



# Rôle de ZNF217, un nouvel oncogène dans le cancer du sein : rôle dans l'échappement tumoral et valeur pronostique

Aurélie Thollet

## ► To cite this version:

Aurélie Thollet. Rôle de ZNF217, un nouvel oncogène dans le cancer du sein : rôle dans l'échappement tumoral et valeur pronostique. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10326 . tel-00862607

**HAL Id: tel-00862607**

<https://theses.hal.science/tel-00862607>

Submitted on 17 Sep 2013

**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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE

BIOLOGIE MOLECULAIRE, INTEGRATIVE ET CELLULAIRE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 8 décembre à 15h

par

**Melle THOLLET Aurélie**

TITRE :

**Rôle de ZNF217, un nouvel oncogène dans le cancer du sein :**

**Rôle dans l'échappement tumoral et valeur pronostique.**

Directeur de thèse : Pr COHEN Pascale

**JURY :**

Dr Pierre ROUX, Directeur de Recherche, CNRS UMR 5237, Montpellier  
Pr Pierre CUQ, Professeur, Université Montpellier I  
Dr Catherine NGUYEN, Directeur de Recherche, INSERM U928, Marseille  
Dr Caroline MOYRET-LALLE, MCU, Université Claude Bernard Lyon I  
Pr Pascale COHEN, Professeur, Université Claude Bernard Lyon I

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examinateur  
Directeur de thèse

## ***Remerciements***

En premier lieu, je tiens à remercier sincèrement Madame le Docteur Catherine Nguyen et Monsieur le Docteur Pierre Cuq pour avoir accepté d'être rapporteurs de ces travaux malgré leurs nombreuses occupations.

Mes sincères remerciements vont également à Madame le Docteur Caroline Moyret-Lalle et Monsieur le Docteur Pierre Roux pour avoir accepté de juger mes travaux.

Je tiens à remercier encore une fois Madame le Docteur Caroline Moyret-Lalle ainsi que Madame le Docteur Sophie Mary pour avoir participé à mes comités de thèse pendant mon Doctorat, pour m'avoir soutenue, encouragée et conseillée avec beaucoup de sympathie.

Je remercie Madame le Professeur Pascale Cohen pour m'avoir acceptée en stage de Master 2 puis en Doctorat, pour ses conseils, pour son apprentissage, pour nos discussions scientifiques très enrichissantes, pour m'avoir guidée à travers mon projet de recherche, pour les congrès auxquels j'ai participé, pour m'avoir donnée l'opportunité d'enseigner et surtout pour la rigueur scientifique qu'elle m'a transmise.

Que Monsieur le Professeur Alain Puisieux trouve ici l'assurance de ma profonde gratitude pour m'avoir accueillie au sein du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon.

Je souhaite remercier également Madame le Docteur Laura Corbo pour nous avoir accueillis au sein de son équipe de recherche. Un grand merci à toute son équipe pour nos conversations très enrichissantes : Madame le Docteur Muriel Le Romancer, Madame le Docteur Stéphanie Sentis, Coralie, Katia, Clément et Chloé.

Je remercie le Docteur Ruth Rimokh, le Docteur Isabelle Treilleux, le Docteur Stéphanie Vinot, le Docteur Léa Payen, le Docteur Ivan Bièche, le Docteur Pierre Roux, le Docteur Emmanuel Prestat, le Professeur Alexandre Aussem et le Docteur Pierre Colas pour les fructueuses collaborations que nous avons eues ensemble.

Je souhaiterais remercier tous les membres du CRCL que j'ai pu côtoyer pendant ces années et en particulier Laurent et Thibault.

Je tiens à remercier le Centre Commun de Quantimétrie où j'ai passé de nombreuses heures au microscope. Merci à Monsieur le Docteur Yves Tourneur, Madame le Docteur Anne Béghin, Denis et Batoule pour leurs conseils et leur disponibilité.

Un grand merci à Julie et Sandra qui m'ont formée avec patience et bonne humeur à de nombreuses techniques. Un merci particulier à Julie pour son écoute et tous ses précieux conseils. Julie n'abandonne surtout pas ta nouvelle vocation d'AQ !

Je tiens à remercier Marie pour m'avoir encadrée pendant mon Master 2, pour sa patience et pour m'avoir initié aux joies de l'enseignement.

