 au cours du cycle cellulaire. Puis, nous avons observé l'expression de l'ARNm et nous nous sommes attardés sur la régulation du promoteur du gène d'Aurora A lors d'un stress entraînant des dommages de l'ADN, dans les conditions physiologiques et lors de l'activation de l'oncogène Ras. Enfin, dans le but de transférer les résultats de la recherche fondamentale vers la recherche clinique, nous avons étudié l'expression d'Aurora A directement au sein des tumeurs colorectales grâce à deux approches différentes, la RT-PCR quantitative et l'immunohistochimie.

Les inhibiteurs de Topoisomérases I inhibent l'expression d'Aurora A par l'intermédiaire du facteur de transcription c-myc

Matériels et méthodes

I Culture cellulaire et réactifs

Les lignées cellulaires tumorales colorectales, HCT116 et HT29 et HCT116 p21-/- sont cultivées en RPMI-1640 supplémenté de 10 % de SVF (sérum de veau fœtal). Les cellules HCT116 et HT29 proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection). La lignée tumorale colorectale HCT116 p21-/- dans laquelle les deux allèles du gène de p21 sont délétés par recombinaison homologue est un don du Dr B. Vogelstein (Waldman, Kinzler et al. 1995). La lignée colorectale LS174T transfectée de façon stable avec un plasmide codant pour un répresseur (LS174T R1) est cultivée en RPMI-1640 supplémenté de 5 % de SVF et 10 µg/ml de blasticidine (Sigma). La lignée colorectale LS174T transfectée de façon stable avec le répresseur et le plasmide pTER inductible contenant deux ARNs interférents (RNAi) différents de c-myc (LS174T #1 et LS174T #2) est cultivée en RPM1-1640 supplémenté de 5 % de SVF, 10 µg/ml de blasticidine et 500 µg/ml de zéocine (Sigma). L'ajout de doxycycline entraîne une modification de conformation du répresseur, qui ne peut alors plus inhiber le plasmide pTER, et permet l'induction du RNAi. Ces cellules sont un don du Dr H. Clevers (van de Wetering, Oving et al. 2003). Les lignées stables HT29R1/T0 et HT29R1/Ras sont cultivées en RPMI 10 % SVF en présence de, respectivement, 10 µg/ml de blasticidine ou 10 µg/ml de blasticidine et 500 µg/ml de zéocine. L'ensemble des cellules est cultivé en incubateur à 37°C sous 5 % de CO_2 en atmosphère humide.

Les transfections transitoires et stables sont réalisées en présence de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en suivant les recommandations du fabriquant. Les plasmides pEGFPC3, pEGFPC1-Aurora A et Aurora A-luc sont un don du Dr C. Prigent. Les 1400 nucléotides en amont du site initiateur de la transcription du promoteur d'Aurora A sont clonés en phase avec le gène codant pour la luciférase et correspond au plasmide Aurora A-luc. Les mesures d'activité luciférase sont réalisées à l'aide des réactifs du kit Promega E1910.

Le test de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) est utilisé pour évaluer la viabilité des cellules tumorales colorectales. Ce test permet d'évaluer l'activité enzymatique mitochondriale des cellules vivantes. La coloration obtenue est proportionnelle à l'activité mitochondriale ainsi qu'au nombre de cellules vivantes. Les cellules sont semées en plaques 96 puits en RPMI 3 % SVF en présence ou non de 1 µg/ml de tétracycline. Après 24

h de culture, des dilutions en série de sn38 sont réalisées en RPMI 3 % SVF et ajoutées sur les cultures cellulaires. La première concentration de sn38 ajoutée est de 100 ng/ml. Les cellules sont ensuite incubées pendant 72 h dans l'incubateur. Le réactif MTT à 500 ng/ml est ensuite ajouté pendant 3 h sur les cultures cellulaires. Les cellules vivantes métabolisent le MTT et le transforment en cristaux violets de formazan. Après dissolution des cristaux avec du DMSO, l'absorbance est mesurée à 550 nm et le pourcentage de survie est calculé selon le calcul suivant :

$$\text{Pourcentage de survie} = (DO_{550\ nm}\ \text{stimulée} / DO_{550\ nm}\ \text{contrôle}) \times 100$$

Les anticorps secondaires couplés à la peroxydase sont obtenus chez Santa Cruz Biotechnology et les anticorps secondaires utilisés pour la fluorescence chez Molecular Probes. L'anticorps monoclonal dirigé contre Aurora A utilisé en western blot et celui utilisé en immunohistochimie sont un don du Dr C. Prigent (Cremet, Descamps et al. 2003). Les anticorps primaires utilisés ainsi que leurs domaines d'applications sont répertoriés dans le tableau 2 suivant.

Tableau 2 : Anticorps commerciaux utilisés et leurs applications.
SC Santa Cruz Biotechnology, T Sigma, A Molecular Probes, WB western blot, ChIP immunoprécipitation de chromatine, IF immunofluorescence, HRP Horse Radish Peroxidase.

Anticorps primaires	Référence	Anticorps secondaires	Applications
Phospho Ser 15 p53	SC-11764-R	SC-2004 HRP	WB
p53	SC-98	SC-2005 HRP	WB
c-myc	SC-764	SC-2004 HRP	WB et ChIP
p21waf1	SC-397	SC-2004 HRP	WB
Phospho Ser 2 ARN polymérase II	SC-899	SC-2004 HRP	ChIP
ARK-1/ Aurora A	SC-14321	A21468 Alexa 594	IF
Ras	SC-29	SC-2005 HRP	WB
tubuline α	T9026	SC-2005 HRP	WB
tubuline γ	T6557	A21200 Alexa 488	IF
Phospho Ser 727 STAT3	SC-21876	SC-2354 HRP	WB
STAT3	SC-482	SC-2004 HRP	WB et ChIP

II Synchronisation cellulaire et analyse par cytométrie de flux

II.1 Synchronisation cellulaire

2. 10^6 cellules sont semées en boite 10 cm en RPMI 3 % SVF et traitées avec 2 mM d'hydroxyurée A (OH-U) pendant 15 h, entraînant l'accumulation des cellules en phase G1 du cycle cellulaire, puis lavées et remises en croissance pendant 9 h avec du RPMI 3 % SVF (OH-U+R). La synchronisation des cellules est contrôlée par cytométrie de flux (FACScan, Becton-Dickinson).

II.2 Analyse par cytométrie de flux de la quantité d'ADN

Pour cette analyse, 1. 10^6 de cellules sont utilisées, lavées en PBS 0,1 % Tween et fixées à l'éthanol 70 %. Les cellules sont ensuite traitées avec 10 µg/mL de RNase (Sigma) pendant 45 min à 37°C et marquées avec 50 µg/ml d'iodure de propidium dilué dans du PBS 0,1 % Tween. L'analyse de la quantité d'ADN de 10000 cellules est réalisée à l'aide du logiciel WinMDI.

III Préparation des lysats cellulaires pour une analyse par western blot

2. 10^6 cellules sont semées en boite 10 cm en RPMI-1640 3 % SVF et stimulées au sn38 à10 ng/ml pendant 24 h, 48 h et 72 h. Après deux lavages au PBS froid, les cellules sont lysées dans un tampon de lyse contenant, 25 mM HEPES pH 7.9, 300 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 10% glycérol, 1 % Nonidet P-40 (NP-40), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM sodium orthovanadate (NaO), 5 mM sodium fluoride (NaF), 2 µg/ml leupeptine, 5 µg/ml aprotinine, 1 µg/ml pestatine). Après 30 min d'incubation à 4°C, les lysats sont centrifugés à 12 000 g pendant 10 min, et les extraits sont immédiatement utilisés ou conservés à -80°C. Les extraits sont dosés à l'aide du réactif BCA protein assay (Pierce) et la même quantité de protéine est soumise à une électrophorèse sur gel dénaturant d'acrylamide/bisacrylamide à 10%. Après migration et électrotransfert des protéines sur une membrane de PVDF (polyvinylidène) en milieu semi sec, les membranes sont saturées avec 5 % de lait en TBS (TRIS 10 mM pH 8, 150 mM NaCl) supplémenté de 0,05 % Tween et hybridées pendant une nuit à 4°C avec les différents anticorps primaires à la concentration de 200 ng/ml. Après plusieurs rinçages au TBS supplémenté de 0,05 % Tween, les membranes sont hybridées avec

l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase à 40 ng/ml puis révélées à l'aide du ChemiDoc XRS (Bio-Rad).

IV Extraction d'ARN, rétrotranscription et PCR quantitative

Les extractions d'ARN totaux sont réalisées à l'aide du réactif TRIzol (Invitrogen) en suivant les recommandations du fabriquant puis les ARN sont quantifiés par lecture à 260 nm de la densité optique et leur qualité est évaluée grâce au rapport de la densité optique 260/280. Les ADN complémentaires (ADNc) sont synthétisés à partir de 2 µg d'ARN par multi amorçage aléatoire à l'aide de 1,3 µg d'hexamère aléatoire et élongation pendant 1 h à 37°C en utilisant la transcriptase reverse MMLV (Promega).
L'amplification des ADNc est réalisée par PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) en présence de SYBR Green sur un thermocycleur LightCycler (2239264, Roche Diagnostics GmbH). Les PCR sont réalisées dans un volume de 10 µl comprenant 5 µl d'ADNc dilués au trentième, 500 mM de chaque amorce (MWG Biotech), 4 mM de $MgCl_2$ et le tampon LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostic) qui contient les dNTPs et une HotSart Taq DNA Polymerase à 1x final. Le tableau 3 répertorie l'ensemble des amorces utilisées.

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées en RT-PCR quantitative.

ARNm analysé	Amorce sens	Amorce anti-sens
Aurora A	5'GATCAGCTGGAGAGCTTAAA3'	5'GAGGCTTCCCAACTAAAAAT3'
p21waf1	5'GCTCCTTCCCATCGCTGTCA3'	5'TCACCCTGCCCAACCTTAGA3'
GAPDH	5'GAAGGTGAAGGTCGGAGTC3'	5'GAAGATGGTGATGGGATTTC3'

Après une dénaturation initiale de 10 min à 95°C, un programme d'amplification de 40 cycles est effectué (15 s à 95°C, 11 s à 55°C, 22 s à 72°C), avec une lecture optique de la fluorescence du SYBR Green en fin de chaque cycle d'élongation. Une courbe de fusion est également réalisée à la fin de chaque cycle de PCR afin de s'assurer de la spécificité des amorces. Les résultats sont analysés par la méthode « Fit Point » à l'aide du logiciel LightCycler version 3.5.3 selon les recommandations du fabriquant. Une dilution appropriée de chaque ARN total, utilisée lors de la rétro transcription, subit également une amplification

par PCR afin de vérifier l'absence d'ADNg dans les échantillons. La quantification relative de l'expression des gènes est réalisée par la méthode de comparaison des cycles seuil (C_T) (Fink, Seeger et al. 1998). La GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) est utilisée comme gène de référence et le facteur d'amplification est calculé selon la formule suivante, en considérant que l'efficacité d'amplification de chaque PCR est proche de 100% (Favy, Lafarge et al. 2000).

$$\text{Facteur d'amplification} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

$$\text{avec } \Delta\Delta C_T = [C_{T\ (\text{gène})} - C_{T\ (\text{GAPDH})}]_{\text{stimulé}} - [C_{T\ (\text{gène})} - C_{T\ (\text{GAPDH})}]_{\text{contrôle}}$$

La moyenne des facteurs d'amplification est déterminée après trois répétitions d'expérience.

V Expérience d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP)

Les expériences de ChIP sont réalisées comme décrites précédemment par Barré et al. en 2003. Les cellules sont traitées à 60% de confluence, puis lavées en PBS. Les interactions protéiques sont fixées avec du PBS 1% formaldéhyde à température ambiante pendant 10 min. Après plusieurs lavages au PBS froid, les cellules sont lysées dans 500 µl de tampon de lyse (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.1, 1 mM PMSF, 5 mM NaF, 5 mM NaO, 2 µg/ml leupeptine, 5 µg/ml aprotinine, 1 µg/ml pestatine), et soniquées 5 fois 20 secondes en position maximale. Le surnageant est ensuite récupéré après centrifugation à 12000 g pendant 10 min à 4°C, puis dilué une fois avec du tampon de dilution (1 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.1) et soumis à un prélavage pendant 2 h à 4°C avec 2 µg d'ADN de sperme de saumon, et 20 µl de protéine A-sépharose (50 % dans de l'eau). L'immunoprécipitation est réalisée pendant la nuit à l'aide de 2 µg d'anticorps spécifique ou d'Ig contrôle en présence de 1 % de NP-40. 2 µg d'ADN de sperme de saumon et 20 µl de protéine A-sépharose (50 % dans de l'eau) sont ensuite ajoutés pendant 1 h à 4°C. Les immunoprécipitats sont lavés séquentiellement pendant 10 min à l'aide des tampons 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), et TSE III (250 mM LiCl, 1 % NP-40, 1 % déoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.1). Les immunoprécipitats sont lavés une dernière fois avec du tampon TE (Tris 1 M, 0,1 M EDTA) et élués avec 1 % SDS, 100 mM NaHCO3. Les éluats sont ensuite chauffés à 65°C toute la nuit pour reverser la liaison induite par le formaldéhyde. L'ADN est ensuite extrait selon la méthode classique du phénol/chloroforme. Une PCR quantitative est réalisée

en utilisant les conditions de PCR précédemment citées. La quantification relative est réalisée selon la méthode de comparaison des seuils. Les inputs sont utilisés comme standard de normalisation et les facteurs d'enrichissement sont calculés en adaptant la formule consacrée au cas présent.

$$\text{Facteur d'enrichissement} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

$$\text{avec } \Delta\Delta C_T = [C_{T\ (\text{région spécifique})} - C_{T\ (\text{input})}]_{\text{Ip spécifique}} - [C_{T\ (\text{région spécifique})} - C_{T\ (\text{input})}]_{\text{IP contrôle}}$$

Les amorces utilisées sont répertoriées dans le tableau 4 qui suit.

Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées lors des expériences de ChIP.

Région amplifiée	Amorce sens	Amorce anti-sens
ChIP AurA -649 –381	5'GATGCCCCCTCACTATATGC3'	5'AGGAGAGAGCGGGATACCAA3'
ChIP ExAurA +1555 +1756	5'TAGTCTGGGCCTGGCTTCATC3'	5'TCTGGAACTCCCGACCTCA3'

VI Immunofluorescence et microscopie

Les expériences d'immunofluorescence indirecte sont réalisées par croissance des cellules sur des lamelles de verre la veille de la stimulation. Les lamelles sont ensuite fixées pendant 10 min avec 4% de para formaldéhyde et perméabilisées 5 min avec de l'éthanol 70%. Après lavage au PBS, les lamelles sont marquées avec l'anticorps dirigé contre Aurora A (SC-14321, dilution au 1:40) ou la γ tubuline (T6557, dilution au 1:100) puis avec les anticorps secondaires, conjugués avec les différents fluorochromes, de Molecular Probes (A21200 et A21468, dilution au 1:500). Les lamelles sont ensuite montées sur lame dans du PBS/50 % glycérol. Les cellules sont ensuite observées au microscope à fluorescence Olympus et analysées avec le logiciel Fluoview.

Résultats

I Etude de l'expression d'Aurora A au cours du cycle cellulaire

Afin d'étudier l'effet des dommages de l'ADN sur l'expression d'Aurora A, nous avons dans un premier temps, déterminé les conditions optimales pour la détection de cette kinase (figure 27). La littérature nous montre en effet que l'expression de cette protéine est cyclique. Elle atteint un pic d'expression lors de la transition G2/M (Dutertre, Descamps et al. 2002; Sugimoto, Urano et al. 2002). Les cellules en croissance présentent une faible ou une absence d'expression de cette protéine, due à un faible pourcentage des cellules en phase G2. Ainsi, pour observer la kinase Aurora A dans les meilleures conditions, l'accumulation des cellules en phase G2 du cycle cellulaire est indispensable. L'hydroxyurée A (OH-U) est un inhibiteur de la ribonucléotide réductase. Cette enzyme intervient dans la synthèse des nucléotides et son inhibition par l'hydroxyurée A entraîne un défaut de réplication de l'ADN associé à une accumulation des cellules en phase G1/S du cycle cellulaire. La lignée tumorale colorectale, HCT116, est donc traitée pendant 15 h avec cette molécule. Une analyse par cytométrie de flux de la quantité d'ADN est réalisée et une accumulation des cellules en phase G1/S du cycle cellulaire est alors observée (figure 27 A). Celle-ci est cependant réversible, puisque l'élimination de l'hydroxyurée A du milieu de culture et la remise en croissance en RPMI 3 % SVF, permet aux cellules de reprendre leur cycle. La synchronisation des cellules en phase G2/M peut alors être observée 9 h après l'élimination de l'hydroxyurée A du milieu, comme le montre la figure 27 A. Parallèlement à l'étude de la quantité d'ADN, l'analyse de l'expression de l'ARNm d'Aurora A est réalisée par RT-PCR quantitative. L'expression de l'ARNm d'Aurora A est normalisée à l'aide de l'expression de la GAPDH et comparée par rapport au point traité à l'OH-U avant le renouvellement du milieu (0 h). L'expression de l'ARNm d'Aurora A est donc maximale 9 h après élimination de l'OH-U (0 h) du milieu (figure 27 B). L'étude de l'expression de la protéine kinase Aurora A est également réalisée, par western blot, dans les mêmes conditions expérimentales, et montre un pic d'expression 9h après élimination de l'OH-U (0 h) du milieu de culture (figure 27 C). Le traitement des cellules HCT116 avec de l'hydroxyurée A pendant 15 h, puis son élimination du milieu et la remise en prolifération pendant 9 h (OH-U+R) permet une synchronisation en phase G2/M du cycle cellulaire et l'observation du pic d'expression de l'ARNm et de la protéine Aurora A. Il

constituera donc notre point de référence pour l'étude de l'effet des dommages de l'ADN sur la protéine kinase Aurora A.

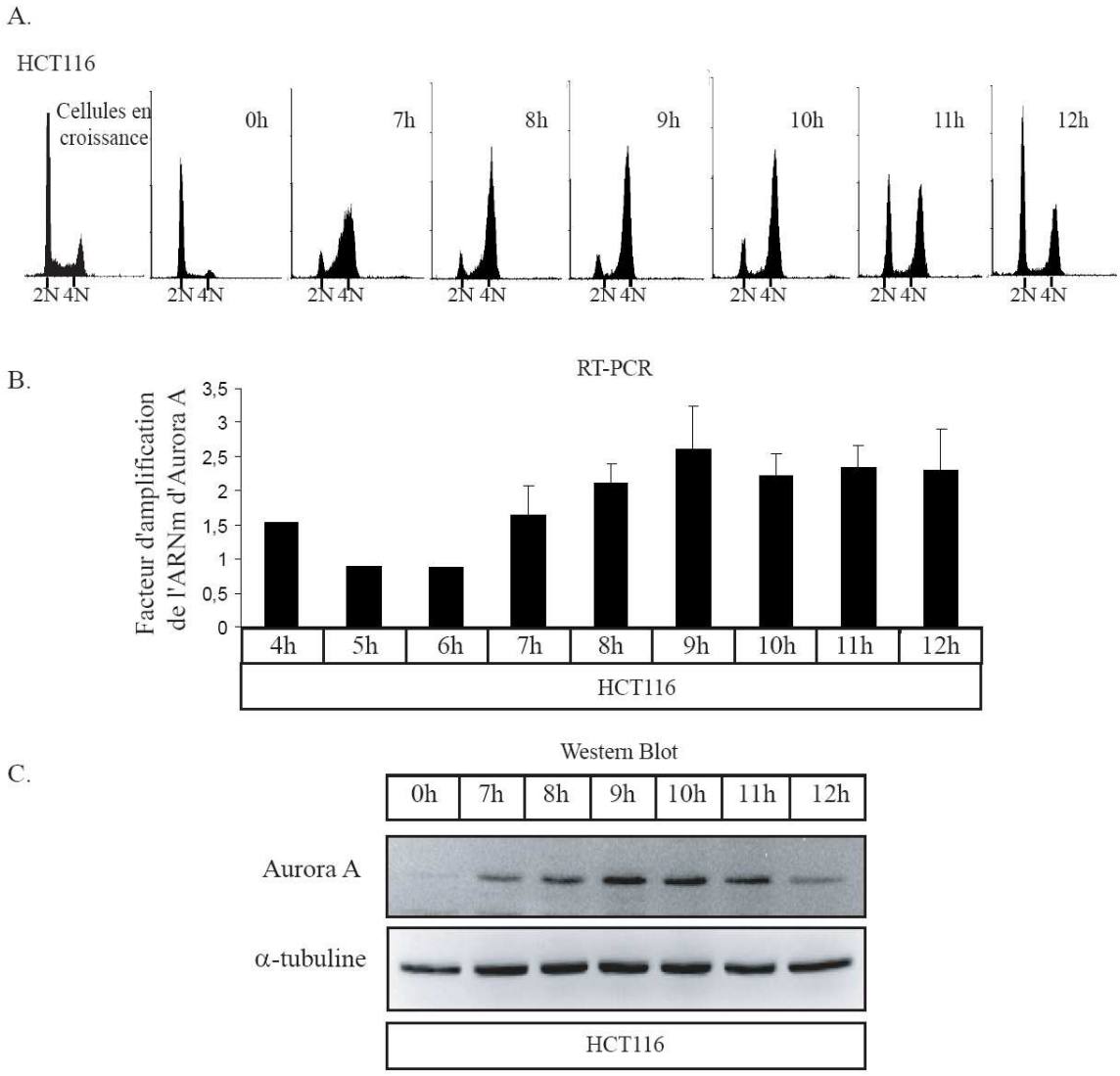


Figure 27 : Expression d'Aurora A au sein de la lignée tumorale colorectale HCT116 au cours du cycle cellulaire.

Les cellules sont traitées avec de l'OH-U pendant 15 h (0 h), puis l'OH-U est éliminé et le milieu de culture est remplacé par du RPMI 3 % SVF. Les cellules sont ensuite récupérées après 7 h, 8 h, 9 h, 10 h, 11 h, 12 h.

A. Cytogramme représentant le cycle cellulaire des cellules HCT116 en croissance, traitées avec OH-U (0 h), et après élimination de l'OH-U et renouvellement du milieu (7 h-12 h) (n=3).

B. RT-PCR quantitative réalisée sur les ARNm des cellules traitées dans les mêmes conditions que dans la figure A et B. Les ARNm d'Aurora A sont normalisés à l'aide de la l'expression de la GAPDH et l'expression de l'ARNm d'Aurora A est comparée par rapport au point traité à l'OH-U (0 h) (n=3).

C. Immunodétection de la protéine Aurora A et de l'α-tubuline au cours du cycle cellulaire par western blot après traitement à l'OH-U (0 h) puis élimination de l'OH-U et renouvellement du milieu (7 h-12 h) (n=3).

L'expression maximale de l'ARNm Aurora A, au cours de la phase G2 du cycle cellulaire, observée dans notre étude peut être due à une stabilisation de l'ARNm ou à une augmentation de l'activité transcriptionnelle au niveau du promoteur de ce gène.

II Effet d'un traitement au sn38 sur l'expression d'Aurora A

Afin d'étudier l'effet des dommages de l'ADN sur l'expression d'Aurora A, la molécule active de l'irinotecan, le sn38 est utilisé sur la lignée tumorale colorectale HCT116. La progression du cycle cellulaire des cellules HCT116 est suivie par cytométrie de flux, lorsque les cellules sont en croissance, après synchronisation en G2/M à l'hydroxyurée A comme précédemment décrit, ou après traitement au sn38 (figure 28 A). La stimulation au sn38 induit une accumulation des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire, au bout de 48 h de traitement (figure 28 B). Parallèlement, l'étude de l'expression de la protéine Aurora A au cours de cette stimulation est réalisée. L'expression d'Aurora A est confirmée par western blot dans les cellules synchronisées lors de la transition G2/M par un traitement à l'hydroxyurée A. Cependant, les dommages de l'ADN induisent une diminution d'expression de la protéine Aurora A. En effet, lors d'un traitement au sn38, molécule entraînant des dommages de l'ADN en inhibant l'ADN topoisomérase I, pendant 24, 48 et 72 h, la quantité de protéine Aurora A diminue progressivement (figure 28 D). L'analyse de l'expression des ARNm est également réalisée simultanément et montre la même diminution (figure 28 D). La diminution de la protéine ne semble pas être seulement le fruit de la régulation de la dégradation de la protéine par le protéasome, mais est également due à une régulation transcriptionnelle du gène d'Aurora A ou à une déstabilisation de son ARNm. De plus, cette diminution d'expression d'Aurora A n'est pas due à une mort des cellules par apoptose comme le montre l'absence de pic sub-G1 sur le cytogramme à 48 h (figure 28 C). En revanche, après 72 h de stimulation, environ 30 % des cellules entrent en apoptose comme l'indique le pic sub-G1 du cytogramme.

Parallèlement, la protéine et l'ARNm de p21 sont suivis lors d'un traitement au sn38. Cette protéine, activée par p53, est induite lors de dommages de l'ADN ou d'un stress cellulaire et participe à l'arrêt du cycle cellulaire. La détection par western blot et RT-PCR montre qu'elle est uniquement exprimée lors du traitement au sn38, témoignant ainsi l'absence d'effets toxiques de l'hydroxyurée A (figure 28 D). Ainsi, les dommages de l'ADN induits par le sn38 entraînent une accumulation des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire et sont associés à une dérégulation transcriptionnelle d'Aurora A.

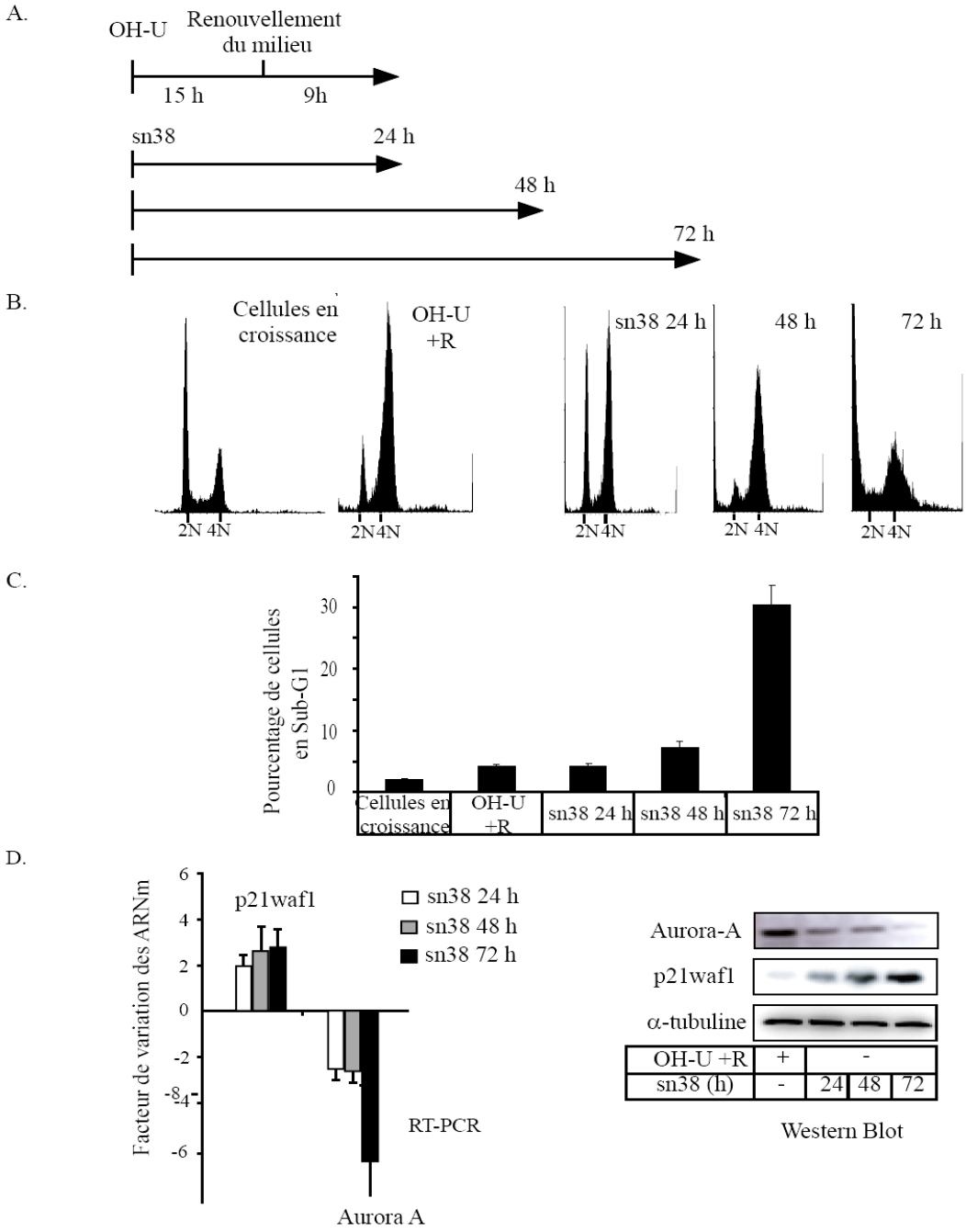


Figure 28 : Accumulation en G2/M et inhibition de l'expression d'Aurora A après traitement des cellules colorectales HCT116 au sn38.

A. Les cellules sont synchronisées avec de l'OH-U puis le milieu de culture est renouvelé par du RPMI 3 % SVF et les cellules sont récupérées 9 h après (OH-U+R), ou traitées avec du sn38 10 ng/ml pendant 24, 48 et 72 h. Les mêmes conditions expérimentales sont appliquées pour les figures B et C et D.

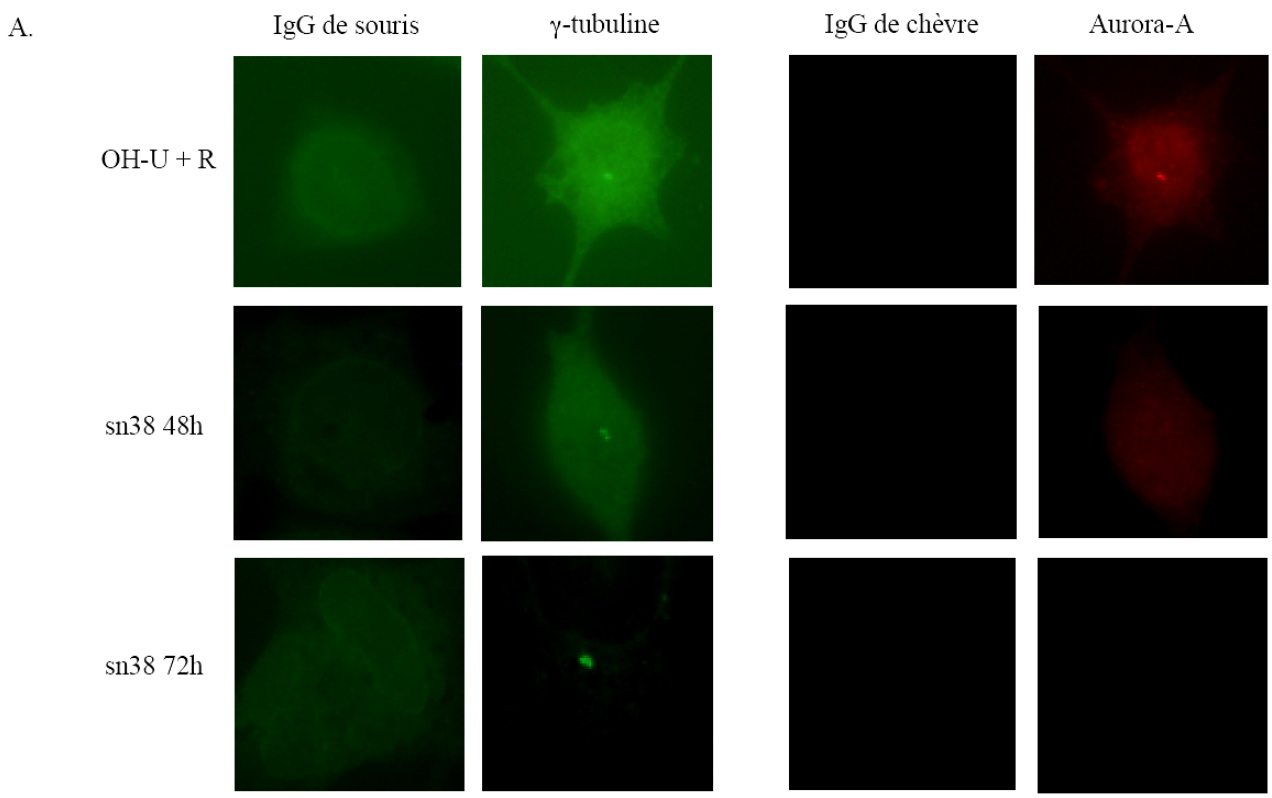
B, C. B, cytogrammes représentant la quantité d'ADN après incorporation d'iodure de propidium et analyse au cytomètre de flux ; C, histogrammes représentant le pourcentage de cellules en apoptose par mesure du pourcentage de la population cellulaire en sub-G1 (n=3).

D. A gauche, RT-PCR quantitative, les ARNm d'Aurora A et p21 sont détectés et normalisés à l'aide de la GAPDH. L'expression des ARNm des cellules stimulées au sn38 est comparée à celle des cellules synchronisées en G2/M (OH-U+R). A droite, western blot des protéines Aurora A, p21 et α-tubuline (n=3).

III Effet des dommages de l'ADN induit par le sn38 sur les centrosomes

La kinase Aurora A se localise au niveau des centrosomes lors de la phase G2 du cycle cellulaire (Dutertre, Descamps et al. 2002; Sugimoto, Urano et al. 2002). Aussi, nous avons étudié la distribution cellulaire d'Aurora A lors d'un traitement au sn38 (figure 29). Un marquage par immunofluorescence de la protéine Aurora A et de la γ-tubuline est réalisé. La γ-tubuline est une protéine entrant dans la composition des centrosomes et nous permet donc de les visualiser (Hannak, Kirkham et al. 2001; Berdnik and Knoblich 2002; Giet, McLean et al. 2002). Les cellules sont synchronisées en phase G2/M selon le protocole précédemment établi ou stimulées avec du sn38 pendant 24, 48 ou 72 h. La synchronisation des cellules en phase G2/M montre l'expression de la γ-tubuline et d'Aurora A au sein des centrosomes dupliqués (figure 29 A) comme cela a déjà été montré (Meraldi, Honda et al. 2002). D'autres part, le traitement des cellules à l'OH-U n'est pas associé à une augmentation du nombre de centrosomes comme cela avait été montré dans d'autres modèles cellulaires. Dans notre modèle, malgré l'introduction de dommages de l'ADN, les cellules HCT116 traitées au sn38 pendant 24 h dupliquent leurs centrosomes, comme le montre l'expression de la γ-tubuline sous la forme de deux spots, et expriment la protéine Aurora A, localisée alors au niveau des centrosomes. Cependant, après 48 h de traitement au sn38, l'expression de la kinase Aurora A diminue progressivement et seules 60 % des cellules expriment cette protéine malgré la persistance de la γ-tubuline au sein des centrosomes. Après 72 h de traitement, Aurora A n'est plus exprimée que par 30 % des cellules (figure 29 B).

De plus, les dommages de l'ADN induits par le sn38 ne semblent pas affecter la duplication des centrosomes ayant lieu lors de la phase S du cycle cellulaire ni le recrutement de la γ-tubuline. La littérature nous montre qu'Aurora A intervient peu dans la duplication des centrosomes mais régule plus particulièrement leur séparation (Marumoto, Honda et al. 2003). Dans notre modèle, la séparation des centrosomes semble altérée par un traitement au sn38 (figure 29 A). En effet, après 48 h de stimulation, des cellules HCT116 sont en phase G2/M du cycle cellulaire, comme le montre le cytogramme de la figure 28 B. A ce stade du cycle cellulaire, les cellules devraient séparer leurs centrosomes, processus normalement initié par Aurora A, et entrer en prophase de mitose. Cependant, les dommages de l'ADN induits par le sn38 diminuent l'expression de la protéine, ce qui semble bloquer l'entrée des cellules en mitose et la séparation des centrosomes.



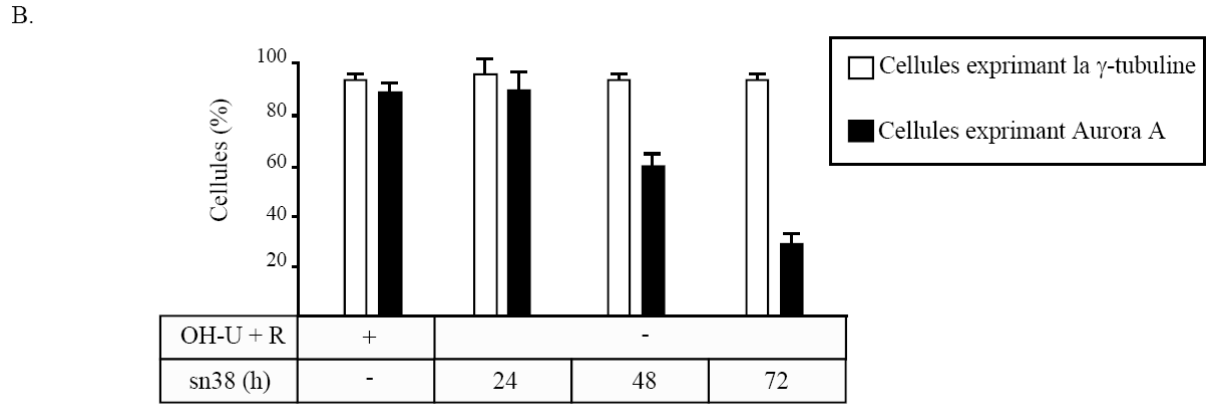


Figure 29 : Inhibition d'Aurora A après traitement des cellules colorectales HCT116 au sn38.

Les cellules sont synchronisées avec de l'OH-U, le milieu de culture est remplacé par du RPMI 3 % SVF et les cellules sont récupérées 9 h après (OH-U+R), ou traitées avec du sn38 10 ng/ml pendant 24, 48 et 72 h.

A. Localisation d'Aurora A au niveau des centrosomes dans les cellules HCT116. Après marquage des cellules, à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la γ-tubuline et d'un anticorps polyclonal dirigé contre Aurora A, les cellules sont analysées au microscope à fluorescence (n=3).

B. Histogramme représentant le pourcentage d'expression des protéines Aurora A et γ-tubuline au sein des centrosomes. Environ 100 cellules sont analysées par fluorescence (n=3).

IV Les protéines p53 et p21 ne sont pas impliquées dans la diminution d'expression d'Aurora A

Plusieurs études montrent que les dommages de l'ADN induisent la phosphorylation de p53 sur la sérine 15 (Chehab, Malikzay et al. 1999). Ce facteur de transcription est capable d'inhiber plusieurs gènes de protéines impliquées dans la transition G2/M ou le déroulement de la mitose. Ainsi, p53 inhibe l'expression de la cycline B, cdc25c, ou encore de cdk1 en interagissant directement avec leurs promoteurs (Innocente, Abrahamson et al. 1999; Zhao, Gish et al. 2000; Taylor, Schonthal et al. 2001; St Clair, Giono et al. 2004). L'expression de la protéine et de l'ARNm d'Aurora A est diminuée en présence de lésions sur la molécule d'ADN, la protéine p53 pourrait donc être responsable de cette inhibition.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons observé l'activation du facteur de transcription p53, lors d'un traitement au sn38 induisant des dommages de l'ADN. Des immunodétections de p53 et de sa forme phosphorylée sur la sérine 15, sont réalisées sur les cellules HCT116 synchronisées ou traitées au sn38. Comme le montre la figure 30, les dommages de l'ADN stabilisent la protéine p53 et l'activent par phosphorylation de la sérine 15. L'augmentation d'expression de la protéine p21 est également observable dans ces conditions. Le facteur de transcription p53 pourrait donc être impliqué dans la diminution d'expression d'Aurora A lors d'un traitement au sn38.

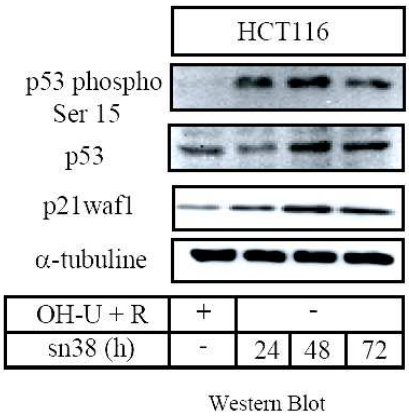


Figure 30 : Les dommages de l'ADN induits par le sn38 entraînent l'activation de p53 et p21.
Aux différents temps indiqués, des extraits cellulaires totaux sont réalisés et analysés par western blot avec les anticorps dirigés contre p21, la forme totale de p53 ainsi que la forme phosphorylée sur la serine 15 de p53, (n=3).

Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié l'effet de l'inhibition de ce facteur de transcription sur l'expression de la kinase mitotique. Pour cela, nous avons utilisé la lignée cellulaire HT29 dans laquelle le gène de p53 présente une mutation, inactivant ainsi la

protéine. De la même manière que pour l'HCT116, nous avons déterminé les conditions optimales permettant l'observation d'Aurora.

Les cellules HT29 sont donc traitées avec de l'OH-U pendant 15 h, l'analyse de la quantité d'ADN par cytométrie de flux nous montre une accumulation des cellules à la transition G1/S (0 h, figure 31 A). Cette accumulation est réversible, puisque lorsque l'OH-U est éliminé du milieu et remplacé par du RPMI 3 % SVF, les cellules reprennent leur cycle cellulaire (7 h-12h, figure 31 A). On observe également que les cellules HT29 atteignent la transition G2/M, 9 h après élimination de l'OH-U du milieu. L'analyse simultanée par western blot de l'expression de la protéine Aurora A montre également un pic, 9 h après élimination de l'OH-U du milieu (figure 31 B).

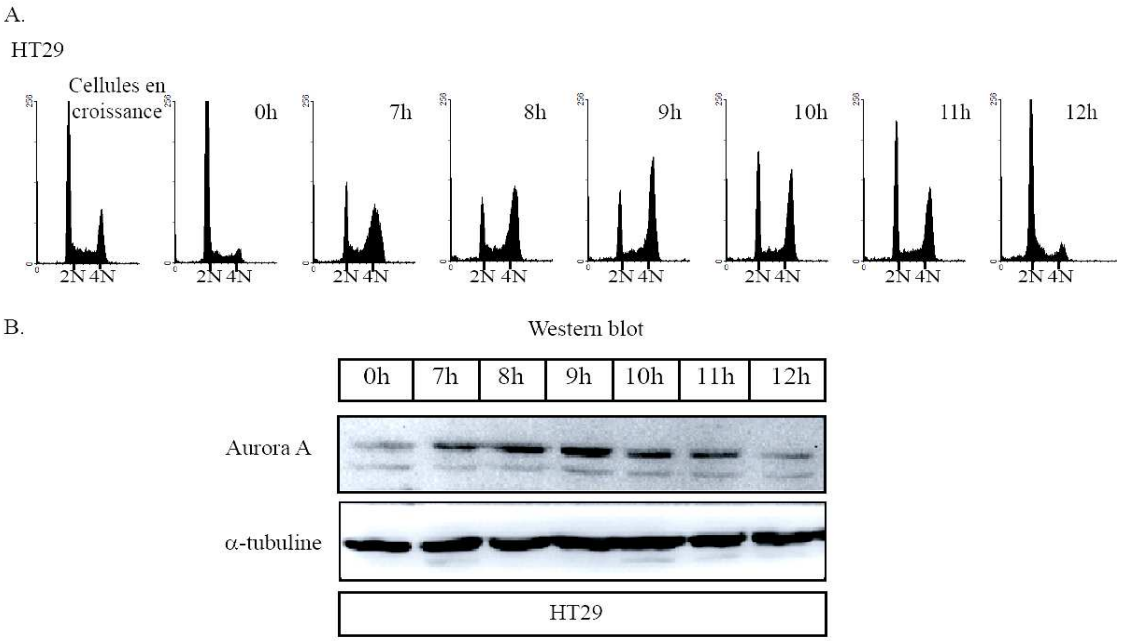


Figure 31 : Expression de la protéine Aurora A au sein de la lignée tumorale colorectale HT29 au cours du cycle cellulaire.

Les cellules sont traitées avec de l'OH-U pendant 15 h, puis le milieu de culture est remplacé par du RPMI 3 % SVF et les cellules sont récupérées après 7 h, 8 h, 9 h, 10 h, 11 h, 12 h.

A. Cytogramme représentant le cycle cellulaire des cellules HT29 en croissance, traitées avec OH-U (0 h), et après renouvellement du milieu (7 h-12 h) (n=3).

B. Immunodétection de la protéine Aurora A et de l'α-tubuline au cours du cycle cellulaire par western blot après traitement à l'OH-U (0 h) ou après traitement à l'OH-U et renouvellement du milieu (7 h-12 h) (n=3).

Ainsi, comme pour l'HCT116, un traitement de 15 h à l'OH-U puis son élimination et la remise en prolifération des cellules en RPMI 3 % SVF permet une accumulation des cellules

en phase G2/M du cycle cellulaire. Ce traitement permet également d'observer le pic d'expression de la kinase Aurora A et constitue donc notre contrôle.

Nous avons ensuite testé l'effet du sn38 sur les cellules HT29 pendant 24 et 48 h. Pour cela, nous avons réalisé des RT-PCR quantitatives et des immunodétections d'Aurora A. Une diminution d'expression de l'ARNm d'Aurora A est observée dans ces cellules après stimulation au sn38 (figure 32 A). L'étude par western blot montre également une diminution d'expression de la kinase (figure 32 B). Ainsi, ces résultats nous laissent penser que le facteur de transcription p53 n'est pas responsable de l'inhibition d'expression d'Aurora A lors de dommages de l'ADN.

