



**HAL**  
open science

# Oncogène RAS et Cancer Colorectal : Étude de la Réponse au Stress Oncogénique et de l'Échappement à la Sénescence

Sophie de Carné Trécesson

► **To cite this version:**

Sophie de Carné Trécesson. Oncogène RAS et Cancer Colorectal : Étude de la Réponse au Stress Oncogénique et de l'Échappement à la Sénescence. Biologie cellulaire. Université d'Angers, 2010. Français. NNT: . tel-00588008

**HAL Id: tel-00588008**

**<https://theses.hal.science/tel-00588008>**

Submitted on 22 Apr 2011

**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.

**ONCOGÈNE RAS ET CANCER COLORECTAL : ÉTUDE DE LA RÉPONSE AU STRESS  
ONCOGÉNIQUE ET DE L'ÉCHAPPEMENT À LA SÉNESCENCE**

**THÈSE DE DOCTORAT**

SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE CELLULAIRE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ NANTES ANGERS

Présentée et soutenue publiquement

le 15 novembre 2010

à Angers

par **Sophie de Carné Trécesson**

Devant le jury ci-dessous :

**Brigitte Sola**, rapporteur, Directrice de Recherche CNRS, Caen

**Corinne Abbadie**, rapporteur, Professeur des Universités, Lille

**Erick Gamelin**, examinateur, Professeur des Universités, Angers

**Philippe Juin**, examinateur, Directeur de Recherche INSERM, Nantes

**Olivier Coqueret**, directeur de thèse, Professeur des Universités, Angers

Directeur de thèse : Pr Olivier Coqueret

INSERM U892

Centre de Lutte Contre le Cancer Paul Papin

2 rue Moll

49933 Angers cedex 09



# REMERCIEMENTS

Pour commencer, je tiens à remercier les Professeurs Erick Gamelin et Olivier Coqueret de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire, et particulièrement le Professeur Olivier Coqueret de m'avoir permis de réaliser cette étude.

Je remercie également le Professeur François Régis Bataille, actuel directeur du Centre Paul Papin où j'ai pu réaliser ces travaux.

Je tiens à remercier le Professeur Corinne Abbadie ainsi que le Docteur Brigitte Sola d'avoir accepté, en tant que rapporteurs, de consacrer une partie de leur temps à examiner ce travail. Leurs conseils m'ont permis de considérablement enrichir ce manuscrit. Je les remercie également pour leurs encouragements.

Merci au Professeur Erick Gamelin d'avoir accepté de siéger à ce jury et d'avoir bien voulu examiner cette thèse. Je le remercie aussi d'avoir consacré de son temps en venant participer aux réunions de laboratoire organisées lorsqu'il était directeur du Centre Paul Papin. Sa passion pour la recherche et l'intérêt qu'il a porté à notre travail ont, pour moi, été très encourageants.

Je remercie également le Docteur Philippe Juin d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'examiner cette thèse. Je lui suis reconnaissante d'avoir suivi mon travail au cours de ces trois années de thèse. Les discussions que nous avons eues ont été très enrichissantes.

Mes plus respectueux remerciements vont à mon directeur de thèse, le Professeur Olivier Coqueret, pour m'avoir accueillie dans son équipe et pour m'avoir fait confiance. Je le remercie de m'avoir guidée tout au long de ce travail et d'avoir été aussi disponible. Je crois savoir que ses cours donnés à l'université d'Angers ont été le moteur de nombreuses vocations, dont la mienne.

Mes remerciements s'adressent également au Docteur Catherine Guette. Les biologistes étant parfois de piètres chimistes, ses conseils m'ont souvent été bien utiles. Merci à elle pour sa grande sympathie.

Un grand merci à Ben, ou devrais-je dire au Docteur Benjamin Barré, pour son soutien et ses nombreux conseils durant cette dernière année de thèse. Merci à lui pour le temps consacré à me guider dans la recherche de postdoc, ainsi que pour être venu pendant ses vacances, m'écouter parler anglais !

Merci également au Professeur Alain Morel et au Docteur Michèle Boisdrion pour ce qu'ils m'ont apporté au cours de ces trois années de thèse.

Je remercie le Docteur Agnès Chassevent ainsi que Cécile et Denise pour leur disponibilité et leur sympathie.

J'adresse également des remerciements à mes copines de laboratoire, devenues bien plus aujourd'hui. Merci à Agnès d'avoir été la première personne à m'accueillir au labo (je me rappelle mon premier jour au CPP). Merci pour les soirées bohèmes angevines et les *skypéro*<sup>1</sup> depuis que tu as quitté Angers (prolongés tard dans la nuit maintenant que nous ne vivons plus sur le même fuseau horaire). Pressée de recommencer, à Washington DC ou ailleurs. Merci ma Chacha, d'avoir été là tout le temps pour me soutenir et m'encourager. Merci pour toutes tes *choubidouseries* et pour ce qui te motive à t'agiter en ce moment... Je crois savoir que tu manigances bien des choses !

Merci aussi à toute l'équipe de recherche du 4<sup>e</sup>. Les nouvelles arrivées, Laurence et Zaza, qui ont incontestablement égayé l'ambiance du *bureau des étudiants en thèse* (si tant est qu'il eût fallu l'égayer...). Merci à toutes les deux pour leur précieuse aide à tous les niveaux. Merci à Alice, et vive la protéomique ! Merci aux autres thésards, tous dans le même bateau, euh... Non, bureau ! À Andreea, Sandy et Émilie, qui ont déjà presque quitté le labo. À Anthony, cher acolyte, merci d'être venu apporter une touche de testostérone à ce labo très féminin et d'avoir supporté mon envahissement, tant à la paillasse qu'au bureau... Merci pour ton soutien, pour les pense-bêtes... Sans toi je ne serais toujours pas réinscrite en 2<sup>e</sup> année de thèse ! Merci à Hélène, et courage à elle pour la dernière année. Merci aussi pour les soirées à la Cale cet été, joyeuses pauses pendant la rédaction de ce manuscrit.

---

<sup>1</sup> Vidéoconférences améliorées

Merci aux nouveaux arrivants du bureau des thésards, Audrey qui commence déjà à vouloir mettre du NF- $\kappa$ B partout, et Damien, la relève en protéomique.

Merci aussi à Sory, notre docteur en statistiques, avec qui j'ai souvent aimé philosopher à des heures tardives au laboratoire, et grâce à qui j'ai appris qu'à la mode malienne les Docksides se portaient avec un costume...

Merci à mes 'relecteurs', aussi nombreux soient ils, en particulier à Zaza qui connaît maintenant pratiquement toute ma thèse !

J'aimerais saluer les participants d'une soirée dont je garde un excellent souvenir. Émilie, Sandy, Laurent, Chacha et Audrey, j'ai été terriblement et agréablement surprise par le grain de folie qui, une soirée de l'été 2009, vous a conduit jusqu'à cette fameuse Chaumière à 300 km d'ici.

Merci aux anciens et à ceux de passage. Je tiens à remercier Amélie pour ses encouragements et son soutien. Je salue son parcours sans faute ! Merci également aux trois médecins, Pierre, Paule et Steph dont le passage au laboratoire a été plus qu'enrichissant. Je n'oublierai pas la période où vous étiez tous les quatre au laboratoire, ni les soirées passées ensemble. Clin d'œil à Laurent avec qui j'ai commencé au labo du CPP en Master 2. Bon courage à toi pour la suite. Et merci à Aude-Hélène, (encore un médecin !) pour ses explications vraiment claires et très détaillées sur l'histologie du cancer colorectal.

Je pense aussi à Arnaud, Julia, Marie-Laure ainsi qu'à l'équipe de Monteclair, pour tout ce qu'ils m'ont apportée tant au niveau scientifique que pour leur amitié. Une pensée en particulier pour Dorothée, Isa et Simon qui, patiemment, ont supporté mes débuts à la paillasse. Mais je songe aussi à Céline, Gersende, Émilie et Chacha (au masculin) dont la sympathie m'a été très agréable.

Merci à Tom, pour la manip de dernière minute, imaginée sur un coin de table entre deux bières... Et qui marche en plus ! C'est beau la science quand ça se passe comme ça ☺

Je remercie également Yannis Guillemin. Agréable rencontre il y a quelques mois, qui a permis une jolie collaboration. Merci pour ton dynamisme contagieux. Merci également à Fabien Gautier, pour les échanges de types cellulaire et autre matériel de labo.

J'adresse mes sincères remerciements aux salariés du Centre Paul Pain et notamment, aux membres de l'équipe d'oncopharmacologie. Marie-Claire, Catherine, Luc, Sabrina, Adélaïde, Julie et Vincent, merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse au quotidien. Je garderai un excellent souvenir de ces années passées à travailler dans un même laboratoire. Merci pour les nombreuses parties de rigolades, les pauses-café très animées, les délicieux gâteaux et tout le reste. Une petite dédicace particulière à Marie-Claire – diplomate reconnue dans notre équipe – qui a toujours réussi à satisfaire les besoins *des jeunes du 4<sup>e</sup>* !

Merci à Bruno, informaticien de génie, sans qui nous resterions totalement désemparés face aux nombreux – et presque quotidiens – *bugs* de cette merveilleuse machine qu'est le PC. Je le remercie aussi de m'avoir gentiment prêté main-forte pour l'impression de cette thèse.

J'adresse de tendres remerciements à ma famille. Mes parents, *Mimi & Olive*, qui ont toujours su m'encourager. Je vous remercie sincèrement de toute l'aide que vous m'avez apportée durant ces huit années d'études. Je remercie également mes grands-parents de m'avoir encouragée et soutenue. Merci à mes oncles et tantes, Michu, Flo. Merci à Blandine pour toute sa gentillesse. Merci à ma ribambelle de cousines et cousins, parmi lesquels il me semble qu'il y en a un qui aimerait se retrouver à ma place dans quelques années... Merci à ma petite sœur Anne. Ma Nanouk, je n'aurais pas cru que ces dernières années auraient été celles qui nous rapprocheraient tant. Merci d'avoir été là, nous nous retrouverons dans l'hémisphère sud, l'année prochaine.

Merci à ma *presque* famille, Michèle, Richard, Céline, Erwann, Camille et Briac.

Merci à mes amis Bretons : Meuh, ma grande copine chérie, et Bego, Greg, merci pour le soutien-tchat-gmail ces dernières semaines, et Soph, merci à Flo, le bac ça date..., à Ced et Claire, jeunes mariés, à Mère-Grand, chez qui on a fait les 400 coups, à Tom, vive la Chaum (et le reste aussi), à Zib, Cool, Gex, puis à Vince et Gio, parce qu'après tout, j'ai envie. Merci à Romain J, pour les escales angevines sur la route du vin, à Perrine et Martin, sans doute les plus vieux, à Antoine et Maxime, les deux font la paire, à Baptiste, vive Photoshop, à Cake, sans qui personne ne serait arrivé à Lisboa, à Guigui, le bel Italien métamorphosé la nuit tombée, à Charly. Merci à tous ceux rencontrés lors de mon

‘deuxième’ métier. Mary, Marianne, sans oublier Jaja, une belle brochette et beaucoup, vraiment beaucoup d’excellents souvenirs. Merci à Pascal, Mimic, Greg, Gildas et à tous ces furieux de saisonniers !

Merci aussi aux Angevins : Matt, Alex, Rémi et encore Meuh parce que mieux vaut deux fois qu’une ! Mon ordinateur déborde de photos de cette époque où nous étions inséparables. Merci aussi à Clem, Lionel, Riton, Ben d’en face et Ben Chimie.

Merci à l’équipe *des gars de médecine (et des filles aussi)*, pour tous les bons moments passés ensemble. Je pense particulièrement à Romain, merci d’être là. Merci à Marlon, Wlad, Franchi, Greg, Mat et Amélie, Solène (ma petite voisine qui a supporté Joplin, à fond, à 4 h du matin, souvent..), Arthur, Clairon et Alexis, et puisqu’on dévie de la médecine, merci au Dublin’s et à ses charmants barman/maid de nous servir de la Guinness bien fraîche en toute occasion !

Finalement, merci à toi mon Benoit d’avoir merveilleusement bien accompagné et supporté cette fin de thèse. Il n’est pas toujours facile d’attendre, merci de ta patience.

# TABLE DES MATIÈRES

## ABRÉVIATIONS

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

<b>I : MODÈLE D'ÉTUDE, LE CANCER COLORECTAL</b>	<b>17</b>
<b>Organisation fonctionnelle des cryptes du colon</b>	<b>17</b>
Les cryptes de Lieberkühn	17
La voie Wnt- $\beta$ -caténine	18
<b>Instabilités génomiques dans le cancer colorectal</b>	<b>19</b>
<b>II : MÉCANISMES GÉNÉRAUX DE LA TUMORIGENÈSE</b>	<b>21</b>
<b>Initiation de la tumorigenèse</b>	<b>21</b>
Les oncogènes, définition et historique	22
Oncogènes et cycle cellulaire	23
Mutation sur les proto-oncogènes	24
<b>L'instabilité génomique</b>	<b>25</b>
Cassures de l'ADN liées à la réplication	26
Instabilité génomique acquise lors de la mitose	29
Autres types de cassures de l'ADN	33
<b>Echappement aux mécanismes suppresseurs de tumeur</b>	<b>36</b>
Les gènes suppresseurs de tumeur, définition et historique	36
Le gène suppresseur de tumeur p53	38
Mise en évidence du rôle de p53 comme suppresseur de tumeur	38
Régulation de p53	39
p53 et arrêt du cycle cellulaire	40
p53 et apoptose	40
Le suppresseur de tumeur p21Waf1	41
p21Waf1 et régulation du cycle cellulaire	42
p21Waf1 et régulation de la transcription	43
p21Waf1 et modulation de l'apoptose	43
p21Waf1 et réparation de l'ADN	44
Choix entre apoptose et arrêt du cycle cellulaire	46
La voie de p38 MAP Kinases	46
Implication de p38 dans l'arrêt du cycle cellulaire	47
Mutation sur les gènes suppresseurs de tumeur	48
<b>III : LA SÉNESCENCE CELLULAIRE</b>	<b>50</b>
<b>Signature des cellules sénescents</b>	<b>50</b>
<b>Réponse aux dommages de l'ADN et sénescence</b>	<b>51</b>
<b>La sénescence induite par l'oncogène</b>	<b>52</b>
Le phénotype sécrétoire associé à la sénescence	53
Sénescence et autophagie	55
<b>IV : L'ONCOGÈNE RAS</b>	<b>56</b>
<b>La protéine Ras, généralités</b>	<b>56</b>

Fonctionnement et activation de Ras _____	56
Les différentes isoformes de Ras _____	56
<b>Rôle de Ras dans la tumorigenèse _____</b>	<b>57</b>
Activation de la voie de Ras dans le cancer _____	58
Mécanismes de réponse au stress oncogénique induit par Ras _____	60
Détection de l'expression oncogénique de Ras _____	60
Sénescence induite par Ras et p16Ink4a _____	60
Sénescence induite par Ras et cassures de l'ADN _____	61
Sénescence induite par Ras et radicaux libres _____	61
Induction de la sénescence indépendante de p53 _____	63
Échappement à la sénescence et inactivation de p21Waf1 _____	65
<b>V : MÉCANISMES DE LA TRANSITION ÉPITHÉLIO-MÉSENCHYMATEUSE _____</b>	<b>68</b>
<b>Rôle de l'EMT dans le développement embryonnaire, mécanismes généraux _____</b>	<b>69</b>
Le premier événement morphogénétique : la formation du trophoctoderme _____	70
L'adhésion cellulaire _____	70
La polarisation cellulaire _____	71
Acquisition des fonctions de l'épithélium _____	71
L'EMT, une deuxième transition nécessaire au développement _____	72
Régulation moléculaire de l'EMT _____	72
<b>Rôle de l'EMT dans la tumorigenèse _____</b>	<b>75</b>
L'EMT induit le processus métastatique _____	75
Implication de l'EMT dans la transformation initiale et la régulation de la sénescence _____	76
<b>Implication de la protéine Notch dans l'EMT _____</b>	<b>79</b>
Les protéines Notch _____	79
Historique et description _____	79
Activation de la voie de Notch _____	80
Fonctions de Notch _____	81
Maintenance de l'état non différencié _____	81
Décision du destin cellulaire _____	81
Différenciation terminale _____	82
Fonction oncogéniques de Notch _____	83
<b>L'EMT confère des propriétés de cellules souches _____</b>	<b>84</b>
Cellules souches et agressivité tumorale _____	85
Origine des cellules tumorales _____	86
Implication de p21Waf1 dans le maintien des caractéristiques de cellules souches _____	87
<b>VI : BUT DU TRAVAIL _____</b>	<b>89</b>
<b><u>RÉSULTATS</u></b>	
<b>I : RAS INDUIT L'ÉCHAPPEMENT À LA SÉNESCENCE _____</b>	<b>92</b>
<b>La surexpression de H-RasV12 induit l'entrée en sénescence et l'arrêt du cycle cellulaire dans les HT29 _____</b>	<b>92</b>
<b>H-RasV12 induit l'expression et la stabilisation de p21Waf1 indépendamment de p53 _____</b>	<b>98</b>
Induction de l'expression de p21Waf1 en réponse à l'oncogène H-RasV12 _____	98
Stabilisation de p21Waf1 par la voie de réponse aux dommages de l'ADN _____	103
<b>p21Waf1 régule l'expression des gènes du cycle cellulaire _____</b>	<b>107</b>

<b>Une population cellulaire échappe à l'arrêt du cycle cellulaire</b>	<b>110</b>
Rétablissement de l'expression des gènes du cycle cellulaire dans les cellules ayant échappé à l'arrêt du cycle cellulaire induit par Ras	112
Perte de l'expression de p21Waf1 dans les cellules ayant échappé à l'arrêt du cycle cellulaire induit par Ras	112
<b>II : RAS INDUIT L'EMT</b>	<b>114</b>
<b>Les cellules ayant échappé au stress oncogénique adoptent un phénotype de cellules invasives</b>	<b>114</b>
Instabilité génomique et invasion	114
Apparition d'un phénotype de cellules mésenchymateuses	117
Apparition d'un phénotype de cellules souches	119
<b>Implication de la voie Jag1/Notch3 dans l'échappement</b>	<b>120</b>
<b>III : L'ÉCHAPPEMENT À L'OIS INDUIT PAR P21WAF1 CONDUIT À LA DÉDIFFÉRENCIATION CELLULAIRE ET À LA DÉPENDANCE AUX PROTÉINES ANTI-APOPTOTIQUES BCL-XL ET MCL1</b>	<b>124</b>
<b><u>DISCUSSION</u></b>	
<b>I : ONCOGÈNE RAS ET SÉNESCENCE</b>	<b>145</b>
L'oncogène Ras induit l'entrée en sénescence	145
Ras induit l'expression de p21Waf1	145
Certaines cellules échappent à la sénescence induite par Ras	148
<b>II : ONCOGÈNE RAS ET EMT</b>	<b>151</b>
L'EMT nécessiterait la perte de p21Waf1	152
Ras induit l'EMT	153
Implication de la voie Notch3/Jag1 dans l'EMT	154
L'EMT permet l'échappement à l'OIS	155
<b><u>TRAVAUX SUPPLÉMENTAIRES : LES THÉRAPIES ANTI-TUMORALES, RÉPONSES ET ÉCHAPPEMENT</u></b>	
<b>I : INTRODUCTION</b>	<b>158</b>
<b>II : CDK5 PHOSPHORYLE STAT3 SUR SA SÉRINE 727 POUR ACTIVER LES MÉCANISMES DE RÉPARATION DE L'ADN</b>	<b>159</b>
<b>III : DISCUSSION</b>	<b>175</b>
<b><u>CONCLUSION GÉNÉRALE</u></b>	
<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b>	
<b><u>ANNEXES</u></b>	
<b>I : MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>	<b>217</b>
Lignée cellulaire et traitements	217

Transfection des siRNA _____	217
<b>Analyse des promoteurs de gènes du cycle cellulaire _____</b>	<b>218</b>
Test de gène rapporteur _____	218
ImmunoPrécipitation de Chromatine ou ChIP _____	218
<b>Test de survie et de prolifération cellulaire _____</b>	<b>219</b>
Test MTT _____	219
Test de sénescence par coloration de la $\beta$ -Galactosidase _____	220
<b>Western Blot _____</b>	<b>220</b>
<b>Analyse de l'expression des gènes du cycle cellulaire par PCR quantitative en temps réel _____</b>	<b>221</b>
Transcription inverse _____	221
PCR quantitative en temps réel _____	221
<b>Estimation du caractère invasif des cellules _____</b>	<b>222</b>
Analyse de l'expression de la phosphorylation de H2Ax et des marqueurs CD138, CD24 et CD44 par cytométrie en flux _____	222
Sphéroïdes _____	223
<b>Étude des marqueurs de l'EMT _____</b>	<b>223</b>
PCR quantitative en temps réel _____	223
Western Blot _____	224
<b>II : COMMENTAIRES DE L'ARTICLE EN RÉVISION _____</b>	<b>225</b>
<b>Reviewer 1 _____</b>	<b>225</b>
Comments for the authors _____	225
Major Points _____	225
Minor Points _____	226
<b>Reviewer 2 _____</b>	<b>226</b>
Comments for the authors: _____	226
Major Points _____	227

## ABRÉVIATIONS

## Abréviations

<b>5-FU</b>	5 FluoroUracile	<b>CKI</b>	Casein Kinase I
<b>ABC</b>	ATP Binding Cassette	<b>CoIP</b>	CoImmunoPrecipitation
<b>ADAM</b>	A Desintegrin And Metalloproteinase	<b>CpG</b>	séquence riche en C et G
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique	<b>CRL4</b>	DTL Denticleless homolog
<b>ADNc</b>	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire	<b>Csk</b>	C-src tyrosine kinase
<b>Akt</b>	PKB protéine kinase B	<b>CSL</b>	CBF1/Su(H)/Lag2
<b>AP1/2</b>	Activator Protein 1/2	<b>CTD</b>	Carboxyl Terminal Domain
<b>APC</b>	Adenomatous Polyposis Coli	<b>CXCR2</b>	CXC Chemokine Receptor
<b>APC/C</b>	Anaphase Promoting Complex/Cyclosome	<b>DAPI</b>	4',6'-diamidino-2-phénylindole
<b>APH</b>	Aphidicoline	<b>DLBCL</b>	Diffuse Large B-Cell Lymphoma
<b>ARF</b>	Alternate Reading Frame	<b>DLBCL</b>	Diffuse Large B-Cell Lymphoma
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique	<b>DLL/K</b>	Delta-Like Ligand
<b>ARNm</b>	Acide RiboNucléique messenger	<b>DNAPK</b>	DNA activated Protein Kinase
<b>ASK1</b>	Apoptosis Signal Kinase 1	<b>DPD</b>	Dihydropyrimidine Dehydrogenase
<b>ASK1</b>	Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1	<b>E-Cad</b>	Epithelial Cadherin
<b>ATF2</b>	Activating Transcription Factor 2	<b>E2F</b>	E2 promoter binding Factor
<b>ATG</b>	AutoPhaGy	<b>EA1</b>	Early region 1A
<b>ATM</b>	Ataxia Telangiectasia Mutated	<b>ECL</b>	Enhanced Chemiluminescence
<b>ATR</b>	ATM and Rad3-related	<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>Bax</b>	BCL2-associated X protein	<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor Receptor
<b>Bcl-Xl</b>	B-cell lymphoma-extra large	<b>ELK1</b>	ETS-like gene 1
<b>BCL6</b>	B-Cell Lymphoma 6	<b>EMT</b>	Epithelial-Mesenchymal Transition
<b>BER</b>	Base Excision Repair	<b>ErbB2</b>	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
<b>Bmi1</b>	B lymphoma Mo-MLV Insertion region 1	<b>Erk</b>	Extracellular signal Related Kinase
<b>BMP</b>	Bone Morphogenetic Protein	<b>Ets</b>	v-Ets erythroblastosis virus E26 oncogene homologue
<b>BSA</b>	Bovin Serum Albumin	<b>Fas</b>	Apoptosis Stimulating Fragment
<b>Btg2</b>	B-cell Translocation Gene 2	<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor
<b>Bub1</b>	Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1	<b>FGFR</b>	Fibroblast Growth Factor Receptor
<b>C-Ter</b>	C-Terminal	<b>FoxO3a</b>	Forkhead box O3
<b>C/EBP</b>	CCAAT/Enhancer Binding Protein	<b>Gadd45</b>	Growth Arrest and DNA-Damage-inducible 45
<b>CBP</b>	CREB Binding Protein	<b>Gal4</b>	Galactoside-binding 4
<b>Cdc25</b>	Cell Division Cycle 25	<b>GAP</b>	GTPase accelerating protein
<b>Cdc6</b>	Cell Division Cycle 6	<b>GAX</b>	MEOX2 Mesenchyme Homeobox
<b>Cdk</b>	Cyclin Dependant Kinase	<b>GDP</b>	Guanosine Diphosphate
<b>Cdt1</b>	Chromatin licensing and DNA replication factor 1	<b>GEF</b>	guanine nucleotide exchange factor
<b>Cdx2</b>	Caudal Type Homeobox 2	<b>Grb2</b>	Growth factor receptor-bound protein 2
<b>ChIP</b>	Chromatin ImmunoPrécipitation	<b>GSK3β</b>	Glycogen Synthase Kinase 3 beta
<b>Chk1/2</b>	Checkpoint Kinase 1/2	<b>GTP</b>	Guanosine Triphosphate
<b>CIN</b>	Chromosomal Instability	<b>HDAC</b>	Histone Deacetylase
<b>Cip1</b>	Cdk Interacting Protein 1	<b>HDM2</b>	Human Double Minute 2
		<b>Hes</b>	Hairy and Enhancer-of-Split protein

## Abréviations

<b>HEY</b>	Hairy/Enhancer-of-split related with YRPW motif	<b>Myc</b>	Myelocytomatosis
<b>HGFR</b>	Hepatocyte Growth Factor Receptor	<b>MYOD1</b>	Myogenic Differentiation 1
<b>HOXA10</b>	Homeobox protein Hox-A10	<b>N-Ter</b>	N-Terminal
<b>HP1</b>	Heterochromatin Protein 1	<b>NADPH</b>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
<b>Hsp</b>	Heat shock proteins	<b>NBS1</b>	Nijmegen Breakage Syndrome 1
<b>Id4</b>	Inhibitor of DNA binding 4	<b>NER</b>	Nucleotide Excision Repair
<b>IL</b>	InterLeukin	<b>NeuroD1</b>	Neurogenic Differentiation 1
<b>Ink4</b>	Inhibitory cyclin associated kinase 4	<b>NF-1</b>	Nuclear Factor 1
<b>JNK</b>	c-Jun-N-terminale Kinase	<b>NF-Y</b>	Nuclear Factor-Y
<b>Kip</b>	Kinase inhibitor protein 1	<b>Nf1</b>	Neurofibromatosis type 1
<b>Klf</b>	Krüppel-like transcription factor	<b>NHEJ</b>	Non Homologous End-Joining
<b>LRP</b>	Low-density lipoprotein receptor-related	<b>NICD</b>	Notch IntraCellular Domain
<b>Mad2</b>	Mitotic arrest deficient-like	<b>NLS</b>	Nuclear Localisation Sequence
<b>MAPK</b>	Mitotogen Activated Protein Kinase	<b>nNOS</b>	neuronal Nitric Oxyde Synthase
<b>Max</b>	Myc-associated factor X	<b>Nox1</b>	Nadph Oxidase 1
<b>MCC</b>	Mitotic Checkpoint Complex	<b>OIS</b>	Oncogene-Induced Senescence
<b>Mcl1</b>	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	<b>ORC</b>	Origin Replication Complex
<b>MCM</b>	Mini Chromosome Maintenance	<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Salin
<b>MDM2</b>	Murin Double Minute 2	<b>PCNA</b>	Proliferating Cell Nuclear Antigen
<b>MEF2</b>	Myocyte Enhancer Factor-2	<b>PDGFR</b>	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
<b>Mek</b>	Mitogen-activated protein kinase	<b>PDK1</b>	3-Phosphoinositide Dependent protein Kinase-1
<b>Met</b>	Hepatocyte Growth Factor Receptor	<b>PI3K</b>	Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
<b>MET</b>	Mesenchymal-Epithelial Transition	<b>PIP</b>	PhosphatidylInositol Phosphate
<b>miARN</b>	Micro ARN	<b>PKC</b>	Protein Kinase C
<b>MIN</b>	Microsatellite Instability	<b>Plk1</b>	Polo-Like Kinase
<b>Mirk</b>	minibrain-related kinase	<b>PML</b>	Promyelocytic Leukemia gene
<b>MK2</b>	MAPK-activated protein Kinase-2	<b>PMS2</b>	PostMeiotic Segregation increased 2
<b>MLH</b>	MutL Homolog	<b>PTEN</b>	Phosphatase and TENsin homolog
<b>MMP</b>	Metalloproteinase	<b>Rac</b>	Ras-related C3 botulinum toxin
<b>MMR</b>	MisMatch Repair	<b>RalGDS</b>	Ral Guanine nucleotide Dissociation Stimulator
<b>MNK1/2</b>	Menkes protein	<b>RAS</b>	Rat Sarcoma (K kirsten) (H Harvey)
<b>MRE</b>	Mismatch Repair Endonuclease	<b>RasL</b>	Ras induction Longue
<b>MRN</b>	MRE-Rad50-NBS1	<b>Rb</b>	Retinoblastoma
<b>MRP1</b>	Multidrug Resistance Protein	<b>RBPJ<math>\alpha</math></b>	Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin kappa J region
<b>MSH2</b>	MutS Homolog 2	<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>MSK1</b>	Mitogen- and Stress-activated protein Kinase	<b>RSV</b>	Rous Sarcoma Virus
<b>mTOR</b>	mammalian Target Of Rapamycin	<b>SAHF</b>	Senescence-Associated Heterochromatin Foci
<b>MTT</b>	bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium	<b>SAPK</b>	Stress-Activated Protein Kinases

## Abréviations

<b>SASP</b>	Senescence-Associated Secretory Phenotype
<b>SCF</b>	Stem Cell Factor
<b>Sip1</b>	Survival of motor neuron protein interacting protein 1
<b>SIPS</b>	Stress-Induced Premature Senescence
<b>siRNA</b>	small interfering Ribonucleic Acid
<b>sn38</b>	7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin
<b>SOS</b>	Son Of Sevenless
<b>SP1/2/3</b>	Specificity Protein
<b>SRB</b>	Sulforhodamine B
<b>Src</b>	Sarcoma
<b>STAT</b>	Signal Transducer and Activator of Transcription
<b>SUMO</b>	Small Ubiquitin-related MODifier
<b>SV40T</b>	Simian Vacuolating Virus 40 Tag
<b>TBS</b>	Tris Buffer Salin
<b>Tcf/Lef</b>	T-cell factor/Lymphoid enhancer factor
<b>TERT</b>	TElomerase Reverse Transcriptase
<b>TGF</b>	Transforming Growth Factor
<b>TMPRSS4</b>	Transmembrane Protease Serine 4
<b>TP53</b>	Tumor Protein 53
<b>TRF</b>	TTAGGG Repeat Binding Factor
<b>UV</b>	Ultra Violet
<b>VEGFR</b>	V-Ets erythroblastosis virus E26 oncogene homologue
<b>Wisp39</b>	Waf1/Cip1 stabilizing protein 39
<b>Wnt</b>	Wingless-type MMTV integration site
<b>Zeb</b>	Zinc-Finger enhancer binding
<b>ZO-1</b>	Zona Occludens protein 1

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

# Chapitre I : Modèle d'étude, le cancer colorectal

Chaque année dans le monde, près d'un million de personnes développent un cancer colorectal et environ 655 000 personnes décèdent des suites de ce cancer. Ces données en font la seconde cause de décès due au cancer dans le monde (Jemal *et al.*, 2006). Environ 15 % des tumeurs colorectales se développent chez des personnes au terrain génétique favorable ou ayant eu une maladie inflammatoire des intestins. Les tumeurs se développant chez les personnes sans prédisposition sont dit sporadiques et représentent 85 % des tumeurs colorectales. Les tumeurs peuvent être de deux types, MIN ou CIN et les différences génomiques qui existent entre ces deux types d'instabilités sont utilisées comme marqueurs prédictifs ou pronostics dans le diagnostic du cancer.

L'épithélium intestinal est composé de cellules capables de proliférer de manière rapide et perpétuelle. Ainsi, l'épithélium est en constant renouvellement. Selon le modèle des cellules souches cancéreuses, les tumeurs malignes seraient issues d'une petite population de cellules cancéreuses capables d'auto-renouvellement et de pluripotentialité et capables de l'initiation et du maintien de la croissance tumorale (Boman & Wicha, 2008).

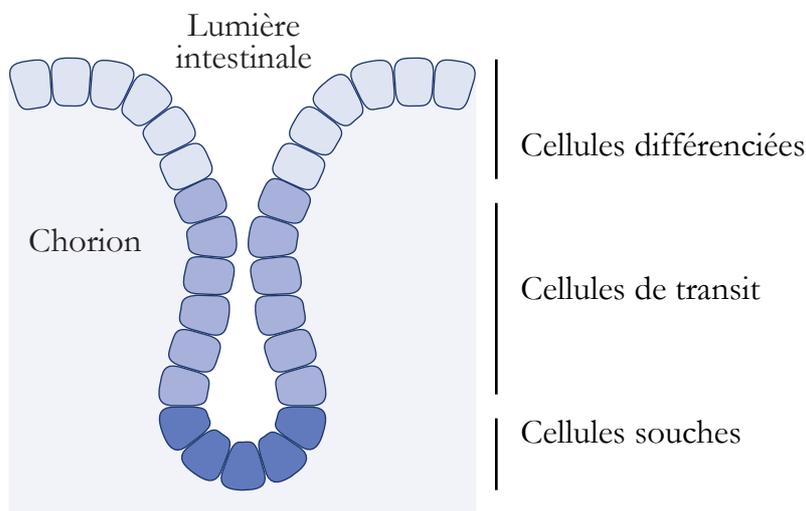
## A. Organisation fonctionnelle des cryptes du colon

La muqueuse du colon est organisée en deux couches distinctes. À la surface de la lumière intestinale se trouve la couche épithéliale, invaginée en forme de doigts et constituée d'un simple feuillet de cellules épithéliales cylindriques. Cette couche de cellules est supportée par un tissu conjonctif appelé le chorion, l'ensemble formant l'unité fonctionnelle du colon appelé crypte de Lieberkühn. La muqueuse est soutenue par une couche de cellules musculaires appelée la musculuse.

### 1. *Les cryptes de Lieberkühn*

Les cryptes de Lieberkühn sont organisées de sorte que les cellules les plus différenciées se trouvent les plus proches de la lumière intestinale et que les cellules souches sont localisées dans le fond des cryptes (Radtke & Clevers, 2005). Au cours de division asymétriques, les cellules du fond des cryptes se renouvellent et génèrent une population de cellules qui migrent en remontant le long de la crypte. Ces cellules continuent de proliférer et

celles ayant atteint le sommet de la crypte se différencient en cellules épithéliales de la paroi intestinale (figure 1). Il existe trois types de cellules différenciées dans la paroi intestinale : les colonocytes, aussi appelées entérocytes d'absorption ; les cellules goblets qui sécrètent le mucus ; et les moins abondantes, les cellules entéroendocrines.



**Figure 1 | Organisation cellulaire des cryptes de Lieberkühn.** Dans l'épithélium de la muqueuse colique normale, les cellules souches sont localisées dans le fond des cryptes (bleu foncé). À la suite d'une division asymétrique, les cellules filles ayant subi une différenciation migrent vers le haut de la crypte. Ces cellules sont des précurseurs de cellules différenciées (bleu). Elles terminent leur différenciation dans la zone haute de la crypte (bleu clair).

## 2. La voie *Wnt*- $\beta$ -caténine

Le maintien des cellules au stade de cellules souches dans le fond des cryptes est possible grâce à l'activation de la voie de *Wnt*. *Wnt* est produit par des cellules mésenchymateuses, les myofibroblastes, qui se trouvent autour des cryptes sous la membrane basale (Fevr *et al.*, 2007). L'activation de son récepteur, Frizzled, conduit à la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine et à la régulation de nombreux gènes cibles notamment impliqués dans la survie et la prolifération tels que *c-Myc*, la cycline D, la survivine (He *et al.*, 1998 ; Shtutman *et al.*, 1999 ; Tetsu & McCormick, 1999 ; Zhang *et al.*, 2001), mais aussi dans la migration et l'adhésion cellulaire comme Oct4, Snail, la fibronectine ou l'E-cadhérine (Cole *et al.*, 2008 ; ten Berge *et al.*, 2008). En l'absence du signal activateur de *Wnt*, la  $\beta$ -caténine est dégradée grâce au recrutement d'un complexe comprenant l'axine, le suppresseur de tumeur APC, et les kinases CKI et GSK3 $\beta$ . À la suite de la phosphorylation de son domaine N-terminal par ce complexe, la  $\beta$ -caténine est

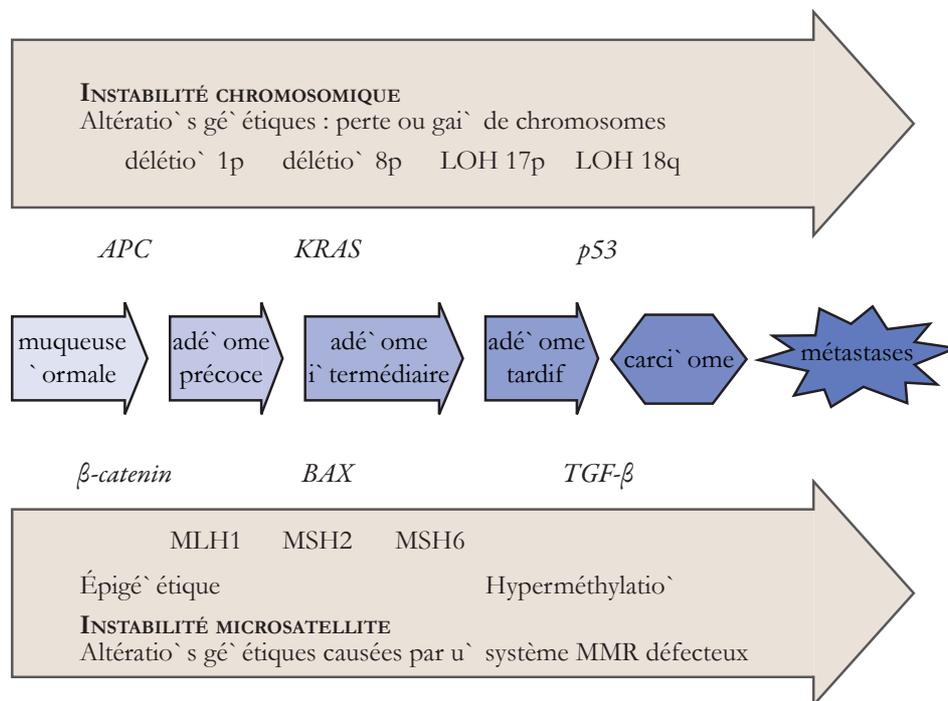
ubiquitinylée, puis dégradée par le protéasome. En présence de Wnt, le signal se produit par l'intermédiaire du récepteur Frizzled et d'une protéine associée, Lrp5 ou Lrp6. À la suite de la fixation de Wnt, l'axine est recrutée à la membrane conduisant à sa dégradation ou à la dissociation du complexe. La  $\beta$ -caténine est alors stabilisée, transloque dans le noyau et se fixe aux facteurs de transcription de la famille de Tcf/Lef pour convertir leur signal répresseur en un signal activateur de la transcription (Gregorieff & Clevers, 2005 ; Katoh, 2007).

## **B. Instabilités génomiques dans le cancer colorectal**

Le développement du cancer colorectal de l'adénome au carcinome peut durer plusieurs décennies. Les cancers émergent à la suite d'une accumulation d'altérations génétiques qui seront décrites au cours du chapitre intitulé *Mécanismes généraux de la tumorigenèse*. Ces altérations permettent la croissance de cellules néoplasiques au phénotype caractéristique tel que celui décrit par Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2000). Vogelstein et Fearon, quant à eux, ont proposé un modèle décrivant l'évolution de la tumorigenèse des cellules colorectales, initiée par la mutation sur le gène de APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) puis amplifiée par les mutations sur les gènes de K-Ras et p53 (Vogelstein *et al.*, 1989). Depuis, de nombreuses études ont confirmé ce modèle et ont montré l'implication d'autres mutations. Pourtant, certains cancers colorectaux ne présentent pas l'ensemble de ces trois mutations. Alors, plutôt que de représenter un modèle linéaire de mutations de ces gènes, des études plus récentes suggèrent qu'elles représentent des voies multiples et alternatives dans le développement tumoral avec des aberrations chromosomiques associées et des résultats cliniques différents.

Les cancers sporadiques se développent à la suite de mutations somatiques acquises de manière aléatoire sur plusieurs des gènes également affectés dans les cancers héréditaires. Toutefois, le taux d'événements mutationnels aléatoires ne peut suffire à expliquer la totalité des altérations génétiques observées dans la plupart des cancers humains. C'est pour cette raison que la déstabilisation du génome est probablement un événement précoce dans la carcinogenèse. Aujourd'hui ces événements sont bien connus et ont permis la classification des cancers colorectaux selon deux voies distinctes de déstabilisation (figure 2).

La plus représentée de ces voies génétiques concerne approximativement 85 % des cancers colorectaux et correspond au phénotype CIN. Elle est caractérisée par des pertes alléliques et des amplifications et translocations chromosomiques, comme la délétion 1p et 8p ou la perte d'hétérozygotie de 17p et 18q. La deuxième voie concerne 15 % des cancers colorectaux sporadiques et fait référence au phénotype MIN. Elle est, quant à elle, caractérisée par la substitution de base ou par des insertions ou délétions engendrant un décalage du cadre de lecture. Ce type de déstabilisation génétique est souvent causé par la perte MMR (*MisMatch Repair*). Ces deux types d'instabilités génomiques seront également décrits au cours du chapitre *Mécanismes généraux de la tumorigenèse*.

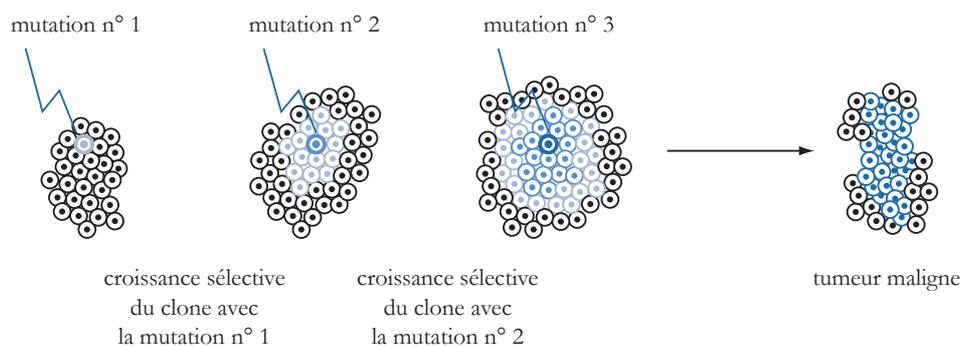


**Figure 2 | Caractéristiques des deux voies majeures d'instabilité génomique conduisant au cancer colorectal.** Au cours du développement tumoral du cancer du colon, deux types d'instabilités génomiques peuvent s'opérer. L'une induisant la modification du nombre de chromosomes, c'est l'instabilité chromosomique, l'autre induisant l'apparition de mutations, c'est l'instabilité microsatellite. Toutes deux conduisent à l'altération de gènes suppresseurs de tumeurs ou à l'activation d'oncogènes (D'après Soreide *et al.*, 2006).

## Chapitre II : Mécanismes généraux de la tumorigénèse

Une cellule tumorale se caractérise par l'acquisition d'un certain nombre de propriétés, notamment : une prolifération incontrôlée, l'envahissement des tissus adjacents et la colonisation des organes à distance. L'acquisition de ces caractéristiques correspond au processus de transformation : le passage d'une cellule normale à une cellule cancéreuse. Aujourd'hui, nous savons que ce sont des altérations génétiques successives qui conduisent à ce processus et mènent à la tumorigénèse. L'apparition de mutations au cours du développement d'un cancer permet à la cellule tumorale d'acquérir une capacité à proliférer plus importante. À chaque étape de la prolifération, une nouvelle mutation permet la sélection d'un clone cellulaire et sa prolifération jusqu'au développement de la tumeur (figure 3).

Dans cette première partie nous décrirons les mécanismes généraux conduisant à la tumorigénèse qui sont les mutations des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur ainsi que l'apparition de l'instabilité génomique. Dans un deuxième temps nous nous intéresserons plus particulièrement à l'oncogène Ras, ses fonctions, son rôle dans la tumorigénèse et l'influence de ses mutations dans le cancer colorectal. Dans un troisième temps nous présenterons les résultats obtenus lors de cette étude.

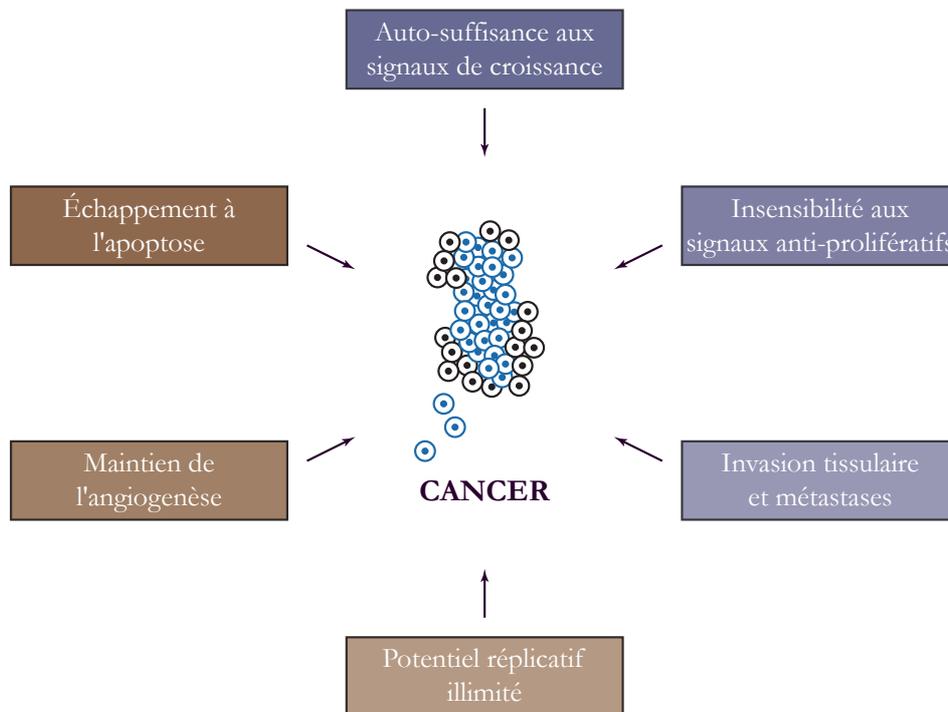


**Figure 3 | Évolution multi-étapes du cancer.** Les mutations successives attribuent un avantage prolifératif à une cellule. Les clones qui résultent de cette prolifération sont autant de cibles pour une nouvelle mutation.

### A. Initiation de la tumorigénèse

Les altérations génétiques nécessaires à l'émergence d'une lésion tumorale doivent, selon Weinberg, satisfaire les critères suivant : l'échappement à l'apoptose, l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux d'arrêt de la croissance,

l'apparition d'un potentiel répliatif illimité, la capacité à induire l'angiogénèse et l'invasion tissulaire et l'activation des processus métastatiques (figure 4) (Hanahan & Weinberg, 2000). La tumorigénèse est initiée par l'apparition de mutations activatrices sur un oncogène ou bien par l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur. Nous nous intéresserons ici particulièrement aux oncogènes ayant un rôle dans le cycle cellulaire.



**Figure 4 | Caractéristiques acquises par les cancers.** Selon Weinberg, la plupart sinon tous les cancers ont acquis les mêmes capacités fonctionnelles au cours de leur développement. Les stratégies permettant l'acquisition de ces caractéristiques sont différentes selon types de cancers (D'après Hanahan & Weinberg, 2000).

### 1. Les oncogènes, définition et historique

L'oncogène se définit par deux caractéristiques. Tout d'abord en tant que séquence génétique capable de transformer des fibroblastes en culture, c'est-à-dire, d'induire une prolifération illimitée et la perte de l'inhibition de contact. Ensuite, l'oncogène doit être capable d'induire une tumeur chez la souris au système immunitaire déficient (souris nude). Les proto-oncogènes sont des gènes potentiellement oncogéniques présents dans la cellule. Ils ont été décrits pour la première fois en 1976. Au début des années 70, Peter Vogt et Steven Martin étudièrent des mutants du virus du sarcome de Rous (RSV) isolé par Peyton Rous en 1911 (Duesberg *et al.*, 1970 ; Rous, 1911). Leur étude révéla que le gène du RSV capable de transformer les cellules n'était pas requis pour la réplication virale, mais que ce

seul gène était responsable de la capacité du RSV à induire des tumeurs chez l'oiseau. En 1976, Michael Bishop et Harold Varmus démontrèrent que l'oncogène présent dans le génome du virus ne représentait pas réellement un gène viral mais plutôt un gène cellulaire acquis durant la réplication dans une cellule de l'hôte (Stehelin *et al.*, 1976). Ils observèrent que ces gènes étaient retrouvés dans de nombreux organismes, notamment chez l'homme. Cette découverte leur valut le prix Nobel de Médecine en 1989.

## 2. *Oncogènes et cycle cellulaire*

Il existe plusieurs systèmes de classification des oncogènes, notamment la classification selon leur fonction. Selon cette classification nous pouvons citer des facteurs de croissance comme Int-2 ou Kgf, des membres de la famille des FGF. Ces facteurs, habituellement sécrétés par des cellules spécialisées, induisent la prolifération cellulaire de manière autocrine ou paracrine en activant les voies sous-jacentes à leurs récepteurs. Les cellules tumorales sont capables de sécréter ce type de facteur pour induire leur propre prolifération. Il existe aussi de nombreux oncogènes à activité tyrosine kinase présents dans la membrane plasmique. On trouve notamment des récepteurs de facteurs de croissance comme l'EGFR, le PDGFR ou le VEGFR. Ces protéines activent les voies de prolifération cellulaire en réponse à un facteur de croissance. Lorsque ces récepteurs deviennent oncogéniques, ils induisent une activation de ces voies sans nécessiter de signal inducteur. Dans une troisième catégorie nous trouvons les protéines sous-membranaires de transduction du signal de croissance telles que Ras, dont la fonction sera développée dans le deuxième chapitre. Il existe également des oncogènes cytoplasmiques à activité tyrosine kinase comme Src ou à activité sérine/thréonine kinase comme Raf, sous-jacent à Ras et capable d'activer la voie des MAP Kinases. L'activation constitutive de ce type d'oncogène participe au processus de tumorigenèse en permettant à la cellule d'acquérir un potentiel répliatif en l'absence de signal. D'autres oncogènes sont des facteurs de transcription comme c-Myc ou c-Fos et c-Jun, qui associés, forment le complexe AP1.

Ces protéines, qu'elles soient facteurs de croissance, récepteurs, protéines de transduction du signal ou facteurs de transcription, ont en temps normal une activité contrôlée. Mais elles peuvent être constitutivement activées au sein des tumeurs. De façon plus ou moins directe, elles permettent l'activation des voies de prolifération et l'expression de protéines d'activation du cycle cellulaire favorisant l'entrée prématurée en phase S.

### 3. *Mutation sur les proto-oncogènes*

L'hypothèse expliquant la tumorigenèse repose sur la découverte des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur. Selon cette hypothèse, l'apparition de tumeur s'explique par la mutation sur des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur. Ces mutations surviennent à la suite de stress environnementaux ou bien au cours des divisions cellulaires chez un organisme et perturbent la fonction normale des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur. Lors de la réplication de l'ADN, l'ADN polymérase  $\delta$  connaît un taux d'erreur d'environ une base sur un milliard, ce qui expliquerait l'apparition de mutations sur les oncogènes ou sur les gènes suppresseurs de tumeur des organismes à vie longue. Les altérations affectant directement les bases peuvent également conduire à l'apparition de mutation. Elles sont notamment causées par les radicaux libres de l'oxygène, eux-mêmes générés par l'activité métabolique de la cellule ou par des agents physiques comme les radiations. N'étant plus soumis aux contraintes nécessaires à la prolifération telles que la stimulation par des facteurs de croissance, l'adhérence à une matrice extracellulaire et la préservation du matériel génétique, l'apparition de ces mutations conduirait à une prolifération cellulaire incontrôlée et favoriserait l'émergence de clones de plus en plus mutés.

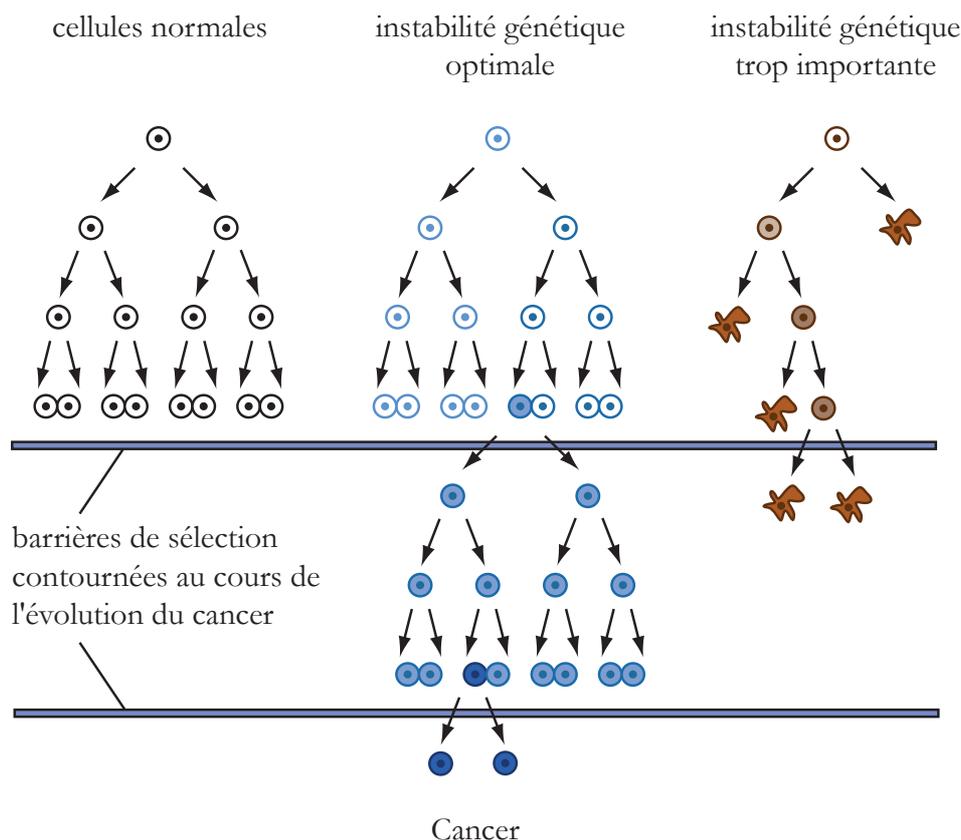
Un proto-oncogène peut être activé par différents moyens, il peut être muté sur sa séquence codante ou sur son promoteur. Premièrement, une mutation ponctuelle au sein de sa séquence peut engendrer une activation constitutive de la protéine. C'est, par exemple, le cas de la mutation G12V de la protéine Ras (Barbacid, 1987). Une mutation peut également être responsable d'une séquence non-sens comme c'est le cas de la mutation sur le codon 531 de la protéine c-Src. Cette mutation conduit à l'apparition d'une forme tronquée de c-Src et provoque une activation constitutive de la protéine (Irby *et al.*, 1999). Mais une mutation sur la séquence du promoteur peut aussi induire une augmentation de l'expression de la protéine. Dans les lymphomes agressifs de type DLBCL, la mutation présente sur le promoteur de BCL6 affecte le site de liaison de facteurs répresseurs de la transcription, perturbant ainsi la boucle d'autorégulation négative du gène de BCL6 (Pasqualucci *et al.*, 2003). Dans le cas des cyclines D et E ou de HDM2 (*Human Double Minute 2*), c'est une variation de l'épissage alternatif qui conduit à l'absence d'un domaine fonctionnel (Bartel *et al.*, 2004 ; Solomon *et al.*, 2003), par exemple, sur la forme courte de la cycline E, p21Waf1 et p27 ne peuvent plus se lier pour inhiber le complexe cycline E/Cdk2 (Wingate *et al.*, 2003).

Enfin, certains oncogènes peuvent être activés de manière indirecte si une mutation touche leur régulateur. Par exemple, dans le cas de la mutation de l'inhibiteur de c-Src, Csk (Kunte *et al.*, 2005).

## **B. L'instabilité génomique**

Nous l'avons vu, les tumeurs colorectales peuvent être associées à deux types d'instabilités génomiques. Selon qu'elles présentent une modification de leur caryotype ou bien des mutations sur des régions microsatellites particulièrement sensibles, elles sont respectivement appelées tumeurs de phénotypes CIN (*Chromosomal Instability*) ou MIN (*Microsatellite Instability*).

Les mutations et réarrangements chromosomiques faisant référence à l'instabilité génomique sont, d'ordinaire, associés à de nombreux troubles pathologiques. Il n'en reste pas moins que cette instabilité a joué un rôle crucial dans l'évolution des espèces. De nombreuses études s'accordent sur le fait que les tumeurs solides sont toutes génétiquement instables car elles possèdent de nombreuses altérations au sein de leur génome. L'apparition des différentes mutations lors du processus de tumorigenèse expliquerait l'installation de l'instabilité génomique observée dans la plupart des carcinomes humains. La notion d'apparition tardive de l'instabilité génomique amène à penser au concept d'instabilité génomique en temps que moteur de la progression tumorale. Le fait qu'il existe de nombreux défauts des systèmes de réparation du génome chez les organismes présentant une forte incidence de tumeurs par rapport aux organismes où ces systèmes ne sont pas perturbés, constitue un argument de poids en faveur du rôle de l'instabilité génomique dans le développement tumoral (figure 5). L'instabilité génomique fait référence à différentes altérations génétiques allant de la mutation ponctuelle au réarrangement chromosomique et peut être divisée en plusieurs classes selon le type d'événement ayant conduit à l'instabilité.

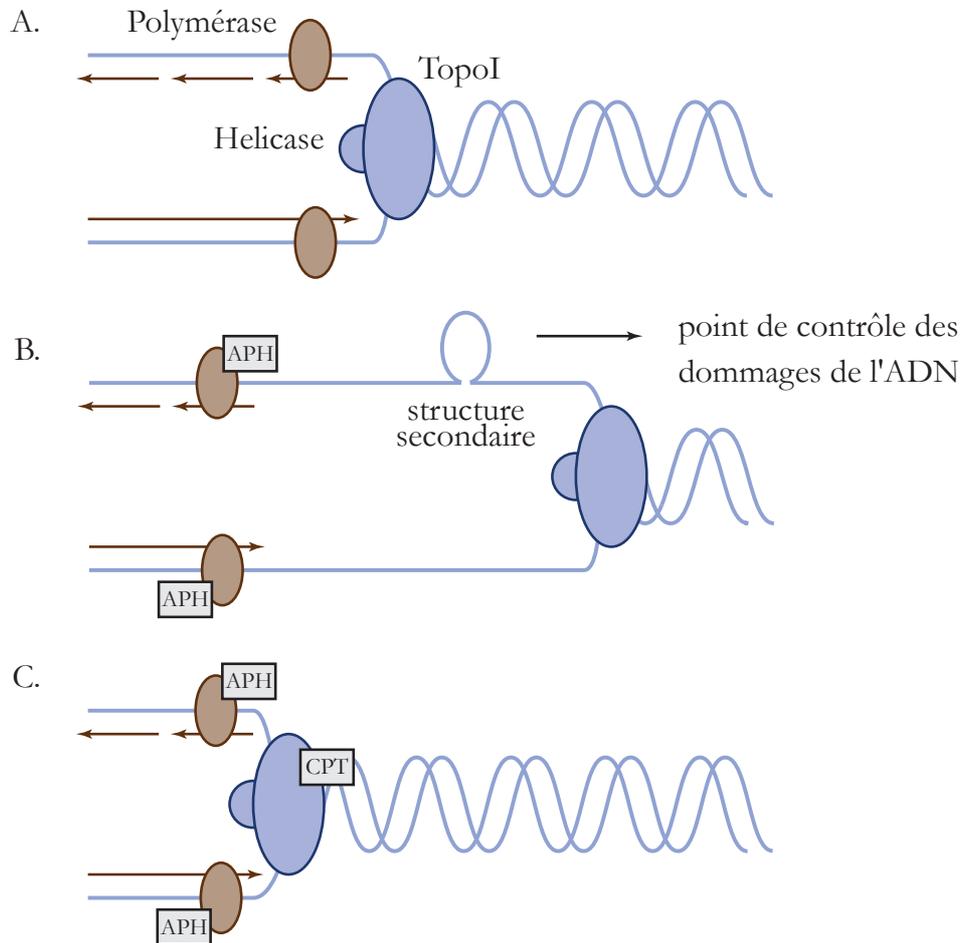


**Figure 5 | L'instabilité génomique dans la progression tumorale.** Seules les cellules qui maintiennent une instabilité génomique optimale conduiront à une tumeur. Dans les cellules normales l'instabilité est faible et les risques de mutation sont faibles. Dans les cellules initiatrices de cellules tumorales, l'augmentation du niveau d'instabilité génomique peut conduire à l'apparition d'altérations génétiques permettant de passer la barrière de sélection et de poursuivre le processus de tumorigenèse. En revanche, si le niveau d'instabilité est trop important les cellules ne supportent pas de nouvelles altérations et sont éliminées par mort cellulaire.

### 1. *Cassures de l'ADN liées à la réplication*

Tout d'abord, la perte du contrôle de la réplication peut être un des événements menant à l'instabilité. Le MMR (*MisMatch Repair*) contrôle la présence de mésappariements au cours de la réplication. Lors de la perte du MMR, le taux de mutations ponctuelles accumulées à chaque réplication augmente. Environ 15 % des cancers colorectaux présentent des mutations sur les protéines MLH1 (*MutL Homolog 1*), MSH2 (*MutS Homolog 2*), MSH6 et PMS2 (*PostMeiotic Segregation increased 2*) (Vilar & Gruber, 2010). Ces protéines sont toutes les quatre impliquées dans le MMR et leurs mutations favorisent ainsi l'apparition extrêmement rapide de mutations aboutissant à la cancérisation des cellules (Strate & Syngal, 2005). Les séquences microsatellites sont particulièrement sensibles aux perturbations du MMR et les tumeurs qui découlent de ce type de mutations sont dites MIN (*Microsatellite*

*Instability*). Ces tumeurs possèdent une quantité normale d'ADN de 2N (ou proche de 2N) chromosomes, mais possèdent des augmentations ou des contractions des séquences répétées de l'ADN pouvant être dû à un 'glissement' de la réplication, à la recombinaison homologe, ou dans ce cas, à un déficit de réparation des mésappariements par le MMR.



**Figure 6 | Modèle de l'effet de l'inhibition de la Polymérase et de la TopoI sur l'apparition des cassures sur les sites fragiles communs** **A.** En temps normal, au cours de la réplication, l'ADN polymérase, l'hélicase, et la TopoI permettent le dénouement et la synthèse de l'ADN en évitant une longueur d'ADN simple brin trop importante. **B.** Lorsque que l'ADN polymérase est ralentie par de l'aphidicoline (APH), la polymérisation est moins rapide que le dénouement de l'ADN. Il en résulte une augmentation de la longueur de l'ADN simple brin et un risque accru d'y voir apparaître des structures secondaires. Ces structures conduisent à l'effondrement des fourches de réplication et à l'activation des points de contrôle des dommages de l'ADN. Certaines de ces structures échappent à ces points de contrôle, il en résulte les cassures des chromosomes lors de la métaphase. Les sites fragiles sont probablement plus enclin à former des structures secondaires en épingle à cheveux. **C.** Lorsque les l'ADN polymérase et la TopoI sont ralenties par les traitements d'aphidicoline et d'irinotecan (CPT), le dénouement et la polymérisation sont toutes deux ralenties et la réplication se fait plus lentement mais la formation de structures secondaires est limitée et il en résulte une réduction des cassures sur les sites fragiles communs (D'après Arlt & Glover, 2010).

Ensuite, au cours de la réplication de l'ADN, d'autres types de séquences peuvent être le siège de mutations conduisant à de l'instabilité génomique, comme les sites de réplication fragile. Ces sites sont classés comme rares ou communs selon leur fréquence d'expression dans la population. Les sites fragiles communs sont exprimés chez tous les individus mais à différentes fréquences, alors que les sites fragiles rares ne sont exprimés que chez certains individus. L'instabilité de ces sites fragiles est observée en culture après inhibition de la réplication, par exemple à l'aide d'aphidicoline, un inhibiteur des ADN Polymérase  $\alpha$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  (Yunis *et al.*, 1987). L'aphidicoline, à faibles doses, n'inhibe que partiellement l'ADN polymérase et conduit à l'apparition de *gaps* et de cassures. Ces sites sont répliqués très tardivement au cours de la phase S et les *gaps* et cassures sont observées sur les chromosomes durant la métaphase. La stabilité de ces sites chez les mammifères dépend notamment, de la protéine ATR (*ATM and Rad3-related*) (Casper *et al.*, 2002). Une explication probable à la réplication tardive des sites fragiles rares serait la formation de structures secondaires dues à la présence dans leurs séquences de répétitions CGG et AT. Ces structures secondaires empêcheraient la progression des fourches de réplication (Chen *et al.*, 1995 ; Hewett *et al.*, 1998). La réplication tardive est aussi une caractéristique des sites fragiles communs. Certaines études ont montré que la réplication de ces régions était initiée durant le début ou le milieu de la phase S mais était trop lente pour se terminer, induisant des *gaps* et des cassures sur les chromosomes des cellules en métastases (Hellman *et al.*, 2000 ; Le Beau *et al.*, 1998 ; Palakodeti *et al.*, 2004). Récemment, il a été montré que l'activité de la topoisomérase I était requise pour voir apparaître des cassures sur les sites fragiles communs. En effet, dans des cellules humaines en culture, Arlt et Glover ont montré qu'en ralentissant la progression de la topoisomérase I à l'aide de faibles doses de camptothécine, l'apparition de cassures sur les sites fragiles par l'inhibition de la polymérase à l'aide d'aphidicoline était diminuée (Arlt & Glover, 2010). Ces observations suggèrent que c'est l'allongement de la partie simple brin de l'ADN dans la fourche de réplication qui est responsable de l'apparition de cassures et de l'instabilité génomique sur les sites fragiles. En effet, si l'activité de la polymérase est ralentie lors de la réplication alors que la progression du complexe hélicase/topoisomérase I se fait normalement pour détendre l'ADN avant la fourche de réplication, l'ADN est alors simple brin sur une plus longue distance, et donc susceptible de former des structures secondaires en épingles à cheveux, perturbant ainsi, l'activité de la polymérase et conduisant à l'effondrement de la fourche de réplication (figure 6). L'ADN simple brin active alors l'arrêt du cycle cellulaire, les mécanismes de recombinaison puis de résolution des

jonctions Hollidays permettant de réengager la fourche de réplication. Ces systèmes sont très sollicités au niveau des sites fragiles (Glover, 2006) et en présence de stress supplémentaires, si la pression sur les fourches de réplication est trop importante, alors ces mécanismes sont débordés et il persiste des séquences génomiques non répliquées qui, lors de la métaphase, vont favoriser l'apparition de cassures chromosomiques et perturber la mitose. La présence de sites fragiles peut conduire à l'apparition de réarrangements aboutissant parfois à la perte allélique d'un ou plusieurs gènes suppresseurs de tumeur.

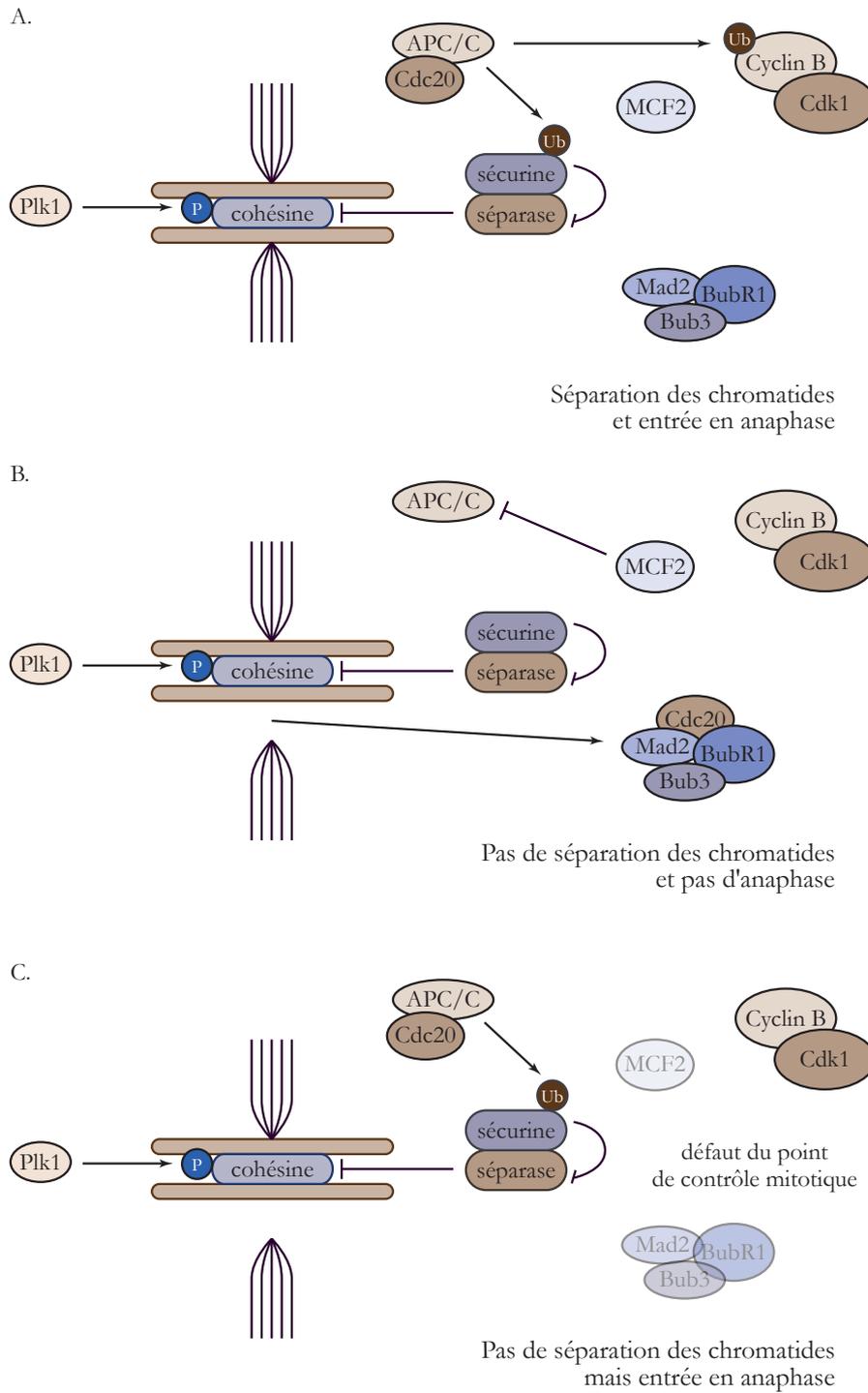
Finalement, la perturbation du contrôle des origines de réplication lors de la réplication de l'ADN peut être responsable d'apparition d'instabilité génomique. À la fin de la phase G1 plusieurs complexes de pré-réplication (pre-RC) sont formés, ils se fixent à l'ADN grâce au complexe ORC (*Origin Recognition Complex*) composé de six sous-unités Orc1-6. L'ORC recrute ensuite une ATPase, cdc6 et un facteur de transcription, Cdt1. Ces deux facteurs vont permettre la liaison des six protéines Mcm2-7 du complexe MCM (*Minichromosome Maintenance*). Certains systèmes empêchent les mécanismes réplicatifs de se mettre en place durant les autres phases du cycle cellulaire et en temps normal ces protéines ne sont actives que lors de la phase G1, lorsque le complexe cycline E/Cdk2 n'est pas encore formé. Mais l'activation précoce de la kinase Cdk2 au cours de la phase G1 empêche le chargement des pre-RC. L'absence de pre-RC sur une région de l'ADN ne permet pas la réplication de ces régions mais perturbe la mitose (Ekholm-Reed *et al.*, 2004). La géminine est aussi un inhibiteur de la réplication. Elle est présente dès l'entrée en phase S jusqu'à la fin de la phase M et inhibe Cdt1 (Blow & Dutta, 2005). Les protéines Cdc6, Cdt1 et la géminine ont toutes les trois été retrouvées surexprimées dans un grand nombre de tumeurs associées à la présence d'une instabilité génomique (Bravou *et al.*, 2005 ; Karakaidos *et al.*, 2004). L'augmentation de cdt1 et cdc6 participerait à l'instabilité génomique via l'ouverture de fourche de réplication sur de l'ADN déjà répliqué, tandis que la géminine limiterait ce mécanisme à un taux supportable pour la survie cellulaire.

## **2. *Instabilité génomique acquise lors de la mitose***

La répartition équilibrée du matériel génétique lors de la mitose est un moment crucial dans le maintien de la stabilité génomique. Le point de contrôle du fuseau lors de la mitose permet la bonne répartition du matériel génétique entre les deux cellules filles. Lors de la métaphase, les chromatides sœurs sont liées entre elles au niveau des centromères. La

protéine responsable de ce maintien s'appelle la cohésine. La cohésine est maintenue sous une forme inactive par la sécurine. Au cours de la transition métaphase/anaphase, la cohésine est phosphorylée par la kinase Plk1 et devient alors sensible à la dégradation par la séparase, elle-même activée grâce à l'ubiquitination de la sécurine par le complexe APC/C (*Anaphase Promoting Complex*) associé à Cdc20 (Musacchio & Hardwick, 2002). C'est donc la dégradation de la sécurine par le protéasome qui permet l'activation de la séparase et conduit à la séparation des chromatides. Les chromosomes sont alors alignés au centre du fuseau et à équidistance des pôles cellulaires sur la plaque métaphasique, puis les chromatides sont réparties en deux lots identiques, tirées par les microtubules vers chaque pôle du fuseau. En temps normal, la protéase n'est activée que lorsque tous les centromères sont liés par deux microtubules issus de chaque pôle au niveau des kinétochores, et l'absence d'attachement d'un unique chromosome suffit à induire un signal d'inactivation d'APC/C. Cette inactivation se fait, non seulement par la séquestration de Cdc20 par Mad2 et BubR1 (Bharadwaj & Yu, 2004 ; Musacchio & Salmon, 2007) mais également par la formation du MCC (*Mitotic Checkpoint Complex*) composé de Mad2, Bub3, BubR1 et Cdc20 (Sudakin *et al.*, 2001). Un deuxième complexe inhibiteur du point de contrôle mitotique, MCF2 (*Mitotic Checkpoint Factor 2*) est capable de s'associer à APC/C de manière compétitive avec Cdc20 (Eytan *et al.*, 2008). Ces mécanismes jouent un rôle primordial dans le maintien de la stabilité du génome. Ils interviennent à deux niveaux de contrôle. Tout d'abord, ils assurent que l'ensemble des chromosomes soient attachés de manière bipolaire avant le début de l'anaphase à chaque division cellulaire. Ensuite, ils sont capables d'induire l'arrêt de la mitose dans les cellules qui auraient commis des erreurs dans la réplication de leur ADN ou qui présenteraient des cassures au sein de leur génome (figure 7) (Kops *et al.*, 2005).

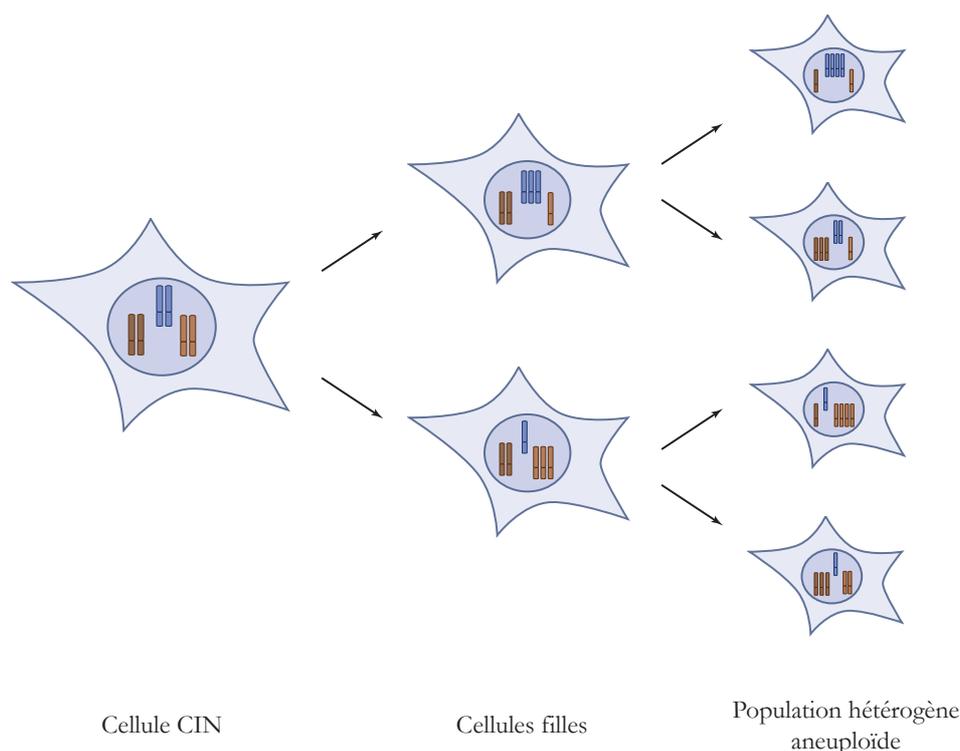
## Introduction générale



**Figure 7 | Apparition de l'instabilité chromosomique de nombre lors de la mitose.** **A.** Lors de la métaphase, la cohésine retient la séparation des chromatides sœurs. Lorsque tous les chromosomes sont reliés aux microtubules par les kinétochores, le complexe APC/C, activé par Cdc20, induit la dégradation de la sécurine, permettant ainsi la dégradation de la cohésine par la séparase. APC/C induit également la dégradation de la cycline B, conduisant à la sortie de mitose. **B.** Lors de l'absence de la liaison d'une chromatide aux microtubules, le complexe MCC est activé, Cdc20 est séquestré et APC/C est inhibé empêchant la séparation des chromatides et la sortie de mitose. **C.** Lorsque le point de contrôle du fuseau mitotique n'est pas fonctionnel, la mitose peut se poursuivre malgré l'absence de liaison d'une chromatide aux microtubules. La mitose se poursuit alors malgré une mauvaise ségrégation des chromosomes.