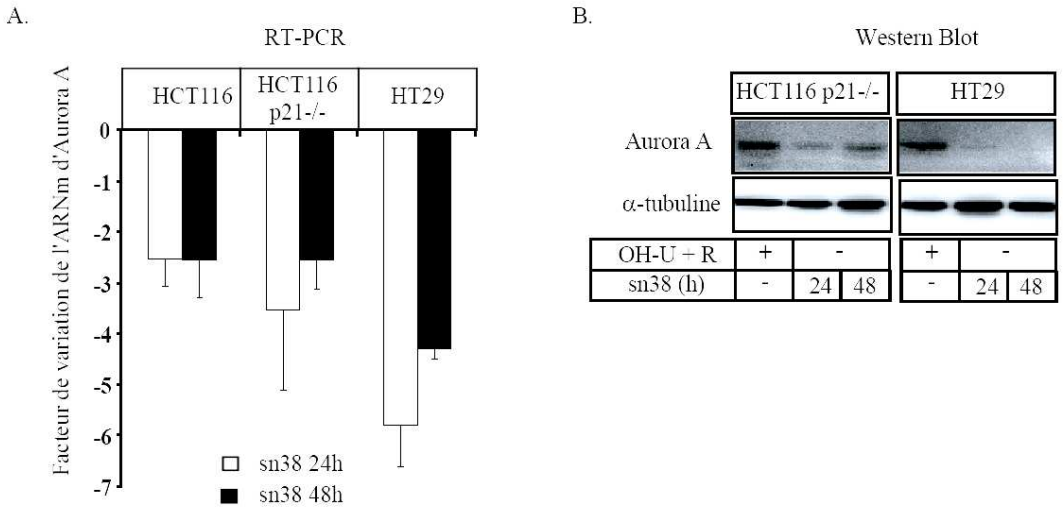


Figure 32 : La diminution d'expression d'Aurora A après traitement au sn38 est indépendante de p21 et de p53.
Les cellules HCT116, HCT116 p21-/- et HT29 sont synchronisées en G2/M avec de l'OH-U ou stimulées avec du sn38 à 10 ng/ml pendant les temps indiqués.
A. Analyse par RT-PCR quantitative de l'expression de l'ARNm d'Aurora A dans les cellules HCT116, HT29 et HCT116 p21-/-. Les résultats sont normalisés à l'aide de la GAPDH. Les points stimulés avec du sn38 sont comparés au point traité avec l'OH-U+R (n=3).
B. Analyse par Western blot de l'expression de la protéine kinase Aurora A dans les cellules HCT116 p21-/- et HT29 (n=3).

La présence de lésions au niveau de la molécule d'ADN est également associée à l'activation de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21, par l'intermédiaire de l'activation du facteur de transcription p53. D'autre part, la littérature montre que cet inhibiteur du cycle cellulaire inhibe de façon indirecte les gènes de cdk1 ou encore de Plk1 en modulant notamment l'activité des histones acétylases (Chang, Broude et al. 2000; Chang, Watanabe et al. 2000). Le CKI p21 pourrait donc être responsable de la diminution d'expression d'Aurora A.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons analysé par western blot l'expression de la protéine p21 lors d'un traitement des cellules HCT116 au sn38 induisant des dommages de l'ADN ou lors d'une synchronisation en phase G2/M. Comme le montrent les figures 28 D et 30, les dommages de l'ADN augmentent l'expression de la protéine et de l'ARNm de p21. Cet inhibiteur du cycle cellulaire peut donc être impliqué dans la diminution d'expression d'Aurora A lors d'un traitement au sn38.

Nous avons donc ensuite testé l'effet de l'inhibition de l'expression de cette protéine dans la lignée cellulaire HCT116 p21-/- dans laquelle les deux allèles du gène de p21 sont délétés par recombinaison homologue. De la même manière que pour l'HCT116 et l'HT29, nous avons déterminé les conditions optimales de détection de la kinase Aurora A.

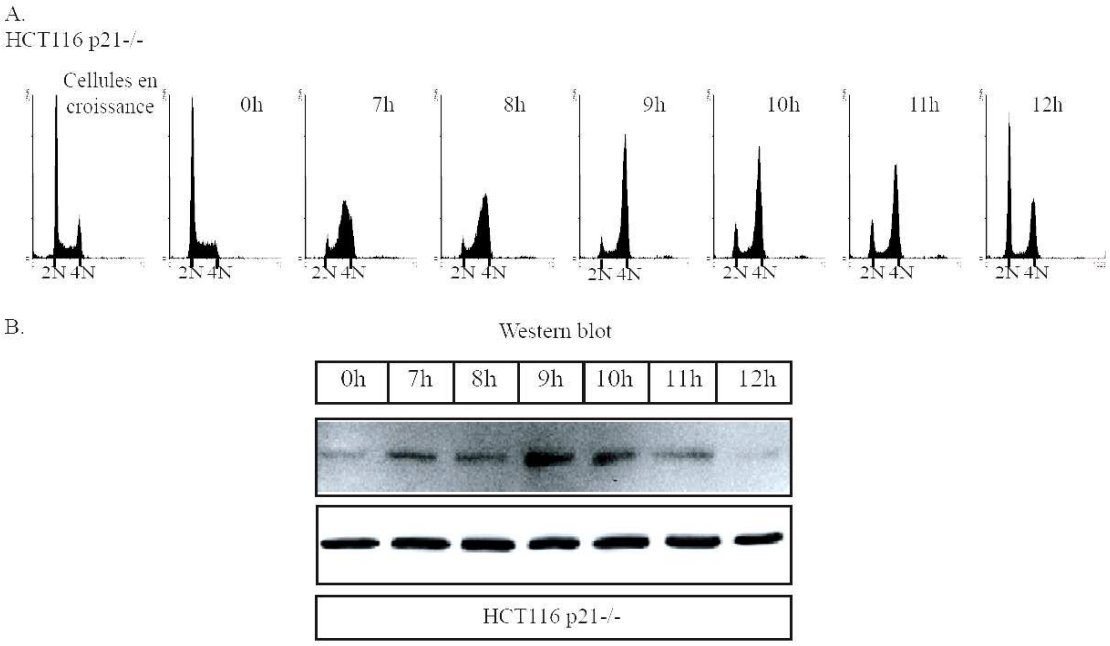


Figure 33 : Expression de la protéine Aurora A au sein de la lignée tumorale colorectale HCT116 p21-/- au cours du cycle cellulaire.

Les cellules sont traitées avec de l'OH-U pendant 15 h, puis le milieu de culture est remplacé par du RPMI 3 % SVF et les cellules sont récupérées aux temps indiqués.

A. Cytogramme représentant le cycle cellulaire des cellules HCT116 p21-/- en croissance, traitées avec OH-U (0 h), et après renouvellement du milieu (7 h-12 h) (n=3).

B. Immunodétection de la protéine Aurora A et de l'α-tubuline au cours du cycle cellulaire par western blot après traitement à l'OH-U (0 h) ou après traitement à l'OH-U et renouvellement du milieu (7 h-12 h) (n=3).

Le même traitement à l'OH-U et le même protocole sont testés. Comme le montre la figure 33 A, et de façon identique aux lignées HCT116 et HT29, les cellules HCT116 p21-/- s'accumulent en phase G2/M du cycle cellulaire, 9 h après élimination de l'OH-U et remise en culture des cellules en RMPI 3 % SVF. Comme le montre également la figure 33 B, ce

protocole nous permet d'observer par western blot, l'expression maximale de la kinase Aurora A, 9 h après élimination de l'OH-U et constitue ainsi notre référence.
L'effet des dommages de l'ADN est alors testé sur ces cellules. Pour cela, la lignée HCT116 p21-/- est traitée au sn38 pendant 24 et 48 h ou synchronisée en G2/M. L'analyse par western blot de la protéine Aurora A montre la même diminution d'expression lors d'un traitement au sn38 (figure 32 B). L'analyse par RT-PCR quantitative de l'ARNm montre également la même diminution (figure 32 A). Ainsi, ces résultats nous suggèrent que l'inhibiteur du cycle cellulaire p21, n'est pas impliqué dans la diminution d'expression d'Aurora A lors d'un traitement induisant des lésions de la molécule d'ADN.
Malgré l'activation des protéines p53 et p21 lors de dommages de l'ADN induits par le sn38, et l'implication de ces protéines dans la régulation de gènes impliqués dans la transition G2/M ou le déroulement de la mitose, p53 et p21 ne semblent pas impliquées dans la régulation de la protéine kinase Aurora A.

A coté de son rôle classique d'inhibiteur du cycle cellulaire, plusieurs études montrent que l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 inhibe l'activité transcriptionnelle de plusieurs facteurs de transcription notamment c-myc ou STAT3 (Delavaine and La Thangue 1999; Coqueret and Gascan 2000; Kitaura, Shinshi et al. 2000). Le facteur de transcription STAT3 est activé par diverses modifications post-traductionnelles, notamment par phosphorylation de la sérine 727 et de la tyrosine 705 (Zhong, Wen et al. 1994; Decker and Kovarik 2000). Historiquement, la phosphorylation de STAT3 sur la tyrosine 705 est induite lors d'un traitement des cellules avec différents mitogènes ou facteurs de croissance. Elle induit la dimérisation de ce facteur de transcription et sa translocation du cytoplasme vers le noyau où il peut alors activer ses différents gènes cibles. La phosphorylation de STAT3 sur la sérine 727 lors d'une stimulation mitogénique est également indispensable à l'activité transcriptionnelle de la protéine et son inhibition empêche le recrutement de protéines histones acétylases comme CBP/p300 au niveau des promoteurs de certains gènes cibles (Schuringa, Dekker et al. 2001; Zhao, Nakajima et al. 2004). D'autre part, plusieurs études montrent également que différentes molécules chimiothérapeutiques induisent la phosphorylation de la serine 727 des facteurs de transcription de la famille des STATs (Thomas, Finnegan et al. 2004). D'autres expériences montrent également que les dommages de l'ADN inhibent la liaison des STATs à l'ADN ainsi que leur phosphorylation sur la tyrosine 705 (Ravi, Jain et al. 2004). Ainsi la phosphorylation de STAT3 sur la sérine 727 lors de dommages de l'ADN pourrait modifier l'activité transcriptionnelle de ce facteur de transcription. Nous avons donc testé l'activation

de STAT3 sur la sérine 727 dans les cellules HCT116 lors de dommages de l'ADN induits par l'irinotecan. Des immunodétections de la forme phosphorylée sur la sérine 727 et de la forme totale de STAT3 sont donc réalisées sur des lysats cellulaires d'HCT116 traitées au sn38. Comme l'illustre la figure 34, le traitement au sn38 des cellules HCT116 induit la phosphorylation de STAT3 sur la sérine 727. Ce facteur de transcription pourrait donc être responsable de la régulation du gène de la protéine kinase Aurora A.

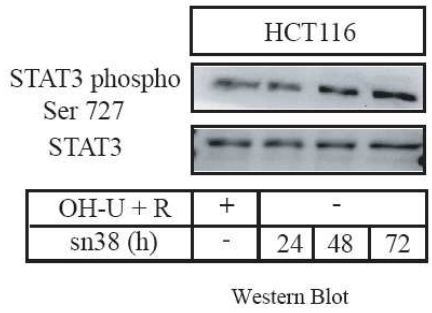


Figure 34 : Les dommages de l'ADN induits par le sn38 entraînent la phosphorylation du facteur de transcritpion STAT3 sur la sérine 727.

Aux différents temps indiqués, des extraits cellulaires totaux sont réalisés et analysés par western blot avec les anticorps dirigés contre la forme totale de STAT3 et la forme phosphorylée sur la serine 727 de STAT3 (n=3).

V Le facteur de transcription c-myc est responsable de la diminution d'expression d'Aurora A lors de dommages de l'ADN induits par le sn38

La protéine c-myc est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques. Il participe à la progression du cycle cellulaire et active notamment le gène de la cycline B, régulateur clé de la transition G2/M (Yin, Grove et al. 2001).

Son expression est diminuée lors de l'induction de dommages de l'ADN. En effet, une étude réalisée au laboratoire montre que le traitement avec la doxorubicine ou le sn38, des cellules fibroblastiques HT1080 et colorectales HCT116, induit l'inhibition de la synthèse de c-myc (Vigneron, Cherier et al. 2006). Nous avons donc voulu savoir s'il en était de même dans notre modèle. Des immunodétections de c-myc sont réalisées dans les cellules HCT116 après synchronisation en G2/M (OH-U+R) ou traitement au sn38. Ainsi, l'expression de la protéine c-myc suit l'expression d'Aurora A lors d'un traitement au sn38 et est donc diminuée (figure 35 A). De plus, l'expression de l'ARNm est également inhibée (figure 35 B). Ainsi, l'expression du facteur de transcription c-myc est inhibée lors de dommages de l'ADN induits par le sn38.

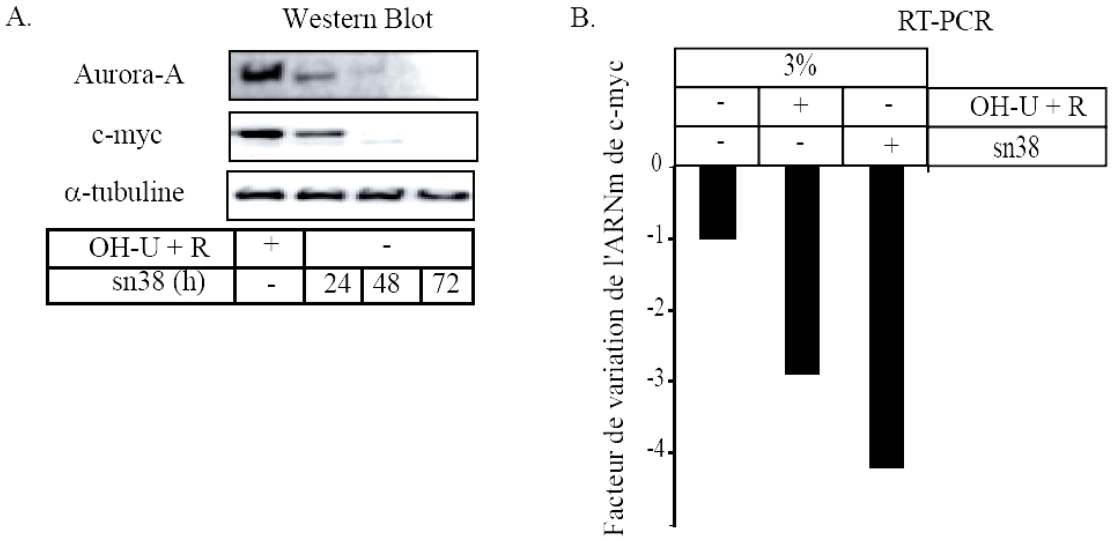


Figure 35 : L'expression du facteur de transcription c-myc est inhibée lors d'un traitement au sn38.

A. Effet du sn38 sur l'expression de la protéine c-myc. Aux différents temps indiqués, des extraits totaux sont réalisés et dosés, puis la détection des protéines Aurora A, α-tubuline et c-myc est réalisée par western blot (n=3).

B. Effet du sn38 sur l'expression de l'ARNm de c-myc. Une analyse par RT-PCR quantitative de l'expression de c-myc est réalisée. Les résultats sont normalisés à l'aide de l'expression de la GAPDH. Les points stimulés avec de l'OH-U+R ou au sn38 sont comparés au point en 3% SVF.

Du fait de l'implication de c-myc dans la progression du cycle cellulaire en phase G2/M, notamment par l'intermédiaire de l'activation du gène de la cycline B (Yin, Grove et al. 2001), de sa dérégulation lors d'un traitement induisant des dommages de l'ADN (Vigneron, Cherier et al. 2006), nous nous sommes interrogés sur l'implication de ce facteur de transcription dans la régulation de la protéine kinase Aurora A. D'autre part, le facteur de transcription STAT3 étant également activé sur la sérine 727 lors de dommages de l'ADN, nous nous sommes également interrogés sur l'implication de ce deuxième facteur de transcription dans la régulation du promoteur de la kinase.

Afin d'évaluer l'implication de ces différents facteurs de transcription dans la régulation transcriptionnelle d'Aurora A, des expériences de gène rapporteur sont réalisées.

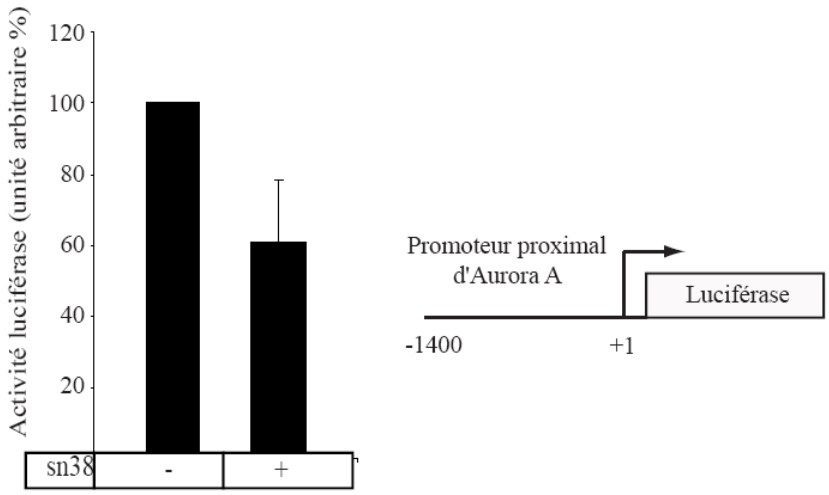


Figure 36 : Le promoteur proximal d'Aurora A est inhibé lors d'un traitement au sn38.
Les cellules HCT116 sont transfectées avec le plasmide codant pour le gène de la luciférase sous la dépendance du promoteur proximal d'Aurora A avec ou sans traitement au sn38. Après 48 h de traitement au sn38, des lysats cellulaires sont réalisés afin de mesurer l'activité luciférase (n=3).

Les cellules HCT116 sont transfectées transitoirement avec un plasmide portant le gène de la luciférase sous la dépendance des 1400 nucléotides situés en amont du site initiateur de la transcription du promoteur du gène d'Aurora A. Les cellules sont ensuite stimulées au sn38 pendant 48 h, des lysats cellulaires sont réalisés et l'activité de la luciférase est alors mesurée. Comme le montre la figure 36, la stimulation au sn38 diminue de 40 % l'activation du gène rapporteur. Ainsi, il existe bien une régulation transcriptionnelle du gène d'Aurora A. Des facteurs de transcription se lient à son promoteur, en absence de dommages de l'ADN et sont donc responsables de l'activation du gène. Les protéines c-myc et STAT3 sont donc des facteurs de transcription pouvant participer à la régulation du promoteur d'Aurora A. Afin de valider cette hypothèse, des expériences d'immunoprécipitation de chromatine sont mises en place.

Pour cela, une analyse du promoteur de la kinase est réalisée. La séquence du promoteur d'Aurora A humaine est récupérée à partir de la base de données *HomoloGene* de *ncbi* sous la référence *GeneID : 6790.* Les 1400 premiers nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription sont ainsi analysés. Le facteur de transcription c-myc se lie à la séquence consensus E canonique : 5'-CACGTG-3' (Dang 1999) mais également sur des séquences consensus E non canoniques 5'-CATGTG-3', 5'-CACGCG-3', 5'-CATGCG-3', 5'-CACGAG-3', et 5'-CACGTTG-3' (Haggerty, Zeller et al. 2003; Zeller, Jegga et al. 2003).

Nous avons donc entrepris la recherche de ces séquences sur les 1400 nucléotides du promoteur d'Aurora A. Les résultats sont présentés dans la figure 37 qui suit.

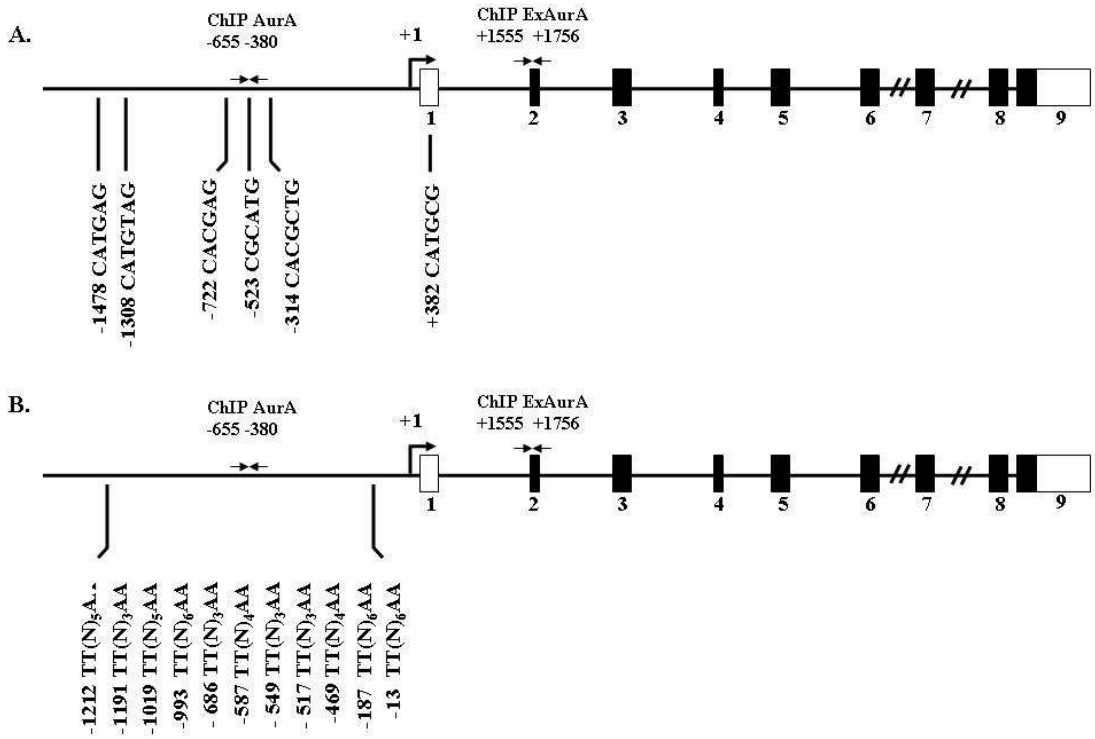


Figure 37 : Localisation des sites potentiels de fixation des facteurs de transcription c-myc (A.) et STAT3 (B.) sur le promoteur du gène d'Aurora A.

Les neufs exons du gène d'Aurora A sont ici représentés par des rectangles. Les rectangles blancs représentent les exons transcrits mais non traduits tandis que les rectangles noirs représentent les exons transcrits et traduits à partir de l'ATG situé au début de l'exon 2. Le premier nucléotide transcrit (+1) est également représenté. La localisation des amorces de ChIP utilisées dans les expériences suivantes est également présentée (ChIP AurA -635 -380 et ChIP ExAurA +1555 +1756).

Plusieurs séquences E non canoniques de c-myc sont ainsi retrouvées le long du promoteur de la kinase Aurora A et pourraient donc permettre la fixation de ce facteur de transcription. Nous avons également constaté l'existence de sites consensus de fixation de STAT3 tout le long du promoteur d'Aurora A (5'-TT(N)$_{3,4,5,6}$AA-3') (Darnell, Kerr et al. 1994; Mui, Wakao et al. 1995; Ihle 1996). La taille des fragments d'ADN générés lors de la sonication des échantillons soumis au ChIP est évaluée entre 500 et 400 pb. Aussi, nous avons choisi un couple d'amorces amplifiant la région -655 -380 et couvrant la région du promoteur où se localise la majorité des sites potentiels de fixation du facteur de transcription c-myc. La région contrôle utilisée correspond à la région -2760 -2486 du promoteur de p21 déjà caractérisée au laboratoire (Giraud, Hurlstone et al. 2004).

Dans le but d'évaluer la fixation de ces facteurs de transcription sur le promoteur d'Aurora A lors de lésions de l'ADN, des expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) sont donc réalisées dans les cellules HCT116 à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine c-myc et STAT3, lors d'un traitement au sn38 pendant 48 h ou d'une synchronisation en G2/M. La figure 38 présente les résultats obtenus et correspond à l'enrichissement de l'ADN lié de manière directe ou indirecte à c-myc et STAT3.

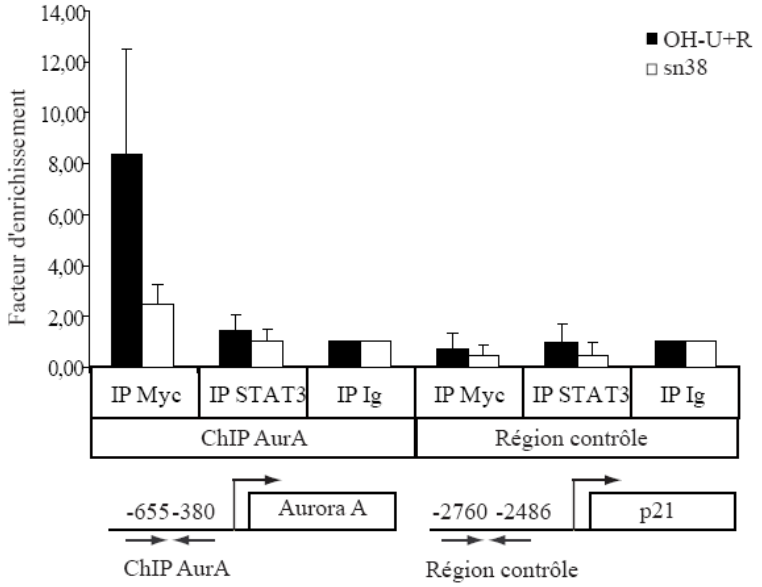


Figure 38 : Le facteur de transcription c-myc se fixe au promoteur d'Aurora A en absence de dommages de l'ADN.

Expérience de ChIP analysant la fixation des facteurs de transcription c-myc et STAT3 sur le promoteur proximal d'Aurora A après synchronisation des cellules HCT116 en phase G2/M (OH-U+R) ou traitement au sn38. Les PCR quantitatives sont réalisées sur les immunoprécipitations de chromatine. IP, immunoprécipitation (n=3).

Ainsi, la protéine c-myc est recrutée sur le promoteur d'Aurora A en absence de traitement cytotoxique. Cependant lors d'une stimulation avec du sn38, la fixation de c-myc est inhibée sur le promoteur du gène d'Aurora A. Le facteur de transcription STAT3 ne se fixe pas sur la région du promoteur amplifiée et ne semble donc pas impliqué dans la régulation de ce gène.

VI Régulation du promoteur d'Aurora A par le facteur de transcription c-myc

Afin de confirmer l'implication de c-myc dans la régulation du gène d'Aurora A, les cellules LS174T transfectées de façon stable avec les vecteurs inductibles codants pour deux RNAi de c-myc de séquences différentes sont utilisées et notées LS174T#1 et LS174T#2 (van de

Wetering, Oving et al. 2003). L'étude de l'expression des protéines c-myc et Aurora A est réalisée simultanément, dans les cellules LS174T et les cellules LS174T ou les RNAi de c-myc sont induits ou non en présence de doxycycline.

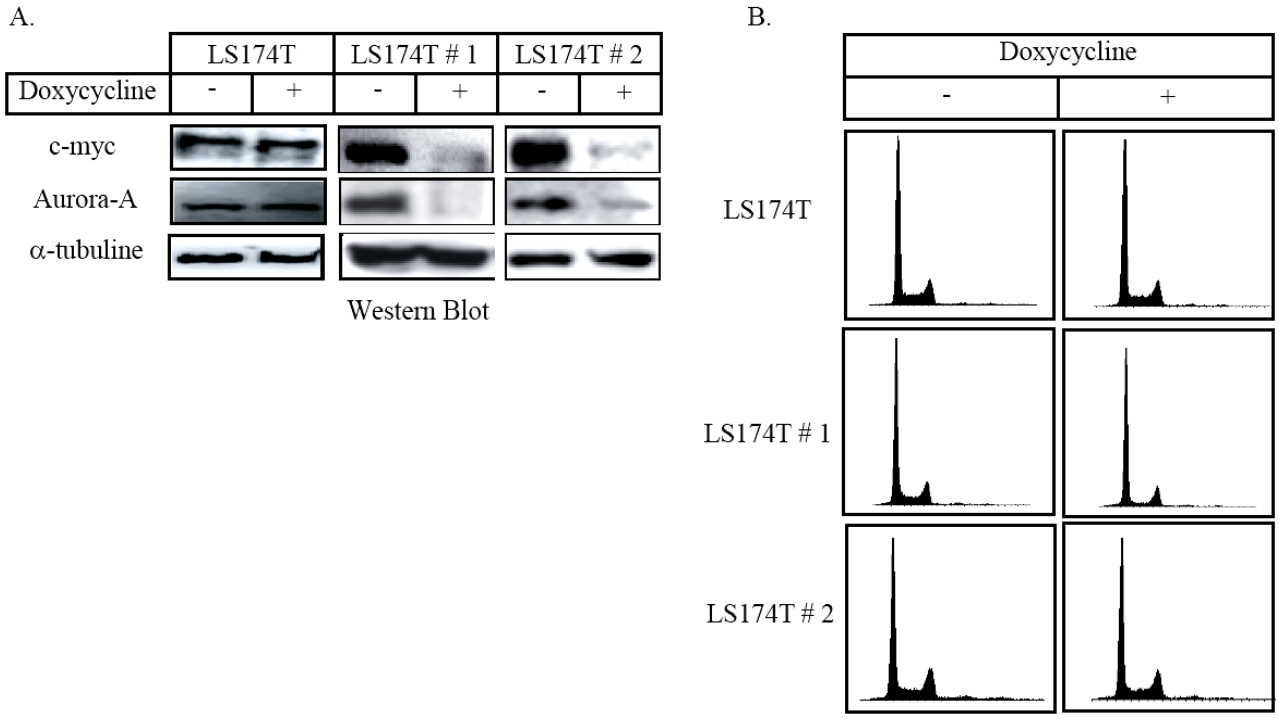


Figure 39 : L'inhibition de l'expression du facteur de transcription c-myc induit une diminution d'expression de la kinase Aurora A.

A. Détection d'Aurora A et de c-myc par western blot, dans les cellules LS174T et les LS174T #1 et LS174T #2 ou deux RNAi différents de c-myc sont induits avec 1 µg/ml de doxycycline pendant 48 h en RPMI 5 % SVF (n=3).

B. Analyse par cytométrie de flux du cycle cellulaire des cellules LS174T, LS174T #1 et LS174T #2 après ajout d'1 µg/ml de doxycycline pendant 48 h. Après fixation, perméabilisation des cellules et traitement à la RNase, l'iodure de propidium est ajouté et les cellules sont analysées au FACScan (n=3).

D'autres part, l'étude est réalisée en RPMI 5 % SVF afin d'analyser l'implication de c-myc dans la régulation du promoteur d'Aurora A dans les cellules en croissance et non en présence de dommages de l'ADN. Les résultats sont présentés dans la figure 39.

Ainsi lors du traitement de 48 h des cellules à la doxycycline, l'expression de la protéine c-myc est fortement inhibée. L'expression d'Aurora A est aussi réduite lors de l'induction des différents RNAi de c-myc (figure 39 A). L'absence de modification des cytogrammes dans ces cellules lors de l'induction ou non des RNAi de c-myc par traitement à la doxycycline montre également que la diminution d'Aurora A n'est pas due à une modification de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (figure 39 B).

Afin de confirmer l'implication du facteur de transcription c-myc dans la régulation normale du promoteur du gène de la kinase Aurora A, des expériences de ChIP sont également réalisées.

Dans des conditions normales, les promoteurs des gènes et leurs zones de régulation sont difficilement accessibles aux facteurs de transcription du fait de la compaction de la molécule d'ADN autour des protéines histones, nommé alors nucléosomes. Pour être activées, les régions promotrices et régulatrices des gènes doivent faciliter leur accessibilité aux facteurs de transcription. Pour cela, l'ouverture du nucléosome est nécessaire. Il existe différentes modifications post-traductionnelles des histones, la plus étudiée est l'acétylation et permet notamment le relâchement de la chromatine (Berger 2001). Les histones acétylases transfèrent un groupement acétyl sur les histones. Les facteurs de transcription interagissent donc avec différents co-facteurs (co-activateurs ou co-répresseurs) favorisant ainsi leur liaison à l'ADN. Les co-activateurs de la transcription sont associés à des activités histone acétyltransférases, alors que les co-répresseurs sont associés à des déacétylases. L'acétylation des histones sur les lysines abouti à une neutralisation des charges positives des histones. Une diminution de l'interaction entre l'ADN et les histones permet alors le déplacement du nucléosome et l'augmentation de l'accessibilité des régions régulatrices ou promotrices de la chromatine pour l'ARN polymérase. Plusieurs phosphorylations de l'ARN polymérase dans son domaine carboxy-terminal sont nécessaires à son activation ainsi qu'à la régulation de l'élongation des ARNm. La phosphorylation sur la sérine 2 est notamment associée à l'initiation de l'élongation de l'ARNm (Ahn, Kim et al. 2004).

Ainsi, des immunoprécipitations de c-myc, de la forme acétylée sur la lysine 9 de l'histone H3 et de l'ARN polymérase II phosphorylée sur la sérine 2, sont réalisées sur des lysats de cellules LS174T dans lesquelles un RNAi de c-myc est induit ou non en présence de doxycycline. Cette étude est réalisée en RPMI 3 % SVF afin d'analyser la régulation du promoteur d'Aurora A dans les conditions physiologiques, en absence de dommages de l'ADN. Les résultats sont présentés dans la figure 40 suivante.

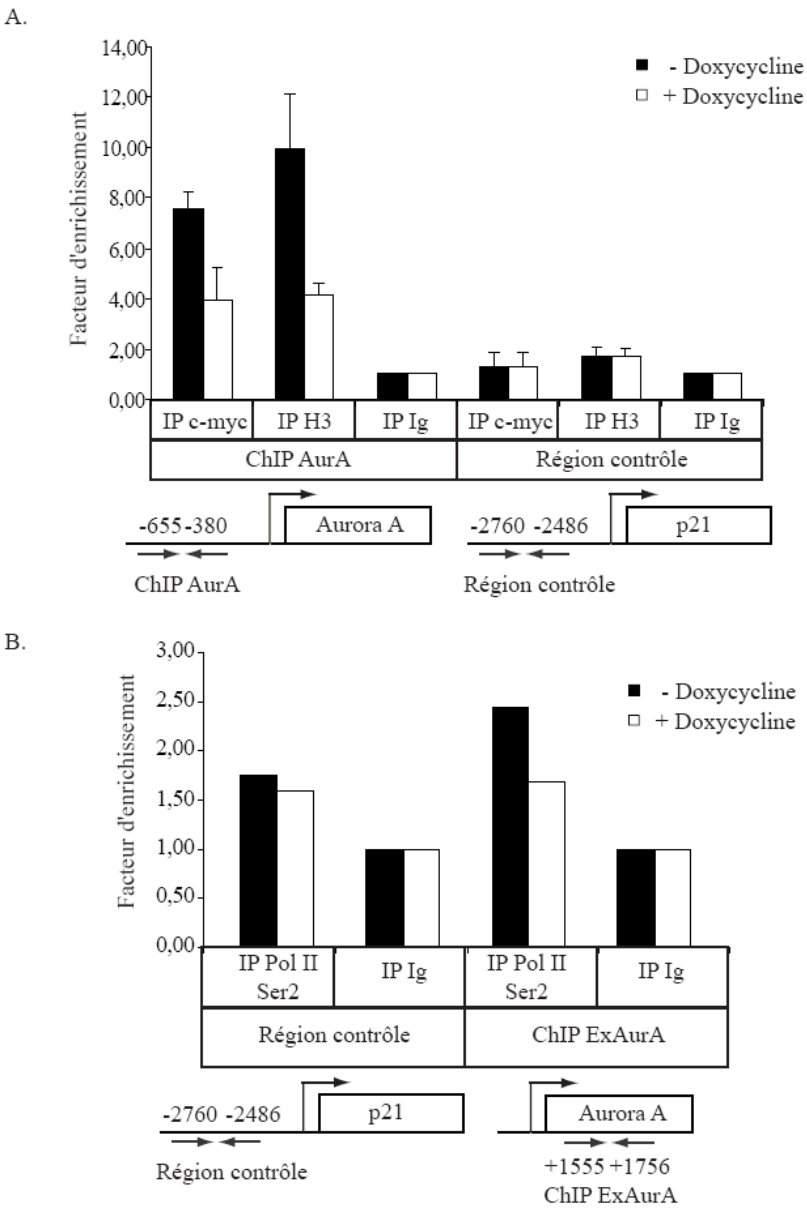


Figure 40 : Régulation du promoteur d'Aurora A par le facteur de transcription c-myc dans les cellules LS174T. Les PCR sont réalisées sur les immunoprécipitations de chromatine dans les cellules LS174T après induction ou non du RNAi de c-myc par la doxycycline 1 µg/ml pendant 48 h.

A. Expériences de ChIP analysant la fixation de c-myc et de l'acétylation de l'histone H3 sur le promoteur d'Aurora A (n=3).

B. Expériences de ChIP analysant la fixation de la forme d'élongation de l'ARN polymérase II sur le gène d'Aurora A (n=1).

En absence d'induction du RNAi, le facteur de transcription c-myc est exprimé et se fixe sur le promoteur d'Aurora A (figure 40 A). Les protéines histones H3 sont également acétylées au niveau du promoteur du gène (figure 40 A). La forme élongatrice de l'ARN polymérase II, phosphorylée sur la sérine 2 est recrutée sur le gène d'Aurora A (figure 40 B). En revanche,

lorsque le facteur de transcription c-myc est inhibé, il n'est plus détectable sur le promoteur du gène d'Aurora A et les protéines histones H3 ne sont désacétylées (figure 40 A), la forme élongatrice de l'ARN polymérase II n'est alors plus détectable sur le gène d'Aurora A.

Ainsi, le facteur de transcription c-myc semble être un régulateur du gène d'Aurora A. Il permet sans doute le recrutement de différents co-facteurs à activité acétyl transférase sur le promoteur proximal de la kinase, permettant alors la neutralisation des charges positives des protéines histones H3, favorisant le relâchement de la chromatine et augmentant son accessibilité à l'ARN polymérase. Cette dernière pourrait alors se fixer au niveau du promoteur du gène ; son activation, par phosphorylation de la sérine 2, lui permettrait alors de parcourir le gène entraînant la production de l'ARNm.

VII Analyse de l'expression de la kinase Aurora A et de c-myc chez des patients atteints de cancers colorectaux

Afin d'appuyer la régulation du gène d'Aurora A par le facteur de transcription c-myc, nous avons cherché à savoir s'il existait chez les patients atteints de cancers colorectaux métastatiques une corrélation entre l'expression de l'ARNm d'Aurora A et de c-myc. L'étude a donc porté sur une population de onze patients, l'extraction d'ARNm est réalisée pour chaque patient à partir de prélèvements de tumeurs et de tissus sains, congelés au sein de la tumorothèque du Centre Régional de Lutte Contre le Cancer, CRLCC Paul PAPIN. 2 µg d'ARN sont utilisées afin de réaliser des RT-PCR quantitatives. Celles-ci sont ensuite analysées en prenant pour référence les ARNm des tissus sains de chaque patient et en normalisant les données par rapport à la GADPH. Comme le montre la figure 41 A, une surexpression de l'ARNm de la kinase Aurora A et du facteur de transcription c-myc est observable dans les tumeurs colorectales. Parmi les onze patients atteints de cancer colorectal étudiés, huit présentent une surexpression d'Aurora A (72 % des patients présentent donc une surexpression d'Aurora A) (figure 41 B). Ce pourcentage de surexpression d'Aurora A est comparable à celui retrouvé dans la littérature. En effet, une surexpression d'Aurora A est également retrouvée dans 60 % des tumeurs, hépatiques, gastriques ou ovariennes (Jeng, Peng et al. 2004) (Zhou, Kuang et al. 1998; Sakakura, Hagiwara et al. 2001; Gritsko, Coppola et al. 2003).

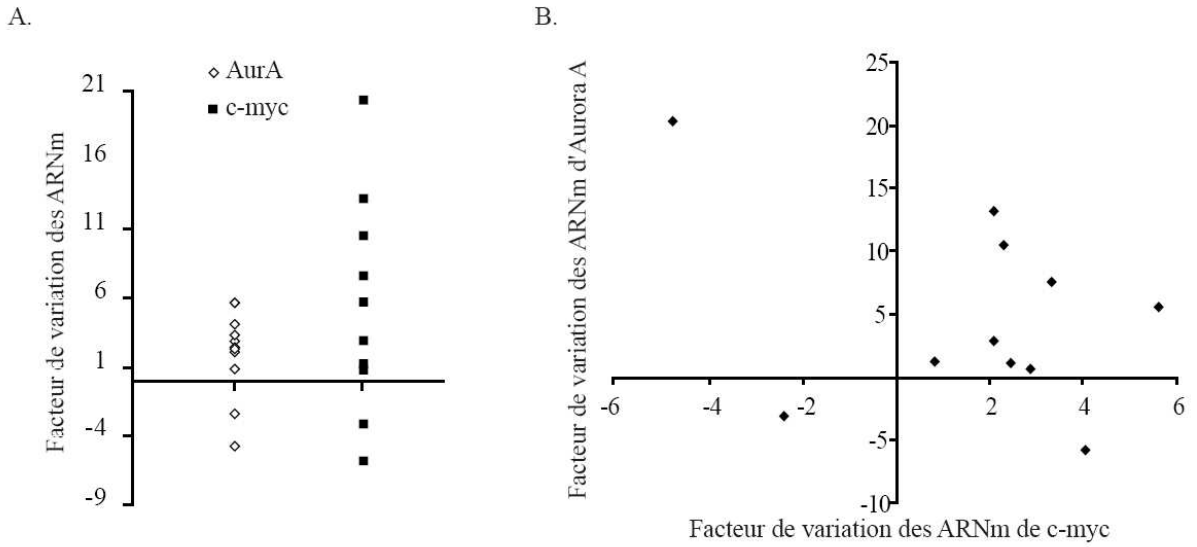


Figure 41 : Analyse de l'expression des ARNm d'Aurora A et de c-myc dans les tumeurs de patients atteints de cancers colorectaux.

Les ARNm des tissus sains et tumoraux de chaque patient sont extraits par la technique Trizol® en suivant les indications du fabriquant. Les ARNm sont ensuite dosés et leur qualité est évaluée avec les rapports 260/280 et 260/230. 2 µg d'ARN sont utilisés pour réaliser les RT, les PCR en temps réel sont ensuite effectuées.

A. Expression des ARNm d'Aurora A et de c-myc.

B. Expression des ARNm d'Aurora A en fonction de l'expression des ARNm de c-myc.

Cette présentation des résultats semble donc montrer l'existence d'une corrélation entre l'expression d'Aurora A et c-myc. Cependant, si l'expression d'Aurora A et de c-myc est représentée pour chaque patient de manière individuelle, les résultats sont présentés dans la figure 42.

Aucune étude statistique ne peut être réalisée sur un nombre de patients aussi réduit. Néanmoins, l'étude au cas par cas nous indique que l'expression d'Aurora A et de c-myc est corrélée dans 7 cas sur 11 (patients 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10). Ainsi, la surexpression de c-myc et de la kinase Aurora A est observée pour 5 cas sur 11 (patient 1, 6, 7, 8 et 10). La sousexpression de c-myc et d'Aurora A dans les tumeurs par rapport au tissu sain, est également retrouvée pour le patient 9. En revanche, deux patients de l'étude présentent des variations d'expression opposées de c-myc et d'Aurora A (patients 3 et 11). D'autre part, l'absence de variation d'expression de c-myc dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain pour les patients 4 et 5 est suivie d'une sous expression d'Aurora A. Ainsi, la corrélation d'expression entre c-myc et Aurora A dans les tumeurs de patients atteints de cancer colorectal reste encore à approfondir.

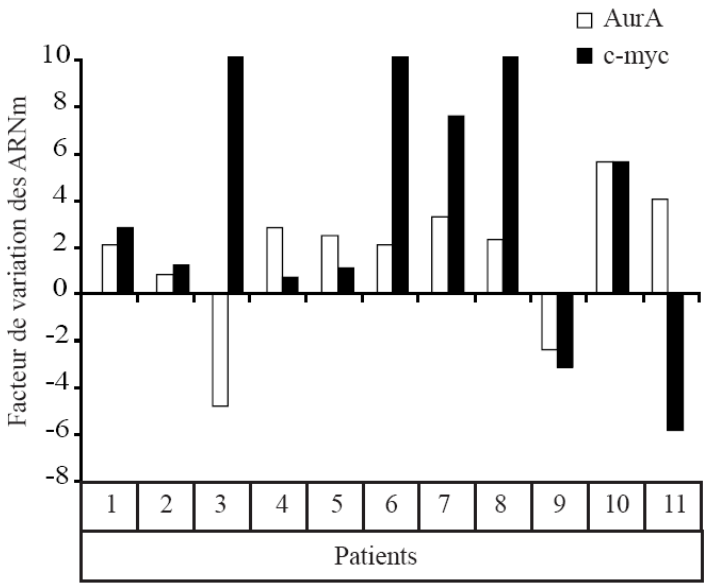


Figure 42 : Expression des ARNm d'Aurora A et de c-myc dans les tumeurs par rapport au au tissu sain.

VIII La surexpression d'Aurora A induit-elle une résistance des cellules colorectales au traitement par sn38 ?

Plusieurs études semblent corréler la surexpression Aurora A à l'incapacité des cellules à induire le point de contrôle de l'état de l'ADN, ainsi que le point de contrôle du fuseau mitotique. Une étude montre également que la surexpression d'Aurora A est associée à une résistance des cellules Hela au taxol (Farruggio, Townsley et al. 1999; Anand, Penrhyn-Lowe et al. 2003; Jiang, Zhang et al. 2003; Cazales, Schmitt et al. 2005; Krystyniak, Garcia-Echeverria et al. 2006). Chez les patients atteints de cancers colorectaux, l'efficacité du traitement par irinotecan reste modeste et certains présentent des résistances à cette molécule. Nous avons donc testé la sensibilité des cellules colorectales au sn38 lors de la surexpression d'Aurora A. Ainsi, les cellules HCT116 sont transfectées de façon transitoire avec un vecteur recombinant, codant pour la protéine Aurora A associée à une étiquette GFP (AurA-GFP) ou avec le vecteur contrôle (pEGFP-C1). Les cellules surexprimant Aurora A sont ainsi triées par analyse différentielle de fluorescence en cytométrie de flux. Les cellules sont traitées pendant 48 h avec du sn38 et le pourcentage de cellules apoptotiques est déterminé après marquage des cellules à l'iodure de propidium et analyse au cytomètre de flux de la population cellulaire en sub-G1 (contenu des cellules en ADN inférieur à 2N chromosomes). Les résultats sont présentés dans la figure 43 qui suit. Il est tout d'abord intéressant de noter l'importance de la population cellulaire en sub-G1, même en absence de traitement au sn38, dans les cellules HCT116 transfectées avec le vecteur contrôle pEGFP-C1 ou avec le vecteur recombinant

AurA-GFP qui peut s'expliquer par une toxicité cellulaire induite par la transfection en lipofectamine. D'autre part, le traitement de 48 h de sn38 ne semble pas suffisant pour induire une mortalité importante des cellules. Néanmoins, les cellules surexprimant Aurora A et traitées au sn38 présentent un pourcentage de cellules en sub-G1 inférieur aux cellules transfectées avec un vecteur contrôle et traitées au sn38. Ainsi, la surexpression d'Aurora A pourrait entraîner une résistance des cellules à induire la mort cellulaire, mais reste encore à confirmer en améliorant certainement la technique de transfection.

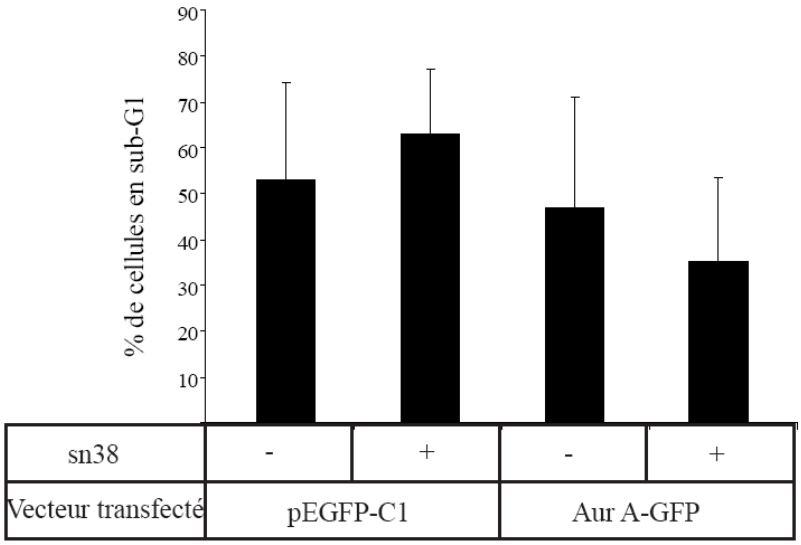


Figure 43 : Résistance des cellules à l'irinotecan induite par la surexpression d'Aurora A.
Les cellules sont semées en plaque six puits, puis transfectées avec les différents vecteurs : pEGFP-C1 et AurA-GFP. Les cellules sont ensuite traitées pendant 48 h avec du sn38 à 10 ng/ml. Le pourcentage de cellules en sub-G1 est ensuite évalué par marquage à l'iodure de propidium des cellules et analyse au cytomètre de flux (n=2).

IX La surexpression d'Aurora A est elle associée dans les tumeurs colorectales à la résistance au traitement ?

Nos résultats suggèrent que la surexpression d'Aurora A dans la lignée tumorale colorectale HCT116 pourrait entraîner la résistance des cellules au traitement. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres équipes notamment en traitant des cellules tumorales Hela avec le taxol, traitement de référence des cancers ovariens ou du sein (Anand, Penrhyn-Lowe et al. 2003).

Afin d'assurer le transfert clinique de ces résultats, le laboratoire d'anatomopathologie a mis au point la détection par immunohistochimie de la kinase Aurora A sur des tumeurs de patients atteints de cancer colorectal métastatique. L'équipe du Dr Valo a ensuite réalisé des marquages sur des coupes de tumeurs de patients atteints de cancers colorectaux. Les résultats

sont présentés dans la figure 44 qui suit. L'équipe du Dr Valo a tout d'abord testé l'anticorps dirigé contre Aurora A sur des coupes de tumeurs d'œsophage et mammaires. En effet, plusieurs études observent une surexpression de cette protéine au sein de ces tumeurs (Goepfert, Adigun et al. 2002; Tong, Zhong et al. 2004). Ainsi, dans le tissu sain, une expression punctiforme d'Aurora A est observée à la base de l'épithélium oesophagien et mammaire. Ainsi, on peut penser que les cellules souches oesophagiennes localisées au niveau de la membrane basale du tissu conjonctif et assurant le renouvellement du tissu, se divisent rapidement par mitose et permettent donc l'observation d'Aurora A au sein des centrosomes.

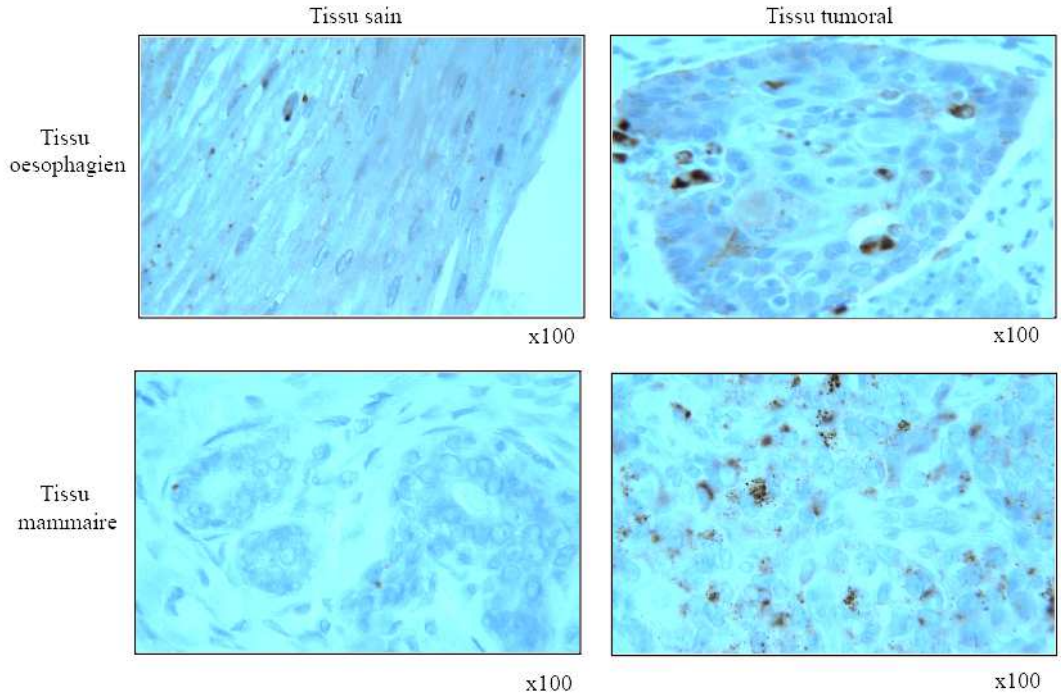


Figure 44 : Détection d'Aurora A dans les tissus sains et les tumeurs de l'œsophage et du sein.

Dans le tissu mammaire présentant un taux de renouvellement faible des cellules, seules quelques cellules se divisent et permettent l'observation d'Aurora A. Le tissu tumoral présente une surexpression anarchique d'Aurora A dont la localisation subcellulaire précise est difficile à déterminer.

Le marquage d'Aurora A par immunohistochimie, au sein des tumeurs de colorectales est néanmoins plus complexe à analyser (figure 45).

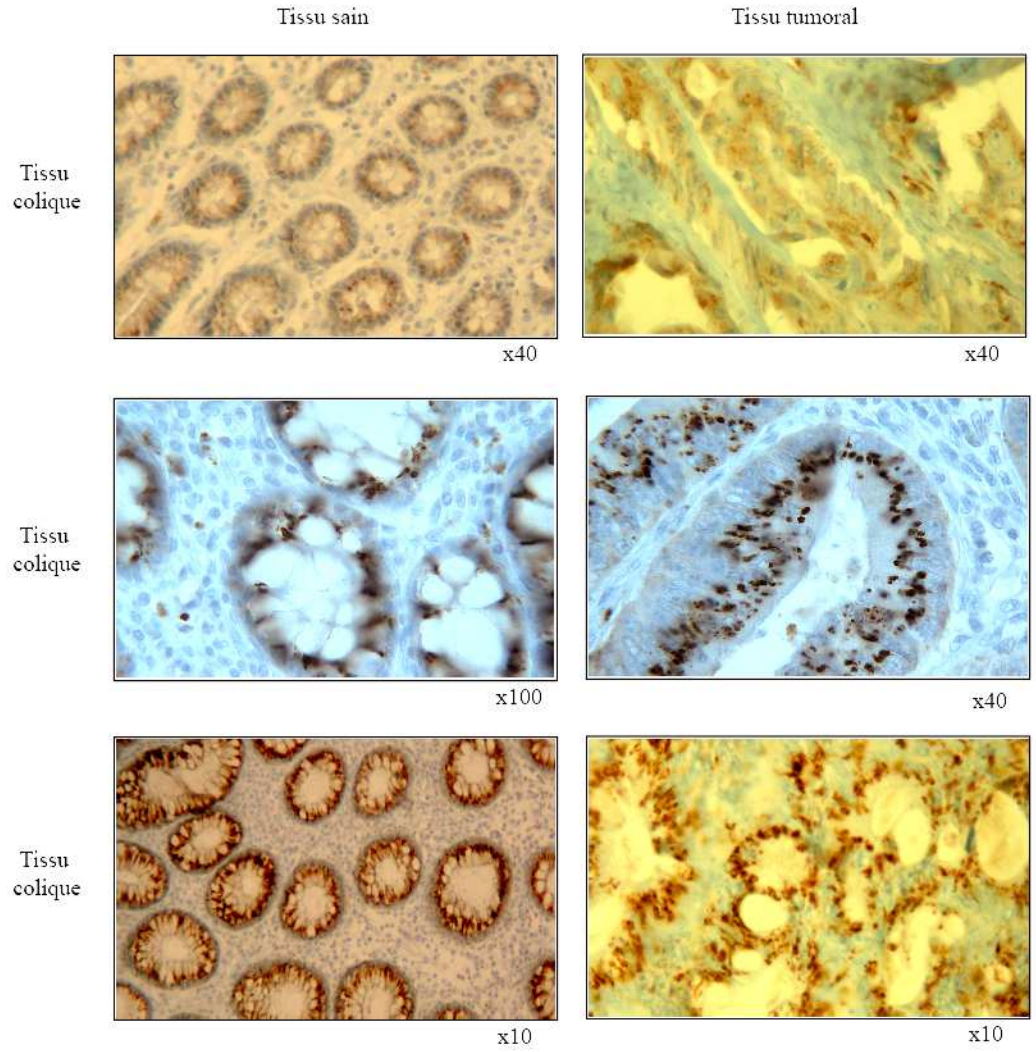


Figure 45 : Détection d'Aurora A par immunohistochimie dans les tissus sains et les tumeurs du colon.

Pour certaines coupes de tumeurs, le tissu sain localisé en périphérie de la tumeur présente un faible marquage d'Aurora A, au pôle apical des cellules, laissant penser à un faible marquage non spécifique. Cependant, dans la majorité des cas, le tissu sain montre un marquage intense du pôle apical de l'ensemble des cellules des cryptes colorectales. Ce marquage semble spécifique du tissu colorectal, puisque aucun marquage n'est observé dans les autres tissus sains testés, comme l'œsophage ou le sein (figure 44). Le tissu tumoral présente quand à lui un marquage diffus et anarchique d'Aurora A de 50 à 100 % des cellules.

La kinase Aurora A est exprimée dans les cellules proliférantes lors d'un court interval de temps, entre la phase G2 et la fin de la mitose. Son expression dans les tissus sains de façon ubiquitaire nous semblait donc suspecte. Le statut prolifératif des tumeurs colorectales et des tissus sains périphériques est alors analysé. Pour cela, l'équipe d'anatomopathologie réalise des marquages de l'antigène nucléaire Ki-67. Cette protéine de 36 kDa est exprimée de façon ubiquitaire par les cellules durant toutes les phases du cycle cellulaire G1, S, G2 et M mais

absente des cellules quiescentes (G0) (Gerdes, Schwab et al. 1983; Gerdes, Lemke et al. 1984). Cet antigène est utilisé classiquement en anatomopathologie afin de détecter la fraction de cellules proliférantes dans les tumeurs humaines (Gerdes 1990). Les résultats sont présentés dans la figure 46 qui suit.

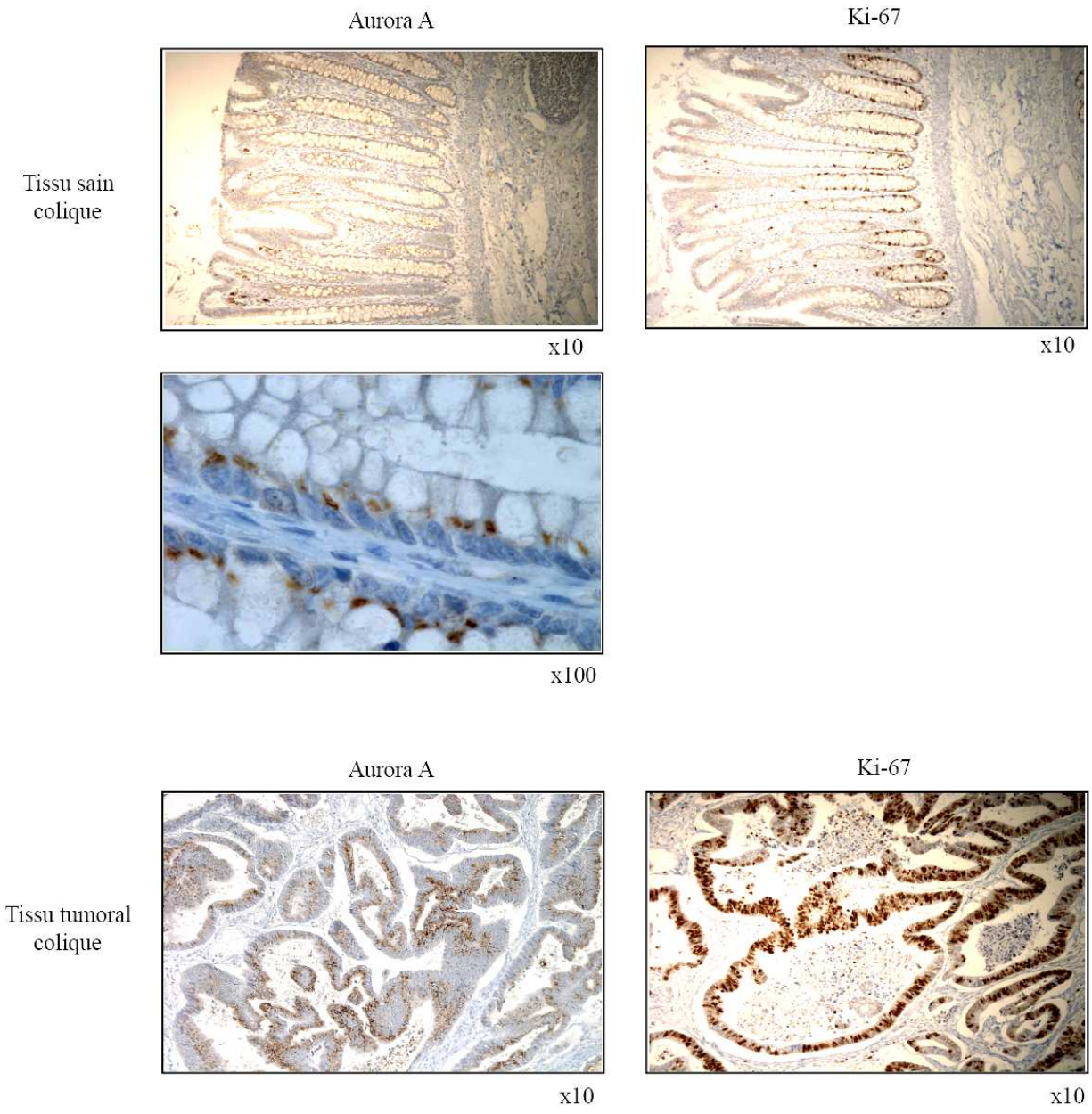


Figure 46 : Expression d'Aurora A et de l'antigène Ki-67 dans les tissus sains et tumoraux colorectaux.

Le marquage du Ki-67 des tissus sains montre que les cellules localisées au fond des cryptes expriment cette protéine. Puis, son expression diminue graduellement vers la surface du tissu. Parallèlement, le marquage d'Aurora A montre que la totalité des cellules des cryptes saines est marquée (figure 46). Du fait de son expression en phase G2/M, le pourcentage de cellules

marquées avec Aurora A devrait se superposer au marquage du Ki-67. Le marquage d'Aurora A dans les tissus sains colorectaux nous pose donc problème.

Nous avons cependant souhaité analyser l'expression d'Aurora A en fonction du statut prolifératif dans les tumeurs colorectales. Le pourcentage de cellules exprimant l'antigène Ki-67 et Aurora A est donc évalué sur des coupes de tumeurs de quinze patients atteints de cancers colorectaux. Les résultats sont présentés dans la figure qui suit.

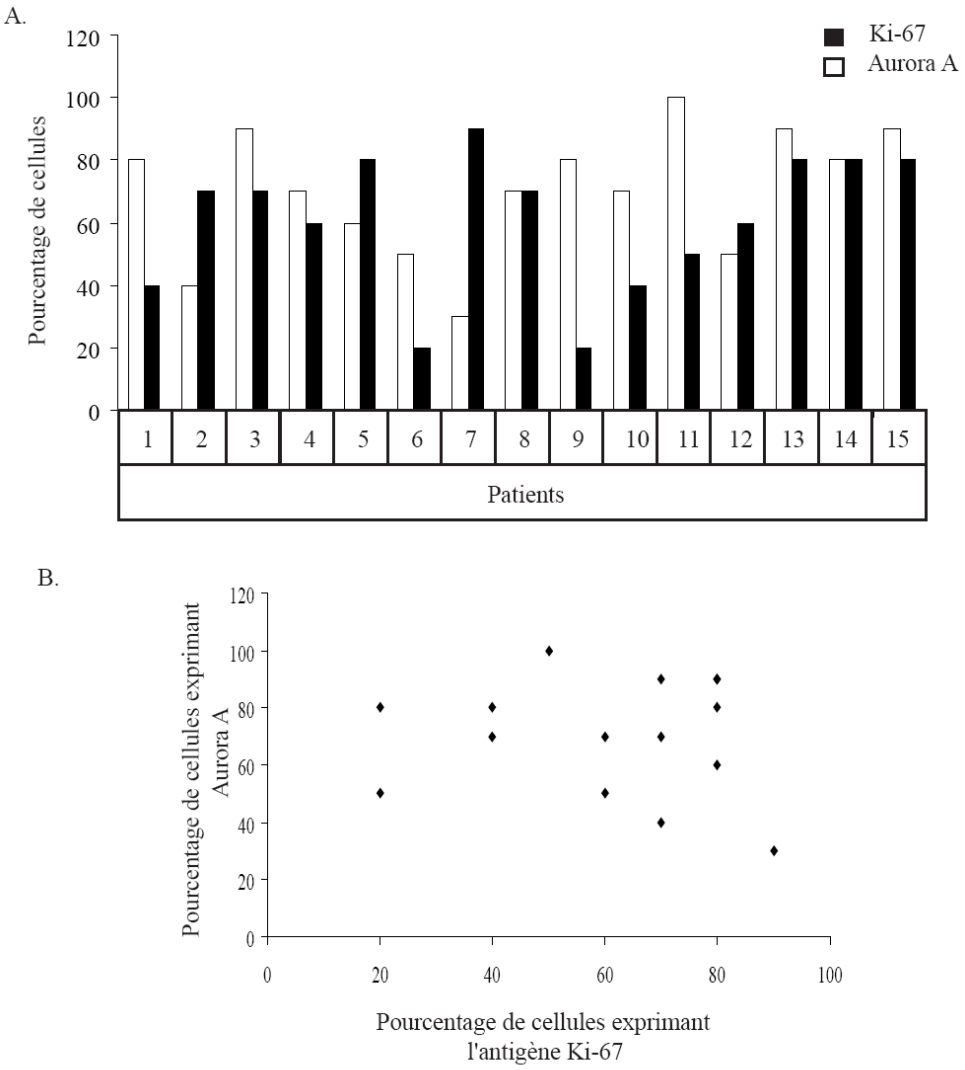


Figure 47 : Expression d'Aurora A et de l'antigène nucléaire Ki-67 dans les tumeurs colorectales.
A. Pourcentage de cellules exprimant Aurora A et l'antigène Ki-67 pour chaque patient.
B. Expression du pourcentage de cellules exprimant Aurora A en fonction de l'expression de l'antigène Ki-67.

Plusieurs études nous indiquent que l'expression d'Aurora A augmente dans diverses tumeurs (Zhou, Kuang et al. 1998; Sakakura, Hagiwara et al. 2001; Gritsko, Coppola et al. 2003). De plus, son expression ne semble plus restreinte aux seules phases G2 et M du cycle cellulaire,

une localisation diffuse dans le cytoplasme est également rapportée (Tanaka, Kimura et al. 1999; Gritsko, Coppola et al. 2003). Les marquages réalisés sur les tumeurs colorectales semblent confirmer ces observations. En effet, l'expression d'Aurora A ne semble pas restreinte aux centrosomes ni au fuseau mitotique mais plutôt diffuse dans le cytoplasme des cellules (figures 45 et 46). L'analyse de l'expression d'Aurora A et du Ki-67 dans les tumeurs semble indiquer un pourcentage de cellules marquées sensiblement identique pour six des patients de l'étude (patients 4, 8, 12, 13, 14 et 15). Pour les autres patients, le pourcentage d'expression entre Aurora A et l'antigène Ki-67 diffère d'au moins 20 % (figure 47 A).
Ainsi, n'ayant pas obtenu de marquage spécifique d'Aurora A convaincant dans les tissus sains, nous n'avons pas poursuivi notre étude sur les tumeurs coliques. D'autre part, nous n'avons pas testé l'implication de la surexpression d'Aurora A dans la résistance au traitement par irinotecan.

X Effet de la surexpression de Ras sur Aurora A dans les cellules tumorales colorectales

Dans cette partie, nous avons voulu nous intéresser à une nouvelle voie de régulation impliquant Aurora A. Plusieurs études montrent que l'activation de la voie Ras/MAPK est associée à une modification d'expression d'Aurora A dans divers modèles de tumeurs, pancréatiques et orales (Tatsuka, Sato et al. 2005; Furukawa, Kanai et al. 2006). Une étude associe également la surexpression d'Aurora A à la présence de la forme oncogénique de Ras dans les tumeurs de la vessie (Tseng, Tzeng et al. 2006). Une surexpression d'Aurora A est retrouvée dans de nombreuses tumeurs hépatiques, gastriques ou ovariennes (Jeng, Peng et al. 2004) (Zhou, Kuang et al. 1998; Sakakura, Hagiwara et al. 2001; Gritsko, Coppola et al. 2003). Ras présente une mutation sur le codon 12 dans 50% des tumeurs colorectales (Bos 1989). D'autre part, les tumeurs colorectales présentent très souvent une mutation inactivante de p53 entraînant la plupart du temps sa perte de fonction gène suppresseur de tumeur (Bunz, Hwang et al. 1999). Ainsi, nous nous sommes intéressés au lien existant entre Aurora A et l'oncogène Ras dans le cancer colorectal présentant une inactivation de p53.
Pour cela, la lignée colorectale HT29 est utilisée. En effet, elle présente une mutation sur le codon 273 du gène de p53 rendant alors la protéine inactive. Cette lignée est donc transfectée de façon stable avec un vecteur contrôle (HT29R1/T0) ou un vecteur inductible codant pour la forme oncogénique de Ras (Ras Val12) (HT29R1/Ras) et constitue notre modèle d'étude des tumeurs colorectales présentant l'oncogène Ras ainsi qu'une inactivation de p53.

Dans un premier temps, nous avons contrôlé l'induction de l'oncogène en présence de tétracycline. Pour cela, des immunodétections de Ras sont réalisées sur les lysats des cellules HT29R1/T0 et HT29R1/Ras lors d'un traitement à la tétracycline. D'autre part, nous avons également analysé l'activité de la forme oncogénique de Ras. La littérature nous montre que l'oncogène Ras active notamment par phosphorylation la voie des MAPK (White, Nicolette et al. 1995; Khosravi-Far, White et al. 1996; Rodriguez-Viciana, Warne et al. 1997). Des immunodétections de la forme totale et phosphorylée des MAPK sont donc réalisées dans les cellules HT29R1/T0 et HT29R1/Ras. Comme le montre la figure 48 A, lors de l'induction de la protéine Ras, la phosphorylation des MAPK est observée, démontrant ainsi l'activité de l'oncogène.

Parallèlement, l'analyse de la quantité d'ADN des cellules HT29R1/T0 et HT29R1/Ras, est réalisée en présence ou non de traitement induisant des lésions de l'ADN. La figure 48 B nous permet de constater une accumulation des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire lors de l'induction de l'oncogène Ras.

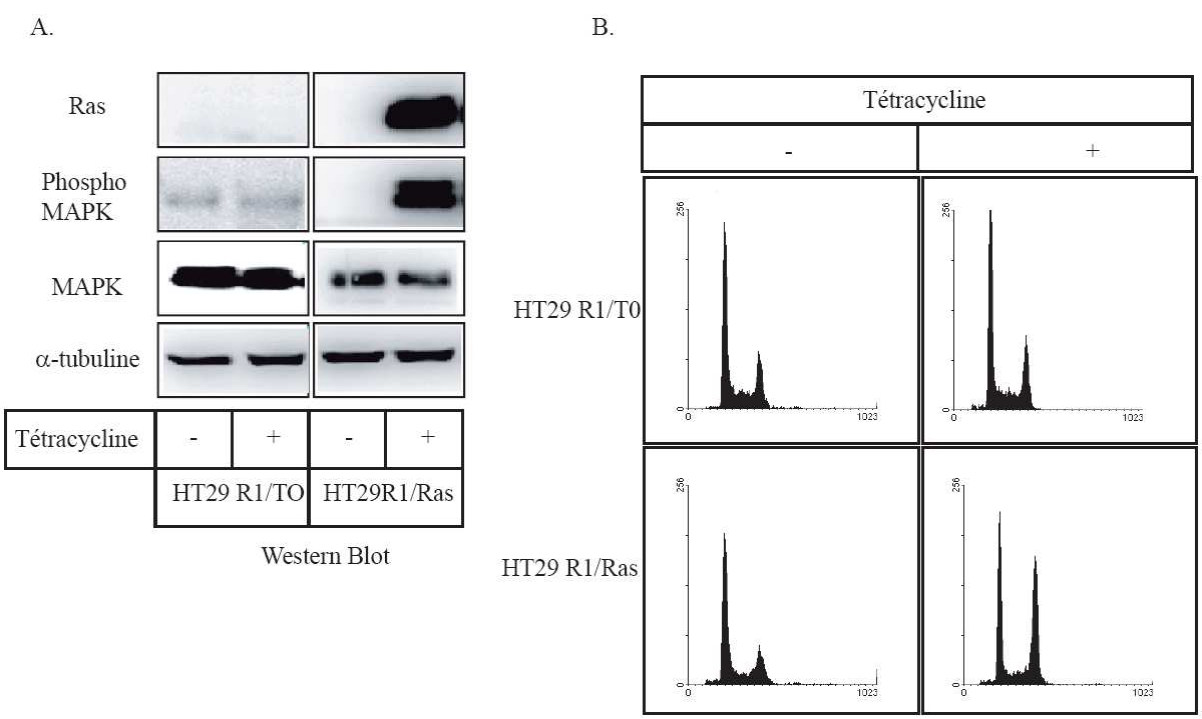


Figure 48 : L'induction de l'oncogène Ras dans les cellules colorectales déficientes en p53.

A. Immunodétections de la protéine Ras et de la forme phosphorylée et totale des MAPKs dans les cellules contrôle HT29R1/T0 et inductible pour Ras HT29R1/Ras après ajout ou non de tétracycline à 1 µg/ml pendant 48 h (n=3).

B. Cytogramme représentant la quantité d'ADN des cellules HT29R1/T0 et HT29R1/Ras lors de l'induction de l'oncogène Ras (n=3).

Puis, nous avons confirmé les résultats précédemment obtenus dans les lignées HCT116 et HT29 et HCT116 p21-/-, montrant l'effet du sn38 sur l'expression d'Aurora A. La lignée cellulaire HT29R1/T0, ne surexprimant pas l'oncogène Ras, est traitée avec du sn38 et l'expression de la protéine kinase est analysée par western blot et RT-PCR quantitative. Il est également intéressant de noter que le contrôle utilisé est un point non synchronisé en G2/M.

Comme le montre la figure 49 A, les dommages de l'ADN induits par le traitement des cellules HT29R1/T0 avec du sn38 entraînent une diminution d'expression de la protéine kinase Aurora A (pistes 1 et 3). L'analyse par RT-PCR quantitative confirme la diminution d'expression de l'ARNm d'Aurora A dans ces cellules lors d'un traitement au sn38 (figure 48 B). Les résultats précédemment obtenus sur la lignée cellulaire HCT116, montraient également une diminution d'expression d'Aurora A et du facteur de transcription c-myc. Nous avons donc analysé l'expression de ces protéines dans la cellule HT29R1/T0 en présence de sn38. L'expression du facteur de transcription c-myc semble également être diminuée lors d'un traitement au sn38 (figure 49 A, pistes 1 et 3). Ainsi, le traitement des cellules HT29R1/T0 au sn38 confirme l'inhibition d'Aurora A et de c-myc lors de l'induction de dommages de l'ADN, même en absence de synchronisation des cellules.

Nous avons ensuite observé l'effet de l'induction de l'oncogène Ras sur l'expression des protéines Aurora A. En effet, plusieurs études semblent montrer l'implication de la voie Ras/MAPK dans la surexpression de la kinase mitotique (Tatsuka, Sato et al. 2005; Furukawa, Kanai et al. 2006). Pour cela, les cellules HT29R1/T0 et HT29R1/Ras sont traitées avec de la tétracycline afin d'induire l'oncogène Ras dans la lignée HT29R1/Ras, la lignée HT29R1/T0 constitue notre contrôle, et des immunodétections d'Aurora A sont réalisées. Comme le montre la figure 49 A, l'induction de l'oncogène Ras pendant 48 et 72 h entraîne l'inhibition de l'expression de la protéine Aurora A (pistes 4, 5, 7 et 8). La tétracycline ajoutée sur la lignée contrôle HT29R1/T0 ne semble pas modifier l'expression de la kinase (piste 2) éliminant ainsi l'effet indirect de la tétracycline sur les cellules. Parallèlement des RT-PCR quantitatives sont réalisées et montrent également une inhibition de l'expression de l'ARNm de cette kinase en présence de la protéine Ras (figure 49 B). D'autre part, le traitement des cellules HT29R1/Ras au sn38 semble potentialiser cette inhibition d'Aurora A par rapport aux cellules contrôles HT29R1/T0 (figure 49 B).

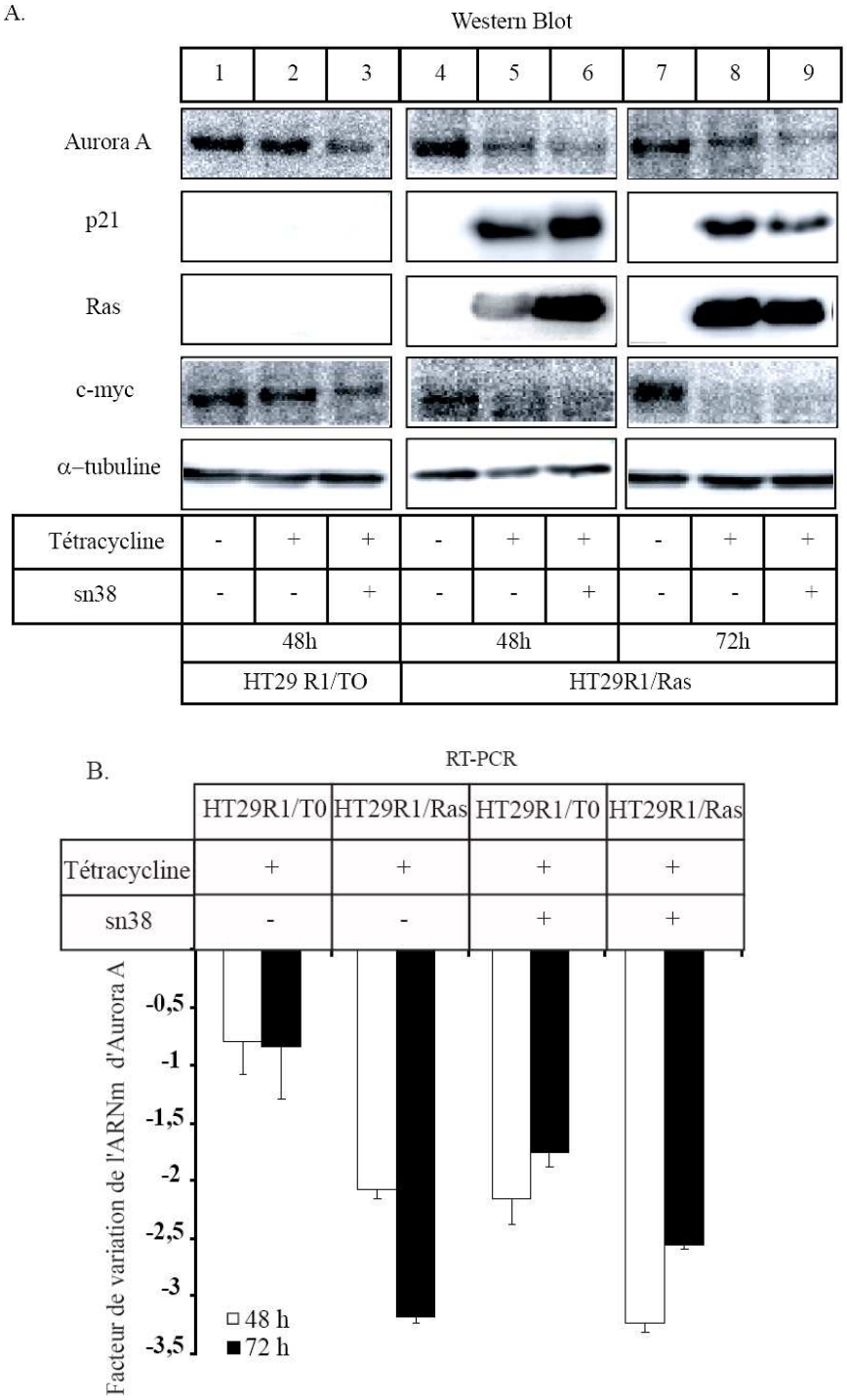


Figure 49 : L'induction de l'oncogène Ras dans les cellules colorectales induit la diminution d'expression de la kinase Aurora A.

Les cellules HT29R1/T0 et HT29R1/Ras sont stimulées pendant 48h ou 72h avec la tétracycline 1µg/ml avec au sans sn38.

A. Immunodétections des protéines Aurora A, Ras, p21, c-myc et α-tubuline (n=3).

B. Détection de l'ARNm d'Aurora A par RT-PCR quantitative normalisée à l'aide de la GAPDH (n=3).

Les analyses précédentes, effectuées sur les cellules HCT1116, montraient une régulation de la protéine Aurora A par le facteur de transcription c-myc. Aussi, l'étude de l'expression de ce facteur de transcription par western blot, nous permet de constater une diminution de la protéine c-myc en présence de l'oncogène Ras et en absence de sn38, dans les cellules HT29R1/Ras où Ras est induit (figure 49 A, pistes 4, 5, 7 et 8).
Ainsi, l'induction de l'oncogène Ras dans les cellules HT29 semble diminuer l'expression de la kinase Aurora A et de son ARNm. L'introduction de dommages de l'ADN semble potentialiser cette inhibition. L'induction de l'oncogène inhibe également l'expression du facteur de transcription c-myc.

Parallèlement, nous nous sommes intéressés à l'expression de la protéine p21 lors de l'induction de l'oncogène Ras. En effet, l'activation de la protéine Ras permet l'induction de deux inhibiteurs clés du cycle cellulaire p21 et p16 (Mason, Jackson et al. 2004; Jackson and Pereira-Smith 2006). Ces deux protéines participent à l'inhibition de la tumorogenèse contrôlée respectivement par p53 et pRb. Des immunodétections de p21 sont donc réalisées dans les cellules HT29R1/Ras en présence de tétracycline. Comme l'illustre la figure 49 A, une augmentation de l'expression de la protéine p21 lors de l'induction de Ras est observable.

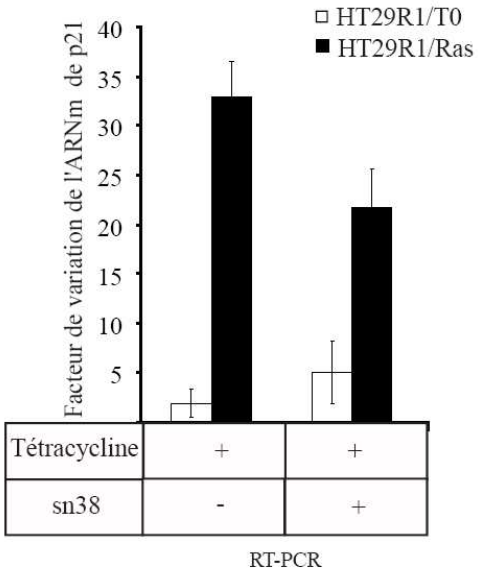


Figure 50 : Expression de l'ARNm de p21 lors de l'induction de l'oncogène Ras.
Les cellules HT29R1/T0 et HT29R1/Ras sont induites avec de la tétracycline à 1 µg/ml, puis stimulées pendant 48 h avec du sn38 à 10 ng/ml. L'expression des ARNm est normalisée à l'aide de la GAPDH (n=3).

La protéine p21 est directement induite par le facteur de transcription p53 permettant l'inhibition de la progression du cycle cellulaire en inhibant les complexes cyclines/cdks

(Jackson and Pereira-Smith 2006). L'étude par western blot montre une augmentation de l'expression de la protéine p21 lors de l'induction de l'oncogène Ras (figure 49 A, piste 5 et 8). L'analyse de l'expression de l'ARNm de p21 est ensuite réalisée par RT-PCR quantitative et les résultats sont présentés dans la figure 50. Une augmentation, de grande amplitude, de ce CKI est observée lors de l'induction de l'oncogène Ras, laissant donc supposer une régulation transcriptionnelle de ce gène malgré l'inactivation de p53 dans ces cellules.

Les résultats précédemment obtenus sur les cellules HCT116 et LS174T montraient l'implication du facteur de transcription c-myc dans la régulation du gène d'Aurora A. De plus, nous avons observé une diminution d'expression de la kinase Aurora A lors de l'induction de Ras. Nous nous sommes donc attardés sur la régulation transcriptionnelle d'Aurora A dans les cellules surexprimant l'oncogène Ras. Pour cela, des expériences de immunoprécipitations de chromatine sont réalisées dans les cellules HR29R1/Ras en présence de tétracycline et de sn38 par Sandy Courapied, doctorante de deuxième année au laboratoire. Ces résultats sont présentés dans la figure 51 qui suit.

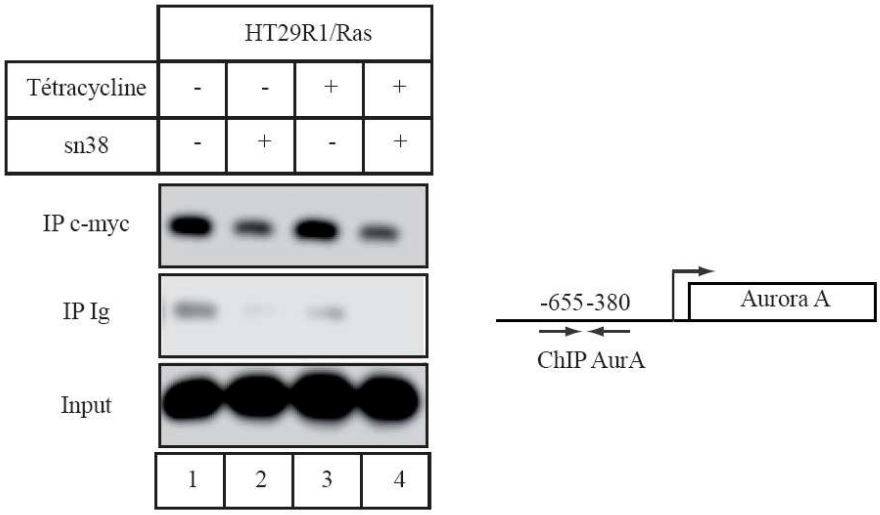


Figure 51 : Recrutement de c-myc sur le promoteur d'Aurora A dans les cellules HT29R1/Ras.
Les cellules HT29R1/Ras sont induites ou non avec de la tétracycline, le sn38 est ensuite ajouté pendant 48 h (n=3).

Les résultats montrent que l'induction de l'oncogène Ras dans les cellules HT29R1/Ras n'entraîne pas de modification de fixation du facteur de transcription c-myc sur le promoteur proximal d'Aurora A (figure 51, pistes 1 et 3). Cependant, le traitement des cellules au sn38 montre une diminution du recrutement de c-myc sur le promoteur de la kinase (figure 51, pistes 2 et 4). Ainsi, cette observation souligne l'implication du facteur de transcription c-myc

dans la régulation du gène d'Aurora A lors de dommages de l'ADN et confirme les résultats précédemment obtenus sur la lignée cellulaire HCT116.

L'activation de l'oncogène Ras dans les cellules est associée dans la littérature à l'entrée des cellules en sénescence. Différents types cellulaires deviennent résistantes à certains inducteurs apoptotiques comme la diminution des facteurs de croissance dans le milieu de culture ou le stress oxydatif (Chen, Liu et al. 2000; Tepper, Seldin et al. 2000; Hampel, Malisan et al. 2004). La résistance à l'apoptose s'expliquerait en partie par la stabilité des cellules sénescentes en culture. Nous avons donc testé l'effet du sn38 sur la survie des cellules HT29 lors de la surexpression de l'oncogène Ras. Pour cela, les cellules HT29R1/T0 et HT29R1/Ras sont stimulées avec de la tétracycline, puis traitées pendant 72 h avec du sn38. Une mesure de la quantité d'ADN est ensuite réalisée après incorporation d'iodure de propidium et analyse au cytomètre de flux. Parallèlement l'effet de différentes concentrations de sn38 sur la survie de ces cellules est mesuré. Les résultats sont présentés dans la figure 52 qui suit.

L'induction de l'oncogène Ras par ajout de tétracycline induit une accumulation des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire (figure 48 B et 52 A). Le traitement au sn38 des cellules HT29R1/T0 et HT29R1/Ras induit également une accumulation des cellules en phase G2/M (figure 52 A). D'autre part, après 72 h de traitement au sn38, le pourcentage de survie diminue dans les cellules HT29R1/T0 et seulement 40 % des cellules survivent (figure 52 B).

Les cellules HT29R1/Ras semblent quant à elles moins sensibles à l'induction de la mort provoquée par le traitement au sn38. La figure 52 B nous permet de constater que même à forte concentration en sn38, plus de 80 % des cellules surexprimant Ras survivent. L'analyse des cytogrammes lors du traitement au sn38 des cellules HT29R1/Ras induites à la tétracycline confirme également ces résultats. En effet, le pourcentage de cellules en sub-G1, dans la lignée ne surexprimant pas Ras et traitée au sn38, est deux fois plus important que lors de l'induction de Ras et du traitement au sn38 dans ces mêmes cellules (figure 52 A).

Ainsi, la surexpression de l'oncogène Ras dans les cellules HT29 entraîne une résistance à induire la mort cellulaire et moins de 20 % des cellules meurent lors d'un traitement entrainant des dommages de l'ADN. D'autre part, la surexpression de Ras s'accompagne d'un blacage de l'expression d'Aurora A.

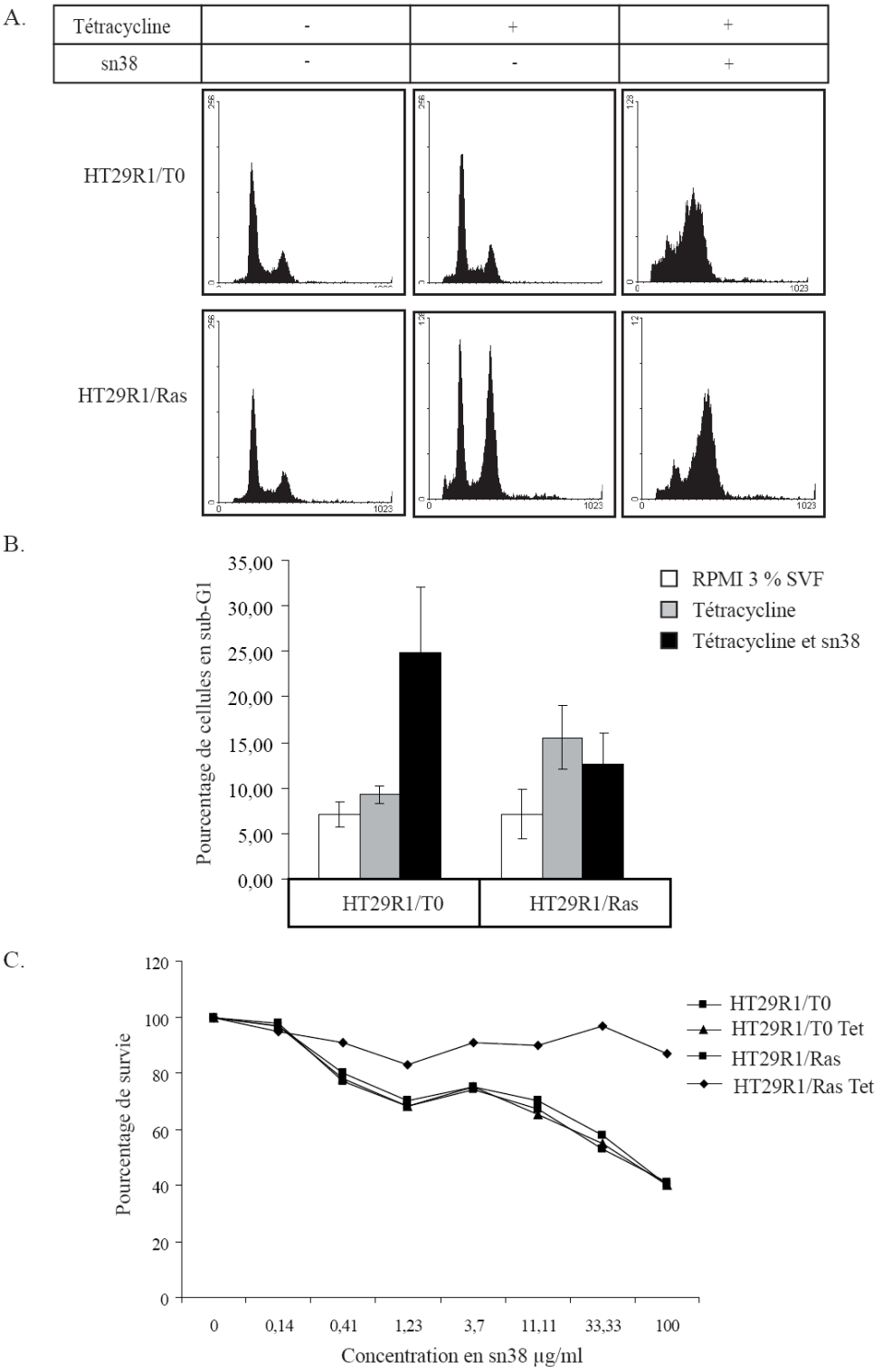


Figure 52 : Etude de la survie des cellules surexprimant Ras lors d'un traitement au sn38.

A. Cytogramme représentant la quantité d'ADN des cellules HT29R1/T0 et HT29R1/Ras induites ou non avec de la tétracycline 1 µg/ml avec ou sans stimulation au sn38 (n=3).

B. Histogramme représentant le pourcentage de cellules de cellules mortes par mesure du pourcentage de la population cellulaire en sub-G1 (n=3).

C. Effet de différentes concentrations de sn38 sur la survie des cellules HT29/R1/T0 et HT29R1/Ras après induction à la tétracycline 1 µg/ml (n=3).