La dérégulation du point de contrôle du fuseau mitotique est impliquée dans l'apparition de cellules tumorales colorectales présentant un caryotype déséquilibré. Les cellules tumorales qui ne montrent pas d'instabilité microsatellite présentent un caryotype anormal avec de nombreuses pertes, gains ou réarrangements de chromosomes. On parle alors de phénotype CIN (*Chromosomal Instability*). Les tumeurs de phénotype CIN représentent environ 85 % de l'ensemble des tumeurs colorectales. L'étude de l'ADN de cellules provenant de cancers de côlon – mais aussi de sein ou de prostate – à un stade avancé, montre une perte d'hétérozygotie d'environ un quart de l'ensemble des loci (Radford *et al.*, 1995 ; Vogelstein *et al.*, 1989). Cependant, seulement une petite partie de ces changements est responsable de la progression tumorale, la majorité n'étant que le reflet d'une instabilité chromosomique générale.

Une cellule aneuploïde est une cellule dont le nombre de chromosomes est anormal, soit différent de 46 chez l'Homme. L'aneuploïdie est très courante au sein des cellules tumorales, cependant celles-ci ne présentent pas forcément un phénotype CIN. La particularité des cellules à phénotype CIN est que l'aneuploïdie n'est pas survenue en une seule étape mais qu'elle est apparue au cours de plusieurs divisions. Ce type de cellules possède entre 60 et 90 chromosomes, ce qui correspond environ à une moyenne de 3N chromosomes (figure 8). La cellule initiale serait d'abord devenue tétraploïde avant de perdre une partie de ses chromosomes surnuméraires (Fujiwara *et al.*, 2005). Dans ce cas, la dérégulation du point de contrôle du fuseau mitotique serait, à la fois, responsable d'émergence de la cellule tétraploïde, mais aussi de l'instabilité chromosomique ultérieure. Ainsi, les modifications d'expression des protéines Mad2 ou Bub1 induites, par exemple, par l'oncogène Myc, conduisent à l'apparition d'un phénotype CIN dans une cellule initialement normale (Menssen *et al.*, 2007). Il a également été observé des mutations somatiques ou des altérations d'expression de ces protéines dans certains cancers aux caryotypes anormaux (Doak *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2005a).



**Figure 8 | La répétition de la ségrégation inégale des chromosomes conduit à l'apparition d'un caryotype instable et à une population cellulaire hétérogène.** Pour plus de clarté seulement trois chromosomes sont représentés sur la figure. L'aneuploïdie dans une cellule de phénotype CIN apparaît au cours de plusieurs mitoses à cause d'une mauvaise ségrégation des chromatides (D'après McClelland *et al.*, 2009).

### 3. *Autres types de cassures de l'ADN*

Les stress environnementaux tels que les rayonnements UV, les radicaux libres de l'oxygène et les rayons  $\gamma$  sont des agents mutagènes qui induisent des cassures de l'ADN. Les cassures produites par ce type d'agents peuvent être simples ou doubles brins (Lindahl & Wood, 1999). Cependant, lors de la collision avec la fourche de réplication, une cassure simple brin devient double brin et les cassures double brin ont un effet important sur l'instabilité chromosomique (Kuzminov, 2001 ; Marini & Krejci, 2010). En effet, leur présence dans le génome génère des fusions entre les chromosomes. Ces chromosomes fusionnés ne peuvent pas être distribués correctement lors de la mitose et sont très souvent cassés durant l'anaphase générant alors des cycles de cassures puis fusion des chromosomes et augmentant ainsi l'instabilité génomique. Deux mécanismes, le NHEJ (*Non Homologous End Joining*) et la recombinaison homologue, permettent la réparation des cassures double brin (Hartlerode & Scully, 2009). Les protéines qui y sont impliquées sont retrouvées mutées dans différents syndromes humains. Les patients porteurs de ces mutations développent un

nombre anormalement élevé de tumeurs suggérant l'importance du rôle de ces systèmes dans le contrôle de la tumorigenèse.

Une autre possibilité d'apparition de cassures double brin est le raccourcissement des télomères. Les télomères sont composées de séquences répétées TTAGGG associées aux complexes de protection Shelterin composés des protéines TRF1 et 2 qui empêchent les extrémités des chromosomes d'être reconnues comme des cassures double brin (Chan & Blackburn, 2004 ; Palm & de Lange, 2008). Chez l'Homme, les télomères ne sont maintenus que dans les lignées germinales, permettant ainsi le maintien du potentiel répliatif de ces cellules tout au long de la vie de l'organisme. Elles sont, en revanche, raccourcies dans les cellules somatiques limitant, ainsi, la répliation de ce type de cellules. À chaque division, les télomères diminuent jusqu'à atteindre un seuil en dessous duquel les séquences télomériques ne permettent plus le recrutement de TRF2 et sont alors reconnues comme des cassures double brin. Le raccourcissement de l'extrémité des chromosomes dans les cellules à potentiel répliatif réduit est dû à une régulation négative de la télomérase. Il n'est donc pas surprenant que les cellules cancéreuses surexpriment cette protéine, bien que dans approximativement 10 % des cancers, les cellules maintiennent la longueur de leurs télomères par des mécanismes alternatifs (Reddel & Bryan, 2003). Une hypothèse proposée pour expliquer la fusion des chromosomes malgré l'augmentation de l'expression des télomérases évoque la surexpression tardive des télomérases. Les télomères diminueraient de manière trop rapide à chaque division et fusionneraient avant que l'expression des télomérases soit mise en place, conduisant ainsi à augmenter l'instabilité chromosomique (Gisselsson *et al.*, 2001).

Nous avons vu que les mutations des proto-oncogènes étaient considérées comme initiatrices de la tumorigenèse et que l'instabilité génomique qui découlait de ces événements serait le moteur de la tumorigenèse. En effet, l'instabilité génomique permet l'élimination de gènes suppresseurs de tumeur ou l'amplification de l'activité des oncogènes. Elle peut donc être considérée comme un catalyseur de l'oncogenèse.

L'instabilité génomique induite par les oncogènes peut avoir diverses origines. Par exemple, l'activité oncogénique conduisant à une augmentation de la prolifération, le métabolisme des cellules tumorales est augmenté, induisant alors la libération de radicaux libres de l'oxygène par la mitochondrie (Dang *et al.*, 2005 ; Vafa *et al.*, 2002). Les radicaux libres possèdent un ou plusieurs électrons non-appariés sur leur couche externe conférant à

ces molécules une grande instabilité. Ils ont la possibilité de réagir avec de nombreux composés et notamment avec l'ADN. Ces radicaux libres sont génotoxiques. Ils induisent essentiellement des cassures simple brin sur l'ADN nucléaire et mitochondrial. Après le passage de la fourche de réplication les cassures simples brins sont converties en cassures double brin. Les cassures induites sur l'ADN mitochondrial ont un rôle important dans l'amplification du phénomène, en effet, les mitochondries ainsi perturbées vont être génératrices de plus de radicaux libres de l'oxygène (Copeland *et al.*, 2002). Ainsi, une augmentation minime de la prolifération cellulaire due à un oncogène – comme Myc, par exemple – entraînera la production de radicaux libres de l'oxygène et permettra l'installation de l'instabilité génomique.

Les instabilités chromosomiques et génomiques peuvent aussi être expliquées par l'altération de l'initiation de la réplication et du mouvement des fourches de réplication. En étudiant la surexpression de la cycline E, Ekholm-Reed et ses collaborateurs ont expliqué l'apparition d'instabilité par un mauvais chargement des protéines initiatrices de la réplication (Ekholm-Reed *et al.*, 2004). Comme nous l'avons évoqué plus haut, lors de la préparation à la phase S, le complexe pré-répliatif pré-RC doit s'assembler au niveau des origines de réplication. L'ORC recrute deux facteurs, cdc6 et Cdt1 pour permettre la formation des complexes des MCM2 à 7 sur les origines de réplication. Ekholm-Reed propose l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de la phosphorylation de MCM4 par Cdk2 induirait une diminution du chargement des complexes de réplication, ce qui aurait pour conséquence une augmentation de la longueur des fourches de réplication et une augmentation de la fréquence de cassures double brin. Le ralentissement de la réplication pourrait compromettre la mitose (réplication des chromosomes incomplète, condensation de la chromatine compromise), permettant ainsi la propagation des dommages de l'ADN (Ekholm-Reed *et al.*, 2004). Après avoir observé une diminution de l'activation des voies ATR-Chk1 et ATM-Chk2 au cours de l'évolution tumorale dans des tumeurs de la vessie, du sein, du côlon ou du poumon, l'équipe de Barktova a étudié l'effet de trois oncogènes impliqués dans l'entrée en phase S, la cycline E, la phosphatase cdc25A et le facteur E2F1. Ils ont pu observer que, contrairement aux effets de l'oncogène Myc (Vafa *et al.*, 2002), les dommages de l'ADN provoqués par la surexpression de ces trois facteurs, n'étaient pas dus à un stress oxydatif, mais à un stress répliatif. Ces oncogènes induiraient la réplication conduisant à l'apparition de cellules au contenu génomique aberrant, reflétant probablement une re-réplication partielle du génome associée à l'impossibilité de la cellule à se diviser.

La tumorigenèse est un processus multifactoriel et multi-étapes qui nécessite toutefois d'être initiée par l'apparition d'une mutation sur un proto-oncogène. L'instabilité qui découle de l'activation de cet oncogène va permettre l'apparition de nouvelles altérations et la progression oncogénique. Pour que la transformation soit complète, elle requière l'élimination des mécanismes pouvant détecter et inhiber cette progression.

### **C. Echappement aux mécanismes suppresseurs de tumeur**

La suppression des mécanismes responsables de l'arrêt de la prolifération ou de l'induction de la mort cellulaire ainsi que les différents mécanismes permettant la détection de l'oncogène, sont des barrières qui doivent être éliminées pour permettre la progression de la tumorigenèse.

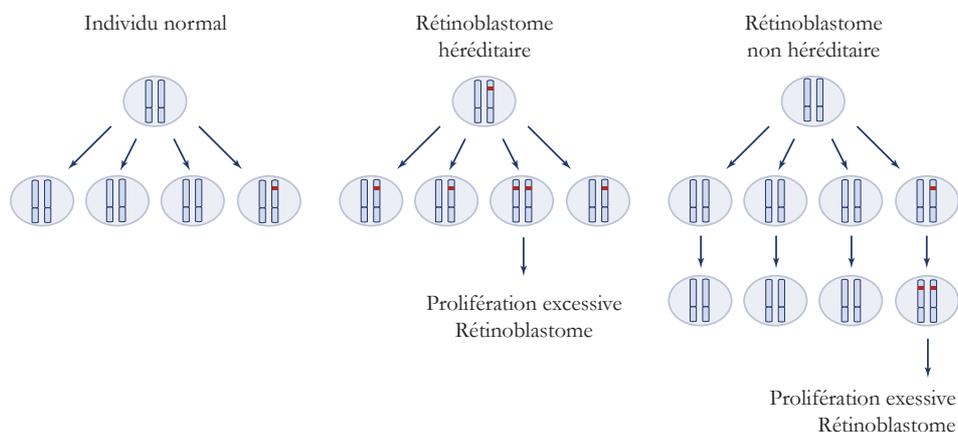
Les protéines p53 et p21Waf1 sont d'importants inhibiteurs du cycle cellulaire, ils limitent l'oncogénèse par leur rôle de suppresseur de tumeur. Par l'activation de ces protéines et en fonction des causes de cette activation, la cellule est amenée à entrer en apoptose ou en sénescence. Malgré leur état statique, les cellules sénescents sont vivantes et métaboliquement actives, cependant, elles deviennent insensibles aux signaux prolifératifs. En revanche, elles peuvent continuer à exercer une activité paracrine. L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est le processus par lequel la cellule déclenche sa destruction en réponse à un signal. La cellule dégrade alors ses constituants par l'activité de protéases appelées caspases. L'ADN est, lui aussi, dégradé et fortement condensé et la cellule se disloque en corps apoptotiques. Les corps apoptotiques sont des vésicules renfermant l'ADN et les différents composants cellulaires.

Dans notre étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à la sénescence induite par l'oncogène H-Ras et aux mécanismes permettant son induction. Nous avons également abordé l'échappement à ces mécanismes de protection contre la progression tumorale.

#### ***1. Les gènes suppresseurs de tumeur, définition et historique***

Le premier gène suppresseur de tumeur a été identifié par l'étude du rétinoblastome, une tumeur rare de l'œil chez l'enfant. La maladie étant détectée très tôt et pouvant être traitée avec succès, beaucoup de patients survivent et peuvent, par la suite, avoir

une descendance. De cette manière il a pu être observé que certains cas de rétinoblastome étaient héréditaires. En effet, environ la moitié des enfants dont l'un des parents a été affecté par cette maladie l'est aussi. Cette observation indique une transmission Mendélienne d'un allèle dominant qui confère une prédisposition au développement tumoral. Bien que l'allèle susceptible de transmettre le rétinoblastome soit dominant, l'héritage de cet allèle n'est pas suffisant pour induire la transformation de cellules normales en cellules tumorales. De plus, toutes les cellules ont hérité de ce gène mais seulement une petite fraction de cellules – voire une seule – deviendra tumorale. La tumorigenèse requiert donc d'autres événements. En 1971, Alfred Knudson propose que le développement d'un rétinoblastome nécessite une deuxième mutation conduisant à la perte de la copie fonctionnelle du gène susceptible d'induire la tumorigenèse (figure 9) (Knudson, 1971). Le clonage de cette région a permis d'identifier le gène nommé Rb. Dans les rétinoblastomes héréditaires, un allèle muté de Rb est transmis génétiquement. Une seule inactivation sur l'allèle fonctionnel est suffisante pour déclencher le processus de tumorigenèse. Les rétinoblastomes non-héréditaires sont plus rares car leur développement nécessite deux mutations somatiques indépendantes pour inactiver les deux allèles normaux de Rb dans la même cellule. Des mutations ou des délétions du gène Rb ont, par la suite, été fréquemment observées dans plusieurs carcinomes du poumon ou du sein, par exemple (Cairns *et al.*, 1991 ; Yokota *et al.*, 1988).



**Figure 9 | Hypothèse de Knudson et gène du Rétinoblastome.** Chez un individu normal la seule inactivation de l'un des deux allèles ne conduit pas à l'apparition d'une tumeur. En revanche, chez un individu ayant hérité du gène muté de Rb, l'inactivation du deuxième allèle conduit à une prolifération excessive et à l'apparition d'une tumeur. Toutefois, il est possible que chez certains individus, l'inactivation occasionnelle du premier allèle soit suivie de l'inactivation du second dans la même cellule. Dans ce rare cas de figure (un cas sur 30 000), l'individu développera une tumeur (D'après Knudson, 1971).

Il existe de très nombreux gènes suppresseurs de tumeur répondant à l'hypothèse de Knudson. On peut notamment citer PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*), une phosphatase qui catalyse la déphosphorylation du PIP3 (*phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*) en PIP2 (*phosphatidylinositol 4,5-diphosphate*) empêchant ainsi l'activation de Akt. La PI3-kinase et Akt sont des oncogènes, ils induisent la survie cellulaire. PTEN agit comme un antagoniste de ces protéines. De plus, l'inactivation ou la perte d'expression de PTEN contribue au développement tumoral car il en résulte l'augmentation du niveau de PIP3, une activation de Akt et par conséquent, une inhibition de la mort cellulaire. Nous détaillerons plus particulièrement les exemples de p53 et de p21Waf1, deux protéines suppresseurs de tumeurs fondamentaux et qui nous ont plus particulièrement intéressés lors de cette étude.

## 2. *Le gène suppresseur de tumeur p53*

Le suppresseur de tumeur p53 tient un rôle clef dans la régulation du cycle cellulaire et de la mort cellulaire. Il est aussi impliqué dans la différenciation cellulaire, la réparation de l'ADN, la sénescence et l'angiogenèse. Il est estimé que dans environ un cancer sur deux les cellules possèdent une mutation sur le gène de p53, la plupart présentant une inactivation de cette voie de protection.

### a. *Mise en évidence du rôle de p53 comme suppresseur de tumeur*

Étonnamment, les premiers travaux sur p53 ont suggéré que cette protéine semblait promouvoir la prolifération cellulaire. Les premières expériences de Reich et Levine en 1984 montraient que des cellules de souris en culture exprimaient très faiblement p53 lorsqu'elles étaient privées de sérum. Lors de l'ajout de sérum dans le milieu de culture, le niveau d'ARNm et de protéine de p53 augmentait jusqu'à l'apparition d'un pic d'expression au moment de la transition G1/S, juste avant la réplication de l'ADN (Reich & Levine, 1984). Des expériences similaires ont été répétées dans des lymphocytes T ou dans des fibroblastes montrant que l'expression de p53 était toujours corrélée à une augmentation de la croissance cellulaire (Mercer *et al.*, 1984 ; Milner, 1984). Ces observations, ainsi que le fait que p53 ait une demi-vie courte et une localisation nucléaire, ont conduit à considérer que p53 pourrait jouer un rôle positif dans la prolifération cellulaire. Cette idée fut d'abord renforcée par des travaux de microinjection d'anticorps dirigés contre p53 dans le noyau de cellules quiescentes, car l'anticorps injecté avait pour effet l'inhibition de l'entrée en phase S

normalement induite après ajout de sérum. En 1989, l'équipe de Levine découvrit que les ADNc utilisés lors des expériences précédentes différaient du clone isolé de cellules F9 (Finlay *et al.*, 1988). Les différents ADNc étudiés montraient des changements sur plusieurs codons. Ces variations avaient d'abord été considérées comme un polymorphisme, mais l'étude approfondie des séquences présentant ces variations a révélé qu'elles avaient lieu sur des régions très conservées n'étant pas sujettes au polymorphisme. Une nouvelle étude des différents clones isolés permit de conclure que l'ADNc issu des cellules F9 était non-muté et que ceux utilisés dans les expériences de microinjection possédaient des mutations conférant un pouvoir transformant à la protéine. L'effet transformant de ces mutants fût à nouveau démontré lors d'expériences de cotransfection avec l'oncogène Ras actif (Halevy *et al.*, 1990).

L'importance de la protéine p53 dans la protection contre le développement tumoral a ensuite été montré à l'aide de souris n'exprimant pas p53. Ces souris transgéniques développent très rapidement des tumeurs de types sarcomes et lymphomes (Donehower *et al.*, 1992 ; Jacks *et al.*, 1994). Chez l'Homme, c'est l'étude du syndrome de Li-Fraumeni qui a permis de montrer que p53 pouvait jouer un rôle important contre la tumorigenèse. Les patients atteints de cette maladie montrent une mutation germinale de p53 et développent rapidement des carcinomes. Depuis, le gène de p53 a été étudié dans de nombreux cancers et il apparaît que ses mutations surviennent au cours de la progression tumorale et modifient la fonction de p53 qui pourrait, alors, favoriser la progression tumorale au lieu de l'empêcher (Oren & Rotter, 2010).

### *b. Régulation de p53*

La protéine p53 peut être régulée à différents niveaux. Ceci est possible grâce à l'action de nombreux régulateurs positifs et négatifs souvent capables d'induire des boucles de rétrocontrôle. Cette régulation se produit à trois niveaux : au niveau de la stabilisation de la protéine, au niveau de son activité et au niveau de sa distribution cellulaire. Le principal régulateur de p53 est le proto-oncogène HDM2 (*Human Double Minute 2*), l'analogue humain de MDM2 (*Murin Double Minute 2*). L'importance de cette protéine dans la régulation négative de p53 est telle que l'interaction HDM2-p53 est une cible thérapeutique séduisante pour le développement de nouveaux traitements (Chene, 2003 ; Shangary & Wang, 2008). HDM2 est transcrit par p53, ainsi, p53 induit sa propre inhibition par une boucle de rétrocontrôle négative. La fixation de p53 à HDM2 conduit à son ubiquitination et à sa

dégradation par le protéasome. HDM2 se fixe à p53 sur les résidus 18 à 28 de sa région transactivatrice, importante pour son interaction avec les composants de la machinerie transcriptionnelle tels que TBP et le coactivateur transcriptionnel p300. Ainsi, en plus d'induire sa dégradation, HDM2 masque le domaine de transactivation de p53. L'interaction avec HDM2 est indispensable à la dégradation de p53, ainsi, en empêchant cette interaction, p53 est stabilisé dans la cellule. Les modifications post-traductionnelles de p53 à la suite de différents stimuli de stress interrompent cette interaction. La phosphorylation de la sérine 20 par Chk2 ou de la thréonine 18 au niveau de sa région de liaison à HDM2 réduit son affinité pour cette protéine.

*c. p53 et arrêt du cycle cellulaire*

p53 cible des gènes différents en fonction des causes de son activation et conduit, soit à l'arrêt du cycle, soit à l'apoptose. p53 active l'expression de gènes inhibiteurs du cycle cellulaire comme Btg2, Gadd45 ou 14.3.3 $\sigma$  mais surtout le gène de p21Waf1 (Boiko *et al.*, 2006 ; Harms *et al.*, 2004). Btg2 inhibe l'expression des cyclines D et E (Boiko *et al.*, 2006). Gadd45 et la protéine 14.3.3 $\sigma$  coopèrent dans l'inhibition du complexe cycline B/Cdk1 (Harms *et al.*, 2004). Gadd45 empêche la formation du complexe, la cycline B est alors exportée dans le cytoplasme et maintenue inactive par la protéine 14.3.3 $\sigma$ . Une grande partie de l'activité cytostatique de p53 passe par p21Waf1, ces mécanismes seront détaillés dans un paragraphe suivant. L'arrêt du cycle cellulaire induit par p53 peut également se faire par l'inhibition directe ou indirecte de la transcription par p53. Par exemple, p53 est recruté de manière indirecte sur les gènes de Cdk1 ou de la cycline B – notamment par le facteur NF-Y – conduisant au recrutement de corépresseurs tels que les déacétylase d'histones, HDAC (*Histone Deacetylase*) qui désacétylent les gènes pour induire leur inhibition (Imbriano *et al.*, 2005). p53 peut aussi être recruté directement sur le promoteur de Myc et inhiber son activité en recrutant des HDAC (Ho *et al.*, 2005).

*d. p53 et apoptose*

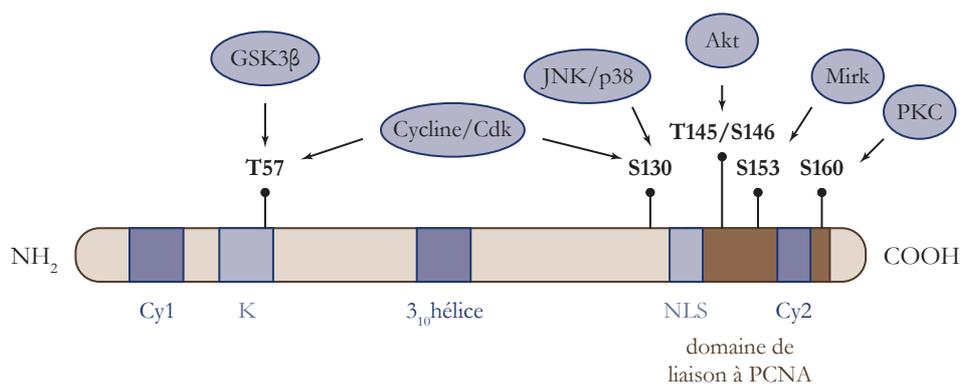
Dans certaines conditions, p53 peut conduire au processus d'apoptose plutôt qu'à l'arrêt du cycle cellulaire. p53 active préférentiellement l'expression de gènes de protéines pro-apoptotiques à un seul domaine BH3 tels que Puma, Bid ou Noxa ou de protéines de mort comme Bax ou p53AIP1. p53 peut aussi augmenter l'expression de

protéines impliquées dans la réponse apoptotique extrinsèque comme les protéines Fas ou Daxx (Harms *et al.*, 2004 ; Yee & Vousden, 2005). La phosphorylation de p53, selon le type de stress et les protéines qui le phosphorylent, est faite sur des résidus différents. Par exemple, un stress oxydatif va conduire à l'activation de p53 par des kinases de stress comme p38 et JNK sur les sérines 33, 46, 81, 376 ou 378 (Bode & Dong, 2004). Ces phosphorylations favorisent la liaison à l'ADN et l'activation de gènes pro-apoptotiques tels que Bax ou p53AIP1 qui possèdent des sites de liaison de faible affinité par rapport à ceux trouvés sur le promoteur de p21Waf1 (Bode & Dong, 2004). La phosphorylation des sérines 15 et 20 va également conduire à l'induction de l'apoptose mais pas de la sénescence (Chao *et al.*, 2006).

### 3. *Le suppresseur de tumeur p21Waf1*

p53 est donc capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire par l'activation de différents inhibiteurs du cycle cellulaire et parmi ces inhibiteurs nous avons déjà cité p21Waf1. Cette protéine appartient à la famille des Cip et Kip comprenant également les protéines p27 et p57. La première observation montrant l'activité de suppresseur de tumeur de p21Waf1 fût l'apparition spontanée de tumeur dans des souris dont le gène *CDKN1A* a été invalidé (Martin-Caballero *et al.*, 2001). p21Waf1 répond à une variété de stimuli de stress par une inhibition de la croissance dépendant de sa capacité à inhiber l'activité des Cdk pour arrêter le cycle cellulaire dans ses différentes phases, mais est aussi capable d'inhiber les voies de réparation de l'ADN dépendantes de PCNA et d'inhiber l'activité transcriptionnelle de E2F1, STAT3 et Myc en se fixant sur leur domaine de transactivation (Abbas & Dutta, 2009).

L'expression de p21Waf1 est principalement régulée à un niveau transcriptionnel mais son activité et sa localisation peuvent l'être à la suite de modifications post-traductionnelles telles que les phosphorylations décrites dans la figure 10. Par exemple, la phosphorylation de la sérine 153 de p21Waf1 conduit à sa localisation cytoplasmique (Rodriguez-Vilarrupla *et al.*, 2005). La phosphorylation des résidus thréonine 145 et sérine 146 conduit également à la relocalisation de p21Waf1 du noyau vers le cytoplasme mais aussi à la perte de sa liaison avec PCNA (Harreman *et al.*, 2004 ; Rossig *et al.*, 2001 ; Warbrick, 2000).



**Figure 10 | Carte de p21Waf1 montrant les principaux motifs d'interactions, les sites de phosphorylation ainsi que les kinases ciblant ces sites.** Cy (*Cyclin-Binding Motif*) ; K (*Cdk-Binding Motif*) ; NLS (*Nuclear Localization Sequence*) (D'après Child & Mann, 2006).

### a. *p21Waf1 et régulation du cycle cellulaire*

L'inhibition de la croissance cellulaire dépendante de p21Waf1 est attribuée à son activité sur deux domaines structuraux : le domaine C-Ter de PCNA et le domaine N-Ter des Cdk. En se fixant à PCNA, p21Waf1 empêche la liaison de l'ADN polymérase  $\delta$  et d'autres protéines impliquées dans la synthèse de l'ADN. Via ses motifs Cy, p21Waf1 agit sur l'interaction des Cdk avec leurs substrats tels que p107 ou p130 – des protéines de la famille de Rb – lorsqu'elles sont complexées à E2F pour le maintenir inactif, empêchant, ainsi la libération de E2F (Shiyanov *et al.*, 1996 ; Zhu *et al.*, 1995). p21Waf1 inhibe aussi Cdk1 et 2 en interférant, respectivement, avec les résidus thréonines 161 et 160 localisés dans la boucle T de leur domaine kinase. Son action inhibitrice peut également agir sur l'interaction entre Cdc25C et le complexe cycline B/Cdk1 dont la déphosphorylation est indispensable à l'entrée en phase M (Saha *et al.*, 1997). p21Waf1 inhibe la progression du cycle cellulaire principalement par l'inhibition de l'activité de Cdk2, requise, non seulement pour la phosphorylation de Rb nécessaire à la libération et l'activation de E2F, mais aussi pour la mise en place des origines de réplication et l'activation des protéines impliquées dans la synthèse de l'ADN. Bien que les autres protéines de la famille de Cip et Kip soient capables d'inhiber l'activité des Cdk, p21Waf1 est particulièrement bien placée pour fonctionner comme un inhibiteur central de Cdk2, car elle est activée en réponse à de nombreux signaux environnementaux pour mettre en place ses activités de suppresseur tumeur. Cependant, certaines études suggèrent que la prolifération de certaines cellules tumorales ne requièrent pas l'activation de Cdk2 (Macias *et al.*, 2007) et que dans certains cas, Cdk2 ne serait pas indispensable à l'inhibition du cycle par p21Waf1 et que cette inhibition passerait, alors, par

Cdk1 pour induire un arrêt du cycle cellulaire en G2 (Martin *et al.*, 2005). Plus récemment, il a aussi été observé que suite à des dommages de l'ADN et en l'absence de Cdk2, p21Waf1 maintenait l'arrêt des cellules en phase G1/S mais que cet arrêt ne permettait pas la réparation des dommages (figure 11A) (Satyanarayana *et al.*, 2008).

### *b. p21Waf1 et régulation de la transcription*

Le rôle de p21Waf1 dans l'inhibition de la prolifération cellulaire peut aussi s'expliquer par sa capacité à moduler la transcription de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Par exemple, p21Waf1 peut s'associer directement à E2F1 et empêcher son activité transcriptionnelle (Delavaine & La Thangue, 1999). En réponse à l'activation de Notch1, p21Waf1 inhibe l'expression de Wnt4 dépendante de E2F1 (Devgan *et al.*, 2005). p21Waf1 se fixe à STAT3 et inhibe l'expression de ces gènes cibles sans empêcher sa fixation à l'ADN (Coqueret & Gascan, 2000). De la même manière, p21Waf1 réprime la transcription des gènes cibles de Myc en interagissant avec la région N-Ter de Myc. Cette interaction empêche la dimérisation de Myc avec Max, son partenaire activateur de la transcription (figure 11C) (Kitaura *et al.*, 2000). Suite aux cassures de l'ADN, p21Waf1 est aussi recrutée sur le promoteur du gène de Cdc25A. Ce recrutement est associé à l'inhibition de l'acétylase d'histone, p300, et à l'inhibition de l'expression du Cdc25A (Vigneron *et al.*, 2006). Il a aussi été montré qu'une surexpression de p21Waf1 conduisait à l'inhibition des promoteurs de Plk1 – une protéine intervenant au cours de la mitose – et de la Topoisomérase II (Zhu *et al.*, 2002). p21Waf1 est nécessaire et suffisante pour inhiber l'expression de nombreux gènes régulés en aval de p53 tels que les gènes de Cdc25C, Cdk1, Chk1, de la cycline B1, de TERT ou le que gène de la protéine anti-apoptotique Survivine (Lohr *et al.*, 2003 ; Shats *et al.*, 2004). Ces régulations sont indirectes, dépendantes de la régulation par Cdk2 des facteurs NF- $\kappa$ B pour la cycline B1 et Cdk1 ou de E2F pour les autres (Gottifredi *et al.*, 2001 ; Park *et al.*, 2000 ; Shats *et al.*, 2004 ; Taylor & Stark, 2001 ; Yun *et al.*, 2003). p21Waf1 est aussi capable d'induire sa propre expression en levant l'inhibition de CBP-p300 provoquant de cette manière, une boucle d'amplification de son expression (Snowden *et al.*, 2000).

### *c. p21Waf1 et modulation de l'apoptose*

Une autre fonction de p21Waf1 est sa capacité à réguler l'apoptose (figure 11D). Lorsque p21Waf1 est exprimée suite à la détection d'un stress, le déclenchement de l'arrêt du

cycle cellulaire qu'il provoque empêche la cellule de mettre en place le processus apoptotique. L'installation des mécanismes apoptotiques nécessite un cycle cellulaire actif, en particulier lors de traitements génotoxiques ou en présence d'agents visant à déstabiliser les microtubules. Ce phénomène est réversible, par exemple, à la suite d'une inhibition de la transcription du gène *CDKN1A* – codant pour la protéine p21Waf1 – ou à la suite de différentes modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations conduisant à la relocalisation de p21Waf1 dans le cytoplasme, ou à sa dégradation.

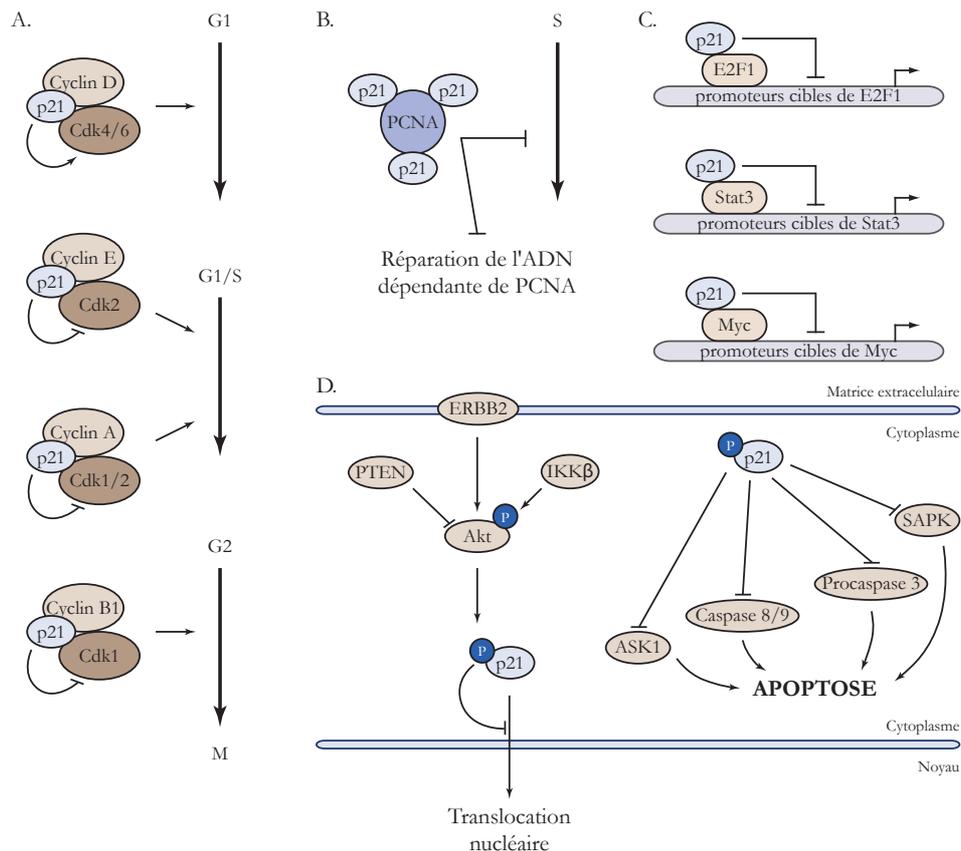
Mais lors de sa relocalisation cytoplasmique, p21Waf1 peut aussi réguler l'apoptose négativement. En effet, la phosphorylation de la thréonine 145 par Akt – lui-même activé par la PI3K – empêche la translocation nucléaire de p21Waf1. La forme cytoplasmique de p21Waf1 montre une activité anti-apoptotique par l'inhibition de plusieurs protéines impliquées dans l'apoptose telles que la pro-caspase 3, les caspases 8 et 10, les protéines SAPK (*Stress-Activated Protein Kinases*) et ASK1 (*Apoptosis Signal Kinase 1*). p21Waf1 inhibe l'apoptose induite par le récepteur Fas en empêchant l'activation de la caspase 3 (Suzuki *et al.*, 1999).

Paradoxalement, dans certaines études, p21Waf1 semble montrer un effet pro-apoptotique. Les mécanismes par lesquels ce phénomène est possible ne sont pas clairs, mais il semblerait qu'ils dépendent de l'activation de la protéine pro-apoptotique Bax et que cette activation soit possible dans des conditions dépendantes ou non de p53 (Gartel, 2005).

#### *d. p21Waf1 et réparation de l'ADN*

Le premier rôle de p21Waf1 dans la réponse aux dommages de l'ADN est sa fonction dans l'arrêt du cycle cellulaire. p21Waf1 permet aux mécanismes de réparation de l'ADN d'agir tandis que l'apoptose est inhibée. Cependant, p21Waf1 interagit avec PCNA empêchant sa liaison à d'autres partenaires nécessaires à la réparation de l'ADN par le MMR (*MisMatch Repair*) ou le BER (*Base Excision Repair*) (figure 11B) (Tom *et al.*, 2001 ; Umar *et al.*, 1996). p21Waf1 pourrait également jouer un rôle dans la régulation du système NER (*Nucleotide Excision Repair*) (Gratchev, 2008).

## Introduction générale



**Figure 11 | Fonctions de p21Waf1 dans le développement tumoral.** **A.** Dans certaines conditions, p21Waf1 maintient l'activité du complexe cycline D/Cdk4 ou 6 permettant ainsi la progression de la phase G1. p21Waf1 inhibe l'activité kinase des Cdk1 et 2 qui sont requises pour la progression du cycle cellulaire dans les phases S, G2 et M. **B.** Par son domaine C-Ter, p21 se fixe à PCNA pour inhiber la synthèse de l'ADN et moduler la voie de réponse aux dommages de l'ADN dépendante de PCNA. **C.** p21Waf1 est capable d'inhiber l'expression des gènes cibles de E2F1, STAT3 ou Myc en se fixant et en inhibant leur domaine de transactivation contribuant ainsi à l'effet anti-apoptotique de p21Waf1. **D.** La phosphorylation de la thréonine 145 de p21Waf1 par Akt empêche la translocation nucléaire de p21Waf1. En restant dans le cytoplasme, p21Waf1 inhibe l'activité de protéines impliquées dans l'apoptose (D'après Abbas & Dutta, 2009).

Le rôle bénéfique de la régulation de la réparation de l'ADN par p21Waf1 est évident quant à la protection contre l'instabilité génomique et la tumorigenèse. Cependant, l'inhibition de réparation des cassures de l'ADN associée à l'inhibition de l'apoptose empêcherait l'élimination d'une cellule tumorale malgré une instabilité génomique qui devrait induire l'apoptose. Ce cas de figure soutient la théorie consistant à dire que p21Waf1 peut avoir un rôle pro-oncogénique.

#### 4. *Choix entre apoptose et arrêt du cycle cellulaire*

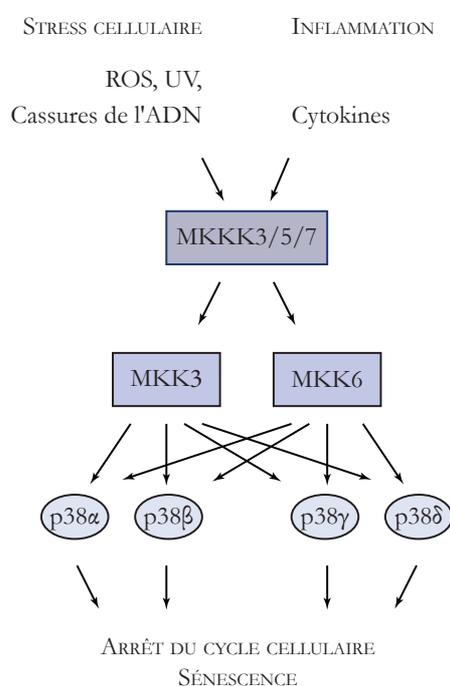
Nous l'avons vu précédemment, en fonction de sa localisation cellulaire, nucléaire ou cytoplasmique, p21Waf1 peut avoir, respectivement, un rôle d'inhibiteur du cycle cellulaire, ou un rôle anti-apoptotique. L'activité anti-apoptotique de p21Waf1 a conduit à penser, que dans certaines circonstances p21Waf1 pourrait avoir une activité oncogénique. Cette théorie s'appuie sur des études génétiques chez la souris montrant que l'inactivation du gène *CDKN1A* supprimerait le développement spontané de lymphomes découlant de l'absence de p53 (De la Cueva *et al.*, 2006) ou de ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) (Wang *et al.*, 1997). Il est intéressant de noter que, chez les souris dont le gène *CDKN1A* a été invalidé, les lymphomes émergeant montrent un fort taux d'apoptose, suggérant que l'activité anti-apoptotique de p21Waf1 serait pro-tumorigénique (Roninson, 2002). La sensibilité des lymphomes à l'activité anti-apoptotique de p21Waf1 pourrait s'expliquer par l'importance de cette protéine dans le processus de différenciation cellulaire. Il est possible qu'une tumorigenèse réduite en l'absence de p21Waf1 soit due au blocage de la différenciation cellulaire à un stade dans lequel les cellules ne peuvent pas proliférer. Il existe une balance entre prolifération et différenciation cellulaire. Selon les stimuli environnementaux reçus par la cellule, les voies de signalisation activées détermineront son destin et les facteurs en aval de ces voies conduiront la cellule à proliférer ou bien à se différencier. Ces mécanismes seront décrits au cours du chapitre V.

#### 5. *La voie de p38 MAP Kinases*

Lors d'un signal de stress certaines protéines, et notamment les kinases de la voie de p38 MAP Kinases, permettent la transduction du signal et une réponse adaptée. La voie p38 MAP Kinases est impliquée dans la réponse aux facteurs de croissance, aux stress environnementaux ou aux stimuli inflammatoires. Ces phénomènes pouvant eux-mêmes être impliqués dans le processus de tumorigenèse, la voie p38 MAP Kinases est aussi décrite comme ayant un rôle dans la détection de l'oncogène.

Les protéines p38 des membres de la classe des SAPK (*Stress-Activated Protein Kinase*) sont des MAP Kinases impliquées dans la réponse au stress cellulaire (Goedert *et al.*, 1997). Quatre gènes codent pour les protéines p38 MAP Kinases. *MAPK14* code pour p38 $\alpha$ , *MAPK11* code pour p38 $\beta$ , *MAPK12* code pour p38 $\gamma$  et *MAPK13* code pour la protéine

p38 $\delta$ . Les formes p38 $\alpha$  et p38 $\beta$  ont des fonctions très proches, en revanche, p38 $\alpha$  est très abondante dans de nombreuses cellules alors que p38 $\beta$  est faiblement exprimé. p38 $\gamma$  et p38 $\delta$  ont un profil d'expression plus restreint et des fonctions plus spécialisées. Les protéines p38 sont activées par les kinases MKK3, MKK6 et parfois MKK4, mais sont aussi capables d'autophosphorylation (Cuenda & Rousseau, 2007 ; Mittelstadt *et al.*, 2005). p38 active ensuite différents facteurs de transcription, notamment p53 pour permettre l'induction de la sénescence ou de l'apoptose, mais aussi ATF2, ELK1, MEF2, C/EBP $\beta$  et d'autres protéines kinases comme MK2, MSK1, MNK1 et MNK2 (Cuenda & Rousseau, 2007 ; Ono & Han, 2000) (figure 12).



**Figure 12 | Schéma de la voie d'activation de p38/MAPK.** À la suite d'un stress cellulaire les protéines p38 sont activées par phosphorylation de leur résidus thréonine et tyrosine par les MAP Kinase Kinase elles-mêmes activées par phosphorylation. Les sérine/thréonine kinases p38 activent alors des protéines cytoplasmiques ou nucléaires pour induire l'arrêt du cycle cellulaire ou la sénescence (D'après Cuadrado & Nebreda, 2010).

### *a. Implication de p38 dans l'arrêt du cycle cellulaire*

p38 est un acteur de l'induction de l'apoptose ou de l'arrêt du cycle cellulaire (Bulavin & Fornace, 2004 ; Hui *et al.*, 2007). La voie p38 MAP Kinases tout d'abord été décrite comme étant activée par le lipopolysaccharide (Han *et al.*, 1994) et jouant un rôle prépondérant dans l'inflammation (Waetzig *et al.*, 2002). Aujourd'hui il est admis qu'un stress

généotoxique ou qu'un oncogène peut également être responsable de l'activation de cette voie. p38 inhibe, alors, la progression du cycle cellulaire en phases G1/S ou G1/M via l'activation de p53, ou par une inhibition plus directe des complexes cycline/Cdk. Par exemple, suite à l'irradiation des cellules par des ultraviolets, p38 phosphoryle la sérine 309 de Cdc25B permettant sa liaison à 14-3-3 et l'activation du point de contrôle de la phase G2/M et l'arrêt du cycle cellulaire (Bulavin *et al.*, 2001). La voie p38 MAP Kinases conduit aussi à l'entrée en sénescence des cellules primaires suite à l'expression de H-Ras en phosphorylant p53 et en augmentant l'expression de p16Ink4a (Deng *et al.*, 2004 ; Han & Sun, 2007). Il lui a également été attribué un rôle dans l'induction de l'apoptose, notamment dans la réponse au récepteur Fas (Raoul *et al.*, 2002).

Il a également été montré que p38 pouvait activer le facteur C/EBP permettant ainsi la différenciation de cellules progénitrices du poumon chez la souris (Ventura *et al.*, 2007). Dans cette même étude, il a été montré que p38 contrôlait le renouvellement de ces cellules en inhibant la prolifération et que son inactivation induisait une sensibilisation à la tumorigenèse induite par Ras. Son rôle dans la différenciation et la prolifération cellulaire contribue à lui attribuer une fonction de suppresseur de tumeur. Tout comme les JNK, la voie de p38 MAPK est souvent dérégulée dans les cancers.

## **6. Mutation sur les gènes suppresseurs de tumeur**

L'inhibition des gènes suppresseurs de tumeur est expliquée par les mêmes mécanismes que ceux responsables de l'activation des proto-oncogènes à la différence que les mutations rencontrées induisent une perte de fonctionnalité de la protéine. Précédemment nous avons décrit l'importance du rôle de p53 dans le maintien d'un cycle cellulaire normal. Différents mécanismes peuvent expliquer la perte de son activité lors de la tumorigenèse, notamment des mutations conduisant au déficit de sa fonction apoptotique ou des mutations sur des médiateurs en aval de la réponse à p53. Les mutations de TP53 peuvent se trouver sur ses domaines de régulation en N-ter (aa 1-99) ou en C-ter (aa 301-393), mais dans 95 % des cas, p53 est mutée sur sa région centrale, responsable de la liaison à l'ADN (aa 100-300). On peut citer les mutations par substitution les plus couramment rencontrées, telles que R175H, G245S, R248Q, R249S, R273H et R282W (Vousden & Lu, 2002). Il est intéressant de noter que la mutation R273L de p53 empêche l'expression de p21Waf1 mais permet l'induction de l'apoptose.

Un autre moyen d'inactivation des suppresseurs de tumeur repose sur la méthylation des îlots CpG conduisant à la relocalisation du gène d'une région d'euchromatine vers une région d'hétérochromatine et à l'inhibition de leur expression (Issa, 2004). L'inactivation du locus INK4/ARF est l'une des inhibitions de loci les plus fréquentes dans les tumeurs. La perte de l'expression complète du gène s'explique par la mutation de l'un des allèles à laquelle s'additionne la méthylation du second. La méthylation entraîne, alors, la perte d'expression d'une des trois protéines ARF, p15 ou p16, ou des trois protéines à la fois. Dans une moindre mesure, le suppresseur de tumeur p27Kip1 peut également être méthylé dans certains cancers mais cet événement serait probablement une conséquence plus qu'un événement initiateur de la tumorigenèse (Auerkari, 2006). Le gène codant pour la protéine APC est fréquemment méthylé dans les cancers colorectaux et cette inactivation conduit à l'activation d'oncogènes tels que la  $\beta$ -Caténine et c-Myc (Arnold *et al.*, 2004).

## Chapitre III : La sénescence cellulaire

La sénescence a d'abord été décrite comme un état permanent d'arrêt du cycle cellulaire résultant d'un épuisement répliatif de fibroblastes diploïdes humains en culture (Hayflick, 1965). Ce mécanisme implique la détection de la diminution des télomères. Nous savons aujourd'hui que la sénescence n'est pas uniquement répliative, mais qu'elle peut aussi trouver son origine dans la réponse à de nombreux stress. Elle est, de nos jours, définie par un arrêt définitif du cycle cellulaire qui devient insensible aux signaux de croissance (Stein *et al.*, 1991). Il est généralement admis que les cellules somatiques, ou du moins les cellules en prolifération, maintiennent leur capacité à induire la sénescence comme mécanisme suppresseur de tumeur. Cependant, la capacité à engager ce phénomène peut également mener à des pathologies liées à l'âge (Vijg & Campisi, 2008). Quel que soit le type de sénescence, ce processus est principalement régulé par deux protéines, p53 et Rb, suppresseurs de tumeurs dont les gènes sont fréquemment mutés ou perdus dans les cellules cancéreuses.

La sénescence cellulaire peut donc avoir différentes origines. La réduction des télomères au cours des divisions cellulaires en est une et conduit à l'activation de la sénescence répliative. Les types de sénescence activés lors d'un stress autre que celui impliquant la réduction des télomères sont des alternatives à la sénescence répliative et entrent notamment en jeu dans la réponse à la progression tumorale. Nous nous intéresserons donc, ici, au type de sénescence indépendante de la voie des télomères appelée SIPS (*Stress-Induced Premature Senescence*).

### A. Signature des cellules sénescentes

Les cellules sénescentes répondent à un certain nombre de caractéristiques telles que l'apparence ou l'expression de différents marqueurs cellulaires. Ces caractéristiques se retrouvent à la fois dans les cellules ayant subi une sénescence répliative et dans celles ayant subi une sénescence prématurée induite par un stress ou SIPS et sont listées ci-après : une morphologie cellulaire altérée (souvent élargie, aplatie, multivacuolée et multinucléée), une augmentation de l'activité de la SA- $\beta$ -Gal, une accumulation des foci de dommages de l'ADN et des foci d'hétérochromatine ou SAHF (*Senescence Associated Heterochromatin Foci*), une instabilité chromosomique et l'induction d'un sécrétome inflammatoire.

La détection histochimique de l'activité de la SA- $\beta$ -Gal est possible à pH 6 dans des cellules sénescents en culture. Ce marqueur est présent dans des cellules sénescents mais pas au cours de la mise en place de la sénescence. Le rôle de la SA- $\beta$ -Gal dans ce processus n'a pas été décrit. En outre, l'augmentation de son activité n'a, à ce jour, été connectée à aucune voie de signalisation conduisant à la sénescence. Cependant, son activation reste l'un des marqueurs les plus utilisés avec la modification morphologique des cellules (Sikora *et al.*, 2010). Pourtant, l'activité de la SA- $\beta$ -Gal est également particulièrement élevée au cours de phénomènes tels que l'inhibition de contact, la privation de sérum, ou est même existante dans certains types de cellules *in vivo* – notamment les kératinocytes (Severino *et al.*, 2000). Ces observations amènent à s'interroger sur l'interprétation de l'augmentation de l'activité de la SA- $\beta$ -Gal dans le phénomène de sénescence.

La formation d'hétérochromatine est une caractéristique importante de la sénescence. Dans les cellules sénescents s'accumulent les structures d'hétérochromatine dans lesquelles sont retrouvées le suppresseur de tumeur Rb, ainsi que la protéine HP1 (*Heterochromatin Protein 1*). Ces protéines sont recrutées au niveau des promoteurs des gènes cibles de E2F conduisant à une répression stable de ces gènes. La formation des SAFH ainsi que l'inhibition des gènes cibles de E2F dépend de l'intégrité de la voie de Rb et ne se produit pas lors d'un arrêt réversible du cycle cellulaire (Narita *et al.*, 2003). Au niveau des SAFH, les histones subissent des modifications post-traductionnelles comme la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9Me) permettant le recrutement de HP1 et nécessaire à la condensation de la chromatine. La méthyltransférase d'histones, SUV39H1 interagit également avec Rb au niveau des SAFH (Nielsen *et al.*, 2001). L'inclusion de gènes responsables de l'induction de la prolifération – comme par exemple la cycline A – dans les sections d'hétérochromatine empêche l'expression de ces gènes (Narita *et al.*, 2006). Cette observation appuie la notion de la sénescence comme barrière contre la progression tumorale.

## **B. Réponse aux dommages de l'ADN et sénescence**

Aujourd'hui, certaines données semblent indiquer que la réponse aux dommages de l'ADN serait une caractéristique de la sénescence (d'Adda di Fagagna, 2008). En effet, lorsque les télomères raccourcissent jusqu'à leur niveau critique, leurs extrémités sont reconnues comme des cassures doubles brins. De la même manière que celles présentes tout

au long du génome, ces cassures activent l'entrée en sénescence. Mais la réponse aux dommages de l'ADN est également impliquée dans la sénescence induite par un stress (d'Adda di Fagagna, 2008), et notamment à la suite de cassures liées au stress réplicatif induit par l'oncogène (Bartkova *et al.*, 2006).

La réponse aux dommages de l'ADN est régulée par des complexes de protéines, tels que le complexe MRN (MRE-Rad50-NBS1), capables d'induire l'activation des kinases ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) et ATR (*ATM and Rad3-related*) elles-mêmes conduisant à l'activation de Chk1 et Chk2. Finalement, la voie de réponse aux dommages de l'ADN active p53 qui, via l'activation de ces gènes cibles, conduit à l'entrée en sénescence ou en apoptose (d'Adda di Fagagna, 2008 ; Prieur & Peeper, 2008). En accord avec le fait que la signalisation des dommages de l'ADN soit activée au cours de la sénescence, le nombre de foci de  $\gamma$ H2Ax augmente dans les cellules primaires sénescents en culture (Nakamura *et al.*, 2008). De plus, chez la souris âgée,  $\gamma$ H2Ax et l'activité de la SA- $\beta$ -Gal sont détectés dans les mêmes cellules (Wang *et al.*, 2009a). Toutefois, si l'activation de la signalisation des dommages de l'ADN est une cause de l'entrée en sénescence des cellules, son utilisation en tant que marqueur de la sénescence requière une plus grande connaissance de son implication dans ce phénomène.

La voie de signalisation des dommages de l'ADN induit l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire afin de garantir l'intégrité du génome et une ségrégation correcte des chromosomes (Jackson & Bartek, 2009). Au cours de maladies liées à l'âge, dans certaines cellules sénescents, ces points de contrôle ne sont plus fonctionnels. S'en suit alors une augmentation de l'instabilité génomique manifestée par l'apparition d'aneuploïdie ou de polyploïdie, qui pourrait être impliquée dans l'échappement à la sénescence (Mosieniak & Sikora, 2010).

### **C. La sénescence induite par l'oncogène**

Il est largement admis que les cellules normales sont réfractaires à la transformation par un oncogène (Newbold & Overell, 1983). La sénescence induite par l'oncogène, ou OIS (*Oncogene-Induced Senescence*), a été décrite pour la première fois dans des cellules normales. L'expression de l'oncogène H-RasV12 dans des fibroblastes a permis d'observer un nouveau type de sénescence indépendant de la signalisation des télomères (Serrano *et al.*, 1997). Ce type de sénescence se distingue de la sénescence répllicative par une

activation plus aiguë et se classe dans la catégorie de sénescence induite par un stress (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Avec l'apoptose, la sénescence induite par l'oncogène est considérée comme une barrière contre le cancer lorsque les dommages de l'ADN sont trop importants pour être réparés (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007 ; Lowe *et al.*, 2004).

Lors de la transformation par B-RafV600E – une forme autoactive de B-Raf – les cellules subissent une forte prolifération conduisant au développement d'un adénome dans le cancer du poumon, ou d'une hyperplasie dans le mélanome chez la souris. S'en suit une diminution de la prolifération et l'entrée en sénescence (Dankort *et al.*, 2007 ; Goel *et al.*, 2009). La transformation par H-RasV12 provoque également l'entrée en sénescence, et ce de manière dose-dépendante (Mo *et al.*, 2007 ; Sarkisian *et al.*, 2007). L'oncogène Myc, quant à lui, induit préférentiellement l'apoptose lors de la transformation cellulaire et la réponse de la cellule à cet oncogène est également dépendante de son taux d'expression dans la cellule (Murphy *et al.*, 2008).

La sénescence cellulaire n'est pas seulement induite par l'expression d'un oncogène, mais peut également l'être par la perte d'expression d'un gène suppresseur de tumeur. Selon leur rôle dans l'induction de la sénescence, les suppresseurs de tumeur peuvent être classés en deux types. Certains suppresseurs tels que PTEN, NF1 ou Rb empêchent l'activation excessive d'un oncogène de manière constitutive. Leur perte conduit alors à l'activation d'oncogènes, respectivement ici, la PI3K, Ras et E2F. En conséquent, la perte de ce type de suppresseur de tumeur conduit à une prolifération excessive à la mise en place de la sénescence de manière indirecte. À l'inverse, la perte de suppresseurs de tumeurs tels que p53, p16Ink4a ou p14ARF altère la sénescence et permettent la progression tumorale (Collado & Serrano, 2010).

### ***1. Le phénotype sécrétoire associé à la sénescence***

Les cellules sénescents sécrètent de nombreux facteurs, notamment des cytokines, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1), du TGF- $\beta$ . Ces médiateurs font partis de ce qu'on appelle le SAPS (*Senescence-Associated Secretory Phenotype*) (Campisi, 2005 ; Coppe *et al.*, 2008 ; Kuilman & Peeper, 2009). De solides preuves semblent indiquer que beaucoup de ces facteurs ne sont pas seulement associés à la sénescence mais y contribuent. Pour l'instant, PAI-1 est considéré comme étant seulement relié à la sénescence mais a été montré comme étant capable d'inciter le phénomène (Kortlever *et al.*, 2006).

Lors de la transformation par B-RafV600E, le facteur de transcription C/EBP $\beta$  induit l'expression de l'interleukine 6 (IL6) conduisant à une boucle d'amplification de la voie. Cette boucle d'amplification active le suppresseur de tumeur p15/Ink4b ainsi qu'une réponse inflammatoire et notamment l'expression de la cytokine inflammatoire IL8 (Kuilman *et al.*, 2008). L'association des interleukines IL6 et IL8 permet aux cellules d'imposer le processus de sénescence de manière autonome. L'IL1 $\alpha$  est une cytokine présentant de multiples fonctions et est notamment connue pour être une composante du phénotype sécrétoire associé à la sénescence ou SAPS (Campisi, 2005). Elle est également un régulateur situé en amont de la sénescence associée à l'IL6 et l'IL8. Le blocage de cette protéine lors de la sénescence induite par les dommages de l'ADN, l'épuisement répliatif ou induite par l'oncogène Ras, conduit à une diminution de la sécrétion d'IL6 et d'IL8 (Orjalo *et al.*, 2009). Il est intéressant de noter que la signalisation des dommages de l'ADN est capable d'initier et de maintenir la sécrétion des cytokines indépendamment de p53 et Rb (Rodier *et al.*, 2009).

Les médiateurs de l'inflammation sont très importants dans la sénescence induite par H-RasV12. Les chémokines exprimées à la suite de la transformation par H-RasV12, via C/EBP $\beta$  et NF- $\kappa$ B renforcent la sénescence grâce à l'expression du récepteur à chémokines, IL8R $\beta$ , autrement nommé CXCR2 (Acosta *et al.*, 2008). Le rôle des protéines p38 dans l'inflammation est largement établi. Ces protéines jouent également un rôle dans la réponse au stress oncogénique induit par Ras et leur inhibition empêche l'induction de la sénescence. p38 $\gamma$  serait responsable de la phosphorylation de p53 sur la sérine 33, augmentant ainsi son activité transcriptionnelle. p38 $\alpha$ , en revanche, agirait de manière indépendante de p53 et conduirait à la sénescence via l'expression de p16Ink4a (Kwong *et al.*, 2009).

Le SAPS n'agit pas seulement de manière autocrine. Il peut également avoir une influence sur son environnement et agir de manière paracrine. L'effet paracrine du SAPS dépend du contexte cellulaire. En effet, les cellules normales ou les cellules précancéreuses de bas grade répondraient préférentiellement à ce signal par l'induction de la sénescence. En revanche, les cellules cancéreuses et précancéreuses de haut grade progresseraient dans le développement tumoral (Gorgoulis & Halazonetis, 2010).

## 2. *Sénescence et autophagie*

Les radicaux libres de l'oxygène (ROS) produits par la mitochondrie lors de la transformation oncogénique sont également responsables de l'entrée en sénescence des cellules (Moiseeva *et al.*, 2009). Les auteurs ont montré une augmentation de la production de ROS liée au dysfonctionnement de la mitochondrie avant l'entrée en sénescence induite par H-RasV12. La sénescence demande une importante ressource énergétique à la cellule. L'autophagie est un processus de régulation. Il en résulte la séquestration des composants intracellulaires et leur dégradation lysosomale. Ce phénomène permet la régulation de l'énergie à la suite d'une réponse au stress cellulaire (Wilkinson & Ryan, 2010).

Lors de la transformation par H-RasV12, il a été montré que les cellules exprimaient les gènes *ATG* impliqués dans l'autophagie et que l'inhibition de ce processus par l'extinction des gènes *ATG5* et *ATG7* retardait l'entrée en sénescence des cellules (Young *et al.*, 2009). La sénescence serait alors un inducteur de la sénescence. De plus, la signalisation de mTOR – un inhibiteur de l'autophagie inhibé par la voie Ras/PI3K – est inactivée lors de la sénescence. Le fait que l'expression d'un des gènes clef de l'autophagie, *ATG6/Beclin* soit supprimée dans les cancers ajoute une preuve au rôle de l'autophagie dans la protection contre le développement tumoral (Qu *et al.*, 2003). Cependant, l'autophagie peut être utilisée à un faible niveau par les cellules au cours du processus de transformation. En effet, certaines études indiquent que les cellules induiraient l'autophagie en réponse à un stress métabolique pour permettre la survie cellulaire (White *et al.*, 2010). L'autophagie pourrait alors permettre l'échappement à l'OIS.

## Chapitre IV : L'oncogène Ras

### A. La protéine Ras, généralités

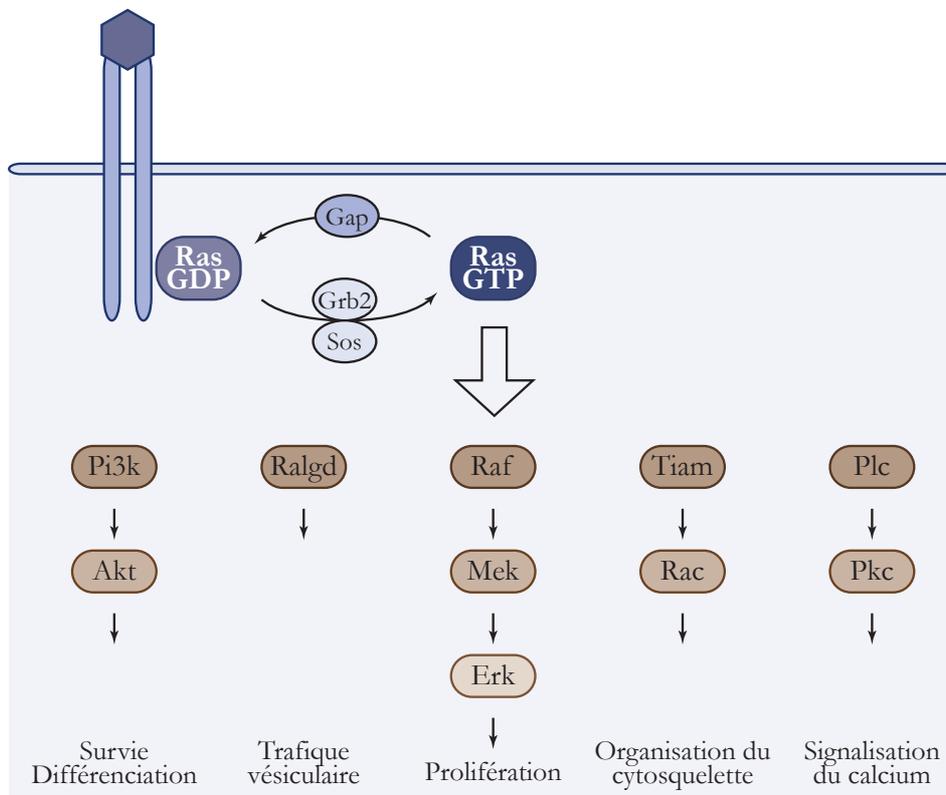
#### 1. *Fonctionnement et activation de Ras*

La protéine Ras est une protéine G de 21 kDa associée à la face interne de la membrane plasmique et capable d'échange entre le GTP et le GDP. Son activité est régulée par la liaison, tantôt activatrice de GTP, tantôt inhibitrice de GDP. Les GEF (*Guanine Nucléotide Exchange Factors*), comme SOS, catalysent le relargage de GDP alors que les GAP (*GTPase Activating Proteins*) catalysent l'hydrolyse du GTP (Colicelli, 2004). Ras est activée en réponse à des signaux environnementaux via des récepteurs de facteurs de croissance comme l'EGFR. A la suite de la fixation de l'EGF, le récepteur à tyrosines kinases s'autophosphoryle et recrute les protéines GEF. Ras est alors activée grâce au chargement du GTP par Grb2/SOS, et active, à son tour, différents effecteurs pour réguler la prolifération cellulaire et la survie. Parmi ces effecteurs, la protéine Raf va activer la voie des MAP Kinases Mek/Erk. Ras active Raf en induisant un changement conformationnel de la protéine. La cascade d'activation de kinases qui en découle permet l'activation de la transcription des gènes du cycle cellulaire et sera décrit dans le paragraphe suivant. Ras est également capable d'activer la voie de la PI3K (*PhosphoInositol-3-Kinase*) qui recrute PDK1 via son domaine d'homologie pleckstrin et phosphoryle et active la kinase AKT. Cette voie sous-jacente conduit à une augmentation de la survie cellulaire et active mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) augmentant la biosynthèse des ribosomes et la traduction des ARNm.

#### 2. *Les différentes isoformes de Ras*

Il existe trois isoformes de Ras, K-Ras, H-Ras et N-Ras. Les séquences de ces trois isoformes sont très similaires, 85 % de leurs séquences d'acides aminés sont identiques, et aucune variabilité fonctionnelle n'a été clairement définie. Il existe, toutefois, quelques différences entre ces protéines au niveau de leur expression. Toutes trois sont largement exprimées mais K-Ras l'est dans pratiquement tous les types cellulaires. Des études génétiques ont montré que, contrairement à K-Ras, H-Ras et N-Ras, n'étaient pas nécessaires au développement normal chez la souris. Nous pouvons aussi noter qu'à la différence de K-Ras, H-Ras et N-Ras possèdent un groupement palmitoylé permettant leur localisation dans

l'appareil de Golgi. K-Ras, en revanche, est uniquement retrouvée sous la membrane plasmique, localisation indispensable à l'activité de Ras. Les modifications post-traductionnelles de Ras sont indispensables à sa localisation sous la face interne de la membrane plasmique. Les protéines Ras qui ne se trouvent pas localisées sous la membrane sont inactives, probablement parce qu'elles sont incapables de recruter leurs protéines cibles. Le fait que la protéine Ras nécessite d'être correctement localisée pour être active conduit de nombreuses études à viser les enzymes responsables des modifications post-traductionnelles de Ras comme cibles thérapeutiques (Ali *et al.*, 2010).



**Figure 13 | Voie d'activation de Ras.** À la suite d'un signal mitogénique reçu par un récepteur (comme, par exemple, l'EGFR), Ras lie un GTP permettant son activation. Ras interagit alors avec plusieurs effecteurs conduisant à la survie cellulaire, la différenciation, le trafic vésiculaire la prolifération, l'organisation du cytosquelette ou la signalisation du calcium (D'après Downward, 2003).

## B. Rôle de Ras dans la tumorigénèse

En 1982, un gène issu de cellules de carcinome de poumon humain montrant une activité transformante dans des fibroblastes fut décrit comme un homologue du gène transformant originaire du virus du sarcome de Kirsten chez le rat (Der *et al.*, 1982). Ce fut la première indication amenant à considérer K-Ras comme un oncogène chez l'Homme. Nous

savons aujourd'hui que Ras est l'un des oncogènes les plus fréquemment activés dans les cancers. 17 à 25 % de l'ensemble des cancers humains présentent une mutation sur le gène de K-Ras, et environ 30 % des cancers colorectaux possèdent une mutation sur ce gène.

En parallèle de ces mutations, les mécanismes indirects d'activation de Ras permettent son activation chronique malgré l'absence de mutation. La protéine Nf1 est une protéine GAP responsable de l'hydrolyse du GTP en GDP. Elle est impliquée dans la régulation de l'expression de Ras et conduit donc à son inhibition. Les mutations de Nf1 empêchent la régulation négative de Ras. D'une autre manière, à un stade avancé de la maladie, l'EGFR est surexprimé dans 65 à 70 % des cancers colorectaux (Lockhart & Berlin, 2005) conduisant à l'activation constitutive de Ras.

Le fait que Ras soit fréquemment muté dans différents types de tumeurs, ou qu'elle soit activée par des mécanismes situés en amont suggère que le signal prolifératif induit par Ras joue un rôle important dans la tumorigenèse, et en effet, son rôle clef dans la transformation oncogénique a été établi dans de nombreuses études. La capacité de Ras à transformer des cellules dépend de son interaction avec ses effecteurs sous-jacents et notamment la protéine Raf et la voie des MAP Kinases, mais aussi la voie de la PI3K, des protéines RalGDS, de la phospholipase-C $\epsilon$  et Rac (Luo *et al.*, 2009).

### ***1. Activation de la voie de Ras dans le cancer***

L'isoforme K-Ras est la plus exprimée et la plus souvent mutée dans les cancers. Elle représente 85 % des isoformes mutées, N-Ras représentant 15 % et H-Ras moins de 1 %. Les mutations retrouvées sur ces trois isoformes compromettent à chaque fois l'hydrolyse du GTP par les GAP sur Ras. Ras est alors liée à un GTP et reste active à tout moment. Les mutations activatrices les plus répandues se retrouvent principalement sur ses codons 12, 13 et 61 de K-Ras (Bos, 1989). Environ 20 % des tumeurs humaines possèdent une mutation de l'une des isoformes de Ras. Toutefois, l'activation de la voie de signalisation de Ras peut être causée par l'activation ou l'inactivation de d'autres protéines en amont ou en aval de Ras. Par exemple l'activation des récepteurs de facteurs croissance, la mutation ou l'amplification d'effecteurs de Ras peuvent conduire à l'activation du signal de Ras et favoriser le développement tumoral. Selon les types de cancers, différentes protéines sont touchées (tableau 1).

Défaut/Mutation	Type de tumeur	Fréquence (%)
Mutation de <i>RAS</i>	Pancréas	90 ( <i>KRAS</i> )
	Adénocarcinome du poumon (non à petites cellules)	35 ( <i>KRAS</i> )
	Colorectal	45 ( <i>KRAS</i> )
	Thyroïde (folliculaire)	55 ( <i>HRAS, KRAS, NRAS</i> )
	Thyroïde (papillaires non différenciés)	60 ( <i>HRAS, KRAS, NRAS</i> )
	Séminome	45 ( <i>KRAS, NRAS</i> )
	Mélanome	15 ( <i>NRAS</i> )
	Vessie	10 ( <i>HRAS</i> )
	Foie	30 ( <i>NRAS</i> )
	Rein	10 ( <i>HRAS</i> )
	Syndrome myéloдисplasique	40 ( <i>KRAS, NRAS</i> )
	Leucémie myéloïde aiguë	30 ( <i>NRAS</i> )
	Mutation de <i>BRAF</i>	Mélanome
Colorectal		12
Surexpression de l' <i>EGFR</i>	Carcinomes	> 50
Amplification de <i>ERBB2</i>	Sein	30
Perte de <i>PTEN</i>	Glioblastome multiforme	20 - 30
	Prostate	20
	Pancréas	40
Amplification de <i>AKT2</i>	Ovaires	12
	Pancréas	10
Amplification de <i>PI3K</i>	Ovaires	40

**Tableau 1 | Activation de la voie de signalisation de Ras dans différents types de tumeurs** (D'après Downward, 2003).

Dans le cancer colorectal, en plus des mutations activatrices de Ras et de l'augmentation du signal en amont, il a été observé que l'activation de la protéine Raf, sous-jacente à Ras, pouvait aussi jouer un rôle dans la tumorigenèse. Les trois isoformes décrites de Raf, A-Raf, B-Raf et C-Raf, partagent une similarité de séquence significative et pourtant présentent des rôles distincts dans le développement et des fonctions biochimiques différentes. Cependant, les trois isoformes montrent la même capacité à faciliter l'activation oncogénique par Ras de la cascade Mek1/2 et Erk1/2. B-Raf est pourtant la seule des trois isoformes à présenter des mutations dans différents cancers. Les 30 mutations observées sont, pour la majorité, situées sur le domaine kinase de la protéine et dans 90 % des cas il s'agit d'une substitution V599E augmentant l'activité kinase de la protéine (Wellbrock *et al.*, 2004). L'incidence des mutations activatrices de Ras et Raf dans les mêmes types de cancers suggèrent que ces deux oncogènes sont fonctionnellement équivalents. De plus, le fait qu'il ne soit observé aucun cas de cancer possédant des mutations sur ces deux protéines de

façon concomitantes contribue à penser qu'elles partagent un rôle équivalent dans la tumorigenèse (Rajagopalan *et al.*, 2002). Pourtant, des études plus récentes menées dans des fibroblastes de souris mutées sur le gène de p53 ont montré que la transfection de formes mutées de B-Raf, de H-Ras et de N-Ras ne conduisaient pas au même pouvoir transformant. Les cellules transfectées avec les mutants de Ras conduisaient à l'apparition d'un plus grand nombre de colonies et ces foci étaient de plus grande taille que ceux issus de la transformation par Raf indiquant que Ras semblait posséder un pouvoir oncogénique plus important que Raf (Benjamin & Ananthaswamy, 2008). Cette observation pourrait être expliquée par le fait que les mutants de Ras activent la voie de la PI3K en plus de l'activation de Raf.

## 2. Mécanismes de réponse au stress oncogénique induit par Ras

Malgré le rôle évident de Ras dans la tumorigenèse, l'expression d'une forme oncogénique de Ras dans des cellules primaires en culture conduit à un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Cet arrêt traduit la présence d'un mécanisme de défense fonctionnel dans les cellules.

### a. Détection de l'expression oncogénique de Ras

#### ◆ Sénescence induite par Ras et p16Ink4a

Paradoxalement au rôle oncogénique de Ras, il a été démontré qu'un signal fort induit par un mutant constitutivement actif de Ras pouvait conduire à l'entrée en sénescence des cellules. Dans des fibroblastes humains, il a été montré qu'un signal modéré de Ras stimulerait l'activité mitogénique de Mek-Erk alors qu'une surexpression de Ras induirait la voie Mek-Erk de façon excessive conduisant à l'entrée en sénescence des cellules via p16Ink4a et à une induction de la voie MKK3/6-p38 (Deng *et al.*, 2004). La réponse cellulaire dépendrait alors de l'intensité du signal induit par Ras et/ou de la capacité des cellules à induire la sénescence. Notons que la plupart des oncogènes activent ce mécanisme de suppression tumorale. L'activation du facteur de transcription Ets par Erk conduit à la transcription du gène de p16Ink4a (Ohtani *et al.*, 2001). En présence de p16Ink4a le cycle cellulaire est inhibé grâce à la répression des gènes cibles d'E2F. En temps normal, Bmi1 est exprimé grâce à l'activation des facteurs de transcription E2F1 ou Myc et vient inhiber le locus INK4/ARF (Nowak *et al.*, 2006 ; Park *et al.*, 2004). Bmi1 est responsable de la

formation d'hétérochromatine au niveau de ce locus. Lors de l'activation de la sénescence, Bmi1 n'est plus exprimée ce qui permet l'activation de p16Ink4a et de p14ARF (Gil *et al.*, 2004 ; Guney *et al.*, 2006). Les mécanismes spécifiques par lesquels p16Ink4a participe à l'entrée en sénescence des cellules ne sont pas clairement établis. Néanmoins, nous savons que p16Ink4a joue un rôle dans le blocage du complexe cycline D/Cdk4 et dans la réorganisation de la chromatine caractéristique des cellules sénescents (Narita *et al.*, 2006). Les cellules sénescents développent des foci d'hétérochromatine distincts de ceux de cellules quiescentes ou prolifératives. Ces foci coïncident avec la répression dépendante de Rb de gènes hétérochromatiques. Beaucoup de ces gènes sont des cibles d'E2F. Lorsque l'expression oncogénique de Ras conduit à l'expression de p14ARF via la voie Raf/Mek/Erk elle permet l'activation de p53 et à l'arrêt du cycle cellulaire. Toutefois, la sénescence induite par la surexpression de H-Ras ou de K-Ras peut être indépendante de p16Ink4a et p14ARF et passer par les voies de Mek et de p38 (Bihani *et al.*, 2004). Elle peut également nécessiter la détection des dommages de l'ADN induits par l'activité oncogénique de Ras (figure 14).