DNA topoisomerase I Inhibition Prevents the Expression of Aurora-A Through Myc Downregulation

Julia Cherier, Sandy Courapied, Arnaud Vigneron, Marie-Bérangère Troadec[*], Sandrine Giraud, Isabelle Valo, Claude Prigent[*], Erick Gamelin and Olivier Coqueret[1]

Cancer Center Paul Papin; INSERM U892; Angers University, Angers, France
[*] CNRS UMR 6061; Rennes I University; Rennes, France

running title:
Regulation of the Aurora-A promoter by Myc

[1] Corresponding Author:
Centre Régional de Lutte Contre le Cancer Paul Papin, INSERM U892
2 rue Moll, 49033 ANGERS, France
olivier.coqueret@univ-angers.fr
Tel.: (33) 2 41 35 29 14 FAX: (33) 2 41 48 31 90

Abstract

In response to topoisomerase I inhibition and DNA damage, tumor cells upregulate several proteins involved in cell cycle arrest. Among these regulators, it is believed that the activation of the p53-p21 pathway and the downregulation of the cdc25c phosphatase play an important role in the activation of the G2 checkpoint. Besides theses proteins, the Aurora-A kinase is also essential for centrosome activation and progression to mitosis. Despite the importance of this kinase, the molecular mechanisms by which this protein is regulated following DNA damage remain most of the time to be characterized. In this study, we show that Aurora-A expression is downregulated in response to topoisomerase I inhibition. Using chromatin immunoprecipitation, we have observed that the Myc transcription factor is associated with the Aurora-A promoter during the G2 phase of the cell cycle when the expression of the kinase is maximal. RNA interference experiments indicated that Myc is necessary for the activation of the Aurora-A gene. Following treatment and topoisomerase I inhibition, the expression of Myc decreased and its association with DNA was inhibited. By contrast, the recruitment of the Max transcription factor increased, leading to the transcriptional downregulation of the gene. Further confirming the link between Myc and Aurora-A, these two proteins were found to be coexpressed in tumor samples isolated from colorectal cancers. These results suggest a model by which Myc regulates the expression of the Aurora-A kinase to induce cell cycle progression. This might provide an explanation for the effect of the myc oncogene on genomic instability.

Introduction

In response to genotoxic treatments, tumor cells upregulate several proteins involved in the activation of the G1 and G2 checkpoints (1). This allows cell cycle arrest and the upregulation of DNA repair genes to prevent the progression of damaged cells into mitosis and the consequent generation of aneuploidy. This response relies to a large extent on the Ataxia-Telangiectasia mutated (ATM) and Ataxia-Telangiectasia and Rad-3-related (ATR) kinases and on the consequent activation of chk1 and chk2 signaling (1-3). Among numerous substrates, this signaling network leads to the activation and stabilization of the p53 tumor suppressor gene by controling its postranslational modifications (4). p53 protects mammalian cells from DNA damage by inducing either apoptosis or cell cycle arrest (5). While cell death depends on the induction of target genes such as Bax, Puma, Noxa or p53AIP1, cell cycle arrest relies on the upregulation of the cell cycle inhibitor p21waf1 which is transcriptionally induced by p53 (6-8). Upon induction, p21waf1 interacts with cyclin-cdk complexes to prevent their activation and inactivates the E2F family of transcription factors. In addition, we and others have recently shown that p21waf1 can also function as a transcriptional repressor of growth promoting genes (9-11). In response to DNA damage induced by topoisomerase inhibitors such as sn38 or doxorubicin, p21waf1 is recruited to the promoters of the Myc and cdc25A genes to induce a downregulation of their expression and prevent cell cycle progression (9). In addition, cDNA microarray analysis has demonstrated that the upregulation of p21waf1 is also correlated with the transcriptional repression of mitotic genes such as the polo-like kinase I and the topoisomerase IIα (11, 12). In the absence of p53 or p21waf1, tumor cells do not undergo G1 or G2 arrest, and this results in an abnormal mitosis that eventually leads to polyploidization (3).

In addition to the p53-p21 protective pathway, others checkpoints are also involved in the control of the progression towards mitosis. Following DNA damage, the chk1/2 kinases phosphorylate the cdc25 family of phosphatases (13). At the G1/S transition, this phosphorylation promotes the degradation of cdc25A by the $SCF^{\beta TCRP}$ complex, leading to cdk2 inactivation and S phase arrest (14). In the G2 phase of the cell cycle, the phosphorylation of cdc25C by chk1/2 induces its binding to 14-3-3 proteins and the cytoplasmic translocation of the phosphatase (13, 15). This in turn inactivates the cyclin B-cdk1 complexes and induces G2 arrest. Finally, the mitotic checkpoint, also known as the spindle checkpoint, also prevents mitosis progression in response to damaged chromosomes (16, 17). In this case, cell cycle arrest relies on the activation of checkpoint proteins such as BubR1, Mad1 or Mad2 whic are recruited to unbound kinetochores to supress the onset of anaphase (18). BubR1, Mad1 or Mad2 proteins inactivate the Cdc20 protein which results in the suppression of the E3 ligase activity of the anaphase-promoting complex (APC) and prevents the segregation of damaged chromosomes.

Besides the cdc25C phosphatase, the cyclin B-cdk1 complex and APC, the Aurora-A serine/threonine kinase is also essential for progression to mitosis (19, 20). This protein localizes in early G2 to duplicated centrosomes where it plays an important role in their maturation, separation and in the consequent assembly of the spindle apparatus. The expression of Aurora-A is regulated during the cell cycle and this protein is mainly expressed during the G2 phase, probably due to the presence of a CDE/CHR regulatory element in its promoter. Illustrating its essential role in spindle organization, the inactivation of Aurora-A by ARN interference leads to the generation of spindle defects, mitotic catastrophe and aneuploidy (20, 21). In addition, the overexpression of Aurora-A transforms NIH3T3 fibroblasts, probably as a consequence of abnormal mitosis and inactivation of the p53 tumor suppressor gene (22). However, the kinase does not transform primary mouse embryonic fibroblasts by itself, suggesting that additional mutations present in NIH3T3 cells cooperate with the kinase to allow cell transformation and bypass of the mitotic checkpoint. Further illustrating its oncogenic role, a high expression of the kinase, often due to gene amplification at 20q13, has been detected in several epithelial tumors such as colon, breast, ovarian, gastric, and pancreatic tumors (19).

Topoisomerase I inhibitors such as camptothecin or irinotecan are among the main drugs used in the treatment of epithelial tumors such as colorectal cancers. These drugs induce topoisomerase I cleavage complexes that collapse with replication forks and induce DNA double strand breaks (23, 24). Although topoisomerase I inhibition is well known to result in the activation of the p53-p21 pathway and in the inactivation of the cdc25C phosphatase, its effect on mitotic kinases remain to be characterized. In this study, we show that sn38, the active metabolite of irinotecan, induced a downregulation of Aurora-A expression. Using chromatin immunoprecipitation and RNA interference experiments, we observed that the promoteur of the kinase is normally regulated by the Myc transcription factor. Following topoisomerase I inhibition, Myc steady state levels are downregulated and this prevents its association with the Aurora-A promoter. Further confirming the link between Myc and Aurora-A, these two proteins were found to be coexpressed in tumor samples isolated from colorectal cancers.

Altogether, these results reveal a unexpected network of interactions indicating that the expression of Aurora-A is downregulated in response to topoisomerase I inhibition. We propose that Aurora-A inhibition plays an important role in G2 arrest in parallel to the induction of p53-p21 and the inactivation of cdc25C.

Materials and methods

Reagents, cell culture

Polyclonal anti-phospho p53 (SC-11764-R), anti-c-myc (SC-764), anti-cyclin B1 (H-433), anti-p21waf1 (SC-397), anti-RNA polymerase II (SC-899), monoclonal anti-p53 (SC-98) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz). Monoclonal anti-α-tubulin (T9026) and anti-γ-tubulin (T6557) were obtained from Sigma. The colorectal cell lines, HCT116 and HT29, were grown in RPMI-1640 (Cambrex) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS Biowest). LS 174T cells stably transfected with the tretracyclin repressor were grown in RPMI-1640 added with 5% SVF, 10 µg/ml of blasticidin (Sigma). LS 174T cells (LS 174T #1 and #2) stably stransfected with the tetracyclin repressor and the pTER plasmid containing the doxyxyclin inductible RNAi of myc were grown in RPMI-1640 added with 5% FCS, 10 µg/ml of blasticidin and 500 µg/ml of zeocin (Sigma). Transient transfections were performed using lipofectamine 2000 (Invitrogen).

Cell synchronization

$2X10^6$ cells were seeded per 10 cm plates in RPMI 3% FCS and treated with 2mM hydroxyurea A (Sigma) for 15 h, washed and released for 9h30 in RPMI 3% FCS. Synchronization was controlled by flow cytometry analysis of DNA content.

Flow cytometry analysis

For cell cycle analysis, cells were seeded at $1X10^6$ in 6 cm plate in RPMI-1640 3% FCS, washed with PBS and permeabilized with ethanol 70%. Cells were treated with 10 µg/mL RNase for 1 h at 37°C and then stained with 50 µg/ml propidium iodide (PI, diluted in PBS 0.1% Tween). DNA content analysis were performed with a Beckman Coulter FACS-SCAN.

Preparation of total cell extracts and western blotting

After two washings with cold PBS, 500 µl of total lysis buffer (25 mM HEPES pH 7.9, 300 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Nonidet P-40 (NP-40), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM sodium orthovanadate (NaO), 5 mM sodium fluoride (NaF), 2 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pestatin) were added immediately to the plates. After 30 min incubation at 4°C, total extracts were recovered by centrifugation at 12 000 g for 10 min, and extracts were either used immediately or stored at -80°C. After transfert, membranes were analyzed by western blot with the indicated antibodies diluted in Tris buffered Saline Buffer (TRIS 10 mM pH 8, 150 mM NaCl) added with 5% BSA (Euromedex).

RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was isolated from cell lines with TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA was synthesized from 2 µg of RNA by random hexamer priming using MMLV reverse transcriptase (promega). cDNA expression was measured by real time PCR analysis using GADPH as a normalization standard. The following primers were used :
Aurora A: Forward primer 5' GATCAGCTGGAGAGCTTAAA 3', Reverse primer 5' GAGGCTTCCCAACTAAAAAT 3'; GAPDH: Forward primer 5' GAAGGTGAAGGTCGGAGTC, Reverse primer 5' GAAGATGGTGATGGGATTTC 3'

Chromatin Immunoprecipitation Assay (ChIP)

Cells, grown to 60% confluence, were treated with genotoxic drugs. After treatment, cells were washed and then cross-linked with 1% formaldehyde at room temperature for 10 min essentially as previously described (25, 26). Cells were washed with cold PBS and lysed in 500 µl of lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.1, 1 mM PMSF, 5 mM NaF, 5 mM NaO, 2 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pestatin), and sonicated five times for 20 secondes each at the maximum setting. Supernatants were then recovered by centrifugation at 12 000 rpm for 10 min at 4 °C, diluted once 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 µg of sheared salmon-sperm DNA, and 20 µl of protein A-sepharose (of 50% slurry). Immunoprecipitation was performed overnight with specific antibodies and IgG control, and then 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. Note that immunoprecipitations were performed in the presence of 1% NP-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 TSE III (250 mM LiCl, 1% NP-40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.1). Bead precipitates were then

washed once with TE buffer and eluted once with 1% SDS, 100 mM NaHCO3. Eluates were heated at 65 °C overnight to reverse the formaldehyde cross-linking. DNA was precipitated using classical procedures. Real-time PCR was used for ChIP analysis and quantification. The following primers were used :
region -655 -381 of the Aurora A promoter
Forward primer 5' GAT GCCCCCTCACTATATGC 3',
Reverse primer 5' AGGAGAGAGCGGGATACCAA 3'
Control region -1732 -1411 of the Aurora A promoter
Forward primer 5' ACTCCAGATCCCTCAGCTTAACCA 3'
Reverse primer 5' CAAGTTATGGGACGGTGAACG 3'

Immunofluorescence

Indirect immunofluorescence experiments were performed with cells grown on cover slips. Cover slips were then fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes and permeabilized in 70% ethanol. After washing, cover slips were probed with anti-aurora-A (1:40 dilution) or γ-tubulin (1:100 dilution) followed by conjugated secondary antibody (1:100 Molecular Probes). Cover slips were then mounted on slides in 50% PBS/50% glycerol.

Results

Topoisomerase I inhibition induced a downregulation of Aurora-A expression

Since Aurora-A plays an important role in progression towards mitosis (21), we wanted to test the hypothesis that genotoxic treatment induced cell cycle arrest through the downregulation of the kinase. We first confirmed in colorectal cell lines that Aurora-A is mainly expressed during the G2 phase of the cell cycle. To this end, cells were synchronized in G1/S with hydroxyurea, washed and then grown again in 10% serum for 7 to 12 hr. Under these conditions, FACS analysis showed that cells were synchronized in the G2 phase of the cell cycle (Figure 1A). As expected, western blot analysis indicated that Aurora-A was expressed in G2 and that its mRNA significantly increased, indicating that the gene was regulated at the transcriptional level or at the level of mRNA stability (Figure 1 B-C). The same results were obtained in a second colorectal cell line, the HT29 cells (Figure 1D-E).

To determine if topoisomerase I inhibition regulates Aurora-A expression, colorectal cell lines were exposed to moderate doses of sn38, the active metabolite of irinotecan, one of the main drug used in the treatment of colorectal cancers (see protocol Figure 2A and (24)). Importantly, FACS analysis indicated that HCT116 cells were synchronized in the G2 phase of the cell cycle following a 48 hr-treatment, a time when Aurora-A expression is supposed to be maximal (Figure 2B, right panel). However, western blot experiments indicated that the expression of Aurora-A was dowregulated in response to sn38 (Figure 2C, left panel). In addition, quantitative PCR experiments showed that the kinase mRNA expression was also inhibited in the presence of sn38, suggesting that DNA damage regulates Aurora-A expression by a transcriptional mechanism. As a control, the levels of the cell cycle inhibitor p21waf1 increased as expected following genotoxic treatment. Note that no significant induction of cell death was noticed before 72 hr of sn38 stimulation (Figure 2D). Finally, we have also repeated these experiments in a different colorectal cell line and DNA damage also downregulated Aurora-A in HT29 cells (see below Figure 3).

Altogether, these results indicate that sn38 and topoisomerase I inhibition induced a downregulation of Aurora-A expression in the G2 phase of the cell cycle.

Topoisomerase I inhibition does not prevent centrosome duplication

It has been shown that Aurora-A is involved in the maturation and separation of centrosome during progression from S phase towards mitosis (27, 28). To determine if the downregulation of the kinase prevents this maturation, centrosome formation was analyzed by immunofluorescence and γ-tubulin staining. When cells were synchronized in the G2 phase of the cell cycle, the centrosomes were effectively stained as a doublet and Aurora-A was essentially localized on the centrosomes (Figure 3A). As expected, when cells were treated with sn38 for 48 or 72 hr, Aurora-A became undetectable by immunofluorescence (Figure 3A). Interestingly, genotoxic treatment dit not prevent centrosome duplication, however, no separation was observed under these conditions. This confirms that Aurora-A is necessary for centrosome separation and that its inhibition probably leads to cell arrest in the G2 phase of the cell cycle due to abnormal centrosomal functions. Quantification experiments are presented Figure 3B to show the downregulation of Aurora-A expression and the absence of modification of centrosome duplication.

Thus, we concluded from these results that the inhibition of Aurora-A expression by sn38 prevents the separation of the centrosomes, thereby inducing G2 arrest.

The downregulation of Aurora-A is not mediated by the p53-p21 pathway

It is well known that genotoxic treatment induced cell cycle arrest and cell death through the activation of the p53-p21waf1 pathway. Following sn38 treatment, we effectively observed in HCT116 cells that p53 was stabilized and phosphorylated on its serine 15 residue. As expected, the steady state level of p21waf1 was also enhanced in response to drug treatment (Figure 4A, left panel). As stated above, a significant proportion of the cells enter senescence or apoptosis but only following 3-4 days of treatment (Figure 4A, rigth panel). Since we and others have shown that p21waf1 functions as a transcriptional repressor of cell cycle genes upon genotoxic treatment (9, 29), we wanted to determine if the p53-p21 suppressor network was involved in Aurora-A downregulation. To this end, we used the human colorectal cancer cell line HCT116 and its p21 -/- derivative cell line in which both p21waf1 alleles have been deleted by homologous recombination (30). Results showed that sn38 reduced Aurora-A mRNA or protein expression to the same extent in parental or in HCT116 p21-/- cells (Figure 4B). To confirm this observation, we also used the HT29 cell line that contains a mutated form of p53. As shown Figure 4B, the kinase was also downregulated by sn38 in this cell line.

In light of these results, we concluded that the dowregulation of Aurora-A is independent of the p53-p21 pathway.

DNA damage prevents the association of Myc with the Aurora-A promoter

We have recently shown that the expression of Myc is downregulated in response to topoisomerase I inhibition (29). Western blot experiments presented Figure 5A confirmed this result and showed that Myc is expressed in the G2 phase of the cell cycle, but that its expression was significantly downregulated following topoisomerase I inhibition. These observations suggested to us that Myc could function as a transcriptional regulator of the Aurora-A gene. As a first attempt to determine if the effect of sn38 is related to a transcriptional downregulation, we have cloned the Aurora-A proxymal promoter in front of a luciferase reporter gene. HCT116 cells were transfected with this reporter construct, treated or not with sn38 and luciferase activity was measured after 48 hr on cytoplasmic extracts. A 2 fold repression of the promoter activity was observed under these conditions (Figure 5A, right panel), further suggesting that the regulation of the Aurora-A gene is due to transcriptional inhibition.

Transcription factor recognition site analysis of the aurora-A promoter (MatInspector, Genomatix) revealed the presence of several potential Myc binding sites in the proximal promoter of the gene (Figure 5C). To determine if Myc could be found associated with this promoter, its recruitment was analyzed by chromatin immunoprecipitation experiments (ChIP) in HCT116 cells. To this end, cells were synchronized in G2 or treated for 48 hr by sn38. Chromatin was then prepared using a formaldehyde cross-linking protocol1 and occupancy of the promoter was analyzed using specific pair of primers spanning the potential Myc binding sites (Figure 5C). To ensure the specificity of the reaction, all immunoprecipitations were quantified by real-time PCR as compared to the signals obtained with a control IgG. PCR analysis was also performed with a different set of primers spanning a control region. Results presented Figure 5D showed that when cells were synchronized in the G2 phase of the cell cycle, antibodies directed against Myc effectively precipitated DNA encompassing the Myc responsive element of the Aurora A promoter. Note however that we were able to detect Myc binding only on the -655/-380 region. Interestingly, the association of Myc with DNA was significantly downregulated upon sn38 treatment, further confirming the implication of this transcription factor in the regulation of the Aurora-A gene. As a control of DNA sonication efficiency, PCR analysis did not detect any increase in the Myc occupancy of a region 1.5 kb upstream of the Myc responsive region of the Aurora-A promoter. In addition, we were also not able to detect any association of the STAT3 transcription factor with the same region (Figure 5D).

Taken together, these results indicate that Myc is associated with the Aurora-A promoter in growing cells and that its binding is downregulated upon topoisomerase I inhibition.

Transcriptional regulation of the Aurora-A promoter by Myc

To further characterize the transcriptional regulation of the Aurora-A promoter by Myc, we then investigated the effect of Myc knockdown on the expression of the kinase. To this end, we used a doxycycline-inducible expression vector that drives Myc siRNA expression in two different clones of LS174T colorectal cell line (named LS174T#1 and LS174T#2, (31)). This cell line was chosen since we were able to detect a steady state expression of Aurora-A in growing cells. As expected, western blot analysis showed that the addition of doxycyclin to LS174T cells induced a significant downregulation of Myc level in the two clones (Figure 6A, top panel). Interestingly, we observed under the same conditions that the expression of Aurora-A was inhibited upon Myc knockdown in the two different clones (Figure 6A, middle panel). Tubulin expression was used as a control to ascertain the specificity of these experiments. In addition, FACS analysis indicated that myc downregulation did not significantly affect the cell cycle profil of LS174T cells (Figure 6B). As expected, chromatin immunoprecipitation experiments indicated that the downregulation of Aurora-A was associated with a significant reduction of Myc DNA binding upon siRNA induction (Figure 6C). Interestingly, we also noticed that the proxymal Aurora A promoter was acetylated on histone H3 but not on histone H4 in growing cells. Following Myc downregulation, a significant inhibition of H3 acetylation was observed, probably related to the inhibition of the promoter (Figure 6C). As a control, Myc and H3 acetylation were not detected on the control 5' region.

Thus, we concluded from these results that Myc is necessary for the expression of the Aurora-A gene.

Aurora-A and Myc are overexpressed in tumor samples isolated from colorectal cancers.

Altogether these results suggest that Myc is involved in the upregulation of the Aurora-A gene. To determine if this observation has a potential clinical interest, the expression of Myc and Aurora A mRNAs were investigated in tumor samples isolated from patients suffering from colorectal cancers (n=11). Following extraction, mRNAs samples were analyzed by quantitative PCR analysis and normalized to the expression of the gapdh housekeeping gene. In agreement with the experimental data, we detected a trend between overexpression of Myc and a high expression of Aurora-A. Results presented Figure 7A and 7B indicated that Aurora-A and Myc were effectively expressed in most tumors. In addition, 7 tumors out of 11 (63%, Figure 7B) expressed corresponding levels of Myc and Aurora, either low or high. Although this remains to be shown with a higher number of samples, these results indicate that a significant proportion of tumors might express at the same time high levels of Myc and of Aurora-A and that these markers might be used as predictive tools.

RasV12 upregulation also induced a downregulation of Aurora-A expression

As stated above, we have recently shown that sn38 and topoisomerase I inhibition induces growth arrest and senescence or apoptotic pathways in colorectal cell lines (32). Therefore, we wanted to determine if Aurora-A downregulation was only related to topoisomerase I inhibition or if this could also be observed with others inducers of cell cycle arrest. During the course of our work, we observed that the rasv12 oncogene was also able to induce cell cycle arrest and cell death in HT29 cells. To this end, we have used an inducible vector that allows the expression of the oncogene and the consequent activation of the erk kinase upon doxycyclin addition (Figure 8A). Under this condition, and as recently shown (33), a significant induction of cell death was noticed after 4 days of induction and was comparable to the effect of sn38 (Figure 8B). Flow cytometry analysis indicated that rasv12 induced a weak increase of the percentage of cells in the G2 phase of the cell cycle (Figure 8C). Interestingly, cell cycle arrest induced by rasv12 expression was also correlated with a downregulation of Aurora-A. Using quantitative PCR analysis, results presented Figure 8D showed that ras inhibited the expression of the Aurora-A mRNA to the same extent as compared to topoisomerase I inhibition. A weak cooperation was observed when ras expressing cells were treated with sn38 since DNA damage further downregulated the expression of the kinase in ras-expressing cells. These results were confirmed by western blot analysis since the expression of the Aurora-A protein was downregulated to the same extent in the presence of rasv12 as compared to sn38 treatment (Figure 8E).

Using chromatin immunoprecipitation experiments, we then asked if the downmodulation of the Aurora-A gene was also related to Myc regulation in ras-expressing cells. As expected, Myc was also found associated with the Aurora-A proxymal promoter in HT29 cells and its binding was inhibited upon sn38 treatment. However, the ability of Myc to bind to this promoter was not modified upon rasv12 expression, indicating that the downregulation of Aurora-A was not due a to DNA binding inhibition (Figure 9A). Myc proteins are not found as monomeric complexes in vivo but are associated with transcriptional partners such as Max or Mad (34). In contrast to Myc, which activates transcription, the Mad-Max heterodimers can act as transcriptional repressors through their association with the mSin3 corepressor complex. To determine which complexes are present on DNA, ChIP experiments were performed using antibodies directed against Mad or Max. Results presented Figure 9B indicate that Mad was detected on the Aurora-A promoter and that its binding was not affected by sn38 or rasv12 expression. Interestingly, Max was also found on DNA in HT29 cells and its recruitment was significantly increased upon rasv12 upregulation (Figure 9B).

Altogether, these results indicate that the expression of Aurora-A is downregulated in rasv12-expressing cells and that this is probably due to an enhanced recruitement of the Max-Mad complex on its proxymal promoter.

Discussion

It is widely accepted that DNA damage prevents cell cycle progression through the upregulation of the p53-p21 pathway. Upon single or double DNA strand breaks, the ATM-ATR and chk1-chk2 kinases are activated and this allows the stabilization of p53 and the consequent upregulation of its target genes (1, 2). As an illustration of this pathway, sn38/irinotecan treatment induces G2 arrest through the p21-mediated inactivation of cdk1 and through the cytoplasmic translocation of cdc25C. In this study, we have shown that cell cycle arrest induced by topoisomerase I inhibition also induced the downregulation of the Aurora-A kinase. ChIP and RNAi experiments indicate that the Myc transcription factor is normally involved in the transcriptional regulation of this gene. Following DNA damage, the association of Myc with the Aurora-A promoter is inhibited and this leads to the transcriptional downregulation. As a consequence, the duplicated centrosomes do not separate and cells are arrested in the G2 phase of the cell cycle. Interestingly, this inhibition is not only related to DNA damage since it can also be observed in response to abnormal expression of ras. Folllowing upregulation of the oncogene, the expression of Aurora-A was also downregulated and this also leads to cell cycle arrest. In contrast to DNA damage, the recruitment of Myc was not modified in ras-expressing cells. However the association of the Max transcription factor with the Aurora-A promoter significantly increased. Altogether, these results indicate that Aurora-A downregulation is an important event in cell cycle arrest induced in response to various cell insults such as DNA damage or abnormal oncogenic expression. Although further experiments are necessary to ascertain this point, we propose that the Max-Mad complex functions as a transcriptional repressor of the Aurora-A gene.

Gene transcription is regulated at multiple steps including DNA binding of transcription factors, recruitment of the basal transcriptional apparatus and elongation of mRNA synthesis. Activation is also affected by several complexes that affect nucleosomal structure (36) such as histone acetyltransferase (HATs) proteins and chromatin remodeling complexes. In light of previous results, we anticipate that Myc is not present as a monomeric proteins on the Aurora promoter but rather associated with its transcriptional partners, either Mad or Max. It is known that as a result of this combinatorial interaction, the effect of Myc on gene expression varies and that the association with Max is necessary to activate transcription. This effect is explained by the association of Myc with TRAPP, a subunit of the TIP60 histone acetylase complex, and its association with TIP48 and TIP49, two ATPases involved in chromatin remodeling (34). Sequential ChIP experiments will determine if Myc is associated with Max and with TRAPP or TIP proteins on the Aurora-A promoter to induce its upregulation. In addition to its effect on chromatin structure, Myc can also regulate the elongation program through its association with the P-TEFb complex and cdk9 (37, 38). Preliminary experiments performed in the lab suggest effectively that the recruitment of the RNA polymerase to the Aurora proxymal promoter is not regulated by the transcription factor. It remains therefore to be determined if Myc regulates the elongation process on this gene. Myc target genes are also regulated by the Mad-Max heterodimers that bind to DNA to inhibit gene activation, probably as a feedback pathway. Transcriptional repression by the Mad-Max complex is due to the recruitment of the Sin3a corepressor complex that induces histone deacetylation and chromatin compaction (39, 40). Interestingly, our results indicate that the transcriptional donwregulation of Aurora-A is effectively associated with an inhibition of histone H3 acetylation. Although this remains to be firmly demonstrated, we propose that the Aurora-A gene is also regulated by this Mad-Max complexes. Under normal conditions, Myc is bound to the promoter of the kinase, associated with Max, and this allows the activation of the gene. Upon topoisomerase I inhibition, the expression of myc decreases and the Max-Mad complex is associated with the Aurora-A promoter to induce its transcriptional downmodulation, probably through histone H3 deacetylation.

Following DNA damage, checkpoint controls prevent cell cycle progression until damage has been repaired. During G1, arrest allows repair before DNA replication and during G2, arrest inhibits progression towards mitosis, preventing the segregation of abnormal chromosomes. As stated above, activation of the ATM/ATR chk1/2 kinases during G2 mainly activates the p53-p21 pathway. Besides p53, DNA damage checkpoints also target the cdc25 phosphatase family, so that cell cycle arrest in G2 essentially relies on the p21-mediated inactivation of cdk1 and on the cytoplasmic translocation of cdc25c (13, 15). In light of our results, we propose that the downregulation of Aurora-A is also an essential event of the G2 checkpoint following topoisomerase I inhibition. Besides the inhibition of centrosome maturation and separation, the inhibition of the kinase is probably also necessary to allow the upregulation of the p53 pathway. It has been shown recently that aurora-A phosphorylates p53 and that this induces its degradation through an enhanced ubiquitination by mdm2 (41). Alternatively, it has also been proposed that p53 phosphorylation by Aurora-A abrogates its DNA binding activity (42). As a consequence, its silencing significantly increased the incidence of apoptosis through an enhanced

expression of the tumor suppressor. We therefore propose that the downregulation of Aurora-A is a necessary event to allow the upregulation of p53 in response to topoisomerase I inhibition. Additionnally, it has also been shown that Aurora-A is required for the initial activation of the cyclin B-cdk1 complexes at the centrosomes (28). Although this remains to be demonstrated, the sn38-mediated downregulation of the kinase certainly also prevents the activation of cdk1 at the centrosomes, further contributing to cell cycle arrest.

Finally, we also speculate that the dowregulation of the kinase could also be a necessary event to allow the transcriptional activation of DNA repair genes in response to topoisomerase I inhibition (23, 32). Importantly, Aurora-A has been originally characterized as a protein overexpressed in several tumors including colorectal cancers and we have been able to confirm this observation using tumors samples. It is also well known that Aurora-A overexpression leads to genomic instability (22) and to the inhibition of p53-mediated apoptosis in response to DNA-damaging drugs. Since irinotecan and more generally topoisomerase I inhibitors are widely used in the treatment of colorectal cancers, further clinical and immunohistochemical analysis are now necessary to determine if the coordinated overexpression of Myc and Aurora-A is associated with drug resistance and poor prognosis. An abnormal expression of Aurora-A in Myc-expressing cells might provide an alternative explanation for the effect of this oncogene on genomic instability.

Altogether, these results uncover a new pathway leading to cell cycle arrest in the G2 phase of the cell cycle following topoisomerase I inhibition. Under normal conditions, the Aurora-A gene is regulated by the Myc transcription factor. Following DNA damage, the expression of Myc is downregulated and the binding of the transcription factor to the promoter of the kinase is inhibited. As a consequence, the steady-state level of Aurora decreases, the centrosomes do not separate and progression towards mitosis is inhibited. These results suggest that tumors expressing abnormal levels of Myc together with a high expression of Aurora-A might be resistant to DNA-topoisomerase I inhibitors such as irinotecan. The early identification of these proteins in colorectal tumors should help to determine the drug resistance profile of individual tumors to define in advance the subsets of tumors that will fail to respond to chemotherapy

Acknowlegdments

This work was supported by a fellowship (to A.V) and a grant from the Ligue contre le Cancer (Equipes labélisées 2007 to O.C, C.P and E.G), a grant from Canceropole Grand Ouest (O.C, C.P and E.G.) and a fellowship from INSERM-Region and Rotary (to J.C). We thank Agnès Chassevent for the gift of tumor samples.

References

1. Su, T. T. Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. Annu Rev Genet, *40:* 187-208, 2006.
2. Bartek, J. and Lukas, J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. Cancer Cell, *3:* 421-429, 2003.
3. Rajagopalan, H. and Lengauer, C. Aneuploidy and cancer. Nature, *432:* 338-341, 2004.
4. Vousden, K. H. and Lu, X. Live or let die: the cell's response to p53. Nat Rev Cancer, *2:* 594-604, 2002.
5. Vousden, K. H. Outcomes of p53 activation--spoilt for choice. J Cell Sci, *119:* 5015-5020, 2006.
6. 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. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell, *75:* 817-825, 1993.
7. Nakano, K. and Vousden, K. H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. Mol Cell, *7:* 683-694, 2001.
8. Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. Mol Cell, *7:* 673-682, 2001.
9. Vigneron, A., Cherier, J., Barre, B., Gamelin, E., and Coqueret, O. The cell cycle inhibitor p21waf1 binds to the myc and cdc25A promoters upon DNA damage and induces transcriptional repression. J Biol Chem, *281:* 34742-34750, 2006.
10. Coqueret, O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? Trends Cell Biol, *13:* 65-70., 2003.
11. Chang, B. D., Watanabe, K., Broude, E. V., Fang, J., Poole, J. C., Kalinichenko, T. V., and Roninson, I. B. Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. Proc Natl Acad Sci U S A, *97:* 4291-4296., 2000.
12. Chang, B. D., Broude, E. V., Fang, J., Kalinichenko, T. V., Abdryashitov, R., Poole, J. C., and Roninson, I. B. p21Waf1/Cip1/Sdi1-induced growth arrest is associated with depletion of mitosis-control proteins and leads to abnormal mitosis and endoreduplication in recovering cells. Oncogene, *19:* 2165-2170., 2000.
13. Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H., and Elledge, S. J. Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. Science, *277:* 1497-1501, 1997.
14. Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R. G., Welcker, M., Bartek, J., and Lukas, J. Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. Science, *288:* 1425-1429., 2000.
15. Peng, C. Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S., and Piwnica-Worms, H. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. Science, *277:* 1501-1505, 1997.
16. Weaver, B. A. and Cleveland, D. W. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. Cancer Cell, *8:* 7-12., 2005.
17. Cahill, D. P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S. D., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. Nature, *392:* 300-303, 1998.
18. Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M. W. The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. Genes Dev, *12:* 1871-1883, 1998.
19. Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W. L., Gray, J. W., Sahin, A., Brinkley, B. R., and Sen, S. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. Nat Genet, *20:* 189-193, 1998.
20. Giet, R., Petretti, C., and Prigent, C. Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? Trends Cell Biol, *15:* 241-250, 2005.
21. Meraldi, P., Honda, R., and Nigg, E. A. Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. Curr Opin Genet Dev, *14:* 29-36, 2004.
22. Meraldi, P., Honda, R., and Nigg, E. A. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53-/- cells. Embo J, *21:* 483-492, 2002.
23. 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. Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. Mutat Res, *532:* 173-203, 2003.
24. Pommier, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. Nat Rev Cancer, *6:* 789-802, 2006.
25. Bienvenu, F., Barre, B., Giraud, S., Avril, S., and Coqueret, O. Transcriptional Regulation by a DNA-associated Form of Cyclin D1. Mol Biol Cell, *16:* 1850-1858. Epub 2005 Jan 1819., 2005.
26. Barré, B., Vigneron, A., and Coqueret, O. The STAT3 transcription factor is a target for the Myc and retinoblastoma proteins on the Cdc25A promoter. J Biol Chem, *280:* 15673-15681, 2005.
27. Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K., and Saya, H. Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. Cell, *114:* 585-598, 2003.

28. Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouche, J. P., Theis-Febvre, N., Schmitt, E., Monsarrat, B., Prigent, C., and Ducommun, B. Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. J Cell Sci, *117:* 2523-2531, 2004.
29. Vigneron, A., Roninson, I. B., Gamelin, E., and Coqueret, O. Src inhibits adriamycin-induced senescence and G2 checkpoint arrest by blocking the induction of p21waf1. Cancer Res, *65:* 8927-8935., 2005.
30. Waldman, T., Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. Nature, *381:* 713-716, 1996.
31. 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. Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. EMBO Rep, *4:* 609-615., 2003.
32. Vigneron, A., Gamelin, E., and Coqueret, O. The EGFR-STAT3 oncogenic pathway up-regulates the Eme1 endonuclease to reduce DNA damage after topoisomerase I inhibition. Cancer Res, *68:* 815-825, 2008.
33. Bihani, T., Chicas, A., Lo, C. P., and Lin, A. W. Dissecting the senescence-like program in tumor cells activated by Ras signaling. J Biol Chem, *282:* 2666-2675, 2007.
34. Adhikary, S. and Eilers, M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. Nat Rev Mol Cell Biol, *6:* 635-645, 2005.
35. Coqueret, O. Linking cyclins to transcriptional control. Gene, *299:* 35-55., 2002.
36. Kingston, R. E. and Narlikar, G. J. ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. Genes Dev, *13:* 2339-2352., 1999.
37. Eberhardy, S. R. and Farnham, P. J. c-Myc mediates activation of the cad promoter via a post-RNA polymerase II recruitment mechanism. J Biol Chem, *276:* 48562-48571., 2001.
38. Eberhardy, S. R. and Farnham, P. J. Myc recruits P-TEFb to mediate the final step in the transcriptional activation of the cad promoter. J Biol Chem, *277:* 40156-40162, 2002.
39. Ayer, D. E., Kretzner, L., and Eisenman, R. N. Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. Cell, *72:* 211-222, 1993.
40. Ayer, D. E., Lawrence, Q. A., and Eisenman, R. N. Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. Cell, *80:* 767-776, 1995.
41. Katayama, H., Sasai, K., Kawai, H., Yuan, Z. M., Bondaruk, J., Suzuki, F., Fujii, S., Arlinghaus, R. B., Czerniak, B. A., and Sen, S. Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. Nat Genet, *36:* 55-62, 2004.
42. Liu, Q., Kaneko, S., Yang, L., Feldman, R. I., Nicosia, S. V., Chen, J., and Cheng, J. Q. Aurora-A abrogation of p53 DNA binding and transactivation activity by phosphorylation of serine 215. J Biol Chem, *279:* 52175-52182, 2004.

Figure Legends

Fig 1:
Aurora-A expression in the G2 phase of the cell cycle in colorectal cell lines.
A-C. HCT116 were synchronized in G1/S with hydroxyurea and released for the indicated times in growth medium complemented with 10% serum. DNA content was analyzed by flow cytometric analysis by propidium iodide incorporation (A). Aurora-A expression was analyzed in these conditions by quantitative PCR (B,) or western blot (C), n=3.
D. HT29 p53-/- cells were synchronized in G1/S with hydroxyurea, released in growth medium and the expression of Aurora-A was analyzed by western blot (n=3).

Fig 2:
Topoisomerase I inhibition induces a downregulation of Aurora-A expression.
A. HCT116 were synchronized in G1/S with hydroxrurea A and released for 9h30 in growth medium or treated with sn38 (10 ng/ml) in RPMI 10% FCS for indicated times.
B. DNA content was analyzed by flow cytometric analysis by propidium iodide incorporation.
C. Aurora-A expression was measured either by western blot analysis (left panel) or by quantitative PCR (right panel). The expression of p21waf1 and tubulin were used as controls, n=3.
D. Flow cytometry analysis of cell death following topoisomerase I inhibition. Cells were treated with sn38 and apoptosis was measured at the indicated times by propidium iodine staining.

Fig 3 :
The inhibition of Aurora-A prevents centrosomal separation.
A. HCT116 cells treated as described in Figure 2 were subjected to immunofluorescence analysis using a polyclonal antibody directed against Aurora-A. Centrosomes were detected by staining with monoclonal antibody to γ-tubulin.
B. The percentage of cells expressing a centrosomal Aurora A was evaluated and compared with γ-tubulin expression. ~ 100 cells were analyzed for each experiment, n=3 +/- sd.

Fig 4 :
The inhibition of Aurora-A is independent of the p53-p21 pathway.
A. HCT116 were synchronized in G1/S with hydroxyurea or treated with sn38 for the indicated times, total cell extracts were prepared and analyzed by western blot using antibodies directed against p21waf1, p53 or its serine 15 phosphorylated form. In parallel, the percentage of senescent cells was evaluated as the number of cells expressing SA-β-gal activity and cell death was analyzed by flow cytometry (n=3).
B. Control, HCT116 p21-/- or HT29 p53-/- cells were treated as described above and the expression of Aurora-A was measured by quantitative PCR analysis (left panel) or by western blot (right) using either GAPDH or tubulin expression as controls, n=3.

Fig 5 :
Myc is associated with the Aurora-A promoter.
A. Western blot analysis of myc expression in HCT116 cells. Cells were presynchronized with hydroxyurea and further treated or not with sn38 (10 ng/ml) for the indicated times. The expression of Myc and Aurora-A was analyzed by western blot on total cell extracts (n=3). In parrallel, cells were transfected with a vector expressing a luciferase reporter gene (500 ng) under the control of the proxymal Aurora-A promoter. Cells were then either synchronized in G2 or treated with sn38. Cytoplasmic extracts were then prepared and processed to measure luciferase activity. The mean of 3 transfections is shown.
B. Schematic representation of the potential Myc binding sites present in the Aurora-A proxymal promoter.
C. ChIP analysis of the recruitment of Myc on the Aurora-A promoter. Cells were either synchronized in G2 or treated with sn38. Soluble chromatin was immunoprecipitated with Myc polyclonal antibodies and DNA samples were then amplified using pairs of primers that cover the proximal Aurora-A promoter (left) or a control region (middle panel). As a control, the association of STAT3 with the -655/-380 region was also analyzed (n=3).

Fig 6 :
Myc is essential for the expression of the Aurora-A gene.
A. LS174T cells were grown in the absence or presence of doxycyclin as indicated and Aurora expression was then analyzed by western blot analysis.
B. DNA content in LST14T cells was analyzed by flow cytometry and propidium iodide incorporation.
C. ChIP analysis of the recruitment of Myc and of histone H3 acetylation on the Aurora-A promoter in LS174T cells. Cells were either synchronized in G2 or treated with sn38. Soluble chromatin was immunoprecipitated with anti-Myc or anti-acetylated-H3 polyclonal antibodies and DNA samples were then amplified using pairs of primers that cover the proximal Aurora-A promoter or a control region. IgG immunoprecipitations were used as controls.

Fig 7 :
Overexpression of Myc and Aurora-A in colorectal tumors.
A-B. The expression of Aurora-A and Myc mRNAs was characterized by quantitative PCR analysis in tumors samples isolated from colorectal tumors (n=11).

Fig 8:
RasV12 induces a downregulation of Aurora-A expression
A. HT29 cells were grown in the presence or absence of doxycyclin and the expression of ras, of erk and of its phosphorylated form was then analyzed by western blot using total cell extract (n=5). HT29 T0 cells express a control empty cDNA whereas HT29 Ras express the rasv12 cDNA upon doxycyclin treatment.
B. Flow cytometry analysis of the percentage of living cells in HT29 cells either expressing ras or treated with sn38 (n=3).
C. Cell cycle profile of HT29 cells expressing or not the activated rasv12 oncogene (n=3).
D-E. HT29 cells were grown in the absence or presence of doxycyclin, treated or not with sn38 as indicated and Aurora expression was then analyzed by quantitative PCR (D) or western blot analysis (E), (n=3).

Fig 9:
RasV12 does not modify Myc recruitment but enhances Max DNA binding.
A. ChIP analysis of the recruitment of Myc on the Aurora-A promoter in HT29 cells expressing rasv12. Cells were grown in the absence or presence of doxycyclin and treated or not with sn38 as indicated. Soluble chromatin was immunoprecipitated with the indicated antibodies and DNA samples were then amplified using pairs of primers that cover the proximal Aurora-A promoter (n=3).
B. Cells were treated as described above and the recruitment of Mad and Max on the proxymal promoter was analyzed by ChIP (n=3).