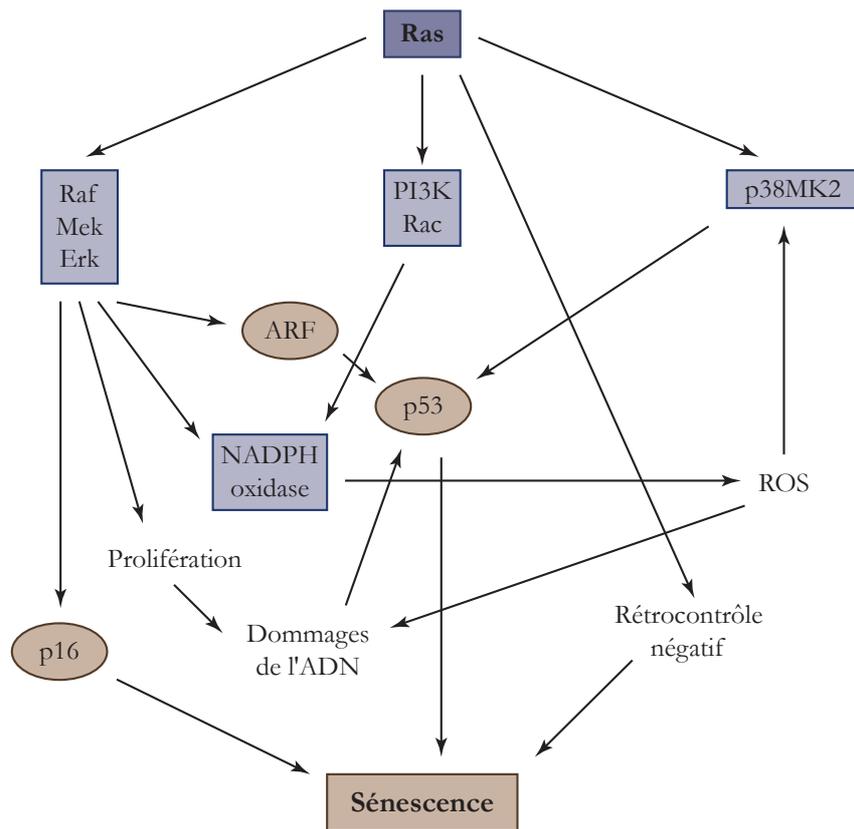
#### ♦ *Sénescence induite par Ras et cassures de l'ADN*

La détection de cassures de l'ADN conduit à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN, constitués – selon la nature simple ou double brin des cassures – des protéines ATM ou ATR et Chk1 ou Chk2. Di Micco et ses collaborateurs ont montré que l'expression de H-RasV12 – une forme mutée auto-active de H-Ras – conduisait à une forte activation de la réponse aux dommages de l'ADN et que l'inactivation des protéines responsables de cette réponse empêchait l'entrée en sénescence et permettait la transformation cellulaire. Il a également été observé que l'expression de l'oncogène H-RasV12 était suivie d'une augmentation du nombre de réplicons au cours de la réplication de l'ADN et d'une altération de la progression des fourches de réplication. Dans ce modèle, l'oncogène force la progression du cycle cellulaire conduisant à une hyper-réplication de l'ADN et l'apparition de dommages. La sénescence est alors observée en réponse à la détection de ces dommages de l'ADN et non en réponse directe au locus INK4/ARF (Di Micco *et al.*, 2006).

#### ♦ *Sénescence induite par Ras et radicaux libres*

L'activité oncogénique au sein de la cellule est associée à l'apparition de radicaux libres de l'oxygène ou ROS (*Reactive Oxygen Species*) qui, nous l'avons vu, ont une activité génotoxique, mais réagissent aussi avec les protéines, l'ARN et les lipides. Les ROS induits

par Ras, comme les radicaux superoxydes  $O_2^{\bullet}$  ou les dérivés actifs de l'oxygène tel que le peroxyde d'hydrogène (Irani *et al.*, 1997), trouvent leur origine dans la chaîne respiratoire au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Ils sont produits lors de l'augmentation de l'activité mitochondriale, mais aussi par l'activité d'une famille de NADPH oxydases, les protéines Nox. La réponse mitogénique découlant de l'oncogène Ras est impliquée dans la production de ces radicaux libres par ces deux procédés. Nox1 est exprimé suite à la signalisation de Raf/Mek/Erk (Adachi *et al.*, 2008 ; Laurent *et al.*, 2008) et l'augmentation de Rac-GTP est due à l'activation de la PI3K (Lambert *et al.*, 2002). Ces deux protéines sont impliquées dans la formation d'un complexe enzymatique générateur de ROS. Les ROS produits conduisent à l'arrêt du cycle cellulaire, à la sénescence et dans un cas extrême, à la mort de la cellule. Certaines études ont montré que les ROS étaient nécessaires à l'induction de la sénescence et que lorsqu'ils étaient inhibés à l'aide d'antioxydants, la sénescence était abrogée (Lee *et al.*, 1999). La sénescence induite par la présence de ROS dans la cellule est probablement due à plusieurs mécanismes. Les cassures de l'ADN provoquées par les ROS activent p53 via la signalisation des dommages de l'ADN et permettent la stabilisation de l'ARNm et de la protéine. Les ROS peuvent aussi activer la voie de p38 qui phosphoryle p53 directement sur sa sérine 33 augmentant ainsi son activité transcriptionnelle. Dans les deux cas, l'induction des ROS permet la mise en place de la sénescence.



**Figure 14 | Induction de l'OIS par l'oncogène Ras.** L'oncogène Ras favorise la production de ROS, l'activation de la réponse aux dommages de l'ADN, la transcription de p14ARF et de p16Ink4a, ainsi que l'activation de p53. Ces voies permettent la mise en place de la sénescence et la suppression tumorale.

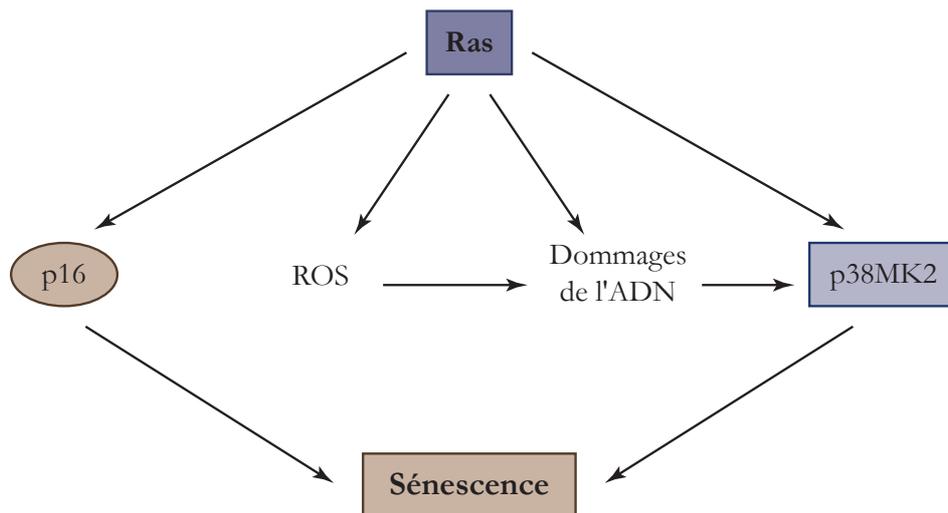
### 3. Induction de la sénescence indépendante de p53

Le suppresseur de tumeur p53 est au centre de la réponse au stress oncogénique. Le fait que cette protéine soit mutée dans environ 50 % de l'ensemble des cancers appuie l'importance de son rôle dans la protection contre l'oncogène. Cependant, il existe des mécanismes d'expression de p21Waf1 et d'induction de la sénescence indépendants de la voie de p53. Dans cette étude nous nous sommes principalement intéressés à la protéine p21Waf1 car nous avons observé son expression, indépendamment de p53, à la suite du stress oncogénique induit par Ras. Nous allons donc décrire ici les voies connues d'activation de p21Waf1 indépendamment de p53.

Plusieurs facteurs de transcriptions permettent l'activation de p21Waf1 en l'absence de p53. Les facteurs E2F, SP1, SP3, AP2, C/EBP $\alpha$  et  $\beta$ , NEUROD1, GAX, HOXA10, les facteurs de transcription STAT et MYOD1 répondent à différents stimuli pour induire l'expression du gène de p21Waf1. Les membres de la famille des Klf (*Krüppel-*

*like transcription factor*) sont des régulateurs clefs de la prolifération et de la différenciation et permettent la transcription du gène de p21Waf1 indépendamment de p53. Ils se fixent aux boîtes GC pour activer ou inhiber l'expression de leurs gènes cibles. À la suite de dommages de l'ADN, l'un des membres de cette famille, KLF4, est capable d'induire l'expression de p21Waf1 et l'activation du point de contrôle de la transition G1/S indépendamment de p53. Son expression est d'ailleurs fréquemment inhibée dans les cancers gastro-intestinaux, colorectaux et dans le cancer de la vessie et cette inhibition est corrélée à une diminution de l'expression de p21Waf1 dans le cas des cancers colorectaux. Cdx2 peut également avoir un rôle dans la régulation du gène de p21Waf1 en absence de p53. Cdx2 est un suppresseur de tumeur dont l'expression est souvent inhibée dans les cancers colorectaux. Sa surexpression conduit à l'arrêt de la prolifération cellulaire et à la différenciation des cellules épithéliales intestinales. Tout comme KLF4, la diminution de son expression est corrélée à la perte d'expression de p21Waf1 dans ce type de cancers. En revanche, il est retrouvé fortement exprimé avec p21Waf1 dans les cellules tumorales hautement différenciées. La transcription du gène de KLF4 est activée par Cdx2 qui est lui-même régulé par APC, un autre suppresseur de tumeur, muté dans les cancers du côlon.

En 2007, les travaux de Reinhardt ont montré que, lors d'un stress génotoxique induit par le cisplatine sur des cellules mutées sur p53, la voie p38/MK2 était indispensable à l'arrêt du cycle cellulaire. Cette voie est activée par les voies de détection des dommages de l'ADN ATM/Chk2 et/ou ATR/Chk1 pour permettre l'arrêt du cycle cellulaire et la survie cellulaire. Lors d'un traitement génotoxique, l'absence de MK2 permettrait à la cellule de poursuivre son cycle en mitose conduisant à la catastrophe mitotique. Dans cette étude, la voie p38/MK2 permettrait la protection contre le processus de tumorigenèse en empêchant la catastrophe mitotique dans les cellules où p53 est inactivée.



**Figure 15 | Induction de l'OIS indépendante de p53 par Ras.** En l'absence d'une forme active de p53, la sénescence induite par l'oncogène peut être maintenue via l'activation de la voie p38MK2.

L'implication de p21Waf1 dans l'induction de la sénescence est largement admise. Son expression se fait principalement par l'activation de la transcription par p53, toutefois, en l'absence d'une forme fonctionnelle de p53, p21Waf1 peut être exprimée via d'autres facteurs de transcription. Son inactivation est, alors, également nécessaire à la progression de la tumorigénèse.

#### 4. *Échappement à la sénescence et inactivation de p21Waf1*

L'induction de la sénescence est possible malgré l'apparition de mutations rendant p53 inactif. Pourtant, pour que le processus de tumorigénèse se poursuive, la cellule en phase de transformation doit pouvoir contrôler ce phénomène. Ce contrôle est possible à différents niveaux. La perte de fonction des activateurs de la transcription de *CDKN1A* en est un exemple, mais ce contrôle peut aussi s'opérer par la répression de *CDKN1A*. La mise en place du contrôle de la sénescence implique souvent le rôle d'un deuxième oncogène. Par exemple, la phosphorylation de Myc par Cdk2 est requise pour contrer la mise en place de la sénescence induite par Ras. Cdk2 interagit avec Myc au niveau des promoteurs de ses gènes cibles tels que Bmi1, p16Ink4a, p21Waf1 ou hTERT pour empêcher leur transcription (Hydbring *et al.*, 2010). Dans le cancer du sein, Myc est surexprimé en réponse aux œstrogènes et sa surexpression conduit à l'inhibition de la transcription de *CDKN1A* (Mukherjee & Conrad, 2005). Myc est aussi capable d'induire l'expression de AP4, un facteur

de transcription fréquemment surexprimé dans les progéniteurs de cellules du côlon et dans les cancers colorectaux. AP4 est capable d'inhiber la transcription de p21Waf1.

La perte d'expression de p21Waf1, son inactivation ou sa relocalisation sont des événements complémentaires à la perte de p53 qui permettent le blocage de la sénescence dans le processus de tumorigenèse. Parmi ces événements, la régulation transcriptionnelle de p21Waf1 est la plus décrite à l'heure actuelle. Cependant, p21Waf1 peut aussi être régulée par des modifications post-traductionnelles pouvant conduire à sa protéolyse ou bien à sa relocalisation cellulaire. Dans les cellules en division, p21Waf1 est une protéine instable avec un temps de demi-vie de 20 à 60 minutes. Lorsque p21Waf1 est exprimée suite aux dommages de l'ADN, la protéine est protégée de la dégradation par le protéasome grâce à la protéine Wisp39 (*Waf1/Cip1 stabilizing protein 39*) qui recrute Hsp90 (Jascur *et al.*, 2005). La dégradation de p21Waf1 se fait par le protéasome suite à l'activité de trois complexes ubiquitine ligase, SCF, CRL4 et APC/C. L'ubiquitination et la dégradation de p21Waf1 par ces trois complexes se fait lorsque p21Waf1 est fixée aux complexes cycline/Cdk ou à PCNA (Abbas *et al.*, 2008). Il existe aussi une dégradation de p21Waf1 indépendante de l'ubiquitine mais cette voie n'est pas la plus courante (Li *et al.*, 2007). Plusieurs protéines responsables de la dégradation de p21Waf1 sont dérégulées dans les cancers. Skp2, la protéine responsable de la reconnaissance de p21Waf1 dans le complexe SCF, est souvent surexprimée dans les cancers (Frescas & Pagano, 2008). Dans des modèles cellulaires, il a été montré que Ras et Raf étaient capables d'augmenter l'expression de Skp2 (Motti *et al.*, 2007 ; Schepers *et al.*, 2005) et que cette augmentation pouvait être corrélée à la perte de p21Waf1 (Mirza *et al.*, 2004). De la même façon, Cdt2 – la protéine responsable de la reconnaissance de p21Waf1 dans le complexe CRL4 – et Cul4A – une sous-unité E3 du même complexe – sont toutes deux retrouvées surexprimées dans les cancers.

La phosphorylation de p21Waf1 est aussi responsable de sa stabilisation et de sa localisation. Nous avons vu que la localisation cytoplasmique de p21Waf1 était responsable de son activité anti-apoptotique et oncogénique. Sa localisation cytoplasmique est observée dans certains cancers et est signe de mauvais pronostic. Parmi les sites de modification de p21Waf1, le résidu le mieux caractérisé à ce jour est la thréonine 145, cible de la kinase Akt. Sa phosphorylation résulte en la perte de l'interaction de p21Waf1 avec PCNA ainsi que sa relocalisation dans le cytoplasme. Des phosphorylations sur les sérines 146 et 160 ont aussi été observées, elles conduiraient, comme la phosphorylation de T145, à la perte de

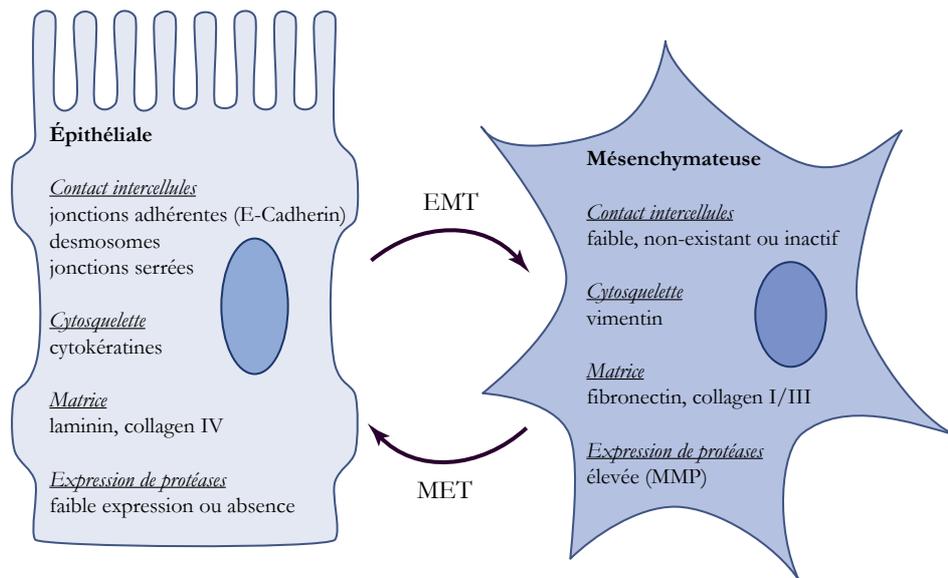
l'interaction p21Waf1/PCNA mais pas à la relocalisation de la protéine. La thréonine 57 et la sérine 130 sont des sites de fixation des Cdk. Elles peuvent être phosphorylées par les kinases p38 $\alpha$  et Jnk1 pour empêcher l'inhibition des complexes cycline/Cdk (figure 10). Ces événements de phosphorylation peuvent donc également être dérégulés dans les tumeurs pour permettre l'échappement.

Tous ces mécanismes sont responsables de l'inhibition de la sénescence dans des cellules soumises à un stress oncogénique. Les voies de détection de ce stress peuvent également être touchées par l'apparition de mutations sur les gènes des protéines qui les composent.

## Chapitre V : Mécanismes de la transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est le processus durant lequel a lieu des changements morphologiques caractéristiques dans des cellules épithéliales, leur permettant d'acquérir les propriétés de cellules mésenchymateuses. Les mécanismes physiologiques permettant ce phénomène se produisent au cours de l'embryogenèse. Les cellules épithéliales établissent un contact étroit entre elles et présentent un axe de polarité apicobasal permettant l'arrangement de leurs différents types de jonctions. Le rôle des cellules épithéliales est de former une barrière étanche entre les tissus grâce aux jonctions serrées qui empêchent le passage de molécules par voie intercellulaire, tout en permettant la communication entre les cellules par les jonctions communicantes. La troisième catégorie de jonction assurent l'adhésion cellulaire et le maintien de la forme des cellules. À l'inverse, les cellules mésenchymateuses ne sont pas capables de s'organiser dans une matrice tridimensionnelle. Elles perdent leur polarité et établissent rarement de contact direct avec leurs cellules voisines.

Les commutations qui ont lieu entre les programmes de différenciation épithéliales et mésenchymateuses servent à la production de cellules spécifiques capables de migrer ainsi qu'à la formation de la couche de cellules mésodermiques et à sa différenciation en tissus ou organes spécifiques tels que le muscle, la peau ou le rein. L'apparition de ces caractéristiques est nécessaire au développement embryonnaire. Cependant, le fait que l'EMT confère aux cellules la possibilité de migrer à travers la matrice extracellulaire en fait aussi un processus acteur de la progression tumorale. En effet, ce processus est réactivé lors de la tumorigenèse pour permettre l'invasion métastatique. L'EMT semble aussi être responsable de l'échappement des cellules au processus de réponse anti-tumorale lors d'un stress oncogénique.



**Figure 16 | Caractéristiques moléculaires généraux de l'EMT.** Les cellules épithéliales et mésenchymateuses sont représentées schématiquement. Les différences moléculaires entre ces deux types cellulaires ont été groupées en 4 catégories : la nature du contact entre les cellules, la nature du cytosquelette, la synthèse de la matrice extracellulaire et l'expression des protéases.

Dans ce chapitre, nous décrivons les mécanismes de la transition épithélio-mésenchymateuse au cours du développement embryonnaire, puis nous nous intéresserons à son rôle dans la progression et l'agressivité tumorale.

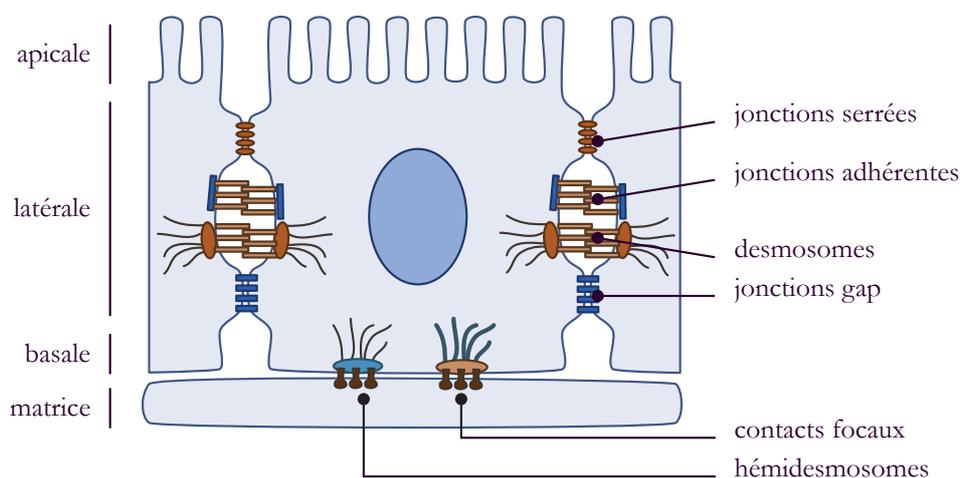
### A. Rôle de l'EMT dans le développement embryonnaire, mécanismes généraux

Au cours du développement embryonnaire précoce, s'opèrent des interconversions entre l'épithélium et le mésenchyme. Chez les mammifères, le premier événement de transition est une MET (*Mesenchymal-Epithelial Transition*). Elle a lieu durant la période précédant l'implantation de l'embryon avec la formation du trophoctoderme. La première EMT s'opère lors de la gastrulation avec la formation du mésoderme. Les structures des jonctions adhérentes et des desmosomes sont notamment composées des cadhérines et des protéines de la famille des Armadillo qui permettent l'agencement de la plate-forme corticale nécessaire aux protéines du cytosquelette. Ces composants sont associés à l'actine et permettent l'organisation des filaments intermédiaires au niveau de la membrane plasmique.

Dans le chapitre qui suit, nous allons brièvement décrire les mécanismes moléculaires conduisant à ces transitions, puis nous nous intéresserons à l'implication de l'EMT dans la progression tumorale.

### 1. *Le premier événement morphogénétique : la formation du trophoctoderme*

Les premières divisions ayant lieu au début du développement embryonnaire sont très rapides c'est la phase de segmentation. Au stade huit cellules, les blastomères – cellules qui composent l'embryon à ce stade – sont très similaires. Après la division suivante – stade seize cellules –, les cellules qui se trouvent en périphérie s'écrasent progressivement et deviennent polarisées. Tous les types de jonctions apparaissent à ce moment-là et ces quelques cellules deviennent le premier épithélium embryonnaire appelé trophoctoderme.



**Figure 17 | Organisation des cellules épithéliales.** Les principales caractéristiques des cellules épithéliales sont : l'adhésion intercellulaire par différents types de jonctions (serrées, adhérentes, desmosomes, gap), la polarisation cellulaire définie par l'existence de différents types de membrane (apicale, latérale, basale) et l'adhésion à la matrice par des complexes localisés uniquement sur la région basale de la cellule (hémidesmosomes et contacts focaux).

#### a. *L'adhésion cellulaire*

Les E-cadhérines sont des molécules d'adhésion qui apparaissent très tôt dans le développement. Leur production commence dès la fin du stade deux cellules pour lier les blastomères entre eux. Les E-cadhérines sont ensuite redistribuées et concentrées sur la future membrane basolatérale des blastomères à la périphérie de la future morula compacte (Hyafil *et al.*, 1980 ; Ziomek & Johnson, 1980). Au stade 16 cellules, la quantité d'E-cadhérines sur la membrane basolatérale augmente et l'adhésion entre les cellules devient

plus serrée. L'extinction de *CDH1*, le gène de l'E-cadhérine chez la souris est létale, les embryons ne peuvent pas former un épithélium fonctionnel et meurent après l'implantation, montrant ainsi l'importance des protéines d'adhésion (Peyrieras *et al.*, 1983).

### *b. La polarisation cellulaire*

La polarisation se fait après le premier contact des cellules entre elles. Les protéines sont alors réparties sur les différents côtés des cellules selon leurs fonctions. Les principales protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire au stade deux cellules sont les protéines du complexe cadhérine-caténine. Au stade huit cellules non-compactées, les membranes des blastomères sont associées entre elles par les jonctions *gap* qui permettent l'échange d'ions et de petites molécules entre les cellules de la couche épithéliale. En parallèles, les E-cadhérines et ZO-1 (*Tight Junction Protein ZO-1*) sont recrutées au niveau des jonctions adhérentes et serrées au niveau de la membrane basolatérale. La partie N-terminale de la protéine ZO-1 serait impliquée dans la transduction du signal requis pour l'assemblage des jonctions serrées alors que la partie C-terminale aurait des propriétés spécifiques de jonctions serrées. Les endosomes s'accumulent au niveau de la future membrane apicale et une réorganisation de l'actine cytoplasmique et corticale ainsi que des microtubules est observée au niveau des microvillosités. La cinguline est recrutée au niveau des jonctions serrées au stade 16 cellules. Elle est localisée dans le cytoplasme au niveau des jonctions serrées et est capable d'interagir avec ZO-1 (D'Atri *et al.*, 2002). Puis les jonctions adhésives fonctionnelles sont dispersées le long des membranes basolatérales afin de renforcer l'adhésion cellulaire. L'EGFR est également relocalisé au niveau de la membrane basolatérale (Dardik *et al.*, 1992).

### *c. Acquisition des fonctions de l'épithélium*

Les jonctions serrées deviennent fonctionnelles au stade 32 cellules du développement. De nombreux desmosomes sont alors présents au niveau des côtés basolatéraux des cellules. Ces desmosomes sont composés des desmogleins, qui font partie de la famille des cadhérines et qui sont responsables de l'adhésion dépendante du calcium, et des desmoplakins, qui sont des protéines du cytosquelette permettant l'ancrage des filaments intermédiaires à la membrane plasmique. La taille du blastocyte continue à augmenter grâce à l'activité des cellules du trophoctoderme puis l'embryon s'implante dans l'utérus.

Après la formation de la première structure épithéliale, la progression du développement embryonnaire nécessite l'intervention d'un autre processus, l'EMT. S'en suit alors la naissance de la première architecture mésenchymateuse, appelée le mésoderme.

## 2. *L'EMT, une deuxième transition nécessaire au développement*

Trois EMT ont lieu durant l'embryogenèse. Lors de ces transitions, différents organes se forment. La première EMT permet la formation de l'endoderme pariétal, de la ligne primitive et de la crête neurale. Ensuite, en fonction de leur localisation au sein de l'embryon, les cellules du mésoderme se condensent en différentes structures épithéliales transitoires (Thiery *et al.*, 2009). Ces structures transitoires font l'objet d'une deuxième EMT conduisant à la génération de cellules mésenchymateuses qui, par la suite, se différencieront en types cellulaires spécifiques. Au niveau des cellules des tissus endodermiques, comme les bourgeons endodermiques du pancréas ou les diverticules du foie, les changements morphologiques induit par cette deuxième EMT conduisent à une dissociation des cellules endocrines ou des hépatoblastes de leur épithélium d'origine. Un exemple d'implication de l'EMT tertiaire peut être la formation des coussins mésenchymateux à l'origine des valves cardiaques (Thiery *et al.*, 2009).

### a. *Régulation moléculaire de l'EMT*

La régulation moléculaire des événements impliqués dans l'EMT a été étudiée dans différents organismes. De nombreux gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire, la différenciation mésenchymateuse, la migration cellulaire, et l'invasion voient leur expression transcriptionnelle varier au cours de l'EMT. Tous ces phénomènes sont responsables du déroulement de l'embryogenèse mais sont également impliqués dans l'invasion tissulaire et l'apparition de métastases lors de la tumorigenèse.

La perte de l'expression de l'E-cadhérine est considérée comme un marqueur robuste de l'EMT. L'identification du promoteur de son gène a montré la présence d'éléments E-Box, en cause dans la régulation négative de l'expression des E-cadhérines dans les cellules mésenchymateuses (Girolodi *et al.*, 1997 ; Hennig *et al.*, 1995). Plusieurs facteurs de transcription tels que les facteurs bHLH comme E12/E47, Twist1 et 2, ou des facteurs de transcription, dit à doigts de zinc (*zinc-finger*) comme ceux de la famille de Snail, de Zeb sont capables d'inhiber l'expression du promoteur (Batlle *et al.*, 2000 ; Cano *et al.*,

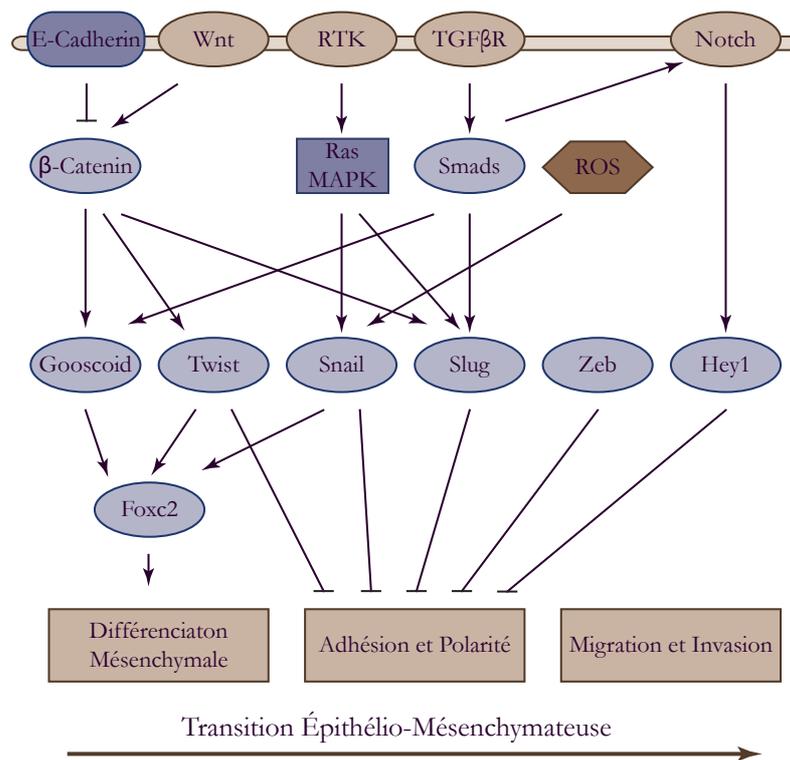
2000 ; Comijn *et al.*, 2001 ; Eger *et al.*, 2005 ; Hajra *et al.*, 2002 ; Perez-Moreno *et al.*, 2001 ; Yang *et al.*, 2004). Le premier à avoir été découvert fût le facteur Snail (Batlle *et al.*, 2000 ; Cano *et al.*, 2000). À la suite de cette découverte, d'autres facteurs à doigts de zinc, tels que Slug, Zeb1 et Zeb2, furent décrits comme étant responsables de la répression du promoteur de l'E-cadhérine et de la dissociation des cellules entre elles au cours de l'EMT (Comijn *et al.*, 2001 ; Eger *et al.*, 2005 ; Hajra *et al.*, 2002). Zeb1, Snail et Slug sont également impliqués dans la régulation de l'expression de facteurs de polarité tels que Crumbs3 et Lgl2 (Aigner *et al.*, 2007 ; Spaderna *et al.*, 2008). L'importance de ces facteurs a été montrée dans plusieurs organismes, par exemple, chez la mouche et la souris, Snail et Slug sont indispensables à la formation du mésoderme (Carver *et al.*, 2001). Chez le xénope et le poulet, ils sont nécessaires à formation de la crête neurale (Nieto, 2002). D'autres facteurs que les protéines *zinc-finger* peuvent se fixer et inhiber le promoteur de l'E-cadhérine au niveau des éléments E-Box. Les facteurs bHLH tels que Twist1, Foxc2 ou Goosoid sont capables d'inhiber, directement ou indirectement, le promoteur de l'E-cadhérine au cours de l'EMT. Twist1 est également capable d'induire une EMT dans des cellules épithéliales mammaires humaines (Yang *et al.*, 2004). La disparition des molécules d'E-cadhérine au niveau des jonctions adhérentes peut également être la conséquence de la perte d'un partenaire intracytoplasmique, la  $\beta$ -caténine. La  $\beta$ -caténine contribue à la fonction des jonctions adhérentes par son association à l'E-cadhérine. Mais elle peut, aussi, transloquer dans le noyau et activer la transcription des gènes de Slug ou Twist1 et ainsi activer l'EMT (Conacci-Sorrell *et al.*, 2003 ; Onder *et al.*, 2008).

La perte de la polarité est une phase critique de l'EMT. Elle est notamment régulée par les complexes Par et Crumbs au niveau des jonctions serrées. Les facteurs de transcription Snail et Zeb1 inhibent l'expression des gènes codant pour les protéines formant ces complexes, altérant ainsi la polarité des cellules en empêchant la localisation des complexes Par et Crumbs (Spaderna *et al.*, 2008 ; Whiteman *et al.*, 2008).

Snail et Zeb sont également capables d'induire l'expression de métalloprotéases responsables de la dégradation de l'attachement de la membrane, favorisant l'évasion. Il est intéressant de noter que les ROS sont capables d'activer l'expression de Snail ainsi que de MMP3 (*Metalloproteinase 3*) pour conduire à l'EMT (Radisky *et al.*, 2005). En effet, les ROS sont très souvent exprimés au cours de la progression tumorale, et le fait qu'ils soient capables d'induire l'EMT appuie l'idée de l'implication de ce processus dans la

cancérogène. MMP13 (*Metalloproteinase 13*) peut déclencher l'EMT à la suite d'une forte induction de FGF1 (Billottet *et al.*, 2008). La protéase transmembranaire TMPRSS4 est fortement exprimée à la surface des cellules cancéreuses gastriques, de pancréas et de colon. Sa surexpression dans les cellules SW480, issues d'une lignée de carcinome de colon, conduit à la diminution d'expression de l'E-cadhérine par Zeb2 et à l'apparition de métastases chez la souris nude (Jung *et al.*, 2008).

Toutes ces données montrent l'importance de la dynamique de communication entre les molécules permettant l'adhésion cellulaire et la régulation de l'expression des gènes impliqués dans le programme d'EMT. Plusieurs voies de signalisation sont responsables de cette régulation et de la progression du développement embryonnaire, notamment les voies de TGF- $\beta$ , de Notch ou de Wnt (figure 18). Nous allons principalement nous concentrer sur la voie de Notch car c'est celle que nous avons étudié au cours de ce travail.



**Figure 18 | Réseau moléculaire des voies de signalisation impliquées dans l'EMT.** Dans les cellules tumorales, les voies TGF- $\beta$ , Wnt et les voies sous-jacentes à différents récepteurs à tyrosine kinase (RTK) tels que le FGFR, l'EGFR, le PDGFR ou le HGFR peuvent conduire à l'activation des facteurs de transcription responsables de l'induction de l'EMT. Les ROS produits au cours du stress oncogénique, peuvent également activer l'EMT via l'expression de Snail. Snail et Slug inhibent directement la transcription de l'E-cadhérine alors que Twist, Goosecoid et Foxc2 conduisent à l'apparition des caractères mésenchymateux. Les inducteurs spécifiques de la migration et de l'invasion au cours de l'EMT ne sont pas encore bien connus.

La voie de Notch est très impliquée dans la modulation de l'EMT au cours de l'embryogenèse mais contrairement aux voies de Wnt et du TGF- $\beta$ , elle n'est pas impliquée dans toutes les EMT qui se produisent au cours de l'embryogenèse. Chez la grenouille et le poulet, elle régule la formation de la crête neurale via l'expression des protéines de la famille BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) (Cornell & Eisen, 2005). Notch peut être responsable de l'induction de l'EMT dans la formation de la valve cardiaque mais également en culture, dans des cellules épithéliales de glandes mammaires, de tubules de rein et d'épiderme (Timmerman *et al.*, 2004). Chez la souris et le poisson-zèbre, l'absence d'acteurs de la voie de Notch empêche l'induction de l'EMT des cellules endocardiques en maintenant l'adhésion des cellules entre elles. De plus, dans les cellules épithéliales de glandes mammaires, de tubules de rein et d'épiderme, des protéines impliquées dans la voie de Notch, telles que l'un de ces ligands, Jagged 1 ou l'une de ces cibles, Hey1, peuvent être induites par le facteur de transcription Smad3 lors de l'activation du TGF- $\beta$  (Zavadil *et al.*, 2004). La voie de Notch est importante dans la régulation de l'embryogenèse, cependant il est probable qu'elle ne soit pas suffisante et qu'elle requière l'activation d'autres voies afin d'induire l'EMT (Yang & Weinberg, 2008).

## **B. Rôle de l'EMT dans la tumorigenèse**

### ***1. L'EMT induit le processus métastatique***

La perte d'expression des molécules d'adhésion, la perte de polarisation, la modification du cytosquelette des cellules ayant subies une EMT, sont des événements qui permettent la migration cellulaire au cours du développement embryonnaire. Cependant, une fois réactivés lors de la tumorigenèse, ces événements peuvent aussi jouer un rôle important dans la migration des cellules lors de la dissémination métastatique. L'EMT est accompagnée de la perte de contact entre les cellules et l'acquisition de propriétés de migration et de motilité.

Nous avons vu l'importance des E-cadhérines dans le maintien de l'adhésion cellulaire au cours du développement. Cet attribut en fait une protéine importante dans la cohésion des cellules et la perte de son expression est l'événement le plus caractéristique de l'EMT. En effet, la perte de l'expression de ces molécules est très souvent associée à la progression des carcinomes et reflète un mauvais pronostic dans plusieurs types de tumeurs

(Vincent-Salomon & Thiery, 2003). De plus, que ce soit dans le modèle murin ou bien dans des lignées cellulaires humaines, une surexpression d'E-cadhérine dans des cellules de carcinome empêche leur pouvoir invasif. La perte d'expression d'E-cadhérine dans les cancers s'observe de manière précoce, conduisant les tumeurs à présenter un phénotype de cellules mésenchymateuses très tôt au cours de leur développement pour permettre l'invasion tissulaire. Nous l'avons vu, l'expression de cette glycoprotéine peut être inhibée par différents types de facteurs de transcription. Les jonctions adhérentes peuvent aussi être inhibées par des modifications post-traductionnelles sur les E-cadhérines suite à l'activation de différentes protéines kinases telles que Met et Src. Ces protéines phosphorylent à la fois la  $\beta$ -caténine et le court domaine cytoplasmique des E-cadhérines. La  $\beta$ -caténine et les E-cadhérines sont, par la suite, ubiquitinylées par la E3-ligase Hakai puis dégradées par le protéasome (Fujita *et al.*, 2002 ; Pece & Gutkind, 2002).

Les tumeurs observées ne sont pas homogènes, et l'expression de l'E-cadhérine en leur sein non plus. Certaines zones d'une tumeur contiennent des cellules exprimant les E-cadhérines alors que dans d'autres zones, les cellules n'expriment plus ces molécules. De plus, les cellules s'étant détachées de la tumeur primitive et ayant colonisé d'autres tissus expriment, à nouveau, des E-cadhérines. Ces observations suggèrent qu'après leur dissémination, les cellules métastatiques recouvrent des propriétés de cellules épithéliales et que les mécanismes qui contrôlent la transcription et les modifications post-traductionnelles des E-cadhérines ne sont pas des événements génétiques irréversibles (Yang & Weinberg, 2008). C'est le processus de transition mésenchymateux-épithélial (MET).

De nombreux facteurs de transcription impliqués dans l'induction de l'EMT sont associés à l'invasion métastatique et souvent réactivés dans les cellules tumorales. Par exemple, les protéines Twist et en particulier Twist1 qui est surexprimée dans de nombreux types de carcinomes tels que des sarcomes, des gliomes, des neuroblastomes et des mélanomes.

### ***1. Implication de l'EMT dans la transformation initiale et la régulation de la sénescence***

L'EMT a souvent été associée à un stade tardif d'adénome (Entz-Werle *et al.*, 2005 ; Hoek *et al.*, 2004 ; Kwok *et al.*, 2005 ; Mironchik *et al.*, 2005 ; Ohuchida *et al.*, 2007 ; Valsesia-Wittmann *et al.*, 2004 ; Yang *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2007). Par exemple, en plus de

leur rôle d'activation de l'EMT, les protéines Twist sont nécessaires à l'oncogène N-Myc pour induire la progression tumorale. Par exemple Twist est capable d'empêcher l'apoptose induite par Myc dans les neuroblastomes (Puisieux *et al.*, 2006). Ces protéines sont également responsables de l'inhibition de la voie ARF/p53 dans les neuroblastomes qui surexpriment N-Myc (Valesia-Wittmann *et al.*, 2004). De la même manière, elles coopèrent avec Ras dans la transformation de fibroblastes embryonnaires murins, en effet, l'équipe de Puisieux a montré que l'EMT était capable de contribuer à la transformation cellulaire initiale (Ansieau *et al.*, 2008). Au cours de leur étude, ils ont observé que de nombreux cancers surexprimaient Twist1 ou Twist2 ou les deux à la fois et que ces protéines permettaient d'outrepasser la sénescence précoce induite par l'oncogène en inhibant les voies de réponse dépendant de p53 et Rb. Ils ont également montré que Twist1 et Twist2 coopéraient avec Ras dans la transformation de fibroblastes et que ces mêmes protéines permettaient, avec Ras ou ErbB2, de conduire à une EMT complète. Ces travaux suggèrent un lien direct entre l'échappement précoce au programme de protection contre la tumorigenèse et l'acquisition des caractères invasifs par les cellules cancéreuses.

Twist permet également d'outrepasser la sénescence via l'inhibition de p14ARF dans des cellules épithéliales de la prostate (Kwok *et al.*, 2007). En effet, la suppression de Twist dans ces cellules conduit à l'induction de la sénescence et à l'arrêt du cycle cellulaire. Au contraire, la surexpression de Twist inhibe l'expression de p14ARF et empêche la sénescence en réponse à un stress génotoxique et induit la prolifération cellulaire conduisant à l'accumulation des cassures de l'ADN. Ces observations amènent à considérer Twist comme un promoteur de la tumorigenèse et de l'instabilité génomique. Il a également été observé une corrélation inverse entre le niveau d'expression de Twist et celui de p53 dans les cancers gastriques et cette variation d'expression serait due à une régulation transcriptionnelle du gène de p53 par Twist (Feng *et al.*, 2009).

La surexpression de Twist empêche également l'expression de p21Waf1 et de p53 à la suite d'un stress génotoxique dans différentes lignées cellulaires (Li *et al.*, 2009 ; Valesia-Wittmann *et al.*, 2004 ; Vichalkovski *et al.*, 2010). En plus de la régulation indirecte de p53 par p14ARF ou de la régulation de sa transcription, Twist peut directement interagir avec p53 et inhiber sa liaison à l'ADN (Shiota *et al.*, 2008).

Un autre régulateur de l'EMT peut être impliqué dans la suppression de la sénescence, le facteur Zeb1 (Liu *et al.*, 2008). La suppression du gène *Zeb1* dans les

fibroblastes embryogéniques de souris induit une MET et une sénescence prématurée par la liaison directe et l'inhibition des promoteurs de *CDKN1A* et *INK4B*. Il a été montré que la surexpression de l'EGFR associée à une mutation de p53 conduisait certaines cellules épithéliales de l'œsophage à devenir sensibles à l'EMT au cours de la transformation cellulaire. Ces cellules ayant échappé à la sénescence induite par la surexpression de l'EGFR avaient augmenté leur expression des facteurs Zeb1 et Zeb2 et étaient alors capables d'induire une EMT en présence de TGF- $\beta$ . Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'inhibition de l'expression de Zeb conduisait à l'expression de p15Ink4b et de p16Ink4a et à la restauration de la sénescence induite par la surexpression de l'EGFR (Ohashi *et al.*, 2010). Dans cette étude, l'inhibition de la sénescence est dépendante de Zeb et permet aux cellules de devenir compétentes pour l'induction d'une EMT. Il semblerait, dans ce cas, que le processus d'EMT ne soit pas directement responsable de l'échappement à la sénescence et qu'elle soit seulement un phénomène se déroulant en parallèle mais dont les acteurs sont responsables de l'échappement observé.

Snail, un autre acteur de l'EMT, peut lui être impliqué dans la dérégulation du cycle cellulaire. En effet, dans des cellules épithéliales canines, Snail inhibe le cycle cellulaire en induisant l'expression de p21Waf1 (Vega *et al.*, 2004). Dans les cellules HepG2, Snail induit l'arrêt du cycle cellulaire via l'expression de p15Ink4b (Hu *et al.*, 2008). Toutefois, associé à l'expression d'un oncogène, Snail peut avoir un rôle de protection contre l'inhibition de la tumorigenèse. Par exemple, Snail empêche l'expression de p21Waf1 induite par la transformation par E2A (Takahashi *et al.*, 2004). La surexpression de Zeb2 est également capable de diminuer la prolifération via l'inhibition de la cycline D1 (Mejlvang *et al.*, 2007).

Notons que certaines protéines impliquées dans la sénescence sont capables d'inhiber l'induction d'une l'EMT. C'est le cas notamment de p21Waf1 qui est inhibée lors de l'EMT induite par RasV12 dans des cellules du sein, ou bien qui ralentie la vitesse de formation des tumeurs dans les souris exprimant RasV12 (Liu *et al.*, 2009). Ces observations suggèrent que p21Waf1 joue un rôle dans l'EMT à la fois *in vitro* et *in vivo*. Son rôle reste à déterminer. De la même manière, p53 est capable d'inhiber le facteur Slug (Wang *et al.*, 2009b). Il a aussi été observé qu'une diminution de l'expression de Rb induisait l'EMT alors que sa surexpression bloquait la répression du gène de l'E-cadhérine par la liaison directe avec le promoteur de *CDH1* (Arima *et al.*, 2008 ; Batsche *et al.*, 1998).

Toutes ces observations amènent à s'interroger sur rôle de l'EMT dans l'inhibition de la sénescence. En effet, si certains inducteurs de l'EMT sont capables d'inhiber les protéines impliquées dans la sénescence, la transition épithélio-mésenchymateuse est-elle directement responsable de l'inhibition de la sénescence ou bien est-elle un phénomène se déroulant en parallèle du processus de sénescence ? Il serait intéressant de savoir si l'E-cadhérine possède un rôle direct dans la régulation de la sénescence. De récentes études ont montré l'importance du SAPS (*Senescence-Associated Secretory Phenotype*) dans l'échappement à la sénescence. Il serait également intéressant d'appréhender l'implication des inducteurs de l'EMT dans la régulation du sécrétome inflammatoire et dans la régulation du SAPS.

### C. Implication de la protéine Notch dans l'EMT

La voie de Notch est directement impliquée dans la régulation de l'EMT. Cette propriété lui confère un rôle dans la tumorigenèse.

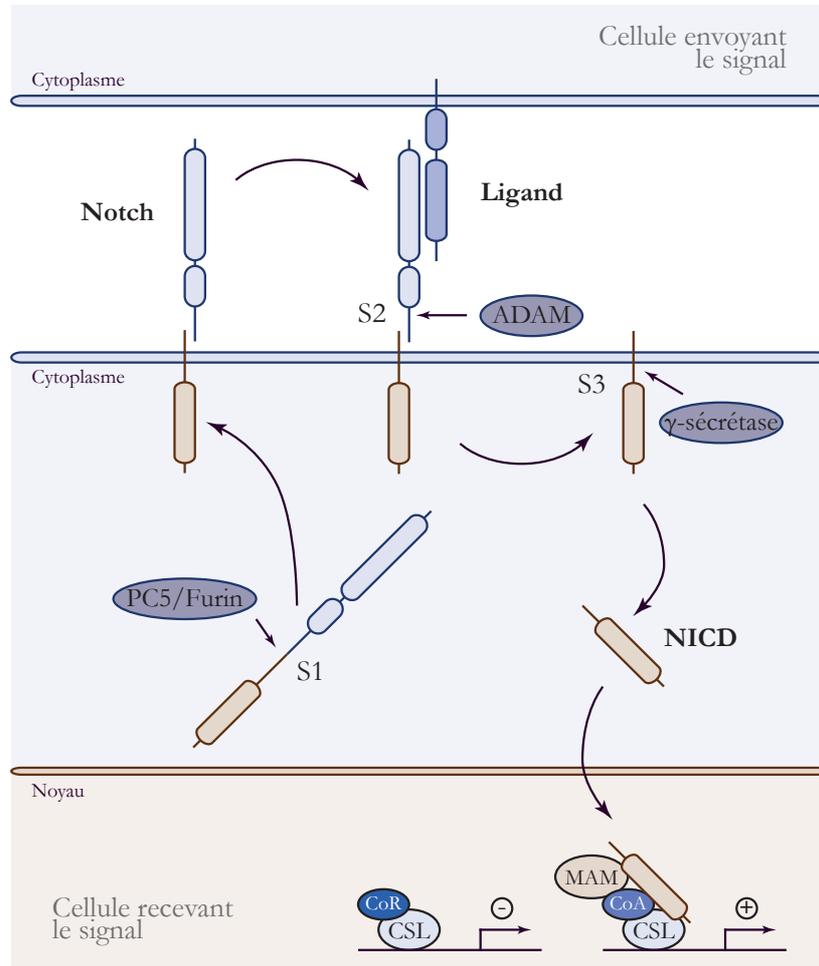
#### 1. *Les protéines Notch*

##### a. *Historique et description*

En 1917, l'équipe de Morgan décrit une particularité de l'aile chez la Drosophile. Certaines mouches possédaient des ailes dont les bords présentaient des entailles (Morgan, 1917). Cette particularité fût attribuée à une haplo-insuffisance due à une mutation sur le gène codant pour une protéine qui fût appelée Notch (traduction du mot 'entaille') par la suite (Kidd *et al.*, 1986 ; Wharton *et al.*, 1985). Les protéines de la famille de Notch sont des protéines transmembranaires dont le domaine extramembranaire possède de nombreuses répétitions EGF-like reconnues par le ligand, ainsi que trois répétitions riches en cystéines – appelées répétitions LN pour Notch/Lin12 – empêchant l'activation de la signalisation en l'absence d'un ligand. Le domaine intracytoplasmique de Notch possède un domaine RAM, six répétitions ankinrins, deux signaux de localisation nucléaire, un domaine de transactivation et une séquence PEST. Chez les mammifères, la famille Notch est composée de 4 protéines, Notch1, Notch2, Notch3 et Notch4. Lors de leur activation par l'un de leurs ligands – Delta ou Jagged chez la Drosophile et DLL1, 3, 4 ou Jag1 et 2 chez l'Homme – les

protéines Notch sont clivées et la partie intracellulaire est transloquée dans le noyau (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999 ; Kadesch, 2000).

*b. Activation de la voie de Notch*



**Figure 19 | Schéma simplifié de la voie de signalisation de Notch.** La voie de signalisation de Notch est principalement régulée par protéolyse. Après sa traduction, Notch subit un premier clivage au niveau du site S1 par PC5 et la Furin, puis ses deux formes clivées sont acheminées à la membrane cytoplasmique sous forme d'hétérodimère. Notch est activé, de manière juxtacrine, grâce à la liaison à l'un de ces ligands. Cette liaison conduit au clivage du site S2 par les métalloprotéases ADAM, puis à un troisième clivage effectué par la  $\gamma$ -sécrétase en S3, au niveau du domaine intracellulaire de Notch. Le domaine intracellulaire de Notch (NICD) transloque alors dans le noyau où il transforme le signal répressif de la transcription du complexe CSL (CBF1/RBPj $\kappa$ /Su(H)/Lag-1) en signal activateur par le recrutement de coactivateurs et notamment de la protéine Mastermind (MAM) (Radtke & Raj, 2003).

La signalisation de Notch est initiée par l'interaction entre le récepteur et son ligand entre deux cellules voisines. S'en suit alors deux protéolyses successives, la première est induite par la métalloprotéase ADAM17 et a lieu à l'extérieur de la cellule, le deuxième

clivage est opéré par l'activité  $\gamma$ -sécrétase de la presenilin et a lieu au niveau de la membrane cytoplasmique à l'intérieure de la cellule. À la suite de ce deuxième clivage, la partie intracellulaire de Notch – NICD (*Notch Intracellular Domain*) – est libérée et transloque dans le noyau pour venir se fixer au complexe de transcription CSL (CBF1/Su(H)/Lag2) et changer son statut de répresseur de la transcription en activateur (Hsieh *et al.*, 1996 ; Lai, 2002). CSL active alors ses gènes cibles à l'aide de co-activateurs comme les protéines MAML qui permettent le recrutement de CBP/p300 pour l'activation de la transcription (Figure 19) (Fryer *et al.*, 2002 ; Kurooka & Honjo, 2000 ; Oswald *et al.*, 2001 ; Zhou *et al.*, 2000).

### *c. Fonctions de Notch*

La signalisation de Notch est impliquée dans le maintien des caractéristiques de cellules souches, dans la décision du destin cellulaire, dans la prolifération cellulaire et dans l'apoptose. La réponse de la cellule à l'activation de Notch dépend du type cellulaire et de la voie de signalisation qui a dirigé cette activation.

Nous allons brièvement décrire les fonctions normales de Notch avant de nous intéresser plus particulièrement à ses fonctions dans la tumorigenèse.

#### ◆ *Maintenance de l'état non différencié*

Dans le système nerveux des vertébrés, la voie de Notch permet de réguler la balance entre les cellules progénitrices indifférenciées et les cellules différenciées qui en découlent (Lewis, 1996 ; 1998). La surexpression de NICD ou du ligand de Notch, Jag1, permet le maintien du phénotype de cellules souches chez le poulet et la grenouille (Henrique *et al.*, 1997) et l'augmentation du taux de cellules souches dans une culture de cellules hématopoïétiques (Jones *et al.*, 1998 ; Varnum-Finney *et al.*, 1998).

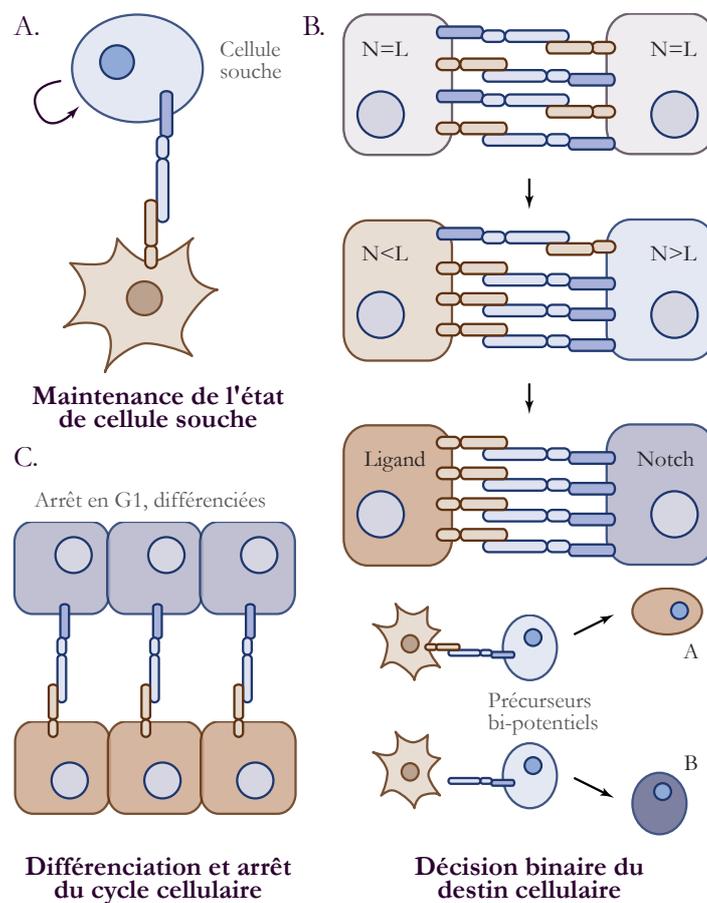
#### ◆ *Décision du destin cellulaire*

Notch participe à la décision du destin cellulaire des cellules lors du développement. En fonction de leur localisation dans l'embryon, les cellules prennent un chemin de différenciation différent. Au cours du développement de la drosophile, dans le système nerveux, les cellules progénitrices expriment, initialement, à la fois Notch et ses ligands. Au fur et à mesure de la différenciation, par des mécanismes encore mal connus, la concentration de ces protéines commence à différer entre les cellules voisines pour que, finalement, les cellules n'expriment plus que le récepteur ou son ligand. Les cellules ayant

hérité de Notch deviendront des cellules épidermiques alors que les cellules exprimant les ligands deviendront des neurones (Robey *et al.*, 1996).

#### ♦ Différenciation terminale

L'expression de Notch permet la différenciation finale des cellules, mais est aussi responsable de la détermination du destin cellulaire de manière précoce. Dans les cellules de peau chez l'Homme, DLL1 induit le programme de différenciation terminal. Chez la souris, DLL n'est pas exprimé, c'est Jag qui induit l'expression des marqueurs de différenciation et l'arrêt du cycle cellulaire par l'expression de p21Waf1 (Rangarajan *et al.*, 2001b).



**Figure 20 | Fonctions de Notch.** **A.** La voie de Notch permet le maintien de cellules souches ou de précurseurs à un stade indifférencié. **B.** La voie de Notch influence la décision binaire du destin cellulaire par signalisation latérale ou inductive. Au cours de la signalisation latérale, les cellules expriment autant de Notch (N) que de ligands (L), puis, finissent par exprimer seulement l'une ou l'autre des molécules selon le signal reçu. Quant au mode de signalisation inductive, il se produit entre deux cellules différentes. Un précurseur bipotentiel est destiné à se différencier en type cellulaire particulier selon l'activation de la signalisation de Notch (exemple A) ou le défaut de cette signalisation (exemple B). **C.** Une troisième propriété de Notch est sa capacité à influencer la différenciation et la progression du cycle cellulaire. L'activation de la voie de Notch entre deux cellules au stade de développement peut initier la différenciation terminale et induire l'arrêt du cycle cellulaire (Radtke & Raj, 2003).

## 2. *Fonction oncogéniques de Notch*

L'implication de Notch dans le développement tumoral a été initialement décrit dans les leucémies lymphoblastiques aiguës dans lesquelles une translocation chromosomique conduisait à la fusion du promoteur du gène TCR $\beta$  avec la partie C-Ter – contenant les répétitions EGF-like – de Notch1. L'expression de la forme tronquée de Notch1, correspondant à la forme NICD activatrice de la transcription, est impliquée dans le développement de la leucémie T-ALL chez l'Homme (Ellisen *et al.*, 1991).

La voie de Notch est aussi activée dans des tumeurs épithéliales, notamment dans le cancer du sein à la suite de la transformation par Ras (Weijzen *et al.*, 2002). Il a récemment été montré que l'augmentation de l'expression de Notch3 dans les tumeurs du sein contribue à l'apparition de métastases osseuses déclenchée par la sécrétion de TGF- $\beta$  par les ostéoblastes (Zhang *et al.*, 2010). Dans cette étude, il a été mis en évidence que l'extinction de Notch3 par siRNA empêchait la formation de colonies en agarose dépendante de TGF- $\beta$ , et diminuait l'expression du régulateur de l'EMT, Snail, ainsi que de la vimentine et de la fibronectine, deux marqueurs de cellules mésenchymateuses. Notch3 contribuerait à l'apparition des métastases osseuses en induisant l'EMT dans les cellules du cancer du sein.

Bien que Notch contribue au processus oncogénique, il nécessite l'activation d'un partenaire pour favoriser le développement tumoral. Ces partenaires peuvent être EA1 (Capobianco *et al.*, 1997), les protéines E6 et E7 du papillomavirus humain (Rangarajan *et al.*, 2001a), Myc (Girard *et al.*, 1996), SV40T (Bocchetta *et al.*, 2003) ou encore l'oncogène Ras (Fitzgerald *et al.*, 2000). La contribution de Notch à la tumorigenèse passerait par l'activation indirecte de la PI3K (Rangarajan *et al.*, 2001a), de ERB2 (Chen *et al.*, 1997) ou de NF- $\kappa$ B (Oswald *et al.*, 1998). Les mécanismes d'activation de la PI3K par Notch1 ne sont pas bien connus. En revanche, les promoteurs de ERB2 et de NF- $\kappa$ B contiennent des sites de liaison à CSL qui sont très probablement impliqués dans l'activation du gène par N1ICD.

Le développement tumoral nécessite la coopération de plusieurs oncogènes. On peut donc imaginer que Notch coopère avec un autre oncogène et que ce dernier serait responsable de l'initiation tumorale alors que la voie de Notch permettrait, par exemple, l'échappement aux voies de mort, l'invasion tissulaire ou la dissémination métastatique.

## D. L'EMT confère des propriétés de cellules souches

Des études suggèrent que les cellules ayant subi une EMT acquièrent les propriétés de cellules souches (Morel *et al.*, 2008). Le niveau d'expression des marqueurs CD24 et CD44 à la surface des cellules permet de déterminer la présence de ce type de cellules dans une population cellulaire. Une faible expression de CD24 associée à une expression élevée de CD44 indique un phénotype de cellules souches normales ou cancéreuses. Ce phénotype a d'abord été observé dans les cancers du sein (Al-Hajj *et al.*, 2003 ; Sleeman *et al.*, 2006). Une étude menée par l'équipe de Weinberg sur des cellules épithéliales mammaires transformées mais non cancéreuses a montré que l'induction d'une EMT par l'expression des facteurs de transcription Twist ou Snail conduisait à l'apparition de ce phénotype de cellules souches. En plus d'une apparence de cellules mésenchymateuses (diminution de l'expression des E-cadhérines et surexpression des N-cadhérines, de la vimentine, de la fibronectine et des facteurs de transcription Sip1 et Foxc2), les auteurs ont montré qu'une population de ces cellules présentait un phénotype CD44<sup>low</sup>/CD44<sup>high</sup> et avaient acquis la capacité à former des mamosphères (Mani *et al.*, 2008).

Lors de la mise en culture de cellules souches embryonnaires en milieu matrigel, les cellules périphériques de la cohorte subissent une EMT (Eastham *et al.*, 2007 ; Ullmann *et al.*, 2007). Les cellules mésenchymateuses indifférenciées ainsi générées sont caractérisées par la perte d'expression des E-cadhérines et l'augmentation de l'expression des N-cadhérines. Elles expriment aussi le facteur Snail, la vimentine et des métalloprotéases. Ces cellules qui ont subi une EMT expriment à nouveau certains facteurs de transcription normalement détectés dans les cellules totipotentes, comme par exemple le facteur Oct4 impliqué dans la régulation positive de gènes de l'embryogenèse. Cette observation suggère que les cellules qui ont subi l'EMT se sont aussi dé-différenciées en cellules souches. Il a récemment été montré que, lors de l'extinction du facteur Oct4 dans des cellules souches murines, celles-ci arrêtaient leur prolifération et bloquaient la progression du cycle cellulaire en phase G0/G1 (Lee *et al.*, 2010). Ce facteur serait donc nécessaire au maintien de l'auto-renouvellement des cellules souches. Il est intéressant de noter que dans cette étude, les auteurs ont aussi mis en évidence une induction de l'expression de p21Waf1 à la suite de l'extinction de Oct4. La répression de p21Waf1 par Oct4 pourrait contribuer à la maintenance de la prolifération des cellules souches.

Le facteur Nanog est également exprimé dans les cellules mésenchymateuses indifférenciées, sa surexpression induit l'entrée en phase S et permet le renouvellement cellulaire des cellules totipotentes (Hyslop *et al.*, 2005 ; Kim *et al.*, 2005b ; Oh *et al.*, 2005). Ce facteur a récemment été décrit comme étant à la fois un inducteur de l'EMT et induit par l'EMT (Meng *et al.*, 2010).

La corrélation existant entre l'expression de ces différents facteurs dans les cellules ayant subi une EMT et possédant des caractéristiques de cellules souches suggèrent un lien entre cette transition et la dédifférenciation cellulaire. Ces facteurs sont capables de rendre le potentiel pluripotent des cellules qui les expriment. Notons que la réapparition de pluripotentialité des cellules chez l'adulte n'est pas la seule caractéristique phénotypique commune aux cellules mésenchymateuse. Ces cellules souches réactivent aussi les propriétés de différenciation. Il a également été noté que ces cellules devenaient plus résistantes aux traitements de chimiothérapie.

### ***1. Cellules souches et agressivité tumorale***

Dans certaines tumeurs du sein, une petite sous-population de cellules présente à leur surface une forte expression de la molécule CD44 et une faible expression de CD24, ces cellules sont dites de phénotype CD44<sup>higt</sup>/CD24<sup>low</sup>. Cette sous-population contient des cellules capables d'initier de nouvelles tumeurs contrairement aux cellules observées dans les mêmes prélèvements mais exprimant faiblement CD44 et fortement CD24 (CD44<sup>low</sup>/CD24<sup>high</sup>) (Al-Hajj *et al.*, 2003).

Récemment, une étude génomique comparative a consisté en l'observation du développement de 1005 tumeurs chez la souris. Ces tumeurs ont été induites par la transformation de 598 lignées cellulaires humaines par le virus murin de la leucémie MuLV (Mattison *et al.*, 2010). Cette analyse inter-espèces a révélé que, parmi le grand nombre d'oncogènes et de suppresseurs de tumeur dont l'expression était modifiée à la suite du développement des tumeurs, un nombre significatif possédaient des sites de liaison pour les facteurs de transcription Oct4 et Nanog. Les auteurs ont également observé que les souris porteuses de tumeurs comprenant des insertions dans, ou à proximité, des gènes supposés participer à l'auto-renouvellement cellulaire sont mortes significativement plus rapidement que les souris ne montrant pas ces insertions. Cette étude, au-delà de présenter un nouveau catalogue de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans la tumorigenèse, montre

l'importance du rôle des mécanismes impliqués dans l'auto-renouvellement des cellules souches dans l'agressivité tumorale.

## 2. *Origine des cellules tumorales*

L'avancement des recherches sur l'étude du développement tumoral a conduit à s'interroger sur l'origine des cellules tumorales. En effet, les connaissances accumulées dans le domaine de l'oncogenèse depuis des années ont conduit à penser que la première cellule transformée donnant lieu à une tumeur trouverait son origine dans une cellule différenciée, dans laquelle, l'apparition successive de mutations aurait conduit à la dédifférenciation et à la faculté de proliférer à nouveau. Aujourd'hui, de nombreuses études semblent indiquer que cette première cellule tumorale aurait, à l'origine, la capacité de proliférer, ce qui lui permettrait d'accumuler les mutations et l'instabilité génomique nécessaires à la transformation (Soltysova *et al.*, 2005 ; Stingl & Caldas, 2007). Cette cellule serait une cellule souche initiatrice. Toutefois, ces hypothèses sont encore controversées (Bjerkvig *et al.*, 2005).

Le fait que dans de nombreuses études les cellules répondent à la surexpression de H-Ras, K-Ras ou à la mutation de ces gènes par l'induction de la sénescence appuie la théorie des cellules souches comme cellules initiatrices de la tumeur. Lors de la tumorigenèse, ce serait les cellules souches qui répondraient à Ras par la transformation, alors que les cellules capables d'activer les mécanismes de sénescence répondraient par un arrêt définitif de la prolifération cellulaire. En effet, les cellules souches – que l'on trouve notamment au fond des cryptes dans le côlon – ont une capacité de prolifération pratiquement infinie et on peut supposer qu'elles sont beaucoup moins sensibles à la sénescence répllicative.

Cependant, si l'instabilité génomique est nécessaire à la transformation et que l'une des raisons de l'augmentation de cette instabilité est la fusion des télomères, alors un argument en faveur des cellules dédifférenciées comme initiatrices de la tumeur, serait le suivant : pour que la fusion des télomères soit possible avant que les télomérases ne soient ré-exprimées, les cellules ne se divisaient pas à l'origine. En effet, les cellules souches au fort taux prolifératif expriment la télomérase qui leur permet d'empêcher ce risque de fusion des chromosomes.

### 3. *Implication de p21Waf1 dans le maintien des caractéristiques de cellules souches*

Certaines études suggèrent que l'expression de p21Waf1 est cruciale pour le maintien du potentiel des cellules souches car elle restreint la capacité d'auto-renouvellement de ces cellules dans de nombreux tissus. L'exemple le mieux décrit de nos jours se trouve dans le système hématopoïétique, dans lequel, des souris dont le gène *CDKN1A* codant pour p21Waf1 a été invalidé ont montré une augmentation de la prolifération des cellules souches (Cheng *et al.*, 2000). p21Waf1 permet le maintien de la quiescence relative de ces cellules leur permettant de garder leur potentiel répliatif alors que les lignées qui en découlent ont la capacité de fortement proliférer avant de s'orienter inexorablement vers une différenciation terminale. Dans certains cas, la restriction de la prolifération par p21Waf1 serait requise pour le maintien du potentiel des cellules souches sur un long terme.

p21Waf1 est également impliquée dans le maintien de la stabilité génomique des cellules souches. Des souris délétées du gène de p21Waf1 et exprimant PML-RAR – un oncogène responsable de l'apparition de la leucémie promyélocytaire aiguë chez l'Homme – montrent de nombreuses lésions de l'ADN de leurs cellules hématopoïétiques dont 95 % présentent de multiples foci (Viale *et al.*, 2009). Dans cette étude, les auteurs montrent que dans les cellules souches hématopoïétiques, l'expression de p21Waf1 induite par l'oncogène conduit à un arrêt réversible du cycle cellulaire pour permettre la réparation des cassures de l'ADN. Le fait que p21Waf1 ait un rôle de protection de l'intégrité de l'ADN de ces cellules dans un contexte oncogénique peut être expliqué par deux hypothèses selon l'activité de suppresseur de tumeur ou oncogénique de p21Waf1. En effet, la protection contre la mort cellulaire lors de dommages de l'ADN des cellules exprimant un oncogène conduit à penser que p21Waf1 favoriserait la tumorigenèse en empêchant l'apoptose des cellules présentant des cassures de l'ADN. Cependant, l'instabilité génomique induite par ces cassures pourraient, au contraire, favoriser la progression tumorale en introduisant d'autres mutations ou réarrangements chromosomiques. Il serait alors raisonnable de penser que p21Waf1 ait un rôle suppresseur de tumeur.

L'étude de l'implication de p21Waf1 dans la prolifération cellulaire dépendante de l'adhésion des cellules a montré que, contrairement à des cellules HCT116 exprimant p21Waf1, des cellules HCT116 mutées sur les deux allèles de p21Waf1 seraient incapables de former des sphéroïdes multicellulaires en culture en suspension et induiraient l'apoptose. Le

contact des cellules entre elles est nécessaire à leur survie en culture en suspension et la capacité des cellules à former des sphéroïdes dépend de l'expression des protéines E-cadherins. Cette découverte semble indiquer que p21Waf1 ait un rôle d'activateur de l'expression des E-cadherins, empêchant ainsi l'apoptose due à l'absence d'attachement (Mueller *et al.*, 2000). De plus, cette observation amène à s'interroger sur le rôle éventuel de p21Waf1 dans l'induction de l'EMT. En effet, si la perte de p21Waf1 conduit à diminuer l'expression de l'E-cadhérine cet événement pourrait être impliqué dans le processus d'EMT.

Une autre étude, menée sur des cellules cancéreuses du sein, a montré que l'extinction de p21Waf1 favorisait la formation de mamosphères lors de l'expression oncogénique de Ras ou de Myc. p21Waf1 serait responsable du maintien de l'expression de l'E-cadhérine en réprimant l'inhibition de la transcription de son gène par Twist. p21Waf1 permettrait également d'empêcher l'accumulation de cellules au phénotype CD24<sup>low</sup>/CD44<sup>high</sup> après surexpression de Ras ou de Myc (Liu *et al.*, 2009).

Si p21Waf1 semble avoir un rôle d'inhibiteur de l'EMT, sa fonction dans le maintien de l'état de quiescence relative des cellules souches indique, quant à elle, que p21Waf1 permettrait à ces cellules de garder leur capacité d'auto-renouvellement, et donc, dans le cas de cellules souches cancéreuses, leur capacité à générer d'autres cellules. Il semblerait que p21Waf1 tend à favoriser le renouvellement cellulaire dans les cellules souches mais qu'il empêche la perte d'adhésion des cellules épithéliales.

## Chapitre VI : But du travail

Nous l'avons vu, l'oncogénèse implique qu'un certain nombre de mécanismes se mettent en place pour permettre à la cellule d'inhiber les processus de protection et d'activer la prolifération. L'oncogène Ras est muté dans environ 30 % des cancers colorectaux. Aujourd'hui, de nombreuses études montrent son implication dans l'initiation de la tumorigénèse, dans le processus métastatique et aussi dans la mise en place de mécanismes de résistance au traitement anti-tumoral.

Malgré son potentiel oncogénique, la réponse cellulaire à une mutation du gène de l'oncogène Ras rendant la protéine constitutivement active conduit à l'activation de processus responsables de l'arrêt du cycle cellulaire. Lorsque tous ces mécanismes fonctionnent normalement, la cellule entre en sénescence ou en apoptose. Cette réponse aboutit à la protection de l'organisme contre le cancer. Lors du développement d'un cancer, les voies de détection ou de réponse à l'oncogène sont altérées et ne permettent plus d'induire la mort cellulaire.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de réponse à l'oncogène H-Ras dans un contexte où le suppresseur de tumeur p53 est muté, conduisant à la perte de liaison à l'ADN, et par là même, à la perte de son potentiel transcriptionnel. Nous avons vu que, malgré la mutation G12V de *HRAS*, les cellules sont capables d'induire l'entrée en sénescence. Ce résultat est surprenant étant donné que l'OIS est un mécanisme essentiellement décrit dans des cellules primaires, et il nous a conduit à étudier les mécanismes permettant cette sénescence indépendante de l'activité transcriptionnelle de p53.



**Figure 21 | Schéma d'échappement à l'arrêt du cycle cellulaire induit par Ras.**

Au cours de cette étude, nous avons observé l'apparition d'un phénotype de cellules mésenchymateuses dans les cellules ayant échappées à l'OIS. Le rôle de l'EMT dans

la tumorigenèse a principalement été décrit comme un processus permettant l'invasion tissulaire et l'apparition de métastases, mais il a aussi été décrit comme permettant la transformation cellulaire initiale (Ansieau *et al.*, 2008). Dans un deuxième temps, nous nous sommes alors interrogés sur le rôle éventuel de l'EMT dans le processus d'échappement s'opérant dans notre modèle d'étude.

Une meilleure connaissance de la réponse à la voie oncogénique de Ras dans le cancer colorectal se justifie par l'échec des chimiothérapies faisant intervenir des inhibiteurs directs du récepteur à l'EGF chez les patients dont la tumeur présente une mutation sur le gène de *KRAS* (Karapetis *et al.*, 2008).

## RÉSULTATS

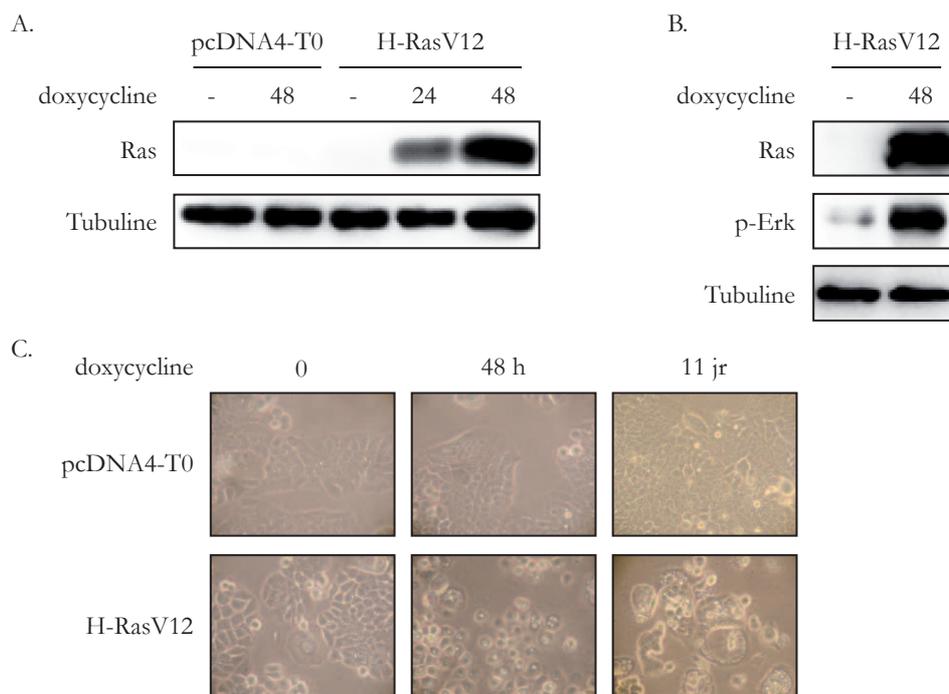
# Chapitre I : Ras induit l'échappement à la sénescence

Dans un premier temps nous avons voulu déterminer quelle était la réponse au stress oncogénique induit par Ras dans un contexte où p53 est mutée.

## A. La surexpression de H-RasV12 induit l'entrée en sénescence et l'arrêt du cycle cellulaire dans les HT29

Afin d'étudier l'effet de l'oncogène Ras sur la survie et le cycle cellulaire, nous avons utilisé une isoforme constitutivement active, H-RasV12, dans un type cellulaire d'adénocarcinome colorectal, la lignée HT29. Nous avons choisi d'utiliser la lignée HT29 issue d'adénocarcinome colorectal car cette lignée présente une mutation homozygote sur le codon 273 du gène de p53 conduisant à la substitution d'une arginine en histidine et à une modification du domaine de liaison à l'ADN de p53. Dans ces cellules, il est décrit que l'activation de p53 suite à un stress cellulaire est toujours possible mais que p53 n'est plus capable de remplir ses fonctions transcriptionnelles. Nous avons choisi d'utiliser un clone de H-Ras muté sur le codon 12. Cette mutation conduit à la substitution d'une glycine en valine et empêche l'hydrolyse du GTP en GDP par les protéines GAP conduisant à l'activation constitutive de H-Ras. Les cellules HT29 n'expriment pas la forme constitutivement active de Ras, nous permettant ainsi d'observer l'effet réel de la surexpression de H-RasV12, forme mutante de Ras. Nous avons donc développé un modèle inductible d'expression de H-RasV12 dans les cellules HT29.