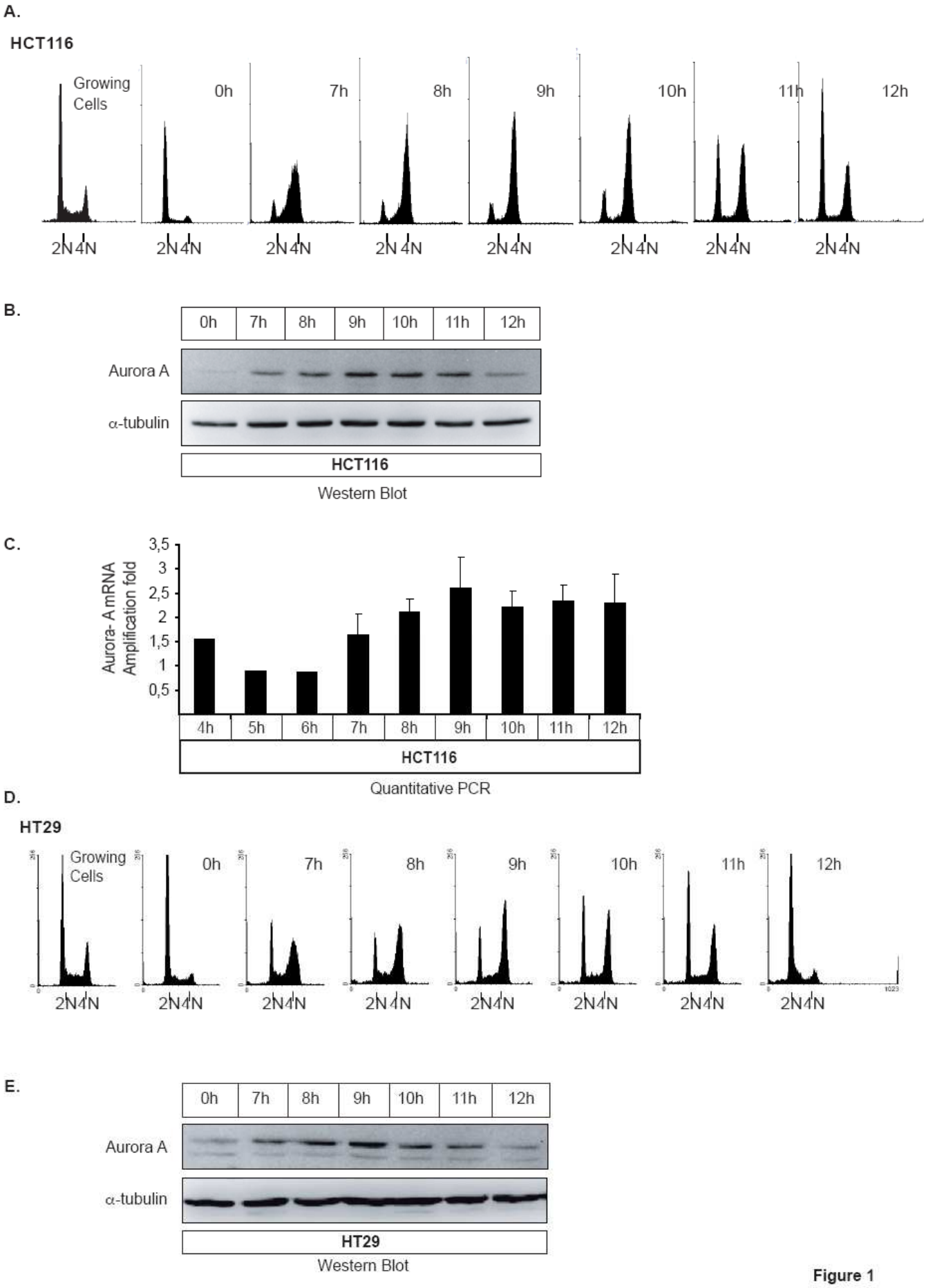

A.
HCT116
Growing Cells
0h
7h
8h
9h
10h
11h
12h
2N 4N
B.
0h
7h
8h
9h
10h
11h
12h
Aurora A
α-tubulin
HCT116
Western Blot
C.
Aurora- A mRNA Amplification fold
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
4h
5h
6h
7h
8h
9h
10h
11h
12h
HCT116
Quantitative PCR
D.
HT29
Growing Cells
0h
7h
8h
9h
10h
11h
12h
2N 4N
E.
0h
7h
8h
9h
10h
11h
12h
Aurora A
α-tubulin
HT29
Western Blot

Figure 1

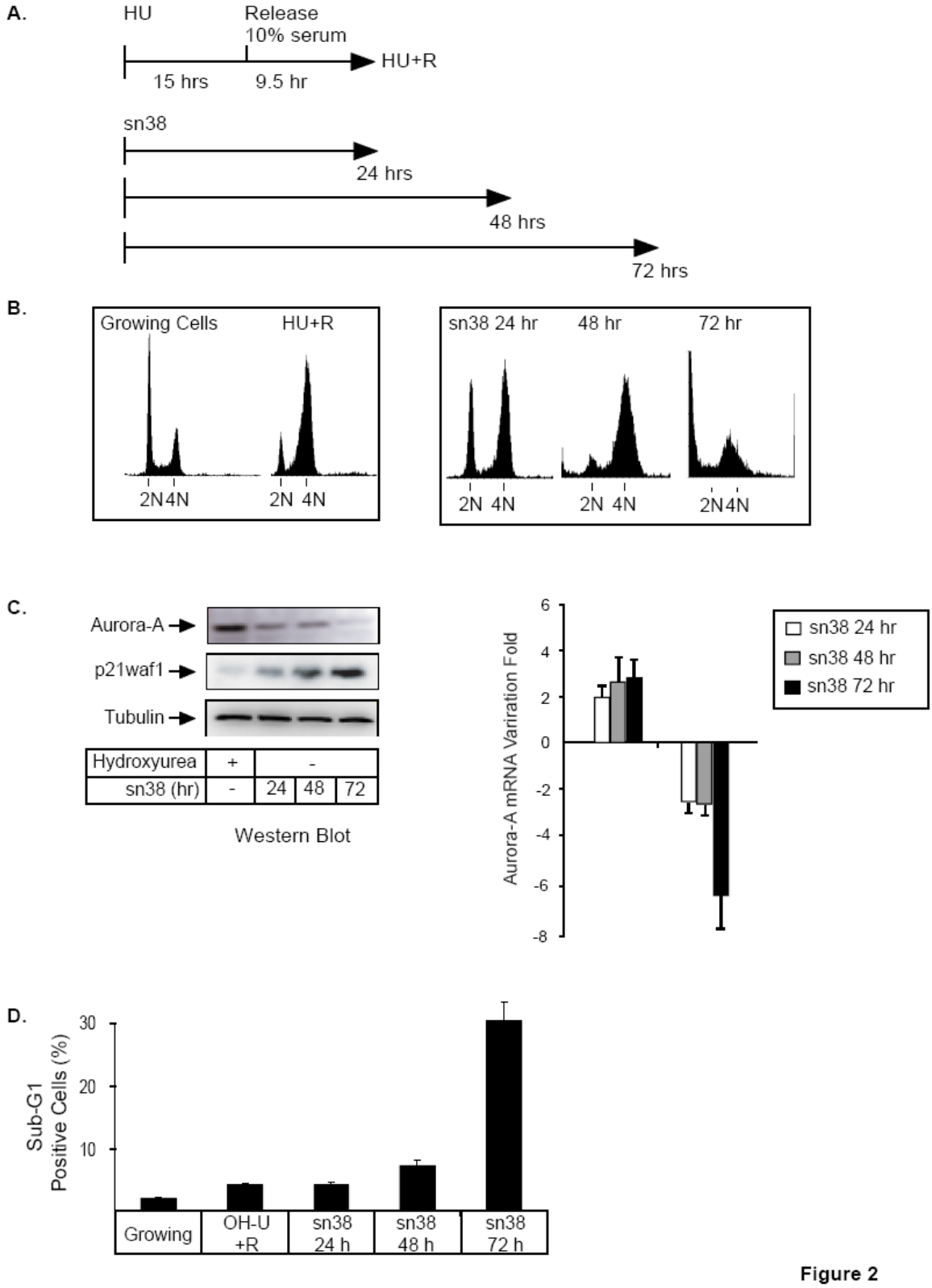
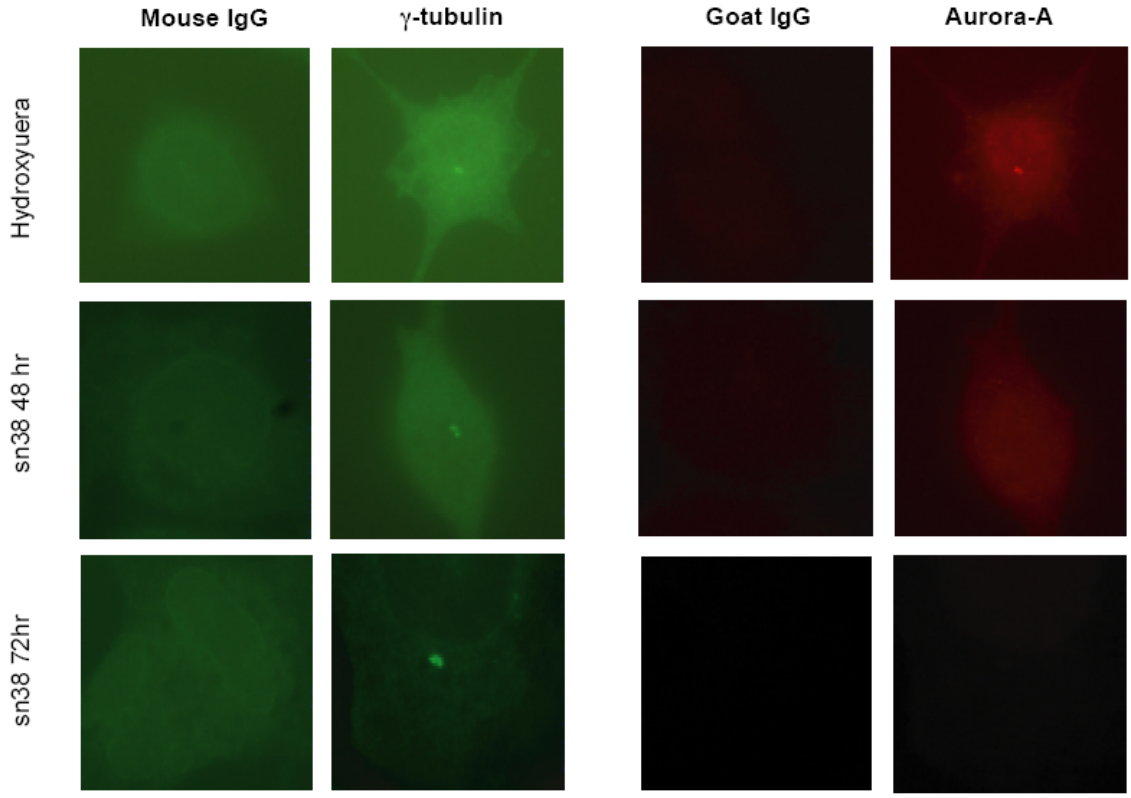

A.
HU
Release
10% serum
HU+R
15 hrs
9.5 hr
sn38
24 hrs
48 hrs
72 hrs
B.
Growing Cells
HU+R
2N 4N
2N 4N
sn38 24 hr
48 hr
72 hr
2N 4N
2N 4N
2N 4N
C.
Aurora-A
p21waf1
Tubulin
Hydroxyurea
+
-
sn38 (hr)
-
24
48
72
Western Blot
Aurora-A mRNA Variration Fold
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
sn38 24 hr
sn38 48 hr
sn38 72 hr
D.
Sub-G1
Positive Cells (%)
30
20
10
Growing
OH-U
+R
sn38
24 h
sn38
48 h
sn38
72 h

Figure 2

A.


Mouse IgG
γ-tubulin
Goat IgG
Aurora-A
Hydroxyuera
sn38 48 hr
sn38 72hr

B.

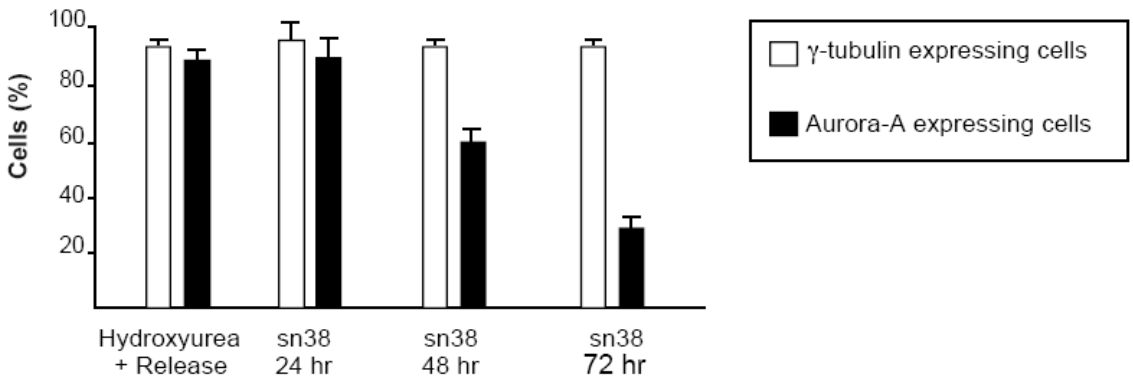
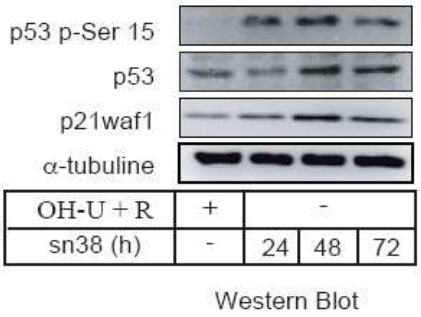
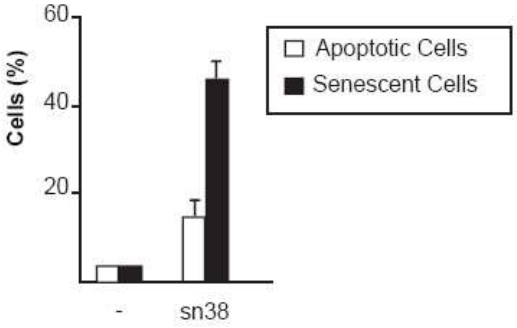

100
80
60
40
20
Cells (%)
Hydroxyurea + Release
sn38 24 hr
sn38 48 hr
sn38 72 hr
γ-tubulin expressing cells
Aurora-A expressing cells

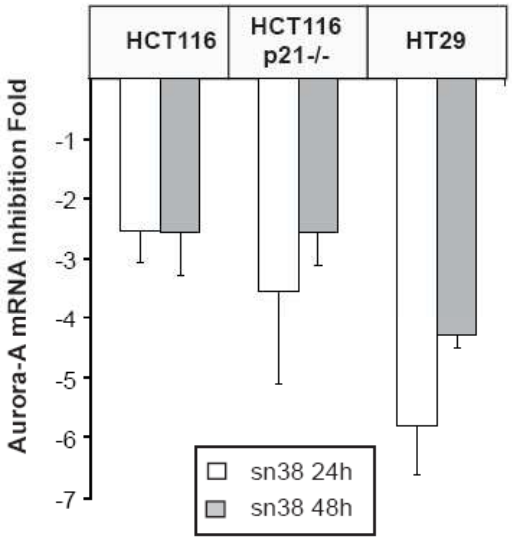
Figure 3

A.


p53 p-Ser 15
p53
p21waf1
α-tubuline
OH-U + R
sn38 (h)
+
-
24
48
72
Western Blot


60
40
20
Cells (%)
Apoptotic Cells
Senescent Cells
-
sn38

B.


HCT116
HCT116 p21-/-
HT29
Aurora-A mRNA Inhibition Fold
-1
-2
-3
-4
-5
-6
-7
sn38 24h
sn38 48h

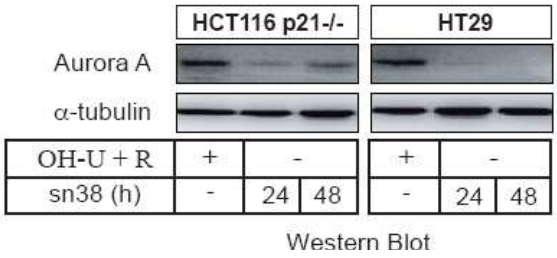

HCT116 p21-/-
HT29
Aurora A
α-tubulin
OH-U + R
sn38 (h)
+
-
24
48
Western Blot

Figure 4

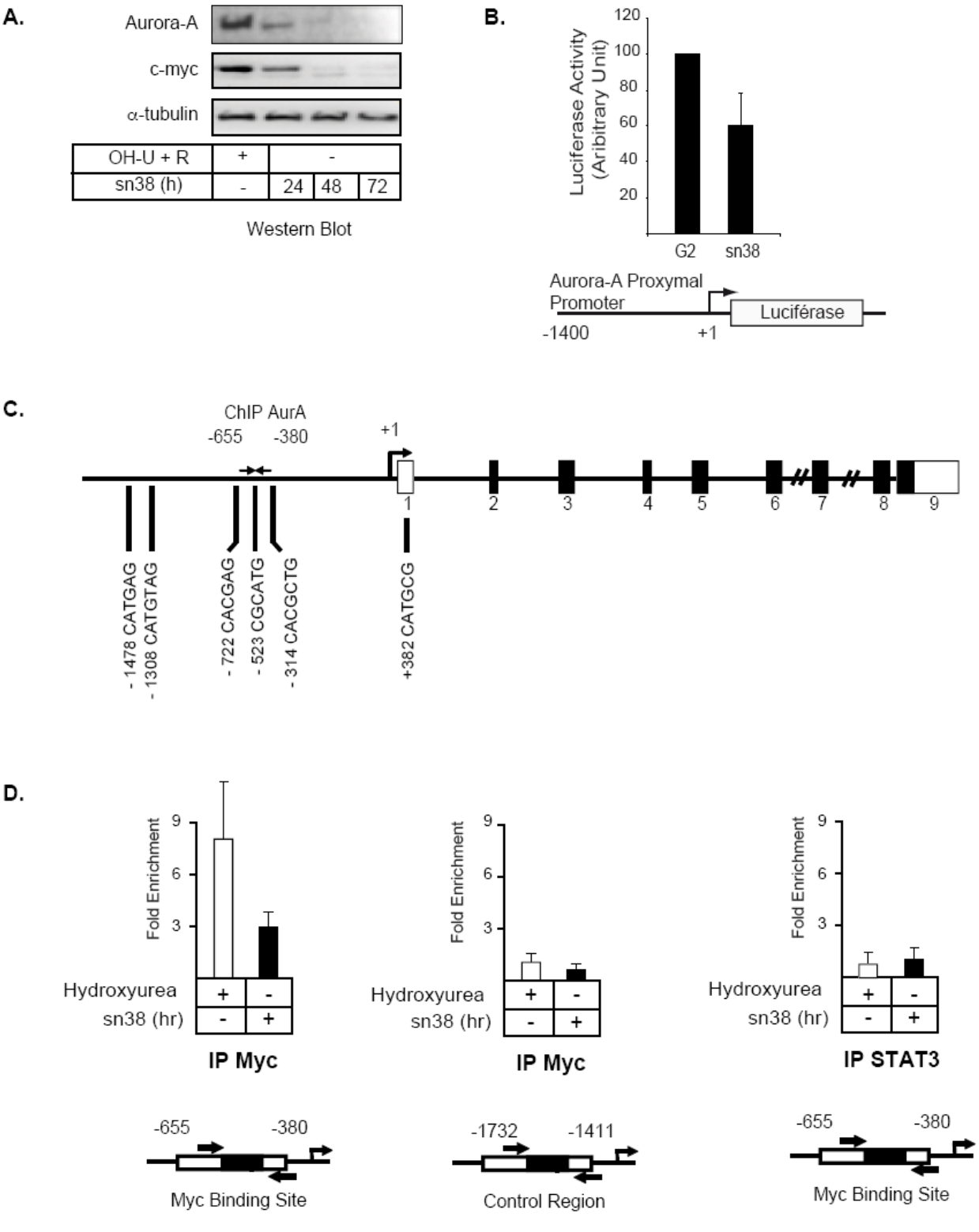

A.
Aurora-A
c-myc
α-tubulin
OH-U + R
sn38 (h)
+
-
24
48
72
Western Blot
B.
Luciferase Activity (Aribitrary Unit)
120
100
80
60
40
20
G2
sn38
Aurora-A Proxymal Promoter
Luciférase
-1400
+1
C.
ChIP AurA
-655
-380
+1
1
2
3
4
5
6
7
8
9
- 1478 CATGAG
- 1308 CATGTAG
- 722 CACGAG
- 523 CGCATG
- 314 CACGCTG
+382 CATGCG
D.
Fold Enrichment
9
6
3
Hydroxyurea
sn38 (hr)
IP Myc
IP Myc
IP STAT3
-655
-380
Myc Binding Site
-1732
-1411
Control Region
-655
-380
Myc Binding Site

Figure 5

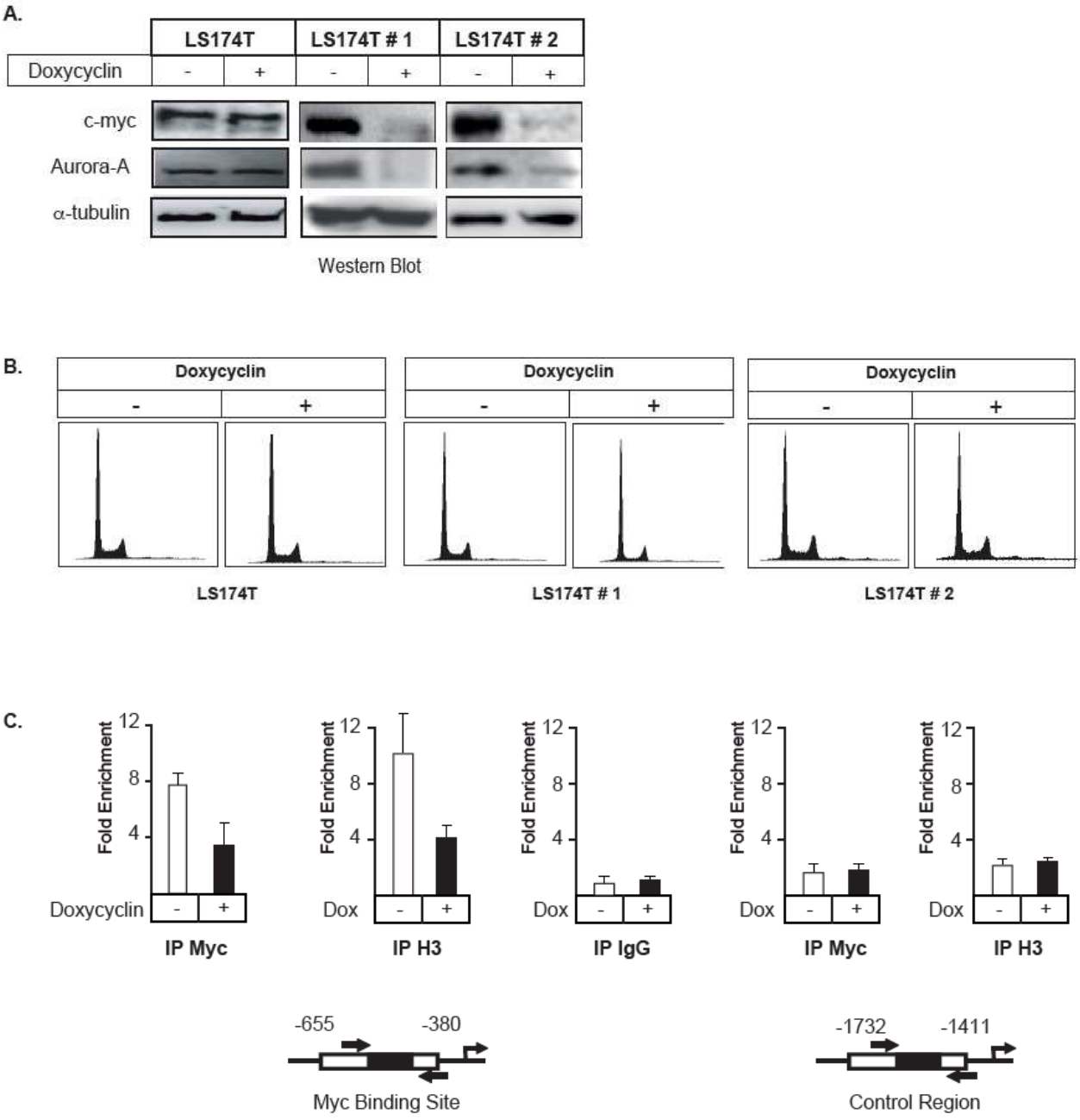

A.
LS174T
LS174T # 1
LS174T # 2
Doxycyclin
-
+
c-myc
Aurora-A
α-tubulin
Western Blot
B.
Doxycyclin
LS174T
LS174T # 1
LS174T # 2
C.
Fold Enrichment
12
8
4
Doxycyclin
Dox
IP Myc
IP H3
IP IgG
-655
-380
Myc Binding Site
-1732
-1411
Control Region

Figure 6

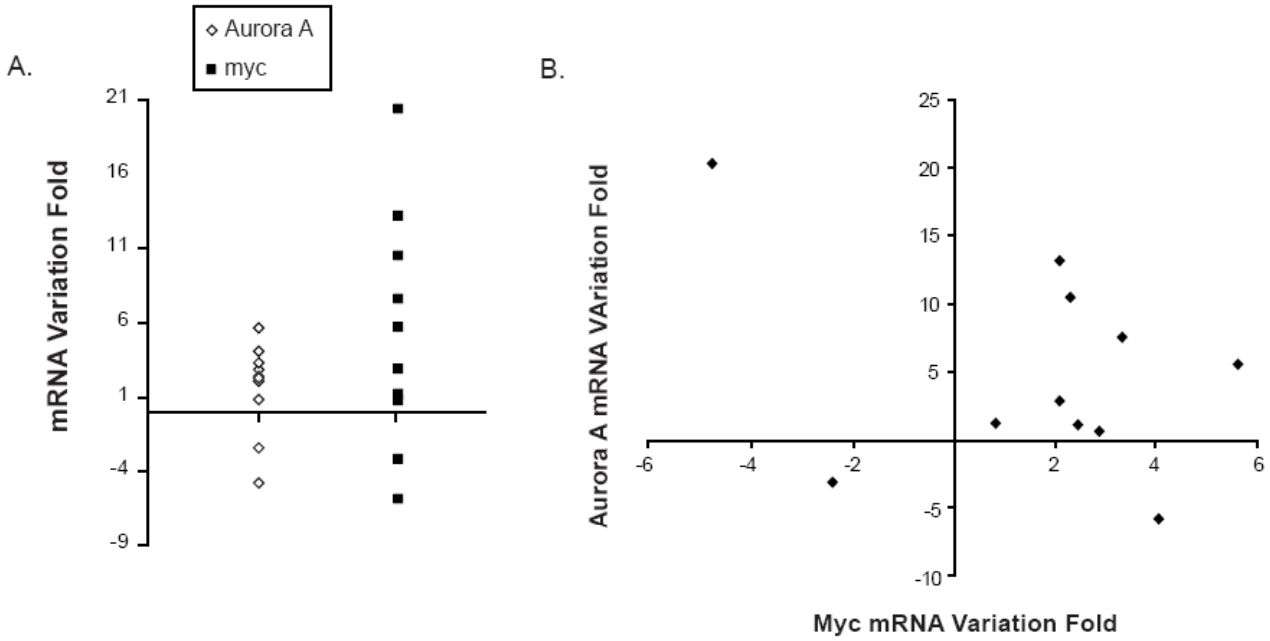

A.
Aurora A
myc
mRNA Variation Fold
21
16
11
6
1
-4
-9
B.
Aurora A mRNA VAriation Fold
25
20
15
10
5
-5
-10
-6
-4
-2
2
4
6
Myc mRNA Variation Fold

Figure 7

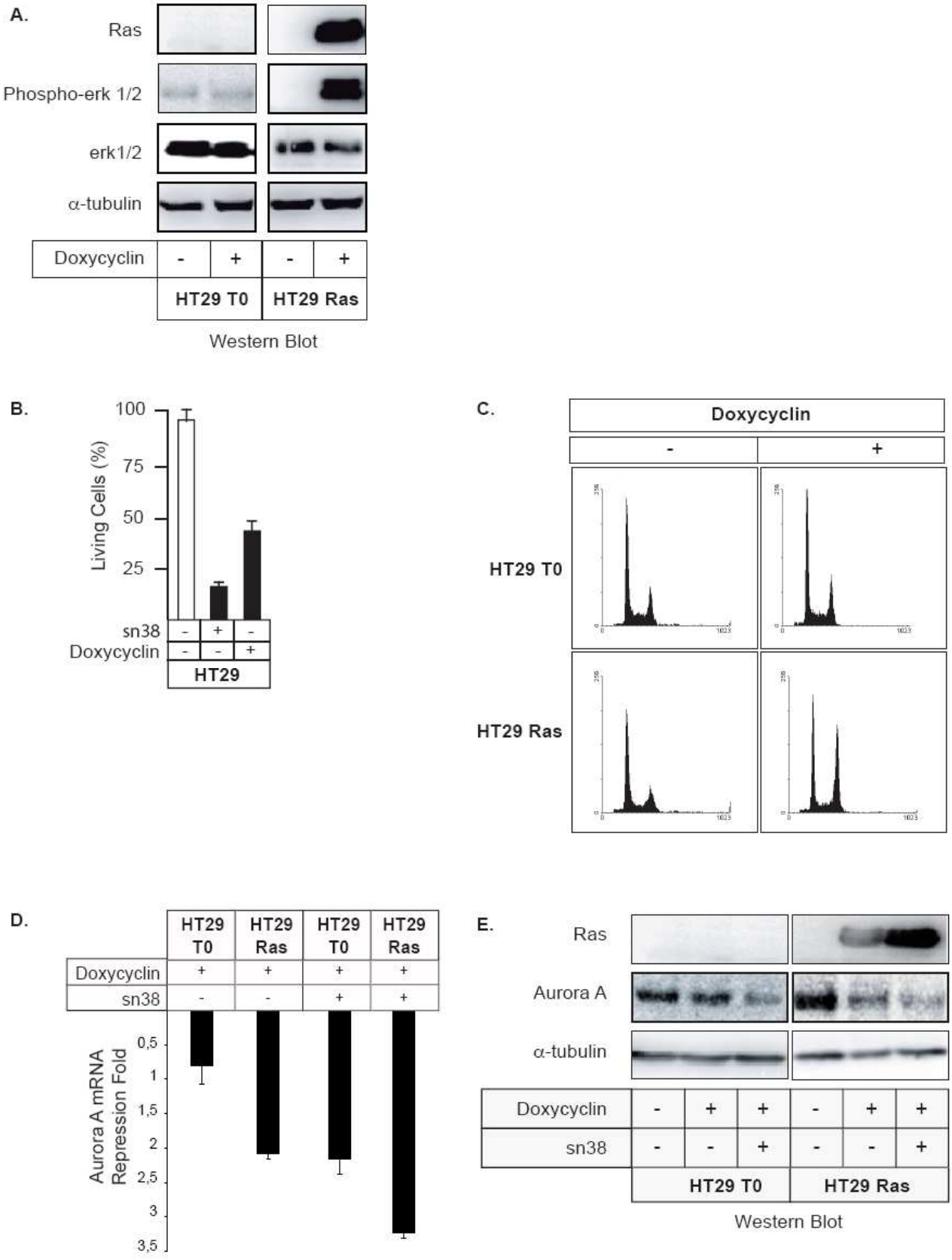

A.
Ras
Phospho-erk 1/2
erk1/2
α-tubulin
Doxycyclin
HT29 T0
HT29 Ras
Western Blot
B.
Living Cells (%)
sn38
Doxycyclin
HT29
C.
Doxycyclin
HT29 T0
HT29 Ras
D.
HT29 T0
HT29 Ras
Doxycyclin
sn38
Aurora A mRNA Repression Fold
E.
Ras
Aurora A
α-tubulin
Doxycyclin
sn38
HT29 T0
HT29 Ras
Western Blot

Figure 8

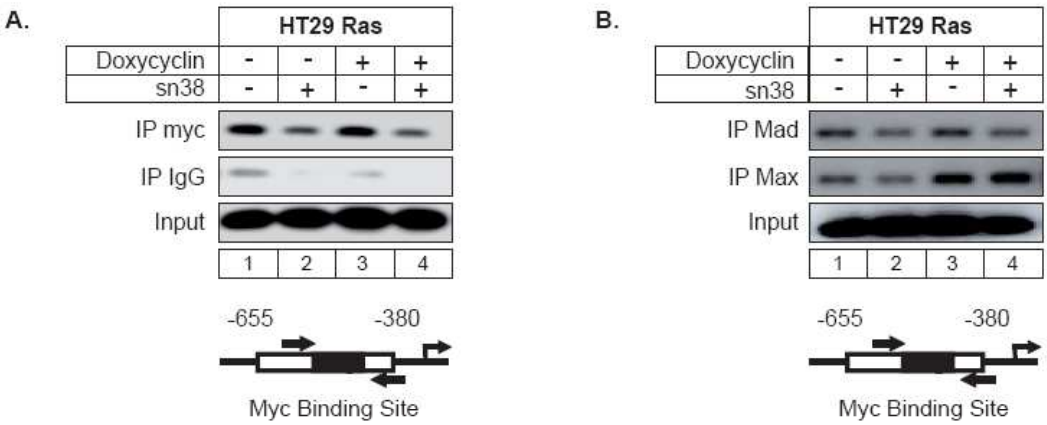

A.
HT29 Ras
Doxycyclin - - + +
sn38 - + - +
IP myc
IP IgG
Input
1 2 3 4
-655 -380
Myc Binding Site
B.
HT29 Ras
Doxycyclin - - + +
sn38 - + - +
IP Mad
IP Max
Input
1 2 3 4
-655 -380
Myc Binding Site

Figure 9

Résultats complémentaires

L'inhibiteur du cycle cellulaire p21 se lie aux promoteurs de c-myc et cdc25A lors de dommages de l'ADN et induit leur répression

Toutes les étapes du cycle cellulaire se succèdent de façon coordonnée. L'enchaînement de ces étapes est assuré par plusieurs régulateurs majeurs, entre autres les complexes cyclines et kinases dépendantes des cyclines (cyclines/cdks). La régulation de l'activité de ces complexes est assurée par l'activation des cdks et l'apparition séquentielle des cyclines mais également par l'existence d'inhibiteurs endogènes appelés CKI. Il existe deux familles de CKI dans les cellules animales, les Cip/Kip et les INK4.
La protéine p21 fait partie de la famille de protéines Cip/Kip impliquée dans la régulation de l'ensemble des complexes cyclines/cdks. L'ensemble de ces protéines participe à la constitution de différents points de contrôle autorisant ou non la progression des cellules dans le cycle cellulaire. A côté de ces rôles classiques dans l'inhibition du cycle cellulaire, plusieurs études montrent que p21 régule le recrutement du complexe transcriptionnel par plusieurs facteurs de transcription comme c-myc ou encore STAT3 (Coqueret and Gascan 2000; Perkins 2002; Fritah, Saucier et al. 2005). La protéine p21 participerait ainsi à l'inhibition de la progression du cycle cellulaire. D'autre part, des expériences de puces à ADNc montrent que la surexpression de p21 est associée à la répression de plusieurs gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, la réplication de l'ADN, ou l'entrée en mitose comme cdk1, Plk1 (Chang, Broude et al. 2000; Chang, Watanabe et al. 2000). Ainsi, p21 semble être un cofacteur transcriptionnel, nous souhaitions donc analyser la régulation de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription STAT3 par p21 et la présence de p21 sur le promoteur des gènes cibles de STAT3. De plus, p21 est induit lors de dommages de l'ADN par une voie dépendante de p53. Nous avons donc testé l'effet des drogues antitumorales telles que les inhibiteurs de topoisomérase I et II sur p21.

Nous avons tout d'abord analysé l'expression de la protéine c-myc en réponse à l'induction de p21 dans une lignée fibroblastique HT1080 transfectée de façon stable avec vecteur inductible à l'IPTG (isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside) de p21. En effet la stimulation de cellules quiescentes avec différents facteurs de croissance induit l'expression de protéines comme c-

myc ou encore STAT3. Ainsi lors d'une stimulation à l'aide de l'IL-6 (interleukine 6) des cellules HT1080, une augmentation des ARNs de c-myc et de cdc25A est observée. En revanche, l'induction de p21 inhibe la transcription et l'expression du gène de c-myc et de cdc25A dans ces cellules, en croissance ou en réponse à l'IL-6. Une analyse par immunoprécipitation de chromatine a permis de mettre en évidence le recrutement de p21 lors de son induction, sur le promoteur du gène de c-myc. Le recrutement de p21 sur le promoteur de c-myc et de cdc25A induit également l'inhibition d'acétylation de l'histone H4 et l'inhibition du recrutement de l'histone acétyltransférase p300. De plus, la forme élongatrice de l'ARN polymérase II (phosphorylée sur la sérine 2) n'est plus observable dans les exons du gène de c-myc. Ainsi, le recrutement de p21 sur le promoteur de c-myc et cdc25A modifie le complexe transcriptionnel recruté par STAT3 et induit l'inhibition de la transcription de c-myc et de cdc 25A.

L'activation de p21 constitue une étape dans la réponse aux dommages de d'ADN. Nous avons souhaité analyser l'inhibition de c-myc par p21 dans les cellules HT1080 lors d'un traitement induisant des cassures de l'ADN. Le sn38, métabolite actif de l'irinotecan utilisé dans le traitement du cancer colorectal, et la doxorubicine, sont respectivement des inhibiteurs de topoisomérases I et II. Le traitement des cellules HT1080 avec ces différentes drogues induit l'expression endogène de p21 et inhibe celle de cdc25A et de c-myc. Le recrutement de p21 est également observé sur les promoteurs de c-myc et cdc25A, de la même manière que lors de l'induction de p21 exogène. L'utilisation de la lignée cellulaire HCT116 colorectale dans laquelle le gène de p21 est inhibé par recombinaison homologue (HCT116 p21-/-) permet de confirmer ces résultats. En effet, le traitement des cellules HCT116 à l'aide des différentes drogues permet également de mettre en évidence l'induction de p21, l'inhibition de c-myc et le recrutement de p21 sur le promoteur de c-myc. En revanche, dans la lignée cellulaire HCT116 p21-/-, l'inhibition de c-myc est moins importante en réponse au traitement. Ainsi, 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.

Lors de dommages de l'ADN, p21 est induit par un mécanisme dépendant de p53, se lie aux complexes cyclines/cdks et les inhibent. La protéine pRb n'est donc pas phosphorylée, elle inhibe les facteurs de transcription E2F, participant alors à l'arrêt de la progression du cycle

cellulaire. Parallèlement, p21 est recruté sur les promoteurs de cdc25A et de c-myc inhibant ainsi leur activation et la progression du cycle cellulaire.

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 281, NO. 46, pp. 34742–34750, November 17, 2006
© 2006 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

The Cell Cycle Inhibitor p21^{waf1} 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[1]

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

In addition to its function as a cyclin-dependent kinase (cdk) inhibitor, p21^{waf1} 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^{waf1} 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^{waf1} 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^{waf1} 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$^{waf1-/-}$ cells re-replicate their DNA and become polyploid. In light of these results, we propose that p21^{waf1} 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)[2] 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^{waf1}, p27^{Kip1}, and p57^{Kip2}, which bind to and inhibit all cyclin-Cdk complexes. *p21^{waf1}* 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^{waf1} 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^{waf1} upon DNA damage, mediating G_1 and G_2 arrest as well as tetraploidy checkpoints (6, 7).

Besides its classical roles, p21^{waf1} is also involved in a number of other specific functions that may also contribute to growth arrest. Beyond its involvement with cyclin/cdks, p21^{waf1} 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^{waf1} binds to these transcription factors to regulate their activities, it is tempting to speculate that p21^{waf1} 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^{waf1} is correlated with the transcriptional repression of genes involved in cell cycle progression, DNA replication, and mitosis entry. For instance, p21^{waf1} 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^{waf1} prevents the recruitment of p300, causing histone hypoacetylation and transcriptional repression of the *Wnt4* gene (18). Upon estradiol signaling, p21^{waf1} 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^{waf1} 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^{waf1}, 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, Comite Departemental 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.

[1] 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.

[2] 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^{waf1}. Therefore, one can speculate that the effects of p21^{waf1} 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^{waf1}.

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^{waf1} 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^{waf1} 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^{waf}, with an isopropyl-1-thio-β-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^{waf1} 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^{waf1} 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^{waf1} (C19), c-Myc (N262), and p53 (FL393) were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Anti-α-tubulin (T9026) was obtained from Sigma. The fibrosarcoma cells used in this study correspond to the HT1080 p21–9 cell line that carries p21^{waf1} in an IPTG-inducible vector as previously described (11). Note that this cell line (referred to in the text as HT1080) is p16^{INK4} 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_2SO and used diluted at the indicated concentrations. The human colorectal cancer cell line HCT116 wild type and its p21$^{-/-}$ derivative cell line in which both p21^{waf1} 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^{waf1}, 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 μl of extraction buffer (10 mM Hepes, pH 7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μg/ml leupeptin, 1 μg/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 μg 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 μg/ml leupeptin, 1 μg/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 μg of sheared salmon sperm DNA, 2.5 μg of preimmune serum, and 20 μl of protein A-Sepharose (of 50% slurry). Immunoprecipitation was performed overnight with specific antibodies, and then 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 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 $NaHCO_3$. 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 μl from a 100-μl DNA preparation were used for 25–30 cycles of amplifications. The following regions were amplified: region −223/−40 (p21^{waf1}, 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 μl of DNA and 5 pM primers diluted in a final volume of 5 μl of reaction mix LightCycler (2239264; Roche Applied Science) and 4 mM $MgCl_2$. Fluorescent products were monitored by real-time PCR using a LightCycler. The PCR reactions were carried out in a 10-μl volume containing 1× LightCycler Faststart DNA master SYBR Green 1 (Roche Applied Science), 5 pmol for each forward and reverse primer, 2 mM $MgCl_2$, and 5 μl 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

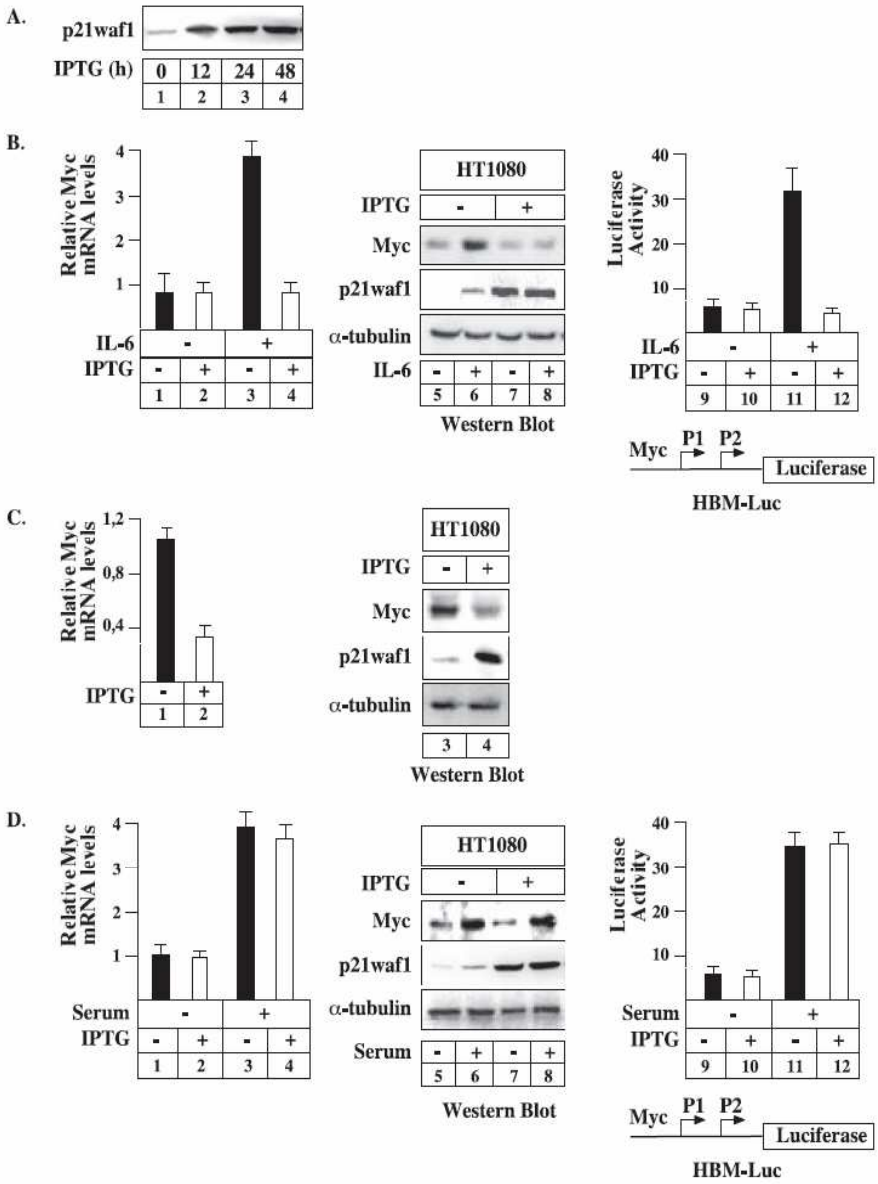


FIGURE 1. **p21^{waf1} down-regulates *myc* expression.** *A*, growing HT1080 cells were left untreated or treated with IPTG (50 μM) for the indicated times. Overexpression of p21^{waf1} was verified by Western blot analysis. *B*, HT1080 cells were serum starved, left untreated or treated with IPTG (24 h, 50 μM), 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 μg), 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 ± S.D. is shown. *C*, asynchronously growing HT1080 cells were either left untreated or treated with IPTG (24 h, 50 μM), 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 μM), 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 ± 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, 2×10^5 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 °C, resuspended in phosphate-buffered saline containing 50 μg/ml propidium iodide, and immediately analyzed by flow cytometry (BD Biosciences).

RESULTS

p21^{waf1} Suppresses myc Gene Transcription—In addition to inhibiting cyclin/cdks, p21^{waf1} participates in several protein-protein interactions to prevent cell cycle progression and DNA replication. In particular, p21^{waf1} binds to transcription factors and coactivators to regulate their functions (8, 9). An attractive possibility could be that p21^{waf1} 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_0–G_1 progression. The HT1080 fibrosarcoma cell line used in the present study (p21–9) (11) carries p21^{waf1} in an IPTG-inducible vector (Fig. 1*A*, *lanes 1–4*). Up-regulation of p21^{waf1} 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^{waf1} regulates *myc* expression, cells were either maintained in serum (Fig. 1*C*) or serum starved and stimulated with two different mitogens, IL-6 or 10% serum (Fig. 1, *B* and *D*, respectively). Results presented in Fig. 1*B* indicate that p21^{waf1} 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. 1*B*, *lanes 3–4* and *7–8*). In addition, p21^{waf1} prevented the IL-6-mediated induction of the Myc HBM-Luc promoter (24), confirming its inhibitory functions at the transcriptional level (Fig. 1*B*, *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^{waf1} was found to

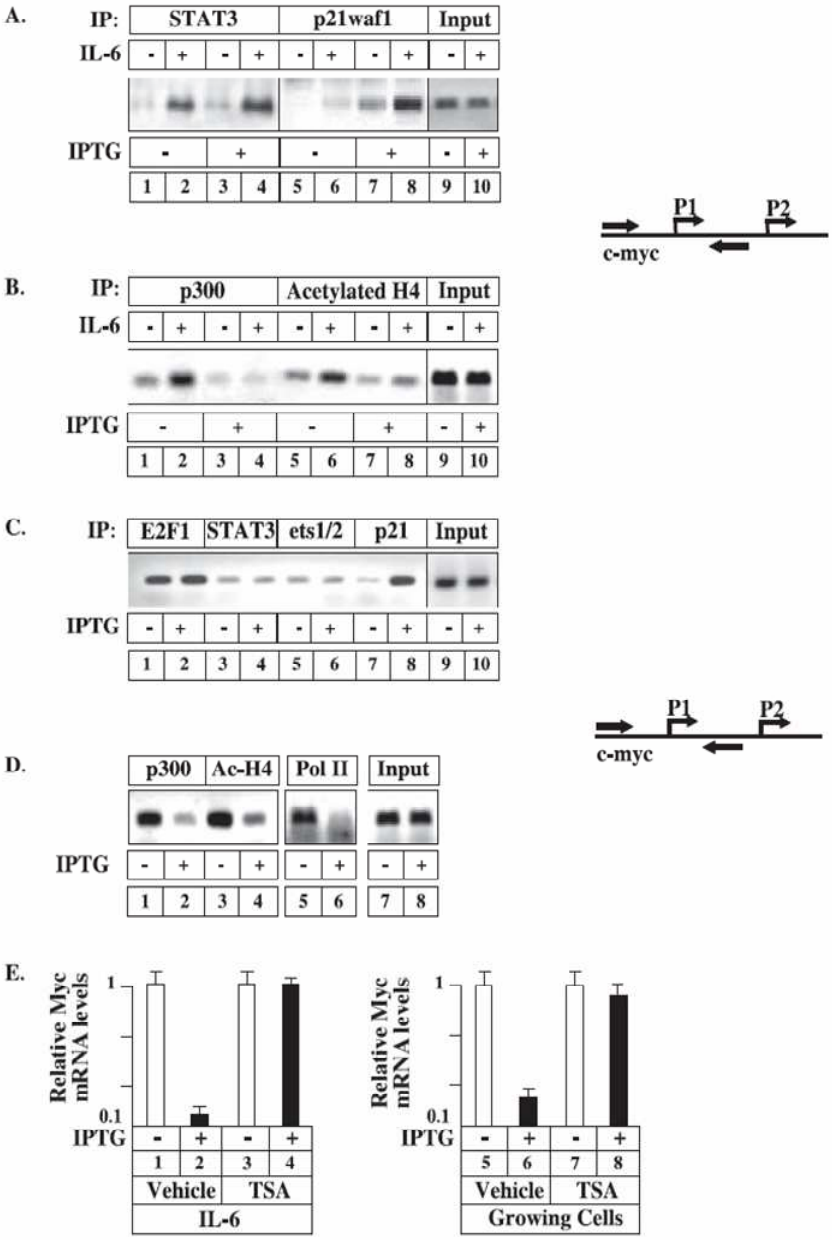


FIGURE 2. **Inhibition of p300 recruitment and histone H4 acetylation upon p21^{waf1} induction.** *A* and *B*, ChIP analysis of the recruitment of STAT3, p21^{waf1}, and p300 and of histone H4 acetylation on the *myc* promoter. Cells were serum starved for 2 days, treated with IPTG (24 h, 50 μM), and 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 EF1, ets1/2, STAT3, p21^{waf1}, 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 μM), 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. 1*C*). The same experiments were also performed using serum-starved cells that were restimulated with 10% serum (Fig. 1*D*). In contrast, p21^{waf1} had no effect on *myc* mRNA (Fig. 1*D*, *lanes 1–4*), protein (*lanes 5–8*), or promoter (*lanes 9–12*) under these conditions, further confirming the specificity of its transcriptional functions.

p21^{waf1} Binds to the myc Promoter to Prevent Histone H4 Acetylation—One proposed mechanism whereby p21^{waf} 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^{waf1} interacts with E2F1 or STAT3 to prevent their transcriptional activity (25, 26). To assess whether p21^{waf1} 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. 2*A*, *lanes 1–4* and data not shown). In parallel, the ChIPs assay also showed that p21^{waf1} binds specifically to this region of the *myc* gene upon IPTG induction (Fig. 2*A*, *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. 2*B*, *lanes 2* and *6*). ChIP assays showed a significant down-modulation of p300 binding as well as a reduction of H4 acetylation upon p21^{waf1} induction (Fig. 2*B*, compare *lanes 2*, *4* and *6*, *8*).