Le modèle d'étude utilisé fonctionne selon le principe T-Rex<sup>TM</sup> issu de l'opéron tétracycline chez *E. coli*. Il comprend d'une part, l'oncogène H-RasV12 sous le contrôle d'un promoteur minimal pCMV lié à deux séquences de l'opérateur TetO2, et d'autre part, un gène codant pour le répresseur TetR. En temps normal, le répresseur est transcrit, se lie à la séquence TetO pour l'inhiber et H-RasV12 n'est pas exprimé. La présence de doxycycline empêche la liaison de TetR sur la séquence promotrice de H-RasV12 et active sa transcription. L'efficacité du modèle a été vérifiée par western blot. La figure 22A montre que, dès 24 h d'induction avec de la doxycycline, le taux de Ras augmente dans les cellules HT29.

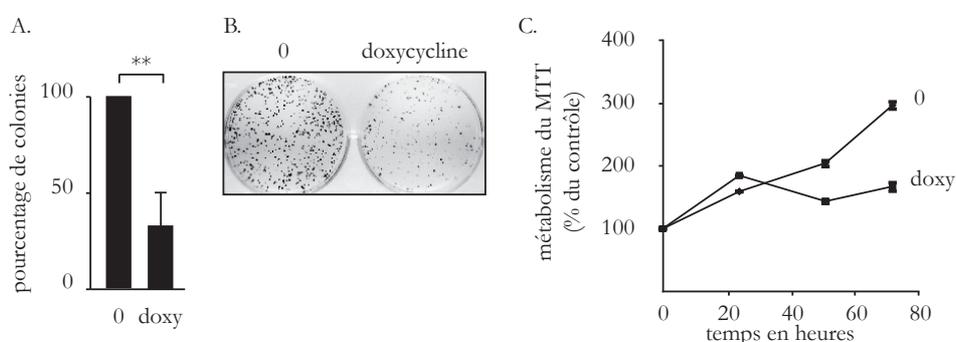


**Figure 22 | Analyse de l'induction de l'expression de H-RasV12 et de la phosphorylation de Erk. A et B.** H-RasV12 est induit dans les cellules HT29 avec  $50 \text{ ng.ml}^{-1}$  de doxycycline pendant 24 ou 48 h. Un contrôle de l'effet de la doxycycline est effectué sur des cellules transfectées avec un vecteur pcDNA4 vide puis traitées à l'aide de  $50 \text{ ng.ml}^{-1}$  de doxycycline. Les extraits protéiques totaux sont analysés à l'aide d'anticorps monoclonaux de souris anti-H-Ras et anti-Erk (Y204). L'expression de la tubuline est utilisée comme contrôle de charge. **C.** H-RasV12 est induit avec  $50 \text{ ng.ml}^{-1}$  de doxycycline pendant 48 h ou 11 jr puis les cellules sont observées au microscope optique à contraste de phase à un grossissement de 200 fois.

Les mutations de Ras décrites dans le cancer colorectal sont principalement observées sur l'isoforme K-Ras. Pourtant, c'est l'isoforme H-Ras qui est la plus utilisée dans les modèles d'étude cellulaire ou dans les modèles *in vivo*. Les deux isoformes ne présentent pas de différence dans leur fonctionnement et sont capables d'activer les mêmes voies sous-jacentes. Toutefois, il a été observé que K-Ras activerait préférentiellement la voie des MAP Kinases alors que H-Ras activerait plutôt la voie de la PI3K lui octroyant un pouvoir transformant plus important. Nous avons alors choisi d'utiliser un mutant de l'isoforme H-Ras afin d'obtenir un fort pouvoir transformant, et nous avons vérifié que l'induction de l'expression de notre mutant permettait également l'activation de la voie des MAP Kinases. Nous avons mesuré l'activation de Erk, protéine située en aval de Ras dans la voie de signalisation des MAP Kinases, et nous avons observé une augmentation de la phosphorylation activatrice Erk1/2 sur sa tyrosine 204 dans les cellules exprimant H-RasV12

(figure 22B). Le modèle d'induction nous permet donc d'induire une expression de la protéine H-RasV12 active dans la lignée HT29.

Lors de l'induction de l'expression de H-RasV12, nous avons observé un changement morphologique des cellules HT29. Les cellules apparaissent plus rondes et turgescentes en microscopie optique après 48 h d'expression de H-RasV12 (figure 22C). Nous avons également observé une augmentation de volume du cytoplasme de certaines cellules ainsi que l'apparition de nombreuses vésicules cytoplasmiques. Après 11 jours d'expression de H-RasV12, la plupart des cellules présente ce phénotype. L'augmentation du volume cellulaire ainsi que l'apparition des vésicules peuvent témoigner de l'état de sénescence.

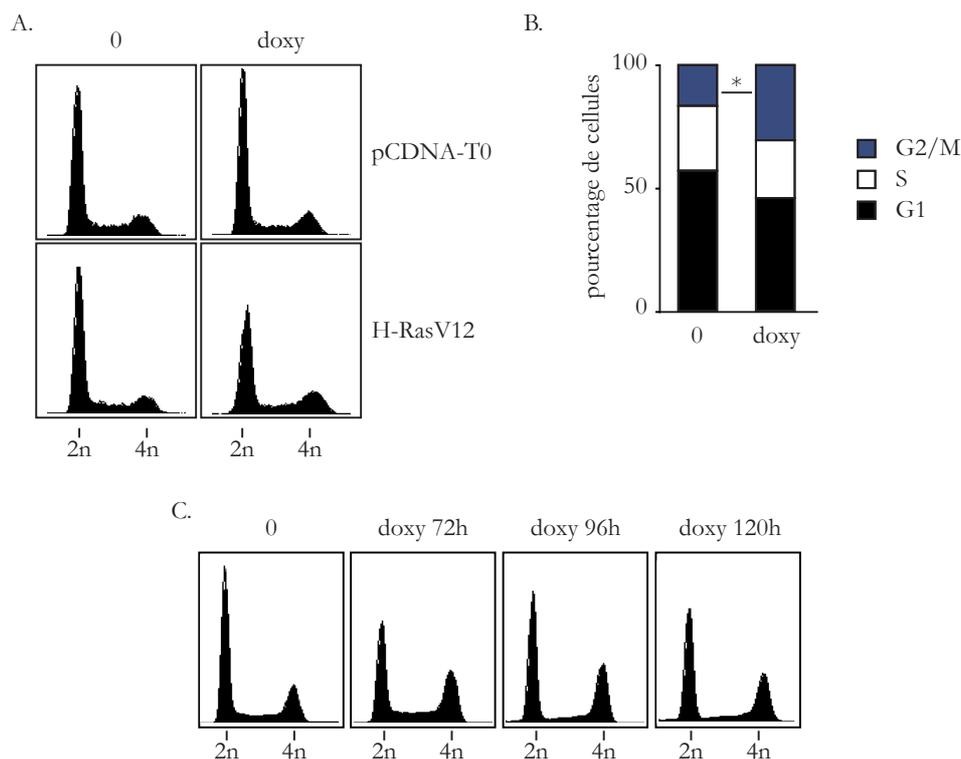


**Figure 23 | Analyse de la formation de colonies et de l'activité métabolique cellulaire induite par H-RasV12.** **A et B.** H-RasV12 est induit pendant 8 jours avec  $50 \text{ ng.ml}^{-1}$  de doxycycline puis les colonies formées sont colorées à l'aide de cristal violet et comptées. Les écarts-types sont calculés sur une moyenne de trois expériences (\*\* $p < 0,01$ ). **C.** H-RasV12 est induit pendant 24, 48 ou 72 h avec  $50 \text{ ng.ml}^{-1}$  de doxycycline, puis les cellules sont incubées avec  $5 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  de MTT. La DO est mesurée à 500 nm. Les écarts-types sont calculés sur une moyenne de trois réplicats répétés lors de deux expériences distinctes (\*\* $p < 0,01$ ).

Nous avons testé l'effet de l'expression de H-RasV12 sur la formation de colonies de cellules. Le test de clonogénicité permet d'estimer la capacité de cellules isolées les unes des autres à poursuivre leur cycle cellulaire et à former des colonies de cellules. Nous avons donc induit l'expression de H-RasV12 durant 8 jours, puis compté le nombre de colonies formées à la suite de l'expression oncogénique par rapport à des cellules n'exprimant pas H-RasV12 (figure 23A et 23B). Nous avons alors observé que, malgré l'activation des MAP Kinases, l'expression de H-RasV12 conduisait à une diminution du nombre de colonies. Seule 30 % des cellules sont capables de poursuivre leur cycle cellulaire après induction de H-RasV12.

Nous avons également évalué l'effet de H-RasV12 sur la prolifération et l'activité métabolique des cellules en utilisant un test de viabilité au MTT (figure 23C). Le MTT est métabolisé en cristaux de formazan par les cellules vivantes. Les cristaux sont ensuite solubilisés et la densité optique mesurée est directement corrélée à l'activité métabolique des cellules vivantes dans chaque condition. Ce test de viabilité nous a permis d'observer que 24 h après l'induction de H-RasV12, les cellules montraient une augmentation de leur activité métabolique, mais qui diminuait à 48 h puis restait significativement inférieure au métabolisme de cellules en croissance à 72 h.

Le test de MTT montre que l'expression de H-RasV12 empêche l'augmentation de l'activité métabolique par rapport aux cellules contrôles, toutefois, le graphique semble indiquer que, même après 72 h d'induction de l'oncogène, les cellules n'ont pas diminué leur activité métabolique par rapport à la mesure faite au temps 0. Pourtant le test de clonogénicité montre que certaines cellules ne sont pas capables de proliférer. Les raisons pour lesquelles ces cellules ne forment pas de colonies peuvent être diverses. Les cellules peuvent avoir arrêté leur cycle cellulaire et être entrées en sénescence ou bien, elles peuvent avoir mis en place des processus de mort cellulaire. Afin de déterminer si les cellules répondent à l'expression de H-RasV12 par de la mort cellulaire, nous avons mesuré la distribution des cellules dans le cycle cellulaire à la suite de 48, 72, 96 ou 120 h d'expression de H-RasV12 (figure 24). Le marquage de l'ADN par iodure de propidium nous a permis de constater qu'il n'y avait pas d'augmentation significative du nombre de cellules en phase subG1 après 72 h d'expression de H-RasV12. La présence d'une phase sub-G1 – sur un histogramme représentant le nombre de cellules en fonction de la quantité d'ADN – montre la présence de corps apoptotiques avec des quantités d'ADN inférieures à la celle d'une cellule diploïde. Ces corps apoptotiques sont représentatifs des cellules en apoptose. Notons que le profil obtenu lors de l'expression de H-RasV12 montre une augmentation significative du nombre de cellules 4n, en revanche les variations du nombre de cellules dans les autres phases du cycle ne sont pas significatives. H-RasV12 induit une accumulation des cellules en transition G2/M.



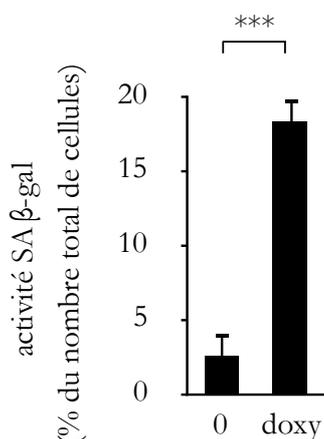
**Figure 24 | Analyse du cycle cellulaire des cellules inducibles pour H-RasV12 par cytométrie en flux. A et B.** H-RasV12 est induit dans les cellules pendant 48 h et l'ADN des cellules est marqué à l'aide de DAPI puis analysé par cytométrie en flux. **A.** Les histogrammes représentent la répartition des cellules en fonction de la quantité d'ADN et sont représentatifs de trois expériences. **B.** L'histogramme représente une moyenne de la répartition des cellules dans le cycle (\* $p < 0,05$ ). **C.** Les histogrammes représentent la répartition des cellules en fonction de la quantité d'ADN après 72, 96 ou 120 h d'induction de H-RasV12 et sont représentatifs de trois expériences.

Ces résultats nous ont conduit à penser que certaines cellules arrêtaient leur cycle cellulaire – puisque seulement quelques cellules étaient capables de former des colonies après induction de H-RasV12 – mais ne mourraient pas – puisque les profils de FACS ne montrent pas de cellules en phase sub-G1 et que le test de MTT semble indiquer que l'augmentation de l'activité métabolique des cellules est moins importante lorsqu'elles expriment H-RasV12 –.

Toutefois, notons que le test de MTT ne permet pas de différencier une variation de la prolifération cellulaire d'une variation de l'activité métabolique. Par exemple, le profil que nous avons obtenu dans la figure 24C pourrait parfaitement être expliqué par l'absence de prolifération des cellules exprimant H-RasV12, mais aussi par la diminution de la prolifération ou par la mort de certaines cellules, compensé par le maintien ou

l'augmentation de l'activité métabolique de quelques cellules. Les résultats obtenus lors du test de clonogénicité semble appuyer cette dernière hypothèse.

La sénescence est décrit comme un état où les cellules ne progressent pas dans le cycle cellulaire mais sont toutefois capables d'activité métabolique. Nous avons mesuré l'activité de la SA  $\beta$ -galactosidase, connue pour être activée lors de la sénescence, puis nous avons déterminé le pourcentage de cellules sénescents par rapport au nombre total de cellules (figure 25). Près de 20 % de cellules présentaient une activation de la SA  $\beta$ -galactosidase après six jours d'expression de H-RasV12. Nous n'avons pas été en mesure de détecter l'activité de la SA  $\beta$ -galactosidase avant six jours. Cette absence de détection peut être due à une limite technique ou bien au temps nécessaire à la mise en place de la sénescence.



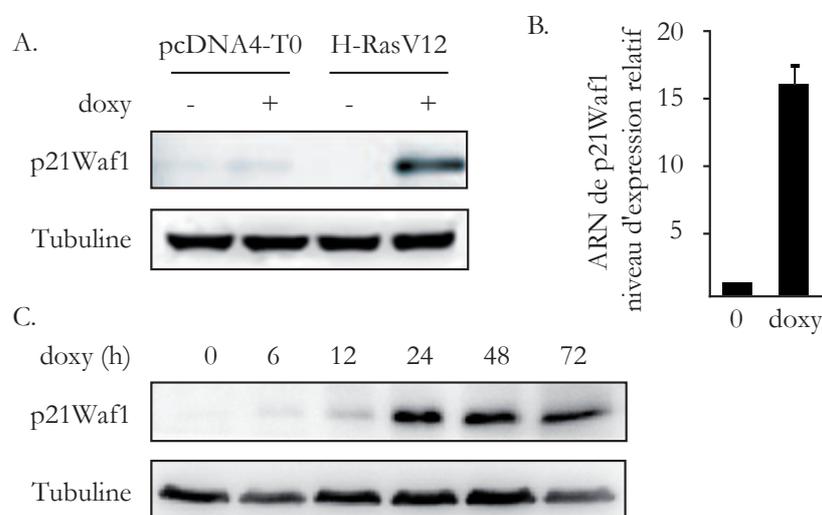
**Figure 25 | Mesure de l'activité de la SA  $\beta$ -Gal dans les cellules inductibles pour H-RasV12.** H-RasV12 est induit avec 50 ng.ml<sup>-1</sup> de doxycycline pendant six jours puis les cellules sénescents sont marquées puis visualisées au microscope optique. L'histogramme représente une moyenne de trois comptages effectués sur des expériences différentes (\*\*\*)p<0,001).

Globalement, ces résultats semblent indiquer que l'expression de H-RasV12 dans les cellules HT29 conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et à l'entrée des cellules en sénescence. Ces résultats ne montrent aucune preuve d'induction de l'apoptose à la suite de l'expression de H-RasV12.

## B. H-RasV12 induit l'expression et la stabilisation de p21Waf1 indépendamment de p53

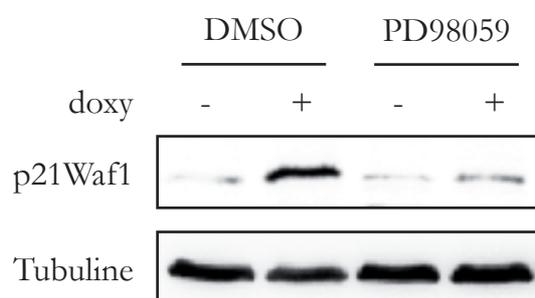
### 1. Induction de l'expression de p21Waf1 en réponse à l'oncogène H-RasV12

L'inhibiteur du cycle cellulaire p21Waf1 jouant un rôle prépondérant l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en sénescence des cellules, nous nous sommes interrogés sur son implication dans la réponse à H-RasV12 dans notre modèle cellulaire. Nous avons alors mesuré l'expression de p21Waf1 après induction de H-RasV12 et nous avons observé une augmentation de sa quantité en ARN et en protéine (figure 26). En effet, l'analyse par PCR en temps réel nous a révélé que l'expression transcriptionnelle de p21Waf1 était surexprimée d'un facteur 15 dans les cellules exprimant H-RasV12 par rapport à des cellules en croissance (figure 26B). De plus, l'analyse de l'expression protéique de p21Waf1 par western blot a permis de conclure que la protéine était stabilisée et que son niveau d'expression était détectable dès 24 h d'expression de H-RasV12 et pendant au moins 72 h (figure 26C). Nous avons également vérifié que l'expression de p21Waf1 n'était pas due à l'ajout de doxycycline seule en utilisant la lignée de HT29 transfectée avec le vecteur pCDNA4 vide (figure 26A).



**Figure 26 | Mesure de l'expression de p21Waf1 après induction de H-RasV12. A et C.** H-RasV12 est induit avec 50 ng.ml<sup>-1</sup> de doxycycline pendant 6, 12, 24, 48 ou 72 h. Un contrôle de l'effet de la doxycycline est effectué sur des cellules transfectées avec un vecteur pCDNA4 vide traitées à l'aide de 50 ng.ml<sup>-1</sup> de doxycycline pendant 48 h. Les extraits protéiques totaux sont analysés à l'aide d'un anticorps monoclonal de lapin anti-p21Waf1. L'expression de la tubuline est utilisée comme contrôle de charge. **B.** H-RasV12 est induit pendant 48 h et le niveau d'expression d'ARNm de p21Waf1 est déterminé par RT-qPCR. Le résultat est exprimé par rapport à l'expression de p21Waf1 dans des cellules contrôles non-induites et normalisé à RPLP0. Les écarts-types sont calculés sur une moyenne de 3 expériences (p<0,001).

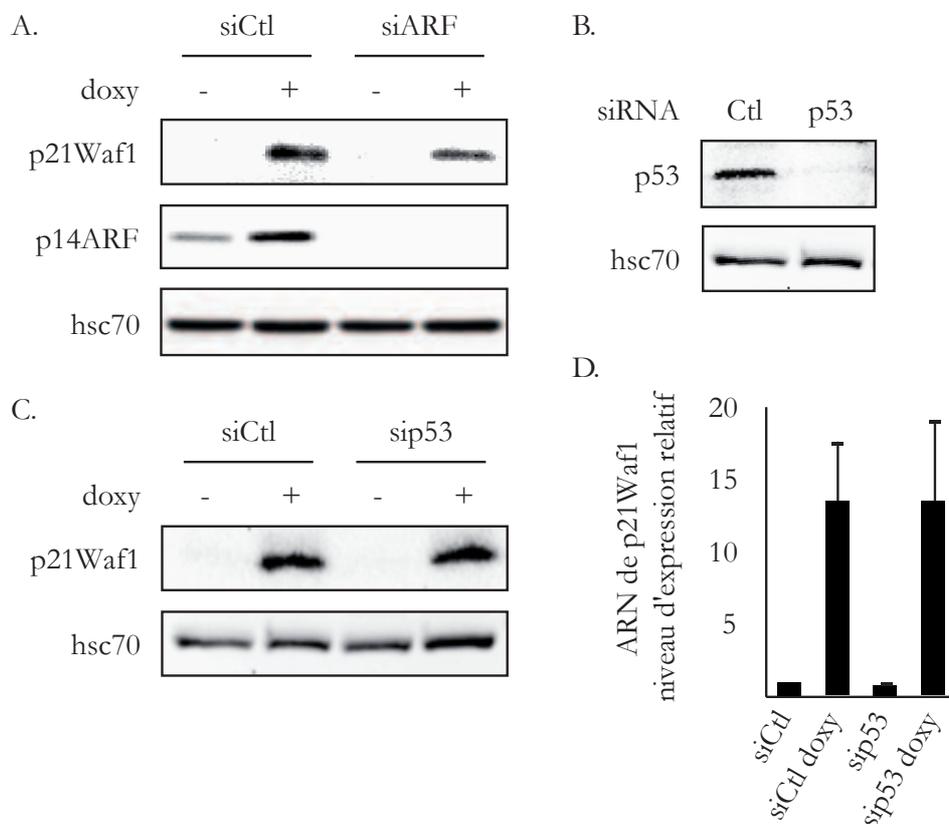
La protéine Ras est située en amont de plusieurs voies de cascade d'activation de kinases. Nous avons observé que Ras induisait l'activation de la voie des MAP Kinases. Nous avons également voulu savoir si l'expression de p21Waf1 dépendait de l'activation de cette voie. Dans ce but, nous avons utilisé la molécule PD98059, un inhibiteur de la kinase Erk. Au moment de l'induction de l'expression de H-RasV12, nous avons ajouté 2  $\mu\text{M}$  d'inhibiteur au milieu cellulaire. La figure 27 montre que l'inhibition de la voie des MAP Kinase diminue significativement l'expression de p21Waf1 à la suite de l'induction de H-RasV12. L'arrêt induit par l'expression de l'oncogène Ras dépend donc de l'activation de la voie des MAP Kinase.



**Figure 27 | Mesure de l'expression de p21Waf1 après inhibition de Erk et induction de H-RasV12.** H-RasV12 est induit avec 50  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  de doxycycline pendant 48 et Erk est inhibé avec 2  $\mu\text{M}$  de PD98059. Les extraits protéiques totaux sont analysés à l'aide d'un anticorps monoclonal de lapin anti-p21Waf1. L'expression de la tubuline est utilisée comme contrôle de charge.

p53 est connu comme étant le principal facteur de transcription permettant l'activation du promoteur de p21Waf1. Cependant, les cellules HT29 sont mutées sur le domaine de liaison à l'ADN du gène TP53 codant pour la protéine p53. p53 est exprimée dans les cellules HT29 mais incapable de se lier, seule, à l'ADN. Lors de l'induction de l'expression de H-RasV12 nous avons observé, par western blot, une augmentation de l'expression de p14ARF, protéine nécessaire à l'inhibition de HDM2 et à la stabilisation de p53 (figure 28A). Nous nous sommes alors interrogés sur la capacité de p53 à permettre l'expression de p21Waf1 dans notre modèle malgré son incapacité à pouvoir se lier à l'ADN. Nous avons alors testé l'expression de p21Waf1 en l'absence de la protéine p53. Nous avons transfecté un siRNA dirigé contre p53 et analysé l'expression de p21Waf1 après 48 h d'induction de H-RasV12. La figure 28B représente l'extinction de p53 après siRNA. Les figures 28B et 28D montrent, respectivement, l'expression protéique et transcriptionnelle de p21Waf1 après extinction de p53 et expression de H-RasV12. Ces résultats nous ont permis

de conclure que H-RasV12 conduisait à l'activation du gène de p21Waf1 et à la stabilisation de la protéine indépendamment de p53. Le siRNA de p14ARF ne permet pas, non plus, d'empêcher l'expression de p21Waf1 en présence de H-RasV12 (figure 28A).



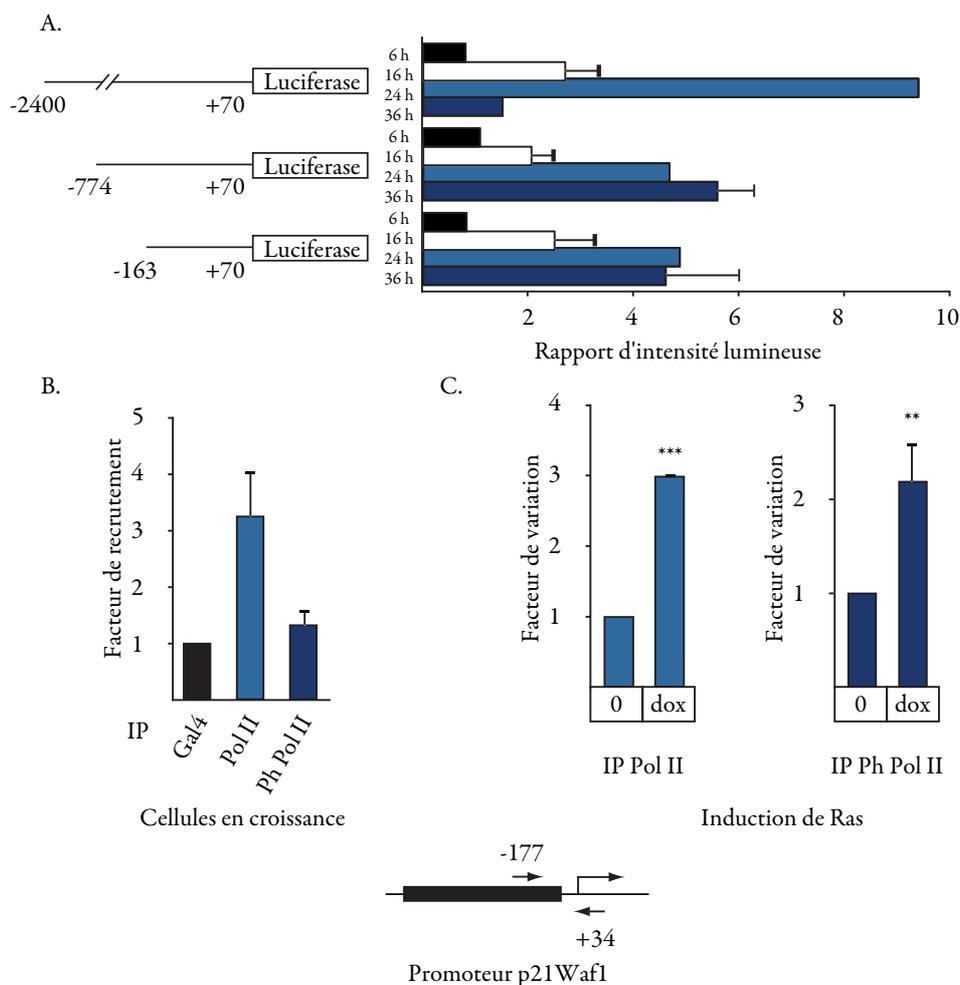
**Figure 28 | Mesure de l'expression de p14ARF et de p21Waf1 après extinction de l'expression de p53 et p14ARF et induction de H-RasV12. A, B et C.** Les cellules sont transfectées avec un siRNA dirigé contre p14ARF, p53 ou avec un siRNA contrôle pendant 48 h. H-RasV12 est induit dans les cellules à l'aide de 50 ng.ml<sup>-1</sup> de doxycycline pendant 48 h. Les extraits totaux sont analysés en western blot à l'aide d'un anticorps polyclonal de chèvre anti-p14ARF ou d'anticorps monoclonaux de lapin anti-p21Waf1 ou anti-p53. L'expression de hsc70 est utilisée comme contrôle de charge. **D.** Les cellules sont transfectées avec un siRNA dirigé contre p53 ou avec un siRNA contrôle pendant 48 h. H-RasV12 est ensuite induit pendant 48 h et le niveau d'expression d'ARNm de p21Waf1 est déterminé par RT-qPCR. Le résultat est exprimé par rapport à l'expression de p21Waf1 dans des cellules contrôles non-induites et normalisé à RPLP0. Les écarts-types sont calculés sur une moyenne de 3 expériences (p<0,001).

Le test de gène rapporteur permet l'étude de l'activation du promoteur d'un gène donné par le couplage de ce promoteur avec le gène de la luciférase. La luciférase est une protéine responsable de la production de lumière chez la luciole. En présence d'ATP, elle oxyde la luciférine et produit un dégagement lumineux. Nous avons transfecté différentes constructions du promoteur de p21Waf1 couplé au gène de la luciférase, puis, induit

l'expression de H-RasV12 pendant 6, 16 ou 24 h. Les deux constructions les plus courtes du promoteur de p21Waf1 ne possèdent pas de site de liaison de p53. À l'aide de l'outil bioinformatique *MatInspector*, nous avons localisé plusieurs sites de fixation de p53 sur le promoteur de p21Waf1 : un site en -2272 avant le premier codon transcrit, quatre sites entre -2232 et -2185, un site en -1458 et trois sites entre -1340 et -1329. Nous avons mesuré l'activité de la luciférase puis calculé le facteur d'activité par rapport à une mesure effectuée sur des cellules transfectées en croissance (figure 29).

La figure 29A montre que l'induction de l'expression de H-RasV12 induit l'activation du promoteur de p21Waf1. En effet, 16 h après l'ajout de doxycycline, l'activation des trois promoteurs est augmentée d'un facteur deux par rapport à des cellules en croissance. Aucune activation n'est observée à seulement 6 h d'expression de H-RasV12, en revanche, elle atteint son maximum après 24 h d'induction. Les promoteurs tronqués ne semblent pas être activés aussi fortement que le promoteur le plus long de p21Waf1. En effet, au temps 24 h d'induction, le promoteur long est pratiquement 10 fois plus actif que dans des cellules en croissance, alors que les deux promoteurs tronqués sont seulement 5 fois plus actifs. Cependant, les promoteurs courts de p21Waf1 permettent l'activation de la transcription à la suite de l'expression de H-RasV12 malgré l'absence du site de liaison de p53. À partir de 36 h, le promoteur long observe une diminution considérable de son activation tandis que les promoteurs courts maintiennent l'expression de la luciférase. Cette observation pourrait être expliquée par la présence de régions régulatrices sur la séquence faisant défaut aux deux promoteurs courts. Cette séquence pourrait permettre la liaison de facteurs inhibiteurs de la transcription et diminuer la transcription du gène. Le promoteur de p21Waf1 étant actif malgré l'absence de la séquence située en amont du nucléotide -167, nous pouvons déclarer que le facteur de transcription responsable de cette activation se fixe dans la zone proximale de la séquence du promoteur de p21Waf1.

## Résultats



**Figure 29 | Analyse de l'activation du promoteur de p21Waf1 après induction de H-RasV12.** **A.** Analyse de l'activation du promoteur de p21Waf1 par test de gène rapporteur. Les cellules sont transfectées avec les vecteurs -2400+70-luc, -774+70-luc ou -163+70-luc puis H-RasV12 est induit avec  $50 \text{ ng.ml}^{-1}$  de doxycycline durant 6, 16 ou 24 h. L'activité de la luciférase est mesurée puis les valeurs obtenues sont rapportées à celles obtenues de cellules transfectées en croissance ( $n=3$  pour les lectures à 16 h et 36 h). **B.** Analyse de la présence de l'ADN Polymérase II et de sa forme phosphorylée sur le promoteur de p21Waf1 par CHIP sur des cellules en croissance. La chromatine est préparée pour examiner la liaison de protéines sur le promoteur de p21Waf1 à l'aide d'anticorps anti-PolIII ou anti-PolIII-Ser2. Une région contrôle de l'ADN est utilisée pour normaliser la quantification relative. Les résultats sont présentés en tant que facteurs de recrutement par rapport à la valeur obtenue avec un anticorps anti-Gal4. **C.** Analyse du recrutement de l'ADN Polymérase II et de sa forme phosphorylée sur le promoteur de p21Waf1 par CHIP après induction de H-RasV12. H-RasV12 est induit ou non pendant 36 h puis la chromatine est préparée pour examiner la liaison de protéines sur le promoteur de p21Waf1 à l'aide d'anticorps anti-PolIII ou anti-PolIII-Ser2. Une région contrôle de l'ADN est utilisée pour normaliser la quantification relative. Les résultats sont présentés en facteurs de variation par rapport à la valeur obtenue en condition de croissance (\*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

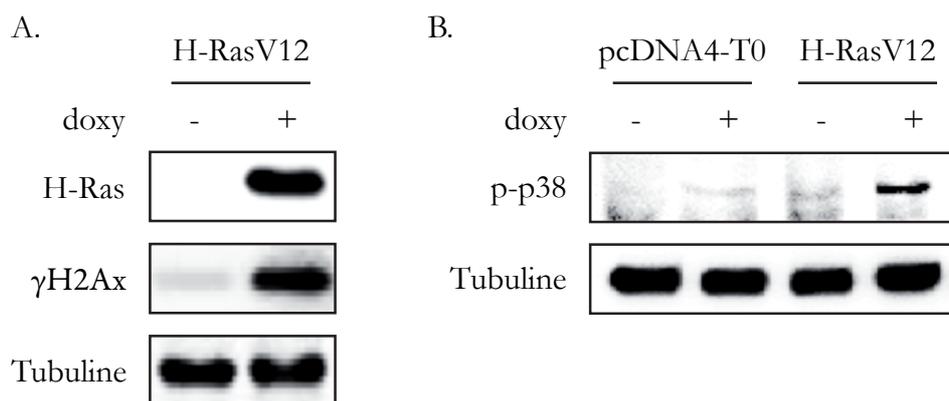
Le test de gène rapporteur nous permet également de penser que l'augmentation de la quantité en ARN – et en protéine – est due à une induction de l'expression

transcriptomique et non, seulement, à une stabilisation de l'ARNm. Afin de confirmer cette observation, nous avons également mesuré le recrutement de l'ARN Polymérase II sur le promoteur proximal de p21Waf1. Pour se faire, nous avons induit l'expression de H-RasV12 pendant 36 h puis nous avons extrait et préparé la chromatine pour réaliser une immunoprécipitation de l'ARN polymérase II ainsi que de sa forme phosphorylée sur la sérine 2 de son domaine CTD, témoin de l'activation de la protéine. Nous avons observé la présence de l'ARN polymérase II sur le promoteur de p21Waf1 dans des cellules en croissance. En revanche, sa forme phosphorylée ne semble pas y être présente lorsque les cellules ne subissent aucun traitement (figure 29B). Après 36 h d'induction de H-RasV12, nous avons constaté une augmentation significative du recrutement de l'ARN polymérase II sur le site proximal du promoteur ainsi que la présence de forme phosphorylée active de l'ARN polymérase II (figure 29C). Notons que sur la figure 29C, les résultats sont présentés sous forme de rapports sur la condition de cellules en croissance. Ces résultats d'immunoprécipitation de chromatine nous permettent de dire que l'ARN Polymérase II est présente sur le promoteur de p21Waf1 dans les cellules en croissance mais sous sa forme inactive. Lors de l'induction de H-RasV12, l'ARN Polymérase est recrutée de manière plus importante et est phosphorylée sur la sérine de son domaine CTD pour permettre son activation.

Globalement, les résultats présentés ici permettent de dire que, suite à l'expression de H-RasV12, le promoteur du gène *CDKN1A* est activé indépendamment de p53, permettant l'expression de la protéine p21Waf1. Les cellules arrêtent leur cycle en G2/M et entrent en sénescence en réponse à l'oncogène H-RasV12.

## 2. *Stabilisation de p21Waf1 par la voie de réponse aux dommages de l'ADN*

La détection du stress oncogénique peut passer par diverses voies que nous avons décrites précédemment. Une forte activité métabolique ou une 'pression' sur les fourches de réplication dues à la présence d'un oncogène peuvent conduire à l'apparition de cassures de l'ADN qui sont alors détectées et qui conduisent à l'arrêt du cycle cellulaire ou à la réparation des dommages.

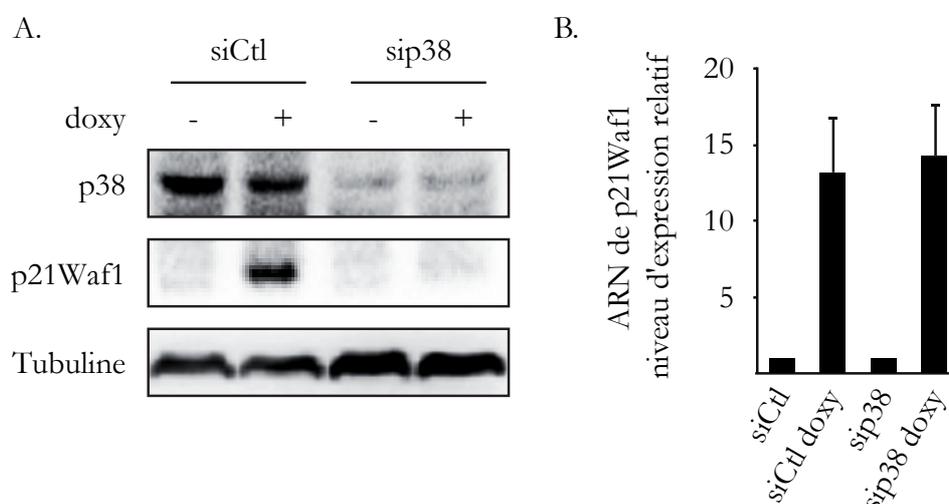


**Figure 30 | Analyse des dommages de l'ADN et de la phosphorylation de p38 après induction de H-rasV12. A et B.** H-RasV12 est induit dans les cellules à l'aide de 50 ng.ml<sup>-1</sup> de doxycycline pendant 48 h puis les extraits totaux sont analysés en western blot à l'aide d'anticorps monoclonaux de souris anti-H-Ras ou anti-γH2Ax ou à l'aide d'un anticorps monoclonal de lapin anti-p38 (T180/Y182). L'expression de la tubuline est utilisée comme contrôle de charge.

Nous avons mesuré l'état de phosphorylation de l'histone H2Ax. La phosphorylation de cet histone témoigne de la présence de cassures double brin. Lors de l'apparition d'une cassure, l'histone H2Ax est phosphorylé sur sa sérine 139. Cette modification conduit à une phosphorylation en chaîne de H2Ax de part et d'autre de la cassure. La figure 30A est un western blot de la phosphorylation de la sérine 139 de l'histone H2Ax. Nous avons observé l'apparition de cette phosphorylation après 48 h d'induction de l'expression de H-RasV12 (figure 30A). Lors de l'apparition de cassures de l'ADN p53 est stabilisée, permettant la transcription de p21Waf1. Or dans notre modèle, p53 n'est pas capable d'induire l'expression de p21Waf1. Nous nous sommes alors interrogés sur la voie responsable de l'expression de p21Waf1 en réponse aux dommages de l'ADN, et notre intérêt s'est porté sur la kinase de stress p38. De manière générale, la kinase p38 est impliquée dans la réponse au stress cellulaire et notamment au stress génotoxique. Le rôle de p38 dans l'induction de la sénescence a déjà été décrit en réponse au stress induit par Ras dans des cellules primaires exprimant une forme non-mutée de p53 (Deng *et al.*, 2004). p38 a également été décrite comme étant impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire lors de traitements génotoxiques dans des cellules mutées sur le gène de p53, permettant, ainsi, d'éviter la catastrophe mitotique (Reinhardt *et al.*, 2007). Nous avons testé l'état de phosphorylation de p38 (figure 30B) et nous avons constaté que p38 était phosphorylé sur les thréonine 180 et sérine 182 à la suite de 48 h d'expression de H-RasV12.

Nous avons ensuite cherché à savoir si l'activation de p38 était impliquée dans l'expression de p21Waf1 dans notre modèle. Nous avons utilisé un siRNA dirigé contre la forme  $\alpha$  de p38 qui est celle impliquée dans la réponse aux dommages de l'ADN (figure 31). Nous avons ainsi observé qu'en l'absence de p38 le stress oncogénique induit par H-RasV12 ne conduisait plus à l'expression de p21Waf1 (figure 31A). Nous avons également mesuré la transcription du gène de p21Waf1 en l'absence de p38 et nous avons constaté que l'ARN de p21Waf1 était toujours surexprimé après induction de H-RasV12 (figure 31B).

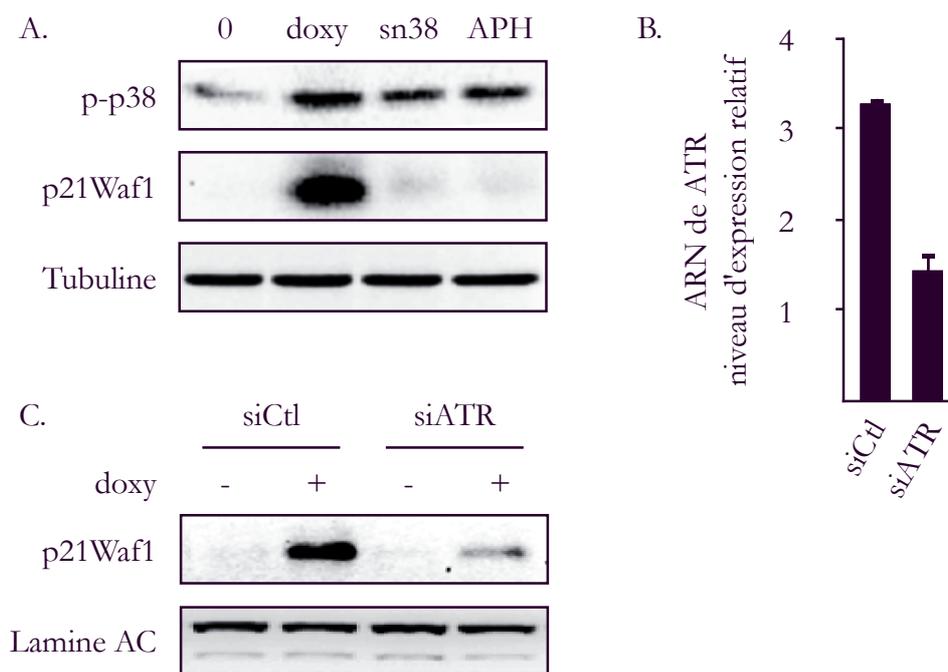
Ces résultats nous permettent de dire que suite au stress oncogénique induit par H-RasV12, p21Waf1 est transcrite et l'activation parallèle de p38 permet sa stabilisation.



**Figure 31 | Analyse de l'expression de p21Waf1 après extinction de p38.** Les cellules sont transfectées avec un siRNA dirigé contre p38 ou avec un siRNA contrôle pendant 48 h. H-RasV12 est ensuite induit avec 50 ng.ml<sup>-1</sup> de doxycycline pendant 48 h. **A.** Les extraits protéiques totaux sont analysés à l'aide d'un anticorps monoclonal de lapin anti-p21Waf1 ou d'un anticorps polyclonal de lapin anti-p38. L'expression de la tubuline est utilisée comme contrôle de charge. **B.** Le niveau d'expression d'ARNm de p21Waf1 est déterminé par RT-qPCR. Le résultat est exprimé par rapport à l'expression de p21Waf1 dans des cellules contrôles non-induites et normalisé à RPLP0. Les écarts-types sont calculés sur une moyenne de 3 expériences (p<0,001).

p38 est une kinase de stress impliquée, notamment, dans la réponse aux dommages de l'ADN. Nous avons voulu déterminer le rôle des cassures de l'ADN dans l'induction de l'expression de p21Waf1. Tout d'abord, nous avons voulu savoir si des cassures de l'ADN induites par des agents chimiques sans activation parallèle des voies sous-jacentes de Ras étaient suffisantes à induire l'expression de p21Waf1. Nous avons utilisé un inhibiteur des Topoisomérases I, le sn38 qui est le métabolite actif de l'irinotecan. Nous

avons également utilisé l'aphidicoline (APH), inhibiteur de l'ADN Polymérase  $\alpha$ . Les traitements ont été utilisés, respectivement, à 2,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  et à 10  $\mu\text{M}$  pendant 48 h. H-RasV12 à également été induit pendant 48 h. La figure 32A montre que, malgré une légère phosphorylation de p38, les cassures de l'ADN occasionnées par le sn38 et l'APH ne sont pas en mesure d'induire l'expression de p21Waf1. Nous avons également effectué des transfections de siRNA dirigés contre la protéine ATR avant d'induire H-RasV12 (figure 32C). Ces expériences ont révélées que l'extinction de ATR empêchait l'expression p21Waf1.

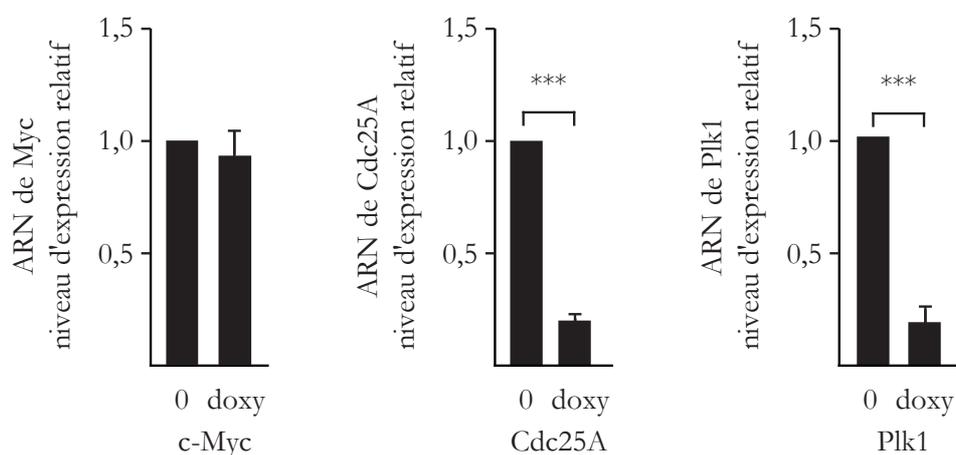


**Figure 32 | Analyse de l'expression de p21Waf1 suite aux dommages de l'ADN et à l'extinction de ATR.** **A.** Les cellules sont traitées à l'aide de 2  $\mu\text{M}$  d'APH, de 2,5  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  de sn38, ou bien H-RasV12 est induit à l'aide de 50  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  de doxycycline pendant 48 h. Les extraits totaux sont analysés en western blot à l'aide d'anticorps monoclonaux de lapin anti-p21Waf1 ou anti-p38 (T180/Y182). L'expression de la tubuline est utilisée comme contrôle de charge. **B.** Les cellules sont transfectées avec un siRNA dirigé contre ATR ou avec un siRNA contrôle pendant 48 h. H-RasV12 est ensuite induit avec 50  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  de doxycycline pendant 48 h puis les extraits protéiques totaux sont analysés à l'aide d'un anticorps monoclonal de lapin anti-p21Waf1 ou d'un anticorps polyclonal de lapin anti-p38. L'expression de la tubuline est utilisée comme contrôle de charge.

Ces résultats suggèrent que la réponse aux cassures de l'ADN faisant intervenir la protéine ATR sont nécessaires à l'expression de p21Waf1. En revanche, les cassures seules, générées par des inhibiteurs de protéines impliquées dans la réplication de l'ADN, ne sont pas suffisantes à l'expression de p21Waf1.

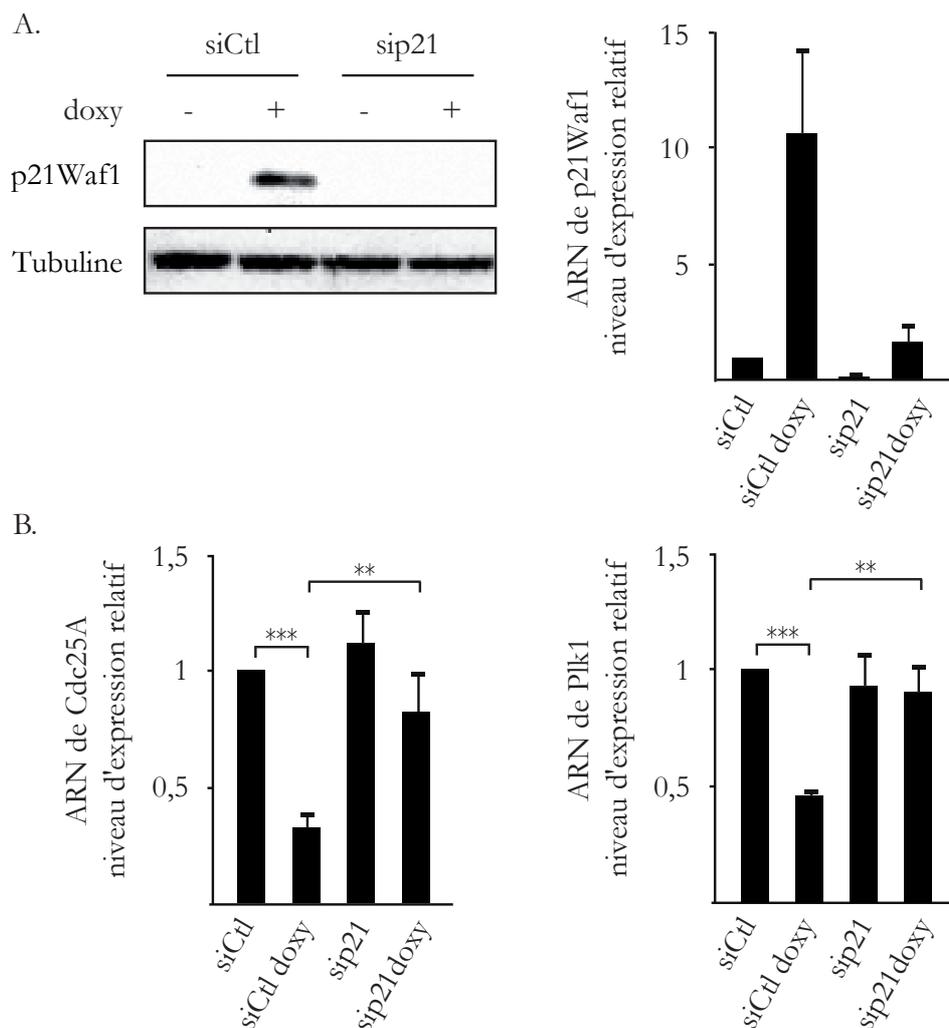
### C. p21Waf1 régule l'expression des gènes du cycle cellulaire

L'induction de l'expression de H-RasV12 conduit à l'arrêt du cycle cellulaire, à l'expression de p21Waf1 et à l'entrée en sénescence. Cet arrêt de la prolifération est possible grâce à l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire. Nous avons mesuré l'expression d'autres gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Myc est connu pour coopérer avec Ras au cours de la transformation cellulaire. Sa principale fonction a lieu au cours de la phase G1 et de la transition G1/S. Cdc25A est une phosphatase activatrice des complexes cycline B/Cdk1 durant l'entrée en phase M et cycline E/Cdk2 lors de l'entrée en phase S. Enfin, Plk1 est une kinase activatrice de Cdc25C permettant l'entrée en mitose. Plk1 phosphoryle également la Cohésine permettant la séparation des chromatides. Nous avons mesuré l'expression de ces trois gènes à la suite de l'induction de H-RasV12 (figure 33).



**Figure 33 | Analyse de l'expression des gènes du cycle cellulaire après induction de H-RasV12.** H-RasV12 est induit dans les cellules à l'aide de 50 ng.ml<sup>-1</sup> de doxycycline pendant 48 h. Le niveau d'expression des ARNm de Myc, de Cdc25A et de Plk1 est déterminé par RT-qPCR. Le résultat est exprimé par rapport à l'expression de ces mêmes gènes dans des cellules contrôles non-induites et normalisé à RPLP0. Les écarts-types sont calculés sur une moyenne de 3 expériences (\*\*\*)p<0,001).

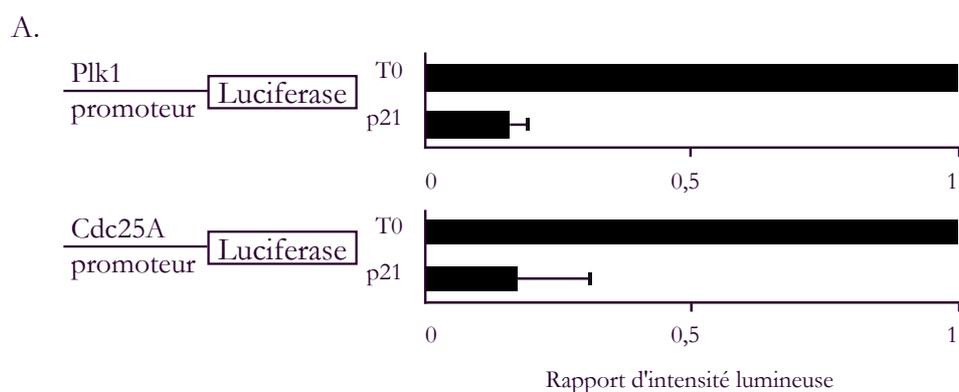
À la suite de 48 h d'expression de H-RasV12, la transcription des gènes de Cdc25A et Plk1 est réprimée. En revanche, nous n'avons pas observé de variation de l'expression de Myc. Cdc25A et Plk1 étant des protéines impliquées dans la régulation de la transition G2/M et dans le déroulement de la mitose, ce résultat est cohérent avec le blocage du cycle en phase G2/M observé dans la figure 24.



**Figure 34 | Analyse de l'expression des gènes du cycle cellulaire après extinction de p21Waf1.** Les cellules sont transfectées avec un siRNA dirigé contre p21Waf1 ou avec un siRNA contrôle pendant 24 h puis H-RasV12 est induit dans les cellules à l'aide de 50 ng.ml<sup>-1</sup> de doxycycline pendant 48 h. **A.** Les extraits totaux sont analysés en western blot à l'aide d'un anticorps monoclonal de lapin anti-p21Waf1. L'expression de la tubuline est utilisée comme contrôle de charge. **A et B.** Le niveau d'expression des ARNm de p21Waf1, de Cdc25A et de Plk1 est déterminé par RT-qPCR. Le résultat est exprimé par rapport à l'expression de ces mêmes gènes dans des cellules contrôles non-induites et normalisé à RPLP0. Les écarts-types sont calculés sur une moyenne de 3 expériences (\*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001).

La protéine p21Waf1 est principalement connue en tant qu'inhibiteur de l'activité des complexes cycline/Cdk, mais elle a aussi été montrée comme étant capable de se fixer et de réguler l'expression des gènes Plk1 et Cdc25A (Vigneron *et al.*, 2006 ; Zhu *et al.*, 2002). Nous avons mesuré la régulation de ces gènes après avoir éteint l'expression de p21Waf1 puis induit H-RasV12 (figure 34). La figure 34A montre l'extinction de p21Waf1 après siRNA et induction de H-RasV12. La figure 34B montre l'expression des gènes de Cdc25A et de Plk1 après extinction de p21Waf1 et induction de H-RasV12. Nous avons constaté que

l'absence de p21Waf1 empêchait, de manière significative, la régulation négative des gènes de Cdc25A et Plk1 à la suite du stress oncogénique induit par H-RasV12. Nous avons voulu savoir si la surexpression de p21Waf1 permettait la régulation des promoteurs de ces gènes. Les cellules ont été transfectées avec des constructions de plasmides contenant le gène de la luciférase sous le contrôle des promoteurs de Cdc25A et de Plk1. Nous avons cotransfecté un pCMV-p21 pour surexprimer la protéine p21Waf1 dans les cellules HT29. L'activité de la luciférase dans les cellules transfectées avec le vecteur de p21Waf1 a été mesurée et rapportée sur celle mesurée dans les cellules transfectées avec le vecteur pCMV vide. Le résultat est présenté dans la figure 35.

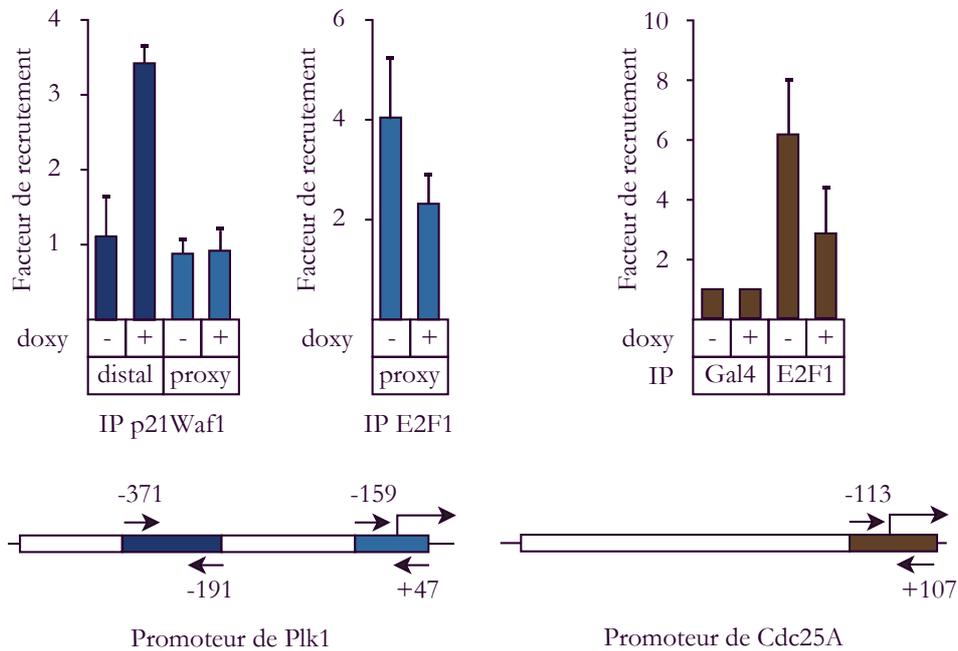


**Figure 35 | Analyse de l'activation des promoteurs de Cdc25A et Plk1 par la surexpression de p21Waf1.** Les cellules sont cotransfectées avec les vecteurs Plk1-luc ou Cdc25A-luc et avec un pCMV-p21. L'activité de la luciférase est mesurée puis les valeurs obtenues sont rapportées à celles obtenues de cellules transfectées avec un vecteur pCMV-vide. Les écarts-types sont calculés sur une moyenne de 3 expériences.

Les promoteurs des gènes de Cdc25A et Plk1 sont tous les deux significativement inhibés lors d'une surexpression de p21Waf1. Ce résultat confirme l'implication de p21Waf1 dans l'inhibition de la transcription des gènes de Cdc25A et Plk1.

Nous avons alors étudié la liaison de p21Waf1 sur les promoteurs de Plk1 et de Cdc25A en réponse à l'oncogène Ras (figure 36). Nous avons examiné deux zones du promoteur de Plk1 après induction de H-RasV12, et nous avons observé le recrutement de p21Waf1 sur une zone distale située entre -371 et -191 avant le premier nucléotide transcrit. Nous n'avons pas détecté la présence de p21Waf1 sur le promoteur de Plk1 au niveau proximal, et p21Waf1 ne semblait pas être présent sur le promoteur de Cdc25A. En revanche, dans des cellules en croissance nous avons observé que le facteur de transcription E2F1 était présent au niveau de cette zone sur les deux promoteurs, et que sa fixation

diminuait lors de l'induction de H-RasV12. Cette diminution contribuerait à expliquer la chute de l'expression de Plk1 et Cdc25A à la suite de l'induction de H-RasV12.



**Figure 36 | Analyse du recrutement de p21Waf1 et E2F1 sur les promoteurs de Plk1 et Cdc25A après induction de H-RasV12.** H-RasV12 est induit ou non pendant 48 h puis la chromatine est préparée pour examiner la liaison de protéines sur le promoteur de Plk1 à l'aide d'anticorps anti-p21Waf ou anti-E2F1. Une région contrôle de l'ADN est utilisée pour normaliser la quantification relative. Les résultats sont présentés en facteurs de recrutement par rapport à la valeur obtenue avec un anticorps anti-Gal4. Les écarts-types sont calculés sur une moyenne de 3 expériences.

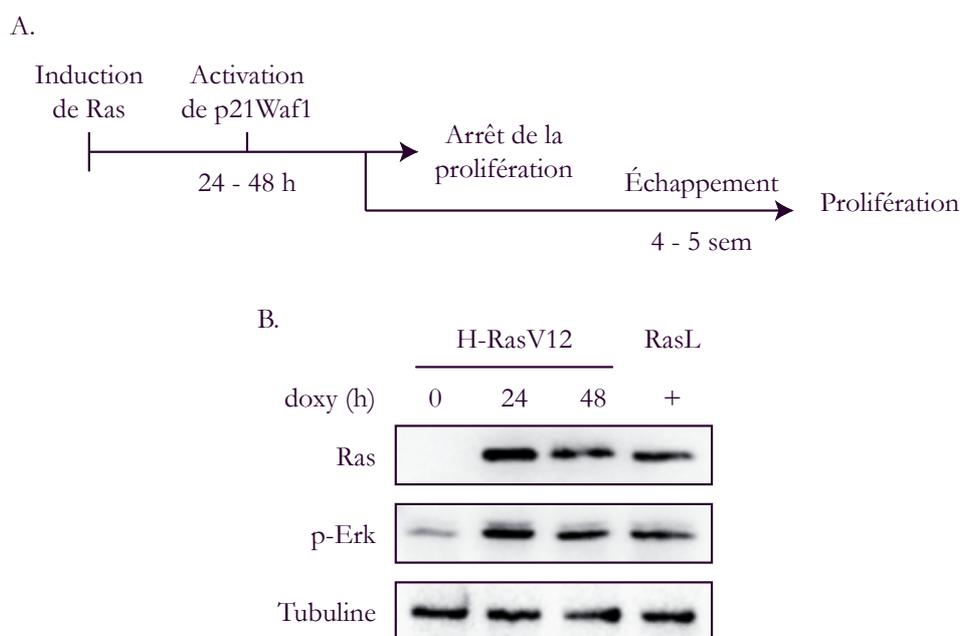
Ces résultats révèlent l'implication de la protéine p21Waf1 dans la régulation de l'expression des gènes du cycle cellulaire Plk1 et Cdc25A en réponse à l'oncogène Ras. p21Waf1 est nécessaire à l'inhibition de la transcription de ces gènes, et plus particulièrement, la figure 36 indique que p21Waf1 se fixe directement au promoteur de Plk1 permettant, probablement, son inhibition.

#### D. Une population cellulaire échappe à l'arrêt du cycle cellulaire

L'expérience de clonogénicité représentée dans la figure 23, a révélé que la majorité des cellules arrêtaient de proliférer à la suite de l'expression de H-RasV12. Pourtant, nous avons constaté qu'un petit nombre de cellules avait tout de même été capable de former des colonies après huit jours d'expression de H-RasV12. Nous avons décidé

d'étudier ces cellules dans le but de déterminer les processus leur permettant d'échapper à la sénescence induite par H-RasV12.

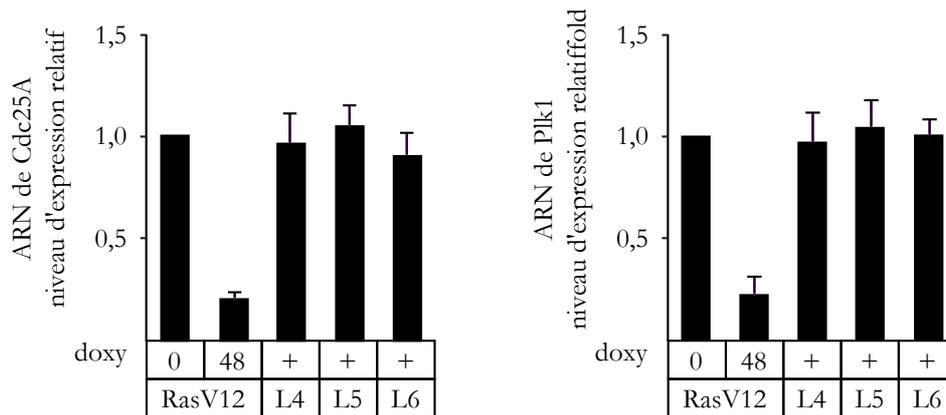
Nous avons cultivé les cellules en présence de 50 ng.ml<sup>-1</sup> de doxycycline. Après quelques jours, la majorité des cellules a arrêté de se diviser. Mais 4 à 5 semaines plus tard, certaines cellules recommencent à proliférer. La population cellulaire ainsi obtenue a été remise en culture et maintenue en présence de 50 ng.ml<sup>-1</sup> de doxycycline. Plusieurs populations ont ainsi été produites et nommées d'un L (ou RasL pour « Ras, Longue induction ») suivi du chiffre correspondant à l'ordre dans lequel elles ont été obtenues. Le schéma expérimental est décrit dans la figure 37A. Tout d'abord, nous avons vérifié l'expression de H-Ras dans ces cellules. Nous avons observé que l'expression de H-Ras était maintenue et que Erk était phosphorylé (figure 37B). Les cellules ont donc recommencé – ou continué – à proliférer malgré le stress oncogénique induit par Ras.



**Figure 37 | Echappement des cellules HT29 à la mort induite par Ras. A.** Schéma expérimental de la génération des cellules ayant échappé à l'arrêt de la prolifération. **B.** H-RasV12 est induit avec 50 ng.ml<sup>-1</sup> de doxycycline pendant 24, 48 h ou de manière continue pendant 5 semaines. Les extraits protéiques totaux sont analysés à l'aide d'anticorps monoclonaux de souris anti-H-Ras et anti-Erk (Y204). L'expression de la tubuline est utilisée comme contrôle de charge.

### 1. Rétablissement de l'expression des gènes du cycle cellulaire dans les cellules ayant échappé à l'arrêt du cycle cellulaire induit par Ras

Les cellules ayant échappées sont capables de proliférer alors que l'induction de courte durée de H-RasV12 active le point de contrôle G2/M et empêche la prolifération. Nous avons mesuré l'expression de Cdc25A et Plk1 dans les cellules RasL, et comme nous l'attendions, l'expression des deux gènes se trouve rétablie (figure 38).

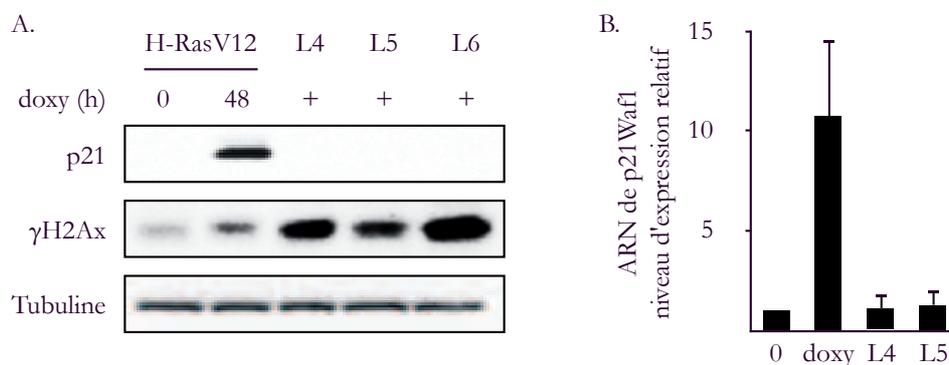


**Figure 38 | Analyse de l'expression des gènes du cycle cellulaire après l'échappement.** H-RasV12 est induit dans les cellules à l'aide de 50 ng.ml<sup>-1</sup> de doxycycline pendant 48 h ou de manière continue. Le niveau d'expression des ARNm de Cdc25A et de Plk1 est déterminé par RT-qPCR. Le résultat est exprimé par rapport à l'expression de ces mêmes gènes dans des cellules contrôles non-induites et normalisé à RPLP0. Les écarts-types sont calculés sur une moyenne de 3 expériences.

### 2. Perte de l'expression de p21Waf1 dans les cellules ayant échappé à l'arrêt du cycle cellulaire induit par Ras

p21Waf1 étant responsable de l'arrêt du cycle cellulaire lors de l'induction de H-RasV12, nous avons mesuré son expression après l'échappement des cellules à la sénescence. La figure 39 montre que les trois populations produites au cours de différentes expériences d'induction de H-RasV12 n'expriment plus la protéine p21Waf1 ni son ARN. Les cassures de l'ADN semblent nécessaires à l'expression de p21Waf1. Les cellules ayant échappé à l'arrêt du cycle n'expriment plus p21Waf1, nous avons voulu savoir si elles avaient réparé les cassures de l'ADN induite par Ras pour pouvoir recommencer à proliférer. Nous avons alors observé l'état de phosphorylation de l'histone H2Ax et constaté qu'il était plus important dans les RasL qu'après 48 h d'expression de H-RasV12 indiquant des dommages plus nombreux (figure 39A). Les cellules ayant échappé à la sénescence induite par Ras ont donc

continué à proliférer malgré de nombreux dommages de l'ADN, probablement sans avoir mis en place les systèmes de réparation des cassures.



**Figure 39 | Analyse de l'expression de p21Waf1 et des cassures de l'ADN après échappement à la sénescence induite par H-Ras. A.** H-RasV12 est induit avec  $50 \text{ ng.ml}^{-1}$  de doxycycline pendant 24, 48 h ou de manière continue. Les extraits protéiques totaux sont analysés à l'aide d'un anticorps monoclonal de lapin anti-p21Waf1 et d'un anticorps monoclonal de souris anti- $\gamma$ H2Ax (S139). L'expression de la tubuline est utilisée comme contrôle de charge. **B.** H-RasV12 est induit pendant 48 h ou de manière continue et le niveau d'expression d'ARNm de p21Waf1 est déterminé par RT-qPCR. Le résultat est exprimé par rapport à l'expression de p21Waf1 dans des cellules contrôles non-induites et normalisé à RPLP0. Les écarts-types sont calculés sur une moyenne de 3 expériences.

Ces résultats suggèrent que les cellules qui échappent à l'arrêt du cycle cellulaire dû au stress génotoxique induit par H-RasV12 prolifèrent malgré un grand nombre de cassures de l'ADN. Les points de contrôle du cycle cellulaire sont outrepassés dans ces cellules et la progression du cycle cellulaire, malgré la présence de dommages, conduit probablement à une forte instabilité génomique.

## Chapitre II : Ras induit l'EMT

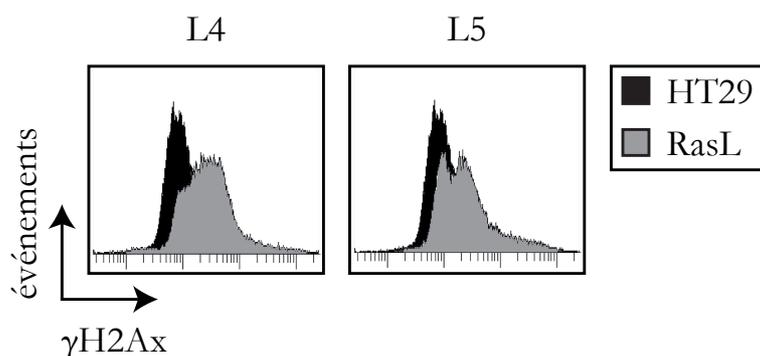
Dans la première partie de ce travail, nous avons montré que des cellules transformées étaient encore capables de répondre à un stress oncogénique par l'induction de la sénescence malgré l'absence de p16Ink4a et d'une forme active de p53. Nous avons observé que l'expression de p21Waf1 faisant suite à l'induction de Ras était responsable de l'inhibition de la transcription des gènes du cycle cellulaire Cdc25A et Plk1. Au cours de ces travaux, nous avons noté qu'une population cellulaire échappait aux mécanismes de sénescence. Dans cette population nous avons détecté une importante quantité de cassures de l'ADN en observant l'état de phosphorylation de l'histone H2Ax. Les dommages de l'ADN, s'ils ne sont pas réparés, peuvent conduire à une importante instabilité génomique et permettre la poursuite de la tumorigenèse. Le rôle de l'EMT dans la tumorigenèse a principalement été décrit comme un processus permettant l'invasion tissulaire et l'apparition de métastases, mais il a aussi été décrit comme permettant la transformation cellulaire initiale (Ansieau *et al.*, 2008).

Dans cette deuxième partie, nous nous sommes interrogés sur le rôle éventuel de l'EMT dans le processus d'échappement s'opérant dans notre modèle d'étude.

### A. Les cellules ayant échappé au stress oncogénique adoptent un phénotype de cellules invasives

#### 1. *Instabilité génomique et invasion*

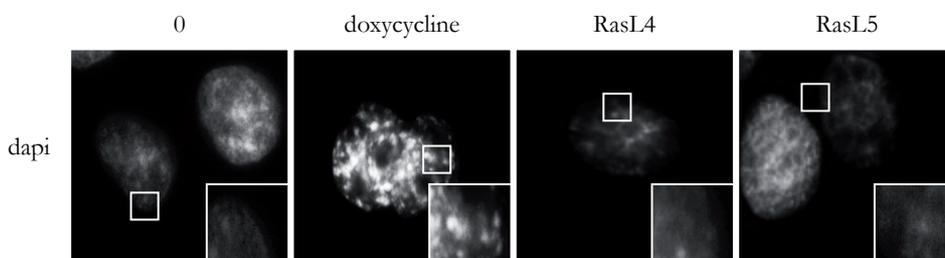
Nous avons vu que la surexpression de H-RasV12 conduisait à l'apparition de cassures de l'ADN dans les HT29 et que les cellules qui échappaient à la réponse à ces dommages présentaient toujours une phosphorylation de l'histone H2Ax. Nous avons mesuré  $\gamma$ H2Ax dans les cellules ayant échappé à l'arrêt du cycle cellulaire (cellules RasL) pour déterminer si les cassures de l'ADN étaient présentes dans toutes les cellules. Les cellules HT29 H-RasV12 cultivées sans doxycycline ont été utilisées comme cellules contrôles non-marquées (figure 40).



**Figure 40 | Analyse de l'expression de  $\gamma$ H2Ax dans les cellules RasL4 et RasL5.** Les cellules RasL et HT29 sont incubées avec un anticorps IgG1 $\alpha$  de souris, reconnaissant la forme phosphorylée de H2Ax, anti- $\gamma$ H2Ax et couplé Alexa488 puis analysées par cytométrie en flux. Les histogrammes représentent la répartition des cellules en fonction de la fluorescence détectée et sont représentatifs de trois expériences.

Le résultat présenté dans la figure 40 montre que dans les cellules RasL4 et RasL5, deux populations se démarquent. Une première population semble être faiblement marquée et se superpose au pic représentant le marquage des cellules contrôles. La deuxième population de cellules présente un marquage plus important de  $\gamma$ H2Ax témoignant d'un plus grand nombre de cassures de l'ADN.

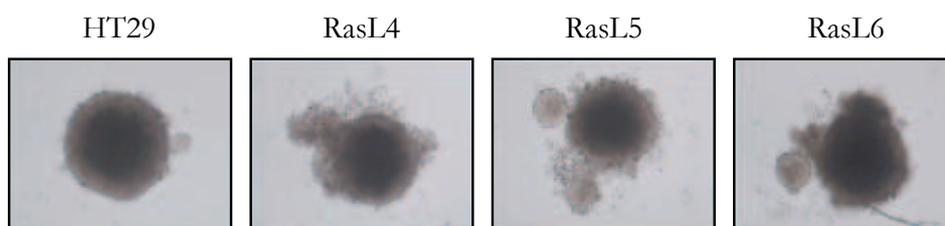
Les SAHF sont des foci d'hétérochromatine caractéristiques de l'état de sénescence dans les cellules. Nous avons analysé leur présence dans les cellules RasL ayant échappé à l'arrêt du cycle cellulaire et dans les cellules exprimant H-RasV12 pendant 60 h. La figure 41 montre que les cellules présentent de nombreux SAHF après 60 h d'expression de H-RasV12 qui disparaissent dans les cellules RasL. Ce résultat indique que les mécanismes de sénescence ont été inhibés dans les cellules ayant traversé le stress oncogénique induit par Ras.



**Figure 41 | Analyse de la présence de SAHF dans les cellules RasL4 et RasL5.** H-RasV12 est induit dans les cellules HT29 à l'aide de 50 ng.mL<sup>-1</sup> de doxycycline pendant 60 h ou de manière continue (RasL). L'ADN des cellules est marqué à l'aide de DAPI puis analysé par microscopie à fluorescence à un grossissement de 200 fois.

Malgré les nombreux dommages subis par l'ADN dans les cellules RasL, elles n'expriment plus les caractéristiques de cellules sénescentes. Les cellules poursuivent alors leur cycle cellulaire en dépit de nombreuses cassures de l'ADN, créant ainsi une forte instabilité génomique. Cette instabilité génomique peut conduire à de nouvelles modifications du génome et être à l'origine d'un phénotype plus agressif des cellules.

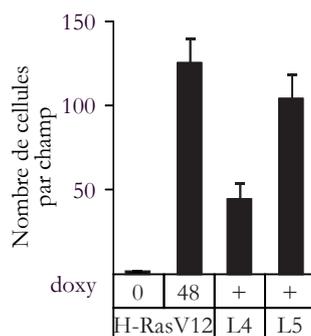
Lors de la formation des sphéroïdes, les cellules HT29 s'organisent en une sphère délimitée. Nous avons observé que les sphéroïdes formés à partir des lignées RasL étaient moins délimités que ceux formés à partir des cellules HT29 sans induction de l'expression de Ras (figure 42). En revanche, les sphéroïdes construits à partir des cellules RasL sont moins définies et présentent de petits amas cellulaires autour de la sphère principale. L'induction de courte durée de H-RasV12 n'a pas permis la formation de sphéroïdes. Les cellules n'ont pas formé d'amas.



**Figure 42 | Étude du développement des cellules sous la forme de sphéroïdes.** Les cellules HT29 non-induites ou RasL4, L5 et L6 sont mise en culture dans 10  $\mu$ l de milieu de culture complet en suspension sur le couvercle d'une plaque 96 puits. 72 h plus tard, les amas formés sont déposés sur agarose en milieu complet, puis, 5 jours plus tard, les sphéroïdes ainsi formés sont observés au microscope optique à contraste de phase à un grossissement de 200 fois.

La formation de nouveaux amas cellulaires autour des sphéroïdes formés par les RasL nous a amené à nous interroger sur le potentiel invasif des cellules RasL. En collaboration avec l'équipe 9 de l'unité Inserm U892 du Docteur Philippe Juin à Nantes, nous avons réalisé un test d'invasion en chambre de Boyden avec Matrigel (figure 43). Ce test nous a permis de constater que l'expression de H-RasV12 conduisait à l'augmentation du pouvoir invasif des cellules. En effet, le nombre de cellules RasL à avoir traversé la membrane est plus important que pour les cellules HT29 ne surexprimant pas H-RasV12. Nous avons été étonnés de constater que l'induction de H-RasV12 pendant 48 h seulement suffisait à augmenter le pouvoir prolifératif des cellules. Malgré la diminution de la prolifération et l'induction de la sénescence, les cellules HT29 exprimant H-RasV12 depuis 48 h semblent déjà présenter un pouvoir invasif.

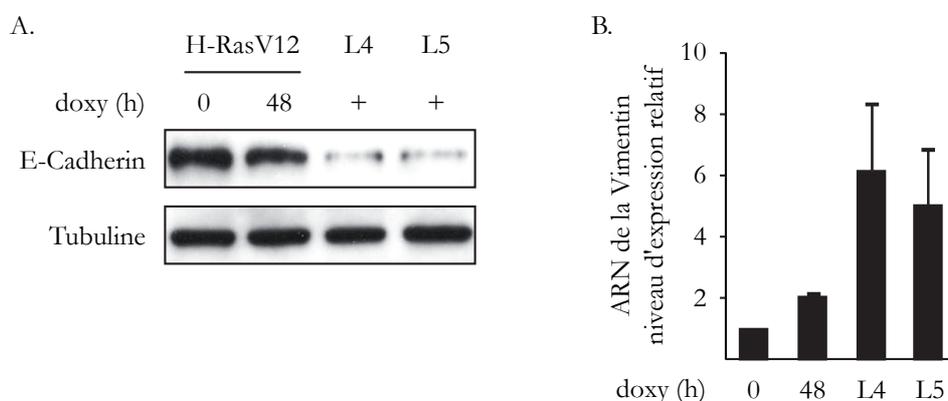
## Résultats



**Figure 43 | Analyse du pouvoir invasif des cellules en chambres de Boyden.** Après 12 h d'incubation à 37°C, le nombre de cellules ayant migré à travers des membranes recouvertes de matrigel est compté. Une moyenne est calculée à partir de 5 comptages effectués au microscope optique à un grossissement de 200 fois.

## 2. Apparition d'un phénotype de cellules mésenchymateuses

L'EMT conduisant à la perte des molécules d'adhésion et à l'apparition d'un phénotype mésenchymateux, nous avons décidé d'étudier l'expression de ces molécules dans les cellules RasL. Deux des événements caractéristiques d'une EMT sont la perte de l'E-cadhérine et l'augmentation d'expression de la vimentine.

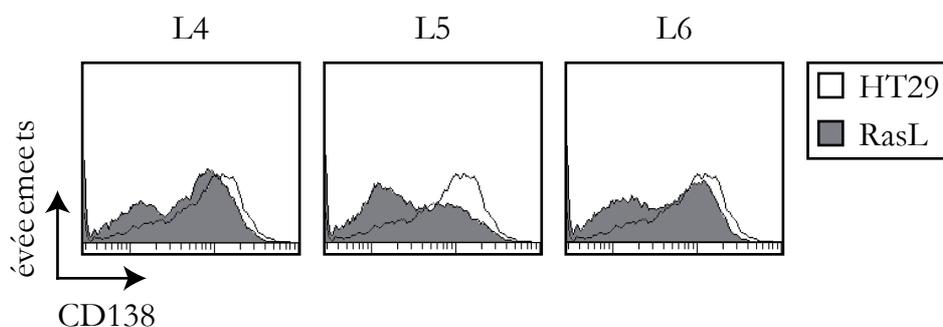


**Figure 44 | Analyse de l'expression des marqueurs de l'EMT dans les cellules RasL.** **A.** H-RasV12 est induit avec 50 ng.ml<sup>-1</sup> de doxycycline pendant 48 h ou de manière continue. Les extraits protéiques totaux sont analysés à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris anti-E-cadhérine. L'expression de la tubuline est utilisée comme contrôle de charge. **B.** H-RasV12 est induit pendant 48 h ou de manière continue et le niveau d'expression d'ARNm de la vimentine est déterminé par RT-qPCR. Le résultat est exprimé par rapport à l'expression de la vimentine dans des cellules contrôles non-induites et normalisé à RPLP0. Les écarts-types sont calculés sur une moyenne de 3 expériences.

La figure 44 représente l'analyse de l'expression de l'E-cadhérine et de la vimentine après 48 h d'expression de H-RasV12 ou dans deux populations de cellules RasL. La figure 44A montre une nette perte d'expression de l'E-cadhérine dans les cellules RasL.

En revanche, cette diminution est très peu perceptible après seulement 48 h d'expression de H-RasV12. La figure 44B montre que les cellules RasL expriment un plus fort taux d'ARN de la vimentine que les cellules initiales. Ces événements indiquent que les cellules RasL semblent avoir subi une EMT.

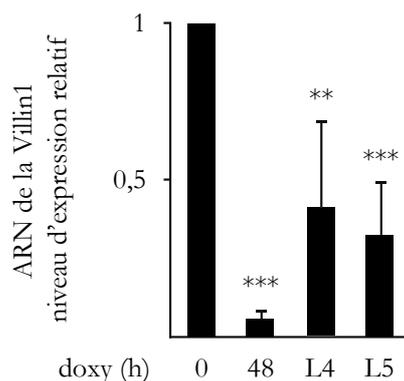
Le CD138, autrement nommé Syndecan1, est une protéine transmembranaire exprimée par les cellules épithéliales. Cette protéine participe à la régulation de la prolifération cellulaire, de la migration cellulaire et des interactions entre les cellules et avec la matrice. La perte de cette molécule a déjà été corrélée avec la transition épithélio-mésenchymateuse dans le carcinome épidermoïde de la langue (Vered *et al.*, 2010), ou dans le cancer de la prostate (Contreras *et al.*, 2010). Nous avons étudié l'expression de CD138 dans les cellules ayant échappées à la sénescence. Les histogrammes de la figure 45 représentent le nombre de cellules en fonction de l'expression de CD138. Tout d'abord, nous avons constaté que la majorité des cellules initiales HT29 exprimaient une quantité importante de CD138. Nous avons également observé que, parmi les populations de cellules RasL étudiées, toutes montraient l'apparition d'un nombre important de cellules exprimant une faible quantité de CD138. Ce résultat suggère qu'une population de cellules ayant échappé à la sénescence a perdu l'expression de CD138. La perte de CD138 est associée à une EMT, les cellules ayant perdu l'expression de CD138 ont probablement subi une EMT.



**Figure 45 | Analyse de l'expression de CD138 dans les cellules RasL4, L5 et L6.** Les cellules RasL et HT29 sont marquées avec un anticorps IgG1 $\alpha$  de souris anti-CD138 couplé FITC puis analysées par cytométrie en flux. Les histogrammes représentent la répartition des cellules en fonction de la fluorescence détectée et sont représentatifs de trois expériences.

Une étude menée au laboratoire par Anthony Bourreau a consisté en une approche globale du protéome de tumeurs colorectales. Cette étude a permis de comparer l'expression des protéines de tumeurs mutées ou non sur *KRAS* à un pool de tissus sain. Ce

travail a permis de mettre en évidence la variation d'expression de nombreuses protéines dans les cellules tumorales par rapport aux cellules normales issues de tissus sains, ainsi qu'en fonction du statut de *KRAS*. Parmi ces protéines, la Villin1 voyait son expression diminuer de manière significative dans les tumeurs par rapport au regroupement de tissus sain. Cette protéine est notamment impliquée dans la régulation de la migration et dans l'EMT. Elle est également un marqueur des cellules épithéliales.



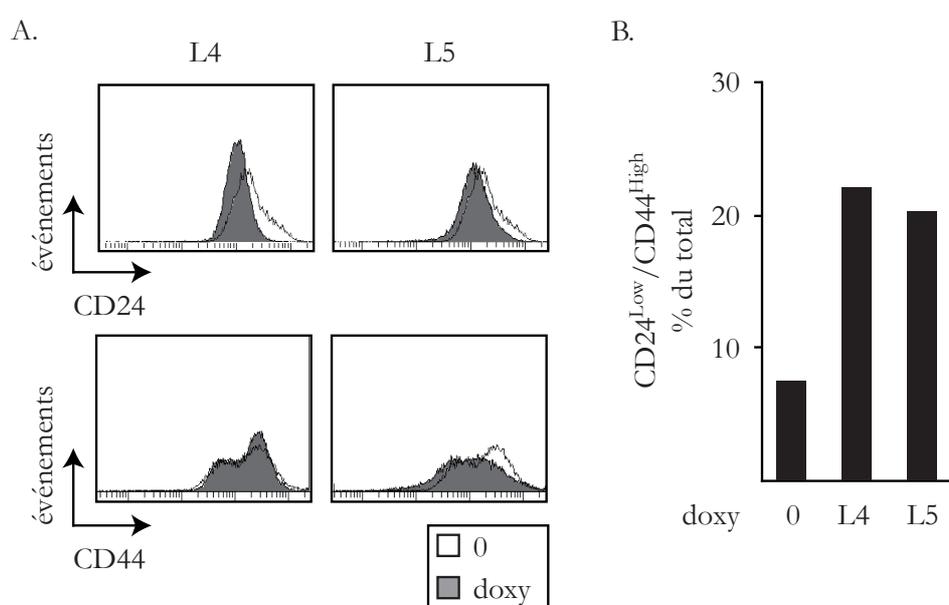
**Figure 46 | Analyse de l'expression de la Villin1 après induction de H-RasV12.** H-RasV12 est induit pendant 48 h ou de manière continue et le niveau d'expression d'ARNm de la Villin1 est déterminé par RT-qPCR. Le résultat est exprimé par rapport à l'expression de la Villin1 dans des cellules contrôles non-induites et normalisé à RPLP0. Les écarts-types sont calculés sur une moyenne de 4 expériences (\*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001).

La figure 46 représente la variation de l'expression de la Villin1 dans les cellules qui expriment H-RasV12 depuis 48 h ou bien dans celles qui ont échappé à la sénescence. Nous avons vu que, globalement, l'expression constante de l'oncogène Ras et l'échappement à la sénescence conduisaient à l'inhibition de l'expression de la Villin1. Cette donnée vient corroborer l'observation du phénotype post-EMT que nous avons observé. Notons la perte considérable de la Villin1 dans les cellules induites pour H-RasV12 durant 48 h. Contrairement aux autres marqueurs de l'EMT, la diminution de l'expression de cette protéine semble indiquer un EMT précoce.

### 3. Apparition d'un phénotype de cellules souches

L'EMT conduit à une dédifférenciation des cellules et de nombreuses études décrivent ce processus comme étant capable d'induire un phénotype de cellules souches (Battula *et al.*, 2010 ; Taube *et al.*, 2010 ; Zavadil, 2010). L'expression des molécules de surface CD24 et CD44 permet d'estimer la proportion de cellules souches dans une lignée cellulaire.

Nous avons effectué un double marquage de CD24 et CD44 après 48 h d'expression de H-RasV12 et dans les cellules RasL. Nous avons observé un léger décalage du pic du nombre de cellules marquées sur CD24 dans les RasL4 et RasL5 par rapport aux cellules initiales (figure 47A). Le marquage de CD44 révèle, dans la lignée RasL4, une augmentation de la population de cellules exprimant une forte expression de CD44. Cette observation ne semble pas probante pour la lignée RasL5 dans cette expérience. La figure 47B est un histogramme représentant le pourcentage de cellules exprimant à la fois, une forte expression de CD44 et une faible expression de CD24. Ce phénotype est représentatif de la présence de cellules souches dans la population cellulaire. Nous avons pu constater une augmentation du nombre de cellules de phénotype CD24<sup>low</sup>/CD44<sup>high</sup> dans les lignées RasL4 et RasL5, indiquant une augmentation du nombre de cellules souches dans les cellules qui ont échappé à l'POIS.

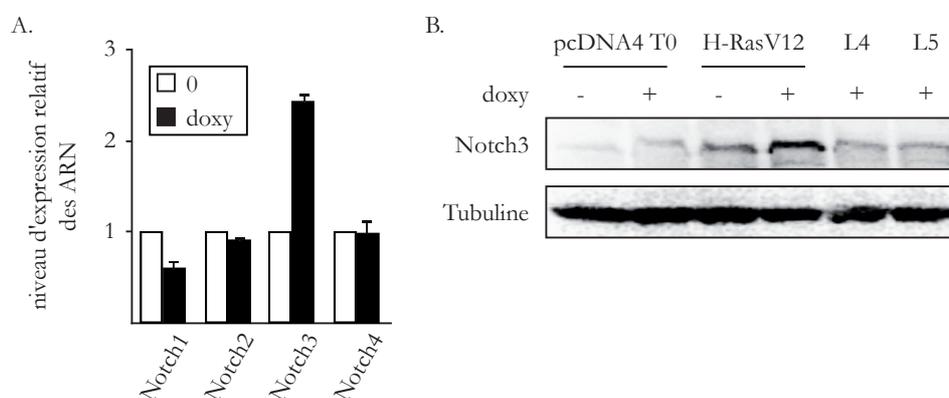


**Figure 47 | Analyse de l'expression des molécules de surface CD24 et CD44 dans les cellules ayant échappé à l'POIS.** **A.** Les cellules RasL sont marquées avec des anticorps IgG2aκ anti-CD24 couplé FITC et anti-CD44 couplé PE puis analysées par cytométrie en flux. Les histogrammes représentent la répartition des cellules en fonction de la fluorescence détectée et sont représentatifs de trois expériences. **B.** L'histogramme représente le pourcentage de cellules de phénotype CD24<sup>low</sup>/CD44<sup>high</sup> dans les trois lignées cellulaires par rapport au nombre total de cellules. Les moyennes sont calculées à partir de deux expériences.

## B. Implication de la voie Jag1/Notch3 dans l'échappement

La voie Notch est impliquée dans l'EMT ainsi que dans la tumorigenèse. En 2008, McMurray et ses collaborateurs ont comparé des cellules murines de côlon exprimant

ou non la forme muté de Ras H-RasV12 ainsi qu'une forme mutée de p53. Les résultats obtenus par puce à ADN ont permis de monter l'implication de 95 gènes dans la coopération entre les mutations de Ras et de p53 pour induire la tumorigenèse et l'échappement à l'OIS (McMurray *et al.*, 2008). Nous avons émis l'hypothèse que les facteurs de transcription qui voyaient leur expression diminuer, uniquement lorsque les deux mutations étaient présentes et dans des cellules capables de proliférer, pourraient avoir un rôle dans le processus d'échappement à la sénescence dans notre modèle. En effet, si ces facteurs de transcription sont responsables de l'échappement à l'OIS, alors il est probable que leur expression augmente dans les cellules induites pour l'oncogène Ras. Parmi ces facteurs de transcription Notch3 a attiré notre attention car cette protéine est notamment impliquée dans l'EMT. Nous avons alors mesuré son expression dans nos cellules (figure 48).

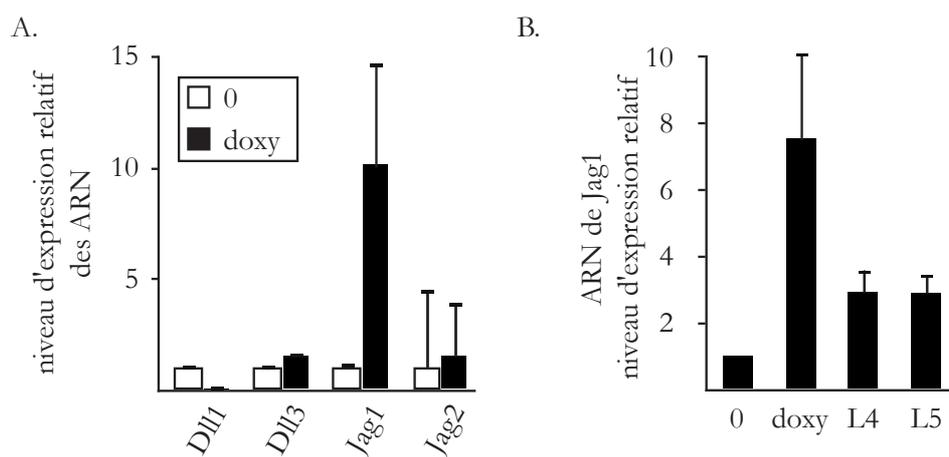


**Figure 48 | Analyse de l'expression des protéines Notch après expression de H-RasV12.** **A.** H-RasV12 est induit dans les cellules à l'aide de 50 ng.ml<sup>-1</sup> de doxycycline pendant 48 h. Le niveau d'expression des ARNm de Notch1, 2, 3 et 4 est déterminé par RT-qPCR. Le résultat est exprimé par rapport à l'expression de ces mêmes gènes dans des cellules contrôles non-induites et normalisé à RPLP0. Les écarts-types sont calculés sur une moyenne de 3 expériences. **B.** H-RasV12 est induit avec 50 ng.ml<sup>-1</sup> de doxycycline pendant 24, 48 h ou de manière continue. Les extraits protéiques totaux sont analysés à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin anti-Notch3. L'expression de la tubuline est utilisée comme contrôle de charge.

Nous avons observé une légère surexpression de l'ARN de Notch3 mais pas des autres formes de Notch à la suite de 48 h d'induction de H-RasV12 (figure 48A). Les protéines Notch étant des protéines transmembranaires, leur activité en tant que facteur de transcription n'est possible qu'à la suite d'un clivage au niveau de leur domaine transmembranaire. Nous avons alors examiné la présence d'une forme clivée de Notch3 par western blot (figure 48B). La forme clivée à activité transcriptionnelle de Notch3 est décrite à 90 kD. Nous n'avons pas observé la forme totale de Notch3, probablement parce que la

lyse que nous avons effectuée ne nous a pas permis d'extraire les protéines transmembranaires. En revanche, nous avons constaté une augmentation de l'expression de la forme clivée de Notch3 après 48 h d'induction de H-RasV12 et nous avons également pu voir que ce clivage diminuait, à nouveau, dans les cellules RasL4 et RasL5, ayant échappées à la sénescence.

Nous avons également mesuré l'expression des différents ligands de Notch : Jag et Delta-like (DLL) qui sont impliqués dans l'activation du clivage des différentes formes de Notch (figure 49). Nous avons constaté que Jag1, mais pas Jag2, ni les formes de Delta-like, était surexprimé d'un facteur proche de 10 après induction de H-RasV12. Nous avons alors testé son expression dans les cellules RasL et nous avons vu qu'après une forte expression de Jag1 au cours de la réponse précoce au stress oncogénique, cette expression diminuait de plus de la moitié (figure 49B).



**Figure 49 | Analyse de l'expression des ligands de Notch après expression de H-RasV12.** A. H-RasV12 est induit dans les cellules à l'aide de 50 ng.mL<sup>-1</sup> de doxycycline pendant 48 h. Le niveau d'expression des ARNm de Dll1, Dll3, Jag1 et Jag2 est déterminé par RT-qPCR. Le résultat est exprimé par rapport à l'expression de ces mêmes gènes dans des cellules contrôles non-induites et normalisé à RPLP0. Les écarts-types sont calculés sur une moyenne de 3 expériences.

Ces résultats semblent indiquer que la voie de Notch3/Jag1 est activée dans les cellules HT29 à la suite de l'expression de H-RasV12. Étant impliquée dans l'EMT, la voie Notch3/Jag1 pourrait avoir un rôle dans l'induction de l'EMT lors de l'échappement des cellules à l'OIS. L'expression de Jag1 est augmentée lors de l'induction de H-RasV12 et est probablement responsable du clivage de Notch3. Le clivage de Notch3 est nécessaire à son activation. Elle est transitoire et ce facteur de transcription n'est plus activé dans les cellules ayant échappé à l'OIS. Nous pouvons faire l'hypothèse que ce clivage serait impliqué dans

l'induction de l'EMT permettant l'échappement des cellules, il ne serait alors plus nécessaire une fois la sénescence inhibée.

## **Chapitre III : L'échappement à l'OIS induit par p21Waf1 conduit à la dédifférenciation cellulaire et à la dépendance aux protéines anti-apoptotiques Bcl-Xl et Mcl1**

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont fait l'objet d'un article soumis à *Journal of Biological Chemistry*. Cet article est actuellement en cours de révision. Les commentaires des critiques choisis pour juger ces travaux sont exposés en annexe 2.

Dans cet article, nous avons montré que p21Waf1 permettait l'OIS dans la lignée colorectale HT29 indépendamment de p53 et de p16Ink4a. À la suite de l'expression oncogénique de Ras dans cette lignée, nous avons observé que p21Waf1 empêchait l'expression de gènes responsables de la transition en phase G2 du cycle cellulaire, Plk1 et Cdc25A. De plus, nous avons montré que les cellules ayant échappé à l'OIS proliféraient malgré de nombreux dommages de l'ADN conduisant à une forte instabilité génomique. Nous avons vu que ces cellules, avaient subi une EMT et avaient activé les voies de survie dépendantes de Bcl-Xl et Mcl1. Nous avons fait l'hypothèse que l'EMT participe à l'échappement à l'OIS et que la perte de p21Waf1 est nécessaire à l'EMT.

L'identification des mécanismes contrôlant l'échappement à l'OIS constitue une voie d'étude intéressante car cet événement est responsable de la progression de la tumorigenèse.

**ESCAPE FROM P21-MEDIATED ONCOGENE-INDUCED SENEESCENCE LEADS TO CELL  
DEDIFFERENTIATION AND DEPENDENCY  
ON ANTI-APOPTOTIC BCL-XL AND MCL-1 PROTEINS**

**Sophie de Carné Trécesson, Yannis Guillemin<sup>1</sup>, Audrey Bélanger, Anne-Charlotte Bernard, Laurence Preisser, Elisa Ravon, Erick Gamelin, Philippe Juin<sup>1</sup>, Benjamin Barré and Olivier Coqueret<sup>2</sup>**

Cancer Center Paul Papin; INSERM U892; Angers, France

<sup>1</sup> Cancer Research Department; INSERM U892; Nantes, France

Running title: p21waf1, EMT and survival dysregulation during OIS escape in colorectal cell line

<sup>2</sup> Corresponding Author: Paul Papin Cancer Center, INSERM U892 2 rue Moll, 49033 ANGERS, France. [olivier.coqueret@univ-angers.fr](mailto:olivier.coqueret@univ-angers.fr) Tel.: (33) 2 41 35 29 14

**Oncogene-Induced-Senescence (OIS) is a tumor suppressor response which induces permanent cell cycle arrest in response to oncogenic signaling. Through the combined activation of the p53-p21 and p16-Rb suppressor pathways, OIS leads to the transcriptional repression of proliferative genes. Whereas this protective mechanism has been essentially described in primary cells, we surprisingly observed in this study that the OIS program is conserved in the established HT29 colorectal cell line. In response to the ras oncogene and despite the inactivation of p53 and p16INK4, HT29 cells enter senescence, upregulate p21waf1 and induce senescence-associated heterochromatin foci formation. In addition, the cycle inhibitor prevents the expression of the cdc25A and PLK1 genes to induce G1 and G2 arrest. Using ChIP and luciferase experiments, we have observed that p21waf1 binds to the PLK1 promoter to induce its downregulation during OIS induction. Following 4-5 weeks, several clones were able to resume proliferation and escape this tumor suppressor pathway. Tumor progression was associated with p21waf1 downregulation and cdc25A and PLK1 reexpression. In addition, OIS and p21waf1 escape was associated with an increase in DNA damage, an induction of the EMT program and an increase in the proportion of cells expressing the CD24<sup>low</sup>/CD44<sup>high</sup> phenotype. Results also indicate that malignant cells having escaped OIS rely on survival pathways induced by Bcl-xL/Mcl-1 signaling. In light of these observations, it appears that the transcriptional functions of p21waf1 are active during OIS and that the inactivation of this protein is associated with cell dedifferentiation and enhanced survival.**

Oncogene-Induced-Senescence (OIS) is a powerful antitumor mechanism that induce permanent cell cycle arrest in response to abnormal proliferative signals (1). Originally described in cell culture, OIS has been recently shown to occur also in vivo as an early protection against carcinogenesis. Its induction involves the combined activities of p53 and p21waf1 to inhibit cell cycle progression and of p16Ink4 and Rb to induce the transcriptional repression of proliferative genes through heterochromatin formation (2). Senescent cells are characterized by an enlarged morphology, by an increased activity of  $\beta$ -galactosidase and by the presence of senescence-associated heterochromatic foci (SAHF). Through their combined inhibitory effects on cyclin-cdk complexes, the p16INK4 and p21waf1 inhibitors play an essential role in OIS induction and in the consequent tumor suppression.

The p21waf1 protein was originally identified as a transcriptional target of the p53 tumor suppressor gene and as an inhibitor of cyclin-cdk complexes and DNA replication (3-6). Gene inactivation studies have also demonstrated essential roles of p21waf1 during DNA damage and chemotherapy responses (7,8). Besides its classical role as a cyclin/cdk inhibitor, p21waf1 is also recruited to the promoters of cell cycle genes to prevent proliferation. We and others have shown that this protein regulates various transcription factors involved in the G0/G1 transition such as NF- $\kappa$ B, Myc, E2F, and STAT3 (9-12). To regulate gene transcription, it is believed that p21waf1 modifies the activity of the CBP histone acetylase and of the cyclin-cdk complexes associated with the initiation complex (13-17).

In light of these observations, we and others have proposed that p21waf1 simultaneously targets growth promoting genes and cdk activity to

induce cell-cycle arrest (9,10,18). However, although transcriptional functions of p21waf1 have been described following overexpression or in response to chemotherapy treatment, it remains to be determined if this also occurs during OIS and which promoters are targeted by p21waf1 to restrain an abnormal oncogenic activity. This activity has already been demonstrated for the p14Arf tumor suppressor since this protein can interact with the Myc oncogene to prevent the activation of proliferative genes. Chromatin immunoprecipitation experiments (ChIP) have shown that Arf is recruited to the promoter of Myc target genes in association with the Myc/Max complex (19).

In this study, we have further characterized OIS induction and the corresponding transcriptional functions of p21waf1 in colorectal cells. Using HT29 cells as a model of an established cell line that has inactivated both p53 and p16INK4, we surprisingly observed that OIS is still functional in these cells, despite the fact that this suppressor response is essentially considered to be active in primary cells. During OIS, we also found that p21waf1 prevents cdc25A and PLK1 expression and binds to the promoter of the PLK1 gene. As an essential mechanism of tumor suppression, the OIS pathway has to be inactivated during tumor progression. We effectively observed that several clones escaped this protective pathway and that this was associated with the inhibition of p21waf1 transcription and with the reexpression of cdc25A and PLK1. In addition, senescence escape was also associated with increased DNA damage, and with signs of epithelial-mesenchymal transition. Interestingly, these malignant cells show enhanced dependency to Bcl-xL/Mcl-1 signaling, suggesting that pro-apoptotic pathways are generated during OIS escape and EMT induction.

Therefore, our results indicate that OIS can be conserved in established cell lines and that p21waf1 functions as a transcriptional inhibitor during this protective pathway. This function is inactivated during tumor escape and this is associated with genomic instability, cell dedifferentiation and as a consequence upregulation of survival signals. These results also suggest that some established cell lines can still be used as an experimental model of tumor progression.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell line

The human colon adenocarcinoma cell line HT29 (American Type Culture Collection, ATCC) was

maintained in antibiotic-free RPMI 1640 medium (Lonza). Cultures were supplemented with 10% fetal bovine serum. Cell lines were maintained at 37°C in 5% carbon dioxide and were tested to rule out mycoplasma contamination.

### Cell transfection and stable screening

For transfection experiment, HT29 cells were seeded into 60 mm culture dishes and grown until 80% confluence. The empty plasmid pcDN4/T0 and the pcDNA4/H-rasV12 were stably co-transfected with the pcDNA6/TR using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction. HT29 cells were selected with 100 µg/ml blasticidin (Sigma Aldrich) and 500 µg/ml zeocin (Invitrogen) for 2 weeks and maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum containing 100 µg/ml zeocin and 2,5 µg/ml blasticidin. H-RasV12 expression was induced by 50 ng/ml doxycycline for 48 hr. RasL lines were obtained after 5 weeks of H-RasV12 induction. After selection, RasL were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum containing 100 µg/ml zeocin, 2,5 µg/ml blasticidin and 50 ng/ml doxycycline.

### Clonogenic assay

HT29 cells were seeded at 800 cells into 6 well cell culture plates and incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells were then treated with 50 ng/ml doxycycline (Sigma Aldrich) for 8 days, washed twice with PBS and stained with 0,1% crystal violet. The colonies were then washed twice with water and colonies exceeding 50 cells were visualized with a Bio-Rad Chemi Doc XRS Imaging device and counted using Quantity One imaging software (Bio-Rad). The survival fraction was determined as the ratio of the number of colonies observed with doxycyclin to the number of cells without doxycyclin, adjusted to the plating efficiency.

### Western Blotting

Following cells lysis at 4°C (50 mM Tris-HCl pH 8,1 ; 1% SDS ; 10 mM EDTA ; 1 mM PMSF ; 10 µg/ml aprotinine ; 10 µg/ml leupeptine ; 10 µg/ml pepstatine ; 1 mM Na<sub>3</sub>V04 ; 50 mM NaF), lysats were sonicated and then boiled for 3 min. Proteins were separated on a polyacrylamide sodium dodecylsulfate-containing gel and transferred to a PVDF membrane. Following a 1 hr incubation in 3% BSA, TBS 0,1% Tween 20, membranes were incubated overnight at 4°C with mouse monoclonal anti-HRas (1:1000, Santa Cruz sc-29), mouse monoclonal anti-ERK (Y204) (1:1000, Santa Cruz sc-7383), goat polyclonal anti-p14ARF

(1:600, Santa Cruz sc-8613), rabbit monoclonal anti-p21 antibody (1:1000, Cell Signaling 2947), mouse monoclonal anti- $\gamma$ H2Ax (1:1000, Upstate 05-636), mouse monoclonal anti- $\alpha$ tubulin (1:1000, Santa Cruz sc5286) HSC70 (1:1000, Santa Cruz sc7298), E-Cadherin (1:1000, Abcam 1416). Membranes were then washed twice with TBS with 0.1% Tween 20 and incubated for 1 hr with peroxidase-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz). Revelation was performed by chemiluminescence with a Bio-Rad Chemi Doc XRS Imaging device (Bio-Rad).

#### Promoter activity assay

Cells were seeded into 6 well cell culture plates 24 hr prior to transfection. Reporter constructs were transfected into HT29 cells by lipofectamine (Invitrogen). Twenty-four hours after transfection, luciferase activity was determined by the Dual-Glo luciferase reagent (Promega) and measured using a Packard Topcount scintillation counter. The reporter luciferase was normalized to Renilla luciferase and the ratio of luminescence from the experimental reporter to luminescence from the control reporter was calculated.

#### Chromatin Immunoprecipitation Assays

ChIP experiments were performed as previously described (20,21). Briefly, HT29 cells were fixed with 1% formaldehyde. After 10 min, cells were washed with ice-cold Tris-buffered saline and lysed with 500  $\mu$ l of ChIP buffer (50 mM Tris-HCl pH 8,1; 1% SDS ; 10 mM EDTA; 1 mM PMSF; 10  $\mu$ g/ml aprotinine; 10  $\mu$ g/ml leupeptine; 10  $\mu$ g/ml pepstatine; 1 mM Na<sub>3</sub>V04; 50 mM NaF). Chromatin was sheared by sonication to an average size of 500 bp. The chromatin solution was diluted with 1 volume of dilution buffer (2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl pH 8,1; 1% Triton X100; 0,1% NP40; 150 mM NaCl; 1 mM PMSF; 10  $\mu$ g/ml aprotinine; 10  $\mu$ g/ml leupeptine; 10 $\mu$ g/ml pepstatine; 1 mM Na<sub>3</sub>V04; 50 mM NaF) and incubated 1 hr at 4°C on a rotating platform with of protein A-agarose and protein G-sepharose which was pretreated with sheared DNA salmon sperm. Chromatin was then incubated overnight at 4°C on a rotating platform with 1  $\mu$ g of the anti-p21, anti-E2F1 or anti-Gal4 antibodies. Following precipitation with A-agarose and protein G-sepharose (pretreated with sheared DNA salmon sperm), chromatin was eluted with elution buffer

(1% SDS ; 100 mM NaHCO<sub>3</sub>) for 5 hr at 65°C. DNA was extracted with phenol-chloroform, precipitated with ethanol, allowed to air dry, and then dissolved in 100  $\mu$ l of sterile H<sub>2</sub>O. Four  $\mu$ l of the DNA samples were then subjected to PCR amplification.

#### Flow cytometry

Cells were fixed with 1% formaldehyde at RT for 10 min, washed twice with PBS and incubated with 70% ethanol at -20°C for 20 min. Cells were then incubated with 1  $\mu$ g of anti- $\gamma$ H2Ax (1:50, BD Biosciences 560445), anti-CD24 (1:50, BD Biosciences 555427), anti-CD44 (1:50, BD Biosciences 555479). Cells were incubated for 1 hr at room temperature and samples were analyzed by FACS (LSR II, BD Biosciences).

#### siRNA

To downregulate p21<sup>Waf1</sup> expression, HT29 cells were transfected with 2,5 nM CDKN1A ON-TARGETplus SMARTpool, (Dharmacon), or ON-TARGETplus Non-Targeting Pool (Dharmacon) using DharmaFect-4 (Dharmacon) according to the manufacturer's instructions. H-RasV12 induction was done 24 hr after.

#### Spheroids

10  $\mu$ l drops containing 1000 cells were suspended on the lids of agar-coated 96-well plates containing 200  $\mu$ l of culture media. After a 96h time period required for cell agregation, the spheroids were transferred to RMPI culture medim and maintained for 8 days.

#### Transwell migration assay

The underside of the transwell (8  $\mu$ m pore size; Falcon) was precoated with matrigel (100 $\mu$ g/mL, Sigma E1270) or collagen type I (Col-I; 10  $\mu$ g/mL). Next, 100 cells were loaded onto the upper chamber and the lower chamber was filled with serum-free medium. Cells were incubated for 12 h at 37°C, fixed with 4% paraformaldehyde, and stained with DAPI. Non-migrating cells retained on the upper side were removed by wiping with a cotton swab. Cells that had migrated through the filter were counted and averaged from 5 randomly chosen microscopic fields using a 20 $\times$  objective.

## RESULTS

### **OIS is still functional in HT29 cells despite the inactivation of p53 and p16INK4**

Several studies have shown that oncogenes induce growth arrest and senescence but it is generally believed that this protective pathway occurs essentially in primary cells to restrain the initial events of cell transformation (22,23). To extend this observation, we wanted to determine if OIS is conserved in established colorectal cell lines, in the absence of intact p53 and p16INK4 signaling. To this end, we generated HT29 cell lines expressing the H-Ras<sup>v12</sup> oncogene under the control of a doxycyclin-inducible promoter. p53 is mutated in this cell line whereas p16INK4 is not expressed, probably as a consequence of promoter methylation. As expected, Western blot experiments indicated that ras was upregulated in response to doxycyclin and that the Erk1/2 kinase was activated (Figure 1A). Consequently, we observed under these conditions that p14Arf was also upregulated in response to the ras oncogene (Figure 1B). Interestingly, MTT and clonogenic assays showed that ras upregulation led to long term cell cycle arrest (Figure 1C). In addition, cells exhibited a flat and enlarged morphology illustrative of cells entering the senescence process (data not shown). The induction of the senescence program was also detected by beta-galactosidase staining (Figure 1D), a specific marker of cells that do not divide or form colonies.

Altogether, these results indicate that HT29 cells have conserved an intact OIS program in response to aberrant ras signaling, despite the fact that these cells are not primary cells and that p53 and p16INK4 are inactivated.

### **p21Waf1 is still upregulated in HT29 cells following H-Ras<sup>v12</sup> induction**

We then determined if the p21waf1 cell cycle inhibitor was still expressed during OIS in HT29 cells. Interestingly, western blot experiments showed a significant induction of p21waf1 in response to the oncogene (Figure 2A). Quantitative RT-PCR experiments showed that H-Ras<sup>v12</sup> induced a significant upregulation of the p21waf1 mRNA compared to non-induced cells (Figure 2B). To determine if this effect occurred at the transcriptional level, we monitored the expression of p21waf1 promoter luciferase constructs following ras upregulation. As shown Figure 2C, we found that the p21waf1 promoter-driven luciferase activity was significantly upregulated during OIS and that the -163/+70 region was sufficient to mediate the response to the ras oncogene. Since p53 mutants have been

recently reported to have unexpected functions (24), we have verified by RNA interference that the p21waf1 promoter is not regulated by the mutated form of p53 under our experimental conditions (data not shown). We then examined the recruitment of the RNA polymerase to the proximal region of the promoter using chromatin immunoprecipitation (ChIP). Since serine 2 phosphorylation of the C-terminal domain of the RNA polymerase is a hallmark of transcriptional elongation, ChIPs experiments were also performed with polyclonal antibodies directed against the phosphorylated form of the polymerase. Gal4 antibodies were used as controls and ChIP results were quantified by real-time quantitative PCR (Fig. 2D). As expected, the RNA polymerase II and its elongating form were recruited to the p21waf1 proximal promoter following H-ras<sup>v12</sup> expression. As a control, PCR analysis did not detect any occupancy of the -2760/-2486 region of the p21waf1 gene (data not shown).

Altogether, we concluded from these results that p21waf1 can still be upregulated in the established HT29 cell line in response to the ras oncogene and during OIS induction.

### **p21Waf1 functions as a transcriptional regulator of the PLK1 gene during OIS**

We then determined the effect of OIS on cell cycle progression. Flow cytometry analysis indicated that cells were arrested in the G1 and G2 phases of the cell cycle 48 hr after ras induction, with a weak increase of cells in the G2 phase (Figure 3A). The expression of the Myc, cdc25A and PLK1 mRNAs was then evaluated since these genes are involved in G1 and G2 progression. Results presented Figure 3B, lanes 3-6, indicate that OIS induced a downregulation of the cdc25A and PLK1 mRNAs. Since these two genes are well known to be necessary at the G1/S and G2/M transitions, this result is consistent with the flow cytometry results. By contrast, we did not observe any modification of Myc mRNA expression (lanes 1-2).

Following chemotherapy treatment, we have already shown that the cell cycle inhibitor binds to cell cycle genes to prevent their expression (25). These observations suggested to us that during OIS, p21waf1 might induce the transcriptional downregulation of the cdc25A and PLK1 genes through promoter binding. To verify this hypothesis, cells were first transfected with a reporter construct containing the PLK1 and cdc25A promoters (26), in the presence or absence of a p21waf1-expressing vector. Interestingly, a significant downregulation of reporter gene

activity was noticed in the presence of p21waf1 (Figure 3C). Note that it has already been proposed that p21waf1 affects PLK1 transcription in a different experimental system (27). To confirm this observation, cells were transfected with a pool of four siRNA directed against p21waf1 or the corresponding control siRNA and the expression of PLK1 and cdc25A was then investigated by quantitative RT-PCR analysis. As expected, p21waf1 expression was downregulated (Figure 3D, right panel). Interestingly, the ras-mediated inhibition of cdc25A and PLK1 was significantly reduced in the absence of the cell cycle inhibitor whereas control siRNA had no significant effects (Figure 3D, compare lanes 1-2 and 3-4, lanes 5-6 and 7-8). To extend these observations, ChIP experiments were then performed to determine if p21waf1 binds to the cdc25A and PLK1 promoters in response to abnormal oncogenic signaling. Whereas we were not able to detect the cell cycle inhibitor on the cdc25A proximal promoter, ChIP experiments indicated that p21waf1 was recruited to the PLK1 promoter following ras induction (Figure 3E, lanes 1-2). As a control, PCR analysis did not detect any occupancy of a 5' control region of the PLK1 promoter. Although p21waf1 was not found associated with the proximal promoter, the E2F1 transcription factor was detected and its DNA binding was reduced in response to ras induction (Figure 3E, lanes 3-6). Interestingly, E2F proteins have already been described as regulators of the PLK1 gene (28) and in addition, p21waf1 can associate with E2F1 to prevent its activity (29).

Altogether, these results indicate that p21waf1 binds to the PLK1 gene during OIS to prevent its expression.

### **The p21 pathway is inactivated following OIS escape to allow PLK1 reexpression**

During the course of these experiments, we have noticed that a few emergent clones bypass the OIS pathway (see the experimental protocol Figure 4A, emergent clones are noted RasL). After approximately 4-5 weeks, several clones resumed proliferation while still expressing active forms of ras and Erk (Figure 4B). This result suggested to us that these cells have inactivated the p21waf1 protective cascade. To verify this hypothesis, western blot experiments were performed in several emergent clones to characterize the expression of p21waf1. As expected, p21waf1 was expressed following ras induction in parental cells. Interestingly, this upregulation was lost following OIS inactivation (Figure 4C, lanes 1-5). In addition, we also noticed that the expression of the p21waf1 mRNA

was also downregulated in the emergent clones (Figure 4C, lanes 6-9). Interestingly, p21waf1 inhibition was correlated with a reexpression of the cdc25A and PLK1 mRNAs in the cells that have escaped the OIS arrest (Figure 4D). Therefore, OIS bypass is associated with a downregulation of p21waf1 and with a reexpression of the cdc25A and PLK1 mRNAs.

### **p21waf1 downregulation and OIS escape are associated with enhanced genomic instability and SAHF inactivation**

DNA damage due to abnormal replication has been recently proposed to function as an anti-cancer barrier (30,31). Since p21waf1 plays an important role in response to genomic instability, we then determined if this response could be observed in our experimental conditions. To this end, HT29 cells were stained with antibodies recognizing the phosphorylated form of histone H2Ax, a marker of DNA double strand breaks. As expected, western blot results showed that the induction of the H-Ras<sup>v12</sup> oncogene led to DNA damage (Figure 5A, lanes 1-2), probably as a consequence of replicative stress. We then determined if DNA damage was maintained following OIS escape and p21waf1 inactivation. Interestingly, a significant phosphorylation of histone H2Ax was still detected in the emergent clones (Figure 5A, lanes 3-7), indicating that these clones continue to proliferate despite a significant amount of DNA damage. The same effect was noticed when DNA damage was analyzed by FACS (Figure 5B).

Besides DNA damage, OIS is also characterized by the formation of isolated heterochromatin foci called Senescence Associated Heterochromatin Foci (SAHF, (2)). Proliferative genes are compacted within these foci to prevent cell cycle progression, generally as a consequence of Rb-mediated silencing. As expected, DAPI staining showed an increase in the presence of punctuate heterochromatin foci in the nucleus of cells following ras induction. Interestingly, this was not observed anymore in cells that have escaped the OIS protective mechanism (Figure 5C).

Altogether, these results indicate that OIS bypass and p21waf1 downregulation are associated in HT29 cells with enhanced genomic instability and SAHF inactivation.

### **Epithelial-mesenchymal transition is induced in HT29 cells during p21/OIS escape.**

Using breast cancer lines, it has been proposed recently that during senescence inactivation, the downregulation of p21waf1 is associated with an induction of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and that this

leads to dedifferentiation (32). We then determined if this was also occurring in the HT29 established cell line. Using a tumour spheroid model, we first observed that parental HT29 cells formed well-differentiated round spheroids with strong cell-cell contacts (Figure 6A). As expected, spheroids did not grow following H-Ras<sup>v12</sup> induction as a consequence of cell cycle arrest. Interestingly, cells that have inactivated p21waf1 and escaped OIS generated irregular spheroids. Cells frequently left the spheroid structures, and migration of chains of cells was observed in the surrounding matrix (Figure 6A). The same observation was made using a classical wound-healing test, showing enhanced migration and reduced adhesion of cells that have escaped the p21/OIS pathway (Figure 6B). We also tested the invasive capacity of the cell line through ECM barriers. We found that cells that have escaped the OIS pathway showed a dramatic increase in invasion compared with parental cells, toward both Matrigel and Collagen I matrices (Figure 6C). In addition, we also noticed that the steady-state level of villin, a marker of epithelial cell adhesion, was downregulated in the emergent clones (Figure 6D). Note however that this effect was already observed following ras induction. These data suggested that emergent clones have acquired an enhanced ability to migrate but since this also occurs during p21waf1 upregulation and senescence, this effect is probably not sufficient to allow tumor escape. This suggested to us that p21waf1 and OIS inactivation might have also induced EMT in RasL cells. Using western blot and quantitative PCR analysis, we effectively observed that the expression of the E-cadherin was reduced in the emergent clones (Figure 6E, lanes 1-4) whereas the vimentin mRNA was upregulated (Figure 6E, lanes 5-8). Interestingly, using FACS analysis, we also noticed an enhanced proportion of cells expressing the CD24<sup>low</sup>/CD44<sup>high</sup> phenotype during senescence escape (Figure 6F). This confirms recent results obtained with mammary cells, showing that senescence escape and EMT induction generate cells with stem cells properties associated with the CD24<sup>low</sup>/CD44<sup>high</sup> phenotype (33). Note that a high expression of CD44 has been associated with an increased ability of HT29 cells to induce tumors in xenograft (34).

Altogether, we concluded that OIS escape and p21waf1 downregulation are associated with cell dedifferentiation and enhanced migration capacities in HT29 cells.

### **Escape to the p21/OIS pathway and EMT induction are associated with enhanced survival and Bcl-xL/Mcl-1 dependency**

In response to p21waf1 inactivation and the consequent genomic instability, cancer cells are expected to prevent cell death by the induction of compensatory anti-apoptotic signals. We speculate that these survival signals are probably also necessary to allow the EMT transition. We thus analyzed whether acute or sustained ras activation impact on survival signaling and focused our analysis on the Bcl-2 family of proteins (35). In parental cells, the upregulation of ras induced an increase in the expression of Bad and of the pro-apoptotic form of Mcl-1, namely Mcl-1-S (Figure 7A). A decrease of Bim level was also noticed. In contrast, the expression of the Bcl-XL and Mcl-1 anti-apoptotic proteins was not affected. Interestingly, these features were different in cells that have downregulated the p21waf1/OIS suppressor pathway. In these cells, the expression level of Mcl-1-S was drastically decreased and Bad was also downregulated. In addition, the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-xL was higher as compared to parental cells. As these expression profiles suggested an enhanced activity of BclxL and Mcl-1, we investigated the role played by these two survival proteins during p21/OIS escape. To this end, Bcl-xL and/or Mcl-1 were depleted by siRNA and apoptosis was evaluated by flow cytometry, using the anti-APO2.7 antibody (also known as 7A6), since its expression is restricted to dying, apoptotic cells. Importantly, results indicate that the codepletion of BclxL and of Mcl-1, but not the depletion of either protein alone, led to significant apoptotic cell death rates in cells that have escaped the p21waf1 suppressor pathway (Figure 7B). In sharp contrast, parental HT29 cells, and HT29 cells in which ras had been activated for 48 hours, remained essentially viable after Bcl-xL and Mcl-1 codepletion.

These results indicate that cells that have escaped to the p21waf1/OIS protective pathway showed dependency to Bcl-xL/Mcl-1, probably as a response to one or more death signals specifically found in highly malignant cells expressing active ras, having escaped OIS, resumed proliferation and enhanced their invasion properties.

## DISCUSSION

In this study, we have shown that the OIS program is conserved in the established HT29 colorectal cell line, in the absence of intact p53 and p16INK4 signaling. Following upregulation of the ras oncogene, p21waf1 is upregulated and cell proliferation is arrested. The cell cycle inhibitor prevents the expression of the cdc25A and PLK1 gene and we have observed that p21waf1 binds to the PLK1 promoter to prevent its expression. Interestingly, we also noticed that some cells escaped this OIS pathway and that this progression is associated with a downregulation of p21waf1 expression. Senescence escape is associated with an increase in DNA damage, an induction of the EMT program and an increase in the proportion of cells expressing the CD24<sup>low</sup>/CD44<sup>high</sup> phenotype. In response to this oncogenic stress, cells having escaped OIS rely on the survival pathway induced by Bcl-xL/Mcl-1 signaling.

In response to abnormal oncogenic signaling, primary cells activate tumor suppressor pathways that rely on the initial activation of the Arf-p53 and p16INK4 proteins. In parallel, replication stress results in the early activation of DNA damage pathways that also function as tumor suppressors. In light of these observations, it was initially expected that cancer cells have to inactivate these tumor suppressor pathways to allow tumor progression. As expected, many established cell lines have inactivated p53 and INK4 signaling and, for this reason, it can be expected that OIS is essentially active in primary cells. At least in HT29 cells, our results indicate that OIS is not only induced in primary cells but that this protective mechanism can still be active in established colorectal cell lines despite the presence of acquired genetic abnormalities such as Raf, p53 and p16INK4 dysregulation in HT29 cells. Recent results have already proposed this hypothesis, showing that the senescence program is conserved in established tumors and that oncogene inactivation is sufficient to reinduce cell cycle arrest (36). In addition, it has been recently shown that OIS can still be induced in established mammary cells (37). Altogether, these results suggest that a complete inactivation of the OIS program is not necessary for initial cell transformation. It is well known that mutation in the APC tumor suppressor gene is one of the initial event of colon carcinogenesis, leading to constitutive  $\beta$ -catenin activation. However, other abnormalities are necessary to allow a complete cell transformation. For instance ras mutation is an important step in the activation of the  $\beta$ -catenin

pathway and during carcinoma progression (38). In light of our results and others, we speculate that OIS is probably not completely inactivated following the initial  $\beta$ -catenin activation and that this suppressor pathway remains partially functional to restrain cell proliferation in response to secondaries mutations. In addition, following senescence escape, our results also imply that apoptosis constitute a secondary fail-safe mechanism. In colorectal cells, we speculate that this suppressor pathway might become active when senescence is bypassed during the successive steps of cell transformation. Indeed, cells that have escaped the p21/OIS pathway harbor specific death signals that kill them once Bcl-xL and Mcl-1 are down-regulated by RNA interference. These proapoptotic signals, and their relationship with ras, remains to be identified. Bcl-xL and Mcl-1 promote cell survival in great part by preventing some BH3-only proteins such as Bim or Puma to directly activate multidomain proteins and promote their cytotoxic activity. The loss of ras-induced repression of Bim we found in escaped cells might thus contribute to these signals. Since p21 exerts anti-apoptotic activities, it is also possible that its loss, which appears necessary to escape from senescence in our paradigm, contributes to enhance death signals in cells that have escape the OIS protective pathway.

We and others have previously described that p21waf1 can function as a transcriptional inhibitor to prevent the expression of cell cycle genes (9-17). This protein associates with several transcription factors such as NFkB, STAT3 or E2F1 to bind to the promoters of genes involved in the activation of cell cycle progression such as Myc, cdc25a or Wnt4. We have recently shown that p21waf1 binds to these promoters in response to chemotherapy treatment to allow cell cycle arrest (25). However, to our knowledge, it has not been demonstrated previously that these transcriptional functions are also activated in response to an abnormal oncogenic activity in colorectal cancer cells. In addition, the association of p21waf1 with DNA has been most of the time characterized on genes activated at the G0/G1 transition of the cell cycle. Interestingly, using an IPTG-inducible vector (27), it has already been suggested that the overexpression of p21waf1 leads to the downregulation of G2-specific genes to prevent progression towards mitosis. In this study, we further confirmed this observation, showing that p21waf1 binds to the PLK1 promoter to prevent its expression in response to the ras oncogene. As previously reported, we speculate that this effect is due to the inactivation of transcriptional regulators such as CBP and to

histone deacetylation. As stated above, OIS is associated with chromatin reorganization into senescence-associated heterochromatin foci. Silencing depends on the retinoblastoma pathway and is associated with enhanced histone H3 trimethylation and recruitment of the HP1 protein on proliferative genes. Therefore, it will be interesting to determine if the binding of p21waf1 to the PLK1 promoter is associated with the recruitment of transcriptional repressors such as Rb or H3K9me3 methyl-transferases. As expected, PLK1 expression was reactivated following p21waf1 downregulation and OIS escape. Interestingly, we have also noticed that cells that escape this suppressor mechanism proliferate despite significant DNA damage. Theoretically, in the absence of intact p53-p21 signaling, inactivation of cdc25C or spindle checkpoint activation are expected to prevent the propagation of damaged DNA (39,40). In addition, it has also been proposed that the Aurora-A-PLK1 pathway plays an important role to prevent G2 progression during DNA damage (41-43). Therefore we speculate that these G2/M checkpoints are also dysregulated during OIS escape. Since cells expressing the ras oncogene have been recently reported to be addicted to the PLK1 kinase (44), it will be interesting to determine if the Aurora-A-PLK1 pathway is involved in OIS escape in our experimental conditions.

Besides regulating cell cycle genes, it has also been shown recently in breast cancer cell lines that p21waf1 inhibits the epithelial mesenchymal transition in response to the ras oncogene (45). The cell cycle inhibitor can prevent the repression of the E-cadherin by the Twist transcription factor. In addition, these results also indicate that p21waf1 reduces the proportion of cells expressing the CD24<sup>low</sup>/CD44<sup>high</sup> phenotype in response to oncogenic transformation. Finally, some of the genes that are overexpressed in embryonic stem cells are also repressed by the cell cycle inhibitor. In light of these results, we speculate that p21waf1 also prevents EMT in colorectal cancer and that this effect might be due to a direct binding of the cell cycle inhibitor to the corresponding promoters. The inactivation of this protein during OIS escape would restore the expression of these genes and allow EMT. Importantly, de-differentiation of transformed epithelial cells and loss of E-cadherin are associated with chemotherapy resistance (46). It is striking to note that both p21waf1 inactivation and Bcl-xL/Mcl-1 upregulation occur at the same time in our experimental conditions. The dysregulation of

these two pathways is a key event that can also lead to chemotherapy resistance. Unravelling the mechanisms that lead to the combined loss of p21waf1, of Mcl-1S and the enhanced Bcl-xL expression during OIS escape is thus of particular relevance, as these events probably play a critical role in maintaining the survival of transformed epithelial cells with a highly malignant phenotype.

### Acknowledgments

This work was supported by a fellowship from Inserm-Pays de Loire (to S.C.T), from the Ministère de la Recherche (to H.S) and grants (Equipe Labellisée to O.C) from the Ligue Contre le Cancer and from Institut du Cancer. We also thank Dr Uchiumi for providing PLK reporter constructs.

**REFERENCES**

1. Roninson, I. B. (2003) *Cancer Res* **63**(11), 2705-2715.
2. Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., and Lowe, S. W. (2003) *Cell* **113**(6), 703-716
3. 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**(4), 817-825
4. Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S. J. (1993) *Cell* **75**(4), 805-816
5. Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., and Stillman, B. (1994) *Nature* **369**(6481), 574-578
6. Chuang, L. S., Ian, H. I., Koh, T. W., Ng, H. H., Xu, G., and Li, B. F. (1997) *Science* **277**(5334), 1996-2000
7. Waldman, T., Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1996) *Nature* **381**(6584), 713-716
8. Andreassen, P. R., Lacroix, F. B., Lohez, O. D., and Margolis, R. L. (2001) *Cancer Res* **61**(20), 7660-7668.
9. Coqueret, O. (2003) *Trends Cell Biol* **13**(2), 65-70.
10. Perkins, N. D. (2002) *Cell Cycle* **1**(1), 39-41.
11. Fritah, A., Saucier, C., Mester, J., Redeuilh, G., and Sabbah, M. (2005) *Mol Cell Biol* **25**(6), 2419-2430
12. Devgan, V., Mammucari, C., Millar, S. E., Briskin, C., and Dotto, G. P. (2005) *Genes Dev* **19**(12), 1485-1495
13. Bienvenu, F., Barre, B., Giraud, S., Avril, S., and Coqueret, O. (2005) *Mol Biol Cell* **16**(4), 1850-1858. Epub 2005 Jan 1819.
14. Giraud, S., Hurlstone, A., Avril, S., and Coqueret, O. (2004) *Oncogene* **23**(44), 7391-7398.
15. Ahn, S. H., Kim, M., and Buratowski, S. (2004) *Mol Cell* **13**(1), 67-76.
16. Ho, C. K., and Shuman, S. (1999) *Mol Cell* **3**(3), 405-411.
17. Snowden, A. W., Anderson, L. A., Webster, G. A., and Perkins, N. D. (2000) *Mol Cell Biol* **20**(8), 2676-2686
18. Wood, A., and Shilatifard, A. (2006) *Genes Dev* **20**(6), 643-647
19. Qi, Y., Gregory, M. A., Li, Z., Brousal, J. P., West, K., and Hann, S. R. (2004) *Nature* **431**(7009), 712-717
20. Courapied, S., Sellier, H., De Carne Trecesson, S., Vigneron, A., Bernard, A. C., Gamelin, E., Barre, B., and Coqueret, O. (2010) *J Biol Chem* **285**(35):26765-78.
21. Vigneron, A., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2008) *Cancer Res* **68**(3), 815-825
22. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., and Lowe, S. W. (1997) *Cell* **88**(5), 593-602
23. Collado, M., and Serrano, M. (2010) *Nat Rev Cancer* **10**(1), 51-57
24. Muller, P. A., Caswell, P. T., Doyle, B., Iwanicki, M. P., Tan, E. H., Karim, S., Lukashchuk, N., Gillespie, D. A., Ludwig, R. L., Gosselin, P., Cromer, A., Brugge, J. S., Sansom, O. J., Norman, J. C., and Vousden, K. H. (2009) *Cell* **139**(7), 1327-1341
25. Vigneron, A., Cherier, J., Barre, B., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2006) *J Biol Chem* **281**(46), 34742-34750
26. Uchiumi, T., Longo, D. L., and Ferris, D. K. (1997) *J Biol Chem* **272**(14), 9166-9174
27. 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**(8), 4291-4296.
28. Tategu, M., Nakagawa, H., Sasaki, K., Yamauchi, R., Sekimachi, S., Suita, Y., Watanabe, N., and Yoshid, K. (2008) *J Genet Genomics* **35**(4), 215-224
29. Delavaine, L., and La Thangue, N. B. (1999) *Oncogene* **18**(39), 5381-5392.
30. Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J. M., Lukas, C., Orntoft, T., Lukas, J., and Bartek, J. (2005) *Nature* **434**(7035), 864-870
31. Gorgoulis, V. G., Vassiliou, L. V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Ditullio, R. A., Jr., Kastrinakis, N. G., Levy, B., Kletsas, D., Yoneta, A., Herlyn, M., Kittas, C., and Halazonetis, T. D. (2005) *Nature* **434**(7035), 907-913
32. Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A. P., Bouchet, B. P., Thomas, C., Fauvet, F., Puisieux, I., Doglioni, C., Piccinin, S., Maestro, R., Voeltzel, T., Selmi, A., Valsesia-Wittmann, S., Caron de Fromentel, C., and Puisieux, A. (2008) *Cancer Cell* **14**(1), 79-89

33. Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J., and Weinberg, R. A. (2008) *Cell* **133**(4), 704-715
34. Yeung, T. M., Gandhi, S. C., Wilding, J. L., Muschel, R., and Bodmer, W. F. (2010) *Proc Natl Acad Sci USA* **107**(8), 3722-3727
35. Youle, R. J., and Strasser, A. (2008) *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1), 47-59
36. Soucek, L., Whitfield, J., Martins, C. P., Finch, A. J., Murphy, D. J., Sodik, N. M., Karnezis, A. N., Swigart, L. B., Nasi, S., and Evan, G. I. (2008) *Nature* **455**(7213), 679-683
37. Bihani, T., Chicas, A., Lo, C. P., and Lin, A. W. (2007) *J Biol Chem* **282**(4), 2666-2675
38. Phelps, R. A., Chidester, S., Dehghanizadeh, S., Phelps, J., Sandoval, I. T., Rai, K., Broadbent, T., Sarkar, S., Burt, R. W., and Jones, D. A. (2009) *Cell* **137**(4), 623-634
39. Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H., and Elledge, S. J. (1997) *Science* **277**(5331), 1497-1501
40. Weaver, B. A., and Cleveland, D. W. (2005) *Cancer Cell* **8**(1), 7-12.
41. Macurek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M. A., Klompaker, R., Freire, R., Clouin, C., Taylor, S. S., Yaffe, M. B., and Medema, R. H. (2008) *Nature* **455**(7209), 119-123
42. Krystyniak, A., Garcia-Echeverria, C., Prigent, C., and Ferrari, S. (2006) *Oncogene* **25**(3), 338-348
43. Courapied, S., Cherier, J., Vigneron, A., Troadec, M. B., Giraud, S., Valo, I., Prigent, C., Gamelin, E., Coqueret, O., and Barre, B. (2010) *Mol Cancer* **9**, 205
44. Luo, J., Emanuele, M. J., Li, D., Creighton, C. J., Schlabach, M. R., Westbrook, T. F., Wong, K. K., and Elledge, S. J. (2009) *Cell* **137**(5), 835-848
45. Liu, M., Casimiro, M. C., Wang, C., Shirley, L. A., Jiao, X., Katiyar, S., Ju, X., Li, Z., Yu, Z., Zhou, J., Johnson, M., Fortina, P., Hyslop, T., Windle, J. J., and Pestell, R. G. (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(45), 19035-19039
46. Gupta, P. B., Onder, T. T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R. A., and Lander, E. S. (2009) *Cell* **138**(4), 645-659

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1: Oncogene-induced senescence is still functional in the established HT29 colorectal cell line.

A. To induce ras expression, cells were stimulated with 50 ng/ml doxycyclin for 24 (lane 4) or 48 h (lanes 2 and 5), whole cell extracts were prepared and analyzed with mouse monoclonal anti-H-ras and mouse monoclonal anti-ERK (Y204) antibodies as indicated. Tubulin expression was examined as a loading control (n=3).

B. HT29 cells were stimulated or not with 50 ng/ml doxycyclin for 48 h, whole cell extracts were prepared and analyzed with mouse monoclonal anti-p14ARF antibodies. Tubulin expression was examined as a loading control (n=3).

C. HT29 cells were plated into 96-well plates and ras was induced with 50 ng/ml doxycyclin and allowed to grow for 72 hours. Cell proliferation was investigated by the MTT assay (n=3 +/- sd, left part). In parallel, clonogenic assays were performed, cells were incubated with 50 ng/ml doxycyclin for 10 days and were stained with crystal violet to count colonies (n=5 +/- sd, right part).

D. Following doxycyclin treatment for seven days, the percentage of SA- $\beta$ -Gal positive cells was evaluated and is shown as the mean  $\pm$  s.d. of at least three independent experiments from a total of at least 300 cells.

### Figure 2: The expression of p21waf1 is induced in response to the Ras oncogene

A. Ras was induced for 48 h and the expression of p21waf1 was then evaluated by western blot analysis using total cell extracts (n=4). Hsc70 expression was used as a loading control.

B. Cells were stimulated as described above for the indicated times and the amount of the p21waf1 mRNA was determined by quantitative RT-PCR. Data are expressed as compared to non-induced control value and normalized to RPLP0 (n=3, mean  $\pm$  sd).

C. HT29 cells were transfected with the indicated p21waf1 reporter gene and treated or not with doxycyclin. Whole extracts were then prepared to measure luciferase activity (n=3).

D. HT29 cells were treated as described above and soluble chromatin was prepared from the indicated cells and immunoprecipitated with antibodies directed against the RNA polymerase, its Ser 2- phosphorylated form or control anti-Gal4 antibodies. DNA was amplified using one pair of primers that covers the p21waf1 proximal promoter. ChIP assays were quantified by real-time PCR as compared to Gal4 signal and control region (n=3 +/- sd).

### Figure 3: p21waf1 binds to the PLK1 promoter to prevent its expression during OIS

A. After incubation with 50 ng/ml doxycyclin for 48 h, cells were stained with DAPI and DNA cell content was analyzed by flow cytometry (n=3).

B. RNA was isolated following ras induction and the expression of the Myc, Cdc25A and PLK1 mRNAs was determined by quantitative real-time PCR. Data are quantified as compared to the non-induced control and normalized to RPLP0 expression (n = 3 +/- sd).

C. Cells were transfected with reporter gene as indicated together with control or p21waf1-expressing plasmids. After two days, cytoplasmic extracts were then prepared and processed to measure luciferase activity which was normalized as compared to Renilla luciferase activity (n=3 +/- sd).

D. HT29 cells were either transfected with p21-specific siRNA oligonucleotides or control oligonucleotides as indicated. The expression of the cdc25A and PLK1 mRNAs was analyzed by real-time PCR. The downregulation of the cell cycle inhibitor was verified by western blot (n=3 +/- sd).

E. Soluble chromatin was prepared from cells and immunoprecipitated with antibodies directed against p21waf1, E2F1 or control anti-Gal4 antibodies. DNA was amplified using pairs of primers that cover the PLK1 proximal promoter. ChIP assays were quantified by real-time PCR as compared to Gal4 signal and control region (n=3 +/- sd).

**Figure 4: OIS escape is associated with p21waf1 downregulation and cdc25A/PLK1 reexpression**

- A. Description of the experimental procedure used to allow the growth of cells and the escape to Ras-mediated senescence (cells that escaped senescence were called RasL cells).
- B. Western blot analysis showing Ras and Erk1/2 expression in parental or RasL cells (n=3).
- C. p21Waf1 expression was analyzed in parental H29 cells or in different representative RasL clones by western blot analysis (lanes 1-5, n=3). In parallel, total RNA was isolated following ras induction or in representative RasL cells and the expression of the p21waf1 mRNA was determined by quantitative real-time PCR (lanes 6-9, n=5 +/- sd).
- D. Expression of the cdc25A (lanes 1-5) and PLK1 (lanes 7-11) mRNAs following Ras induction or in RasL cells (n=3 +/- sd).

**Figure 5 : DNA damage and SAHF downregulation during p21waf1/OIS inactivation**

- A, B. DNA double strand breaks were analysed by western blot using polyclonal antibodies directed against the ser139 phosphorylated form of histone H2Ax, following ras induction in parental clones (48h, lanes 1-2 and 3-4) or in representative RasL cells (lanes 5-7, n=3). The generation of DNA double strand breaks was also quantified by FACS analysis (B).
- C. SAHF formation and chromatin compaction were analyzed following Ras induction or in representative RasL cells by immunofluorescence using DAPI staining (one experiment representative of three).

**Figure 6 : p21waf1/OIS inactivation is associated with EMT induction**

- A. Using either parental or representative RasL cells, spheroids were allowed to grow for 8 days and visualized by microscopy (200X, n=3).
- B. Cells monolayers were wounded by removing cells with a standard 1-ml pipette tip. Following washing, cells were allowed to grow for two days (n=3).
- C. Transwell assay showing cell migration across matrigel or collagen-precoated wells as indicated. Following loading, cells were incubated for 12 h at 37°C, and cells that had migrated through the filter were counted and averaged from 5 randomly chosen microscopic fields using a 20× objective.
- D. RNA was isolated following ras induction or in representative RasL cells and the expression of the Villin mRNA was determined by quantitative real-time PCR and quantified as compared to RPLPO expression (n = 3 +/- sd).
- E. Following ras induction or in representative RasL cells, E-Cadherin expression was analyzed by western blot analysis, using whole cell extracts. Tubulin expression was examined as a loading control (n=2). In parallel, the expression of the Vimentin (lanes 5-8) mRNAs was determined by quantitative real-time PCR. Data are quantified as compared to RPLPO expression (n = 3 +/- sd).
- F. The percentage of cells expressing the CD24<sup>low</sup>/CD44<sup>high</sup> phenotype was determined by FACS analysis following ras induction (lanes 1) or in established RasL clones.

**Figure 7 : Increased dependency to Bcl-XL/Mcl1 following p21waf1 inactivation and OIS escape**

- A. Western blot analysis of apoptotic and non-apoptotic regulators following ras induction or in representative RasL clones (n=3).
- B. HT29 cells were either transfected with control or Bcl-XL and Mcl1-specific siRNA oligonucleotides as indicated. Transfection were performed in parental cells treated or not with doxycyclin or in two representative RasL clones. Apoptosis was evaluated by flow cytometry using APO2.7 staining (n=4 +/- sd).