The same effects were also observed in growing cells, where p21^{waf1} was also found to inhibit *myc* expression (Fig. 1*C*). Under these conditions, p21^{waf1} bound to the *myc* promoter upon IPTG induction (Fig. 2*C*, *lanes 7* and *8*). Confirming the above results, down-modulation of p300 binding as well as inhibition of histone H4 acetylation in p21^{waf1}-expressing cells was shown. As a consequence, the association of the elongating form of the RNA polymerase with DNA was also inhibited (Fig. 2*D*, *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. 2*C*, *lanes 1–6*).

We also observed that the DNA binding activities of E2F-1 and STAT3 were unaffected by increased p21^{waf1} expression (Fig. 2*A*, *lane 4*, and 2*C*, *lane 2*). To confirm that p21^{waf1} down-

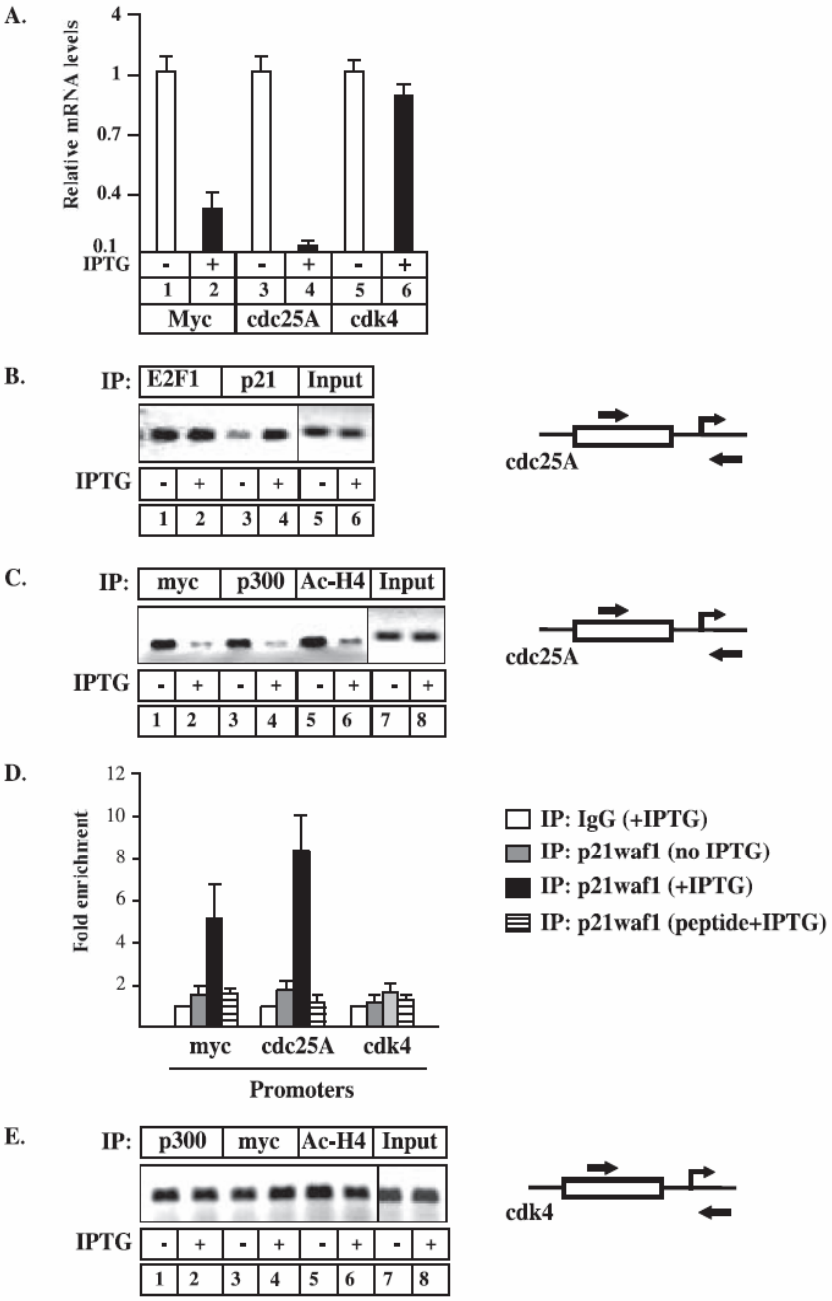


FIGURE 3. **p21^{waf1} inhibits the expression of *cdc25A*.** *A*, asynchronously growing HT1080 cells were either left untreated or treated with IPTG (24 h, 50 μM), and the expression of the Myc, cdc25A, and cdk4 mRNAs was analyzed by real-time PCR. *B* and *C*, soluble chromatin was prepared from asynchronously growing HT1080 cells treated or not with IPTG for 24 h and immunoprecipitated with antibodies directed against E2F1, p21^{waf1} (*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^{waf1} or a control IgG in the presence or absence of the corresponding p21^{waf1} 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 ± 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^{waf1} 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*).

Transcriptional Regulation of myc Target Genes by p21^{waf1}—Having shown that p21^{waf1} 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^{waf1} 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^{waf1} 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^{waf1} 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^{waf1} 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^{waf1} 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^{waf1} 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^{waf1} was not recruited to DNA in the absence of IPTG, but real-time

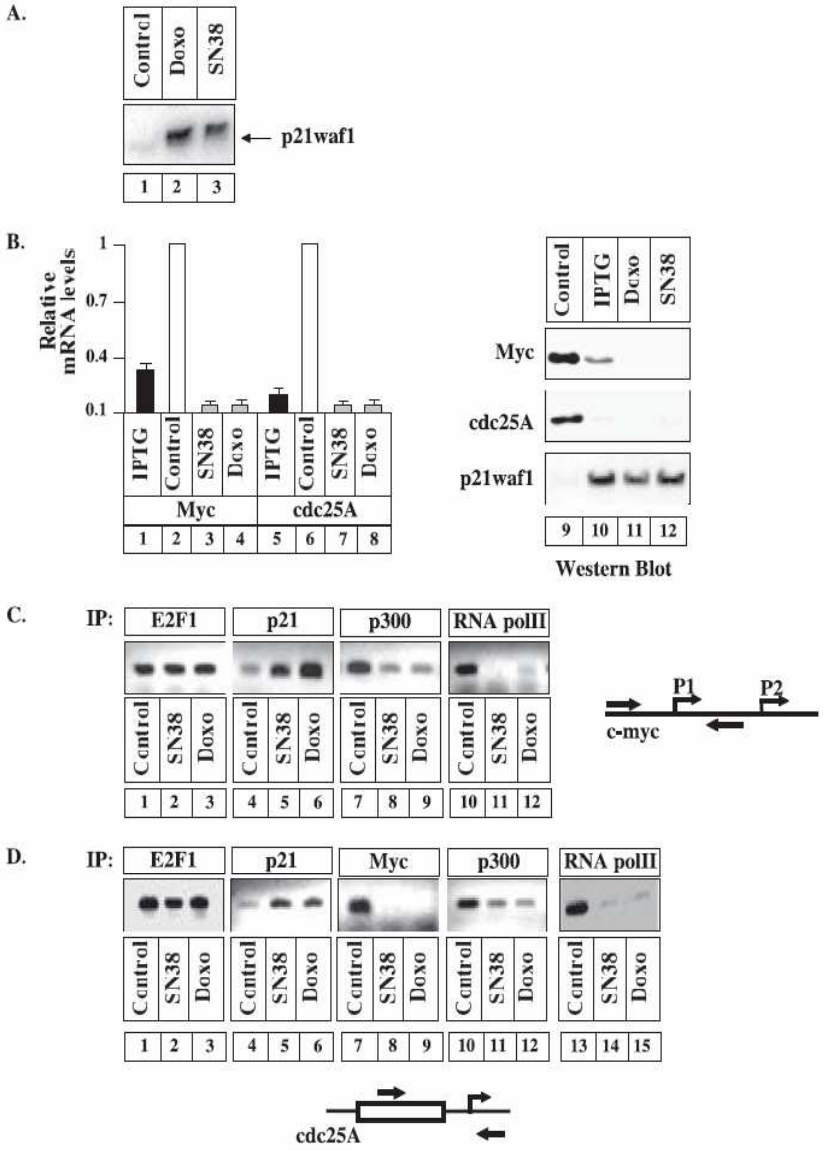


FIGURE 4. **p21^{waf1} functions as a transcriptional repressor upon DNA damage.** *A*, asynchronously growing HT1080 cells were treated or not with SN38 (5 ng/ml) or doxorubicin (30 nM) for 36 h, and the up-regulation of p21^{waf1} was verified by Western blot analysis. *B*, asynchronously growing HT1080 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^{waf1} 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^{waf1} was not detected on the *cdk4* promoter (Fig. 3*D*). 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^{waf1} 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. 3*E*, *lanes 3* and *4*). Accordingly, p300 binding and histone H4 acetylation were not affected by the up-regulation of the cell cycle inhibitor (Fig. 3*E*). This indicates that the transcriptional effects of p21^{waf1} are specific to the Myc-cdc25A pathway and do not affect the expression of *cdk4*.

p21^{waf1} Binds to the myc and cdc25A Promoters upon DNA Damage—We then studied whether p21^{waf1} 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^{waf1} (Fig. 4*A*, *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. 4*B*, *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^{waf1}. Western blot analysis also confirmed that these treatments induce the down-regulation of the Myc and cdc25A proteins (Fig. 4*B*, *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^{waf1} with the *myc* and *cdc25A* promoters (Fig. 4*C* and 4*D*, *lanes 4–6*). Confirming the above results, we also observed that the recruitment of p21^{waf1} to DNA was associated with a down-modulation of p300 and RNA polymerase binding to the *myc* gene (Fig. 4*C*, *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^{waf1} prevented the elongating form of the polymerase from reaching the 3′ part of the gene (Fig. 4*D*, *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$^{-/-}$ derivative cell line in which both p21^{waf1} 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−/− cells (Fig. 5*A*, *lanes 1–6*). Interestingly, Myc was only partially repressed in the absence of p21^{waf1} (Fig. 5*A*, *lanes 7–12*). It has been recently demonstrated that p53 binds to the Myc promoter to repress its expression (28).

The Journal of Biological Chemistry

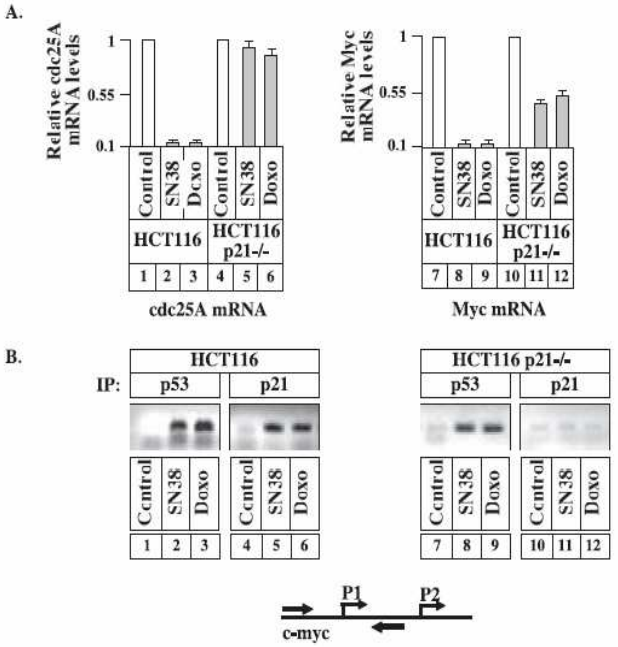


FIGURE 5. **Regulation of *myc* and *cdc25A* expression in cells lacking p21^{waf1}.** *A*, HCT116 wild-type cells or their p21$^{-/-}$ derivative were treated with SN38 (5 ng/ml) or doxorubicin (30 nM) for 36 h, and the expression of the *cdc25A* (*lanes 1–6*) and *myc* (*lanes 7–12*) mRNAs was analyzed 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^{waf1} and p53 to the proximal *myc* promoter in parental (*lanes 1–6*) or p21$^{-/-}$ cells (*lanes 7–12*).

Using ChIP experiments, we effectively found in wild-type or p21$^{-/-}$ 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$^{-/-}$ cells was probably due to p53 binding.

p21^{waf1} Prevents Aneuploidy upon Genotoxic Treatment—The effect of doxorubicin was also studied on HCT116 wild-type or p21$^{-/-}$ 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^{waf1}* 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$^{waf1-/-}$ 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 become 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$^{-/-}$ 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

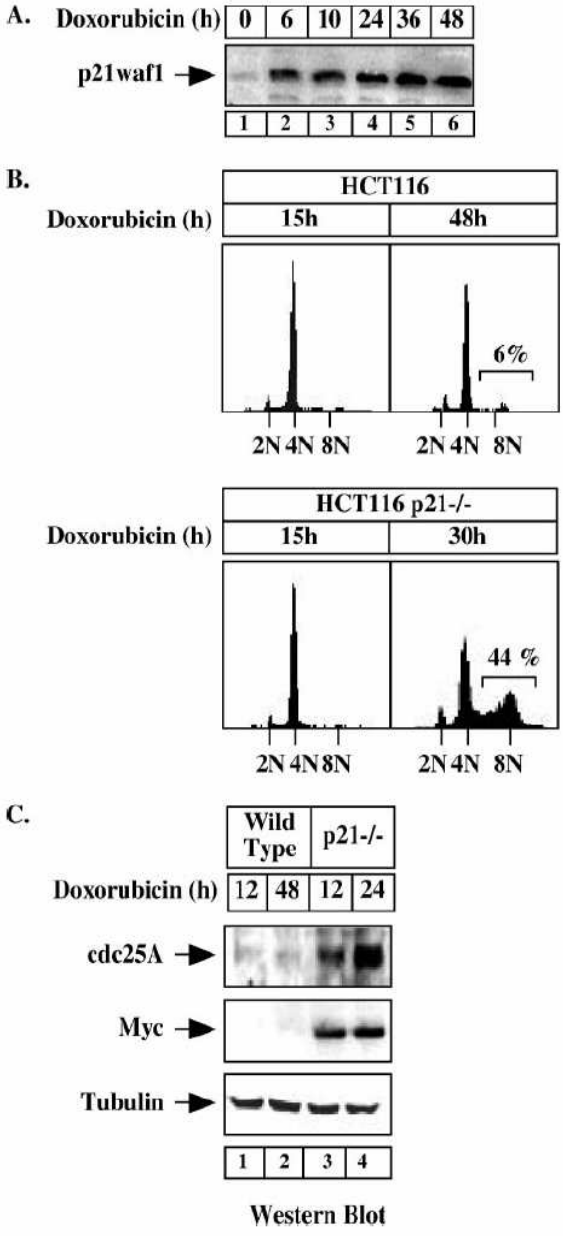


FIGURE 6. **HCT116-attached cells lacking p21^{waf1} become polyploid upon genotoxic treatment.** *A*, HCT116 wild-type cells were synchronized with hydroxyurea and released in serum in the presence of doxorubicin (30 nM) for the indicated times. Cellular extracts were then subjected to immunoblotting for p21^{waf1}. *B*, HCT116 wild-type or p21$^{-/-}$ 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$^{-/-}$ 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^{waf1} 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^{waf1} 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^{waf1} also interacts with various DNA-binding proteins involved in cell cycle progression. This has led to the hypothesis that p21^{waf1} 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^{waf1} functions as a transcriptional regulator that physically associates with the promoter of the *myc* and *cdc25A* genes. By ChIP assays, we found that p21^{waf1} 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^{waf1} 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^{waf1} 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^{waf1} 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^{waf1} prevents both Myc and cdc25A mRNA expression, cdk4 levels were unaffected by the cell cycle inhibitor. Accordingly, p21^{waf1} 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^{waf1} 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, upregulation 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^{INK4}, p19^{ARF}, or p21^{waf1}, prevent the effects of Myc on cell cycle progression through Rb dephosphorylation and E2F inactivation. However, recent results have also shown that p19^{ARF} binds to the activation domain of Myc to prevent its transcriptional functions

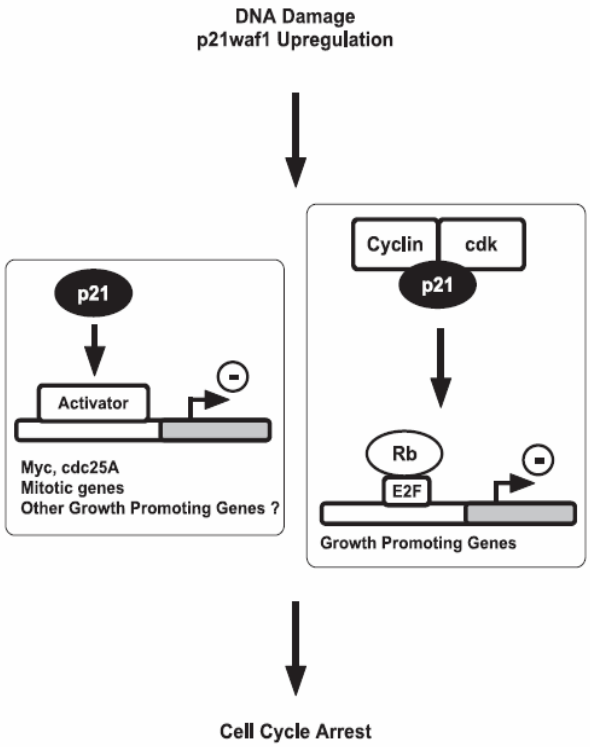


FIGURE 7. **Proposed model for the p21-mediated cell cycle arrest upon DNA damage.** Upon DNA damage, p21^{waf1} is induced by p53-dependent mechanisms and binds to cyclin-cdk complexes. As a consequence, Rb is dephosphorylated, and this protein binds to E2F to prevent cell cycle progression. In addition, p21^{waf1} 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^{ARF} 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^{INK4}, it therefore appears that p53, p19^{ARF}, and p21^{waf1} have transcriptional functions that also control the effect of Myc on tumorigenesis.

Recent results have suggested that the balance between Myc and p21^{waf1} 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*^{waf1} 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*^{waf1} promoter (41). Therefore, it appears that p21^{waf1} can inhibit cell cycle arrest through Myc down-regulation but also that Myc prevents p21^{waf1} expression to induce proliferation. In line with this observation, we have recently shown that the

expression of p21^{waf1} is lost in glioblastoma cells, whereas myc levels remain unaltered (42).

Recent observations have demonstrated that the up-regulation of p21^{waf1} 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^{ARF}, p21^{waf1} 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^{waf1} 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

1. Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (2004) *Genes Dev.* **18,** 2699–2711
2. 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
3. Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S. J. (1993) *Cell* **75,** 805–816
4. Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., and Stillman, B. (1994) *Nature* **369,** 574–578
5. Chuang, L. S., Ian, H. I., Koh, T. W., Ng, H. H., Xu, G., and Li, B. F. (1997) *Science* **277,** 1996–2000
6. Waldman, T., Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1996) *Nature* **381,** 713–716
7. Andreassen, P. R., Lacroix, F. B., Lohez, O. D., and Margolis, R. L. (2001) *Cancer Res.* **61,** 7660–7668
8. Coqueret, O. (2003) *Trends Cell Biol.* **13,** 65–70
9. Perkins, N. D. (2002) *Cell Cycle* **1,** 39–41
10. Fritah, A., Saucier, C., Mester, J., Redeuilh, G., and Sabbah, M. (2005) *Mol. Cell. Biol.* **25,** 2419–2430
11. 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
12. 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
13. Snowden, A. W., Anderson, L. A., Webster, G. A., and Perkins, N. D. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20,** 2676–2686
14. 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
15. 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
16. Martinez-Balbas, M. A., Bannister, A. J., Martin, K., Haus-Seuffert, P., Meisterernst, M., and Kouzarides, T. (1998) *EMBO J.* **17,** 2886–2893
17. Nakajima, T., Uchida, C., Anderson, S. F., Lee, C. G., Hurwitz, J., Parvin, J. D., and Montminy, M. (1997) *Cell* **90,** 1107–1112
18. Devgan, V., Mammucari, C., Millar, S. E., Brisken, C., and Dotto, G. P. (2005) *Genes Dev.* **19,** 1485–1495
19. Zhu, H., Chang, B. D., Uchiumi, T., and Roninson, I. B. (2002) *Cell Cycle* **1,** 59–66
20. Lucibello, F. C., Truss, M., Zwicker, J., Ehlert, F., Beato, M., and Muller, R. (1995) *EMBO J.* **14,** 132–142
21. Galaktionov, K., Chen, X. C., and Beach, D. (1996) *Nature* **382,** 511–517
22. Vigo, E., Muller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M. C., and Helin, K. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19,** 6379–6395
23. Barré, B., Vigneron, A., and Coqueret, O. (2005) *J. Biol. Chem.* **280,** 15673–15681
24. Facchini, L. M., Chen, S., Marhin, W. W., Lear, J. N., and Penn, L. Z. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17,** 100–114
25. Delavaine, L., and La Thangue, N. B. (1999) *Oncogene* **18,** 5381–5392
26. Coqueret, O., and Gascan, H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275,** 18794–18800
27. 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
28. Ho, J. S., Ma, W., Mao, D. Y., and Benchimol, S. (2005) *Mol. Cell. Biol.* **25,** 7423–7431
29. Le, H. V., Minn, A. J., and Massague, J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280,** 32018–32025
30. Perkins, N. D., Felzien, L. K., Betts, J. C., Leung, K., Beach, D. H., and Nabel, G. J. (1997) *Science* **275,** 523–527
31. Buratowski, S. (2003) *Nat. Struct. Biol.* **10,** 679–680
32. Shin, C., and Manley, J. L. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5,** 727–738
33. Calvo, O., and Manley, J. L. (2003) *Genes Dev.* **17,** 1321–1327
34. Giraud, S., Hurlstone, A., Avril, S., and Coqueret, O. (2004) *Oncogene* **23,** 7391–7398
35. Secombe, J., Pierce, S. B., and Eisenman, R. N. (2004) *Cell* **117,** 153–156
36. Vafa, O., Wade, M., Kern, S., Beeche, M., Pandita, T. K., Hampton, G. M., and Wahl, G. M. (2002) *Mol. Cell* **9,** 1031–1044
37. Qi, Y., Gregory, M. A., Li, Z., Brousal, J. P., West, K., and Hann, S. R. (2004) *Nature* **431,** 712–717
38. Kitaura, H., Shinshi, M., Uchikoshi, Y., Ono, T., Iguchi-Ariga, S. M., and Ariga, H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275,** 10477–10483
39. 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
40. Seoane, J., Le, H. V., and Massague, J. (2002) *Nature* **419,** 729–734
41. Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Loriot, 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
42. Barré, B., Avril, S., and Coqueret, O. (2003) *J. Biol. Chem.* **278,** 2990–2996

Discussion et perspectives

I Les inhibiteurs des Topoisomérases I inhibent l'expression d'Aurora A par l'intermédiaire du facteur de transcription c-myc

La progression des cellules à travers le cycle cellulaire et la mitose est assurée par l'apparition séquentielle de différentes protéines comme les cyclines, mais également les kinases mitotiques. L'entrée en mitose se caractérise ainsi par l'augmentation d'expression de la kinase Aurora A. Celle-ci persiste au niveau des centrosomes dupliqués jusqu'en fin de phase M où elle est prise en charge par le système ubiquitine ligase APC/C cdh1 pour être dégradée (Dutertre, Descamps et al. 2002; Sugimoto, Urano et al. 2002). Aurora A est activée dans un premier temps par la protéine Ajuba (Hirota, Kunitoku et al. 2003) et se localise au niveau des centrosomes et des microtubules proximaux émanant de ces derniers (Dutertre, Descamps et al. 2002). Elle régule ainsi le nombre de fuseaux mitotiques formés. Elle active la phosphatase cdc25B, participant alors à l'activation du complexe cycline B/cdk1 au niveau des centrosomes, et constitue donc un régulateur clé de la transition G2/M (De Souza, Ellem et al. 2000; Dutertre, Cazales et al. 2004). Elle participe peu à la duplication, mais plutôt à la maturation des centrosomes (Marumoto, Honda et al. 2003). Elle participe également à la condensation de la chromatine, en phosphorylant l'histone H3 (Scrittori, Hans et al. 2001; Crosio, Fimia et al. 2002) et à l'attachement des chromosomes au fuseau mitotique en phosphorylant au niveau des centromères, CENP-A (Kunitoku, Sasayama et al. 2003; Marumoto, Honda et al. 2003). Enfin, sa dégradation semble indispensable à la sortie de mitose des cellules (Honda, Mihara et al. 2000).

Du fait de son implication dans l'établissement du nombre de pôles et de fuseaux mitotiques, la dérégulation d'Aurora A semble être impliquée dans la tumorogenèse. Elle contrôle en effet la ploïdie des cellules. Son inhibition dans les lignées cellulaires tumorales est associée à la tétraploïdisation par absence de division, un arrêt temporaire en phase G2/M du cycle cellulaire dépendant de pRb et une induction de l'apoptose dépendante de p53 (Du and Hannon 2004). Sa surexpression dans les lignées cellulaires tumorales est également associée à la tétraploïdisation des cellules, à l'augmentation du nombre de centrosomes et à l'absence d'induction d'apoptose par inhibition de p53 (Anand, Penrhyn-Lowe et al. 2003). D'autre part les traitements chimiothérapeutiques utilisés en clinique semblent inhiber la kinase Aurora A

(Cazales, Schmitt et al. 2005; Krystyniak, Garcia-Echeverria et al. 2006). Cependant, sa surexpression dans les cellules semble également diminuer la mort cellulaire induite normalement par ces traitements (Anand, Penrhyn-Lowe et al. 2003). De plus, la surexpression d'Aurora A est très fréquemment retrouvée dans différentes tumeurs humaines. Cette surexpression est associée à une amplification du nombre des centrosomes récemment associée à l'instabilité chromosomique de type CIN (Eckerdt, Yuan et al. 2005).
Ainsi, comprendre les différents mécanismes régulant l'activité de la kinase Aurora A mais également la régulation de sa synthèse permettraient de mieux appréhender son implication dans la tumorogenèse. Nous nous sommes donc intéressés à la régulation transcriptionnelle d'Aurora A.

Dans cette étude, nous avons testé l'effet du sn38, métabolite actif de l'irinotecan utilisé en clinique, dans le traitement des cancers colorectaux, sur les cellules tumorales colorectales. Nous avons observé la diminution de l'expression de la protéine Aurora A. Du fait de son implication dans le cycle du centrosome, nous avons ensuite observé l'effet de cette inhibition sur cette organelle par microscopie fluorescente. Nous avons constaté que malgré l'introduction de dommages de l'ADN, les centrosomes se dupliquent normalement dans les cellules. L'expression de la kinase Aurora A diminue cependant et la protéine est de moins en moins visible au niveau des centrosomes dupliqués. Nous avons également constaté une absence totale de séparation des centrosomes, même après 72 h de traitement. Des études précédentes démontrent l'inhibition de l'activité de la kinase en réponse aux dommages de l'ADN induits par l'étoposide (Cazales, Schmitt et al. 2005; Krystyniak, Garcia-Echeverria et al. 2006). L'absence de séparation des centrosomes lors de l'inhibition de la kinase Aurora A par RNAi est également rapportée par d'autres équipes (Du and Hannon 2004). Les dommages de l'ADN induits par le sn38 dans les cellules colorectales se caractérisent ici par une diminution d'expression de la protéine, qui s'accompagne de l'absence de séparation des centrosomes.

Nous avons également observé une diminution de l'expression de l'ARNm d'Aurora A en réponse aux dommages de l'ADN. L'expression des ARNm est régulée par l'action de différents facteurs de transcription. Plusieurs études montrent que les dommages de l'ADN induisent un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou G2 dépendante du facteur de transcription p53, empêchant alors la tétraploïdisation des cellules (Waldman, Lengauer et al. 1996; Andreassen, Lacroix et al. 2001). Ce facteur de transcription est impliqué dans la

régulation de plusieurs autres protéines participant à la progression du cycle cellulaire ou la mitose. Ainsi, p53 inhibe l'expression de la cycline B, cdc25C, ou encore de cdk1 en interagissant directement avec leurs promoteurs (Innocente, Abrahamson et al. 1999; Zhao, Gish et al. 2000; Taylor, Schonthal et al. 2001; St Clair, Giono et al. 2004). Cependant, malgré l'activation de p53 et sa phosphorylation sur la sérine 15 en réponse au sn38, ce facteur de transcription ne semble pas impliqué dans la régulation de l'expression d'Aurora A. En effet, le traitement au sn38 de la lignée cellulaire HT29 dans laquelle la protéine p53 est inactivée montre la même diminution d'expression de la protéine et de l'ARNm d'Aurora A que la lignée HCT116.

L'inhibiteur du cycle cellulaire p21, également activé par p53 lors de dommages de l'ADN induits par le sn38 ne semble pas non plus impliqué dans la diminution d'expression de l'ARNm d'Aurora A. Une étude réalisée au laboratoire montre que les dommages de l'ADN induisent l'expression de p21 (Vigneron, Cherier et al. 2006). Cette protéine est responsable de l'inhibition de plusieurs gènes cibles de STAT3 comme c-myc ou cdc25A dans les fibroblastes humains et dans la lignée tumorale HCT116. Nous avons donc testé l'expression de p21 lors d'un traitement au sn38. En réponse au sn38, l'expression de l'ARNm de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 augmente, parallèlement à la diminution d'Aurora A. Cependant, l'inactivation de cet inhibiteur du cycle cellulaire, par recombinaison homologue, dans la lignée HCT116 p21-/-, ne modifie pas la diminution d'expression d'Aurora A en réponse au sn38.

Malgré leur implication dans la régulation de nombreuses protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire et leur activation lors de dommages de l'ADN, les protéines p53 et p21 ne semblent pas impliquées dans la régulation de l'expression d'Aurora A. Parallèlement, à coté de son rôle classique d'inhibiteur du cycle cellulaire, p21 inhibe l'activité du facteur de transcription STAT3. En réponse à un stress oxydatif ou aux dommages de l'ADN, ce facteur de transcription est phosphorylé sur la sérine 727 (Thomas, Finnegan et al. 2004; Barre, Vigneron et al. 2005). De plus, des études semblent montrer une inhibition de sa capacité à se lier à l'ADN qui pourrait entraîner une diminution de son activité transcriptionnelle lors de dommages de l'ADN (Ravi, Jain et al. 2004). Une étude semble également montrer l'implication de STAT3 dans la duplication des centrosomes (Metge, Ofori-Acquah et al. 2004). Malgré sa phosphorylation sur la sérine 727, il semblerait que le facteur de transcription STAT3 ne soit pas directement impliqué dans la régulation transcriptionnelle d'Aurora A en réponse aux dommages de l'ADN. Cependant, ce facteur de transcription pourrait participer à la régulation d'un autre facteur régulant à son tour les gènes

codant pour les protéines du centrosome, comme Aurora A, ou réguler la demie-vie des ARNm. De plus, cette phosphorylation de STAT3 sur la sérine 727 pourrait être indispensable à l'arrêt des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire lors d'un traitement au sn38.

Le facteur de transcription STAT3 régule l'expression du facteur de transcription c-myc (Vigneron, Cherier et al. 2006). Ce facteur de transcription est impliqué dans la tumorogenèse et dans la progression du cycle cellulaire en phase G2/M en activant notamment la synthèse de la cycline B (Yin, Grove et al. 2001). Nous avons confirmé la diminution d'expression de c-myc lors d'un traitement au sn38 des cellules HCT116. Puis, nous avons étudié la liaison du facteur de transcription c-myc au promoteur de la kinase Aurora A dans les cellules HCT116. En réponse au métabolite actif de l'irinotecan, la liaison de c-myc sur le promoteur d'Aurora A est inhibée (figure 53). L'utilisation de la lignée colorectale LS174T contenant deux RNAi différents du facteur de transcription c-myc permet de confirmer l'implication de c-myc dans la régulation du promoteur d'Aurora A en absence de lésions de l'ADN. Nos résultats suggèrent également que la diminution du recrutement de c-myc sur le promoteur d'Aurora A lors de l'induction du RNAi dans ces mêmes cellules, est associée à une diminution de l'acétylation de l'histone H3 ainsi qu'à la diminution du recrutement de la forme élongatrice de l'ARN polymérase II.

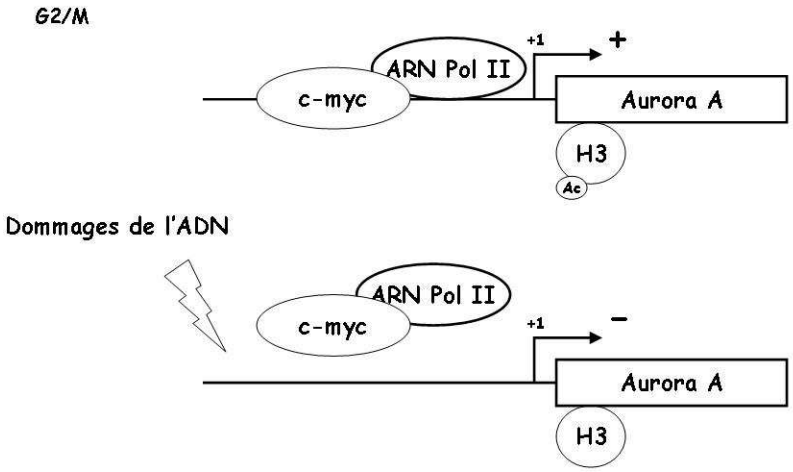


Figure 53 : Modèle de régulation du promoteur d'Aurora A lors de dommages de l'ADN.

Le facteur de transcription c-myc s'hétérodimérise avec la protéine max permettant le recrutement d'HAT, par l'intermédiaire de protéines adaptatrices comme TRRAP, sur le promoteur de ces gènes cibles (McMahon, Van Buskirk et al. 1998; McMahon, Wood et al. 2000; Frank, Parisi et al. 2003). Le recrutement de ces différentes protéines permet notamment l'acétylation des histones nécessaire à l'ouverture de la chromatine (Frank, Schroeder et al. 2001). Ainsi, d'autres expériences de ChIP pourraient nous permettre de

mettre en évidence la présence d'HAT sur le promoteur d'Aurora A en phase G2/M du cycle cellulaire. D'autres expériences de ChIP permettraient de déterminer si la diminution du recrutement de c-myc lors de lésions de l'ADN est associée à une diminution de l'accessibilité du promoteur par l'intermédiaire des protéines de remodelage et de compléter l'étude de ce promoteur.

Le facteur de transcription c-myc est impliqué dans la régulation d'environ 10 à 15 % des gènes cellulaires, cependant la carte précise de ces gènes cibles semble difficile à établir (Dang, O'Donnell et al. 2006). Néanmoins, en activant ou réprimant certains gènes, la surexpression de c-myc est impliquée dans l'hyperprolifération cellulaire, la tumorogenèse ainsi que dans l'instabilité génétique (Vafa, Wade et al. 2002; Secombe, Pierce et al. 2004). Nous avons constaté que l'induction des inhibiteurs du cycle cellulaire comme p21 lors des dommages de l'ADN, induisait une inhibition de la transcription du gène de c-myc. D'autres études montrent que les protéines comme p53, p16/INK4 ou p19/ARF sont également responsables de l'inhibition des effets de c-myc sur la progression du cycle cellulaire (Qi, Gregory et al. 2004; Ho, Ma et al. 2005; Sarkar and Fisher 2006; Wu, van Riggelen et al. 2007). Nous avons montré l'implication de l'oncogène c-myc, dans la régulation du promoteur d'Aurora A, qui constituerait ainsi une nouvelle cible de ce facteur de transcription, impliquée dans la progression des cellules en mitose. Nous avons également constaté que les protéines p53 et p21 n'étaient pas impliquées dans la régulation de la kinase Aurora A. Cependant, des études réalisées sur des modèles murins semblent impliquer p19/ARF dans l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de c-myc (Datta, Nag et al. 2004; Qi, Gregory et al. 2004; Amente, Gargano et al. 2006). Ce gène suppresseur de tumeur se lie au domaine d'activation de c-myc et bloque l'activité transcriptionnelle des dimères myc/max, en empêchant notamment la fixation des co-facteurs comme TRRAP ou encore TIP60. Cette inhibition semble spécifique des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, comme la télomérase, cdk4 ou encore eIF4E, et ne toucherait pas les gènes impliqués dans l'induction de l'apoptose et régulés par c-myc (Qi, Gregory et al. 2004). Ainsi, on peut donc penser que la protéine équivalente chez l'Homme, p14/ARF pourrait inhiber les complexes myc/max directement sur le promoteur d'Aurora A (figure 54).

L'étude de l'expression de la protéine Aurora A dans la lignée cellulaire LS174T nous a également permis de montrer la liaison du facteur de transcription c-myc en condition normale de prolifération et en absence de synchronisation. Ces cellules présentent peut-être une population cellulaire en phase G2/M plus importante que les autres lignées cellulaires utilisées ici, ou un niveau d'expression de la kinase Aurora A plus élevé.

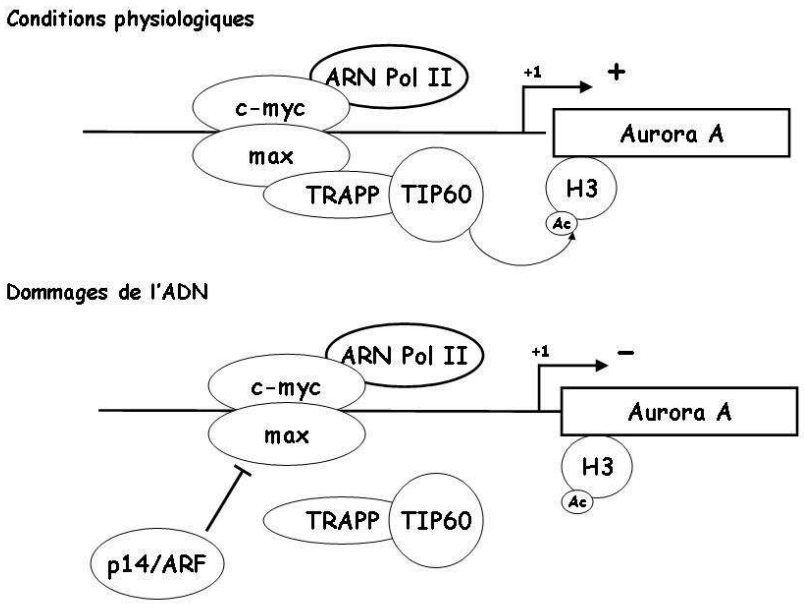


Figure 54 : Modèle d'inhibition des dimères c-myc/max sur le promoteur d'Aurora A lors de dommages de l'ADN par p14/ARF.

L'analyse de la fixation du facteur de transcription c-myc dans d'autres phases du cycle cellulaire n'a pas été réalisée. Cette étude nous permettrait de déterminer l'existence d'une oscillation de liaison de c-myc sur le promoteur d'Aurora A, ou au contraire une oscillation de son activité transcriptionnelle. En effet, l'étude réalisée par Tanaka et ses collaborateurs montrent qu'un autre facteur de transcription E4TF1, est lié de façon permanente au promoteur d'Aurora A (Tanaka, Ueda et al. 2002).

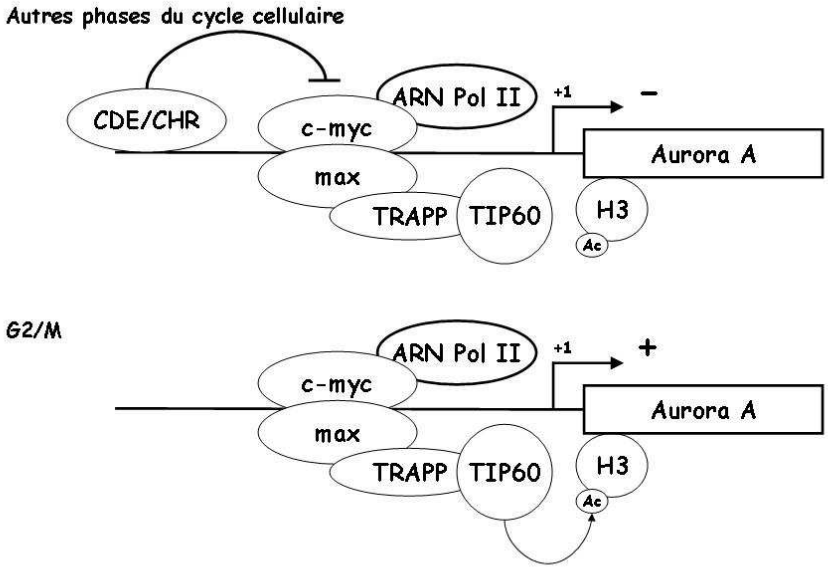


Figure 55 : Modèle de l'arrêt de l'inhibition des dimères c-myc/max sur le promoteur d'Aurora A lors de la transition G2/M du cycle cellulaire.

Les auteurs soupçonnent alors l'inhibition de ce facteur par d'autres protéines, répondant aux éléments de réponse CDE/CHR, qui permettrait l'oscillation de la synthèse de l'ARNm d'Aurora A. Ainsi, le facteur de transcription c-myc pourrait se lier de façon ubiquitaire au promoteur d'Aurora A et serait inhibé par les protéines répondant aux éléments CDE/CHR. L'activation de la transcription de ce gène lors de la transition G2/M serait due à l'arrêt de cette inhibition (figure 55).

Les dimères myc/max constituent des complexes activateurs, tandis que les dimères max/mad répriment les gènes précédemment activés par les dimères myc/max (Ayer and Eisenman 1993). L'existence de ces deux complexes permet donc l'oscillation des gènes entre un état actif régulé par le dimère myc/max, et un état inactif régulé par le complexe mad/max. Ce dernier se lie aux mêmes sites de fixation précédemment occupés par les complexes myc/max et recrute des HDAC via un co-répresseur Sin3a entraînant alors la désacétylation des histones, ainsi que la fermeture de la chromatine (Ayer, Lawrence et al. 1995). Des expériences de ChIP pourraient nous permettre de mettre en évidence la présence des dimères max/mad sur le promoteur d'Aurora A, lors de son inactivation par traitement au sn38 (figure 56).

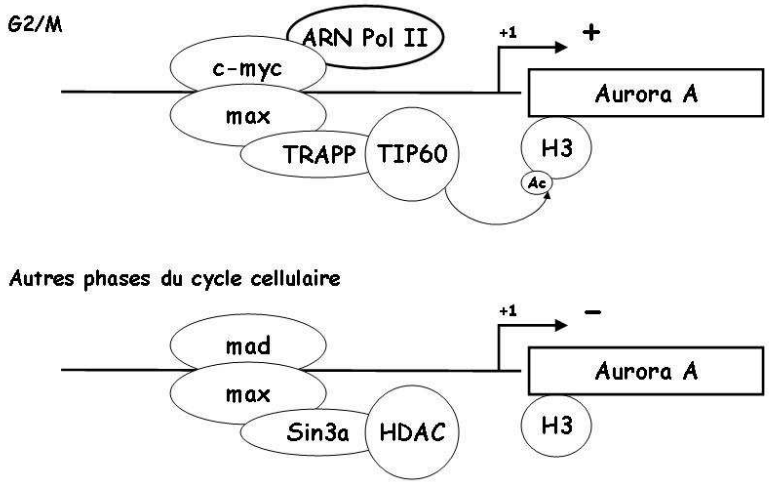


Figure 56 : Modèle d'oscillation du recrutement des dimères c-myc/max et mad/max sur le promoteur d'Aurora A au cours du cycle cellulaire.

Une autre étude montre également que la kinase Aurora A augmente l'expression de la télomérase (Yang, Ou et al. 2004). Le facteur de transcription c-myc est un activateur clé du gène de la télomérase (Takakura, Kyo et al. 1999). La kinase Aurora A régule l'expression de la télomérase de façon indirecte, par l'intermédiaire de l'augmentation d'expression du

facteur de transcription c-myc. Il pourrait exister une boucle d'amplification du signal, dans laquelle l'augmentation d'expression d'Aurora A favoriserait l'augmentation d'expression de c-myc, ainsi que son activité transcriptionnelle et l'augmentation d'expression de la kinase.

Afin d'assurer le transfert des résultats de la recherche fondamentale vers la recherche clinique, l'étude de l'expression d'Aurora A dans les tumeurs de patients atteints de cancer colorectal est analysée par RT-PCR. L'étude porte initialement sur une population de onze patients dont les tissus sains et tumoraux sont conservés au sein de la tumorothèque du Centre Régional de Lutte Contre le Cancer, Paul Papin. L'étude par RT-PCR nous a permis de mettre en évidence que l'expression du facteur de transcription c-myc est corrélée à l'expression de la kinase Aurora A dans sept cas sur onze. Cependant, nous avons également constaté que pour quatre patients, l'expression de c-myc ne suivait pas l'expression de la kinase Aurora A. Pour ces derniers, on peut imaginer qu'il existe au sein des tumeurs colorectales d'autres facteurs de transcription également dérégulés, et expliquant l'absence de corrélation d'expression de ces deux protéines. Une altération d'expression des facteurs E4TF1 ou des facteurs de transcription répondant aux éléments CDE/CHR déjà décrits comme des protéines régulant l'activation de ce gène (Tanaka, Ueda et al. 2002), pourrait expliquer l'absence de corrélation d'expression entre l'ARNm d'Aurora A et celui de c-myc.

D'autre part, le choix et le nombre de patients à inclure dans une telle étude sont également importants. Ainsi, le stade histologique des tumeurs pourrait être évalué. Plusieurs études montrent que la surexpression d'Aurora A est associée avec les tumeurs de haut grade, ainsi qu'à un faible pronostic pour les cancers du sein et les tumeurs hépatiques (Miyoshi, Iwao et al. 2001; Jeng, Peng et al. 2004). D'autres auteurs assurent que la surexpression et l'activation de la protéine sont au contraire plus fréquemment détectées lors des stades précoces des cancers ovariens (Gritsko, Coppola et al. 2003).

Parallèlement, nous avons voulu déterminer si la surexpression d'Aurora A au sein des lignées colorectales pouvait être à l'origine de la résistance au traitement. En effet, une précédente étude montre que la surexpression d'Aurora A est associée à une résistance des cellules Hela au taxol (Anand, Penrhyn-Lowe et al. 2003). D'autre part, la surexpression d'Aurora A est observée dans 60 % des tumeurs colorectales et une résistance au traitement est observée pour de nombreux patients traités par irinotecan. Deux approches ont donc été mises en œuvre.

Dans un premier temps, nous avons analysé l'effet des dommages de l'ADN sur la mort cellulaire. Pour cela, l'incorporation d'iodure de propidium, dans la lignée cellulaire HCT116

surexprimant Aurora A et traitée au sn38, est analysée au cytomètre de flux. Il semblerait que la surexpression de la kinase Aurora A dans la lignée HCT116 soit associée à une diminution de l'effet du sn38 à induire la mort cellulaire. Ces résultats, méritant d'être approfondis, semblent montrer que la surexpression d'Aurora A, observée dans 60 % des cancers colorectaux, pourrait contribuer à la résistance au traitement des patients atteints de cette affection et traités par irinotecan. L'utilisation d'une lignée colorectale stable exprimant Aurora A de façon inductible, nous permettrait d'analyser plus aisément l'effet de la surexpression de cette kinase sur la survie cellulaire en réponse aux dommages de l'ADN à court et long terme.

Dans un second temps, l'équipe du Dr Valo a mis au point le marquage par immunohistochimie de la protéine Aurora A sur les coupes de tumeurs colorectales humaines. L'étude de l'expression d'Aurora A sur ces coupes suivie de l'analyse rétrospective de l'efficacité du traitement pour chaque patient, nous aurait permis d'incriminer ou non la surexpression d'Aurora A dans la résistance au traitement par irinotecan. Malgré la mise au point du marquage d'Aurora A dans les tissus sains oesophagiens et mammaires, le marquage d'Aurora A dans les tissus sains colorectaux semble plus complexe. En effet, dans la majorité des tissus sains observés, la totalité des cellules des cryptes saines exprimaient Aurora A de façon diffuse dans le cytoplasme et le mucus des cellules. Le tissu colorectal se renouvelle continuellement du fond des cryptes vers la surface sur le modèle d'un « tapis roulant » grâce à l'existence de cellules souches localisées au fond des cryptes. Seules ces cellules prolifèrent et forment les cellules de l'épithélium colique. Le marquage à l'aide de l'antigène Ki-67 nous permet de visualiser ces cellules souches. Comme nous avons pu le constater, seules quelques cellules localisées au fond des cryptes expriment l'antigène Ki-67. Dans les tissus sains, la kinase Aurora A étant exprimée uniquement lors de la phase G2 du cycle cellulaire et de la mitose, le marquage d'Aurora A et du Ki-67 devrait donc se superposer. Cependant, le marquage d'Aurora A couvre la totalité des cellules des cryptes saines, et pas seulement la partie profonde. La kinase Aurora A pourrait participer à la différenciation des cellules coliques, le marquage d'Aurora A dans la partie haute des cryptes pourrait alors se justifier (figure 57). Des études réalisées sur Aurora B, un autre membre de la famille Aurora, montrent qu'elle serait capable de phosphoryler certains des histones de la chromatine permettant alors l'inactivation de certains gènes ou au contraire leur activation nécessaire à l'acquisition de la différenciation (Goto, Yasui et al. 2002). L'expression de kinase Aurora A pourrait ne pas être restreinte aux seules phases G2 et M et participer à la différenciation cellulaire.

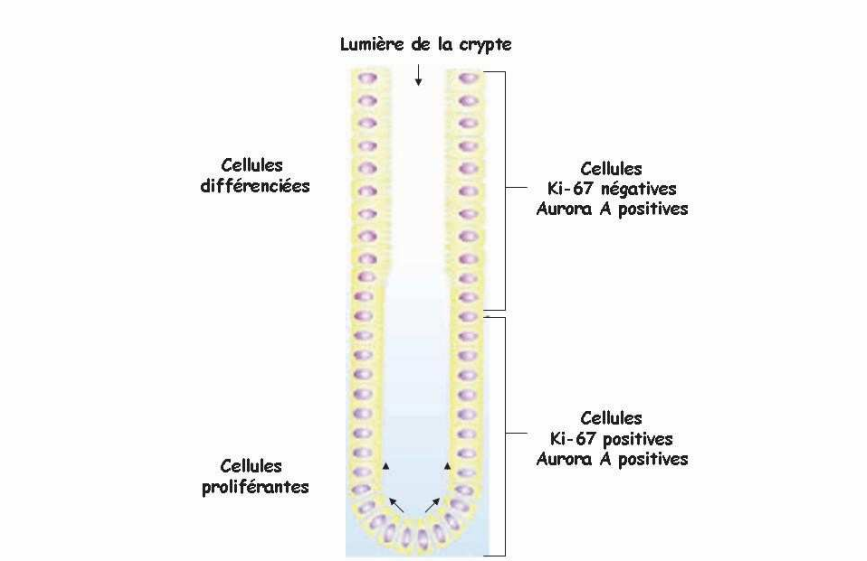


Figure 57 : Schéma d'une crypte normale montrant l'expression de la kinase Aurora A et de l'antigène Ki-67.

Le marquage d'Aurora A et du Ki-67 se trouvrant dans la partie profonde des cryptes, est plus complexe à analyser, mais pourrait laisser penser au marquage physiologique des cellules proliférantes. Cependant, comment expliquer que sur les cellules proliférantes du fond des cryptes, marquées au Ki-67, la totalité se trouvent en phase G2 et en mitose (Aurora A positives) sachant que sur une population cellulaire normale, le pourcentage de cellules se trouvant dans une des ces phases est très faible. Il semblerait possible que le mucus sécrété par les cellules l'épithélium colorectal interagisse avec les anticorps ou la technique de marquage utilisés et ne permette pas l'obtention d'un marquage spécifique dans ce tissu.

Dans ces conditions, l'analyse rétrospective de l'efficacité du traitement n'a pas été réalisée. L'étude de l'implication de la surexpression d'Aurora A dans la résistance au traitement mérite d'être approfondie.

Plusieurs études génétiques ont mis en évidence l'existence de deux polymorphismes au niveau du gène d'Aurora A, notamment au niveau de la phénylalanine 31, Phe31Ile (91T>A) et de la valine 57, Val57Ile (169G>A) (Honda, Mihara et al. 2000; Pfleger and Kirschner 2000). Les deux acides aminés sont alors remplacés par l'isoleucine. Une étude portant sur la mutation Phe31Ile montre que la forme mutée de la kinase, Ile31, présente une capacité de transformation des cellules Rat1 et U2OS plus importante que la kinase Aurora A sauvage et empêche la fixation de l'ubiquitine UBE2N sur la kinase au niveau des centrosomes (Ewart-Toland, Briassouli et al. 2003). Une autre étude montre également que la forme mutée d'Aurora A Ile 31 potentialise la transformation des cellules induite par Ras (Tatsuka, Sato et al. 2005). La mutation Ile31 pourrait donc empêcher la dégradation de la protéine kinase

Aurora A et permettre sa persistance au niveau des centrosomes facilitant alors la transformation cellulaire. La mutation Phe31Ile est retrouvée préférentiellement dans les tumeurs du colon et des ovaires, et la présence des deux polymorphismes de manière constitutionnelle se traduit par une augmentation du risque de cancer du sein (Ewart-Toland, Briassouli et al. 2003; Dicioccio, Song et al. 2004; Egan, Newcomb et al. 2004) mais également du cancer de l'œsophage et du cancer gastrique (Miao, Sun et al. 2004; Kimura, Mori et al. 2005; Ju, Cho et al. 2006). Ainsi, l'effet de ces deux polymorphismes sur la kinase Aurora A reste encore à approfondir.

La surexpression de la kinase ainsi que l'existence de ces mutations pourraient entraîner l'inefficacité du traitement par irinotecan des tumeurs colorectales. Ainsi, le statut génétique d'un groupe de patients pourrait être évalué par miniséquençage luminumétrique. Une analyse rétrospective de l'efficacité du traitement pourrait être réalisée ou nous permettrait de statuer sur l'implication des polymorphismes d'Aurora A dans la résistance au traitement.

II Effet de la surexpression de Ras sur Aurora A dans les cellules tumorales colorectales

La protéine Ras fait partie de la superfamille des petites protéines G liant et hydrolysant le GTP. Sous sa forme non mutée, ce proto-oncogène est donc activé par divers mitogènes et facteurs de croissance comme l'EGF. La fixation de cette protéine sur son récepteur entraîne son autodimérisation, ainsi que son autophosphorylation sur les résidus tyrosines, permettant l'échange du GDP en GTP sur la protéine Ras, qui est alors active. Ras participe alors à la régulation de plusieurs voies de signalisation, notamment la voie des MAPK, PI3kinase/Akt, assurant à la fois : la progression du cycle cellulaire, la survie cellulaire et la différenciation. Les trois isoformes de la famille de Ras, (H, N et K Ras) sont mutées et suractivées dans environ 20 à 30 % des tumeurs humaines. Dans le cancer du colon, 50 % des tumeurs sont porteuses d'une mutation suractivant Ras (Bos 1989). Plusieurs études semblent montrer l'existence d'une nouvelle voie de régulation de la protéine kinase Aurora A, notamment la voie Ras/MAPK (Tatsuka, Sato et al. 2005; Furukawa, Kanai et al. 2006; Tseng, Tzeng et al. 2006). D'autre part, la plupart des tumeurs colorectales présente une mutation inactivante de p53. Nous nous sommes donc intéressés à la régulation d'Aurora A dans des cellules tumorales colorectales présentant la forme oncogénique de Ras et une inactivation de p53.

Nous avons analysé dans un premier temps l'expression des protéines et des ARNm d'Aurora A et c-myc en présence de la forme oncogénique de Ras avec ou sans induction de lésions de

l'ADN. Nous avons ainsi constaté l'inhibition des protéines Aurora A et c-myc en présence de l'oncogène Ras. L'induction de dommages de l'ADN, par ajout de sn38 sur les cellules exprimant déjà l'oncogène Ras, semble potentialiser cette inhibition. Plusieurs études sur des modèles murins montrent que l'oncogène Ras est capable d'induire le gène suppresseur de tumeur p19/ARF, notamment par l'intermédiaire de l'activation du facteur de transcription DMP1 (Inoue, Roussel et al. 1999; Sreeramaneni, Chaudhry et al. 2005). Ce dernier se fixe alors au promoteur de p19/ARF et induit sa transcription. Dans des modèles cellulaires humains, lors d'une stimulation oncogénique, le facteur E2F1 est responsable de l'activation du promoteur de p14/ARF (Aslanian, Iaquinta et al. 2004). L'activation de p14/ARF pourrait également reposer sur l'activation de facteur de transcription comme DMP1. D'autres études montrent également que p14/ARF est capable d'inhiber l'effet de c-myc sur la prolifération cellulaire en bloquant notamment le recrutement de plusieurs de ces co-facteurs, comme TRRAP ou TIP60 (Qi, Gregory et al. 2004). Ainsi l'oncogène Ras pourrait induire la transcription du gène suppresseur de tumeur p14/ARF, qui inhiberait l'effet du facteur de transcription c-myc sur la prolifération, s'accompagnant alors de la diminution d'expression d'Aurora A (figure 58).

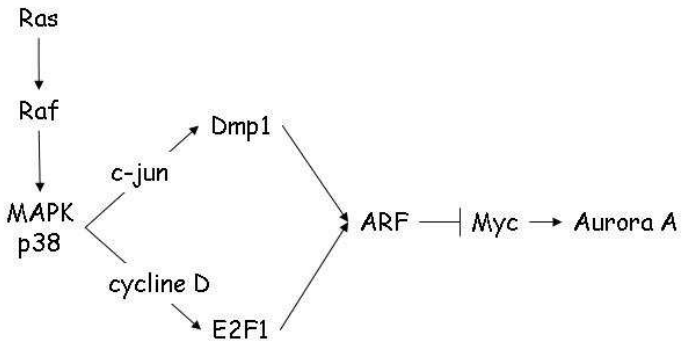


Figure 58 : Modèle d'inhibition de la kinase Aurora A lors de la surexpression de Ras.

Cependant, l'étude du recrutement du facteur de transcription c-myc ne montre pas de modification de la fixation de c-myc sur le promoteur d'Aurora A lors de l'induction de l'oncogène Ras, laissant alors sousentendre une répression transcriptionnelle. Seul le traitement des cellules au sn38 est associé à une diminution du recrutement de c-myc, appuyant l'implication de ce facteur dans la régulation du gène d'Aurora A, lors des dommages de l'ADN et confirmant les résultats obtenus sur l'HCT116. Pourtant, une diminution de l'expression de l'ARNm d'Aurora A après induction de l'oncogène est observable. La modification de la stabilité des l'ARNm pourrait participer à la diminution de l'ARNm d'Aurora A. Les ARNm sont des molécules dont la demie-vie est contrôlée par le

complexe RISC (RNAi Induced Silencing Complex). Les ARNm peuvent être pris en charge après maturation par des miARNs (micro ARNs). Les miARNs sont eux-mêmes associés au complexe RISC, permettant ainsi l'adressage des ARNm à ce dernier. La traduction des ARNm est alors inhibée et s'accompagne de leur stockage ou de leur dégradation (Rana 2007). D'autre part, plusieurs études impliquent l'oncogène Ras dans la diminution de la stabilité de certains ARNm, notamment GAAD153 ou du récepteur de la vitamine D (Rozenchan, Folgueira et al. 2004; Rong, Montalbano et al. 2005). D'autre études montre l'importance de la déstabilisation des ARNm lors de la sénescence réplicative (Cristofalo, Pignolo et al. 1992; Wang, Yang et al. 2001). Ainsi, dans les conditions physiologiques, il existerait un équilibre entre les protéines impliquées dans la stabilisation et la déstabilisation des ARNm. Lors de la sénescence, l'équilibre serait rompu et l'expression des protéines impliquées dans la stabilisation des ARNm diminuerait, entraînant alors une destruction des ARNm (Brewer 2002). Ainsi, la diminution d'expression de l'ARNm d'Aurora A lors de l'induction de l'oncogène Ras pourrait passer par des voies similaires.

Nous avons également observé l'induction de la protéine et de l'ARNm de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21, en présence de l'oncogène Ras. p21 inhibe la prolifération cellulaire en inhibant notamment les complexes cyclines/cdks entraînant l'arrêt du cycle cellulaire. Le facteur de transcription p53 est responsable de l'activation du promoteur de p21. Dans les cellules HT29 utilisées pour l'étude, le gène de p53 est muté, entraînant la synthèse d'une protéine inactive. Ainsi, l'activation de la synthèse de p21 en présence de l'oncogène Ras laisse supposer une régulation transcriptionnelle du gène indépendamment du statut de p53. Plusieurs études montrent que p21 pourrait être induit indépendamment de p53, par plusieurs facteurs comme E2F ou encore les STAT (Gartel and Tyner 1999). Des travaux récents montrent également que p21 peut être induit par la voie des MAPK entraînant alors un arrêt du cycle cellulaire (Ciccarelli, Marampon et al. 2005; Lee and Moon 2005; Zupanska, Adach et al. 2007). On peut donc supposer que l'oncogène Ras entraîne l'activation des MAPK et l'induction de p21 aboutissant à l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, les cytogrammes montrent une accumulation des cellules en phase G2 du cycle cellulaire pouvant être expliquée par l'activation de p21 et l'inhibition d'Aurora A.

L'étude de l'effet cytotoxique du sn38 sur les cellules HT29 surexprimant Ras montre une persistance de l'activité mitochondriale. Les cellules HT29, ne surexprimant pas cet oncogène, montrent une diminution de leur activité mitochondriale. On peut donc supposer que les cellules surexprimant Ras entrent en sénescence. En effet, à la différence de

l’apoptose qui induit une destruction cellulaire, la sénescence correspond plutôt à un arrêt du cycle cellulaire, sans pour autant stopper l’activité métabolique de la cellule (Di Leonardo, Linke et al. 1994). Les cellules restent viables même après une longue période de culture, mais aucune division cellulaire n’est observée. D’autre part, elles sont résistantes à l’induction de la mort cellulaire. Les cellules sénescentes expriment les deux inhibiteurs clés du cycle cellulaire : p21 et p16 (Mason, Jackson et al. 2004; Jackson and Pereira-Smith 2006). On peut donc supposer que l’oncogène Ras induit l’expression de p21, par une voie indépendante de p53, aboutissant à l’arrêt du cycle cellulaire. Il peut également induire p16 dans ces cellules par des voies déjà décrites, notamment l’induction de ETS2 par les MAPK ou l’activation des kinases de stress p38 (Wang, Chen et al. 2002 Iwasa, Han et al. 2003).

Conclusion

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont permis de caractériser l'effet du sn38, métabolite actif de l'irinotecan utilisé dans le traitement du cancer colorectal sur la kinase Aurora A et sur sa régulation transcriptionnelle. Le facteur de transcription c-myc se lie au promoteur d'Aurora A et l'active en absence de dommages de l'ADN. Cependant, le traitement des cellules avec du sn38 induit l'inhibition de c-myc et son absence du promoteur d'Aurora A. Cet effet s'accompagne d'une inhibition des événements transcriptionnels régulant normalement l'expression de ce gène. Ce traitement entraîne également une absence de séparation des centrosomes, un blocage des cellules en phase G2 du cycle cellulaire et l'induction du processus de sénescence.

Nous avons également étudié l'effet de l'oncogène Ras sur la kinase Aurora A. Cet oncogène induit également une accumulation des cellules en phase G2 du cycle cellulaire et le déclenchement du processus de sénescence, l'ensemble étant dû à l'activation de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21waf1. En effet, l'activation de p21 par les kinases p38, permet certainement l'activation de la protéine pRb. Parallèlement, les cellules pourraient activer la protéine p16 par l'intermédiaire de l'activation de protéines comme ETS2 ou l'inhibition de Id-1 ou Bmi par les kinases p38. L'activation de pRb permettrait alors l'activation de la sénescence.

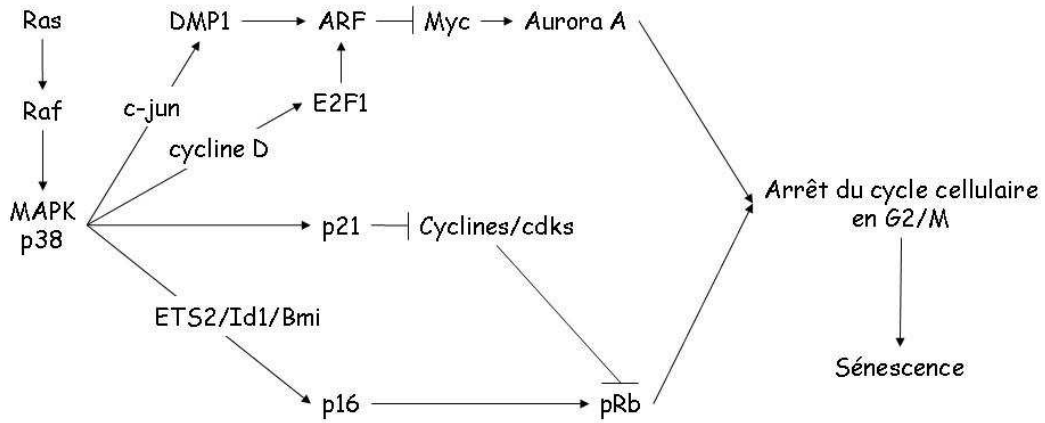


Figure 59 : Induction de la sénescence par l'oncogène Ras faisant intervenir l'activation de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 et l'inhibition de la protéine kinase Aurora A.

Comme pour le sn38, l'expression de cet oncogène induit une diminution d'expression de l'ARNm et de la protéine Aurora A. Cet effet ne s'explique pas par une diminution du recrutement de c-myc mais plutôt par une modulation de l'activité de ses cofacteurs

transcriptionnels. Les facteurs comme DMP1 ou E2F activés tous deux par la voie les MAPK, pourraient activer ARF. Cette dernière participerait ensuite à la modulation de l'activité transcriptionnelle des cofacteurs de c-myc.

En résumé, nos résultats indiquent que la kinase Aurora A est une cible à la fois des traitements de chimiothérapie et des mécanismes de contrôles oncogéniques. Le blocage de son expression constitue certainement une protection contre le développement tumoral.

Bibliographie

Adams, J. M., A. W. Harris, et al. (1985). "The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice." Nature **318**(6046): 533-8.

Adams, R. R., H. Maiato, et al. (2001). "Essential roles of Drosophila inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation." J Cell Biol **153**(4): 865-80.

Ahn, S. H., M. Kim, et al. (2004). "Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing." Mol Cell **13**(1): 67-76.

Akiyama, Y., R. Iwanaga, et al. (1996). "Mutations of the transforming growth factor-beta type II receptor gene are strongly related to sporadic proximal colon carcinomas with microsatellite instability." Cancer **78**(12): 2478-84.

Alexandru, G., F. Uhlmann, et al. (2001). "Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast." Cell **105**(4): 459-72.

Ali, A., J. Zhang, et al. (2004). "Requirement of protein phosphatase 5 in DNA-damage-induced ATM activation." Genes Dev **18**(3): 249-54.

Amati, B., S. R. Frank, et al. (2001). "Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription." Biochim Biophys Acta **1471**(3): M135-45.

Amente, S., B. Gargano, et al. (2006). "p14ARF directly interacts with Myc through the Myc BoxII domain." Cancer Biol Ther **5**(3): 287-91.

Anand, S., S. Penrhyn-Lowe, et al. (2003). "AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol." Cancer Cell **3**(1): 51-62.

Andreassen, P. R., F. B. Lacroix, et al. (2001). "Neither p21WAF1 nor 14-3-3sigma prevents G2 progression to mitotic catastrophe in human colon carcinoma cells after DNA damage, but p21WAF1 induces stable G1 arrest in resulting tetraploid cells." Cancer Res **61**(20): 7660-8.

Andreassen, P. R., O. D. Lohez, et al. (2001). "Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1." Mol Biol Cell **12**(5): 1315-28.

Andresson, T. and J. V. Ruderman (1998). "The kinase Eg2 is a component of the Xenopus oocyte progesterone-activated signaling pathway." Embo J **17**(19): 5627-37.

Andrews, P. D., Y. Ovechkina, et al. (2004). "Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere." Dev Cell **6**(2): 253-68.

Arnaud, L., J. Pines, et al. (1998). "GFP tagging reveals human Polo-like kinase 1 at the kinetochore/centromere region of mitotic chromosomes." Chromosoma **107**(6-7): 424-9.

Aslanian, A., P. J. Iaquinta, et al. (2004). "Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics." Genes Dev **18**(12): 1413-22.

Ayer, D. E. and R. N. Eisenman (1993). "A switch from Myc:Max to Mad:Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation." Genes Dev **7**(11): 2110-9.

Ayer, D. E., Q. A. Lawrence, et al. (1995). "Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3." Cell **80**(5): 767-76.

Bahram, F., N. von der Lehr, et al. (2000). "c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover." Blood **95**(6): 2104-10.

Bakkenist, C. J. and M. B. Kastan (2003). "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation." Nature **421**(6922): 499-506.

Balint, E. E. and K. H. Vousden (2001). "Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein." Br J Cancer **85**(12): 1813-23.

Banin, S., L. Moyal, et al. (1998). "Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage." Science **281**(5383): 1674-7.

Bannister, A. J., R. Schneider, et al. (2002). "Histone methylation: dynamic or static?" Cell **109**(7): 801-6.

Bannister, A. J., P. Zegerman, et al. (2001). "Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain." Nature **410**(6824): 120-4.

Barr, S. M., C. G. Leung, et al. (2003). "ATR kinase activity regulates the intranuclear translocation of ATR and RPA following ionizing radiation." Curr Biol **13**(12): 1047-51.

Barre, B., A. Vigneron, et al. (2005). "The STAT3 transcription factor is a target for the Myc and riboblastoma proteins on the Cdc25A promoter." J Biol Chem **280**(16): 15673-81.

Barros, T. P., K. Kinoshita, et al. (2005). "Aurora A activates D-TACC-Msps complexes exclusively at centrosomes to stabilize centrosomal microtubules." J Cell Biol **170**(7): 1039-46.

Bartek, J., C. Lukas, et al. (2004). "Checking on DNA damage in S phase." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 792-804.

Bayliss, R., T. Sardon, et al. (2003). "Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle." Mol Cell **12**(4): 851-62.

Berdnik, D. and J. A. Knoblich (2002). "Drosophila Aurora-A is required for centrosome maturation and actin-dependent asymmetric protein localization during mitosis." Curr Biol **12**(8): 640-7.

Berger, S. L. (2001). "Molecular biology. The histone modification circus." Science **292**(5514): 64-5.

Bischoff, J. R., L. Anderson, et al. (1998). "A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers." Embo J **17**(11): 3052-65.

Blackwood, E. M. and R. N. Eisenman (1991). "Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc." Science **251**(4998): 1211-7.

Blandino, G., A. J. Levine, et al. (1999). "Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy." Oncogene **18**(2): 477-85.

Blangy, A., H. A. Lane, et al. (1995). "Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo." Cell **83**(7): 1159-69.

Blower, M. D., B. A. Sullivan, et al. (2002). "Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans." Dev Cell **2**(3): 319-30.

Bode, A. M. and Z. Dong (2004). "Post-translational modification of p53 in tumorigenesis." Nat Rev Cancer **4**(10): 793-805.

Boguski, M. S. and F. McCormick (1993). "Proteins regulating Ras and its relatives." Nature **366**(6456): 643-54.

Boland, C. R., S. N. Thibodeau, et al. (1998). "A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer." Cancer Res **58**(22): 5248-57.

Bos, J. L. (1989). "ras oncogenes in human cancer: a review." Cancer Res **49**(17): 4682-9.

Bouchard, C., K. Thieke, et al. (1999). "Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27." Embo J **18**(19): 5321-33.

Brassac, T., A. Castro, et al. (2000). "The polo-like kinase Plx1 prevents premature inactivation of the APC(Fizzy)-dependent pathway in the early Xenopus cell cycle." Oncogene **19**(33): 3782-90.

Brewer, G. (2002). "Messenger RNA decay during aging and development." Ageing Res Rev **1**(4): 607-25.

Brodeur, G. M. (2003). "Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma." Nat Rev Cancer **3**(3): 203-16.

Bronner, C. E., S. M. Baker, et al. (1994). "Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer." Nature **368**(6468): 258-61.

Brown, E. J. and D. Baltimore (2000). "ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality." Genes Dev **14**(4): 397-402.

Budihardjo, I., H. Oliver, et al. (1999). "Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 269-90.

Bullock, P., J. J. Champoux, et al. (1985). "Association of crossover points with topoisomerase I cleavage sites: a model for nonhomologous recombination." Science **230**(4728): 954-8.

Bunz, F., P. M. Hwang, et al. (1999). "Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents." J Clin Invest **104**(3): 263-9.

Cairns, P., A. J. Proctor, et al. (1991). "Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma." Oncogene **6**(12): 2305-9.

Calbo, J., M. Parreno, et al. (2002). "G1 cyclin/cyclin-dependent kinase-coordinated phosphorylation of endogenous pocket proteins differentially regulates their interactions with E2F4 and E2F1 and gene expression." J Biol Chem **277**(52): 50263-74.

Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 729-40.

Canman, C. E., D. S. Lim, et al. (1998). "Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53." Science **281**(5383): 1677-9.

Carboni, M. C. and S. Coderoni (1994). "Effect of CPT on the DNA cleavage/religation reaction mediated by calf thymus Topoisomerase I: evidence of an inhibition of DNA religation. Inhibition of Topoisomerase I-mediated DNA religation by CPT." Mol Biol Rep **20**(3): 129-33.

Carter, S. L., A. C. Eklund, et al. (2006). "A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers." Nat Genet **38**(9): 1043-8.

Cartron, P. F., P. Juin, et al. (2003). "Nonredundant role of Bax and Bak in Bid-mediated apoptosis." Mol Cell Biol **23**(13): 4701-12.

Casenghi, M., F. A. Barr, et al. (2005). "Phosphorylation of Nlp by Plk1 negatively regulates its dynein-dynactin-dependent targeting to the centrosome." J Cell Sci **118**(Pt 21): 5101-8.

Casenghi, M., P. Meraldi, et al. (2003). "Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation." Dev Cell **5**(1): 113-25.

Castedo, M., A. Coquelle, et al. (2006). "Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells." Embo J **25**(11): 2584-95.

Castedo, M., J. L. Perfettini, et al. (2004). "Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition." Oncogene **23**(16): 2825-37.

Castro, A., Y. Arlot-Bonnemains, et al. (2002). "APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis." EMBO Rep **3**(5): 457-62.

Castro, A., C. Bernis, et al. (2005). "The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle." Oncogene **24**(3): 314-25.

Cazales, M., E. Schmitt, et al. (2005). "CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage." Cell Cycle **4**(9): 1233-8.

Chang, B. D., E. V. Broude, et al. (2000). "p21Waf1/Cip1/Sdi1-induced growth arrest is associated with depletion of mitosis-control proteins and leads to abnormal mitosis and endoreduplication in recovering cells." Oncogene **19**(17): 2165-70.

Chang, B. D., K. Watanabe, et al. (2000). "Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4291-6.

Chehab, N. H., A. Malikzay, et al. (1999). "Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 13777-82.

Chen, M. S., C. E. Ryan, et al. (2003). "Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding." Mol Cell Biol **23**(21): 7488-97.

Chen, Q. M., J. Liu, et al. (2000). "Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H2O2 response of normal human fibroblasts." Biochem J **347**(Pt 2): 543-51.

Chen, S. S., P. C. Chang, et al. (2002). "Suppression of the STK15 oncogenic activity requires a transactivation-independent p53 function." Embo J **21**(17): 4491-9.

Chen, X., L. J. Ko, et al. (1996). "p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells." Genes Dev **10**(19): 2438-51.

Chen, Y., D. J. Riley, et al. (2002). "Phosphorylation of the mitotic regulator protein Hec1 by Nek2 kinase is essential for faithful chromosome segregation." J Biol Chem **277**(51): 49408-16.

Cheng, C., P. Kussie, et al. (1998). "Conservation of structure and mechanism between eukaryotic topoisomerase I and site-specific recombinases." Cell **92**(6): 841-50.

Choo, K. H. (2001). "Domain organization at the centromere and neocentromere." Dev Cell **1**(2): 165-77.

Chu, G. (1997). "Double strand break repair." J Biol Chem **272**(39): 24097-100.

Ciccarelli, C., F. Marampon, et al. (2005). "p21WAF1 expression induced by MEK/ERK pathway activation or inhibition correlates with growth arrest, myogenic differentiation and onco-phenotype reversal in rhabdomyosarcoma cells." Mol Cancer **4**: 41.

Clarke, P. R. and C. Zhang (2001). "Ran GTPase: a master regulator of nuclear structure and function during the eukaryotic cell division cycle?" Trends Cell Biol **11**(9): 366-71.

Cochran, J. C., C. A. Sontag, et al. (2004). "Mechanistic analysis of the mitotic kinesin Eg5." J Biol Chem **279**(37): 38861-70.

Coqueret, O. (2002). "Linking cyclins to transcriptional control." Gene **299**(1-2): 35-55.

Coqueret, O. and H. Gascan (2000). "Functional interaction of STAT3 transcription factor with the cell cycle inhibitor p21WAF1/CIP1/SDI1." J Biol Chem **275**(25): 18794-800.

Cortez, D., Y. Wang, et al. (1999). "Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks." Science **286**(5442): 1162-6.

Crane, R., B. Gadea, et al. (2004). "Aurora A, meiosis and mitosis." Biol Cell **96**(3): 215-29.

Crane, R., A. Kloepfer, et al. (2004). "Requirements for the destruction of human Aurora-A." J Cell Sci **117**(Pt 25): 5975-83.

Cremet, J. Y., S. Descamps, et al. (2003). "Preparation and characterization of a human aurora-A kinase monoclonal antibody." Mol Cell Biochem **243**(1-2): 123-31.

Cristofalo, V. J., R. J. Pignolo, et al. (1992). "Changes in gene expression during senescence in culture." Exp Gerontol **27**(4): 429-32.

Crook, T., N. J. Marston, et al. (1994). "Transcriptional activation by p53 correlates with suppression of growth but not transformation." Cell **79**(5): 817-27.

Crosio, C., G. M. Fimia, et al. (2002). "Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases." Mol Cell Biol **22**(3): 874-85.

Cunningham, D., Y. Humblet, et al. (2004). "Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer." N Engl J Med **351**(4): 337-45.

d'Adda di Fagagna, F., S. H. Teo, et al. (2004). "Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response." Genes Dev **18**(15): 1781-99.

Dahiya, A., S. Wong, et al. (2001). "Linking the Rb and polycomb pathways." Mol Cell **8**(3): 557-69.

Dalal, S. N., C. M. Schweitzer, et al. (1999). "Cytoplasmic localization of human cdc25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site." Mol Cell Biol **19**(6): 4465-79.

Dalla-Favera, R., F. Wong-Staal, et al. (1982). "Onc gene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary leukaemic cells of the same patient." Nature **299**(5878): 61-3.

Dang, C. V. (1999). "c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism." Mol Cell Biol **19**(1): 1-11.

Dang, C. V., K. A. O'Donnell, et al. (2006). "The c-Myc target gene network." Semin Cancer Biol **16**(4): 253-64.

Darnell, J. E., Jr., I. M. Kerr, et al. (1994). "Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins." Science **264**(5164): 1415-21.

Datta, A., A. Nag, et al. (2004). "Myc-ARF (alternate reading frame) interaction inhibits the functions of Myc." J Biol Chem **279**(35): 36698-707.

Davis, A. C., M. Wims, et al. (1993). "A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice." Genes Dev **7**(4): 671-82.

De Souza, C. P., K. A. Ellem, et al. (2000). "Centrosomal and cytoplasmic Cdc2/cyclin B1 activation precedes nuclear mitotic events." Exp Cell Res **257**(1): 11-21.

Debatin, K. M., D. Poncet, et al. (2002). "Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway." Oncogene **21**(57): 8786-803.

Decker, T. and P. Kovarik (2000). "Serine phosphorylation of STATs." Oncogene **19**(21): 2628-37.

Delavaine, L. and N. B. La Thangue (1999). "Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1." Oncogene **18**(39): 5381-92.

DePinho, R. A. (1998). "Transcriptional repression. The cancer-chromatin connection." Nature **391**(6667): 533, 535-6.

Desai, S. D., H. Zhang, et al. (2003). "Transcription-dependent degradation of topoisomerase I-DNA covalent complexes." Mol Cell Biol **23**(7): 2341-50.

Dessev, G., C. Iovcheva-Dessev, et al. (1991). "A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles nuclei of clam oocytes in vitro." J Cell Biol **112**(4): 523-33.

Di Leonardo, A., S. H. Khan, et al. (1997). "DNA rereplication in the presence of mitotic spindle inhibitors in human and mouse fibroblasts lacking either p53 or pRb function." Cancer Res **57**(6): 1013-9.

Di Leonardo, A., S. P. Linke, et al. (1994). "DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts." Genes Dev **8**(21): 2540-51.

Dicioccio, R. A., H. Song, et al. (2004). "STK15 polymorphisms and association with risk of invasive ovarian cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **13**(10): 1589-94.

Ditchfield, C., V. L. Johnson, et al. (2003). "Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores." J Cell Biol **161**(2): 267-80.

Dittmann, K., C. Mayer, et al. (2005). "Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase." J Biol Chem **280**(35): 31182-9.

Dogterom, M., M. A. Felix, et al. (1996). "Influence of M-phase chromatin on the anisotropy of microtubule asters." J Cell Biol **133**(1): 125-40.

Douillard, J. Y., D. Cunningham, et al. (2000). "Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial." Lancet **355**(9209): 1041-7.

Downward, J. (2003). "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy." Nat Rev Cancer **3**(1): 11-22.

Downward, J. (2006). "Signal transduction. Prelude to an anniversary for the RAS oncogene." Science **314**(5798): 433-4.

Doxsey, S. (2001). "Re-evaluating centrosome function." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(9): 688-98.

Du, J. and G. J. Hannon (2004). "Suppression of p160ROCK bypasses cell cycle arrest after Aurora-A/STK15 depletion." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(24): 8975-80.

Dumaz, N. and D. W. Meek (1999). "Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2." Embo J **18**(24): 7002-10.

Dutertre, S., M. Cazales, et al. (2004). "Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition." J Cell Sci **117**(Pt 12): 2523-31.

Dutertre, S., S. Descamps, et al. (2002). "On the role of aurora-A in centrosome function." Oncogene **21**(40): 6175-83.

Eckerdt, F., J. Yuan, et al. (2005). "Polo-like kinases and oncogenesis." Oncogene **24**(2): 267-76.

Egan, K. M., P. A. Newcomb, et al. (2004). "STK15 polymorphism and breast cancer risk in a population-based study." Carcinogenesis **25**(11): 2149-53.

Eilers, M. (1999). "Control of cell proliferation by Myc family genes." Mol Cells **9**(1): 1-6.

el-Deiry, W. S., T. Tokino, et al. (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." Cell **75**(4): 817-25.

Ellinger-Ziegelbauer, H., H. Karasuyama, et al. (2000). "Ste20-like kinase (SLK), a regulatory kinase for polo-like kinase (Plk) during the G2/M transition in somatic cells." Genes Cells **5**(6): 491-8.

Espinosa, J. M. and B. M. Emerson (2001). "Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment." Mol Cell **8**(1): 57-69.

Esteban, L. M., C. Vicario-Abejon, et al. (2001). "Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development." Mol Cell Biol **21**(5): 1444-52.

Evan, G. I., A. H. Wyllie, et al. (1992). "Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein." Cell **69**(1): 119-28.

Ewart-Toland, A., P. Briassouli, et al. (2003). "Identification of Stk6/STK15 as a candidate low-penetrance tumor-susceptibility gene in mouse and human." Nat Genet **34**(4): 403-12.

Eyers, P. A., E. Erikson, et al. (2003). "A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A." Curr Biol **13**(8): 691-7.

Faragher, A. J. and A. M. Fry (2003). "Nek2A kinase stimulates centrosome disjunction and is required for formation of bipolar mitotic spindles." Mol Biol Cell **14**(7): 2876-89.

Farruggio, D. C., F. M. Townsley, et al. (1999). "Cdc20 associates with the kinase aurora2/Aik." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7306-11.

Favy, D. A., S. Lafarge, et al. (2000). "Real-time PCR quantification of full-length and exon 11 spliced BRCA1 transcripts in human breast cancer cell lines." Biochem Biophys Res Commun **274**(1): 73-8.

Fernandez, P. C., S. R. Frank, et al. (2003). "Genomic targets of the human c-Myc protein." Genes Dev **17**(9): 1115-29.

Fink, L., W. Seeger, et al. (1998). "Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking." Nat Med **4**(11): 1329-33.

Fischle, W., B. S. Tseng, et al. (2005). "Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation." Nature **438**(7071): 1116-22.

Frank, S. R., T. Parisi, et al. (2003). "MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin." EMBO Rep **4**(6): 575-80.

Frank, S. R., M. Schroeder, et al. (2001). "Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation." Genes Dev **15**(16): 2069-82.

Friedlander, P., Y. Haupt, et al. (1996). "A mutant p53 that discriminates between p53-responsive genes cannot induce apoptosis." Mol Cell Biol **16**(9): 4961-71.

Friedmann, B. J., M. Caplin, et al. (2006). "Interaction of the epidermal growth factor receptor and the DNA-dependent protein kinase pathway following gefitinib treatment." Mol Cancer Ther **5**(2): 209-18.

Fritah, A., C. Saucier, et al. (2005). "p21WAF1/CIP1 selectively controls the transcriptional activity of estrogen receptor alpha." Mol Cell Biol **25**(6): 2419-30.

Fry, A. M., T. Mayor, et al. (1998). "C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2." J Cell Biol **141**(7): 1563-74.

Fry, A. M. and E. A. Nigg (1995). "Cell cycle. The NIMA kinase joins forces with Cdc2." Curr Biol **5**(10): 1122-5.

Fu, J., M. Bian, et al. (2007). "Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis." Mol Cancer Res **5**(1): 1-10.

Fujiwara, T., M. Bandi, et al. (2005). "Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells." Nature **437**(7061): 1043-7.

Fukasawa, K., T. Choi, et al. (1996). "Abnormal centrosome amplification in the absence of p53." Science **271**(5256): 1744-7.

Furukawa, T., N. Kanai, et al. (2006). "AURKA is one of the downstream targets of MAPK1/ERK2 in pancreatic cancer." Oncogene **25**(35): 4831-9.

Galaktionov, K., X. Chen, et al. (1996). "Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc." Nature **382**(6591): 511-7.

Garcia-Carbonero, R. and J. G. Supko (2002). "Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins." Clin Cancer Res **8**(3): 641-61.

Gartel, A. L. and K. Shchors (2003). "Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes." Exp Cell Res **283**(1): 17-21.

Gartel, A. L. and A. L. Tyner (1999). "Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene." Exp Cell Res **246**(2): 280-9.

Gerdes, J. (1990). "Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies." Semin Cancer Biol **1**(3): 199-206.

Gerdes, J., H. Lemke, et al. (1984). "Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67." J Immunol **133**(4): 1710-5.

Gerdes, J., U. Schwab, et al. (1983). "Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation." Int J Cancer **31**(1): 13-20.

Giacchetti, S., M. Itzhaki, et al. (1999). "Long-term survival of patients with unresectable colorectal cancer liver metastases following infusional chemotherapy with 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and surgery." Ann Oncol **10**(6): 663-9.

Giet, R., D. McLean, et al. (2002). "Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules." J Cell Biol **156**(3): 437-51.

Giet, R., R. Uzbekov, et al. (1999). "The Xenopus laevis aurora-related protein kinase pEg2 associates with and phosphorylates the kinesin-related protein XlEg5." J Biol Chem **274**(21): 15005-13.

Gil, J. and G. Peters (2006). "Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(9): 667-77.

Giraud, S., A. Hurlstone, et al. (2004). "Implication of BRG1 and cdk9 in the STAT3-mediated activation of the p21waf1 gene." Oncogene **23**(44): 7391-8.

Glover, D. M., M. H. Leibowitz, et al. (1995). "Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles." Cell **81**(1): 95-105.

Goepfert, T. M., Y. E. Adigun, et al. (2002). "Centrosome amplification and overexpression of aurora A are early events in rat mammary carcinogenesis." Cancer Res **62**(14): 4115-22.

Goffeau, A., B. G. Barrell, et al. (1996). "Life with 6000 genes." Science **274**(5287): 546, 563-7.

Goldstein, N. I., M. Prewett, et al. (1995). "Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model." Clin Cancer Res **1**(11): 1311-8.

Gopalan, G., C. S. Chan, et al. (1997). "A novel mammalian, mitotic spindle-associated kinase is related to yeast and fly chromosome segregation regulators." J Cell Biol **138**(3): 643-56.

Goto, H., Y. Yasui, et al. (2003). "Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process." J Biol Chem **278**(10): 8526-30.

Goto, H., Y. Yasui, et al. (2002). "Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation." Genes Cells **7**(1): 11-7.

Grabsch, H., S. Takeno, et al. (2003). "Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1, BUBR1, and BUB3 in gastric cancer--association with tumour cell proliferation." J Pathol **200**(1): 16-22.

Grana, X., J. Garriga, et al. (1998). "Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth." Oncogene **17**(25): 3365-83.

Greene, D. R., S. R. Taylor, et al. (1991). "DNA ploidy by image analysis of individual foci of prostate cancer: a preliminary report." Cancer Res **51**(15): 4084-9.

Gregory, M. A. and S. R. Hann (2000). "c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells." Mol Cell Biol **20**(7): 2423-35.

Gritsko, T. M., D. Coppola, et al. (2003). "Activation and overexpression of centrosome kinase BTAK/Aurora-A in human ovarian cancer." Clin Cancer Res **9**(4): 1420-6.

Groth, A., J. Lukas, et al. (2003). "Human Tousled like kinases are targeted by an ATM- and Chk1-dependent DNA damage checkpoint." Embo J **22**(7): 1676-87.

Grothey, A. and M. P. Goetz (2004). "Oxaliplatin plus oral fluoropyrimidines in colorectal cancer." Clin Colorectal Cancer **4 Suppl 1**: S37-42.

Gruneberg, U., R. Neef, et al. (2004). "Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2." J Cell Biol **166**(2): 167-72.

Gruss, O. J., M. Wittmann, et al. (2002). "Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells." Nat Cell Biol **4**(11): 871-9.

Guney, I., S. Wu, et al. (2006). "Reduced c-Myc signaling triggers telomere-independent senescence by regulating Bmi-1 and p16(INK4a)." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(10): 3645-50.

Haggerty, T. J., K. I. Zeller, et al. (2003). "A strategy for identifying transcription factor binding sites reveals two classes of genomic c-Myc target sites." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5313-8.

Hagting, A., C. Karlsson, et al. (1998). "MPF localization is controlled by nuclear export." Embo J **17**(14): 4127-38.

Hames, R. S. and A. M. Fry (2002). "Alternative splice variants of the human centrosome kinase Nek2 exhibit distinct patterns of expression in mitosis." Biochem J **361**(Pt 1): 77-85.

Hampel, B., F. Malisan, et al. (2004). "Differential regulation of apoptotic cell death in senescent human cells." Exp Gerontol **39**(11-12): 1713-21.

Hanks, S., K. Coleman, et al. (2004). "Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B." Nat Genet **36**(11): 1159-61.

Hannak, E., M. Kirkham, et al. (2001). "Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in Caenorhabditis elegans." J Cell Biol **155**(7): 1109-16.

Harbour, J. W. and D. C. Dean (2000). "Chromatin remodeling and Rb activity." Curr Opin Cell Biol **12**(6): 685-9.

Harley, C. B., A. B. Futcher, et al. (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." Nature **345**(6274): 458-60.

Harper, J. W., J. L. Burton, et al. (2002). "The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more." Genes Dev **16**(17): 2179-206.

Harrington, E. A., D. Bebbington, et al. (2004). "VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo." Nat Med **10**(3): 262-7.

Harrington, E. A., D. Bebbington, et al. (2007). "Addendum: VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo." Nat Med **13**(4): 511.

Hauf, S., R. W. Cole, et al. (2003). "The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint." J Cell Biol **161**(2): 281-94.

Hayflick, L. (1965). "The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains." Exp Cell Res **37**: 614-36.

Herbst, R. S. and D. M. Shin (2002). "Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy." Cancer **94**(5): 1593-611.