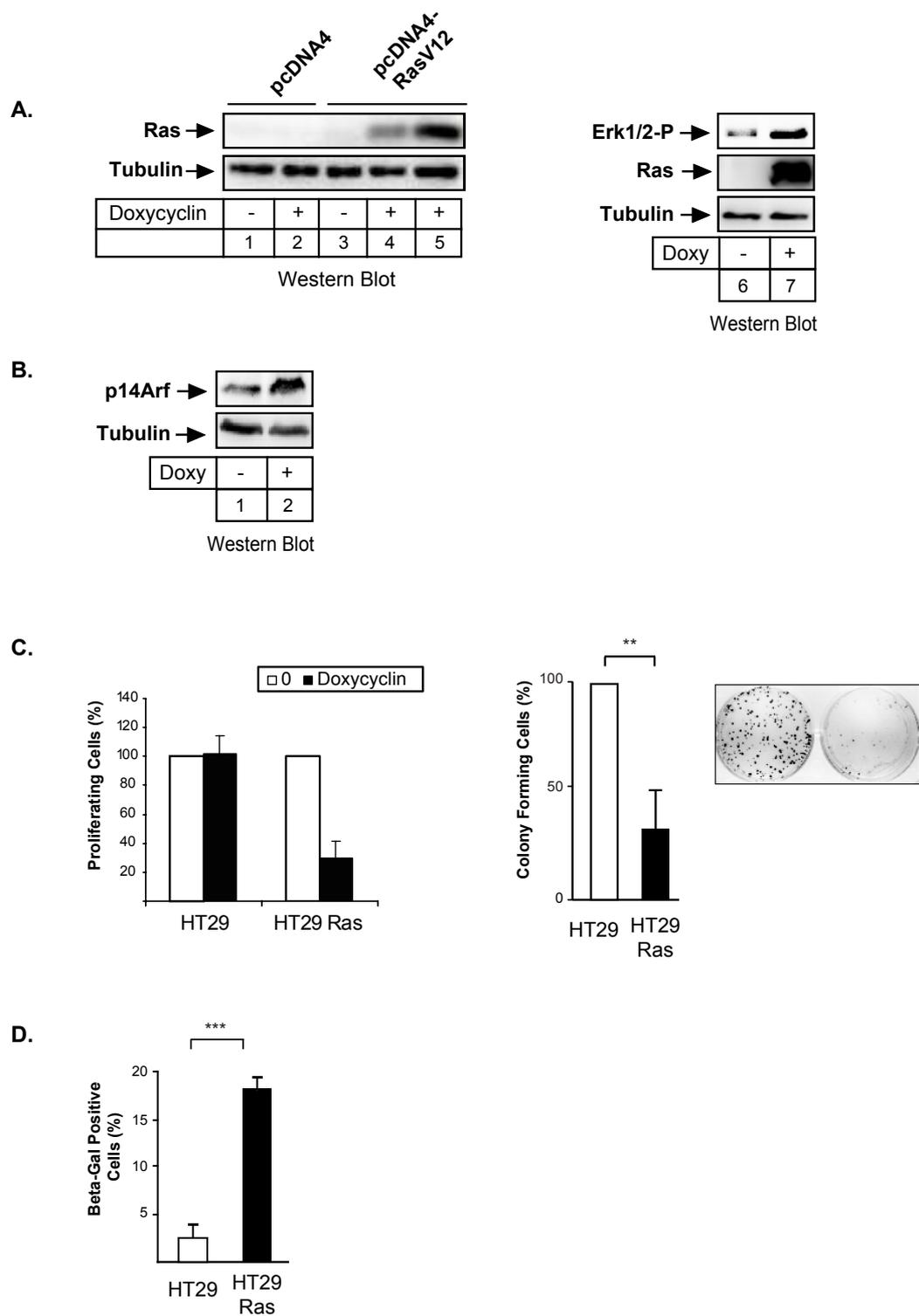


Figure 1

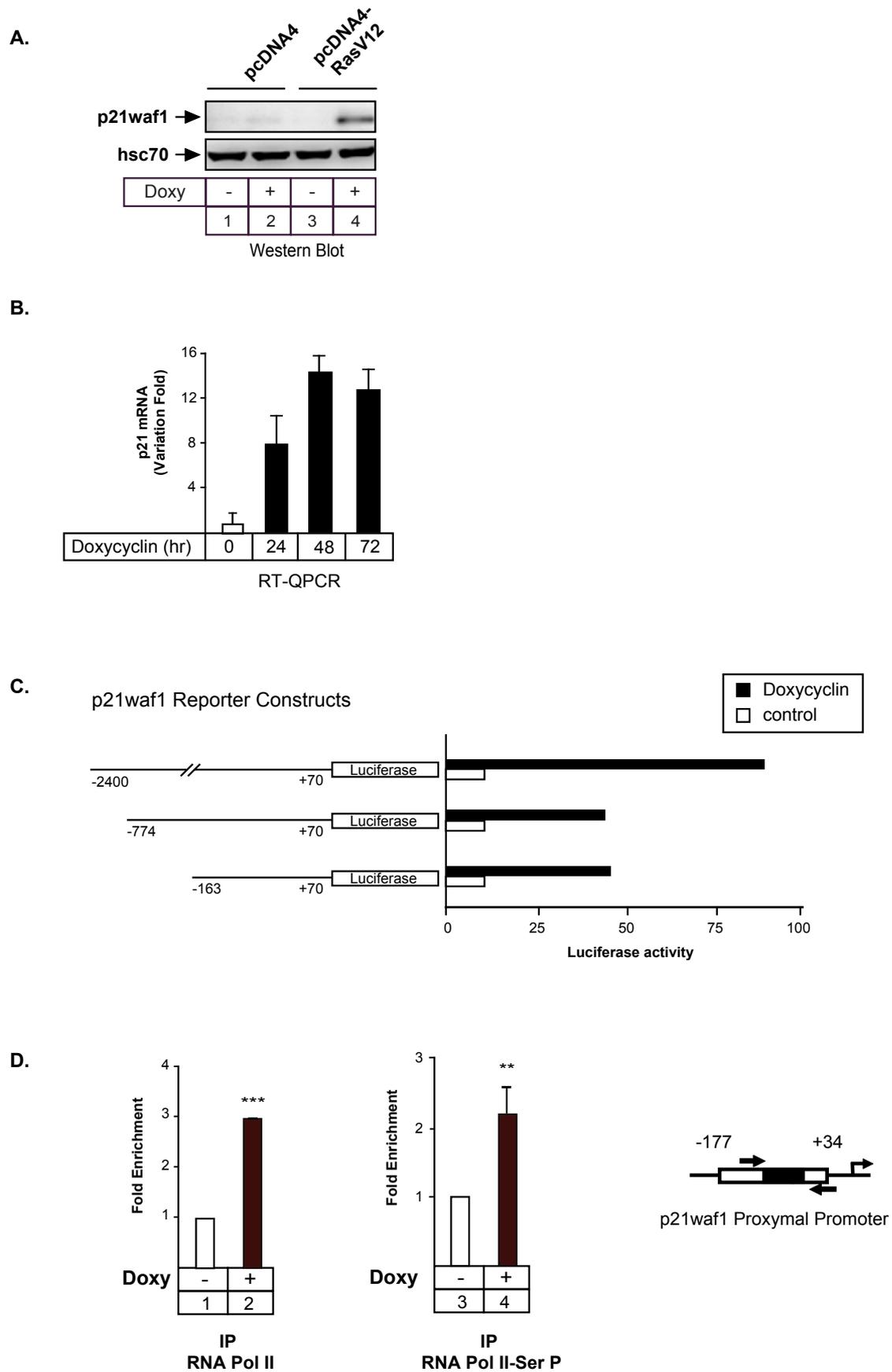


Figure 2

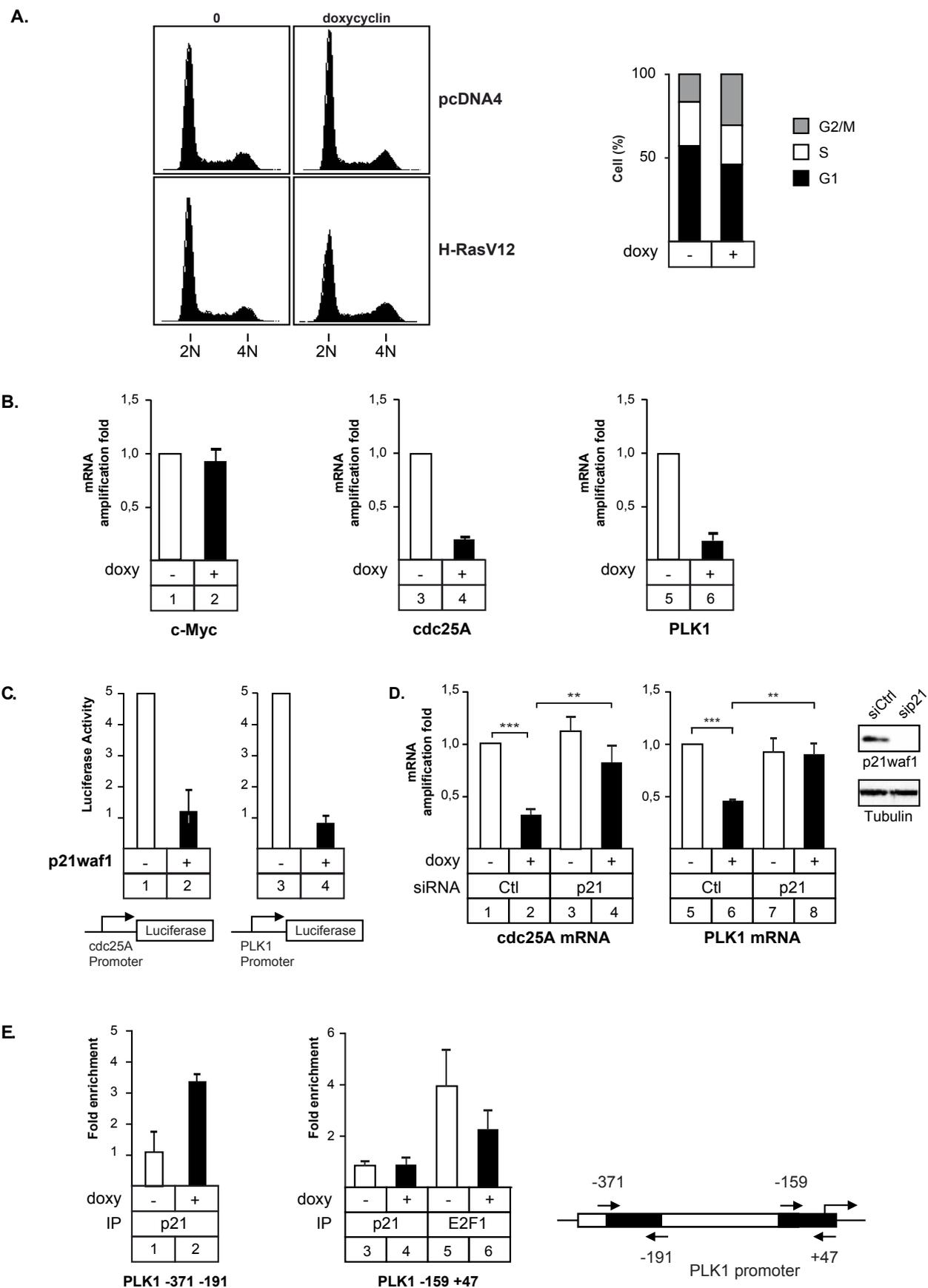


Figure 3

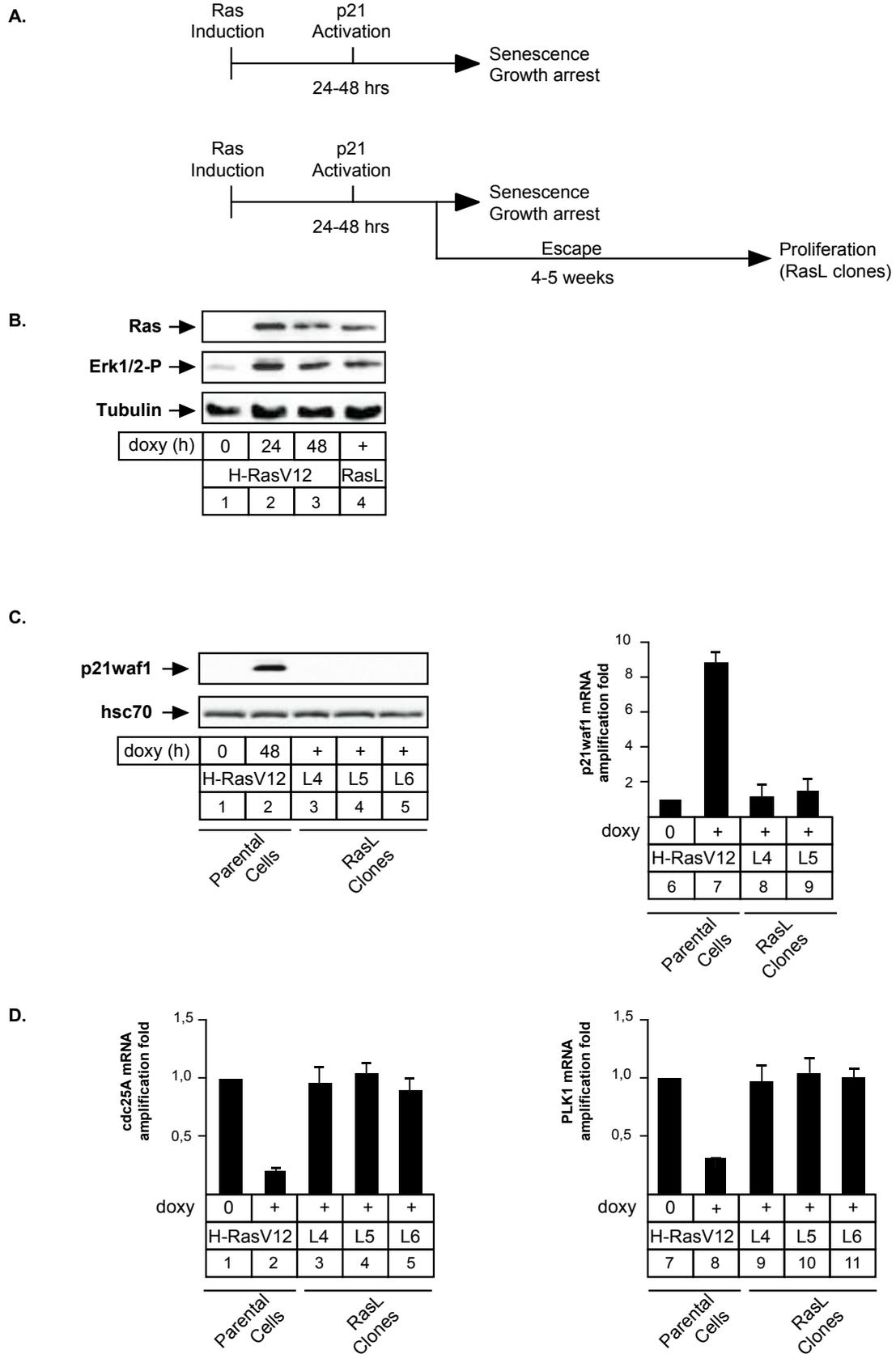


Figure 4

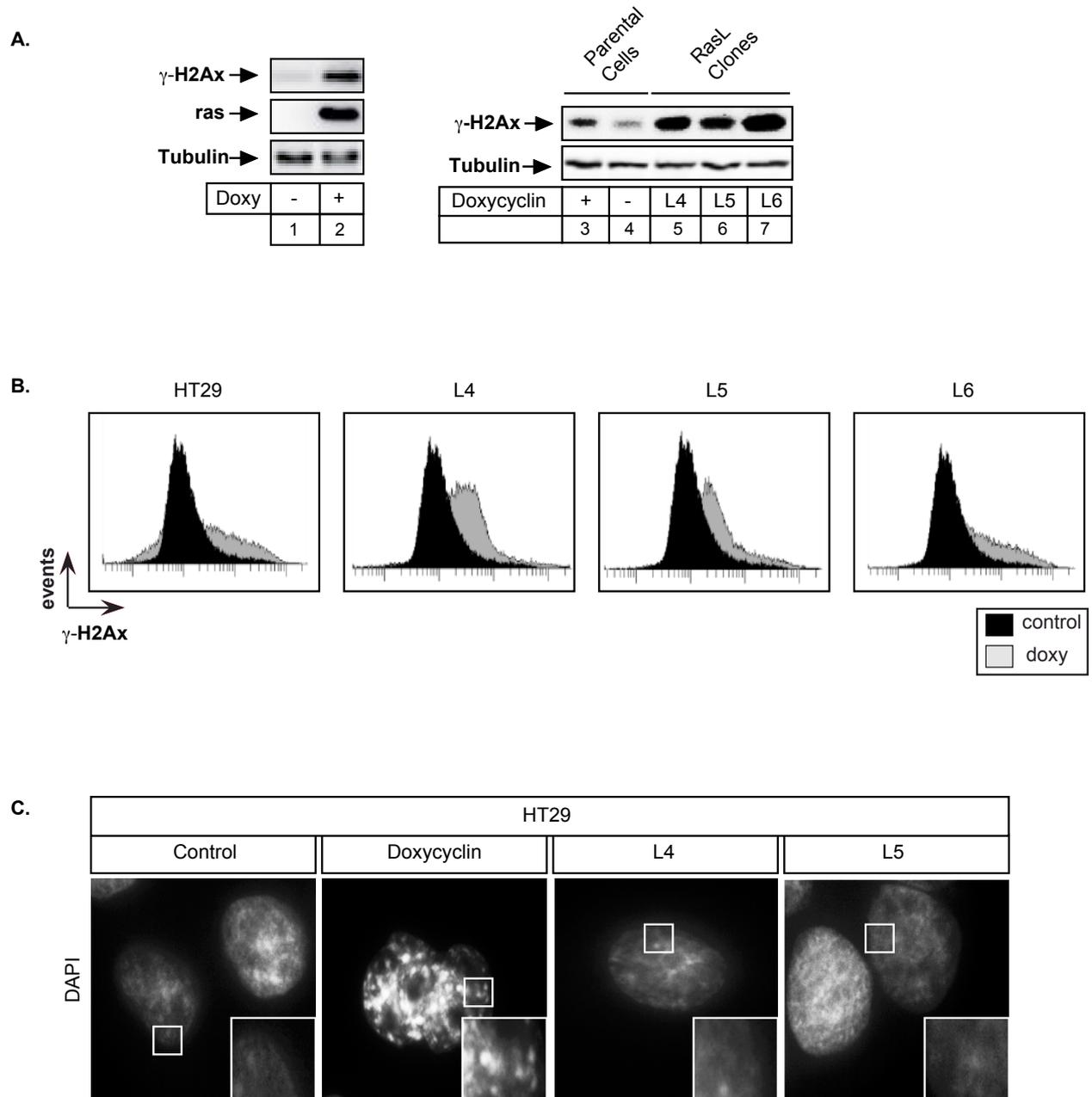


Figure 5

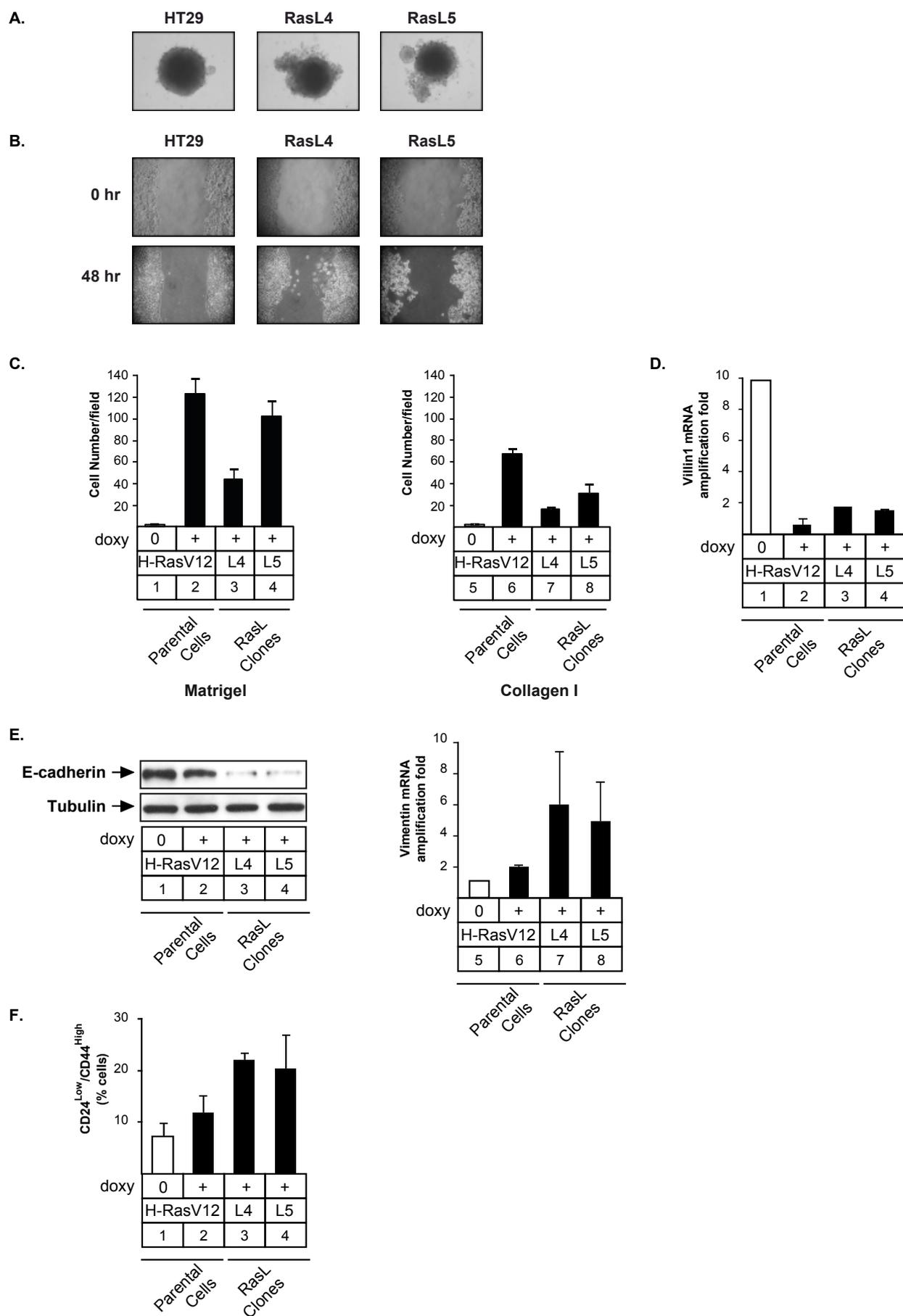
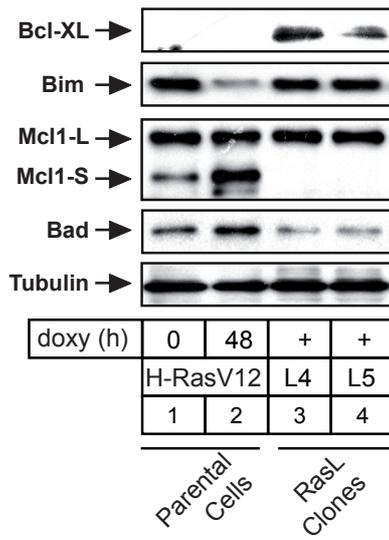


Figure 6

A.



B.

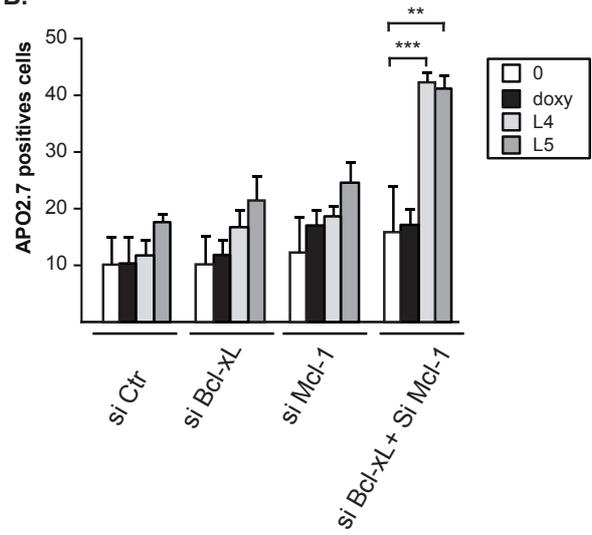


Figure 7

## DISCUSSION

# Chapitre I : Oncogène Ras et sénescence

## A. L'oncogène Ras induit l'entrée en sénescence

Dans un premier temps nous avons vu que la surexpression d'une forme autoactive de Ras conduisait à diminuer la prolifération cellulaire, à induire une accumulation des cellules en phase G2/M et à engager l'entrée en sénescence. L'OIS (*Oncogene Induced-Senescence*) est classiquement associée aux lésions précancéreuses chez l'Homme. L'OIS a d'abord été décrit comme inducteur de l'expression de p16Ink4a et p14ARF mais pas des points de contrôle des cassures double brin de l'ADN (d'Adda di Fagagna *et al.*, 2003 ; Herbig *et al.*, 2004 ; Takai *et al.*, 2003). Cependant, il a été observé que selon l'oncogène étudié, l'OIS pouvaient activer les mécanismes de réponse aux cassures double brin, ATM et Chk2, et pas l'expression de p16Ink4a (Bartkova *et al.*, 2006). Dans notre modèle nous avons observé la mise en place de la sénescence indépendamment de p16Ink4a dont le locus est méthylé. Nous avons également observé l'expression de p21Waf1 dépendante de ATR ainsi que la phosphorylation de H2Ax, décrite comme étant représentative des cassures double brin de l'ADN. L'apparition de cassures de l'ADN faisant suite à la surexpression de Ras et l'induction de la sénescence qui en découle, indiquent une réponse proche de celle observée au cours des lésions précoces du processus oncogénique. Nos cellules inductibles pour Ras constituent donc un modèle d'étude intéressant de la réponse précoce à un oncogène.

Il est intéressant de noter que l'induction de la sénescence est conservée dans des cellules déjà transformées. La transformation initiale ne nécessite donc pas l'inactivation complète du programme d'induction de l'OIS et les cellules doivent traverser une seconde barrière de protection contre l'oncogène lors de la mutation d'un second oncogène pour poursuivre la progression tumorale.

## B. Ras induit l'expression de p21Waf1

Les cellules HT29 qui sont mutées sur le gène de p53 ont été capables d'induire l'entrée en sénescence suite à l'expression de l'oncogène Ras. En temps normal, l'expression des gènes nécessaires à la réponse au stress oncogénique se fait principalement grâce à l'activation de p53. Nous avons montré que des cellules mutées sur p53 étaient néanmoins capables d'induire l'arrêt du cycle cellulaire. Nous avons vérifié par extinction de son expression que, malgré la mutation sur son domaine de liaison à l'ADN, p53 ne pouvait pas

avoir une activité transcriptionnelle grâce une éventuelle fixation à un autre facteur de transcription.

Nous avons également observé, grâce à l'inhibition des MAP Kinases par un inhibiteur de Erk, que l'activation de cette voie était essentielle à l'expression de p21Waf1. Notre étude n'a pas permis l'identification du facteur ayant permis la transcription du gène de p21Waf1. Cependant, nous avons observé que son site de fixation était situé au niveau du promoteur proximal de p21Waf1. L'analyse de cette séquence par le logiciel en ligne *MatInspector* présent sur le site de *Genomatix* nous a permis d'émettre plusieurs hypothèses quant au facteur de transcription potentiellement responsable de l'expression de p21Waf1 après induction de Ras. Sur la zone responsable de l'activation de la transcription du gène de p21Waf1, nous avons notamment observé des sites de fixation de protéines impliquées dans le développement embryonnaire telles que Hes et Ets1, ou encore le site de fixation de STAT1 et de STAT3, de NF-1 ou de Sp1. Au cours de ce travail, nous avons testé la fixation d'un certain nombre de facteurs de transcription par immunoprécipitation de chromatine sur la zone proximale du promoteur de p21Waf1. Par exemple, il nous avait semblé judicieux de nous intéresser à p52, un membre de la famille de NF- $\kappa$ B, car nous avons observé son activation à la suite de l'induction de Ras. Nous nous sommes aussi intéressés à p62, à FoxO3a qui est régulé par la voie de la PI3K, à p73 qui fait partie de la même famille que p53. Nous avons également étudié la présence de Myc et des formes actives de STAT1 et STAT5 ainsi que Id4, un facteur de transcription impliqué dans le développement et dont l'expression est inhibée dans les cellules mutées sur H-Ras et sur p53. De plus, nous avons observé la surexpression de Id4 après l'induction courte de Ras. Aucun de ces facteurs n'a été détecté sur le site proximal du promoteur de p21Waf1 après l'expression de Ras. Toutefois, l'explication de l'expression de p21Waf1 à la suite de l'induction de H-RasV12 pourrait se faire par une autre approche. La transcription pourrait être maintenue inhibée en condition normale et l'inhibition serait levée à la suite du stress oncogénique induit par Ras. Par la suite, l'échappement conduirait, à nouveau, à l'expression du répresseur de p21Waf1 comme par exemple le facteur de transcription de Oct4.

Les cassures de l'ADN semblent nécessaires à la stabilisation de la protéine p21Waf1 après induction de Ras. En effet, l'extinction de ATR empêche l'expression de la protéine p21Waf1. Le traitement des cellules avec des médicaments génotoxiques ne permet pas l'expression de p21Waf1 confirmant l'importance de l'activation des MAP Kinases dans

l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire. Nous pouvons formuler l'hypothèse selon laquelle l'activation de la transcription de p21Waf1 serait induite par une voie sous-jacente des MAP Kinases, et que la stabilisation de la protéine par p38 serait dépendante des cassures de l'ADN induites par Ras et détectées par ATR. Au cours de notre étude, l'équipe de Nebreda a publié ses observations au sujet de l'implication de p38 dans la stabilisation de p21Waf1. Ces travaux décrivent qu'après irradiation des cellules, p21Waf1 est transcrite par p53, puis p38 stabilise l'ARNm de p21Waf1 pour permettre sa traduction (Lafarga *et al.*, 2009). Dans notre modèle inductible pour H-RasV12 et muté sur le gène de p53, nous avons décrit, qu'à la suite de dommages de l'ADN, p38 stabilisait la protéine p21Waf1 mais pas son ARN. Cette observation confirme l'implication de la kinase de stress p38 dans l'induction de la sénescence par p21Waf1.

Les cassures observées à la suite de l'expression de H-RasV12 peuvent être induites par différents mécanismes. L'oncogène induit une forte pression sur les fourches de réplication de l'ADN lors de la phase S. L'activation de la phase S au détriment de la phase G1 conduit également à un chargement incomplet des complexes de réplication et donc à une augmentation de l'ampleur des yeux de réplication et à une fragilité accrue de la molécule d'ADN. Les oncogènes activent également le métabolisme cellulaire conduisant à la production de ROS par la mitochondrie. Les cassures induites par les ROS sont généralement détectées par la kinase ATR plutôt que par ATM. À la suite de l'induction de H-RasV12 nous avons observé la phosphorylation de la sérine 139 de l'histone H2Ax indiquant la présence de cassures double brin. Cette observation semble indiquer que l'oncogène Ras induit des cassures double brin, pourtant, l'importance de la kinase ATR dans l'expression de p21Waf1 est, en général, révélatrice de l'activation de réponse aux cassures simple brin de l'ADN. Cependant, la progression en phase S et la rencontre des fourches de réplication avec les cassures simple brin va conduire à l'apparition de cassures double brin, ce qui pourrait expliquer la phosphorylation de H2Ax. Il est donc possible que l'induction de p21Waf1 par Ras soit la conséquence de cassures double brin. ATR est responsable du maintien de la l'intégrité des sites fragiles au cours de la réplication. Il peut donc aussi être activé au cours de la réplication, lors du désenroulement de l'ADN par les topoisomères I alors que l'ADN polymérase est ralentie. Dans ce cas, il se forme des structures secondaires de l'ADN simple brin, conduisant à l'apparition de cassures et de zones non répliquées sur les chromosomes. Ces zones sont appelées des sites fragiles et conduisent à l'activation de ATR (Casper *et al.*, 2002). Le fait que l'expression de p21Waf1

soit dépendante de ATR dans notre modèle pourrait suggérer que les cassures induites par l'expression de Ras seraient apparues lors du stress réplicatif porté par l'oncogène. L'expression de p21Waf1 dépendante de ATR serait alors importante pour limiter l'instabilité génomique et par là même, la progression de la tumorigenèse.

Dans cette étude, nous avons observé que la présence de p21Waf1 sur le promoteur du gène de Plk1 permettait l'inhibition de sa transcription. Nous avons aussi vu une diminution du recrutement du facteur de transcription E2F1 sur son promoteur proximal. E2F1 étant un facteur de transcription responsable de l'activation des gènes du cycle cellulaire, sa diminution pourrait expliquer l'inhibition de la transcription du gène de Plk1. Une hypothèse permettant d'expliquer la perte de E2F1 au niveau de la zone proximale du promoteur de Plk1 serait que son recrutement soit fait en amont de cette zone et que la transcription soit induite par la formation de la boucle de transcription qui permettrait de ramener E2F1 sur la zone proximale. Le recrutement de p21Waf1 inhiberait la formation de la boucle de transcription et empêcherait le recrutement de E2F1 sur la zone proximale.

### C. Certaines cellules échappent à la sénescence induite par Ras

L'inhibition de la transcription des gènes du cycle cellulaire, Cdc25A et Plk1, par p21Waf1 a pu contribuer à l'arrêt de la prolifération et à l'entrée en sénescence. La sénescence est habituellement observée dans des cellules primaires lorsque les points de contrôle du cycle cellulaire sont fonctionnels et que les gènes suppresseurs de tumeur ne sont pas mutés. Pourtant, nous avons observé l'apparition de la sénescence dans des cellules qui sont déjà transformées. Cette observation suggère que l'inactivation totale de la sénescence n'est pas nécessaire pour permettre la transformation cellulaire. Dans le cancer colorectal, il est décrit que c'est la mutation de APC qui permet l'initiation de la tumorigenèse. Cette mutation conduit à une activation constitutive de la voie de la  $\beta$ -caténine mais d'autres événements sont nécessaires à la progression tumorale et il a été montré que la mutation de Ras, qui arrive plus tardivement, serait nécessaire à cette progression (Phelps *et al.*, 2009). L'inhibition incomplète de la sénescence permettrait alors aux cellules d'avoir une deuxième ligne de réponse aux événements pro-oncogéniques arrivant par la suite.

Lors d'une collaboration avec l'équipe du Docteur Philippe Juin de l'unité U892, nous avons également observé que la survie des cellules ayant échappé à la sénescence induite par Ras était dépendante des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-xL. Nous

n'avions pas observé d'induction significative de l'apoptose à la suite de l'expression de Ras. Pourtant il semblerait que les cellules RasL expriment des protéines anti-apoptotiques nécessaires à leur survie. L'effet anti-apoptotique de p21Waf1 lors de la réponse à Ras serait suffisant à permettre la survie cellulaire, et à la suite de la perte d'expression de p21Waf1, les cellules exprimeraient des protéines anti-apoptotiques pour contrer la mise en place de l'apoptose.

La sénescence est décrite comme un arrêt définitif de la prolifération des cellules malgré une activité métabolique persistante. Dans notre modèle, la sénescence induite ne semble pas être persistante, les cellules sénescents ne sont pas retrouvées dans les sous-cultures des populations échappées. Soit ces cellules sortent de sénescence et recommencent à proliférer, soit elles meurent. L'hypothèse de la sortie de sénescence des cellules pourrait s'expliquer par le fait que le promoteur de p16Ink4a est méthylé dans les cellules HT29. p16Ink4a est une protéine nécessaire à la mise en place de la sénescence et elle n'est pas exprimée dans le modèle que nous avons utilisé. Dans ce modèle, l'expression de p21Waf1 semble suffisante à induire la sénescence mais pas à la maintenir. L'absence de p16Ink4a suffirait à expliquer que la sénescence ne soit pas maintenue car toutes les conditions nécessaires à la mise en place définitive de ce processus ne sont pas remplies. Pour être définitive, la sénescence nécessite l'activation de la protéine p16Ink4a, inhibitrice du complexe cycline D/Cdk4-6 et activatrice du suppresseur de tumeur pRb. L'induction de la sénescence lors de la réponse normale d'une cellule à un stress oncogénique est un processus permettant d'empêcher la progression tumorale. Le problème de la mise en place d'une sénescence non définitive, est que la cellule mutée sur un oncogène et présentant d'importantes cassures de l'ADN poursuit sa prolifération conduisant inéluctablement à l'augmentation de l'instabilité génomique. Dans notre modèle, malgré l'induction de la sénescence indépendante de p53, les cellules ont outrepassés le blocage de la prolifération et ont réussi à progresser dans le processus de tumorigenèse. L'instabilité génomique ainsi générée pourrait conduire à une augmentation de l'agressivité tumorale et éventuellement à une induction de la résistance aux traitements.

De nombreuses études notent l'importance du maintien de l'expression de l'oncogène dans les cellules tumorales. L'inhibition de l'oncogène responsable de la tumorigenèse d'une cellule conduirait à l'induction de la mort cellulaire (Weinstein, 2002). Ce phénomène s'appelle l'addiction à l'oncogène. En fonction de la diminution de la

prolifération cellulaire, un index d'addiction peut être calculé. Lorsque nous avons voulu savoir si nos cellules présentaient une addiction à l'oncogène Ras après avoir échappées à la sénescence, nous avons constaté que le retrait de la doxycycline dans le milieu n'empêchait pas la prolifération des cellules en culture. Nous n'avons pas quantifié cette prolifération mais le fait que les cellules aient continué à proliférer en culture malgré l'absence de la surexpression de H-RasV12 nous a conduit à penser que la survie des cellules de notre modèle n'était pas dépendante de Ras. Au cours d'une collaboration avec l'équipe du Professeur Pascale Jeannin et du Docteur Yves Delneste de l'unité U892, nous avons dosé par ELISA multiplexe les cytokines exprimées dans les surnageants des cellules inductibles pour H-RasV12 ainsi que dans les cellules RasL. Nous avons observé que les cellules RasL exprimaient un plus fort taux d'IL-6 que les cellules initiales. L'IL-6 active la voie des MAP Kinases. Son expression par les cellules RasL suggère l'apparition d'une boucle d'activation de la voie des MAP Kinases ce qui permettrait aux cellules de maintenir leur prolifération malgré l'absence de signal constitutif de H-Ras.

## Chapitre II : Oncogène Ras et EMT

Malgré l'existence de mécanismes de contrôle du cycle cellulaire et de voies permettant l'arrêt de la prolifération, nous l'avons vu, certaines cellules sont capables de recommencer à proliférer. Cette capacité à proliférer malgré le stress oncogénique s'explique par l'inactivation des mécanismes suppresseurs menant à la sénescence. Dans un premier temps, nous avons décrit par quels mécanismes ces inactivations étaient possibles lors de la tumorigenèse. Récemment, la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) a été montrée comme étant capable d'induire un échappement aux mécanismes de sénescence. Cet événement, normalement impliqué dans le développement embryonnaire, avait d'ores et déjà été associé à l'apparition de métastases dans les cancers. Aujourd'hui, l'équipe de Puisieux lui a attribué un rôle dans la tumorigenèse précoce. Twist1 et Twist2, deux protéines impliquées dans le développement embryonnaire et dans l'EMT, sont fortement exprimées dans certains cancers. Ces deux protéines sont responsables de l'induction de l'EMT et de l'inhibition de l'expression de p21Waf1 et p16Ink4a au cours de la transformation induite par Ras (Ansieau *et al.*, 2008).

Dans un deuxième temps, nous avons montré que l'échappement à l'POIS était corrélé à l'apparition d'un phénotype de cellules mésenchymateuses et à une dédifférenciation. La collaboration avec l'équipe du Docteur Philippe Juin nous a permis d'observer que cet échappement était également corrélé à une dépendance aux voies de survies induites par les protéines anti-apoptotiques Bcl-Xl et Mcl1.

Une hypothèse permettant d'expliquer l'échappement des cellules à l'arrêt du cycle cellulaire peut se baser sur l'hétérogénéité de la réponse cellulaire. Nous avons observé que les cellules qui échappaient à la sénescence surexprimaient toujours H-Ras mais dans une moindre mesure qu'après 48 h d'induction. Cette observation conduit à nuancer l'homogénéité de la réponse des cellules. En effet, on pourrait imaginer que la totalité des cellules répondent au stress oncogénique par l'induction d'une sénescence incomplète due à l'absence de p16Ink4a, puis qu'après une période de crise, elles échappent et recommencent à proliférer. Une alternative plus raisonnable à cette hypothèse pourrait expliquer l'échappement. Au cours de la sélection des cellules HT29 transfectées par le système d'induction de H-RasV12, nous n'avons pas sélectionné une population clonale mais gardé l'ensemble des cellules transfectées. Nous avons préféré travailler sur une population

hétérogène, sans doute plus proche de ce qui est observé dans la réalité d'une tumeur. De plus, l'étude d'une population hétérogène nous a permis de nous affranchir des risques de voir s'intégrer le gène d'intérêt dans une séquence du génome codant pour des protéines impliquées dans les processus que nous souhaitons observer. Ce choix peut, toutefois, être discuté si on considère que les cellules ayant échappé à la sénescence pourraient être celles dont l'insertion du gène de H-RasV12 dans le génome présentaient un avantage sélectif. Le fait que nous ayons observé une expression moins importante de H-Ras dans les cellules RasL par rapport à une induction de 48 h de Ras, amène à penser que certaines cellules auraient intégré une quantité du vecteur de H-RasV12 incompatible avec la survie après induction. En revanche, les cellules ayant intégré une moins grande quantité de ce vecteur auraient pu survivre à cette expression moins importante de H-RasV12.

#### A. L'EMT nécessiterait la perte de p21Waf1

p21Waf1 est responsable de l'expression de l'E-cadhérine permettant l'adhésion cellulaire (Mueller *et al.*, 2000). Cette expression contribue à l'inhibition de l'apoptose due à la perte d'adhésion. Plus récemment, il a été montré que p21Waf1 empêchait la formation de mammosphères par les cellules du sein ainsi que l'apparition de cellules souches (Liu *et al.*, 2009).

p21Waf1 contribuerait alors à l'inhibition de l'EMT pour empêcher le développement tumoral. La perte de p21Waf1 serait nécessaire à la mise en place de l'EMT. Dans notre modèle, l'induction de p21Waf1 est possible grâce aux cassures de l'ADN provoquées par le stress oncogénique. Malgré le maintien de l'activation de Ras et de l'expression des cassures dans les cellules RasL, p21Waf1 n'est plus exprimée. Plusieurs hypothèses peuvent alors expliquer la perte de son expression. Tout d'abord, nous pouvons penser que l'activité ou l'expression du facteur responsable de la transcription de p21Waf1 lors de la réponse précoce à Ras est inhibée par un répresseur. Par exemple, Oct4 a récemment été montrée comme ayant un rôle important dans la répression du gène de p21Waf1 dans les cellules souches, permettant ainsi le maintien du phénotype de cellules souches (Lee *et al.*, 2010). Nous avons testé l'expression de l'ARNm de Oct4 (résultats non-présentés) dans les cellules RasL mais nous n'avons pas décelé de variation d'expression de son gène. Toutefois, la protéine Oct4 pourrait être dégradée au cours de la réponse au stress oncogénique, puis à nouveau stabilisée dans les cellules ayant échappé à la sénescence. Une

étude plus approfondie de l'expression de la protéine pourrait être intéressante dans notre modèle. La perte d'expression de p21Waf1 pourrait également être expliquée par l'expression de miARN dirigés contre son ARNm. En effet, il a récemment été montré qu'au moins 28 miARN ciblent l'ARNm de p21Waf1 (Wu *et al.*, 2010). La majorité de ces miARN sont surexprimés dans différents types de cancers et pourraient être impliqués dans l'oncogenèse.

## **B. Ras induit l'EMT**

L'implication de l'EMT dans notre modèle peut avoir deux rôles ; un rôle de transformation et d'échappement à la sénescence ; ou bien un rôle dans le pouvoir invasif des cellules. Nous avons observé le pouvoir de migration des cellules après seulement 48 h d'expression de H-RasV12. Pourtant, dans ces mêmes cellules, l'expression des marqueurs de l'EMT ne témoignait pas d'une transition vers un phénotype mésenchymateux. L'apparition précoce du phénomène d'invasion semble indiquer que les cellules commencent à mettre en place une EMT alors que la réponse au stress oncogénique n'a pas encore aboutie. À seulement 48 h d'expression de Ras, les cellules ont déjà acquis des capacités invasives. Ceci pourrait notamment s'expliquer par l'importante perte d'expression de la Villin1 qui est une protéine d'adhésion. Toutefois, ce processus d'invasion ne serait pas suffisant pour induire l'échappement à la sénescence.

Au cours de notre étude, nous avons observé que l'arrêt de l'expression de Ras dans les cellules RasL ne les empêchait pas de proliférer. Nous n'avons pas mesuré l'index d'addiction à l'oncogène des cellules à la suite de l'arrêt de l'expression de Ras. Toutefois nous n'avons pas observé d'arrêt de la prolifération. Les observations que nous avons pu faire nous ont donc permis de supposer que les cellules RasL n'étaient pas dépendantes à l'oncogène Ras. De plus, l'extinction de K-Ras par siRNA dans différentes lignées de cancer du poumon et du pancréas a permis de mettre en évidence que les cellules tumorales indépendantes de l'expression de Ras exprimaient des marqueurs de l'EMT et avaient perdu l'expression de certaines protéines impliquées dans l'apoptose (Singh *et al.*, 2009). Cette étude corrobore l'observation que nous avons faite. Une autre observation intéressante a été faite dans cette publication. Les cellules qui se sont montrées dépendantes de l'expression de K-Ras présentaient un phénotype de cellules épithéliales bien différenciées. Cette observation conduit à penser que l'oncogène Ras serait indispensable au cours du stade précoce du processus de tumorigenèse des cellules n'ayant pas encore subi une EMT. À la

suite de l'EMT, en revanche, les cellules auraient inhibé l'expression des protéines impliquées dans l'apoptose et ne seraient donc plus dépendantes de l'expression de Ras. Ras serait alors indispensable au processus précoce de transformation et l'expression des marqueurs de l'EMT coïnciderait avec l'avancement des cellules dans un processus irréversible, engagé dans la tumorigenèse. Cette hypothèse s'accorde avec l'idée que l'EMT serait impliquée de manière avancée dans la réponse à l'oncogène Ras pour permettre l'échappement des cellules à la sénescence.

Lors de l'induction de la sénescence, il a été montré que les cellules sécrétaient de nombreux facteurs pouvant encourager la transformation des cellules paracrines non-sénescents présentant déjà un terrain favorable à la prolifération. Ce phénomène est appelé SASP (*Senescence-Associated Secretory Phenotype*) (Young & Narita, 2009). L'IL-6 et l'IL-8 sont deux cytokines que nous avons retrouvées dans les surnageants de culture des cellules exprimant Ras lors d'expériences préliminaires. Toutes deux sont impliquées dans l'induction de l'EMT et en particulier lors d'une expression oncogénique de Ras ajoutée à la perte de p53 (Coppe *et al.*, 2008). Nous pouvons alors faire l'hypothèse que, dans notre modèle, les cellules sénescents exprimeraient ces facteurs et permettraient aux cellules non-sénescents qui expriment Ras d'induire une EMT pour poursuivre leur tumorigenèse. Les cellules qui entreraient en sénescence avant les autres seraient alors celles dont les cassures de l'ADN seraient les plus importantes.

### C. Implication de la voie Notch3/Jag1 dans l'EMT

Nous avons observé le clivage de Notch3 ainsi que l'augmentation de l'expression de Jag1 dans la phase précoce de réponse à Ras. La voie de Notch est impliquée dans le développement embryonnaire et dans l'induction de l'EMT via le facteur de transcription Snail (Saad *et al.*, 2010). Nous avons émis l'hypothèse que la voie Jag1/Notch3 pourrait avoir un rôle dans l'échappement des cellules à la sénescence. Pour être activées et clivées, les protéines de la famille de Notch doivent être liées à leur ligand. Ces ligands étant eux-mêmes des protéines transmembranaires, l'activation du clivage de Notch dans une cellule doit se faire de manière paracrine. Lors de la différenciation cellulaire qui a lieu au cours du développement, les cellules qui expriment plus de Notch vont recevoir le signal d'activation qui va engendrer une augmentation de l'expression de Notch alors que les cellules voisines qui expriment le ligand ne vont pas recevoir ce signal et vont continuer d'exprimer le ligand

à leur surface, mais pas Notch. Ceci suggère qu'un signal hétérogène existe entre les cellules et confirmerait l'hypothèse selon laquelle certaines cellules induisent la sénescence permettant aux autres d'échapper. Il a récemment été montré que Notch était responsable de l'inhibition de l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27 dans les cellules initiatrices du cancer du colon, empêchant ainsi l'induction de l'apoptose dans ces cellules (Sikandar *et al.*, 2010).

L'activation de Notch3 dans les cellules exprimant ce récepteur pourrait conduire à la transition épithélio-mésenchymateuse pour permettre l'échappement à la sénescence. La réponse hétérogène des cellules à l'induction de l'oncogène Ras serait alors expliquée par le fait que seules certaines cellules expriment et/ou activent le clivage de Notch3. De plus, un faible nombre de cellules échappent à l'OIS. La majorité active la sénescence et inhibe le cycle cellulaire. Les quelques cellules capables de recommencer – ou de poursuivre – leur progression dans le cycle cellulaire pourraient être celles présentant, à la fois, l'expression de Notch3 et pouvant être activées par la proximité de cellules exprimant le ligand Jag1.

La voie de Notch joue également un rôle dans la régulation de l'apoptose et est responsable de son inhibition dans certains cancers (Grottkau *et al.*, 2009 ; Meurette *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2010a ; Wang *et al.*, 2010b). Son activation pourrait alors également expliquer l'implication des protéines anti-apoptotiques Bcl-Xl et Mcl1 dans l'inhibition de l'apoptose.

#### **D. L'EMT permet l'échappement à l'OIS**

Les cellules ayant échappé à la sénescence induite par Ras ont recommencé à proliférer malgré les cassures de leur ADN. Les dommages de l'ADN associées au maintien de la prolifération cellulaire conduisent à l'apparition d'une instabilité génomique pouvant permettre à la cellule d'échapper aux mécanismes de sénescence. Nous avons observé que, dans les sphéroïdes formés à partir de cellules RasL, certaines cellules se détachent du sphéroïde pour former des amas distincts. Ces cellules ont également acquis un caractère invasif important en chambre de Boyden. Nous avons été surpris de constater qu'une induction courte de Ras permettait également la migration en chambre de Boyden. Pourtant, à 48 h d'expression de Ras, les cellules ont déjà commencé à activer la mise en place de la sénescence, p21Waf1 est exprimée, l'expression de Cdc25A et de Plk1 est inhibée et les cellules ont arrêté de proliférer. Toutefois, la voie des MAP Kinases est activée. Il est

raisonnable de penser que deux types de voies soient activées dans les cellules à ce moment du processus de réponse à Ras. L'oncogène induirait l'activation de voies d'invasion et de prolifération. La suractivation des voies de prolifération est détectée comme un stress important pour la cellule et elle y répond par la mise en place de la sénescence. Les mécanismes d'invasion sont mis en place très tôt, avant l'expression des marqueurs traduisant l'EMT. La transition vers un phénotype de cellule mésenchymateuse semble alors être un événement différent de l'apparition du caractère invasif des cellules et cette observation permet de proposer l'hypothèse selon laquelle l'EMT aurait, dans notre modèle, un rôle dans l'échappement à l'OIS avant d'être impliquée dans l'invasion tissulaire et l'apparition des métastases.

**TRAVAUX SUPPLÉMENTAIRES : LES THÉRAPIES  
ANTI-TUMORALES, RÉPONSES ET ÉCHAPPEMENT**

## Chapitre I : Introduction

Nous avons vu que les cellules ayant échappé à l'OIS induite par Ras avaient subi une EMT, étaient devenues dépendantes de la mise en place des voies de survie impliquant Bcl-Xl et Mcl1, et que certaines d'entre elles présentaient des caractères de cellules souches. Il est décrit que les cellules souches cancéreuses sont plus résistantes aux traitements anticancéreux (Ahmed *et al.*, 2010 ; Gangemi *et al.*, 2009).

Au cours de mon travail de thèse j'ai participé à l'étude de l'implication du facteur STAT3 dans la réponse aux traitements génotoxiques induits par le sn38. Cette étude a été menée par deux autres étudiantes en thèses, Hélène Sellier et Sandy Courapied. Cette troisième partie résume les résultats obtenus lors de ce travail.

L'irinotecan est une chimiothérapie largement utilisée dans le traitement des tumeurs colorectales. C'est un anticancéreux dérivé de la camptothécine et métabolisé dans le foie. Son métabolite actif, le sn38 agit en inhibant les topoisomérases I et conduit à l'effondrement des fourches de réplication et l'apparition de cassures de l'ADN. Malheureusement, certaines tumeurs résistent à ce traitement, et parfois de manière intrinsèque. Les connaissances apportées dans les mécanismes de résistance des cellules tumorales aux traitements anticancéreux permettraient de mieux cibler ces traitements et permettraient d'orienter le développement de nouvelles molécules visant à inhiber ces mécanismes.

## Chapitre II : Cdk5 phosphoryle STAT3 sur sa sérine 727 pour activer les mécanismes de réparation de l'ADN

L'activation constitutive de STAT3 dans les cancers colorectaux ainsi que dans de nombreuses lignées cellulaires est bien documentée. Des travaux précédemment effectués dans le laboratoire ont montré que la voie EGFR-Src-STAT3 pouvait inhiber l'induction de la sénescence et activer les voies de réparation des dommages de l'ADN pour conduire à la résistance aux traitements (Vigneron *et al.*, 2008 ; Vigneron *et al.*, 2005). L'activation de la phosphorylation de la sérine 727 de STAT3 est mal connue et nous avons décidé d'étudier cet événement à la suite de dommage de l'ADN induit par un traitement utilisé en chimiothérapie, l'irinotecan.

Pour cette étude nous avons utilisé les cellules HT29 mutées sur le gène de p53. Nous les avons traitées avec le métabolite actif de l'irinotecan, le sn38, puis dans un premier temps nous avons observé que, suite aux dommages de l'ADN provoqués par l'inhibiteur des topoisomérases I, STAT3 était phosphorylé sur la sérine 727 mais pas sur la tyrosine 705. Nous avons alors voulu déterminer quelle était la kinase responsable de la phosphorylation de STAT3. Au cours de notre étude, nous avons constaté que la kinase Cdk5 était surexprimée suite à d'un traitement au sn38 mais que la transcription de son ARN n'était pas induite. La kinase Cdk5 est principalement exprimée dans les neurones, mais elle a récemment été montré comme étant impliquée dans la réponse aux dommages de l'ADN (Dhavan & Tsai, 2001) et dans l'induction de la sénescence (Alexander *et al.*, 2004 ; Tian *et al.*, 2009 ; Yang & Hinds, 2003).

La kinase Cdk5 est activée à la suite de la fixation à ses co-activateurs p35/p25 (Dhavan & Tsai, 2001). Nous avons alors étudié la liaison de Cdk5 à p35 par CoImmunoPrécipitation (CoIP) et nous avons constaté qu'après un traitement au sn38 Cdk5 et p35 formaient un complexe. L'activité kinase de Cdk5 est possible après sa phosphorylation sur sa tyrosine 15. Nous avons observé cette phosphorylation à la suite de 48 h de traitement au sn38. Nous avons voulu savoir si cette kinase pouvait être responsable de l'activation de STAT3 dans notre modèle. Le traitement des cellules HT29 avec du sn38 après extinction de Cdk5 par siRNA puis nous a permis d'observer que Cdk5 était nécessaire

à la phosphorylation de STAT3, et la CoIP de Cdk5 avec STAT (S727) a confirmé l'implication de Cdk5 dans l'activation de STAT3.

Par la suite, nous avons souhaité connaître le rôle de cette forme de STAT3 dans les cellules HT29. Pour cela nous avons effectué des CHIP de STAT3 sur les promoteurs de gènes du cycle cellulaire, tels que Myc et la cycline D, et nous avons observé sa fixation et la régulation négative de ces gènes.

Finalement, une analyse par FACS du marquage de  $\gamma$ H2Ax nous a permis d'observer que des siRNA dirigés contre Cdk5 ou STAT3 conduisait à une augmentation des cassures de l'ADN suite au traitement au sn38. Des CHIP des différentes formes de STAT3 nous ont permis d'observer la présence de sa forme STAT3 phosphorylée sur la sérine 727 – mais pas sur la tyrosine 705 – sur le promoteur de Eme1 et la perte de fixation de cette même forme sur le promoteur de Myc et de la cycline D.

En résumé, ce travail a montré que suite à un traitement génotoxique induit par un inhibiteur de topoisomérase I, la kinase Cdk5 était activée et phosphorylait, à son tour, le facteur STAT3. STAT3 S727 active alors le promoteur du gène de réparation de l'ADN, Eme1, et quitte les promoteurs des gènes du cycle cellulaire tel que Myc et la cycline D pour empêcher leur expression.

# The cdk5 Kinase Regulates the STAT3 Transcription Factor to Prevent DNA Damage upon Topoisomerase I Inhibition\*

Received for publication, December 7, 2009, and in revised form, May 10, 2010. Published, JBC Papers in Press, June 1, 2010, DOI 10.1074/jbc.M109.092304

Sandy Courapied<sup>1</sup>, Hélène Sellier<sup>1</sup>, Sophie de Carné Trécesson, Arnaud Vigneron, Anne-Charlotte Bernard, Erick Gamelin, Benjamin Barré, and Olivier Coqueret<sup>2</sup>

From the Paul Papin Cancer Center, INSERM U892, 2 rue Moll, 49933 Angers, France

The STAT3 transcription factors are cytoplasmic proteins that induce gene activation in response to growth factor stimulation. Following tyrosine phosphorylation, STAT3 proteins dimerize, translocate to the nucleus, and activate specific target genes involved in cell-cycle progression. Despite its importance in cancer cells, the molecular mechanisms by which this protein is regulated in response to DNA damage remain to be characterized. In this study, we show that STAT3 is activated in response to topoisomerase I inhibition. Following treatment, STAT3 is phosphorylated on its C-terminal serine 727 residue but not on its tyrosine 705 site. We also show that topoisomerase I inhibition induced the up-regulation of the cdk5 kinase, a protein initially described in neuronal stress responses. In co-immunoprecipitations, cdk5 was found to associate with STAT3, and pull-down experiments indicated that it associates with the C-terminal activation domain of STAT3 upon DNA damage. Importantly, the cdk5-STAT3 pathway reduced DNA damage in response to topoisomerase I inhibition through the up-regulation of Eme1, an endonuclease involved in DNA repair. ChIP experiments indicated that STAT3 can be found associated with the Eme1 promoter when phosphorylated only on its serine 727 residue and not on tyrosine 705. We therefore propose that the cdk5-STAT3 oncogenic pathway plays an important role in the expression of DNA repair genes and that these proteins could be used as predictive markers of tumors that will fail to respond to chemotherapy.

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)<sup>3</sup> proteins are cytoplasmic transcription factors that translocate into the nucleus following growth factor stimulation. In contrast to normal cells where its phosphorylation is only transient, constitutive activation of STAT3 has been reported in several primary cancers and tumor cell lines (1–3). This abnormal activation is due to oncogenic kinases such as epidermal growth

factor receptor, Her2/Neu, src, or bcr-abl, which induce STAT3 activation through phosphorylation of its tyrosine 705 residue (4). This phosphorylation allows the nuclear translocation and DNA binding of the STAT3 dimer and the up-regulation of several genes involved in cell-cycle and cell survival such as *cyclin D1*, *Myc*, or *bclxl*. The up-regulation of these cancer genes mediates the oncogenic activity of STAT3 and its ability to transform cells (5).

A second phosphorylation occurs on the serine 727 residue of the C-terminal activation domain. It has been proposed that this phosphorylation is necessary for maximal gene activation, because its mutation prevents STAT3 transcriptional function (6). It is believed that this modification favors the recruitment of transcriptional cofactors such as CBP, NcoA, or P-Tefb that binds to the C-terminal domain of the transcription factor (7–10). However, it remains to be determined if the association of STAT3 with its coactivators is a direct consequence of Ser-727 phosphorylation.

Although it was initially believed that the tyrosine phosphorylation is essential for STAT3 activity, several groups have recently reported that specific forms of the transcription factor, which are only phosphorylated on its Ser-727 residue, can induce gene activation. In prostate cancer, Ser-727 phosphorylation is sufficient to activate STAT3 and drive tumorigenesis in the absence of tyrosine 705 activation (11). Elegant results have shown that tyrosine 705 mutants can associate with NF- $\kappa$ B and induce the expression of genes such as *mdm2* or *met*, which are likely to play an important role in cell transformation by STAT3 (12–14). These results lead to the important conclusion that the influence of STAT3 on cell transformation can be independent of the tyrosine 705 phosphorylation and that this site should not be considered as a unique marker of STAT3 oncogenic activity.

This conclusion also leads to the hypothesis that STAT3 can induce different transcriptional programs, depending on which sites are phosphorylated and certainly on the type of stimulation. Although STAT3 activation is well characterized in response to growth factor stimulation, little is known about its regulation in response to other stimulation such as DNA damage and chemotherapy treatment. Interestingly, several studies have suggested that an abnormal activation of this transcription factor is associated with intrinsic drug resistance (15). STAT3 expression has been associated with resistance to radiation-induced apoptosis (16–18), and it can also confer resistance to Fas or paclitaxel-mediated apoptosis in multiple myeloma and ovarian cancer (19, 20). Most of the time, escape to drug treatment is related to the STAT3-mediated expression of survival

\* This work was supported by fellowships (to S. C. and A. V.), by a grant (Equipe Labelis ee) from the Ligue Contre le Cancer and Institut du Cancer, and a fellowship from Inserm-Pays de Loire (to S. C. T.), and by the Ministère de la Recherche (to H. S.).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed: Centre R egional de Lutte Contre le Cancer Paul Papin, INSERM U892 2 rue Moll, 49033 Angers, France. Tel.: 33-2-41-35-29-14; E-mail: olivier.coqueret@univ-angers.fr.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: STAT3, signal transducers and activators of transcription 3; ChIP, chromatin immunoprecipitation; CBP, CREB-binding protein; cdk, cyclin-dependent kinase; siRNA, small interference RNA; PBS, phosphate-buffered saline; RT, reverse transcription; IL-6, interleukin-6; FACS, fluorescent-activated cell sorting.

## The *cdk5*-STAT3-*Eme1* Pathway Prevents DNA Damage

proteins such as bcl-xl or survivin (21, 22). In addition, we have recently shown that the epidermal growth factor receptor-src-STAT3 pathway can prevent senescence induction (23) and activate DNA repair genes (24) to confer resistance to chemotherapy treatments.

In this study, we have further characterized the regulation of STAT3 during DNA damage. In colorectal cell lines, we have found that the transcription factor is phosphorylated on its serine 727 residue following topoisomerase I inhibition and that tyrosine 705 phosphorylation is not modified. In addition, we have also observed that this phosphorylation is due to the binding of the *cdk5* kinase to the transcription factor. *cdk5* is a serine/threonine kinase, which was initially characterized in postmitotic neurons. Once associated with its specific activators p35/p25, this protein plays an important role in neuronal survival, neurite outgrowth, and cytoskeletal functions (25–27). In response to topoisomerase I inhibition, we have observed that *cdk5* is activated and that it interacts with STAT3 to induce its serine phosphorylation. *Cdk5* appeared to be involved in the STAT3-mediated regulation of the *cyclin D1*, *myc*, and *Eme1* genes. Importantly, ChIP analysis showed that the transcription factor can be found associated with the *Eme1* promoter when phosphorylated only on serine 727. We therefore propose that *cdk5* regulates the STAT3-*Eme1* pathway and that this is an important step in the response of colorectal tumors to topoisomerase I inhibition.

### MATERIALS AND METHODS

**Cell Lines**—The human colorectal cell lines HT29 (HTB-38) and HCT116 (CCL-247) (ATCC, Manassas, VA) were cultured in RPMI 1640 medium (Lonza, Walkersville, MD). Cell lines were supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories GmbH, Austria).

**Materials**—sn38 came from Pfizer (New York, NY). Polyclonal anti-STAT3 (C20), anti-phospho-STAT3-Ser-727 (ser727-R), anti-*cdk5* (C8), anti-*cdk5* Y15, anti-Erk2 (C14), anti-phospho-Erk1/2 (E4), anti-p35 (C19), anti-lamin A/C (346), anti- $\beta$ -tubulin (H-235), and hsc70 (B-6) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The anti-H2Ax Alexa fluor was obtained from BD Biosciences, and the anti-phospho-STAT3-Tyr 705 was from Cell Signaling. The *cdk5* and STAT3 siRNAs have been obtained from Dharmacon Inc. (Lafayette, CO) and transfected using the Dharmafect 4 (Dharmacon) method. Three different siRNAs were used for each transfection.

**Cell Treatment**—Cells grown in 3% FBS medium were immediately treated with sn38 (5 ng/ml) for 48 h. Note that this treatment should be done before complete cell adhesion so that every cell can incorporate the drug before entering the next S phase. For siRNA experiment, cells were transfected with the appropriate siRNA using the Dharmafect 4 method and grown up for 48 h in 6-well plates. In 3% FBS medium, cells were then divided into two wells and again immediately treated with sn38 (5 ng/ml) for 48 h.

**Immunoprecipitation and Western Blot Analysis**—After two washings with cold PBS, cells were lysed in 100  $\mu$ l (Western blot) or 1 ml (immunoprecipitation) using ice-cold lysis buffer (25 mM HEPES, pH 7.9, 300 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 10% gly-

erol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2  $\mu$ g/ml leupeptin, 5  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml pepstatin A, 0.5 M NaF, 100 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ). After a 30-min incubation at 4 °C, total extracts were clarified by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min.

Immunoprecipitations were performed overnight at 4 °C with whole cell extracts (2–4 mg) in the presence of 0.1 or 1% Nonidet P-40 (CA-630, Sigma). Cell extracts were precleared with 75  $\mu$ l of protein G-agarose (Sigma-Aldrich, 50% slurry in phosphate-buffered saline) for 2 h at 4 °C, and cleared extracts were immunoprecipitated with 4  $\mu$ g of the indicated antibodies overnight at 4 °C followed by the addition of 50  $\mu$ l of protein G-agarose for 1 h at 4 °C. Immunoprecipitated proteins were washed two times in lysis buffer and one time with 10 mM Tris, pH 8, 100 mM EDTA, prior to the addition of sample buffer. Following electrotransfer, membranes (Millipore Corp., Billerica, MA) were blocked for 45 min at room temperature in Tris-buffered saline buffer, 5% bovine serum albumin, 0.05% Tween. Membranes were then incubated overnight with the indicated antibodies diluted in Tris-buffered saline buffer, 1% bovine serum albumin, 0.05% Tween at 4 °C. After three washings, blots were incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 45 min. Proteins were detected using an enhanced chemiluminescence system (ECL, Bio-Rad).

**Quantitative PCR**—RNA was extracted using the TRIzol method (Invitrogen), and complementary DNA was synthesized from 2  $\mu$ g of RNA by random hexamer priming using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI). For cDNA quantification, PCR was performed with 4  $\mu$ l of 20 $\times$  diluted cDNA, 5  $\mu$ l of Qiamix (Qiagen), and 1  $\mu$ l of 5  $\mu$ M primers. Accumulation of fluorescent products was monitored on the ABI PRISM 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA). 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 RPLPO. RT-PCR primers were as follows: RPLPO (5'-AACCCAGC-TCTGGAGAAACT-3' and 5'-CCCCTGGAGATTTTAGTGGT-3'), CD1 (5'-CAGTAACGTCACACGGACTAC-3' and 5'-ACAGGAGCTGGTGTTCAT-3'), *cdk5* (5'-AGCGACA-AGAAGCTGACTTT-3' and 5'-AGAATCCCAGCCCTTTT-AGT-3'), and *Eme1* (5'-AACGCTTCAGGGCTTTGTAA-3' and 5'-GCTCCCTGTTTCCCTCTTCT-3').

**ChIP**—Attached cells were washed twice with cold PBS, cross-linked with 1% formaldehyde at room temperature for 10 min, and then washed twice with 10 ml of cold PBS. Cells were lysed with 500  $\mu$ l of lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2  $\mu$ g/ml leupeptin, 5  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml pepstatin A, 0.5 M NaF, 100 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), and extracts were sonicated six times for 15 s each. Supernatants were recovered by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min at 4 °C, diluted one time in dilution buffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2  $\mu$ g/ml leupeptin, 5  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml pepstatin A, 0.5 M NaF, 100 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), and subjected to one round of immunoclearing for 2 h at 4 °C using protein-G-agarose coated with salmon sperm DNA (Millipore). Immunoprecipitations were

**The *cdk5*-STAT3-Eme1 Pathway Prevents DNA Damage**

performed overnight with specific antibodies, then 20  $\mu$ l of protein G-agarose-coated beads with salmon sperm DNA (50%) was added for 1 h at 4 °C. Beads were then washed for 10 min in TSE1 (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, and 150 mmol/L NaCl), TSE2 (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, and 500 mmol/L NaCl), and TSE3 (0.25 M LiCl, 1% Nonidet P-40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, and 10 mM Tris-HCl, pH 8.1). Beads were washed once with TE buffer (10 mM Tris, pH 8, 100 mM EDTA) and eluted with 500  $\mu$ l of elution buffer (1% SDS and 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>) for 1 h. Eluates were heated at 65 °C overnight, and DNA was precipitated using classic procedures. For PCR, 5  $\mu$ l from a 100- $\mu$ l DNA preparation was used for 25–30 amplification cycles. The following primers were used: region -34/+89, 5'-CCGGGCTTTGATCTTTGCT-3' and 5'-GACTCTGCTGCTCGCTGCTA-3' of the cyclin D1 promoter; region -2760/-2486, 5'-TTGTGCCACTGCTGACTTTGTC-3' and 5'-AGCTGAAGAAGGAGGATGTGAGG-3' of the p21 promoter. Myc and Eme1 primers have been described before (24, 28).

**Flow Cytometry**—For DNA content analysis,  $1.5 \times 10^6$  cells were washed twice with PBS and fixed in 70% ethanol. Cells were treated with 100 units/ml RNase A for 20 min at 37 °C, then diluted in PBS/propidium iodide (50  $\mu$ g/ml), and immediately analyzed by flow cytometry (BD Biosciences). For phospho-H2Ax analysis,  $1 \times 10^6$  cells were recovered by centrifugation with their supernatant at 1500 rpm for 5 min at room temperature. Cells were fixed with 2% paraformaldehyde at room temperature for 10 min. Cells were then washed twice with PBS and centrifuged at 1500 rpm for 5 min at 4 °C. Cells were incubated with a PBS-2% bovine serum albumin-0.2% Triton solution for 2 min. The primary antibody was diluted at 1/50, and 4',6-diamidino-2-phenylindole (5  $\mu$ g/ml) was diluted 500 times. Cells were incubated for 1 h at room temperature and then analyzed by flow cytometry.

**Colony Formation Assay**—For colony formation assays, 1000 cells were plated per well in 6-well plates, treated with sn38 the next day and allowed to form colonies. After 10–14 days cells were washed twice with PBS and treated with crystal violet for 10 min at room temperature, and then washed five times with water. The percentage of colony-forming cells was calculated as compared with non-treated cells.

**Pulldown Assay**—Bacteria were grown up in 5 ml of LB medium overnight. 200 ml of ampicillin-LB was inoculated with 2 ml of the overnight culture and grown up until optical density reached 0.6–0.8. Isopropyl 1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside was then added at 1 mM for 2 h, bacteria were recovered by centrifugation at 4000 rpm for 20 min at 4 °C, resuspended in 8 ml of lysis buffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mg/ml lysozyme), incubated on ice for 30 min and sonicated 6–8 times for 20 s. Triton X-100 was added to the final concentration of 1% and incubated on ice for 15 min. Extracts were recovered by centrifugation at 4000 rpm for 15 min at 4 °C, and supernatants were transferred to a 15-ml conical tube. 250  $\mu$ l of beads (nickel-nitrilotriacetic acid-agarose, Qiagen) was added for every 200 ml of initial culture, and extracts were incubated for 1 h at 4 °C. Beads were then washed three times with washing buffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1 mM

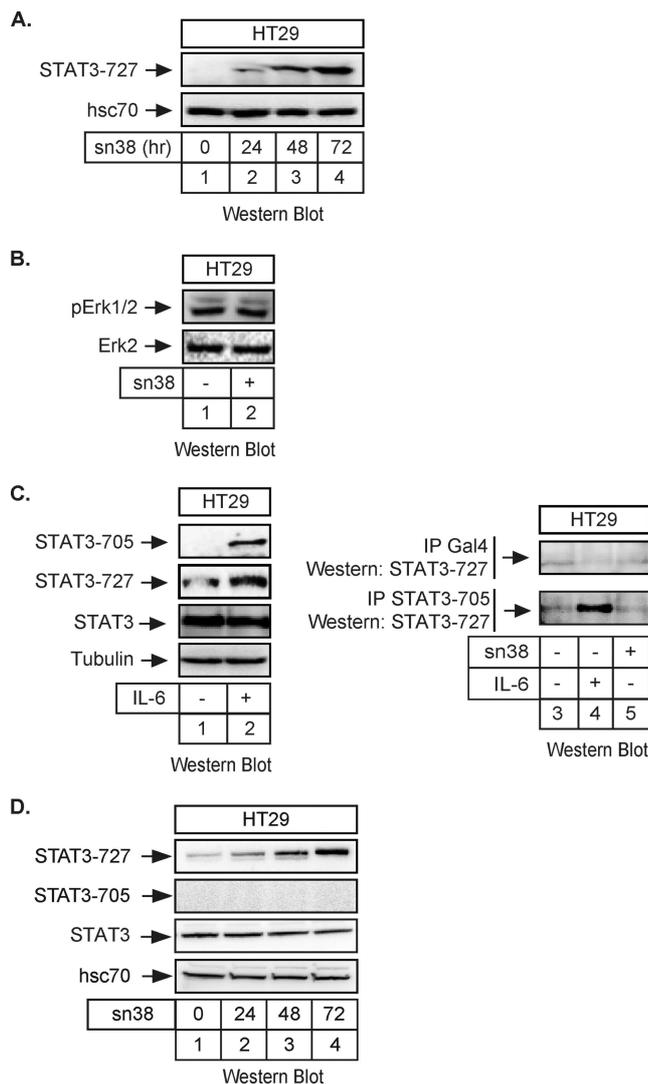
phenylmethylsulfonyl fluoride). Beads (400 ng of fusion protein) were then incubated for 20 min at 4 °C with cell extracts (300  $\mu$ g) and washed three times with lysis buffer (25 mM HEPES, pH 7.9, 300 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2  $\mu$ g/ml leupeptin, 5  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml pepstatin A, 0.5 M NaF, 100 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) prior to the addition of sample buffer and Western blot analysis.

**Kinase Assay**—His- $\Delta$ 1-716 STAT3 proteins were produced as described above and eluted from the beads. In parallel, *cdk5* was immunoprecipitated from sn38-treated cells (total extracts, 100  $\mu$ g), and 15  $\mu$ l of beads was incubated with 1  $\mu$ g of His- $\Delta$ 1-716 STAT3 at room temperature for 10 min with 10  $\mu$ M cold ATP. The reaction was stopped by the addition of 50  $\mu$ l of sample buffer. Samples were analyzed by Western blot as described above using a polyclonal antibody directed against the serine-phosphorylated form of STAT3.

**RESULTS**

**STAT3 Is Phosphorylated on Its Serine 727 Residue following Topoisomerase I Inhibition**—To determine if the STAT3 transcription factor is involved in the response to DNA damage, growing HT29 colorectal cells were treated with sn38, the active metabolite of irinotecan. Using Western blot analysis, we observed that topoisomerase I inhibition induced the phosphorylation of STAT3 on its serine 727 C-terminal residue (Fig. 1A, lanes 3 and 4). As a control, topoisomerase I inhibition did not affect the expression or phosphorylation of the Erk1/2 kinases (Fig. 1B, lanes 1 and 2). Because p53 is mutated in the HT29 cell line, this effect does not appear to rely on the tumor suppressor gene. Under these conditions, we were not able to detect a significant activation of the tyrosine 705 phosphorylation site, whereas this site was normally phosphorylated upon IL-6 stimulation. When HT29 cells were serum-starved for 2 days and then stimulated with this cytokine for 30 min, a significant activation of the two phosphorylation sites was detected as expected (Fig. 1C, lanes 1 and 2). In addition, when the transcription factor was immunoprecipitated using antibodies directed against its tyrosine 705-phosphorylated form, we observed that STAT3 was phosphorylated on its two sites following IL-6 stimulation. However, we were not able to detect any tyrosine phosphorylation following topoisomerase I inhibition (Fig. 1C, compare lanes 4 and 5). Using Western blot analysis, we observed that this phosphorylation remained non-detectable during the 3 days of treatment, whereas the serine 727 phosphorylation was easily detected and declined at 96 h (Fig. 1D, lanes 1–4 and data not shown). Note, however, that we were able to detect a weak constitutive phosphorylation of the tyrosine 705 site when 600  $\mu$ g of total extract was used. By contrast, 50–60  $\mu$ g of proteins were used in this study to detect all protein expression and STAT3 serine 727 phosphorylation. Therefore, in our experimental model, the tyrosine-phosphorylated forms of STAT3 are not highly expressed as compared with the ones presenting a phosphorylation on the serine 727 residue.

The activation of STAT3 was surprising, because its phosphorylation theoretically occurs in the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle and in response to growth factor stimulation. Under the conditions used in this study, clonogenic assays indicated that sn38

The *cdk5*-STAT3-Eme1 Pathway Prevents DNA Damage

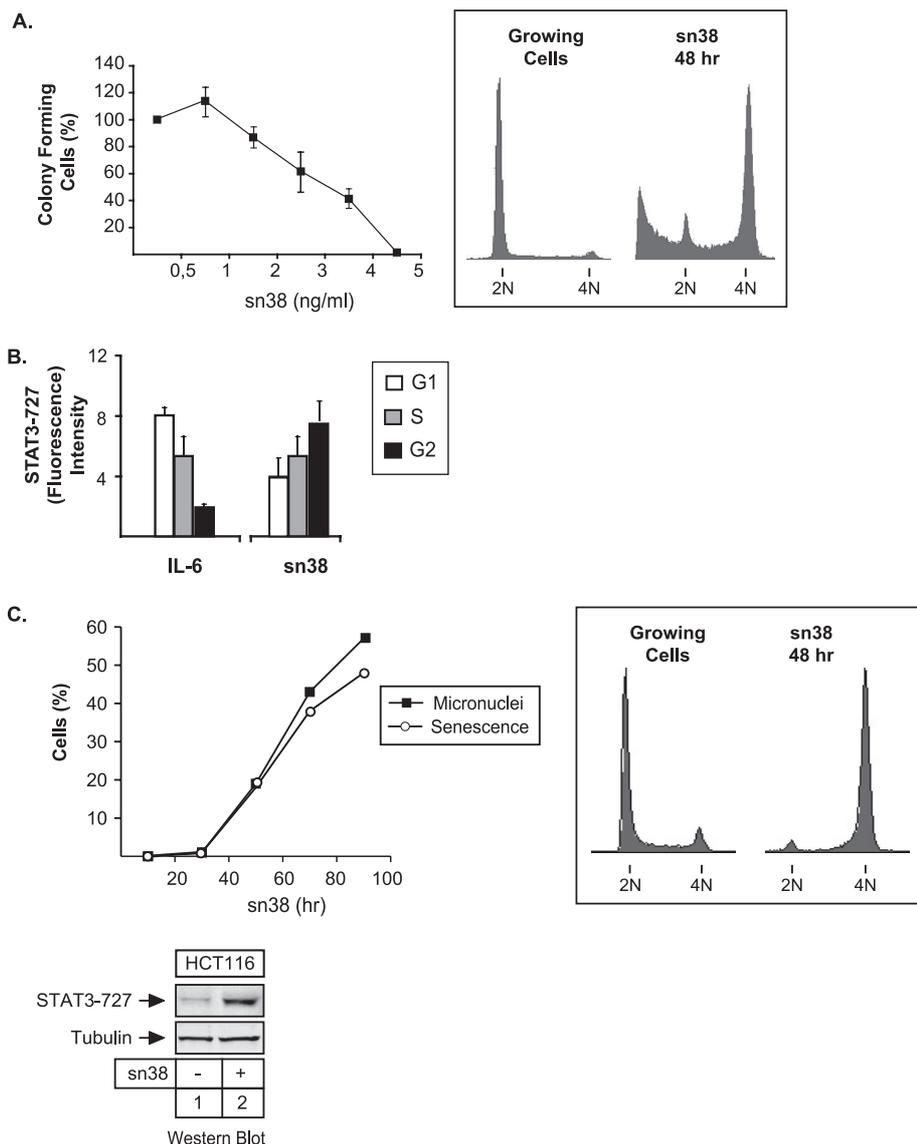
**FIGURE 1. STAT3 is phosphorylated on its serine 727 residue following topoisomerase I inhibition.** *A*, HT29 cells were treated with sn38 (5 ng/ml) or not for the indicated times. Following stimulation, total cell extracts were prepared, and serine 727 phosphorylation was analyzed by Western blot using polyclonal antibodies directed against the phosphorylated form of the protein. The membrane was reprobbed with an antibody directed against hsc70 as a loading control ( $n = 5$ ). Note that, in every experiment, sn38 was added to the cell culture just after cell plating to get an optimal inhibition of cell cycle progression. *B*, HT29 cells were treated with sn38 (5 ng/ml) for 48 h. Following stimulation, cell extracts were prepared and p-Erk1/2 and Erk2 expression was analyzed by Western blot with polyclonal antibodies directed against these proteins ( $n = 3$ ). *C*, HT29 cells were serum-starved for 2 days and stimulated with IL-6 (20 ng/ml) for 30 min. STAT3 activation was analyzed by Western blot using antibodies directed against the different phosphorylated forms of the proteins or against its non-phosphorylated form ( $n = 2$ ). In parallel, whole cell extracts were immunoprecipitated with polyclonal antibodies directed against the tyrosine-phosphorylated form of STAT3 (–705) or control antibodies (Gal4), and samples were then analyzed by Western blot using polyclonal antibodies directed against STAT3 Ser727 ( $n = 2$ ). *D*, HT29 cells were treated with sn38 (5 ng/ml) or not for the indicated times. Following stimulation, total cell extracts were prepared, and the serine 727 and tyrosine 705 phosphorylations were analyzed by Western blot using polyclonal antibodies directed against the phosphorylated forms of the protein. The membrane was reprobbed with an antibody directed against STAT3 and then hsc70 as a loading control ( $n = 3$ ).

treatment inhibited cell proliferation, and FACS analysis showed that HT29 cells were arrested in the  $G_2$  phase of the cell cycle after 48 h (Fig. 2A). Because STAT3 phosphorylation is

maximal at 72 h, this event is probably not driving  $G_2$  arrest. To confirm that STAT3 was activated during the  $G_2$  phase of the cell cycle upon DNA damage, FACS experiments were performed using propidium iodide staining conjugated with intracellular staining using phospho-serine 727 antibodies. Cells were treated with sn38 or starved and stimulated with IL-6 as a control. As expected, upon cytokine stimulation, the two main STAT3 phosphorylation sites, serine 727 (and tyrosine 705, data not shown) were detected mainly in cells present in the  $G_1$  phase of the cell cycle. By contrast, serine phosphorylation following sn38 treatment was detected essentially in the  $G_2$  phase of the cell cycle (Fig. 2B).

We noticed that a fraction of HT29 cells died by apoptosis following sn38 treatment as shown by the reproducible presence of a sub $G_1$  propidium iodide staining (Fig. 2A, right panel). This escape to  $G_2$  arrest has been previously reported and is due to the inactivation of the p53-p21<sup>waf1</sup> pathway in this cell line (29). To determine if STAT3 phosphorylation was due to the induction of apoptosis, we used HCT116 cells, because topoisomerase I inhibition induces senescence in this cell line due to intact p53 signaling. Results presented in Fig. 2C confirm that sn38 induced  $G_2$  arrest and the appearance of cells with multiple micronuclei and an increase in the number of  $\beta$ -galactosidase-positive cells, two hallmarks of senescence induction and mitotic catastrophe. Under this condition, Western blot analysis showed that STAT3 was phosphorylated on its serine 727 residue to the same extent as compared with HT29 cells (Fig. 2C, lanes 1 and 2). This result suggests that the phosphorylation of the transcription factor is not due to apoptosis. Importantly, it also indicates that this effect is not cell line-specific. Altogether, these results indicate that the STAT3 transcription factor is phosphorylated on its serine 727 residue in response to topoisomerase I inhibition.

*The cdk5 Kinase Is Up-regulated upon Topoisomerase I Inhibition*—We then wanted to determine which kinase is involved in STAT3 phosphorylation upon genotoxic treatment. During the course of these experiments, we have noticed that the expression of the *cdk5* kinase was increased in response to topoisomerase I inhibition. Although *cdk5* has been essentially characterized in neurons (25), it has been recently shown that this protein is also involved in the response to DNA damage and in the induction of senescence programs (30–33). Interestingly, this kinase has also been shown to regulate STAT3 in neuronal cells (34). Using total cell extracts, Western blot experiments showed that *cdk5* expression was significantly enhanced in response to sn38 (Fig. 3A, lanes 2 and 3). As a control, we did not detect any significant activation of p38, although it was phosphorylated as expected in response to the *rasV12* oncogene (Fig. 3A, lanes 4–6). To determine if the increased expression of the kinase was regulated at the transcriptional level, cells were treated with sn38, and the level of the *cdk5* mRNA was analyzed by quantitative RT-PCR experiments. Results presented Fig. 3B showed that topoisomerase I inhibition had no effect on this mRNA, suggesting that the expression of *cdk5* was mainly regulated at the translational level. In neuronal cells, it has been shown that *cdk5* is activated following its association with its p35/p25 coactivator (25). Western blot experiments showed that p35 was constitutively expressed in HT29 cells and

The *cdk5*-STAT3-Eme1 Pathway Prevents DNA Damage

**FIGURE 2. STAT3 is phosphorylated on serine 727 during G<sub>2</sub> arrest.** A, HT29 cells were treated or not with different concentration of sn38 for 10–14 days. Colony formation was then counted using an inverted microscope, and the growth of non-treated cells was set up at 100%. Clonogenic survival was then plotted as a fraction relative to these untreated cells ( $n = 5 \pm S.D.$ ). In parallel, growing HT29 cells were treated with sn38 (5 ng/ml) for 48 h, and DNA content and apoptosis were then evaluated by flow cytometry ( $n = 5$ ). B, HT29 cells were treated with sn38 (5 ng/ml) or IL-6 (20 ng/ml) as indicated, and DNA content and serine phosphorylation were then analyzed by flow cytometry analysis using polyclonal antibodies directed against the serine 727-phosphorylated form of STAT3 ( $n = 3$ ). C, growing HCT116 cells were treated or not with sn38 for different times as indicated. The percentage of senescent cells was evaluated as the number of cells expressing SA- $\beta$ -gal activity and micronuclei (left part,  $n = 3$ ). In parallel, DNA content was evaluated by flow cytometry after 48 h (right part), and the phosphorylation of STAT3 on its serine residue was analyzed by Western blot as described above ( $n = 3$ , bottom).