Herold, S., M. Wanzel, et al. (2002). "Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1." Mol Cell **10**(3): 509-21.

Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-79.

Higashimoto, Y., S. Saito, et al. (2000). "Human p53 is phosphorylated on serines 6 and 9 in response to DNA damage-inducing agents." J Biol Chem **275**(30): 23199-203.

Hill, C. and F. Doyon (2006). "[The frequency of cancer in France in year 2002, and trends since 1968]." Bull Cancer **93**(1): 7-11.

Hirota, T., N. Kunitoku, et al. (2003). "Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells." Cell **114**(5): 585-98.

Hirota, T., J. J. Lipp, et al. (2005). "Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin." Nature **438**(7071): 1176-80.

Ho, J. S., W. Ma, et al. (2005). "p53-Dependent transcriptional repression of c-myc is required for G1 cell cycle arrest." Mol Cell Biol **25**(17): 7423-31.

Hofseth, L. J., S. P. Hussain, et al. (2004). "p53: 25 years after its discovery." Trends Pharmacol Sci **25**(4): 177-81.

Honda, K., H. Mihara, et al. (2000). "Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase-promoting complex-ubiquitin-proteasome pathway." Oncogene **19**(24): 2812-9.

Horn, V., J. Thelu, et al. (2007). "Functional interaction of Aurora-A and PP2A during mitosis." Mol Biol Cell **18**(4): 1233-41.

Hu, H. M., C. K. Chuang, et al. (2000). "Genomic organization, expression, and chromosome localization of a third aurora-related kinase gene, Aie1." DNA Cell Biol **19**(11): 679-88.

Hunter, T. and G. D. Plowman (1997). "The protein kinases of budding yeast: six score and more." Trends Biochem Sci **22**(1): 18-22.

Ihle, J. N. (1996). "STATs: signal transducers and activators of transcription." Cell **84**(3): 331-4.

Innocente, S. A., J. L. Abrahamson, et al. (1999). "p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2147-52.

Inoue, K., M. F. Roussel, et al. (1999). "Induction of ARF tumor suppressor gene expression and cell cycle arrest by transcription factor DMP1." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3993-8.

Ionov, Y., H. Yamamoto, et al. (2000). "Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 10872-7.

Irwin, M. S. and W. G. Kaelin (2001). "p53 family update: p73 and p63 develop their own identities." Cell Growth Differ **12**(7): 337-49.

Jackson, J. G. and O. M. Pereira-Smith (2006). "p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and GADD45 during replicative senescence of normal human fibroblasts." Cancer Res **66**(17): 8356-60.

Jang, Y. J., S. Ma, et al. (2002). "Phosphorylation of threonine 210 and the role of serine 137 in the regulation of mammalian polo-like kinase." J Biol Chem **277**(46): 44115-20.

Jeng, Y. M., S. Y. Peng, et al. (2004). "Overexpression and amplification of Aurora-A in hepatocellular carcinoma." Clin Cancer Res **10**(6): 2065-71.

Jiang, Y., Y. Zhang, et al. (2003). "AuroraA overexpression overrides the mitotic spindle checkpoint triggered by nocodazole, a microtubule destabilizer." Oncogene **22**(51): 8293-301.

Johnson, L., D. Greenbaum, et al. (1997). "K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras." Genes Dev **11**(19): 2468-81.

Ju, H., H. Cho, et al. (2006). "Functional polymorphism 57Val>Ile of aurora kinase A associated with increased risk of gastric cancer progression." Cancer Lett **242**(2): 273-9.

Kang, Y., C. R. Chen, et al. (2003). "A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells." Mol Cell **11**(4): 915-26.

Karsenti, E. and I. Vernos (2001). "The mitotic spindle: a self-made machine." Science **294**(5542): 543-7.

Katayama, H., K. Sasai, et al. (2004). "Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53." Nat Genet **36**(1): 55-62.

Katayama, H., H. Zhou, et al. (2001). "Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle." J Biol Chem **276**(49): 46219-24.

Kawajiri, A., Y. Yasui, et al. (2003). "Functional significance of the specific sites phosphorylated in desmin at cleavage furrow: Aurora-B may phosphorylate and regulate type III intermediate filaments during cytokinesis coordinatedly with Rho-kinase." Mol Biol Cell **14**(4): 1489-500.

Kawato, Y., M. Aonuma, et al. (1991). "Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11." Cancer Res **51**(16): 4187-91.

Keen, N. and S. Taylor (2004). "Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents." Nat Rev Cancer **4**(12): 927-36.

Kelley, G. G., S. E. Reks, et al. (2001). "Phospholipase C(epsilon): a novel Ras effector." Embo J **20**(4): 743-54.

Kelm, O., M. Wind, et al. (2002). "Cell cycle-regulated phosphorylation of the Xenopus polo-like kinase Plx1." J Biol Chem **277**(28): 25247-56.

Khosravi-Far, R., M. A. White, et al. (1996). "Oncogenic Ras activation of Raf/mitogen-activated protein kinase-independent pathways is sufficient to cause tumorigenic transformation." Mol Cell Biol **16**(7): 3923-33.

Kim, E. S., F. R. Khuri, et al. (2001). "Epidermal growth factor receptor biology (IMC-C225)." Curr Opin Oncol **13**(6): 506-13.

Kimura, M., S. Kotani, et al. (1997). "Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of Drosophila and yeast Ipl1." J Biol Chem **272**(21): 13766-71.

Kimura, M., Y. Matsuda, et al. (1999). "Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3." J Biol Chem **274**(11): 7334-40.

Kimura, M. T., T. Mori, et al. (2005). "Two functional coding single nucleotide polymorphisms in STK15 (Aurora-A) coordinately increase esophageal cancer risk." Cancer Res **65**(9): 3548-54.

Kinoshita, K., T. L. Noetzel, et al. (2005). "Aurora A phosphorylation of TACC3/maskin is required for centrosome-dependent microtubule assembly in mitosis." J Cell Biol **170**(7): 1047-55.

Kitada, K., A. L. Johnson, et al. (1993). "A multicopy suppressor gene of the Saccharomyces cerevisiae G1 cell cycle mutant gene dbf4 encodes a protein kinase and is identified as CDC5." Mol Cell Biol **13**(7): 4445-57.

Kitaura, H., M. Shinshi, et al. (2000). "Reciprocal regulation via protein-protein interaction between c-Myc and p21(cip1/waf1/sdi1) in DNA replication and transcription." J Biol Chem **275**(14): 10477-83.

Kneisel, L., K. Strebhardt, et al. (2002). "Expression of polo-like kinase (PLK1) in thin melanomas: a novel marker of metastatic disease." J Cutan Pathol **29**(6): 354-8.

Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-3.

Kolodner, R. D. (1995). "Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility." Trends Biochem Sci **20**(10): 397-401.

Konishi, Y., M. Lehtinen, et al. (2002). "Cdc2 phosphorylation of BAD links the cell cycle to the cell death machinery." Mol Cell **9**(5): 1005-16.

Kops, G. J., D. R. Foltz, et al. (2004). "Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(23): 8699-704.

Kops, G. J., B. A. Weaver, et al. (2005). "On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint." Nat Rev Cancer **5**(10): 773-85.

Kraft, C., F. Herzog, et al. (2003). "Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation." Embo J **22**(24): 6598-609.

Krause, D. R., J. C. Jonnalagadda, et al. (2003). "Suppression of Tousled-like kinase activity after DNA damage or replication block requires ATM, NBS1 and Chk1." Oncogene **22**(38): 5927-37.

Krause, S., G. Feil, et al. (2004). "Examination of tumorigenesis of precursor lesions in bladder cancer by in situ hybridization." Urol Int **72**(2): 118-22.

Krystyniak, A., C. Garcia-Echeverria, et al. (2006). "Inhibition of Aurora A in response to DNA damage." Oncogene **25**(3): 338-48.

Kufer, T. A., H. H. Sillje, et al. (2002). "Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle." J Cell Biol **158**(4): 617-23.

Kumagai, A. and W. G. Dunphy (2000). "Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in Xenopus egg extracts." Mol Cell **6**(4): 839-49.

Kunimoto, T., K. Nitta, et al. (1987). "Antitumor activity of 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothec in, a novel water-soluble derivative of camptothecin, against murine tumors." Cancer Res **47**(22): 5944-7.

Kunitoku, N., T. Sasayama, et al. (2003). "CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function." Dev Cell **5**(6): 853-64.

Kunkel, T. A. and K. Bebenek (2000). "DNA replication fidelity." Annu Rev Biochem **69**: 497-529.

Lachner, M., D. O'Carroll, et al. (2001). "Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins." Nature **410**(6824): 116-20.

Lamb, N. J., A. Fernandez, et al. (1990). "Microinjection of p34cdc2 kinase induces marked changes in cell shape, cytoskeletal organization, and chromatin structure in mammalian fibroblasts." Cell **60**(1): 151-65.

Lan, W., X. Zhang, et al. (2004). "Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity." Curr Biol **14**(4): 273-86.

Lane, H. A. and E. A. Nigg (1996). "Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes." J Cell Biol **135**(6 Pt 2): 1701-13.

Lanni, J. S. and T. Jacks (1998). "Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption." Mol Cell Biol **18**(2): 1055-64.

Laoukili, J., M. R. Kooistra, et al. (2005). "FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability." Nat Cell Biol **7**(2): 126-36.

Lassus, P., X. Opitz-Araya, et al. (2002). "Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization." Science **297**(5585): 1352-4.

Lee, B. and S. K. Moon (2005). "Ras/ERK signaling pathway mediates activation of the p21WAF1 gene promoter in vascular smooth muscle cells by platelet-derived growth factor." Arch Biochem Biophys **443**(1-2): 113-9.

Lees, E., B. Faha, et al. (1992). "Cyclin E/cdk2 and cyclin A/cdk2 kinases associate with p107 and E2F in a temporally distinct manner." Genes Dev **6**(10): 1874-85.

Lelong, B., V. Moutardier, et al. (2004). "[Colorectal cancer: what should be the management of primary tumour?]." Rev Prat **54**(2): 155-66.

Lengauer, C., K. W. Kinzler, et al. (1998). "Genetic instabilities in human cancers." Nature **396**(6712): 643-9.

Lenz, H. J., E. Van Cutsem, et al. (2006). "Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines." J Clin Oncol **24**(30): 4914-21.

Leon, J., I. Guerrero, et al. (1987). "Differential expression of the ras gene family in mice." Mol Cell Biol **7**(4): 1535-40.

Letai, A., M. C. Bassik, et al. (2002). "Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics." Cancer Cell **2**(3): 183-92.

Leu, J. I., P. Dumont, et al. (2004). "Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex." Nat Cell Biol **6**(5): 443-50.

Li, J. J., S. J. Weroha, et al. (2004). "Estrogen mediates Aurora-A overexpression, centrosome amplification, chromosomal instability, and breast cancer in female ACI rats." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(52): 18123-8.

Li, S., K. R. Schmitz, et al. (2005). "Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab." Cancer Cell **7**(4): 301-11.

Li, X., G. Sakashita, et al. (2004). "Direct association with inner centromere protein (INCENP) activates the novel chromosomal passenger protein, Aurora-C." J Biol Chem **279**(45): 47201-11.

Lim, D. S., S. T. Kim, et al. (2000). "ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway." Nature **404**(6778): 613-7.

Lin, B., S. K. Kolluri, et al. (2004). "Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3." Cell **116**(4): 527-40.

Lindon, C. and J. Pines (2004). "Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells." J Cell Biol **164**(2): 233-41.

Lingle, W. L., W. H. Lutz, et al. (1998). "Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 2950-5.

Lipton, S. A. and E. Bossy-Wetzel (2002). "Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity." Cell **111**(2): 147-50.

Littlepage, L. E. and J. V. Ruderman (2002). "Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit." Genes Dev **16**(17): 2274-85.

Littlepage, L. E., H. Wu, et al. (2002). "Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15440-5.

Liu, P., L. R. Barkley, et al. (2006). "The Chk1-mediated S-phase checkpoint targets initiation factor Cdc45 via a Cdc25A/Cdk2-independent mechanism." J Biol Chem **281**(41): 30631-44.

Liu, Q., S. Kaneko, et al. (2004). "Aurora-A abrogation of p53 DNA binding and transactivation activity by phosphorylation of serine 215." J Biol Chem **279**(50): 52175-82.

Lobrich, M. and P. A. Jeggo (2007). "The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction." Nat Rev Cancer **7**(11): 861-9.

Loeb, L. A., K. R. Loeb, et al. (2003). "Multiple mutations and cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(3): 776-81.

Lou, Y., J. Yao, et al. (2004). "NEK2A interacts with MAD1 and possibly functions as a novel integrator of the spindle checkpoint signaling." J Biol Chem **279**(19): 20049-57.

Ludwig, R. L., S. Bates, et al. (1996). "Differential activation of target cellular promoters by p53 mutants with impaired apoptotic function." Mol Cell Biol **16**(9): 4952-60.

Lukas, C., J. Falck, et al. (2003). "Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage." Nat Cell Biol **5**(3): 255-60.

Lukas, J., C. Lukas, et al. (2004). "Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 997-1007.

Macmillan, J. C., J. W. Hudson, et al. (2001). "Comparative expression of the mitotic regulators SAK and PLK in colorectal cancer." Ann Surg Oncol **8**(9): 729-40.

Magrath, I. (1990). "The pathogenesis of Burkitt's lymphoma." Adv Cancer Res **55**: 133-270.

Mailand, N., J. Falck, et al. (2000). "Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage." Science **288**(5470): 1425-9.

Mailand, N., A. V. Podtelejnikov, et al. (2002). "Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability." Embo J **21**(21): 5911-20.

Malliri, A., R. A. van der Kammen, et al. (2002). "Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours." Nature **417**(6891): 867-71.

Mantel, C., S. E. Braun, et al. (1999). "p21(cip-1/waf-1) deficiency causes deformed nuclear architecture, centriole overduplication, polyploidy, and relaxed microtubule damage checkpoints in human hematopoietic cells." Blood **93**(4): 1390-8.

Mao, Y., A. Abrieu, et al. (2003). "Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E-dependent activation/inactivation of BubR1." Cell **114**(1): 87-98.

Mao, Y., M. Sun, et al. (2000). "SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4046-51.

Marumoto, T., S. Honda, et al. (2003). "Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells." J Biol Chem **278**(51): 51786-95.

Marumoto, T., D. Zhang, et al. (2005). "Aurora-A - a guardian of poles." Nat Rev Cancer **5**(1): 42-50.

Mason, D. X., T. J. Jackson, et al. (2004). "Molecular signature of oncogenic ras-induced senescence." Oncogene **23**(57): 9238-46.

Masutomi, K., E. Y. Yu, et al. (2003). "Telomerase maintains telomere structure in normal human cells." Cell **114**(2): 241-53.

Maya, R., M. Balass, et al. (2001). "ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage." Genes Dev **15**(9): 1067-77.

Mayer, R. J. (2000). "Moving beyond fluorouracil for colorectal cancer." N Engl J Med **343**(13): 963-4.

Mayor, T., U. Hacker, et al. (2002). "The mechanism regulating the dissociation of the centrosomal protein C-Nap1 from mitotic spindle poles." J Cell Sci **115**(Pt 16): 3275-84.

Mayor, T., Y. D. Stierhof, et al. (2000). "The centrosomal protein C-Nap1 is required for cell cycle-regulated centrosome cohesion." J Cell Biol **151**(4): 837-46.

McKusick, V. A. (1985). "Marcella O'Grady Boveri (1865-1950) and the chromosome theory of cancer." J Med Genet **22**(6): 431-40.

McMahon, S. B., H. A. Van Buskirk, et al. (1998). "The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins." Cell **94**(3): 363-74.

McMahon, S. B., M. A. Wood, et al. (2000). "The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc." Mol Cell Biol **20**(2): 556-62.

Mellstedt, H. (2003). "Monoclonal antibodies in human cancer." Drugs Today (Barc) **39 Suppl C**: 1-16.

Meraldi, P., R. Honda, et al. (2002). "Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53-/- cells." Embo J **21**(4): 483-92.

Meraldi, P. and E. A. Nigg (2002). "The centrosome cycle." FEBS Lett **521**(1-3): 9-13.

Metge, B., S. Ofori-Acquah, et al. (2004). "Stat3 activity is required for centrosome duplication in chinese hamster ovary cells." J Biol Chem **279**(40): 41801-6.

Miao, X., T. Sun, et al. (2004). "Functional STK15 Phe31Ile polymorphism is associated with the occurrence and advanced disease status of esophageal squamous cell carcinoma." Cancer Res **64**(8): 2680-3.

Michael, D. and M. Oren (2003). "The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system." Semin Cancer Biol **13**(1): 49-58.

Midgley, R. and D. Kerr (1999). "Colorectal cancer." Lancet **353**(9150): 391-9.

Miyashita, T. and J. C. Reed (1995). "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene." Cell **80**(2): 293-9.

Miyoshi, Y., K. Iwao, et al. (2001). "Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers." Int J Cancer **92**(3): 370-3.

Modrich, P. (1997). "Strand-specific mismatch repair in mammalian cells." J Biol Chem **272**(40): 24727-30.

Morham, S. G., K. D. Kluckman, et al. (1996). "Targeted disruption of the mouse topoisomerase I gene by camptothecin selection." Mol Cell Biol **16**(12): 6804-9.

Moroni, M. C., E. S. Hickman, et al. (2001). "Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53." Nat Cell Biol **3**(6): 552-8.

Mui, A. L., H. Wakao, et al. (1995). "Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs." Embo J **14**(6): 1166-75.

Muller, R., D. J. Slamon, et al. (1983). "Transcription of c-onc genes c-rasKi and c-fms during mouse development." Mol Cell Biol **3**(6): 1062-9.

Murakami, H. and H. Okayama (1995). "A kinase from fission yeast responsible for blocking mitosis in S phase." Nature **374**(6525): 817-9.

Murata-Hori, M. and Y. L. Wang (2002). "Both midzone and astral microtubules are involved in the delivery of cytokinesis signals: insights from the mobility of aurora B." J Cell Biol **159**(1): 45-53.

Murzina, N., A. Verreault, et al. (1999). "Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins." Mol Cell **4**(4): 529-40.

Musacchio, A. and K. G. Hardwick (2002). "The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(10): 731-41.

Nakano, K. and K. H. Vousden (2001). "PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53." Mol Cell **7**(3): 683-94.

Narita, M., S. Nunez, et al. (2003). "Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence." Cell **113**(6): 703-16.

Nau, M. M., B. J. Brooks, et al. (1985). "L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer." Nature **318**(6041): 69-73.

Neben, K., A. Korshunov, et al. (2004). "Microarray-based screening for molecular markers in medulloblastoma revealed STK15 as independent predictor for survival." Cancer Res **64**(9): 3103-11.

Neef, R., C. Preisinger, et al. (2003). "Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis." J Cell Biol **162**(5): 863-75.

Nicholson, R. I., J. M. Gee, et al. (2001). "EGFR and cancer prognosis." Eur J Cancer **37 Suppl 4**: S9-15.

Nielsen, S. J., R. Schneider, et al. (2001). "Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters." Nature **412**(6846): 561-5.

Nigg, E. A. (2001). "Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(1): 21-32.

Nigg, E. A. (2002). "Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression?" Nat Rev Cancer **2**(11): 815-25.

O'Driscoll, M., V. L. Ruiz-Perez, et al. (2003). "A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome." Nat Genet **33**(4): 497-501.

Obaya, A. J., M. K. Mateyak, et al. (1999). "Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle." Oncogene **18**(19): 2934-41.

Oda, E., R. Ohki, et al. (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." Science **288**(5468): 1053-8.

Ohi, R., T. Sapra, et al. (2004). "Differentiation of cytoplasmic and meiotic spindle assembly MCAK functions by Aurora B-dependent phosphorylation." Mol Biol Cell **15**(6): 2895-906.

Ohtani, N., Z. Zebedee, et al. (2001). "Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence." Nature **409**(6823): 1067-70.

Okuda, M., H. F. Horn, et al. (2000). "Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication." Cell **103**(1): 127-40.

Osmani, S. A. and X. S. Ye (1996). "Cell cycle regulation in Aspergillus by two protein kinases." Biochem J **317 (Pt 3)**: 633-41.

Owen-Schaub, L. B., W. Zhang, et al. (1995). "Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression." Mol Cell Biol **15**(6): 3032-40.

Pavletich, N. P. (1999). "Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors." J Mol Biol **287**(5): 821-8.

Payne, G. S., J. M. Bishop, et al. (1982). "Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas." Nature **295**(5846): 209-14.

Pena, A., C. D. Reddy, et al. (1993). "Regulation of human ornithine decarboxylase expression by the c-Myc.Max protein complex." J Biol Chem **268**(36): 27277-85.

Peng, C. Y., P. R. Graves, et al. (1997). "Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216." Science **277**(5331): 1501-5.

Perez-Roger, I., S. H. Kim, et al. (1999). "Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1)." Embo J **18**(19): 5310-20.

Perkins, N. D. (2002). "Not just a CDK inhibitor: regulation of transcription by p21(WAF1/CIP1/SDI1)." Cell Cycle **1**(1): 39-41.

Peter, M., J. Nakagawa, et al. (1990). "In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase." Cell **61**(4): 591-602.

Peters, J. M. (2002). "The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond." Mol Cell **9**(5): 931-43.

Pfleger, C. M. and M. W. Kirschner (2000). "The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1." Genes Dev **14**(6): 655-65.

Pfleger, C. M., E. Lee, et al. (2001). "Substrate recognition by the Cdc20 and Cdh1 components of the anaphase-promoting complex." Genes Dev **15**(18): 2396-407.

Pines, J. and C. L. Rieder (2001). "Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression." Nat Cell Biol **3**(1): E3-6.

Pinsky, B. A., C. Kung, et al. (2006). "The Ipl1-Aurora protein kinase activates the spindle checkpoint by creating unattached kinetochores." Nat Cell Biol **8**(1): 78-83.

Polager, S., Y. Kalma, et al. (2002). "E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis." Oncogene **21**(3): 437-46.

Pommier, Y. (2006). "Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond." Nat Rev Cancer **6**(10): 789-802.

Pruitt, K. and C. J. Der (2001). "Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis." Cancer Lett **171**(1): 1-10.

Qi, Y., M. A. Gregory, et al. (2004). "p19ARF directly and differentially controls the functions of c-Myc independently of p53." Nature **431**(7009): 712-7.

Quelle, D. E., F. Zindy, et al. (1995). "Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest." Cell **83**(6): 993-1000.

Rajagopalan, H., M. A. Nowak, et al. (2003). "The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer." Nat Rev Cancer **3**(9): 695-701.

Rana, T. M. (2007). "Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(1): 23-36.

Ravi, R., A. J. Jain, et al. (2004). "Elimination of hepatic metastases of colon cancer cells via p53-independent cross-talk between irinotecan and Apo2 ligand/TRAIL." Cancer Res **64**(24): 9105-14.

Rea, S., F. Eisenhaber, et al. (2000). "Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases." Nature **406**(6796): 593-9.

Ren, B., H. Cam, et al. (2002). "E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints." Genes Dev **16**(2): 245-56.

Repasky, G. A., E. J. Chenette, et al. (2004). "Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis?" Trends Cell Biol **14**(11): 639-47.

Rieder, C. L. and A. Khodjakov (2003). "Mitosis through the microscope: advances in seeing inside live dividing cells." Science **300**(5616): 91-6.

Robertson, J. D., V. Gogvadze, et al. (2004). "Processed caspase-2 can induce mitochondria-mediated apoptosis independently of its enzymatic activity." EMBO Rep **5**(6): 643-8.

Robertson, K. D., S. Ait-Si-Ali, et al. (2000). "DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters." Nat Genet **25**(3): 338-42.

Rodriguez-Viciana, P., P. H. Warne, et al. (1994). "Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras." Nature **370**(6490): 527-32.

Rodriguez-Viciana, P., P. H. Warne, et al. (1997). "Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras." Cell **89**(3): 457-67.

Roghi, C., R. Giet, et al. (1998). "The Xenopus protein kinase pEg2 associates with the centrosome in a cell cycle-dependent manner, binds to the spindle microtubules and is involved in bipolar mitotic spindle assembly." J Cell Sci **111 (Pt 5)**: 557-72.

Rong, R., J. Montalbano, et al. (2005). "Oncogenic Ras-mediated downregulation of Gadd153/CHOP is required for Ras-induced cellular transformation." Oncogene **24**(30): 4867-72.

Roninson, I. B., E. V. Broude, et al. (2001). "If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells." Drug Resist Updat **4**(5): 303-13.

Rossi, F., E. Labourier, et al. (1996). "Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I." Nature **381**(6577): 80-2.

Rouault, J. P., N. Falette, et al. (1996). "Identification of BTG2, an antiproliferative p53-dependent component of the DNA damage cellular response pathway." Nat Genet **14**(4): 482-6.

Rowan, S., R. L. Ludwig, et al. (1996). "Specific loss of apoptotic but not cell-cycle arrest function in a human tumor derived p53 mutant." Embo J **15**(4): 827-38.

Royce, M. E., W. Xia, et al. (2004). "STK15/Aurora-A expression in primary breast tumors is correlated with nuclear grade but not with prognosis." Cancer **100**(1): 12-9.

Rozenchan, P. B., M. A. Folgueira, et al. (2004). "Ras activation is associated with vitamin D receptor mRNA instability in HC11 mammary cells." J Steroid Biochem Mol Biol **92**(1-2): 89-95.

Saito, S., A. A. Goodarzi, et al. (2002). "ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation." J Biol Chem **277**(15): 12491-4.

Sakaguchi, K., S. Saito, et al. (2000). "Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding." J Biol Chem **275**(13): 9278-83.

Sakakura, C., A. Hagiwara, et al. (2001). "Tumour-amplified kinase BTAK is amplified and overexpressed in gastric cancers with possible involvement in aneuploid formation." Br J Cancer **84**(6): 824-31.

Saltz, L. B., J. V. Cox, et al. (2000). "Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group." N Engl J Med **343**(13): 905-14.

Samejima, K., S. Tone, et al. (1998). "Transition from caspase-dependent to caspase-independent mechanisms at the onset of apoptotic execution." J Cell Biol **143**(1): 225-39.

Samowitz, W. S. and M. L. Slattery (1997). "Transforming growth factor-beta receptor type 2 mutations and microsatellite instability in sporadic colorectal adenomas and carcinomas." Am J Pathol **151**(1): 33-5.

Samuels-Lev, Y., D. J. O'Connor, et al. (2001). "ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53." Mol Cell **8**(4): 781-94.

Sarkar, D. and P. B. Fisher (2006). "Regulation of Myc function by ARF: checkpoint for Myc-induced oncogenesis." Cancer Biol Ther **5**(6): 693-5.

Sasai, K., H. Katayama, et al. (2004). "Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells." Cell Motil Cytoskeleton **59**(4): 249-63.

Satinover, D. L., C. A. Leach, et al. (2004). "Activation of Aurora-A kinase by protein phosphatase inhibitor-2, a bifunctional signaling protein." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(23): 8625-30.

Schmid, P., W. A. Schulz, et al. (1989). "Dynamic expression pattern of the myc protooncogene in midgestation mouse embryos." Science **243**(4888): 226-9.

Schmidt, E. V. (2004). "The role of c-myc in regulation of translation initiation." Oncogene **23**(18): 3217-21.

Schubbert, S., K. Shannon, et al. (2007). "Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer." Nat Rev Cancer **7**(4): 295-308.

Schuringa, J. J., L. V. Dekker, et al. (2001). "Sequential activation of Rac-1, SEK-1/MKK-4, and protein kinase Cdelta is required for interleukin-6-induced STAT3 Ser-727 phosphorylation and transactivation." J Biol Chem **276**(29): 27709-15.

Schwab, M., K. Alitalo, et al. (1983). "Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour." Nature **305**(5931): 245-8.

Scrittori, L., F. Hans, et al. (2001). "pEg2 aurora-A kinase, histone H3 phosphorylation, and chromosome assembly in Xenopus egg extract." J Biol Chem **276**(32): 30002-10.

Scrittori, L., D. A. Skoufias, et al. (2005). "A small C-terminal sequence of Aurora B is responsible for localization and function." Mol Biol Cell **16**(1): 292-305.

Sears, R. C. (2004). "The life cycle of C-myc: from synthesis to degradation." Cell Cycle **3**(9): 1133-7.

Secombe, J., S. B. Pierce, et al. (2004). "Myc: a weapon of mass destruction." Cell **117**(2): 153-6.

Sen, S., H. Zhou, et al. (1997). "A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines." Oncogene **14**(18): 2195-200.

Shah, M. A. and G. K. Schwartz (2001). "Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy." Clin Cancer Res **7**(8): 2168-81.

Sharpless, N. E. (2005). "INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus." Mutat Res **576**(1-2): 22-38.

Sherr, C. J. (2000). "The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited." Cancer Res **60**(14): 3689-95.

Shikama, N., C. W. Lee, et al. (1999). "A novel cofactor for p300 that regulates the p53 response." Mol Cell **4**(3): 365-76.

Shiloh, Y. (1997). "Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart." Annu Rev Genet **31**: 635-62.

Shiloh, Y. (2003). "ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity." Nat Rev Cancer **3**(3): 155-68.

Shiloh, Y. and M. B. Kastan (2001). "ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths." Adv Cancer Res **83**: 209-54.

Shin, H. J., K. H. Baek, et al. (2003). "Dual roles of human BubR1, a mitotic checkpoint kinase, in the monitoring of chromosomal instability." Cancer Cell **4**(6): 483-97.

Sigal, A. and V. Rotter (2000). "Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome." Cancer Res **60**(24): 6788-93.

Simmonds, P. C. (2000). "Palliative chemotherapy for advanced colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. Colorectal Cancer Collaborative Group." Bmj **321**(7260): 531-5.

Smith, M. R., M. L. Wilson, et al. (1997). "Malignant transformation of mammalian cells initiated by constitutive expression of the polo-like kinase." Biochem Biophys Res Commun **234**(2): 397-405.

Song, C., C. D. Hu, et al. (2001). "Regulation of a novel human phospholipase C, PLCepsilon, through membrane targeting by Ras." J Biol Chem **276**(4): 2752-7.

Soret, J., M. Gabut, et al. (2003). "Altered serine/arginine-rich protein phosphorylation and exonic enhancer-dependent splicing in Mammalian cells lacking topoisomerase I." Cancer Res **63**(23): 8203-11.

Spencer, C. A. and M. Groudine (1991). "Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells." Adv Cancer Res **56**: 1-48.

Sreeramaneni, R., A. Chaudhry, et al. (2005). "Ras-Raf-Arf signaling critically depends on the Dmp1 transcription factor." Mol Cell Biol **25**(1): 220-32.

St Clair, S., L. Giono, et al. (2004). "DNA damage-induced downregulation of Cdc25C is mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the cdc25C promoter." Mol Cell **16**(5): 725-36.

Staller, P., K. Peukert, et al. (2001). "Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1." Nat Cell Biol **3**(4): 392-9.

Stenoien, D. L., S. Sen, et al. (2003). "Dynamic association of a tumor amplified kinase, Aurora-A, with the centrosome and mitotic spindle." Cell Motil Cytoskeleton **55**(2): 134-46.

Stevens, C. and N. B. La Thangue (2003). "E2F and cell cycle control: a double-edged sword." Arch Biochem Biophys **412**(2): 157-69.

Stevens, C., L. Smith, et al. (2003). "Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage." Nat Cell Biol **5**(5): 401-9.

Stott, F. J., S. Bates, et al. (1998). "The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2." Embo J **17**(17): 5001-14.

Strumberg, D., A. A. Pilon, et al. (2000). "Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff." Mol Cell Biol **20**(11): 3977-87.

Sudakin, V., G. K. Chan, et al. (2001). "Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2." J Cell Biol **154**(5): 925-36.

Sugimoto, K., T. Urano, et al. (2002). "Molecular dynamics of Aurora-A kinase in living mitotic cells simultaneously visualized with histone H3 and nuclear membrane protein importinalpha." Cell Struct Funct **27**(6): 457-67.

Sumara, I., E. Vorlaufer, et al. (2002). "The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase." Mol Cell **9**(3): 515-25.

Sunkel, C. E. and D. M. Glover (1988). "polo, a mitotic mutant of Drosophila displaying abnormal spindle poles." J Cell Sci **89 (Pt 1)**: 25-38.

Syljuasen, R. G., C. S. Sorensen, et al. (2005). "Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage." Mol Cell Biol **25**(9): 3553-62.

Szumiel, I. (2006). "Epidermal growth factor receptor and DNA double strand break repair: the cell's self-defence." Cell Signal **18**(10): 1537-48.

Taguchi, S., K. Honda, et al. (2002). "Degradation of human Aurora-A protein kinase is mediated by hCdh1." FEBS Lett **519**(1-3): 59-65.

Takagi, M., M. J. Absalon, et al. (2005). "Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin." Cell **123**(1): 49-63.

Takahashi, T., B. Sano, et al. (2003). "Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers." Cancer Sci **94**(2): 148-52.

Takakura, M., S. Kyo, et al. (1999). "Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells." Cancer Res **59**(3): 551-7.

Tanaka, M., A. Ueda, et al. (2002). "Cell-cycle-dependent regulation of human aurora A transcription is mediated by periodic repression of E4TF1." J Biol Chem **277**(12): 10719-26.

Tanaka, T., M. Kimura, et al. (1999). "Centrosomal kinase AIK1 is overexpressed in invasive ductal carcinoma of the breast." Cancer Res **59**(9): 2041-4.

Tanner, M. M., M. Tirkkonen, et al. (1994). "Increased copy number at 20q13 in breast cancer: defining the critical region and exclusion of candidate genes." Cancer Res **54**(16): 4257-60.

Tarapore, P. and K. Fukasawa (2002). "Loss of p53 and centrosome hyperamplification." Oncogene **21**(40): 6234-40.

Tatsuka, M., H. Katayama, et al. (1998). "Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of the aurora- and Ipl1-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells." Cancer Res **58**(21): 4811-6.

Tatsuka, M., S. Sato, et al. (2005). "Overexpression of Aurora-A potentiates HRAS-mediated oncogenic transformation and is implicated in oral carcinogenesis." Oncogene **24**(6): 1122-7.

Taylor, W. R., A. H. Schonthal, et al. (2001). "p130/E2F4 binds to and represses the cdc2 promoter in response to p53." J Biol Chem **276**(3): 1998-2006.

Tepper, C. G., M. F. Seldin, et al. (2000). "Fas-mediated apoptosis of proliferating, transiently growth-arrested, and senescent normal human fibroblasts." Exp Cell Res **260**(1): 9-19.

Terada, Y., M. Tatsuka, et al. (1998). "AIM-1: a mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis." Embo J **17**(3): 667-76.

Terada, Y., Y. Uetake, et al. (2003). "Interaction of Aurora-A and centrosomin at the microtubule-nucleating site in Drosophila and mammalian cells." J Cell Biol **162**(5): 757-63.

Thomas, M., C. E. Finnegan, et al. (2004). "STAT1: a modulator of chemotherapy-induced apoptosis." Cancer Res **64**(22): 8357-64.

Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." Science **281**(5381): 1312-6.

Tibbetts, R. S., K. M. Brumbaugh, et al. (1999). "A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53." Genes Dev **13**(2): 152-7.

Tong, T., Y. Zhong, et al. (2004). "Overexpression of Aurora-A contributes to malignant development of human esophageal squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **10**(21): 7304-10.

Toyoshima-Morimoto, F., E. Taniguchi, et al. (2002). "Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase." EMBO Rep **3**(4): 341-8.

Toyoshima-Morimoto, F., E. Taniguchi, et al. (2001). "Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase." Nature **410**(6825): 215-20.

Trahey, M. and F. McCormick (1987). "A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants." Science **238**(4826): 542-5.

Trimarchi, J. M. and J. A. Lees (2002). "Sibling rivalry in the E2F family." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(1): 11-20.

Tseng, T. C., S. H. Chen, et al. (1998). "Protein kinase profile of sperm and eggs: cloning and characterization of two novel testis-specific protein kinases (AIE1, AIE2) related to yeast and fly chromosome segregation regulators." DNA Cell Biol **17**(10): 823-33.

Tseng, Y. S., C. C. Tzeng, et al. (2006). "Aurora-A overexpression associates with Ha-ras codon-12 mutation and blackfoot disease endemic area in bladder cancer." Cancer Lett **241**(1): 93-101.

Tsukasaki, K., C. W. Miller, et al. (2001). "Mutations in the mitotic check point gene, MAD1L1, in human cancers." Oncogene **20**(25): 3301-5.

Unger, T., T. Juven-Gershon, et al. (1999). "Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2." Embo J **18**(7): 1805-14.

Vafa, O., M. Wade, 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**(5): 1031-44.

Valerie, K. and L. F. Povirk (2003). "Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair." Oncogene **22**(37): 5792-812.

van de Wetering, M., I. Oving, et al. (2003). "Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector." EMBO Rep **4**(6): 609-15.

Vennstrom, B., D. Sheiness, et al. (1982). "Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29." J Virol **42**(3): 773-9.

Vigneron, A., J. Cherier, et al. (2006). "The cell cycle inhibitor p21waf1 binds to the myc and cdc25A promoters upon DNA damage and induces transcriptional repression." J Biol Chem **281**(46): 34742-50.

Vigneron, S., S. Prieto, et al. (2004). "Kinetochore localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom?" Mol Biol Cell **15**(10): 4584-96.

Vincenzi, B., D. Santini, et al. (2006). "New issues on cetuximab mechanism of action in epidermal growth factor receptor-negative colorectal cancer: the role of vascular endothelial growth factor." J Clin Oncol **24**(12): 1957; author reply 1957-8.

Visscher, D. W., T. L. Wallis, et al. (1996). "Evaluation of chromosome aneuploidy in tissue sections of preinvasive breast carcinomas using interphase cytogenetics." Cancer **77**(2): 315-20.

Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." Nat Rev Cancer **2**(7): 489-501.

Vodermaier, H. C. (2004). "APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle." Curr Biol **14**(18): R787-96.

Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (2004). "Cancer genes and the pathways they control." Nat Med **10**(8): 789-99.

Voncken, J. W., H. Niessen, et al. (2005). "MAPKAP kinase 3pK phosphorylates and regulates chromatin association of the polycomb group protein Bmi1." J Biol Chem **280**(7): 5178-87.

Waldman, T., K. W. Kinzler, et al. (1995). "p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells." Cancer Res **55**(22): 5187-90.

Waldman, T., C. Lengauer, et al. (1996). "Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21." Nature **381**(6584): 713-6.

Walter, A. O., W. Seghezzi, et al. (2000). "The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation." Oncogene **19**(42): 4906-16.

Walworth, N., S. Davey, et al. (1993). "Fission yeast chk1 protein kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2." Nature **363**(6427): 368-71.

Wang, J. C. (1996). "DNA topoisomerases." Annu Rev Biochem **65**: 635-92.

Wang, W., J. X. Chen, et al. (2002). "Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence." Mol Cell Biol **22**(10): 3389-403.

Wang, W., X. Yang, et al. (2001). "Loss of HuR is linked to reduced expression of proliferative genes during replicative senescence." Mol Cell Biol **21**(17): 5889-98.

Wang, X., Y. X. Zhou, et al. (2006). "Overexpression of aurora kinase A in mouse mammary epithelium induces genetic instability preceding mammary tumor formation." Oncogene **25**(54): 7148-58.

Waters, C. M., T. D. Littlewood, et al. (1991). "c-myc protein expression in untransformed fibroblasts." Oncogene **6**(5): 797-805.

Weber, J. D., M. L. Kuo, et al. (2000). "Cooperative signals governing ARF-mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex." Mol Cell Biol **20**(7): 2517-28.

Weichert, W., G. Kristiansen, et al. (2005). "Polo-like kinase 1 expression is a prognostic factor in human colon cancer." World J Gastroenterol **11**(36): 5644-50.

Weiss, R. S., S. Matsuoka, et al. (2002). "Hus1 acts upstream of chk1 in a mammalian DNA damage response pathway." Curr Biol **12**(1): 73-7.

White, M. A., C. Nicolette, et al. (1995). "Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation." Cell **80**(4): 533-41.

Willumsen, B. M., A. Christensen, et al. (1984). "The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association." Nature **310**(5978): 583-6.

Wittmann, T., M. Wilm, et al. (2000). "TPX2, A novel xenopus MAP involved in spindle pole organization." J Cell Biol **149**(7): 1405-18.

Wolthuis, R. M. and J. L. Bos (1999). "Ras caught in another affair: the exchange factors for Ral." Curr Opin Genet Dev **9**(1): 112-7.

Wu, C. H., J. van Riggelen, et al. (2007). "Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(32): 13028-33.

Wu, G. S., T. F. Burns, et al. (1997). "KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene." Nat Genet **17**(2): 141-3.

Wu, X., J. H. Bayle, et al. (1993). "The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop." Genes Dev **7**(7A): 1126-32.

Yan, X., L. Cao, et al. (2005). "Aurora C is directly associated with Survivin and required for cytokinesis." Genes Cells **10**(6): 617-26.

Yang, H., C. C. Ou, et al. (2004). "Aurora-A kinase regulates telomerase activity through c-Myc in human ovarian and breast epithelial cells." Cancer Res **64**(2): 463-7.

Yang, J., E. S. Bardes, et al. (1998). "Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1." Genes Dev **12**(14): 2131-43.

Yang, S., C. Kuo, et al. (2002). "PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2." Nat Cell Biol **4**(11): 865-70.

Yang, X. D., X. C. Jia, et al. (2001). "Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy." Crit Rev Oncol Hematol **38**(1): 17-23.

Yarden, R. I., S. Pardo-Reoyo, et al. (2002). "BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage." Nat Genet **30**(3): 285-9.

Ychou, M., J. L. Raoul, et al. (2002). "High-dose, single-agent irinotecan as first-line therapy in the treatment of metastatic colorectal cancer." Cancer Chemother Pharmacol **50**(5): 383-91.

Yin, X. Y., L. Grove, et al. (2001). "Inverse regulation of cyclin B1 by c-Myc and p53 and induction of tetraploidy by cyclin B1 overexpression." Cancer Res **61**(17): 6487-93.

Yokota, J., T. Akiyama, et al. (1988). "Altered expression of the retinoblastoma (RB) gene in small-cell carcinoma of the lung." Oncogene **3**(4): 471-5.

Zeller, K. I., A. G. Jegga, et al. (2003). "An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets." Genome Biol **4**(10): R69.

Zhan, Q., I. Alamo, et al. (1996). "The apoptosis-associated gamma-ray response of BCL-X(L) depends on normal p53 function." Oncogene **13**(10): 2287-93.

Zhan, Q., M. J. Antinore, et al. (1999). "Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45." Oncogene **18**(18): 2892-900.

Zhang, C. X., A. D. Chen, et al. (2000). "Essential functions of DNA topoisomerase I in Drosophila melanogaster." Dev Biol **222**(1): 27-40.

Zhang, D., T. Hirota, et al. (2004). "Cre-loxP-controlled periodic Aurora-A overexpression induces mitotic abnormalities and hyperplasia in mammary glands of mouse models." Oncogene **23**(54): 8720-30.

Zhang, R., W. Chen, et al. (2007). "Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci." Mol Cell Biol **27**(6): 2343-58.

Zhao, H., R. Nakajima, et al. (2004). "Region 752-761 of STAT3 is critical for SRC-1 recruitment and Ser727 phosphorylation." Biochem Biophys Res Commun **325**(2): 541-8.

Zhao, R., K. Gish, et al. (2000). "Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays." Genes Dev **14**(8): 981-93.

Zheng, Y., M. L. Wong, et al. (1995). "Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex." Nature **378**(6557): 578-83.

Zhivotovsky, B. and G. Kroemer (2004). "Apoptosis and genomic instability." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(9): 752-62.

Zhong, Z., Z. Wen, et al. (1994). "Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6." Science **264**(5155): 95-8.

Zhou, B. B. and J. Bartek (2004). "Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection." Nat Rev Cancer **4**(3): 216-25.

Zhou, H., J. Kuang, et al. (1998). "Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation." Nat Genet **20**(2): 189-93.

Zindy, F., C. M. Eischen, et al. (1998). "Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization." Genes Dev **12**(15): 2424-33.

Zou, L., D. Cortez, et al. (2002). "Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin." Genes Dev **16**(2): 198-208.

Zou, L. and S. J. Elledge (2003). "Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes." Science **300**(5625): 1542-8.

Zupanska, A., A. Adach, et al. (2007). "Alternative pathway of transcriptional induction of p21WAF1/Cip1 by cyclosporine A in p53-deficient human glioblastoma cells." Cell Signal **19**(6): 1268-78.

Résumé :

La progression des cellules à travers le cycle cellulaire et la mitose est assurée par l'apparition séquentielle de différentes protéines comme les cyclines mais également les kinases mitotiques. L'entrée en mitose se caractérise par l'augmentation d'expression de la kinase Aurora A. Cette kinase participe à la régulation de la transition G2/M ainsi qu'au cycle des centrosomes et à la mise en place du fuseau mitotique, permettant la séparation des chromosomes. Sa dérégulation semble être impliquée dans la tumorogenèse. Sa surexpression est en effet très fréquemment retrouvée dans différentes tumeurs humaines et semble diminuer la mort cellulaire induite normalement par les traitements anticancéreux. Cette surexpression s'accompagne également d'une amplification du nombre des centrosomes associée à une instabilité chromosomique.

Nous avons caractérisé l'effet du sn38, métabolite actif de l'irinotecan utilisé dans le traitement du cancer colorectal sur la kinase Aurora A et sur sa régulation transcriptionnelle. En absence de traitement, le facteur de transcription c-myc se lie au promoteur d'Aurora A et l'active. Cependant, le traitement des cellules avec du sn38 induit l'inhibition de c-myc et son absence du promoteur d'Aurora A. Cet effet s'accompagne d'une inhibition des événements transcriptionnels régulant normalement l'expression de ce gène. Ce traitement entraîne finalement une absence de séparation des centrosomes, un blocage des cellules en phase G2 du cycle cellulaire et l'induction du processus de sénescence. Nous avons également étudié l'effet de l'oncogène Ras sur la kinase Aurora A. Cet oncogène induit également une accumulation des cellules en phase G2 du cycle cellulaire et le déclenchement du processus de sénescence, l'ensemble étant du à l'activation de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21waf1. Comme pour le sn38, l'expression de cet oncogène induit une diminution d'expression de l'ARNm et de la protéine Aurora A. Cet effet ne s'explique pas par une diminution du recrutement de c-myc mais plutôt par une modulation de l'activité de ses cofacteurs transcriptionnels.

En résumé, nos résultats indiquent que la kinase Aurora A est une cible à la fois des traitements de chimiothérapie et des mécanismes de contrôles oncogéniques. Le blocage de son expression constitue certainement une protection contre le développement tumoral.

Spécialité :

Biologie cellulaire et moléculaire

Mots clés:

Aurora A, c-myc, dommages de l'ADN, régulation transcriptionnelle, résistance aux traitements.

Julia CHERIER
U892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes Angers
Centre Régional de Lutte Contre de Cancer, Paul PAPIN
2 rue Moll
49933 ANGERS cedex 09