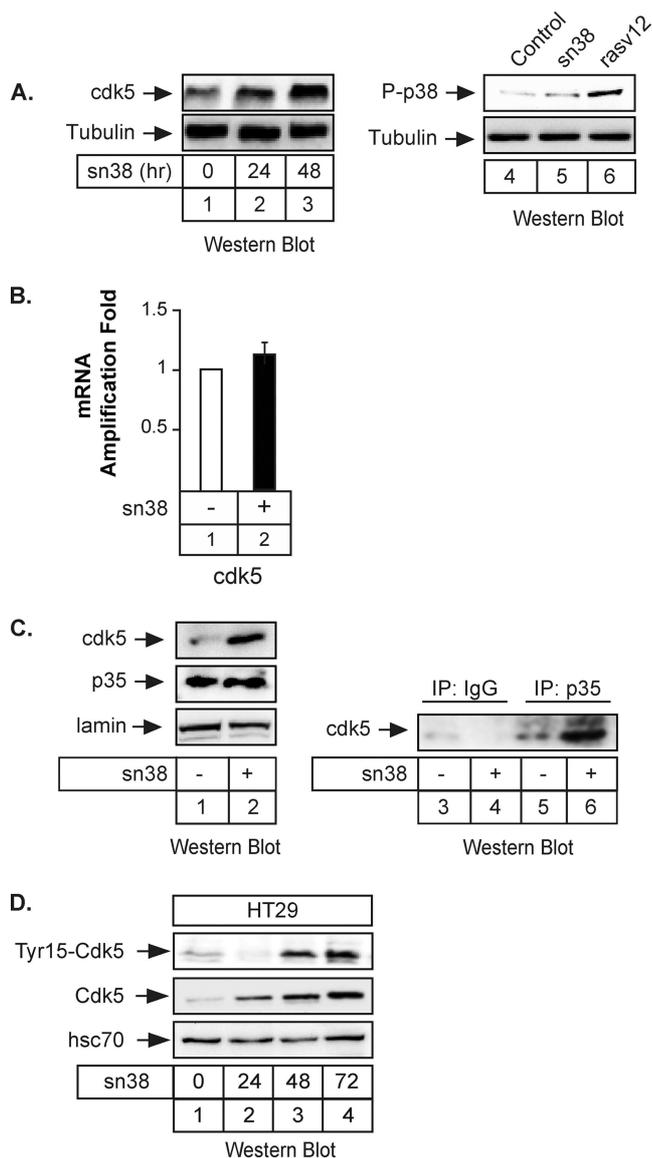
that sn38 did not affect its expression level (Fig. 3C, lanes 1 and 2). We were not able to detect p25. We then asked whether *cdk5* interacts with p35 upon drug treatment. To this end, HT29 cells were treated with sn38, total cell extracts were recovered, and co-immunoprecipitations were performed with polyclonal antibodies directed against p35 or nonspecific antibodies (Fig. 3C, lanes 3–6). Proteins present in the immunoprecipitates were revealed by immunoblotting with anti-*cdk5* antibodies. Under these conditions, *cdk5*

was found to co-immunoprecipitate with p35 proteins (Fig. 3C, compare lane 6 and 4). Note that these co-immunoprecipitations were carried out using non-transfected cells, so that the association does not require the proteins to be overexpressed. It has been recently proposed that the binding to p35 is not sufficient to initiate *Cdk5* kinase activation, which is also dependent on the phosphorylation of the kinase on its tyrosine 15 residue (35). We thus determined using total cell extracts whether sn38 also modulates *Cdk5* phosphorylation. As shown in Fig. 3D, lanes 1–4, we found that phosphorylation of *Cdk5* at tyrosine 15 was also increased in response to topoisomerase I inhibition. Note that, using total cell extracts, we were not able to detect a significant activation of the kinase before 48 h of treatment (see below). Therefore, we concluded from these results that the *cdk5* kinase is activated following topoisomerase I inhibition.

***Cdk5* Interacts with STAT3 and Induces Its Serine 727 Phosphorylation upon Topoisomerase I Inhibition**—To determine if *cdk5* is involved in STAT3 serine phosphorylation following sn38 treatment, we first asked if the kinase could bind to the transcription factor. To this end, HT29 cells were treated with sn38, total cell extracts were recovered, and immunoprecipitations were performed with polyclonal antibodies directed either against STAT3 or nonspecific antibodies (Fig. 4A, lanes 1 and 2). Proteins present in the immunoprecipitates were revealed by immunoblotting with the reciprocal *cdk5* or STAT3 antibodies. Under these conditions, STAT3 was found to co-immunoprecipitate with *cdk5*.

These interactions were specific, because almost no interaction was observed using a control IgG antibody (Fig. 4A, compare lanes 1 and 2). Importantly, these co-immunoprecipitations were performed with extracts from non-transfected cells; therefore, the association between STAT3 and *cdk5* did not rely on the overexpression of the two proteins.

To confirm this observation, *in vitro* pulldown experiments were performed using bacterially produced 6 $\times$  histidine-tagged STAT3 containing either the full-length protein or the

The *cdk5*-STAT3-Eme1 Pathway Prevents DNA Damage

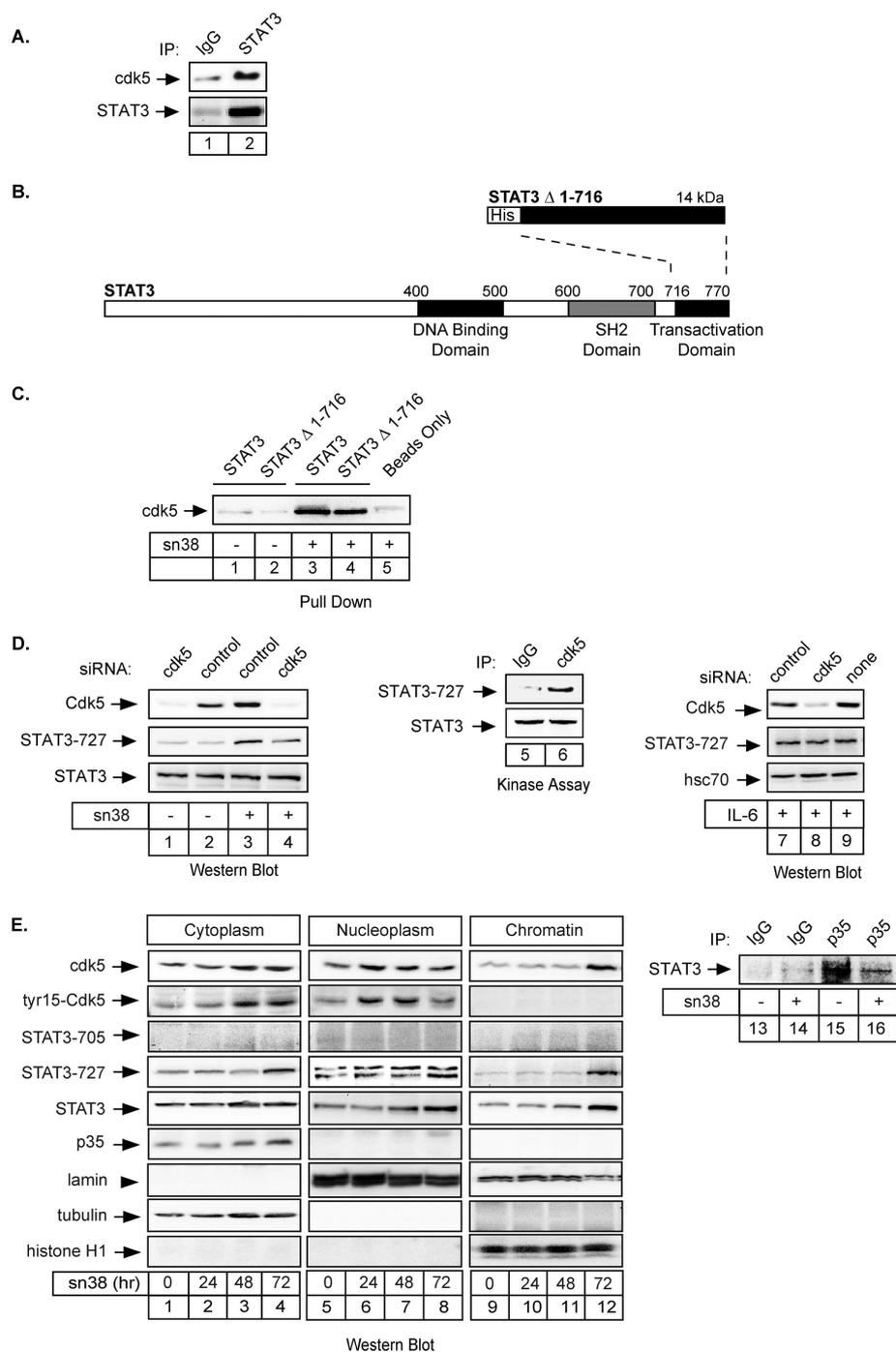
**FIGURE 3. The *cdk5* kinase is activated following topoisomerase I inhibition.** *A*, growing HT29 cells were treated or not with sn38 (5 ng/ml) for 24 or 48 h. Following stimulation, total cell extracts were prepared, and *cdk5* expression was analyzed by Western blot using polyclonal antibodies directed against the kinase (*lanes 1–3*,  $n = 5$ ). Under the same conditions, the phosphorylation of the p38 kinase was investigated. As a control, cells were transfected with the *rasv12* oncogene to induce p38 activation (*lanes 4–6*,  $n = 3$ ). The membranes were reprobbed with an antibody directed against tubulin as a loading control. *B*, growing HT29 cells were incubated with sn38 (5 ng/ml) for 48 h, and the expression of the *cdk5* mRNA was analyzed by quantitative RT-PCR experiments ( $n = 3$ ). *C*, growing HT29 cells were treated as described above, and after 48 h, whole cell extracts were prepared and Western blot analysis was performed with polyclonal antibodies directed against *cdk5*, p35, or lamin as a loading control (*lanes 1 and 2*). In parallel, extracts were immunoprecipitated with polyclonal antibodies directed against p35 (*lanes 5 and 6*) or a control serum (*lanes 3 and 4*). Samples were then analyzed by Western blot using polyclonal antibodies directed against *cdk5* ( $n = 3$ ). *D*, HT29 cells were treated with sn38 as described previously, and the expression and phosphorylation of *cdk5* on its tyrosine 15 residue were analyzed by Western blot ( $n = 3$ ).

716–770 amino acids corresponding to the activation domain of STAT3 (Fig. 4B, STAT3 or STAT3 $\Delta$ 1–716). His-tagged STAT3 proteins were immobilized on beads and incubated

with total cell extracts prepared from cells treated or not with sn38. As previously shown using extracts from neuronal cells (34), we found that the endogenous *cdk5* kinase was retained by the full-length his-STAT3 protein as well as by the STAT3 $\Delta$ 1–716 fusion protein immobilized on beads. By contrast, the kinase was not retained by the beads alone (Fig. 4C, compare *lanes 3–5*). We also noticed that this interaction was dependent on sn38, because almost no signal was observed using extracts from non-treated cells (Fig. 4C, compare *lanes 1–2* with *3–4*).

We then determined if *cdk5* was involved in the serine phosphorylation of STAT3 in response to genotoxic treatment. To this end, cells were transfected with a pool of three siRNA directed against *cdk5* or the corresponding control siRNA, cells were treated or not, and STAT3 phosphorylation was then investigated by Western blot. Following siRNA transfection, we observed as expected that the expression of *cdk5* was down-regulated (Fig. 4D, *lanes 1 and 4*, *top panel*). Interestingly, we also noticed that STAT3 serine phosphorylation was reduced upon genotoxic treatment in the absence of the kinase (Fig. 4D, compare *lanes 3 and 4*, *middle panel*). Note, however, that we were not able to completely down-regulate STAT3 phosphorylation, suggesting either that the S727-phosphorylated form of STAT3 has an increased half-life or that other kinases are also phosphorylating STAT3. To further confirm that *cdk5* was able to phosphorylate STAT3, the kinase was immunoprecipitated from sn38-treated cells and incubated *in vitro* in the presence of cold ATP and a purified preparation of STAT3 $\Delta$ 1–716. Western blot analysis confirmed that the transcription factor was effectively phosphorylated on its serine 727 residue under these conditions (Fig. 4D, *lanes 5 and 6*). In addition, we also determined if *cdk5* was involved in STAT3 phosphorylation in other experimental conditions. To this end, cells were transfected with siRNA as described above, serum-starved, and then stimulated with IL-6 for 30 min. Results indicates that *cdk5* was not involved in the activation of STAT3 by this cytokine (Fig. 4D, *lanes 7–9*).

It is well known that STAT3 is present in the cytoplasm and in the nucleus. In addition, it has also been reported that *cdk5* is localized in the cytoplasm to regulate the neuronal architecture. To determine the localization of these proteins following topoisomerase I inhibition, fractionation experiments have been performed (Fig. 4E, *lanes 1–12*). Results showed that both STAT3 and *cdk5* were present in the nucleus and on the chromatin following sn38 treatment (Fig. 4E, *lanes 6, 7, and 12*). As observed in Fig. 1, STAT3 phosphorylation was maximal at 72 h. Both proteins were also activated in the cytoplasm; however, *cdk5* activation occurred first in the nucleus, suggesting that the initial activation event might occur in this compartment between 24 and 48 h. Interestingly, we were also able to detect *cdk5* on chromatin but only its non-phosphorylated form. However, ChIP experiments indicated that *cdk5* was not associated with STAT3 on its target genes (see below). These fractionation experiments also indicated that p35 was not present in the nucleus. Because p35 and *cdk5* interact, we then asked whether p35 binds to STAT3 in response to sn38. As described above, total cell extracts were recovered, and immunoprecipitations were performed with polyclonal antibodies directed either against p35 or nonspecific antibodies (Fig. 4E,

The *cdk5*-STAT3-Eme1 Pathway Prevents DNA Damage

**FIGURE 4. Cdk5 interacts with STAT3 to induce its phosphorylation on Serine 727.** *A*, HT29 cells were treated with sn38 for 48 h, and whole cell extracts were then immunoprecipitated with polyclonal antibodies directed against STAT3 proteins (*lane 2*) or a control serum (*lane 1*), separated by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose filter, and probed with polyclonal antibodies directed against STAT3 or cdk5 proteins as indicated. *B*, representation of the fusion proteins used in the pull-down experiments. *C*, total cell extracts (300  $\mu$ g) were incubated with histidine, with His-tagged STAT3Cter (STAT3 $\Delta$ 1-716), or with the full-length STAT3 (his-STAT3) immobilized on nickel-agarose beads (400 ng). Samples were then separated on polyacrylamide gels, and cdk5 binding was detected by Western blot using anti-cdk5 polyclonal antibodies (*lanes 1-4*). *D*, growing HT29 cells were either transfected with cdk5-specific siRNA oligonucleotides or control oligonucleotides as indicated. Cdk5 expression and phosphorylation of STAT3 on its serine residue were monitored after treatment with sn38 for 48 h (*lanes 1-4*,  $n = 4$ ). In parallel, cdk5 was immunoprecipitated from sn38-treated cells and incubated with STAT3 $\Delta$ 1-716 for 10 min at RT in the presence of cold ATP. The phosphorylation of STAT3 on its serine 727 residue was analyzed by Western blot as described above (*lanes 5 and 6*). In parallel, growing HT29 cells were either transfected with cdk5-specific siRNA or control siRNA as indicated, serum-starved, and then stimulated with IL-6 for 30 min. Cdk5 expression and STAT3 phosphorylation were monitored as above ( $n = 2$ ). *E*, HT29 cells were treated with sn38 for the indicated times and cytoplasmic, nuclear, or chromatin extracts were prepared and analyzed by Western blot analysis using antibodies directed against the indicated proteins ( $n = 2$ , *lanes 1-12*). Lamin, tubulin, and histone expression were used as loading controls for each compartment. In parallel, HT29 cells were treated or not with sn38 for 48 h, and whole cell extracts were then immunoprecipitated with polyclonal antibodies directed against p35 (*lanes 15 and 16*) or a control serum (*lanes 13 and 14*), separated by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose filter, and probed with polyclonal antibodies directed against STAT3 proteins as indicated.

### The *cdk5*-STAT3-*Eme1* Pathway Prevents DNA Damage

lanes 13–16). Proteins present in the immunoprecipitates were revealed by immunoblotting with the reciprocal STAT3 antibodies. Under these conditions, STAT3 was found to co-immunoprecipitate with p35. Interestingly, this association was inhibited following sn38 treatment (Fig. 4E, compare lanes 15 and 16). This was expected if these proteins localized in two different compartments following topoisomerase I inhibition. Taken together, these results suggest that *cdk5* binds to STAT3 upon topoisomerase I inhibition to induce its phosphorylation on serine 727.

**The *cdk5* Kinase Regulates the Activation of STAT3 Target Genes following Topoisomerase I Inhibition**—We then wanted to determine if *cdk5* is involved in the regulation of STAT3 target genes following sn38 treatment. It is well known that STAT3 regulates the expression of cyclin D1 in growing cells to induce cell cycle progression (36). Because sn38 treatment induced growth inhibition (see Fig. 2), we then determined if topoisomerase I inhibition prevented cyclin D1 expression and if this was linked to *cdk5* activation. To this end, cells were treated or not with sn38, and the expression of the cyclin was evaluated by quantitative RT-PCR and Western blot experiments. As expected, results indicated that genotoxic treatment down-regulated the expression of the cyclin D1 mRNA and protein (Fig. 5A). STAT3 was phosphorylated as expected on the serine 727 under these conditions. To determine if STAT3 is associated with the cyclin D1 promoter and if this binding is regulated in response to SN38, CHIP experiments were then performed using STAT3 antibodies and primers encompassing the proximal promoter where a binding site for the transcription factor has been recently described (37). Antibodies directed against the Ras protein were used as negative controls. As previously shown, CHIP experiments confirmed that STAT3 was present on the proximal cyclin D1 promoter in growing cells. Importantly, the association of the transcription factor with DNA was significantly inhibited following sn38 treatment (Fig. 5B, lanes 5 and 6). As a control, PCR analysis did not detect any occupancy of the  $-2760/-2486$  region of the *p21<sup>waf1</sup>* gene by STAT3 (data not shown). The CHIP result was obtained by semi-quantitative PCR (Fig. 5B, compare lanes 5 and 6) and quantified by quantitative-PCR (Fig. 5B, lanes 7 and 8). We then determined if *cdk5* was involved in the inhibition of the *cyclin D1* gene upon sn38 treatment. As described above, cells were transfected with a pool of three siRNA directed against *cdk5* or the corresponding control siRNA, and the expression of cyclin D1 was then investigated following sn38 treatment by quantitative RT-PCR analysis. As expected, genotoxic treatment reduced the expression of the cyclin D1 mRNA, and the same effect was observed when cells were transfected with control siRNA (Fig. 4C). Interestingly, the sn38-mediated inhibition of cyclin D1 was not observed anymore in the absence of *cdk5*.

Besides cyclin D1, we and others have also shown that the *Myc*-*cdc25a* pathway is also an important target of the STAT3 oncogene (38–41). To extend our results, we therefore determined if *cdk5* was involved in the regulation of the *myc* gene upon genotoxic treatment. As expected, CHIP experiments indicated that STAT3 was associated with the proximal promoter of the *myc* gene in growing HT29 cells (Fig. 5D, compare

lanes 3 and 5). As described above for the *cyclin D1* gene, the association of the transcription factor with the *myc* promoter was significantly inhibited following sn38 treatment (Fig. 5D, lanes 5 and 6). The expression of the *Myc* mRNA was then investigated following sn38 treatment and transfection with a pool of three siRNA directed against *cdk5* or with the corresponding controls. As previously shown (23, 28), *Myc* expression was down-regulated following topoisomerase I inhibition. Interestingly, results showed that this inhibition was reduced in the absence of *cdk5* (Fig. 5D, right panel). Although this does not rule out the participation of others regulators, these results suggest that *cdk5* also regulates the STAT3-mediated activation of *myc* following DNA damage.

To further extend this observation, we then determined if *cdk5* was only involved in the regulation of proliferative genes such as *cyclin D1* or *myc*, or if its effects could also be observed on other genes regulated by STAT3. We have recently shown that STAT3 can bind to the promoter of the *Eme1* gene to induce its expression (24). *Eme1* is an endonuclease that is implicated in the rescue of broken replication forks in response to topoisomerase I inhibition (42–44). Using quantitative PCR analysis, we confirmed in HT29 cells that *Eme1* expression was increased in response to sn38 (Fig. 6A, lanes 1 and 2). In addition, CHIP experiments also indicated that STAT3 effectively bound to the *Eme1* promoter following DNA damage (Fig. 6A, lanes 5 and 6). To determine if *cdk5* was involved in the activation of the endonuclease, its expression was then investigated in the presence or absence of siRNA directed against the kinase. As expected, *Eme1* expression was increased in the presence of control siRNA in response to sn38 (Fig. 6A, right part). However, when cells were transfected with a pool of three siRNAs directed against *cdk5*, the sn38-mediated expression of the endonuclease was significantly reduced (Fig. 6A, right part). The expression of *Eme1* has been correlated with DNA damage, chromosomal aberrations, and genetic stability. Based on these observations, we made the hypothesis that the down-regulation of *cdk5* or STAT3 might potentiate the effect of sn38 on DNA damage through a reduced expression of the endonuclease. To this end, cells were transfected with pools of three siRNA directed against STAT3 or *cdk5*, treated or not with sn38, and DNA damage was investigated by FACS analysis using an antibody directed against the Ser-139-phosphorylated form of histone H2Ax. Results presented Fig. 6B show as expected that topoisomerase I inhibition induced a significant increase in H2Ax phosphorylation (compare the first and second panel). Interestingly, we also observed that DNA damage was enhanced in the absence of *cdk5* or STAT3 (compare the second panel with panels 3 and 4). FACS quantification (Fig. 6C) confirmed that the percentage of cells with increased DNA damage is higher in the absence of STAT3 or *cdk5*.

To further extend this result, we then determined if *cdk5* down-regulation enhanced cell death following topoisomerase I inhibition. This would be expected as a consequence of increased DNA damage. To this end, cells were transfected with control siRNA or a pool of siRNAs directed against *cdk5* for 2 days, and cells were then split and treated for 10–14 days with sn38. Results from clonogenic assays presented in Fig. 6D showed that *cdk5* down-regulation resulted in a significant

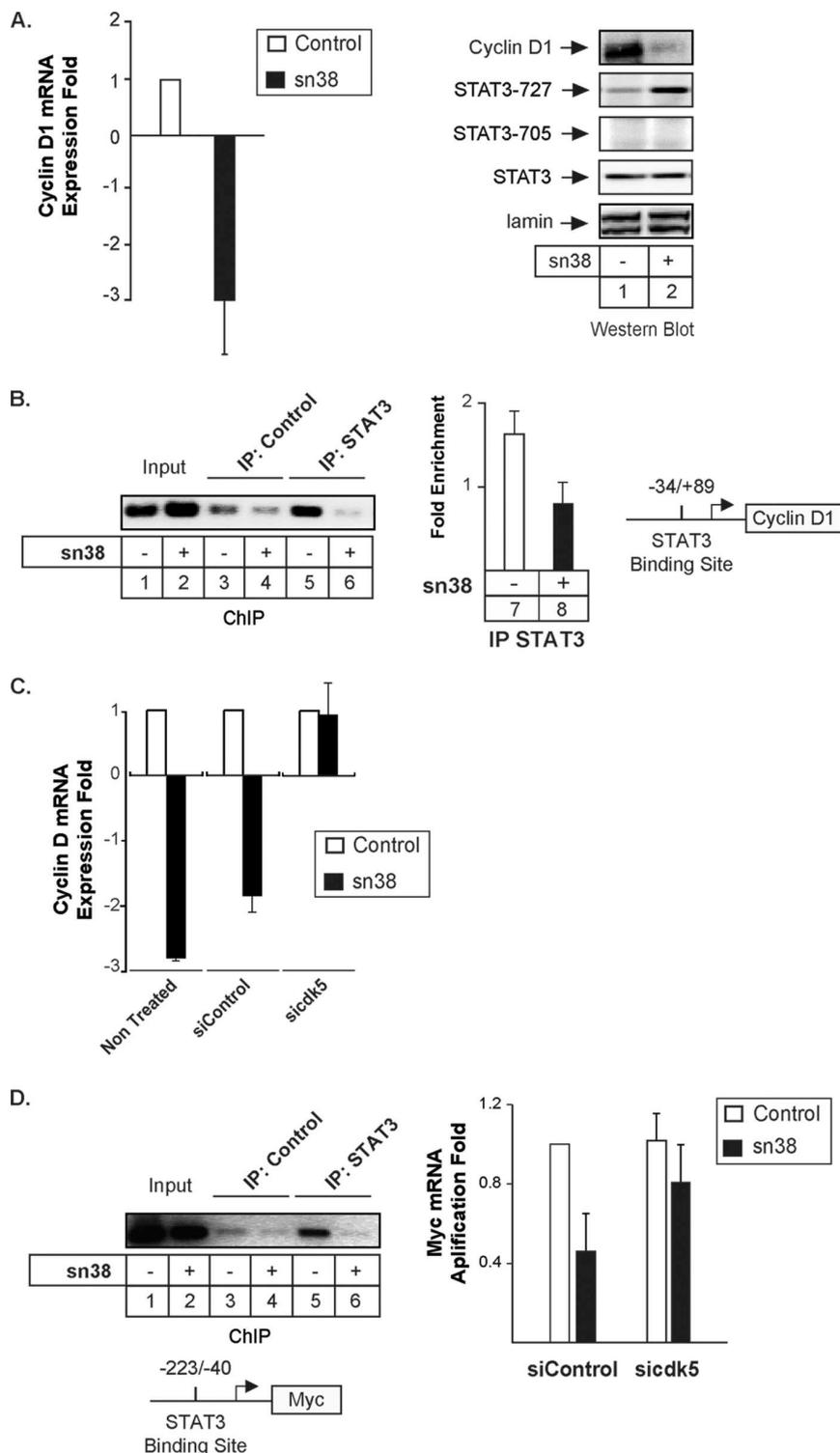
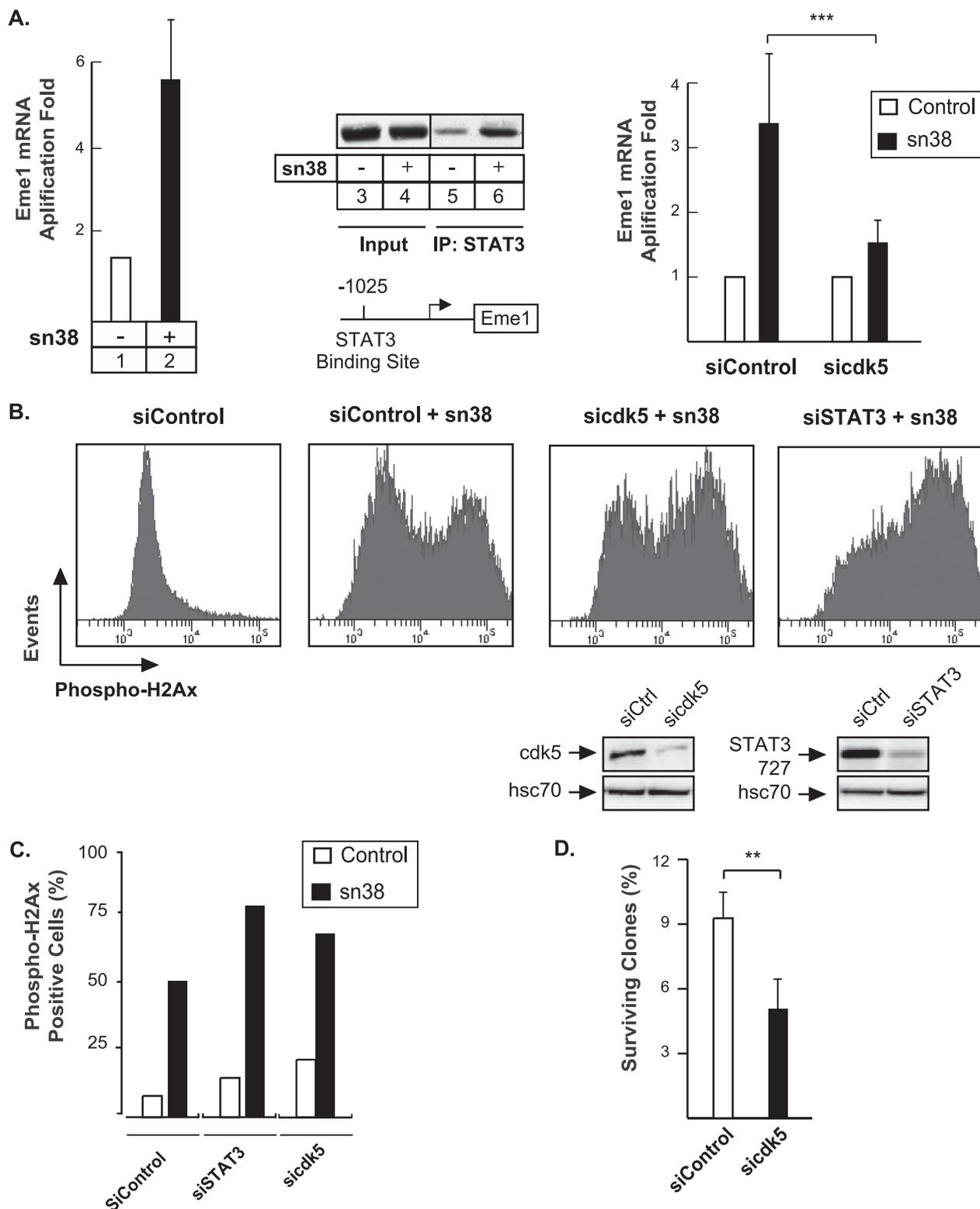
The *cdk5*-STAT3-Eme1 Pathway Prevents DNA Damage

FIGURE 5. **Cdk5 is involved in the down-regulation of cyclin D1 and myc following topoisomerase I inhibition.** *A*, growing HT29 cells were incubated with sn38 (5 ng/ml) for 48 h, and the expression of the cyclin D1 mRNA was analyzed by quantitative RT-PCR experiments ( $n = 3$ ). In parallel, Western blot experiments were also performed to confirm the down-regulation of the cyclin D1 protein and the phosphorylation of STAT3 on its serine residue (lanes 1 and 2). *B*, HT29 growing cells were treated as described above, and soluble chromatin was prepared from the indicated cells and immunoprecipitated with antibodies directed against STAT3 or control antibodies. DNA was amplified using one pair of primers that covers the STAT3 proximal binding site of the cyclin D1 promoter. ChIP assays were analyzed on agarose gel (left part) or quantified by real-time PCR ( $n = 3$ , right part of the figure). *C*, growing HT29 cells were left untreated or transfected with cdk5-specific or control siRNA oligonucleotides as indicated. Cyclin D1 mRNA expression was analyzed by quantitative RT-PCR experiments following sn38 treatment ( $n = 3$ ). *D*, growing HT29 cells were treated as described above, and the association of STAT3 with the myc proximal promoter was analyzed by ChIP (lanes 1–6). In parallel, myc expression was evaluated by quantitative RT-PCR in the presence or absence of cdk5 (right part,  $n = 4 \pm$  S.D.).

The *cdk5*-*STAT3*-*Eme1* Pathway Prevents DNA Damage

**FIGURE 6. The *cdk5*-*STAT3* pathway regulates the expression of *Eme1* and reduces DNA damage.** *A*, *Eme1* mRNA expression was analyzed by quantitative RT-PCR (*lanes 1* and *2*), and *STAT3* association with the *Eme1* promoter was characterized by ChIP (*lanes 3–6*) following *sn38* treatment. In parallel, cells were transfected with control or *cdk5* siRNA and then treated with *sn38* (5 ng/ml) for 48 h. The expression of the *Eme1* mRNA was analyzed by RT-QPCR experiments ( $n = 3 \pm \text{S.D.}$ ,  $p < 0.001$ ). *B* and *C*, growing HT29 cells were transfected with specific or control siRNA and treated or not with *sn38* (5 ng/ml). The generation of DNA double strand breaks was quantified by FACS analysis using polyclonal antibodies directed against the ser139 phosphorylated form of histone H2Ax (one experiment representative of three). *D*, HT29 cells were transfected with pools of siRNAs directed against *cdk5* or control siRNAs for 48 h. Cells were then split and treated with *sn38* for 10–14 days. The percentage of colony-forming cells was evaluated as compared with non-treated cells ( $n = 3 \pm \text{S.D.}$ ,  $p < 0.01$ ).

**The cdk5-STAT3-Eme1 Pathway Prevents DNA Damage**

decrease of cell viability as compared with control cells. Altogether, these results suggest that cdk5 interacts with STAT3 to regulate the expression of Eme1 and that this allows DNA repair in response to topoisomerase I inhibition.

**STAT3 Is Associated with the Eme1 Promoter, Phosphorylated on Serine 727, but Not on Tyrosine 705**—These results suggest that STAT3 can function as a transcriptional regulator following serine 727 phosphorylation, in the absence of tyrosine 705 phosphorylation. To test this hypothesis, ChIP experiments were performed in HT29 cells using antibodies directed against either the tyrosine (Tyr-705), the serine (Ser-727) phosphorylated forms of the transcription factor or one polyclonal antibody directed against all forms of STAT3 (Fig. 7). Two conditions have been used, growing cells treated or not with sn38 for the indicated times, or cells that have been serum-starved and stimulated with IL-6 for 30 min. DNA binding has been characterized on the Eme1, cyclin D1, and Myc promoters. We observed as expected that STAT3 was recruited to the Eme1 gene following sn38 treatment (Fig. 7A, lanes 1–3). Interestingly, the same recruitment was noticed using the Ser-727 antibody, but the Tyr-705 antibody did not detect any STAT3 binding (Fig. 7, lanes 4–9). This observation further suggests that a serine-phosphorylated form of STAT3 can be found associated with a target gene in the absence of tyrosine phosphorylation. When cells were stimulated with IL-6 (Fig. 7B), STAT3 was not recruited to the Eme1 gene, indicating that this promoter is not a target of the transcription following cytokine stimulation. On the cyclin D1 and Myc promoters (Fig. 7, C and D), results showed that STAT3 was present on both promoters in growing cells and that its binding was inhibited following sn38 treatment. This was observed using either a “total” antibody or an antibody directed against the tyrosine-phosphorylated form of the transcription factor (Fig. 7, C and D, lanes 1–2 and 5–6). In serum-starved cells, STAT3 was not present on these promoters, but the transcription factor was recruited following IL-6 stimulation. As expected, this promoter-associated form was phosphorylated on tyrosine 705 (Fig. 7, C and D, lanes 7–8 and 11–12). This observation corresponds to results that have been published previously by our group and others, showing that STAT3 can activate the *myc* and *cyclin D1* genes following JAK-mediated phosphorylation of tyrosine 705 and the recruitment of transcriptional activators such as CBP, SRC, or P/Tefb. Interestingly, we were not able to detect a significant recruitment of STAT3 phosphorylated on its serine residue on these two promoters. Note, however, that this site may not be accessible when the dimer is bound to DNA, whereas this would be the case following DNA damaged if STAT3 has a different conformation or different partners. Taken together, these results indicate that STAT3 can be found associated with the Eme1 promoter in response to DNA damage when phosphorylated only on its serine 727 residue.

**DISCUSSION**

In this study, we have found that the STAT3 transcription factor is phosphorylated on its serine C-terminal residue but not on tyrosine 705 upon topoisomerase I inhibition. Our results indicate that this is due to the activation of the cdk5 kinase, which binds to the C-terminal of domain of the tran-

scription factor to induce its phosphorylation. Importantly, cdk5 is involved in the down-regulation of early G<sub>1</sub> genes such as *myc* and *cyclin D1* and in the STAT3-mediated up-regulation of the Eme1 gene, an endonuclease involved in the processing of damaged replication forks. In light of these results, we propose that the cdk5-STAT3-Eme1 pathway plays an important role in the response to topoisomerase I inhibition and chemotherapy treatments.

It is well known that STAT3 is activated at the G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> transition following cytokine or growth factor stimulation. In this condition, the transcription factor binds to the promoter of several cell cycle genes such as *myc*, *cyclin D1*, *fos*, or *cdc25A* to induce their expression and activate progression toward S phase. Gene activation by STAT3 during the G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> transition is due to the phosphorylation of STAT3 on its tyrosine residue, followed by nuclear translocation and DNA binding. The second phosphorylation of STAT3 on its serine residue allows the contact of the tyrosine-phosphorylated dimer with transcriptional cofactors such as CBP, NcoA, or Ptefb. However, this pathway is probably not the only mechanism by which STAT proteins are activated, because several results have shown that these transcription factors induce transcription in the absence of tyrosine phosphorylation. This was originally described with STAT1 when it was shown that this transcription factor can drive the expression of several genes in the absence of tyrosine phosphorylation (45). Using non-phosphorylated forms of STAT3 on its tyrosine residue, Yang *et al.* have shown that these mutants can induce the expression of genes such as *met* and *mras*, which certainly play an important role in the oncogenic activity of STAT3. Under these conditions, gene activation is a consequence of the formation of a STAT3-NF- $\kappa$ B enhanceosome that plays a key role in transformed cells (12, 13). Most importantly, the genes regulated by STAT3 in these conditions are normally not activated when the transcription factor is phosphorylated on its tyrosine residue. This leads to the important conclusion that the STAT3 transcriptional targets depends on its post-translational modifications.

Importantly, using ChIP analysis, we have been able to detect STAT3 on the Eme1 promoter when phosphorylated only on its Ser-727 residue. We therefore propose that STAT3 is activated by DNA damage during the G<sub>2</sub> phase of the cell cycle and that its serine phosphorylation allows the specific up-regulation of DNA repair genes such as the Eme1 endonuclease. Surprisingly, the role of STAT3 in the response to genotoxic treatment has not been well characterized. By contrast, it is known that both STAT1 and STAT5 are regulated following DNA damage. STAT1 is involved in the S and G<sub>2</sub>/M checkpoints and can associate with repair signaling proteins such as Chk2 and Mdc1 in response to  $\gamma$ -irradiation (46, 47). In addition, this transcription factor is also phosphorylated in response to topoisomerase inhibitors (47). STAT5 has been shown to regulate the expression of rad51 and, importantly, this has been linked to the ability of several oncogenic kinases such as bcr-abl or tel-jak2 to induce drug resistance (48, 49). Interestingly, recent results also suggest that STAT3 plays an important role in the regulation of genome stability. The inactivation of the T-cell protein tyrosine phosphatase induces a constitutive activation of STAT3 probably as a consequence of replication fork stall-

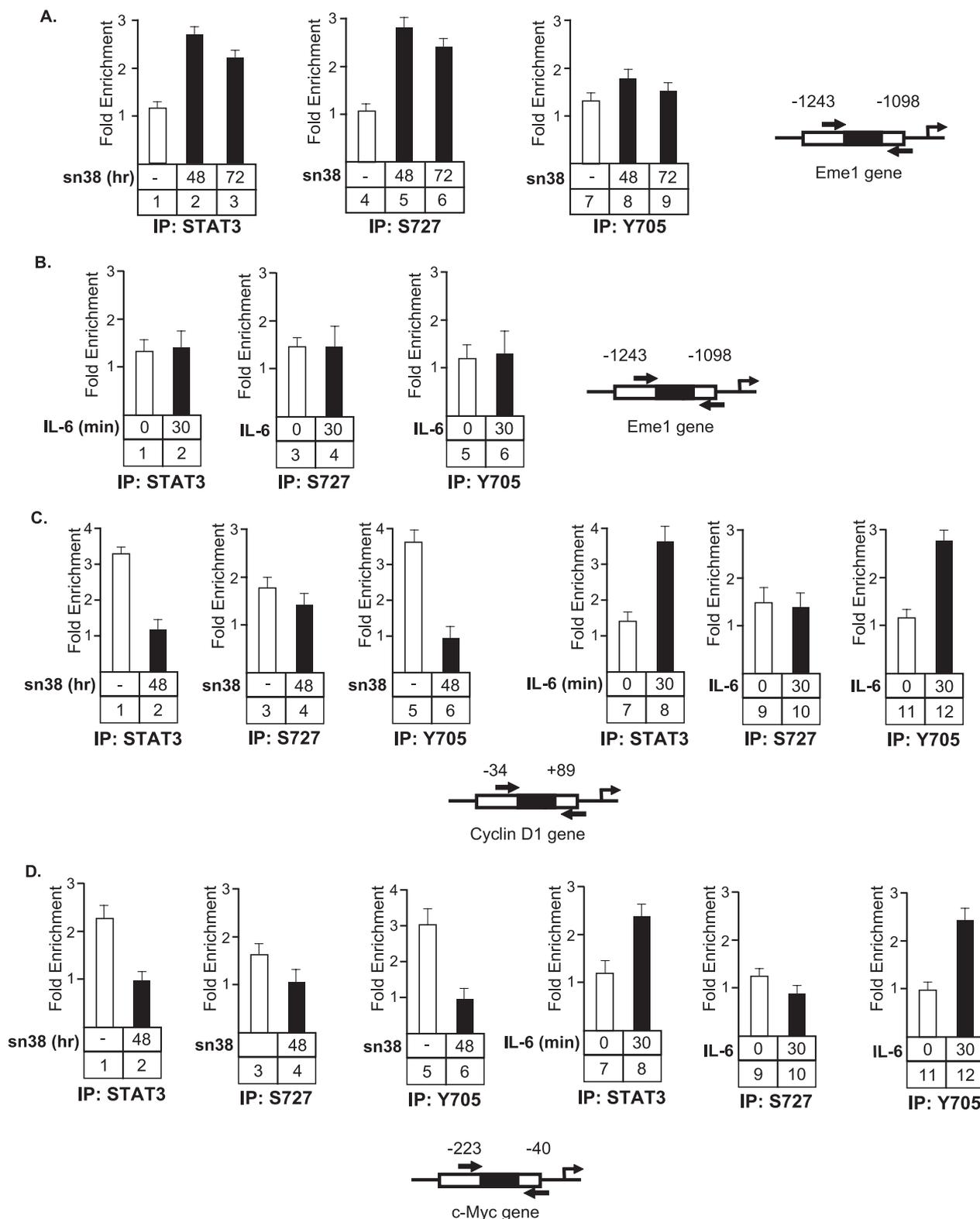
The *cdk5-STAT3-Eme1* Pathway Prevents DNA Damage

FIGURE 7. **STAT3 is recruited to the Eme1 promoter when phosphorylated only on its serine 727 residue.** Growing HT29 cells were treated or not with sn38 as indicated above and soluble chromatin was prepared and immunoprecipitated with antibodies directed against STAT3 (IP:STAT3) or its serine or tyrosine phosphorylated forms (IP:S727 or IP:Y705). In parallel, cells were serum-starved and stimulated or not with IL-6 (10 ng/ml) for 30 min, and the chromatin was immunoprecipitated under the same conditions. DNA was amplified using pair of primers that covers the STAT3 proximal binding sites of the cyclin D1 (*panel C*), Myc (*panel D*), and Eme1, (*panel A and B*) promoters as indicated. ChIP assays were then quantified by real-time PCR as compared with the signals obtained on each genes with a control IgG ( $n = 3$ ). Note that sn38 (-) in the legend means growing cells, whereas IL6 (0) means serum-starved cells.

**The cdk5-STAT3-Eme1 Pathway Prevents DNA Damage**

ing, and this leads to aberrant mitoses with lagging chromosomes (50). Unfortunately, the link between STAT3 and DNA repair has not been characterized in this study, because this effect has been linked to a sustained expression of cyclin D1 during S phase. Further suggesting a link between STAT3 and DNA stability, it is well known that a direct target of STAT3, myc, can induce DNA damage and dysregulate genomic stability and DNA repair pathways (51). In this study, we further extend these observations, showing that this transcription factor is activated by Cdk5 in response to topoisomerase I inhibitors. We speculate that this kinase allows the formation of a new STAT3 enhanceosome that would specifically regulate the expression of DNA repair genes upon genotoxic treatment. In light of recent results showing an essential role of NF- $\kappa$ B in the response to DNA damage (52), one interesting hypothesis is that genes involved in the response to sn38 are controlled by a specific STAT3-NF- $\kappa$ B complex that would be activated by cdk5. It will be interesting to determine if this enhanceosome preferentially binds DNA repair genes as opposed to more conventional STAT3 targets such as myc or cdc25A.

As a consequence of DNA repair genes regulation, our results indicate that the cdk5-STAT3 pathway reduces DNA damage in response to topoisomerase I inhibition. This suggests that these proteins might play an essential role in the resistance of cancer cells to chemotherapy. Further confirming the importance of this oncogenic cascade, recent results have shown that the cdk5-STAT3 pathway plays an essential role in thyroid carcinomas (53). In addition, we and others have recently shown that STAT3 prevents the induction of senescence through p53-p21 inactivation (18, 40, 54, 55). Interestingly, cdk5 is also involved in senescence programs, because this kinase regulates cell morphology through ezrin and rac1 modulation (32, 33). It will be interesting to determine if cdk5 is also involved in the inactivation of the p53-p21 pathway by the STAT3 oncogene during senescence induction.

In light of this study and other results (53), we therefore propose that cdk5 plays an important role in cell transformation by the STAT3 oncogene. Because it has been proposed that cell transformation induces an intrinsic resistance program to chemotherapy (56), we speculate that cdk5-STAT3 provides cancer cells with intrinsic resistance capacities due to enhanced Eme1 expression and that this a corollary of cell transformation. We propose that the early detection on tumor biopsies of the cdk5-STAT3 oncogenic pathway, both of its phosphorylation status and of its target genes, will provide oncologists with a resistance profile indicative of tumors that will fail to respond to chemotherapy (15, 57). In addition, we also propose that STAT3 inhibitors, which are emerging as new targeted cancer therapies (2, 57, 58) should be tested in clinical trials in combination with irinotecan to reduce DNA repair and enhance the efficiency of genotoxic treatments.

**REFERENCES**

- Bromberg, J. (2002) *J. Clin. Invest.* **109**, 1139–1142
- Yu, H., and Jove, R. (2004) *Nat. Rev. Cancer* **4**, 97–105
- Levy, D. E., and Lee, C. K. (2002) *J. Clin. Invest.* **109**, 1143–1148
- Bromberg, J. F., Horvath, C. M., Besser, D., Latham, W. W., and Darnell, J. E., Jr. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2553–2558
- Bromberg, J. F., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G., Albanese, C., and Darnell, J. E., Jr. (1999) *Cell* **98**, 295–303
- Wen, Z., Zhong, Z., and Darnell, J. E., Jr. (1995) *Cell* **82**, 241–250
- Giraud, S., Bienvenu, F., Avril, S., Gascan, H., Heery, D. M., and Coqueret, O. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 8004–8011
- Giraud, S., Hurlstone, A., Avril, S., and Coqueret, O. (2004) *Oncogene* **23**, 7391–7398
- Paulson, M., Pisharody, S., Pan, L., Guadagno, S., Mui, A. L., and Levy, D. E. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 25343–25349
- Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K., and Taga, T. (1999) *Science* **284**, 479–482
- Qin, H. R., Kim, H. J., Kim, J. Y., Hurt, E. M., Klarmann, G. J., Kawasaki, B. T., Duhagon Serrat, M. A., and Farrar, W. L. (2008) *Cancer Res.* **68**, 7736–7741
- Yang, J., Chatterjee-Kishore, M., Staugaitis, S. M., Nguyen, H., Schlessinger, K., Levy, D. E., and Stark, G. R. (2005) *Cancer Res.* **65**, 939–947
- Yang, J., Liao, X., Agarwal, M. K., Barnes, L., Auron, P. E., and Stark, G. R. (2007) *Genes Dev.* **21**, 1396–1408
- Lee, H., Herrmann, A., Deng, J. H., Kujawski, M., Niu, G., Li, Z., Forman, S., Jove, R., Pardoll, D. M., and Yu, H. (2009) *Cancer Cell* **15**, 283–293
- Barré, B., Vigneron, A., Perkins, N., Roninson, I. B., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2007) *Trends Mol. Med.* **13**, 4–11
- Sano, S., Chan, K. S., Kira, M., Kataoka, K., Takagi, S., Tarutani, M., Itami, S., Kiguchi, K., Yokoi, M., Sugawara, K., Mori, T., Hanaoka, F., Takeda, J., and DiGiovanni, J. (2005) *Cancer Res.* **65**, 5720–5729
- Shen, Y., Devgan, G., Darnell, J. E., Jr., and Bromberg, J. F. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 1543–1548
- Niu, G., Wright, K. L., Ma, Y., Wright, G. M., Huang, M., Irby, R., Briggs, J., Karras, J., Cress, W. D., Pardoll, D., Jove, R., Chen, J., and Yu, H. (2005) *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7432–7440
- Catlett-Falcone, R., Landowski, T. H., Oshiro, M. M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernández-Luna, J. L., Nuñez, G., Dalton, W. S., and Jove, R. (1999) *Immunity* **10**, 105–115
- Duan, Z., Foster, R., Bell, D. A., Mahoney, J., Wolak, K., Vaidya, A., Hampel, C., Lee, H., and Seiden, M. V. (2006) *Clin. Cancer Res.* **12**, 5055–5063
- Diaz, N., Minton, S., Cox, C., Bowman, T., Gritsko, T., Garcia, R., Eweis, I., Wloch, M., Livingston, S., Seijo, E., Cantor, A., Lee, J. H., Beam, C. A., Sullivan, D., Jove, R., and Muro-Cacho, C. A. (2006) *Clin. Cancer Res.* **12**, 20–28
- Gritsko, T., Williams, A., Turkson, J., Kaneko, S., Bowman, T., Huang, M., Nam, S., Eweis, I., Diaz, N., Sullivan, D., Yoder, S., Enkemann, S., Eschrich, S., Lee, J. H., Beam, C. A., Cheng, J., Minton, S., Muro-Cacho, C. A., and Jove, R. (2006) *Clin. Cancer Res.* **12**, 11–19
- Vigneron, A., Roninson, I. B., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2005) *Cancer Res.* **65**, 8927–8935
- Vigneron, A., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2008) *Cancer Res.* **68**, 815–825
- Dhavan, R., and Tsai, L. H. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 749–759
- Gong, X., Tang, X., Wiedmann, M., Wang, X., Peng, J., Zheng, D., Blair, L. A., Marshall, J., and Mao, Z. (2003) *Neuron* **38**, 33–46
- Wang, C. X., Song, J. H., Song, D. K., Yong, V. W., Shuaib, A., and Hao, C. (2006) *Cell Death Differ.* **13**, 1203–1212
- Vigneron, A., Chierier, J., Barré, B., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 34742–34750
- Le, H. V., Minn, A. J., and Massagué, J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 32018–32025
- Turner, N. C., Lord, C. J., Iorns, E., Brough, R., Swift, S., Elliott, R., Rayter, S., Tutt, A. N., and Ashworth, A. (2008) *EMBO J.* **27**, 1368–1377
- Tian, B., Yang, Q., and Mao, Z. (2009) *Nat. Cell Biol.* **11**, 211–218
- Alexander, K., Yang, H. S., and Hinds, P. W. (2004) *Mol. Cell. Biol.* **24**, 2808–2819
- Yang, H. S., and Hinds, P. W. (2003) *Mol. Cell* **11**, 1163–1176
- Fu, A. K., Fu, W. Y., Ng, A. K., Chien, W. W., Ng, Y. P., Wang, J. H., and Ip, N. Y. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 6728–6733
- Lee, J. H., Jeong, M. W., Kim, W., Choi, Y. H., and Kim, K. T. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 19826–19835
- Leslie, K., Lang, C., Devgan, G., Azare, J., Berishaj, M., Gerald, W., Kim, Y. B., Paz, K., Darnell, J. E., Albanese, C., Sakamaki, T., Pestell, R., and Bromberg, J. (2006) *Cancer Res.* **66**, 2544–2552

**The cdk5-STAT3-Eme1 Pathway Prevents DNA Damage**

37. Lo, H. W., Hsu, S. C., Ali-Seyed, M., Gunduz, M., Xia, W., Wei, Y., Bartholomeusz, G., Shih, J. Y., and Hung, M. C. (2005) *Cancer Cell* **7**, 575–589
38. Kiuchi, N., Nakajima, K., Ichiba, M., Fukada, T., Narimatsu, M., Mizuno, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1999) *J. Exp. Med.* **189**, 63–73
39. Bowman, T., Broome, M. A., Sinibaldi, D., Wharton, W., Pledger, W. J., Sedivy, J. M., Irby, R., Yeatman, T., Courtneidge, S. A., and Jove, R. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 7319–7324
40. Barré, B., Avril, S., and Coqueret, O. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 2990–2996
41. Barré, B., Vigneron, A., and Coqueret, O. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 15673–15681
42. Dendouga, N., Gao, H., Moechars, D., Janicot, M., Vialard, J., and McGowan, C. H. (2005) *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7569–7579
43. Osman, F., and Whitby, M. C. (2007) *DNA Repair* **6**, 1004–1017
44. Pommier, Y., Redon, C., Rao, V. A., Seiler, J. A., Sordet, O., Takemura, H., Antony, S., Meng, L., Liao, Z., Kohlhagen, G., Zhang, H., and Kohn, K. W. (2003) *Mutat. Res.* **532**, 173–203
45. Chatterjee-Kishore, M., Wright, K. L., Ting, J. P., and Stark, G. R. (2000) *EMBO J.* **19**, 4111–4122
46. Townsend, P. A., Cragg, M. S., Davidson, S. M., McCormick, J., Barry, S., Lawrence, K. M., Knight, R. A., Hubank, M., Chen, P. L., Latchman, D. S., and Stephanou, A. (2005) *J. Cell Sci.* **118**, 1629–1639
47. Thomas, M., Finnegan, C. E., Rogers, K. M., Purcell, J. W., Trimble, A., Johnston, P. G., and Boland, M. P. (2004) *Cancer Res.* **64**, 8357–8364
48. Slupianek, A., Schmutte, C., Tomblin, G., Nieborowska-Skorska, M., Hoser, G., Nowicki, M. O., Pierce, A. J., Fishel, R., and Skorski, T. (2001) *Mol. Cell* **8**, 795–806
49. Slupianek, A., Hoser, G., Majsterek, I., Bronisz, A., Malecki, M., Blasiak, J., Fishel, R., and Skorski, T. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4189–4201
50. Shields, B. J., Hauser, C., Bukczynska, P. E., Court, N. W., and Tiganis, T. (2008) *Cancer Cell* **14**, 166–179
51. Vafa, O., Wade, M., Kern, S., Beeche, M., Pandita, T. K., Hampton, G. M., and Wahl, G. M. (2002) *Mol. Cell* **9**, 1031–1044
52. Campbell, K. J., Witty, J. M., Rocha, S., and Perkins, N. D. (2006) *Cancer Res.* **66**, 929–935
53. Lin, H., Chen, M. C., Chiu, C. Y., Song, Y. M., and Lin, S. Y. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 2776–2784
54. Flørenes, V. A., Lu, C., Bhattacharya, N., Rak, J., Sheehan, C., Slingerland, J. M., and Kerbel, R. S. (1999) *Oncogene* **18**, 1023–1032
55. Bienvenu, F., Barre, B., Giraud, S., Avril, S., and Coqueret, O. (2005) *Mol. Biol. Cell* **16**, 1850–1858
56. Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., and Lowe, S. W. (2002) *Cell* **108**, 153–164
57. Henderson, B. W., Daroqui, C., Tracy, E., Vaughan, L. A., Loewen, G. M., Cooper, M. T., and Baumann, H. (2007) *Clin. Cancer Res.* **13**, 3156–3163
58. Benekli, M., Baumann, H., and Wetzler, M. (2009) *J. Clin. Oncol.* **27**, 4422–4432

## Chapitre III : Discussion

Ce travail a permis de mettre en évidence le rôle de la phosphorylation de la sérine 727 de STAT3 lors d'un traitement de chimiothérapie, ainsi que la kinase qui permet cette activation. À la suite d'un traitement au sn38, STAT3 est phosphorylée sur sa sérine 727 par Cdk5 permettant la transcription de Eme1, un gène impliqué dans la réparation de l'ADN.

Dans les deux précédentes parties, nous avons discuté le rôle de l'EMT dans l'échappement à la sénescence induite par l'oncogène Ras dans les cellules HT29. Dans cette dernière partie, nous avons observé que ces mêmes cellules étaient capables de répondre à un traitement de chimiothérapie par l'induction de la réparation de l'ADN. Lors de l'induction de l'oncogène Ras ainsi que lors du traitement génotoxique au sn38, les cellules présentent de nombreux dommages de l'ADN. Bien que les réponses que nous avons étudiées au cours de ces deux études soient différentes, nous avons observé que dans ces deux modèles, les cellules mettaient en place un système d'échappement et de résistance, respectivement contre l'oncogène et contre le traitement génotoxique. Les mécanismes induits permettent aux cellules de progresser dans le cycle cellulaire et de poursuivre le développement tumoral malgré un stress oncogénique ou un traitement anticancéreux.

Au cours de ce travail, nous avons également mesuré l'expression de Cdk5 à la suite de l'induction de H-RasV12. Contrairement au sn38, l'oncogène Ras induit la diminution de l'expression de Cdk5. Cette donnée concorde avec le fait que nous observions de nombreux dommages de l'ADN à la suite de l'échappement à l'OIS alors que lors des cassures induites par le sn38, les cellules activent les mécanismes de réparation de l'ADN grâce à Cdk5. Ces deux mécanismes de résistance ou d'échappement sont donc différents. Dans le cas du traitement au sn38, les cellules HT29 répondent aux cassures de l'ADN par la mise en place des mécanismes d'apoptose, alors que des cellules HCT116 exprimant une forme mutée de Ras répondent par l'induction de la sénescence. Dans les cellules HT29 traitées au sn38, l'induction de Cdk5 permet de contrer la mort cellulaire par la réparation des cassures. En revanche, dans ces mêmes cellules, l'expression d'une forme oncogénique de Ras permet l'échappement à la sénescence induite par les cassures de l'ADN (elles-mêmes provoquées par Ras). En résumé, nous pouvons faire l'hypothèse que, si l'oncogène Ras permet l'échappement à l'OIS, il pourrait également induire l'échappement à la sénescence

induite par les traitements. Lors d'un traitement génotoxique, il contribuerait alors à diriger les cellules vers ce type de réponse plutôt que vers l'induction de l'apoptose pour permettre l'échappement.

H-RasV12 diminue l'expression de Cdk5 empêchant ainsi l'activation des voies de réparation de l'ADN. En effet, nous avons observé de nombreuses cassures de l'ADN dans les cellules ayant échappé à l'OIS. L'instabilité génomique ainsi générée contribue probablement à l'apparition de l'EMT et de l'échappement. La diminution de Cdk5 serait alors un événement moteur de la progression tumorale.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

La protéine Ras est l'oncogène le plus fréquemment muté et constitutivement activé dans les cancers. L'activation de ses voies sous-jacentes conduit à l'augmentation de la prolifération, à l'activation des voies de survie cellulaire ainsi qu'à la résistance aux traitements anticancéreux.

Au cours de cette étude nous avons observé l'induction de la sénescence à la suite de l'expression oncogénique de Ras. Nous avons montré que l'OIS était conservée dans des cellules transformées malgré l'absence de certaines des protéines responsables de l'arrêt du cycle cellulaire et de la sénescence. Toutefois, cette barrière contre la progression tumorale n'est pas suffisante et nous avons observé que certaines cellules échappent à la sénescence et recommencent à proliférer. Cet échappement est corrélé à l'apparition d'un phénotype de cellules mésenchymateuses et l'apparition d'une population de cellules souches. Nous avons émis l'hypothèse que la transition épithélio-mésenchymateuse était responsable de l'échappement à l'OIS et que cette transition était possible grâce à la perte de l'expression de p21Waf1. Nous avons également observé que la survie des cellules ayant échappé à l'OIS était dépendante des protéines anti-apoptotiques Bcl-Xl et Mcl1.

Les cellules ayant échappé à l'OIS ont accumulé de nombreux dommages de l'ADN dus à l'expression oncogénique de Ras. Une forte instabilité génomique s'est alors créée et il est probable que ces cellules – dont certaines se sont dédifférenciées et présentent les caractéristiques de cellules souches – aient acquis une résistance aux traitements anticancéreux. De plus, ces cellules ont subi une EMT et il a été montré que cet événement ainsi que l'apparition de cellules souches cancéreuses augmentaient la résistance aux traitements anti-tumoraux.

Il serait intéressant d'étudier l'influence de l'oncogène Ras sur la réponse à un traitement génotoxique. Nous avons montré que l'échappement à l'OIS était corrélé à l'apparition de l'EMT. Dans le prolongement de cette idée, nous pourrions étudier le rôle de l'EMT dans l'échappement et l'apparition de la résistance au traitement. De la même manière que lors d'un stress oncogénique, les cellules traitées à l'aide d'un agent génotoxique subissent des cassures de l'ADN. Si l'EMT permet l'échappement à l'OIS à la suite de dommages de l'ADN et en présence de l'oncogène Ras, alors il pourrait permettre aux cellules traitées d'échapper à la mort cellulaire induite par les cassures et de se dédifférencier pour augmenter leur résistance aux traitements. Un modèle cellulaire en particulier serait approprié pour cette étude. Les cellules HCT116 sont mutées sur le gène de K-Ras. L'équipe

de Sasazuki a effectué une recombinaison homologue du gène de K-Ras et a remplacé le gène muté par une forme non-mutée de K-Ras. Cette lignée a été nommée Hke3 (Shirasawa *et al.*, 1993). Considérée en comparaison de la lignée HCT116, elle constituerait un excellent modèle d'étude de l'influence de l'oncogène Ras sur l'EMT et sur l'échappement à la sénescence induite par les traitements.

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle certaines cellules sénescents expriment des facteurs permettant aux autres d'échapper à l'POIS et de maintenir l'activation du cycle cellulaire. Cette hypothèse pourrait s'étendre à l'échappement à la sénescence induite par les traitements. Il serait intéressant d'observer la réponse des cellules au sn38 en présence de surnageant de cultures des cellules exprimant l'oncogène Ras et en phase de réponse au stress oncogénique. Si l'hypothèse émise se vérifie, les cellules devraient répondre à ces stimuli par l'échappement à la sénescence.

Le rôle de p21Waf1 dans la régulation de l'EMT reste à établir. La perte de son expression est probablement nécessaire à l'induction de ce phénomène. Afin de le déterminer, nous pourrions réintroduire p21Waf1 dans les cellules ayant subi une EMT et mesurer l'expression des marqueurs de ce processus. Il est probable que p21Waf1 inhibe directement l'expression de certains marqueurs de la même manière que ce qui est décrit pour l'inhibition de la E-cadhérine.

Cette étude contribue à la description des voies de réponses et d'échappement à l'oncogène Ras et appuie l'intérêt de développer des inhibiteurs de cette voie et notamment des inhibiteurs des MAP Kinases, voie largement impliquée dans la progression tumorale. L'utilisation d'inhibiteurs des MAP Kinases pourrait être particulièrement intéressante lors de l'utilisation de traitements génotoxiques. En effet, si les cellules qui présentent une mutation de Ras et une activation constitutive de la voie des MAP Kinases sont capables d'échapper à la sénescence en induisant l'EMT, alors il se peut que l'apparition de la résistance aux traitements des tumeurs mutées sur le gène de Ras passe par ce processus. De plus, si les cellules mutées sur Ras échappent à l'arrêt du cycle en induisant une EMT, elles deviennent alors capables d'envahir le tissu adjacent et les organes à distance pour former des métastases.

Au cours de ce travail nous avons vu l'importance de la voie Ras/MAP Kinase dans la tumorigenèse ainsi que de la voie Cdk5/STAT3 dans la résistance au traitement anticancéreux. Nous pourrions proposer un dépistage précoce systématique des tumeurs afin

de déterminer la meilleure approche possible dans le traitement des tumeurs colorectales. Par exemple, la détection de la forme phosphorylée de STAT3 et de l'expression de ces gènes cibles permettrait d'éviter de traiter des tumeurs à l'aide de chimiothérapies génotoxiques inefficaces (Barre *et al.*, 2007 ; Henderson *et al.*, 2007). La détection précoce du statut de *KRAS*, permettrait, quant à elle, d'appréhender la capacité d'invasion de la tumeur dans le tissu ainsi que sa capacité à former des métastases. Le développement des thérapies ciblant la protéine STAT3 ou la voie Ras/MAP kinase pourrait permettre une meilleure prise en charge des tumeurs ayant activé ces voies. L'utilisation d'inhibiteurs de STAT3 associée à de l'irinotecan pourrait permettre de limiter la réparation de l'ADN et ainsi, améliorer l'efficacité du génotoxique sur la tumeur. Aussi, l'emploi d'inhibiteur de Ras ou de la voie des MAP Kinases pourrait permettre de limiter la progression du cancer.

## BIBLIOGRAPHIE



- Abbas T and Dutta A (2009) *p21 in cancer: intricate networks and multiple activities*. **Nat Rev Cancer** 9: 400-414
- Abbas T, Sivaprasad U, Terai K, Amador V, Pagano M and Dutta A (2008) *PCNA-dependent regulation of p21 ubiquitylation and degradation via the CRL4Cdt2 ubiquitin ligase complex*. **Genes Dev** 22: 2496-2506
- Acosta JC, O'Loghlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, Fumagalli M, Da Costa M, Brown C, Popov N, Takatsu Y, Melamed J, d'Adda di Fagagna F, Bernard D, Hernando E and Gil J (2008) *Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence*. **Cell** 133: 1006-1018
- Adachi Y, Shibai Y, Mitsushita J, Shang WH, Hirose K and Kamata T (2008) *Oncogenic Ras upregulates NADPH oxidase 1 gene expression through MEK-ERK-dependent phosphorylation of GATA-6*. **Oncogene** 27: 4921-4932
- Ahmed N, Abubaker K, Findlay J and Quinn M (2010) *Epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes facilitate chemoresistance in recurrent ovarian cancer*. **Curr Cancer Drug Targets** 10: 268-278
- Aigner K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M, Mikulits W, Brabletz T, Strand D, Obrist P, Sommergruber W, Schweifer N, Wernitznig A, Beug H, Foisner R and Eger A (2007) *The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity*. **Oncogene** 26: 6979-6988
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ and Clarke MF (2003) *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100: 3983-3988
- Alexander K, Yang HS and Hinds PW (2004) *Cellular senescence requires CDK5 repression of Rac1 activity*. **Mol Cell Biol** 24: 2808-2819
- Ali BR, Nouvel I, Leung KF, Hume AN and Seabra MC (2010) *A novel statin-mediated "prenylation block-and-release" assay provides insight into the membrane targeting mechanisms of small GTPases*. **Biochem Biophys Res Commun**

- Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, Thomas C, Fauvet F, Puisieux I, Doglioni C, Piccinin S, Maestro R, Voeltzel T, Selmi A, Valsesia-Wittmann S, Caron de Fromental C and Puisieux A (2008) *Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence.* **Cancer Cell** 14: 79-89
- Arima Y, Inoue Y, Shibata T, Hayashi H, Nagano O, Saya H and Taya Y (2008) *Rb depletion results in deregulation of E-cadherin and induction of cellular phenotypic changes that are characteristic of the epithelial-to-mesenchymal transition.* **Cancer Res** 68: 5104-5112
- Arlt MF and Glover TW (2010) *Inhibition of topoisomerase I prevents chromosome breakage at common fragile sites.* **DNA Repair (Amst)** 9: 678-689
- Arnold CN, Goel A, Niedzwiecki D, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM and Boland CR (2004) *APC promoter hypermethylation contributes to the loss of APC expression in colorectal cancers with allelic loss on 5q.* **Cancer Biol Ther** 3: 960-964
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD and Lake RJ (1999) *Notch signaling: cell fate control and signal integration in development.* **Science** 284: 770-776
- Auerkari EI (2006) *Methylation of tumor suppressor genes p16(INK4a), p27(Kip1) and E-cadherin in carcinogenesis.* **Oral Oncol** 42: 5-13

~ B ~

- Barbacid M (1987) *ras genes.* **Annu Rev Biochem** 56: 779-827
- Barre B, Avril S and Coqueret O (2003) *Opposite regulation of myc and p21waf1 transcription by STAT3 proteins.* **J Biol Chem** 278: 2990-2996
- Barre B, Vigneron A, Perkins N, Roninson IB, Gamelin E and Coqueret O (2007) *The STAT3 oncogene as a predictive marker of drug resistance.* **Trends Mol Med** 13: 4-11
- Bartel F, Harris LC, Wurl P and Taubert H (2004) *MDM2 and its splice variant messenger RNAs: expression in tumors and down-regulation using antisense oligonucleotides.* **Mol Cancer Res** 2: 29-35

- Bartkova J, Rezaei N, Lontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, Vassiliou LV, Kolettas E, Niforou K, Zoumpourlis VC, Takaoka M, Nakagawa H, Tort F, Fugger K, Johansson F, Sehested M, Andersen CL, Dyrskjot L, Orntoft T, Lukas J *et al.* (2006) *Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints*. **Nature** 444: 633-637
- Battle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J and Garcia De Herreros A (2000) *The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells*. **Nat Cell Biol** 2: 84-89
- Batsche E, Muchardt C, Behrens J, Hurst HC and Cremisi C (1998) *RB and c-Myc activate expression of the E-cadherin gene in epithelial cells through interaction with transcription factor AP-2*. **Mol Cell Biol** 18: 3647-3658
- Battula VL, Evans KW, Hollier BG, Shi Y, Marini FC, Ayyanan A, Wang RY, Brisken C, Guerra R, Andreeff M and Mani SA (2010) *Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells*. **Stem Cells** 28: 1435-1445
- Benjamin CL and Ananthaswamy HN (2008) *Oncogenic potential of BRAF versus RAS*. **Cancer Lett** 261: 137-146
- Bharadwaj R and Yu H (2004) *The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer*. **Oncogene** 23: 2016-2027
- Bihani T, Mason DX, Jackson TJ, Chen SC, Boettner B and Lin AW (2004) *Differential oncogenic Ras signaling and senescence in tumor cells*. **Cell Cycle** 3: 1201-1207
- Billottet C, Tuefferd M, Gentien D, Rapinat A, Thiery JP, Broet P and Jouanneau J (2008) *Modulation of several waves of gene expression during FGF-1 induced epithelial-mesenchymal transition of carcinoma cells*. **J Cell Biochem** 104: 826-839
- Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J and Terzis AJ (2005) *Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights*. **Nat Rev Cancer** 5: 899-904
- Blow JJ and Dutta A (2005) *Preventing re-replication of chromosomal DNA*. **Nat Rev Mol Cell Biol** 6: 476-486
- Bocchetta M, Miele L, Pass HI and Carbone M (2003) *Notch-1 induction, a novel activity of SV40 required for growth of SV40-transformed human mesothelial cells*. **Oncogene** 22: 81-89

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

Boiko AD, Porteous S, Razorenova OV, Krivokrysenko VI, Williams BR and Gudkov AV (2006) *A systematic search for downstream mediators of tumor suppressor function of p53 reveals a major role of BTG2 in suppression of Ras-induced transformation*. **Genes Dev** 20: 236-252

Boman BM and Wicha MS (2008) *Cancer stem cells: a step toward the cure*. **J Clin Oncol** 26: 2795-2799

Bos JL (1989) *ras oncogenes in human cancer: a review*. **Cancer Res** 49: 4682-4689

Bravou V, Nishitani H, Song SY, Taraviras S and Varakis J (2005) *Expression of the licensing factors, Cdt1 and Geminin, in human colon cancer*. **Int J Oncol** 27: 1511-1518

Bulavin DV and Fornace AJ, Jr. (2004) *p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor*. **Adv Cancer Res** 92: 95-118

Bulavin DV, Higashimoto Y, Popoff IJ, Gaarde WA, Basrur V, Potapova O, Appella E and Fornace AJ, Jr. (2001) *Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase*. **Nature** 411: 102-107

~ C ~

Cairns P, Proctor AJ and Knowles MA (1991) *Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma*. **Oncogene** 6: 2305-2309

Campisi J (2005) *Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors*. **Cell** 120: 513-522

Campisi J and d'Adda di Fagnana F (2007) *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*. **Nat Rev Mol Cell Biol** 8: 729-740

Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F and Nieto MA (2000) *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. **Nat Cell Biol** 2: 76-83

- Capobianco AJ, Zagouras P, Blaumueller CM, Artavanis-Tsakonas S and Bishop JM (1997) *Neoplastic transformation by truncated alleles of human NOTCH1/TAN1 and NOTCH2. Mol Cell Biol* 17: 6265-6273
- Carver EA, Jiang R, Lan Y, Oram KF and Gridley T (2001) *The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. Mol Cell Biol* 21: 8184-8188
- Casper AM, Nghiem P, Arlt MF and Glover TW (2002) *ATR regulates fragile site stability. Cell* 111: 779-789
- Chan SR and Blackburn EH (2004) *Telomeres and telomerase. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359: 109-121
- Chen X, Mariappan SV, Catasti P, Ratliff R, Moyzis RK, Laayoun A, Smith SS, Bradbury EM and Gupta G (1995) *Hairpins are formed by the single DNA strands of the fragile X triplet repeats: structure and biological implications. Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5199-5203
- Chen Y, Fischer WH and Gill GN (1997) *Regulation of the ERBB-2 promoter by RBPJkappa and NOTCH. J Biol Chem* 272: 14110-14114
- Chene P (2003) *Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. Nat Rev Cancer* 3: 102-109
- Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M and Scadden DT (2000) *Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. Science* 287: 1804-1808
- Child ES and Mann DJ (2006) *The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability. Cell Cycle* 5: 1313-1319
- Chomczynski P and Sacchi N (2006) *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nat Protoc* 1: 581-585
- Cole MF, Johnstone SE, Newman JJ, Kagey MH and Young RA (2008) *Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. Genes Dev* 22: 746-755
- Colicelli J (2004) *Human RAS superfamily proteins and related GTPases. Sci STKE* 2004: RE13
- Collado M and Serrano M (2010) *Senescence in tumours: evidence from mice and humans. Nat Rev Cancer* 10: 51-57

- Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D and van Roy F (2001) *The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion*. **Mol Cell** 7: 1267-1278
- Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, Blechman J, Savagner P and Ben-Ze'ev A (2003) *Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK*. **J Cell Biol** 163: 847-857
- Contreras HR, Ledezma RA, Vergara J, Cifuentes F, Barra C, Cabello P, Gallegos I, Morales B, Huidobro C and Castellon EA (2010) *The expression of syndecan-1 and -2 is associated with Gleason score and epithelial-mesenchymal transition markers, E-cadherin and beta-catenin, in prostate cancer*. **Urol Oncol** 28: 534-540
- Copeland WC, Wachsman JT, Johnson FM and Penta JS (2002) *Mitochondrial DNA alterations in cancer*. **Cancer Invest** 20: 557-569
- Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY and Campisi J (2008) *Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor*. **PLoS Biol** 6: 2853-2868
- Coqueret O and Gascan H (2000) *Functional interaction of STAT3 transcription factor with the cell cycle inhibitor p21WAF1/CIP1/SDI1*. **J Biol Chem** 275: 18794-18800
- Cornell RA and Eisen JS (2005) *Notch in the pathway: the roles of Notch signaling in neural crest development*. **Semin Cell Dev Biol** 16: 663-672
- Cuadrado A and Nebreda AR (2010) *Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling*. **Biochem J** 429: 403-417
- Cuenda A and Rousseau S (2007) *p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases*. **Biochim Biophys Acta** 1773: 1358-1375

~ D ~

- d'Adda di Fagagna F (2008) *Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response*. **Nat Rev Cancer** 8: 512-522

- d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP and Jackson SP (2003) *A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. Nature* 426: 194-198
- D'Attri F, Nadalutti F and Citi S (2002) *Evidence for a functional interaction between cingulin and ZO-1 in cultured cells. J Biol Chem* 277: 27757-27764
- Dang CV, Li F and Lee LA (2005) *Could MYC induction of mitochondrial biogenesis be linked to ROS production and genomic instability? Cell Cycle* 4: 1465-1466
- Dankort D, Filenova E, Collado M, Serrano M, Jones K and McMahon M (2007) *A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. Genes Dev* 21: 379-384
- Dardik A, Smith RM and Schultz RM (1992) *Colocalization of transforming growth factor- $\alpha$  and a functional epidermal growth factor receptor (EGFR) to the inner cell mass and preferential localization of the EGFR on the basolateral surface of the trophectoderm in the mouse blastocyst. Dev Biol* 154: 396-409
- De la Cueva E, Garcia-Cao I, Herranz M, Lopez P, Garcia-Palencia P, Flores JM, Serrano M, Fernandez-Piqueras J and Martin-Caballero J (2006) *Tumorigenic activity of p21Waf1/Cip1 in thymic lymphoma. Oncogene* 25: 4128-4132
- Delavaine L and La Thangue NB (1999) *Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1. Oncogene* 18: 5381-5392
- Deng Q, Liao R, Wu BL and Sun P (2004) *High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts. J Biol Chem* 279: 1050-1059
- Der CJ, Krontiris TG and Cooper GM (1982) *Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 3637-3640
- Devgan V, Mammucari C, Millar SE, Brisken C and Dotto GP (2005) *p21WAF1/Cip1 is a negative transcriptional regulator of Wnt4 expression downstream of Notch1 activation. Genes Dev* 19: 1485-1495
- Dhavan R and Tsai LH (2001) *A decade of CDK5. Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 749-759

- Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, Schurra C, Garre M, Nuciforo PG, Bensimon A, Maestro R, Pelicci PG and d'Adda di Fagagna F (2006) *Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication*. **Nature** 444: 638-642
- Doak SH, Jenkins GJ, Parry EM, Griffiths AP, Baxter JN and Parry JM (2004) *Differential expression of the MAD2, BUB1 and HSP27 genes in Barrett's oesophagus-their association with aneuploidy and neoplastic progression*. **Mutat Res** 547: 133-144
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS and Bradley A (1992) *Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours*. **Nature** 356: 215-221
- Downward J (2003) *Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy*. **Nat Rev Cancer** 3: 11-22
- Duesberg PH, Martin GS and Vogt PK (1970) *Glycoprotein components of avian and murine RNA tumor viruses*. **Virology** 41: 631-646

~ E ~

- Eastham AM, Spencer H, Soncin F, Ritson S, Merry CL, Stern PL and Ward CM (2007) *Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation*. **Cancer Res** 67: 11254-11262
- Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, Berx G, Cano A, Beug H and Foisner R (2005) *DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells*. **Oncogene** 24: 2375-2385
- Ekholm-Reed S, Mendez J, Tedesco D, Zetterberg A, Stillman B and Reed SI (2004) *Deregulation of cyclin E in human cells interferes with prereplication complex assembly*. **J Cell Biol** 165: 789-800
- Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD and Sklar J (1991) *TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms*. **Cell** 66: 649-661

Entz-Werle N, Stoetzel C, Berard-Marec P, Kalifa C, Brugiere L, Pacquement H, Schmitt C, Tabone MD, Gentet JC, Quillet R, Oudet P, Lutz P, Babin-Boilletot A, Gaub MP and Perrin-Schmitt F (2005) *Frequent genomic abnormalities at TWIST in human pediatric osteosarcomas*. **Int J Cancer** 117: 349-355

Eytan E, Braunstein I, Ganoth D, Teichner A, Hittle JC, Yen TJ and Hershko A (2008) *Two different mitotic checkpoint inhibitors of the anaphase-promoting complex/cyclosome antagonize the action of the activator Cdc20*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105: 9181-9185

~ F ~

Feng MY, Wang K, Song HT, Yu HW, Qin Y, Shi QT and Geng JS (2009) *Metastasis-induction and apoptosis-protection by TWIST in gastric cancer cells*. **Clin Exp Metastasis** 26: 1013-1023

Fevr T, Robine S, Louvard D and Huelsken J (2007) *Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells*. **Mol Cell Biol** 27: 7551-7559

Fink L, Seeger W, Ermert L, Hanze J, Stahl U, Grimminger F, Kummer W and Bohle RM (1998) *Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking*. **Nat Med** 4: 1329-1333

Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M and Levine AJ (1988) *Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life*. **Mol Cell Biol** 8: 531-539

Fitzgerald K, Harrington A and Leder P (2000) *Ras pathway signals are required for notch-mediated oncogenesis*. **Oncogene** 19: 4191-4198

Frescas D and Pagano M (2008) *Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer*. **Nat Rev Cancer** 8: 438-449

Fryer CJ, Lamar E, Turbachova I, Kintner C and Jones KA (2002) *Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex*. **Genes Dev** 16: 1397-1411

Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, Leddy HE, Behrens J, Sommer T and Birchmeier W (2002) *Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex*. **Nat Cell Biol** 4: 222-231

Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, Ivanova EV, Bronson RT and Pellman D (2005) *Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells*. **Nature** 437: 1043-1047

~ G ~

Gangemi R, Paleari L, Orengo AM, Cesario A, Chessa L, Ferrini S and Russo P (2009) *Cancer stem cells: a new paradigm for understanding tumor growth and progression and drug resistance*. **Curr Med Chem** 16: 1688-1703

Gartel AL (2005) *The conflicting roles of the cdk inhibitor p21(CIP1/WAF1) in apoptosis*. **Leuk Res** 29: 1237-1238

Gil J, Bernard D, Martinez D and Beach D (2004) *Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan*. **Nat Cell Biol** 6: 67-72

Girard L, Hanna Z, Beaulieu N, Hoemann CD, Simard C, Kozak CA and Jolicoeur P (1996) *Frequent provirus insertional mutagenesis of Notch1 in thymomas of MMTVD/myc transgenic mice suggests a collaboration of c-myc and Notch1 for oncogenesis*. **Genes Dev** 10: 1930-1944

Giroldi LA, Bringuier PP, de Weijert M, Jansen C, van Bokhoven A and Schalken JA (1997) *Role of E boxes in the repression of E-cadherin expression*. **Biochem Biophys Res Commun** 241: 453-458

Gisselsson D, Jonson T, Petersen A, Strombeck B, Dal Cin P, Hoglund M, Mitelman F, Mertens F and Mandahl N (2001) *Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98: 12683-12688

Glover TW (2006) *Common fragile sites*. **Cancer Lett** 232: 4-12

Goedert M, Hasegawa J, Craxton M, Leversha MA and Clegg S (1997) *Assignment of the human stress-activated protein kinase-3 gene (SAPK3) to chromosome 22q13.3 by fluorescence in situ hybridization*. **Genomics** 41: 501-502

Goel VK, Ibrahim N, Jiang G, Singhal M, Fee S, Flotte T, Westmoreland S, Haluska FS, Hinds PW and Haluska FG (2009) *Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice*. **Oncogene** 28: 2289-2298

- Gorgoulis VG and Halazonetis TD (2010) *Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response*. **Curr Opin Cell Biol**
- Gottifredi V, Karni-Schmidt O, Shieh SS and Prives C (2001) *p53 down-regulates CHK1 through p21 and the retinoblastoma protein*. **Mol Cell Biol** 21: 1066-1076
- Gratchev A (2008) *The nucleotide excision repair of DNA in human cells and its association with xeroderma pigmentosum*. **Adv Exp Med Biol** 637: 113-119
- Gregorieff A and Clevers H (2005) *Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer*. **Genes Dev** 19: 877-890
- Grottkau BE, Chen XR, Friedrich CC, Yang XM, Jing W, Wu Y, Cai XX, Liu YR, Huang YD and Lin YF (2009) *DAPT enhances the apoptosis of human tongue carcinoma cells*. **Int J Oral Sci** 1: 81-89
- Guney I, Wu S and Sedivy JM (2006) *Reduced c-Myc signaling triggers telomere-independent senescence by regulating Bmi-1 and p16(INK4a)*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103: 3645-3650

~ H ~

- Hajra KM, Chen DY and Fearon ER (2002) *The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer*. **Cancer Res** 62: 1613-1618
- Halevy O, Michalovitz D and Oren M (1990) *Different tumor-derived p53 mutants exhibit distinct biological activities*. **Science** 250: 113-116
- Han J, Lee JD, Bibbs L and Ulevitch RJ (1994) *A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells*. **Science** 265: 808-811
- Han J and Sun P (2007) *The pathways to tumor suppression via route p38*. **Trends Biochem Sci** 32: 364-371
- Hanahan D and Weinberg RA (2000) *The hallmarks of cancer*. **Cell** 100: 57-70
- Harms K, Nozell S and Chen X (2004) *The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors*. **Cell Mol Life Sci** 61: 822-842

- Harreman MT, Kline TM, Milford HG, Harben MB, Hodel AE and Corbett AH (2004) *Regulation of nuclear import by phosphorylation adjacent to nuclear localization signals.* **J Biol Chem** 279: 20613-20621
- Hartlerode AJ and Scully R (2009) *Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells.* **Biochem J** 423: 157-168
- Hayflick L (1965) *The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains.* **Exp Cell Res** 37: 614-636
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B and Kinzler KW (1998) *Identification of c-MYC as a target of the APC pathway.* **Science** 281: 1509-1512
- Hellman A, Rahat A, Scherer SW, Darvasi A, Tsui LC and Kerem B (2000) *Replication delay along FRA7H, a common fragile site on human chromosome 7, leads to chromosomal instability.* **Mol Cell Biol** 20: 4420-4427
- Henderson BW, Daroqui C, Tracy E, Vaughan LA, Loewen GM, Cooper MT and Baumann H (2007) *Cross-linking of signal transducer and activator of transcription 3--a molecular marker for the photodynamic reaction in cells and tumors.* **Clin Cancer Res** 13: 3156-3163
- Hennig G, Behrens J, Truss M, Frisch S, Reichmann E and Birchmeier W (1995) *Progression of carcinoma cells is associated with alterations in chromatin structure and factor binding at the E-cadherin promoter in vivo.* **Oncogene** 11: 475-484
- Henrique D, Hirsinger E, Adam J, Le Roux I, Pourquie O, Ish-Horowicz D and Lewis J (1997) *Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina.* **Curr Biol** 7: 661-670
- Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ and Sedivy JM (2004) *Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a).* **Mol Cell** 14: 501-513
- Hewett DR, Handt O, Hobson L, Mangelsdorf M, Eyre HJ, Baker E, Sutherland GR, Schuffenhauer S, Mao JI and Richards RI (1998) *FRA10B structure reveals common elements in repeat expansion and chromosomal fragile site genesis.* **Mol Cell** 1: 773-781
- Ho JS, Ma W, Mao DY and Benchimol S (2005) *p53-Dependent transcriptional repression of c-myc is required for G1 cell cycle arrest.* **Mol Cell Biol** 25: 7423-7431

- Hoek K, Rimm DL, Williams KR, Zhao H, Ariyan S, Lin A, Kluger HM, Berger AJ, Cheng E, Trombetta ES, Wu T, Niinobe M, Yoshikawa K, Hannigan GE and Halaban R (2004) *Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. Cancer Res* 64: 5270-5282
- Hsieh JJ, Henkel T, Salmon P, Robey E, Peterson MG and Hayward SD (1996) *Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. Mol Cell Biol* 16: 952-959
- Hu CT, Wu JR, Chang TY, Cheng CC and Wu WS (2008) *The transcriptional factor Snail simultaneously triggers cell cycle arrest and migration of human hepatoma HepG2. J Biomed Sci* 15: 343-355
- Hui L, Bakiri L, Stepniak E and Wagner EF (2007) *p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis. Cell Cycle* 6: 2429-2433
- Hyafil F, Morello D, Babinet C and Jacob F (1980) *A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. Cell* 21: 927-934
- Hydbring P, Bahram F, Su Y, Tronnorsjo S, Hogstrand K, von der Lehr N, Sharifi HR, Lilischkis R, Hein N, Wu S, Vervoorts J, Henriksson M, Grandien A, Luscher B and Larsson LG (2010) *Phosphorylation by Cdk2 is required for Myc to repress Ras-induced senescence in cotransformation. Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 58-63
- Hyslop L, Stojkovic M, Armstrong L, Walter T, Stojkovic P, Przyborski S, Herbert M, Murdoch A, Strachan T and Lako M (2005) *Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. Stem Cells* 23: 1035-1043
- ~ I ~
- Imbriano C, Gurtner A, Cocchiarella F, Di Agostino S, Basile V, Gostissa M, Dobbstein M, Del Sal G, Piaggio G and Mantovani R (2005) *Direct p53 transcriptional repression: in vivo analysis of CCAAT-containing G2/M promoters. Mol Cell Biol* 25: 3737-3751
- Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T and Goldschmidt-Clermont PJ (1997) *Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. Science* 275: 1649-1652

Irby RB, Mao W, Coppola D, Kang J, Loubeau JM, Trudeau W, Karl R, Fujita DJ, Jove R and Yeatman TJ (1999) *Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers*. **Nat Genet** 21: 187-190

Issa JP (2004) *CpG island methylator phenotype in cancer*. **Nat Rev Cancer** 4: 988-993

~ J ~

Jacks T, Remington L, Williams BO, Schmitt EM, Halachmi S, Bronson RT and Weinberg RA (1994) *Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice*. **Curr Biol** 4: 1-7

Jackson SP and Bartek J (2009) *The DNA-damage response in human biology and disease*. **Nature** 461: 1071-1078

Jascur T, Brickner H, Salles-Passador I, Barbier V, El Khissiin A, Smith B, Fotedar R and Fotedar A (2005) *Regulation of p21(WAF1/CIP1) stability by WISp39, a Hsp90 binding TPR protein*. **Mol Cell** 17: 237-249

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C and Thun MJ (2006) *Cancer statistics, 2006*. **CA Cancer J Clin** 56: 106-130

Jones P, May G, Healy L, Brown J, Hoyne G, Delassus S and Enver T (1998) *Stromal expression of Jagged 1 promotes colony formation by fetal hematopoietic progenitor cells*. **Blood** 92: 1505-1511

Jung H, Lee KP, Park SJ, Park JH, Jang YS, Choi SY, Jung JG, Jo K, Park DY, Yoon JH, Lim DS, Hong GR, Choi C, Park YK, Lee JW, Hong HJ, Kim S and Park YW (2008) *TMPRSS4 promotes invasion, migration and metastasis of human tumor cells by facilitating an epithelial-mesenchymal transition*. **Oncogene** 27: 2635-2647

~ K ~

Kadesch T (2000) *Notch signaling: a dance of proteins changing partners*. **Exp Cell Res** 260: 1-8

- Karakaidos P, Taraviras S, Vassiliou LV, Zacharatos P, Kastrinakis NG, Kougiou D, Kouloukoussa M, Nishitani H, Papavassiliou AG, Lygerou Z and Gorgoulis VG (2004) *Overexpression of the replication licensing regulators hCdt1 and hCdc6 characterizes a subset of non-small-cell lung carcinomas: synergistic effect with mutant p53 on tumor growth and chromosomal instability--evidence of E2F-1 transcriptional control over hCdt1. Am J Pathol* 165: 1351-1365
- Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ and Zalcborg JR (2008) *K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N Engl J Med* 359: 1757-1765
- Kato M (2007) *WNT signaling pathway and stem cell signaling network. Clin Cancer Res* 13: 4042-4045
- Kidd S, Kelley MR and Young MW (1986) *Sequence of the notch locus of Drosophila melanogaster: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. Mol Cell Biol* 6: 3094-3108
- Kim HS, Park KH, Kim SA, Wen J, Park SW, Park B, Gham CW, Hyung WJ, Noh SH, Kim HK and Song SY (2005a) *Frequent mutations of human Mad2, but not Bub1, in gastric cancers cause defective mitotic spindle checkpoint. Mutat Res* 578: 187-201
- Kim JS, Kim J, Kim BS, Chung HY, Lee YY, Park CS, Lee YS, Lee YH and Chung IY (2005b) *Identification and functional characterization of an alternative splice variant within the fourth exon of human nanog. Exp Mol Med* 37: 601-607
- Kitaura H, Shinshi M, Uchikoshi Y, Ono T, Iguchi-Arigo SM and Ariga H (2000) *Reciprocal regulation via protein-protein interaction between c-Myc and p21(cip1/waf1/sdi1) in DNA replication and transcription. J Biol Chem* 275: 10477-10483
- Knudson AG, Jr. (1971) *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 820-823
- Kops GJ, Weaver BA and Cleveland DW (2005) *On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. Nat Rev Cancer* 5: 773-785
- Kortlever RM, Higgins PJ and Bernards R (2006) *Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. Nat Cell Biol* 8: 877-884

- Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ and Peeper DS (2008) *Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network*. **Cell** 133: 1019-1031
- Kuilman T and Peeper DS (2009) *Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress*. **Nat Rev Cancer** 9: 81-94
- Kunte DP, Wali RK, Koetsier JL, Hart J, Kostjukova MN, Kilimnik AY, Pyatkin IG, Strelnikova SR and Roy HK (2005) *Down-regulation of the tumor suppressor gene C-terminal Src kinase: an early event during premalignant colonic epithelial hyperproliferation*. **FEBS Lett** 579: 3497-3502
- Kurooka H and Honjo T (2000) *Functional interaction between the mouse notch1 intracellular region and histone acetyltransferases PCAF and GCN5*. **J Biol Chem** 275: 17211-17220
- Kuzminov A (2001) *Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98: 8241-8246
- Kwok WK, Ling MT, Lee TW, Lau TC, Zhou C, Zhang X, Chua CW, Chan KW, Chan FL, Glackin C, Wong YC and Wang X (2005) *Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target*. **Cancer Res** 65: 5153-5162
- Kwok WK, Ling MT, Yuen HF, Wong YC and Wang X (2007) *Role of p14ARF in TWIST-mediated senescence in prostate epithelial cells*. **Carcinogenesis** 28: 2467-2475
- Kwong J, Hong L, Liao R, Deng Q, Han J and Sun P (2009) *p38alpha and p38gamma mediate oncogenic ras-induced senescence through differential mechanisms*. **J Biol Chem** 284: 11237-11246

~ L ~

- Lafarga V, Cuadrado A, Lopez de Silanes I, Bengoechea R, Fernandez-Capetillo O and Nebreda AR (2009) *p38 Mitogen-activated protein kinase-and HuR-dependent stabilization of p21(Cip1) mRNA mediates the G(1)/S checkpoint*. **Mol Cell Biol** 29: 4341-4351
- Lai EC (2002) *Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins*. **EMBO Rep** 3: 840-845

- Lambert M, Choquet D and Mege RM (2002) *Dynamics of ligand-induced, Rac1-dependent anchoring of cadherins to the actin cytoskeleton*. **J Cell Biol** 157: 469-479
- Laurent E, McCoy JW, 3rd, Macina RA, Liu W, Cheng G, Robine S, Papkoff J and Lambeth JD (2008) *Nox1 is over-expressed in human colon cancers and correlates with activating mutations in K-Ras*. **Int J Cancer** 123: 100-107
- Le Beau MM, Rassool FV, Neilly ME, Espinosa R, 3rd, Glover TW, Smith DI and McKeithan TW (1998) *Replication of a common fragile site, FRA3B, occurs late in S phase and is delayed further upon induction: implications for the mechanism of fragile site induction*. **Hum Mol Genet** 7: 755-761
- Lee AC, Fenster BE, Ito H, Takeda K, Bae NS, Hirai T, Yu ZX, Ferrans VJ, Howard BH and Finkel T (1999) *Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species*. **J Biol Chem** 274: 7936-7940
- Lee J, Go Y, Kang I, Han YM and Kim J (2010) *Oct-4 controls cell-cycle progression of embryonic stem cells*. **Biochem J** 426: 171-181
- Lewis J (1996) *Neurogenic genes and vertebrate neurogenesis*. **Curr Opin Neurobiol** 6: 3-10
- Lewis J (1998) *Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates*. **Semin Cell Dev Biol** 9: 583-589
- Li QQ, Xu JD, Wang WJ, Cao XX, Chen Q, Tang F, Chen ZQ, Liu XP and Xu ZD (2009) *Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells*. **Clin Cancer Res** 15: 2657-2665
- Li X, Amazit L, Long W, Lonard DM, Monaco JJ and O'Malley BW (2007) *Ubiquitin- and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REGgamma-proteasome pathway*. **Mol Cell** 26: 831-842
- Lindahl T and Wood RD (1999) *Quality control by DNA repair*. **Science** 286: 1897-1905
- Liu M, Casimiro MC, Wang C, Shirley LA, Jiao X, Katiyar S, Ju X, Li Z, Yu Z, Zhou J, Johnson M, Fortina P, Hyslop T, Windle JJ and Pestell RG (2009) *p21<sup>CIP1</sup> attenuates Ras- and c-Myc-dependent breast tumor epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like gene expression in vivo*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 106: 19035-19039

Liu Y, El-Naggar S, Darling DS, Higashi Y and Dean DC (2008) *Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence*. **Development** 135: 579-588

Lockhart AC and Berlin JD (2005) *The epidermal growth factor receptor as a target for colorectal cancer therapy*. **Semin Oncol** 32: 52-60

Lohr K, Moritz C, Contente A and Dobbelstein M (2003) *p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53*. **J Biol Chem** 278: 32507-32516

Lowe SW, Cepero E and Evan G (2004) *Intrinsic tumour suppression*. **Nature** 432: 307-315

Luo J, Emanuele MJ, Li D, Creighton CJ, Schlabach MR, Westbrook TF, Wong KK and Elledge SJ (2009) *A genome-wide RNAi screen identifies multiple synthetic lethal interactions with the Ras oncogene*. **Cell** 137: 835-848

~ M ~

Macias E, Kim Y, Miliani de Marval PL, Klein-Szanto A and Rodriguez-Puebla ML (2007) *Cdk2 deficiency decreases ras/CDK4-dependent malignant progression, but not myc-induced tumorigenesis*. **Cancer Res** 67: 9713-9720

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J and Weinberg RA (2008) *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. **Cell** 133: 704-715

Marini V and Krejci L (2010) *Srs2: the "Odd-Job Man" in DNA repair*. **DNA Repair (Amst)** 9: 268-275

Martin A, Odajima J, Hunt SL, Dubus P, Ortega S, Malumbres M and Barbacid M (2005) *Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27(Kip1) and p21(Cip1)*. **Cancer Cell** 7: 591-598

Martin-Caballero J, Flores JM, Garcia-Palencia P and Serrano M (2001) *Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice*. **Cancer Res** 61: 6234-6238

- Mattison J, Kool J, Uren AG, de Ridder J, Wessels L, Jonkers J, Bignell GR, Butler A, Rust AG, Brosch M, Wilson CH, van der Weyden L, Largaespada DA, Stratton MR, Futreal PA, van Lohuizen M, Berns A, Collier LS, Hubbard T and Adams DJ (2010) *Novel candidate cancer genes identified by a large-scale cross-species comparative oncogenomics approach*. **Cancer Res** 70: 883-895
- McClelland SE, Burrell RA and Swanton C (2009) *Chromosomal instability: a composite phenotype that influences sensitivity to chemotherapy*. **Cell Cycle** 8: 3262-3266
- McMurray HR, Sampson ER, Compitello G, Kinsey C, Newman L, Smith B, Chen SR, Klebanov L, Salzman P, Yakovlev A and Land H (2008) *Synergistic response to oncogenic mutations defines gene class critical to cancer phenotype*. **Nature** 453: 1112-1116
- Mejlvang J, Kriajevska M, Vandewalle C, Chernova T, Sayan AE, Berx G, Mellon JK and Tulchinsky E (2007) *Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition*. **Mol Biol Cell** 18: 4615-4624
- Meng HM, Zheng P, Wang XY, Liu C, Sui HM, Wu SJ, Zhou J, Ding YQ and Li JM (2010) *Overexpression of nanog predicts tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer*. **Cancer Biol Ther** 9
- Menssen A, Epanchintsev A, Lodygin D, Rezaei N, Jung P, Verdoodt B, Diebold J and Hermeking H (2007) *c-MYC delays prometaphase by direct transactivation of MAD2 and BubR1: identification of mechanisms underlying c-MYC-induced DNA damage and chromosomal instability*. **Cell Cycle** 6: 339-352
- Mercer WE, Avignolo C and Baserga R (1984) *Role of the p53 protein in cell proliferation as studied by microinjection of monoclonal antibodies*. **Mol Cell Biol** 4: 276-281
- Meurette O, Stylianou S, Rock R, Collu GM, Gilmore AP and Brennan K (2009) *Notch activation induces Akt signaling via an autocrine loop to prevent apoptosis in breast epithelial cells*. **Cancer Res** 69: 5015-5022
- Milner J (1984) *Different forms of p53 detected by monoclonal antibodies in non-dividing and dividing lymphocytes*. **Nature** 310: 143-145
- Mironchik Y, Winnard PT, Jr., Vesuna F, Kato Y, Wildes F, Pathak AP, Kominsky S, Artemov D, Bhujwala Z, Van Diest P, Burger H, Glackin C and Raman V (2005) *Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer*. **Cancer Res** 65: 10801-10809

- Mirza AM, Gysin S, Malek N, Nakayama K, Roberts JM and McMahon M (2004) *Cooperative regulation of the cell division cycle by the protein kinases RAF and AKT*. **Mol Cell Biol** 24: 10868-10881
- Mittelstadt PR, Salvador JM, Fornace AJ, Jr. and Ashwell JD (2005) *Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase*. **Cell Cycle** 4: 1189-1192
- Mo L, Zheng X, Huang HY, Shapiro E, Lepor H, Cordon-Cardo C, Sun TT and Wu XR (2007) *Hyperactivation of Ha-ras oncogene, but not Ink4a/Arf deficiency, triggers bladder tumorigenesis*. **J Clin Invest** 117: 314-325
- Moiseeva O, Bourdeau V, Roux A, Deschenes-Simard X and Ferbeyre G (2009) *Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence*. **Mol Cell Biol** 29: 4495-4507
- Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S and Puisieux A (2008) *Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition*. **PLoS One** 3: e2888
- Morgan TH (1917) *The theory of the gene*. **Am Nat** 51: 31
- Mosieniak G and Sikora E (2010) *Poliploidy: the link between senescence and cancer*. **Curr Pharm Des** 16: 734-740
- Motti ML, De Marco C, Califano D, De Gisi S, Malanga D, Troncone G, Persico A, Losito S, Fabiani F, Santoro M, Chiappetta G, Fusco A and Viglietto G (2007) *Loss of p27 expression through RAS-->BRAF-->MAP kinase-dependent pathway in human thyroid carcinomas*. **Cell Cycle** 6: 2817-2825
- Mueller S, Cadenas E and Schonthal AH (2000) *p21WAF1 regulates anchorage-independent growth of HCT116 colon carcinoma cells via E-cadherin expression*. **Cancer Res** 60: 156-163
- Mukherjee S and Conrad SE (2005) *c-Myc suppresses p21WAF1/CIP1 expression during estrogen signaling and antiestrogen resistance in human breast cancer cells*. **J Biol Chem** 280: 17617-17625
- Murphy DJ, Junttila MR, Pouyet L, Karnezis A, Shchors K, Bui DA, Brown-Swigart L, Johnson L and Evan GI (2008) *Distinct thresholds govern Myc's biological output in vivo*. **Cancer Cell** 14: 447-457

Musacchio A and Hardwick KG (2002) *The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling*. **Nat Rev Mol Cell Biol** 3: 731-741

Musacchio A and Salmon ED (2007) *The spindle-assembly checkpoint in space and time*. **Nat Rev Mol Cell Biol** 8: 379-393

~ N ~

Nakamura AJ, Chiang YJ, Hathcock KS, Horikawa I, Sedelnikova OA, Hodes RJ and Bonner WM (2008) *Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence*. **Epigenetics Chromatin** 1: 6

Narita M, Krizhanovsky V, Nunez S, Chicas A, Hearn SA, Myers MP and Lowe SW (2006) *A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation*. **Cell** 126: 503-514

Narita M, Nunez S, Heard E, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ and Lowe SW (2003) *Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence*. **Cell** 113: 703-716

Newbold RF and Overell RW (1983) *Fibroblast immortality is a prerequisite for transformation by EJ c-Ha-ras oncogene*. **Nature** 304: 648-651

Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D, Firestein R, Cleary M, Jenuwein T, Herrera RE and Kouzarides T (2001) *Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters*. **Nature** 412: 561-565

Nieto MA (2002) *The snail superfamily of zinc-finger transcription factors*. **Nat Rev Mol Cell Biol** 3: 155-166

Nowak K, Kerl K, Fehr D, Kramps C, Gessner C, Killmer K, Samans B, Berwanger B, Christiansen H and Lutz W (2006) *BM11 is a target gene of E2F-1 and is strongly expressed in primary neuroblastomas*. **Nucleic Acids Res** 34: 1745-1754



- Oh JH, Do HJ, Yang HM, Moon SY, Cha KY, Chung HM and Kim JH (2005) *Identification of a putative transactivation domain in human Nanog*. **Exp Mol Med** 37: 250-254
- Ohashi S, Natsuizaka M, Wong GS, Michaylira CZ, Grugan KD, Stairs DB, Kalabis J, Vega ME, Kalman RA, Nakagawa M, Klein-Szanto AJ, Herlyn M, Diehl JA, Rustgi AK and Nakagawa H (2010) *Epidermal growth factor receptor and mutant p53 expand an esophageal cellular subpopulation capable of epithelial-to-mesenchymal transition through ZEB transcription factors*. **Cancer Res** 70: 4174-4184
- Ohtani N, Zebedee Z, Huot TJ, Stinson JA, Sugimoto M, Ohashi Y, Sharrocks AD, Peters G and Hara E (2001) *Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence*. **Nature** 409: 1067-1070
- Ohuchida K, Mizumoto K, Ohashi S, Yamaguchi H, Konomi H, Nagai E, Yamaguchi K, Tsuneyoshi M and Tanaka M (2007) *Twist, a novel oncogene, is upregulated in pancreatic cancer: clinical implication of Twist expression in pancreatic juice*. **Int J Cancer** 120: 1634-1640
- Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES and Weinberg RA (2008) *Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways*. **Cancer Res** 68: 3645-3654
- Ono K and Han J (2000) *The p38 signal transduction pathway: activation and function*. **Cell Signal** 12: 1-13
- Oren M and Rotter V (2010) *Mutant p53 gain-of-function in cancer*. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2: a001107
- Orjalo AV, Bhaumik D, Gengler BK, Scott GK and Campisi J (2009) *Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 106: 17031-17036
- Oswald F, Liptay S, Adler G and Schmid RM (1998) *NF-kappaB2 is a putative target gene of activated Notch-1 via RBP-Jkappa*. **Mol Cell Biol** 18: 2077-2088
- Oswald F, Tauber B, Dobner T, Bourteele S, Kostezka U, Adler G, Liptay S and Schmid RM (2001) *p300 acts as a transcriptional coactivator for mammalian Notch-1*. **Mol Cell Biol** 21: 7761-7774

~ P ~

- Palakodeti A, Han Y, Jiang Y and Le Beau MM (2004) *The role of late/slow replication of the FRA16D in common fragile site induction.* **Genes Chromosomes Cancer** 39: 71-76
- Palm Wand de Lange T (2008) *How shelterin protects mammalian telomeres.* **Annu Rev Genet** 42: 301-334
- Park IK, Morrison SJ and Clarke MF (2004) *Bmi1, stem cells, and senescence regulation.* **J Clin Invest** 113: 175-179
- Park M, Chae HD, Yun J, Jung M, Kim YS, Kim SH, Han MH and Shin DY (2000) *Constitutive activation of cyclin B1-associated cdc2 kinase overrides p53-mediated G2-M arrest.* **Cancer Res** 60: 542-545
- Pasqualucci L, Migliazza A, Basso K, Houldsworth J, Chaganti RS and Dalla-Favera R (2003) *Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma.* **Blood** 101: 2914-2923
- Pece S and Gutkind JS (2002) *E-cadherin and Hakai: signalling, remodeling or destruction?* **Nat Cell Biol** 4: E72-74
- Perez-Moreno MA, Locascio A, Rodrigo I, Dhondt G, Portillo F, Nieto MA and Cano A (2001) *A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions.* **J Biol Chem** 276: 27424-27431
- Peyrieras N, Hyafil F, Louvard D, Ploegh HL and Jacob F (1983) *Uvomorulin: a nonintegral membrane protein of early mouse embryo.* **Proc Natl Acad Sci U S A** 80: 6274-6277
- Phelps RA, Chidester S, Dehghanizadeh S, Phelps J, Sandoval IT, Rai K, Broadbent T, Sarkar S, Burt RW and Jones DA (2009) *A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss.* **Cell** 137: 623-634
- Prieur A and Peeper DS (2008) *Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis.* **Curr Opin Cell Biol** 20: 150-155
- Puisieux A, Valsesia-Wittmann S and Ansieau S (2006) *A twist for survival and cancer progression.* **Br J Cancer** 94: 13-17

## ~ Q et R ~

- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G and Levine B (2003) *Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene.* **J Clin Invest** 112: 1809-1820
- Radford DM, Fair KL, Phillips NJ, Ritter JH, Steinbrueck T, Holt MS and Donis-Keller H (1995) *Allelotyping of ductal carcinoma in situ of the breast: deletion of loci on 8p, 13q, 16q, 17p and 17q.* **Cancer Res** 55: 3399-3405
- Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE, Liu H, Nelson CM, Fata JE, Leake D, Godden EL, Albertson DG, Nieto MA, Werb Z and Bissell MJ (2005) *Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability.* **Nature** 436: 123-127
- Radtke F and Clevers H (2005) *Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin.* **Science** 307: 1904-1909
- Radtke F and Raj K (2003) *The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor?* **Nat Rev Cancer** 3: 756-767
- Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B and Velculescu VE (2002) *Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status.* **Nature** 418: 934
- Rangarajan A, Syal R, Selvarajah S, Chakrabarti O, Sarin A and Krishna S (2001a) *Activated Notch1 signaling cooperates with papillomavirus oncogenes in transformation and generates resistance to apoptosis on matrix withdrawal through PKB/Akt.* **Virology** 286: 23-30
- Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, Aster JC, Krishna S, Metzger D, Chambon P, Miele L, Aguet M, Radtke F and Dotto GP (2001b) *Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation.* **EMBO J** 20: 3427-3436
- Raoul C, Estevez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyriere O, Henderson CE, Haase G and Pettmann B (2002) *Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations.* **Neuron** 35: 1067-1083
- Reddel RR and Bryan TM (2003) *Alternative lengthening of telomeres: dangerous road less travelled.* **Lancet** 361: 1840-1841

- Reich NC and Levine AJ (1984) *Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells.* **Nature** 308: 199-201
- Reinhardt HC, Aslanian AS, Lees JA and Yaffe MB (2007) *p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage.* **Cancer Cell** 11: 175-189
- Robey E, Chang D, Itano A, Cado D, Alexander H, Lans D, Weinmaster G and Salmon P (1996) *An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages.* **Cell** 87: 483-492
- Rodier F, Coppe JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Munoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR and Campisi J (2009) *Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion.* **Nat Cell Biol** 11: 973-979
- Rodriguez-Vilarrupla A, Jaumot M, Abella N, Canela N, Brun S, Diaz C, Estanyol JM, Bachs O and Agell N (2005) *Binding of calmodulin to the carboxy-terminal region of p21 induces nuclear accumulation via inhibition of protein kinase C-mediated phosphorylation of Ser153.* **Mol Cell Biol** 25: 7364-7374
- Roninson IB (2002) *Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts.* **Cancer Lett** 179: 1-14
- Rossig L, Jadidi AS, Urbich C, Badorff C, Zeiher AM and Dimmeler S (2001) *Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells.* **Mol Cell Biol** 21: 5644-5657
- Rous P (1911) *A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells.* **J Exp Med** 13: 397-411



- Saad S, Stanners SR, Yong R, Tang O and Pollock CA (2010) *Notch mediated epithelial to mesenchymal transformation is associated with increased expression of the Snail transcription factor.* **Int J Biochem Cell Biol** 42: 1115-1122

- Saha P, Eichbaum Q, Silberman ED, Mayer BJ and Dutta A (1997) *p21<sup>CIP1</sup> and Cdc25A: competition between an inhibitor and an activator of cyclin-dependent kinases*. **Mol Cell Biol** 17: 4338-4345
- Sarkisian CJ, Keister BA, Stairs DB, Boxer RB, Moody SE and Chodosh LA (2007) *Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis*. **Nat Cell Biol** 9: 493-505
- Satyanarayana A, Hilton MB and Kaldis P (2008) *p21 Inhibits Cdk1 in the absence of Cdk2 to maintain the G1/S phase DNA damage checkpoint*. **Mol Biol Cell** 19: 65-77
- Schepers H, Wierenga AT, Eggen BJ and Vellenga E (2005) *Oncogenic Ras blocks transforming growth factor-beta-induced cell-cycle arrest by degradation of p27 through a MEK/Erk/SKP2-dependent pathway*. **Exp Hematol** 33: 747-757
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D and Lowe SW (1997) *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16<sup>INK4a</sup>*. **Cell** 88: 593-602
- Severino J, Allen RG, Balin S, Balin A and Cristofalo VJ (2000) *Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo?* **Exp Cell Res** 257: 162-171
- Shangary S and Wang S (2008) *Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy*. **Clin Cancer Res** 14: 5318-5324
- Shats I, Milyavsky M, Tang X, Stambolsky P, Erez N, Brosh R, Kogan I, Braunstein I, Tzukerman M, Ginsberg D and Rotter V (2004) *p53-dependent down-regulation of telomerase is mediated by p21<sup>waf1</sup>*. **J Biol Chem** 279: 50976-50985
- Shiota M, Izumi H, Onitsuka T, Miyamoto N, Kashiwagi E, Kidani A, Hirano G, Takahashi M, Naito S and Kohno K (2008) *Twist and p53 reciprocally regulate target genes via direct interaction*. **Oncogene** 27: 5543-5553
- Shirasawa S, Furuse M, Yokoyama N and Sasazuki T (1993) *Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras*. **Science** 260: 85-88
- Shiyanov P, Bagchi S, Adami G, Kokontis J, Hay N, Arroyo M, Morozov A and Raychaudhuri P (1996) *p21 Disrupts the interaction between cdk2 and the E2F-p130 complex*. **Mol Cell Biol** 16: 737-744

- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R and Ben-Ze'ev A (1999) *The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5522-5527
- Sikandar SS, Pate KT, Anderson S, Dizon D, Edwards RA, Waterman ML and Lipkin SM (2010) *NOTCH signaling is required for formation and self-renewal of tumor-initiating cells and for repression of secretory cell differentiation in colon cancer. Cancer Res* 70: 1469-1478
- Sikora E, Arendt T, Bennett M and Narita M (2010) *Impact of cellular senescence signature on ageing research. Ageing Res Rev*
- Singh A, Greninger P, Rhodes D, Koopman L, Violette S, Bardeesy N and Settleman J (2009) *A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. Cancer Cell* 15: 489-500
- Sleeman KE, Kendrick H, Ashworth A, Isacke CM and Smalley MJ (2006) *CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. Breast Cancer Res* 8: R7
- Snowden AW, Anderson LA, Webster GA and Perkins ND (2000) *A novel transcriptional repression domain mediates p21(WAF1/CIP1) induction of p300 transactivation. Mol Cell Biol* 20: 2676-2686
- Solomon DA, Wang Y, Fox SR, Lambeck TC, Giesting S, Lan Z, Senderowicz AM, Conti CJ and Knudsen ES (2003) *Cyclin D1 splice variants. Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. J Biol Chem* 278: 30339-30347
- Soltysova A, Altanerova V and Altaner C (2005) *Cancer stem cells. Neoplasma* 52: 435-440
- Soreide K, Janssen EA, Soiland H, Korner H and Baak JP (2006) *Microsatellite instability in colorectal cancer. Br J Surg* 93: 395-406
- Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M, Dimmler A, Bauer K, Sultan A, Hlubek F, Jung A, Strand D, Eger A, Kirchner T, Behrens J and Brabletz T (2008) *The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. Cancer Res* 68: 537-544
- Stehelin D, Guntaka RV, Varmus HE and Bishop JM (1976) *Purification of DNA complementary to nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses. J Mol Biol* 101: 349-365

Stein GH, Drullinger LF, Robetorye RS, Pereira-Smith OM and Smith JR (1991) *Senescent cells fail to express cdc2, cycA, and cycB in response to mitogen stimulation*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 88: 11012-11016

Stingl J and Caldas C (2007) *Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis*. **Nat Rev Cancer** 7: 791-799

Strate LL and Syngal S (2005) *Hereditary colorectal cancer syndromes*. **Cancer Causes Control** 16: 201-213

Sudakin V, Chan GK and Yen TJ (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: 925-936

Suzuki A, Tsutomi Y, Miura M and Akahane K (1999) *Caspase 3 inactivation to suppress Fas-mediated apoptosis: identification of binding domain with p21 and ILP and inactivation machinery by p21*. **Oncogene** 18: 1239-1244

~ T ~

Takahashi E, Funato N, Higashihori N, Hata Y, Gridley T and Nakamura M (2004) *Snail regulates p21(WAF/CIP1) expression in cooperation with E2A and Twist*. **Biochem Biophys Res Commun** 325: 1136-1144

Takai H, Smogorzewska A and de Lange T (2003) *DNA damage foci at dysfunctional telomeres*. **Curr Biol** 13: 1549-1556

Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, Zhou AY, Gupta S, Yang J, Hartwell K, Onder TT, Gupta PB, Evans KW, Hollier BG, Ram PT, Lander ES, Rosen JM, Weinberg RA and Mani SA (2010) *Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 107: 15449-15454

Taylor WR and Stark GR (2001) *Regulation of the G2/M transition by p53*. **Oncogene** 20: 1803-1815

ten Berge D, Koole W, Fuerer C, Fish M, Eroglu E and Nusse R (2008) *Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies*. **Cell Stem Cell** 3: 508-518

- Tetsu O and McCormick F (1999) *Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells*. **Nature** 398: 422-426
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY and Nieto MA (2009) *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. **Cell** 139: 871-890
- Tian B, Yang Q and Mao Z (2009) *Phosphorylation of ATM by Cdk5 mediates DNA damage signalling and regulates neuronal death*. **Nat Cell Biol** 11: 211-218
- Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, Bertran E, Perez-Pomares JM, Diez J, Aranda S, Palomo S, McCormick F, Izpisua-Belmonte JC and de la Pompa JL (2004) *Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation*. **Genes Dev** 18: 99-115
- Tom S, Ranalli TA, Podust VN and Bambara RA (2001) *Regulatory roles of p21 and apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 in base excision repair*. **J Biol Chem** 276: 48781-48789

~ U et V ~

- Ullmann U, In't Veld P, Gilles C, Sermon K, De Rycke M, Van de Velde H, Van Steirteghem A and Liebaers I (2007) *Epithelial-mesenchymal transition process in human embryonic stem cells cultured in feeder-free conditions*. **Mol Hum Reprod** 13: 21-32
- Umar A, Buermeier AB, Simon JA, Thomas DC, Clark AB, Liskay RM and Kunkel TA (1996) *Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis*. **Cell** 87: 65-73
- Vafa O, Wade M, Kern S, Beeche M, Pandita TK, Hampton GM and Wahl GM (2002) *c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability*. **Mol Cell** 9: 1031-1044
- Valsesia-Wittmann S, Magdeleine M, Dupasquier S, Garin E, Jallas AC, Combaret V, Krause A, Leissner P and Puisieux A (2004) *Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells*. **Cancer Cell** 6: 625-630

- Varnum-Finney B, Purton LE, Yu M, Brashem-Stein C, Flowers D, Staats S, Moore KA, Le Roux I, Mann R, Gray G, Artavanis-Tsakonas S and Bernstein ID (1998) *The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells.* **Blood** 91: 4084-4091
- Vega S, Morales AV, Ocana OH, Valdes F, Fabregat I and Nieto MA (2004) *Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death.* **Genes Dev** 18: 1131-1143
- Ventura JJ, Tenbaum S, Perdiguero E, Huth M, Guerra C, Barbacid M, Pasparakis M and Nebreda AR (2007) *p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation.* **Nat Genet** 39: 750-758
- Vered M, Dayan D, Yahalom R, Dobriyan A, Barshack I, Bello IO, Kantola S and Salo T (2010) *Cancer-associated fibroblasts and epithelial-mesenchymal transition in metastatic oral tongue squamous cell carcinoma.* **Int J Cancer** 127: 1356-1362
- Viale A, De Franco F, Orleth A, Cambiaghi V, Giuliani V, Bossi D, Ronchini C, Ronzoni S, Muradore I, Monestiroli S, Gobbi A, Alcalay M, Minucci S and Pelicci PG (2009) *Cell-cycle restriction limits DNA damage and maintains self-renewal of leukaemia stem cells.* **Nature** 457: 51-56
- Vichalkovski A, Gresko E, Hess D, Restuccia DF and Hemmings BA (2010) *PKB/AKT phosphorylation of the transcription factor Twist-1 at Ser42 inhibits p53 activity in response to DNA damage.* **Oncogene** 29: 3554-3565
- Vigneron A, Cherier J, Barre B, Gamelin E and Coqueret O (2006) *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
- Vigneron A, Gamelin E and Coqueret O (2008) *The EGFR-STAT3 oncogenic pathway up-regulates the Eme1 endonuclease to reduce DNA damage after topoisomerase I inhibition.* **Cancer Res** 68: 815-825
- Vigneron A, Roninson IB, Gamelin E and Coqueret O (2005) *Src inhibits adriamycin-induced senescence and G2 checkpoint arrest by blocking the induction of p21waf1.* **Cancer Res** 65: 8927-8935
- Vijg J and Campisi J (2008) *Puzzles, promises and a cure for ageing.* **Nature** 454: 1065-1071

Vilar E and Gruber SB (2010) *Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence*. **Nat Rev Clin Oncol** 7: 153-162

Vincent-Salomon A and Thiery JP (2003) *Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-mesenchymal transition in breast cancer development*. **Breast Cancer Res** 5: 101-106

Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y and White R (1989) *Allelotype of colorectal carcinomas*. **Science** 244: 207-211

Vousden KH and Lu X (2002) *Live or let die: the cell's response to p53*. **Nat Rev Cancer** 2: 594-604

~ W ~

Waetzig GH, Seegert D, Rosenstiel P, Nikolaus S and Schreiber S (2002) *p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease*. **J Immunol** 168: 5342-5351

Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C and von Zglinicki T (2009a) *DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice*. **Aging Cell** 8: 311-323

Wang M, Wu L, Wang L and Xin X (2010a) *Down-regulation of Notch1 by gamma-secretase inhibition contributes to cell growth inhibition and apoptosis in ovarian cancer cells A2780*. **Biochem Biophys Res Commun** 393: 144-149

Wang SP, Wang WL, Chang YL, Wu CT, Chao YC, Kao SH, Yuan A, Lin CW, Yang SC, Chan WK, Li KC, Hong TM and Yang PC (2009b) *p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug*. **Nat Cell Biol** 11: 694-704

Wang YA, Elson A and Leder P (1997) *Loss of p21 increases sensitivity to ionizing radiation and delays the onset of lymphoma in atm-deficient mice*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 94: 14590-14595

Wang Z, Li Y, Banerjee S, Kong D, Ahmad A, Nogueira V, Hay N and Sarkar FH (2010b) *Down-regulation of Notch-1 and Jagged-1 inhibits prostate cancer cell growth, migration and invasion, and induces apoptosis via inactivation of Akt, mTOR, and NF-kappaB signaling pathways*. **J Cell Biochem** 109: 726-736

- Warbrick E (2000) *The puzzle of PCNA's many partners*. **Bioessays** 22: 997-1006
- Weijzen S, Rizzo P, Braid M, Vaishnav R, Jonkheer SM, Zlobin A, Osborne BA, Gottipati S, Aster JC, Hahn WC, Rudolf M, Siziopikou K, Kast WM and Miele L (2002) *Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells*. **Nat Med** 8: 979-986
- Weinstein IB (2002) *Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer*. **Science** 297: 63-64
- Wellbrock C, Ogilvie L, Hedley D, Karasarides M, Martin J, Niculescu-Duvaz D, Springer CJ and Marais R (2004) *V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes*. **Cancer Res** 64: 2338-2342
- Wharton KA, Johansen KM, Xu T and Artavanis-Tsakonas S (1985) *Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats*. **Cell** 43: 567-581
- White E, Karp C, Strohecker AM, Guo Y and Mathew R (2010) *Role of autophagy in suppression of inflammation and cancer*. **Curr Opin Cell Biol** 22: 212-217
- Whiteman EL, Liu CJ, Fearon ER and Margolis B (2008) *The transcription factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apico-basal polarity complexes*. **Oncogene** 27: 3875-3879
- Wilkinson S and Ryan KM (2010) *Autophagy: an adaptable modifier of tumorigenesis*. **Curr Opin Genet Dev** 20: 57-64
- Wingate H, Bedrosian I, Akli S and Keyomarsi K (2003) *The low molecular weight (LMW) isoforms of cyclin E deregulate the cell cycle of mammary epithelial cells*. **Cell Cycle** 2: 461-466
- Wu S, Huang S, Ding J, Zhao Y, Liang L, Liu T, Zhan R and He X (2010) *Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region*. **Oncogene** 29: 2302-2308

~ Y et Z ~

- Yang HS and Hinds PW (2003) *Increased ezrin expression and activation by CDK5 coincident with acquisition of the senescent phenotype*. **Mol Cell** 11: 1163-1176

- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A and Weinberg RA (2004) *Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis*. **Cell** 117: 927-939
- Yang J and Weinberg RA (2008) *Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis*. **Dev Cell** 14: 818-829
- Yee KS and Vousden KH (2005) *Complicating the complexity of p53*. **Carcinogenesis** 26: 1317-1322
- Yokota J, Akiyama T, Fung YK, Benedict WF, Namba Y, Hanaoka M, Wada M, Terasaki T, Shimosato Y, Sugimura T *et al.* (1988) *Altered expression of the retinoblastoma (RB) gene in small-cell carcinoma of the lung*. **Oncogene** 3: 471-475
- Young AR and Narita M (2009) *SASP reflects senescence*. **EMBO Rep** 10: 228-230
- Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, Tavares S, Arakawa S, Shimizu S and Watt FM (2009) *Autophagy mediates the mitotic senescence transition*. **Genes Dev** 23: 798-803
- Yun J, Chae HD, Choi TS, Kim EH, Bang YJ, Chung J, Choi KS, Mantovani R and Shin DY (2003) *Cdk2-dependent phosphorylation of the NF- $\kappa$ B transcription factor and its involvement in the p53-p21 signaling pathway*. **J Biol Chem** 278: 36966-36972
- Yunis JJ, Soreng AL and Bowe AE (1987) *Fragile sites are targets of diverse mutagens and carcinogens*. **Oncogene** 1: 59-69
- Zavadil J (2010) *A spotlight on regulatory networks connecting EMT and cancer stem cells*. **Cell Cycle** 9: 2927
- Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N and Bottlinger EP (2004) *Integration of TGF- $\beta$ /Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition*. **EMBO J** 23: 1155-1165
- Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ and Boman BM (2001) *Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer*. **Cancer Res** 61: 8664-8667
- Zhang Z, Wang H, Ikeda S, Fahey F, Bielenberg D, Smits P and Hauschka PV (2010) *Notch3 in Human Breast Cancer Cell Lines Regulates Osteoblast-Cancer Cell Interactions and Osteolytic Bone Metastasis*. **Am J Pathol**

- Zhang Z, Xie D, Li X, Wong YC, Xin D, Guan XY, Chua CW, Leung SC, Na Y and Wang X (2007) *Significance of TWIST expression and its association with E-cadherin in bladder cancer. Hum Pathol* 38: 598-606
- Zhou S, Fujimuro M, Hsieh JJ, Chen L, Miyamoto A, Weinmaster G and Hayward SD (2000) *SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of NotchIC To facilitate NotchIC function. Mol Cell Biol* 20: 2400-2410
- Zhu H, Chang BD, Uchiumi T and Roninson IB (2002) *Identification of promoter elements responsible for transcriptional inhibition of polo-like kinase 1 and topoisomerase IIalpha genes by p21(WAF1/CIP1/SDI1). Cell Cycle* 1: 59-66
- Zhu L, Harlow E and Dynlacht BD (1995) *p107 uses a p21CIP1-related domain to bind cyclin/ cdk2 and regulate interactions with E2F. Genes Dev* 9: 1740-1752
- Ziomek CA and Johnson MH (1980) *Cell surface interaction induces polarization of mouse 8-cell blastomeres at compaction. Cell* 21: 935-942

# ANNEXES

## Annexe I : Matériels et Méthodes

Dans cette première annexe sont décrits les matériels et méthodes des expériences ne figurant pas dans les articles.

### A. Lignée cellulaire et traitements

La lignée de cellules HT29, issue d'un adénocarcinome colorectal humain (American Type Culture Collection, ATCC), a été maintenue en culture en milieu RPMI 1640 (Lonza) complété de 10 % de sérum du veau fœtal et en l'absence d'antibiotique. Les cellules sont maintenues à 37 °C dans 5 % de dioxyde de carbone et ont été testées régulièrement pour écarter les risques de contamination par des mycoplasmes.

Pour l'étude les cellules sontensemencées de sorte qu'elles soient à une densité d'environ 40 à 50 % de confluence lors de l'induction de H-RasV12. Les cellules sont ensuite cultivées à 37 °C dans 5 % de dioxyde de carbone.

Les solutions mères de PD98059 (Sigma Aldrich), d'aphidicoline (Sigma Aldrich) et de sn38 (Aventis Pharma) ont été préparées dans du DMSO puis diluées dans du PBS pour être utilisées aux concentrations voulues. La solution mère de doxycycline (Invitrogen) a été préparée à 50 mg.ml<sup>-1</sup> dans de l'eau ultra-pure puis diluée à 50 µg.ml<sup>-1</sup> dans du PBS avant d'être utilisé à 50 ng.ml<sup>-1</sup> dans le milieu de culture des cellules.

#### 1. *Transfection des siRNA*

Pour inhiber l'expression de p38 $\alpha$ , p21, ATM et ATR, les cellules sont transfectées avec 2,5 nM de siRNA spécifique *ON-TARGETplus* (Dharmacon) ou de *ON-TARGETplus Non-Targeting Pool* (Dharmacon) avec le DharmaFect-4 (Dharmacon) selon les instructions du fabricant. H-RasV12 est induit 48 h après la transfection.

## B. Analyse des promoteurs de gènes du cycle cellulaire

### 1. *Test de gène rapporteur*

Nous avons utilisé trois constructions plasmidiques dans lesquels ont été insérées différentes séquences du promoteur de p21Waf1 (Barre *et al.*, 2003). La séquence la plus longue représente la séquence totale de 2470 paires de bases du promoteur. Nous avons utilisé une deuxième séquence comprenant les paires de bases allant de -774 à +70 ainsi qu'une troisième allant de -163 à +70 paires de bases. Ces trois séquences de promoteur sont suivies par un gène codant pour la *firefly luciferase*, enzyme bioluminescente chez la luciole. Les cellules sont cultivées sur plaque 24 puits afin qu'elles soient à 90-95 % de confluence le jour de la transfection. Vingt-quatre heures après, elles sont transfectées avec 0,8 µg d'ADN (0,1 µg de plasmide contenant une des formes du promoteur de p21Waf1, 0,1 µg d'un plasmide contenant le gène de la Renilla luciférase et 0,6 µg du vecteur vide pSGT). Pour chaque puits, les 0,8 µg d'ADN sont dilués dans 50 µl de milieu Opti-MEM I (Gibco). 2 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) sont dilués dans 50 µl de milieu Opti-MEM I (Gibco) et la transfection est réalisée selon la procédure du manuel LF2000. Six heures après, la transcription de H-RasV12 est induite avec 50 ng.ml<sup>-1</sup> de doxycycline.

### 2. *ImmunoPrécipitation de Chromatine ou CHIP*

Les cellules sont cultivées en boîtes 15 cm, une boîte 15 cm permet d'effectuer 3 immunoprécipitations. Les cellules sont fixées directement dans le milieu de culture avec 1 % de formaldéhyde final. Après 10 minutes, les cellules sont lavées avec une solution de PBS froid puis lysées dans 500 µl de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 8,1 ; 1 % SDS ; 10 mM EDTA ; 1 mM PMSF ; 10 µg.ml<sup>-1</sup> aprotinine ; 10 µg.ml<sup>-1</sup> leupeptine ; 10 µg.ml<sup>-1</sup> pepstatine ; 1 mM Na3V04 ; 50 mM NaF). La chromatine est sectionnée en fragments d'environ 500 pb puis les échantillons de chromatine sont dilués avec un volume de tampon de dilution (2 mM EDTA ; 20 mM Tris-HCl pH 8,1 ; 1 % Triton X100 ; 0,1 % NP40 ; 150 mM NaCl ; 1 mM PMSF ; 10 µg.ml<sup>-1</sup> aprotinine ; 10 µg.ml<sup>-1</sup> leupeptine ; 10 µg.ml<sup>-1</sup> pepstatine ; 1 mM Na3V04 ; 50 mM NaF) et les risques d'aspécificité sont réduits par l'incubation pendant 2 heures à 4 °C sur une plate forme rotative avec un mélange de billes de protéine A-agarose et de protéine G-sepharose prétraitées avec de l'ADN de sperme de saumon. La chromatine est ensuite incubée avec 1 µg d'anticorps pendant une nuit à 4 °C. La précipitation se fait

avec le mélange de billes de protéine A-agarose et de protéine G-sepharose prétraitées avec de l'ADN de sperme de saumon, puis, la chromatine immunoprécipitée est éluée dans un tampon d'éluion (1 % SDS ; 100 mM NaHCO<sub>3</sub>). La chromatine est ensuite incubée pendant 5 h à 65 °C pour rompre les liaisons du complexe ADN-protéine-anticorps. L'ADN est avec un volume de phénol-chloroforme, précipité à l'éthanol, le culot d'ADN est ensuite séché à l'air libre puis dissout dans 100 µl d'H<sub>2</sub>O ultra-pure. Finalement, 4 µl des échantillons d'ADN sont utilisés pour être amplifiés par RT-qPCR en utilisant les couples d'amorces listées dans le tableau 2.

	sens	anti-sens
Seq_ctl	TGTGCAGGTGGGTGTAGTTG	CCAGGCACAAGGCTAAGAGT
p21-177+34	GTGCCCTCCTGCAGCACGCG	TCAGCTGGCGCAGCTCAGCG
Cdc25A-113+107	TGGCCCCACTGAGCCGCTAT	GGCGCCGGCAACCTGAAGAT
Plk1 -159+47	GTTTTCCCCGGCTGGGTCCG	AAGCTGCGCTGCAGACCTCG
Plk1-371-171	TGATGGCGATGCTACTGTTC	ATAGCCTGGGAAACCAAACC

Tableau 2 | Séquences des amorces de PCR utilisées pour le CHIP.

## C. Test de survie et de prolifération cellulaire

### 1. Test MTT

Le test de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) est utilisé pour évaluer l'activité métabolique des cellules sur un temps court en mesurant l'activité enzymatique mitochondriale des cellules vivantes.

Les cellules sont ensemencées en plaques 96 puits. La doxycycline est ajoutée après 24 h de culture. Les cellules sont ensuite incubées pendant 24, 48 ou 72 h. Le réactif MTT est ensuite ajouté à 500 ng.ml<sup>-1</sup> 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 d'activité métabolique est calculé selon le calcul suivant :

$$\text{Pourcentage de cellules actives} = (\text{DO}_{550} \text{ T}^2 / \text{DO}_{550} \text{ T}0^3) \times 100$$

<sup>2</sup> DO<sub>550</sub> T = densité optique à 550 nm mesurée à un temps T

<sup>3</sup> DO<sub>550</sub> T<sub>0</sub> = densité optique à 550 nm mesurée au temps 0 au moment de l'ajout de doxycycline dans les autres plaques

## 2. *Test de sénescence par coloration de la $\beta$ -Galactosidase*

Les tests de sénescence ont été effectués sur les cellules cultivées en plaque 12 puits et H-RasV12 a été induit avec 50 ng.ml<sup>-1</sup> de doxycycline (Invitrogen). Après 6 jours d'induction, les cellules sont lavées en PBS puis fixées à l'aide de formaldéhyde 3 % pendant 5 min à température ambiante. À nouveau, les cellules sont lavées en PBS puis 1 ml de solution de marquage (X-Gal 1 mg.ml<sup>-1</sup> ; NaCl 150 mM ; MgCl<sub>2</sub> 2 mM ; ferrocyanide de potassium 5 mM ; ferricyanide de potassium 5 mM ; Acide citrique/Phosphate de sodium 40 mM, pH 6) est déposée durant la nuit à 37 °C. La révélation se fait au microscope par comptage des cellules colorées en bleu par rapport aux cellules normales.

### D. Western Blot

Après le traitement, les cellules sont lysées en tampon SDS (50 mM Tris-HCl pH 8,1 ; 1% SDS ; 10 mM EDTA ; 1 mM PMSF ; 10 µg.ml<sup>-1</sup> aprotinine ; 10 µg.ml<sup>-1</sup> leupeptine ; 10 µg.ml<sup>-1</sup> pepstatine ; 1 mM Na<sub>3</sub>V04 ; 50 mM NaF) à 4 °C, puis les extraits sont soniqués. Les protéines sont dosées à l'aide du dispositif Qubit (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Les concentrations protéiques des échantillons sont ajustées et un tampon de charge est ajouté puis les échantillons sont migrés sur gel SDS page. Après la migration, les protéines sont transférées sur des membranes en polyvinylidène fluoride (Millipore Corporation) par transfert demi-sec (Trans-blot® SD, Bio-rad). La membrane est saturée dans du TBS 0,05 % tween avec 3 % de BSA pendant 30 min à 37 °C puis rincée dans du TBS-tween et incubée pendant la nuit à 4°C avec 200 ng.ml<sup>-1</sup> d'anticorps primaire anti-H-Ras (sc-29, Santa Cruz Biotechnology), anti-phospho-Erk1/2 Y204 (sc-7383, Santa Cruz Biotechnology), anti- $\gamma$ H2Ax S189 (06-636, Upstate), anti-H2Ax (07-627, Upstate), anti-p21Waf1 (sc-397, Santa Cruz Biotechnology) ou anti- $\alpha$ -tubuline (T6199, Sigma Aldrich). Après rinçage, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire (40 ng.ml<sup>-1</sup>) couplé à la peroxydase pendant 45 min à température ambiante puis les protéines sont visualisées à l'aide d'un réactif de détection (Amersham Pharmacia Biotech). La visualisation des protéines marquées se fait par réaction d'ECL à l'aide du ChemiDoc XRS (Bio-rad, Hercules, CA).

## E. Analyse de l'expression des gènes du cycle cellulaire par PCR quantitative en temps réel

### 1. *Transcription inverse*

Les cellules sont cultivées en boîtes 60 mm et traitées avec 50 ng.ml<sup>-1</sup> de doxycycline pendant différents temps. L'ARN total est isolé par la méthode d'extraction au phénol-chloroforme (Chomczynski & Sacchi, 2006), puis quantifié à 260 et 280 nm. Les ARN sont traités avec de la DNase pendant 30 minutes à température ambiante. La rétrotranscription est réalisée sur 1 µg d'ARN totaux auxquels sont ajoutés 1,3 µg d'amorces hexamériques aléatoires (Amersham Pharmacia Biotech) dans un volume de 15 µl. L'ensemble est incubé 5 min à 70 °C puis à 4 °C. Ensuite, 400 nM de dNTPs, 25 U de *Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor* (Promega corporation), 200 U de MMLV Reverse Transcriptase (Promega corporation) et le tampon réactionnel (MMLV Buffer, Promega) sont ajoutés à la réaction et l'ensemble réactionnel (50 µl) est incubé 1 h à 37 °C. Les ADNc sont stockés à -20 °C.

### 2. *PCR quantitative en temps réel*

Les amplifications d'ADNc des gènes étudiés sont réalisées par PCR en présence de SYBR Green avec le ABI PRISM 7300 real time PCR system (Applied Biosystems). La PCR est réalisée dans un volume réactionnel de 10 µl final, comprenant 5 µl d'ADNc dilués au vingtième, 500 mM de chaque amorce (Eurofins Biotech), 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, et le tampon LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostic) qui contient le SYBR green, les dNTPs et une HotStart Taq polymérase). Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau 3. Le programme de PCR comporte 3 étapes : Une dénaturation initiale de 10 min à 95 °C, un programme d'amplification de 40 cycles (15 s à 95 °C, 11 s à 55 °C, 22 s à 72 °C), avec une lecture unique de la fluorescence du SYBR green en fin de chaque élongation, et un programme de courbe de fusion (dénaturation à 95 °C, renaturation des brins d'ADN par abaissement de la température à 65 °C pendant 30 s, puis dénaturation lente par élévation de la température de 65 °C à 95 °C à 0,1 °C/s, avec une lecture de la fluorescence en continu). La courbe de fusion à la fin du programme permet de vérifier la spécificité de chaque amplification. La quantification relative de l'expression génique est réalisée par la méthode de comparaison des CT (cycle seuil) (Fink *et al.*, 1998). Le niveau d'expression des

gènes est normalisé avec le gène de ménage endogène RPLP0 et le facteur d'amplification est calculé en considérant que l'efficacité de PCR est proche de 100 %.

	sens	anti-sens
<b>Rplp0</b>	AACCCAGCTCTGGAGAAACT	CCCCTGGAGATTTTAGTGGT
<b>p21Waf1</b>	GCTCCTTCCCATCGCTGTCA	TCACCCTGCCAACCTTAGA
<b>Cdc25A</b>	GAGATCGCCTGGGTAATGAA	TGCGGAACCTTTCAGGTCT
<b>Plk1</b>	AAGAGATCCCGGAGGTCTTA	GCTGCGGTGAATGGATATTT
<b>Myc</b>	ATTCTCTGCTCTCCTCGAC	GTAGTTGTGCTGATGTGTGG
<b>ATM</b>	CGCAAACGCTAAGTCGCTGGC	GCGGTCTCCGCGCTCAAAAC
<b>ATR</b>	GGGAGGAGTTTTGGCCTCCACAC	ACTAGTCAACCACGCCAACGCG

Tableau 3 | Séquences des amorces de PCR utilisées pour mesurer l'expression des gènes de régulation du cycle cellulaire.

## A. Estimation du caractère invasif des cellules

### 1. Analyse de l'expression de la phosphorylation de H2Ax et des marqueurs CD138, CD24 et CD44 par cytométrie en flux

Les cellules sontensemencées dans des boîtes 10 cm. H-RasV12 est induit avec 50 ng.ml<sup>-1</sup> de doxycycline. Après un lavage au PBS les cellules sont fixées avec 1 % de formaldéhyde puis perméabilisées avec de l'éthanol 70 % à -20 °C pendant au moins 20 minutes. Les cellules sont incubées avec les anticorps présentés dans le tableau 4 suivant pendant 45 min à température ambiante. Les cellules sont lavées dans du PBS puis le noyau des cellules est marqué avec 50 µg.ml<sup>-1</sup> de DAPI dilué en PBS 0,1 % BSA. L'analyse de la quantité d'ADN est faite à l'aide d'un *LSR II* (BD) sur un échantillon de 10 000 cellules. Les doublets sont exclus pour l'analyse.

	couplage	Isotype	référence
<b>Anti-γH2Ax</b>	Alexa-488	IgGg1κ	BD 557 721
<b>Anti-CD138</b>	FITC	IgGg1κ	BD 554 679
<b>Anti-CD24</b>	FITC	IgGg2Aκ	BD 554 647
<b>Anti-CD44</b>	PE	IgGg2Aκ	BD 559 319

Tableau 4 | Références des anticorps utilisés pour l'étude des marqueurs de l'EMT et de cellule souche.

## 2. *Sphéroïdes*

Un sphéroïde est un amas de cellules proliférant en trois dimensions. Ce modèle permet de reproduire en culture l'hétérogénéité d'une tumeur. Brièvement, nous avons préparé le fond des puits d'une plaque de culture avec un mélange de milieu de culture complet et d'agarose, puis nous avons préparé une solution cellulaire dont nous avons déposé une goutte de 10 µl contenant environ 2000 cellules sur le couvercle de la boîte. Le sphéroïde se forme par gravité dans la goutte de milieu de culture pendant trois jours. Sans contact avec une surface les cellules adhèrent les unes aux autres et forme un agrégat. À l'issue de ces trois jours, les agrégats sont déposés dans du milieu de culture sur le tapis d'agarose coulé au fond des puits. Les sphéroïdes se développent ensuite sur ce tapis d'agarose.

### B. Étude des marqueurs de l'EMT

#### 1. *PCR quantitative en temps réel*

L'extraction des ARN, la transcription inverse et les RT-qPCR ont été réalisées de la même manière que dans la première partie. Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau 5 suivant.

	sens	anti-sens
<b>Rplp0</b>	AACCCAGCTCTGGAGAAACT	CCCCTGGAGATTTTAGTGGT
<b>Villin1</b>	TCGGCGAGAAGCAGCATTACCT	TGGTGTGTGTGGCGCCAGTT
<b>Notch1</b>	ACTGTGAGGACCTGGTGGAC	TTGTAGGTGT'TGGGGAGGTC
<b>Notch2</b>	ATGACTGCCCTAACCACAGG	CTGGAGTACAGGAGGCCAAG
<b>Notch3</b>	GTTTTCCCCGGCTGGGTCCG	AAGCTGCGCTGCAGACCTCG
<b>Notch4</b>	CACGTGAACCCATGTGAGTC	TTGAGCAGTTCTTCTGTCCATCG
<b>DLL1</b>	TGTGCCTCAAGCACTACCAG	TTCTGTTGCGAGGTCATCAG
<b>DLK2</b>	GCGGTGAGTACCATTGTGTG	CAGGACAGAGGCAGGAGAAG
<b>DLL3</b>	TGAGCATGGCTTCTGTGAAC	TCAAAGGACCTGGGTGTCTC
<b>Jag1</b>	GTCCCACTGGTTTCTCTGGA	CCACAGACGT'TGGAGGAAAT
<b>Jag2</b>	GTCAAGGTGGAGACGGTTGT	TTGCACTGGTAGAGCACGTC
<b>Vimentin</b>	GAGAACTTTGCCGTTGAAGC	TCCAGCAGCTTCTCTGTAGGT

Tableau 5 | Séquences des amorces de PCR utilisées pour l'étude des marqueurs de l'EMT.

## 2. *Western Blot*

Les western blot ont été effectués de la même manière que dans la première partie. Les anticorps primaires que nous avons utilisés sont : un anticorps dirigé contre Notch3 (2889, Cell Signaling) et un anticorps dirigé contre l'E-cadhérine (AB1416, Abcam).

## Annexe II : Commentaires de l'article en révision

### A. Reviewer 1

#### 1. *Comments for the authors*

In this manuscript, Carné Trécesson et al describe that p21waf1 mediates Oncogene induced Senescence (OIS) in HT29 colorectal cell line upon RAS expression by means of preventing the induction of genes that induce transition from G1 to G2, including cdc25A and PLK1. Moreover, the authors go on two show that cells escaping RAS-induced p21-mediated OIS in HT29 cell line induce increase DNA damage, EMT and survival pathways induced by Bcl-xl/Mcl-1. Identifying mechanisms that control escape from OIS has been the focus of much attention since this is a key step in the cancer progression towards disseminated disease. Using HT20, p53 defective colon cancer cells; the authors showed that RAS-induced OIS is associated with an increase in p21waf and shed light on the processes downstream effectors. Collectively, these results provide mechanistic insight into the RAS-driven OIS potential of tumor cells. This is a well-done analysis and the results are largely convincing. Thus, the paper is potentially interesting and provides a new mechanism for regulation of OIS and its escape in colorectal cancer cells, but it falls short in their validation of some aspects except for one cell line.

#### 2. *Major Points*

1. The manuscript collects several concepts already present in the literature; even the authors in their previous articles pointed some out. The authors ensembled several evidences that provide an interesting edge on build up. This allows them to propose that RAS mediated OIS is a tumor barrier retained in, at least, some colorectal cancer cells. Despite all this, the authors lack a pivotal cue to support their hypothesis. They must show that OIS in HT29 cells is mediated by p21waf, as they propose, and exclude the possibility that p21waf is not a bystander marker. The authors could take advantatge of the p21waf siRNA to show that upon p21waf loss-of-function doxycyclin mediated RAS induction does not trigger OIS.
2. The authors do most of their work in one single cell line, HT29 colorectal cell line. In an effort to generalize their finding that RAS mediates OIS in transformed cells through

p21waf they should use an independent cell line where to recapitulate at list part of the findings. Alternatively, the authors could include experiments in KRASG12V colorectal cancer cells whereby forced expression of p21waf restores their ability to trigger OIS. In summary, the authors need to generalize their observations otherwise; the manuscript conclusions would be limited to one single cell line, HT29. Thus restraining its implications and value.

3. Figure 6C, the authors suggest that emergent clones in 48hour DOX treated cells have already acquired enhanced ability to migrate (This is surprising). This is surprising since these clones are more abundant than in when compared to L4 and L5 populations. Moreover, these 24-48h DOX treated cells still retain E-Cadherin expression and have not induced Vimentin. A better explanation must be provided to reconcile this surprising observation.
4. Why do the authors never discuss the potential function of p15Ink4b, since it has been recently related to BRAF OIS (Peepers and colleagues). And p19? How is the INK4b locus in this particular cell system?

### **3. *Minor Points***

1. Pag 5 lane 15, there is a work missing. Probably “role”
2. SAHF acronym is described twice through the text
3. Bcl-xL or Bcl-XL, ras or RAS etc... nomenclature must be consistent through the manuscript, text and figures. Moreover, human proteins should be written in capital letters and genes in Italics.

## **B. Reviewer 2**

### **1. *Comments for the authors:***

In this manuscript, the authors have clearly established that oncogene-induced senescence can be induced in a p53 and p16-deficient cell line. Interestingly, some cells can eventually escape senescence, dedifferentiate and acquire a transformed phenotype. These are potentially very significant findings, especially in the context of chemoresistance.

However, there are some concerns regarding the use of a single cell line and the lack of or miss interpretation of some data.

## **2. Major Points**

1. A main concern is regarding the use of a single cell line throughout the manuscript. The manuscript will be significantly improved by assessing ras-mediated senescence and escape from senescence in another p53/p16-deficient cell line. It may also be interesting to determine whether escape from senescence is a general mechanism i.e. could also take place in p53/p16-expressing cells.
2. The p53 target and cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is the major and best characterized inducer of cellular senescence. The authors have nicely showed that p21 is induced in senescent HT29 cells and then is lost once HT29 cells are escaping senescence. The authors need to provide possible mechanisms involved in p21 induction and subsequent loss in p53/p16-deficient cell line.
3. Cell cycle arrest is a mean feature of senescent cells and the authors claimed in the results that “cells were arrested in the G1 and G2 phases of the cell cycle 48 hr after Ras induction”. However, the corresponding FACS data do not show a significant increase in the number of cells in G1 or G2 (Figure 3A). There might be a decrease in the number of cells in G1 instead. This is major concern and additional experiments are required to clearly establish that HT29 cells are arrested upon Ras induction.
4. In Fig. 4C, the authors have selected three clones escaping senescence (L4, L5, and L6). The expression of Ras and ERK1/2-P need to be confirmed for each clone.
5. In Fig. 6C, Matrigel and Collagen I assays revealed that there was a strong increase in invasion in parental cells upon Ras induction in comparison to cells escaping senescence. These results are surprising. The authors need to address this discrepancy.

Sent on: October 1, 2010

## **TITRE EN ANGLAIS**

RAS Oncogene and Colorectal Cancer: Study of the Oncogenic Stress Response and Senescence Bypass

## **RÉSUMÉ EN ANGLAIS**

Oncogene-Induced Senescence (OIS) is a tumor suppressor mechanism which prevent uncontrolled cells proliferation during oncogenic stress. During tumorigenesis, this process is inhibited by inactivation of tumor suppressor genes to allow proliferation and cell transformation. The OIS is described in primary cells, however, we have observed that this mechanism is conserved in transformed cells following the expression of H-RasV12. We investigated the regulation of this line of response in a colorectal adenoma cell line that have already inactivated tumor suppressors p16INK4a and p53.

We observed that Ras oncogene induces p53-independent p21Waf1 expression which promotes senescence establishment. Under these conditions, we observed that p21Waf1 inhibits proliferation by transcriptional regulation of cell cycle genes Cdc25A and Plk1. In this work we noticed that some cells escaped to this arrest. By studying the presence of Senescence-Associated Heterochromatin Foci (SAHF), we observed that these cells loss senescence phenotype, and exhibit mesenchymal and dedifferentiation markers. These results suggests that upon expression of the oncogene Ras, some cells escape the OIS and this bypass exhaust is associated with an Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and emergence of dedifferentiated cells. The bypass of Ras mediated OIS is associated to EMT and dedifferentiation. This mechanism might contribute to tumorigenesis.

## **TITRE**

Oncogène RAS et Cancer Colorectal : Étude de la Réponse au Stress Oncogénique et de l'Échappement à la Sénescence

## **RÉSUMÉ**

La sénescence induite par l'oncogène, ou OIS (*Oncogene-Induced Senescence*), est un mécanisme permettant d'empêcher la prolifération anarchique des cellules lors du stress oncogénique. Lors de la tumorigenèse, ce processus est inhibé par l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs pour permettre la prolifération et la transformation cellulaire. L'OIS est un processus conservé dans les cellules primaires, cependant, nous l'avons observé dans des cellules transformées à la suite de l'expression de H-RasV12. Nous avons étudié les acteurs de cette réponse dans une lignée d'adénome colorectal ayant déjà inactivé les suppresseurs de tumeurs p16Ink4a et p53.

Nous avons observé que l'oncogène Ras induisait l'expression de p21Waf1 et conduisait à la mise en place de la sénescence. Dans ces conditions, nous avons vu que p21Waf1 inhibait la transcription des gènes du cycle cellulaire Cdc25A et Plk1 pour permettre l'arrêt de la prolifération. Au cours de ce travail nous avons remarqué que certaines cellules échappaient à cet arrêt. Par l'étude de la présence de SAHF (*Senescence-Associated Heterochromatine Foci*), nous avons observé que ces cellules ne présentaient plus ce phénotype caractéristique de la sénescence, mais des marqueurs de cellules mésenchymateuses, et que certaines d'entre elles avaient subi une dédifférenciation. Les résultats que nous avons obtenus indiquent que lors de l'expression de l'oncogène Ras, certaines cellules échappent à l'OIS et que cet échappement est associé à une EMT (*Epithelial-Mesenchymal Transition*) et à l'émergence de cellules dédifférenciées. L'EMT contribuerait à l'échappement des cellules à l'arrêt du cycle cellulaire.

## **MOTS CLÉS**

Oncogène, Ras, Sénescence, p21Waf1, OIS (Sénescence induite par l'oncogène), EMT (Transition épithélio-mésenchymateuse), Échappement.

## **SPÉCIALITÉ**

Biologie Cellulaire

Sophie de Carné Trécesson  
INSERM U892  
Centre de Lutte Contre le Cancer Paul Papin  
2 rue Moll  
49933 Angers cedex 09