Je tiens à remercier les techniciennes Evelyne, ma deuxième maman, et Sabrina avec qui j'ai travaillé au cours des dernières années. Un grand merci pour tous nos fous rires et tous vos potins !

Un grand merci aux autres Doctorants, Paul et Nhan, avec qui nous avons partagé les bons comme les mauvais moments, pour nos conversations sans fin, les repas partagés (merci Nhan pour nous avoir fait de succulents plats vietnamiens), nos soirées pub et tant d'autres choses. Tout mon soutien pour la réalisation de votre thèse.

Merci à tous les membres du Département Pédagogique des Sciences Biomédicales B qui partagent notre bureau pour leur bonne humeur et leurs conseils : le Docteur Karim Chick, le Docteur Carole Ferraro-Peyret, Eric et Gilles.

Merci également à nos voisines de la plateforme du LCMT, Delphine, Perrine et Marjorie, pour les bons moments partagés ensemble.

Un grand merci à tous mes amis qui m'ont soutenue et encouragée pendant toutes ces années. A Alexandra pour nos 10 ans d'amitié (déjà !), toutes nos soirées depuis le début de la fac, nos « longues » conversations, nos week-end et nos vacances ; à Aline pour nos soirées filles et ton éternelle bonne humeur, tout mes encouragements et mon soutien pour Adrén'Aline ; à Aurel pour ses précieux conseils informatiques, ses cours de roller et bientôt ses cours de théâtre ! ; à Lionel toujours partant pour une soirée ; à Jean-Louis et Guillaume pour les bonnes soirées passées ensemble et toutes leurs gaffes ! Jean-Louis bon courage pour finir ta thèse ; à Anne pour son aide et pour m'avoir fait découvrir de nombreuses fonctionnalités de word, et surtout d'être une « belle-sœur » en or et au mini-Anne (ou Roy !)

à venir ; à mes amis de la fac, surtout Marion pour ses bons conseils, maintenant Marion à toi d'écouter les miens...

Un grand merci à toute ma famille en particulier mes parents grâce auxquels je suis là aujourd'hui et à qui je dédie cette thèse. Un grand merci pour tout ce qu'ils ont fait pour moi, leur soutien et leur aide au cours de toutes ses années. Un grand merci aussi à ma sœur et au petit nouveau de la famille, François, pour leur retard légendaire, les week-ends passés ensemble (et surtout Las Vegaas !), les bons repas et les brocantes mythiques ! Enfin, un grand merci aussi à Bernard et Françoise qui m'ont accueilli dans leur famille avec une extrême sympathie.

Vincent, je tiens à te remercier du fond du cœur pour tout le soutien que tu m'as apporté durant ces deux dernières années, pour ta confiance, tes encouragements, ton amour et tous les moments de bonheur passés et surtout à venir. Je t'aime !

# Sommaire

LISTE DES FIGURES .....	7
LISTE DES TABLEAUX .....	8
LISTE DES ABREVIATIONS .....	9
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ISSUES DE CE TRAVAIL .....	13
AVANT-PROPOS .....	14
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>16</b>
1. <i>Cancer du sein</i> .....	17
1.1. Epidémiologie .....	17
1.2. Types de cancers .....	18
1.3. Facteurs étiologiques .....	18
1.4. Diagnostic.....	22
1.5. Facteurs pronostiques .....	22
1.5.1. Détermination de l'extension de la tumeur.....	22
1.5.2. Etude du degré d'agressivité de la tumeur.....	24
1.5.3. Etude des récepteurs hormonaux.....	24
1.5.4. Analyse des ganglions axillaires .....	27
1.5.5. Etude de l'expression d'oncogènes .....	27
1.6. Traitement .....	28
1.6.1. La chirurgie .....	28
1.6.2. La radiothérapie.....	28
1.6.3. La chimiothérapie.....	29
1.6.4. L'hormonothérapie .....	31
2. <i>Les amplifications 20q13</i> .....	35
2.1. Amplifications 20q13 et cancers .....	35
2.2. Amplifications 20q13 et progression tumorale .....	41
2.3. Oncogènes présents au sein de l'amplification 20q13.....	43
2.3.1. <i>PTB1B</i> .....	43
2.3.2. <i>STK15/BTK/AURKA</i> .....	44
2.3.3. <i>MYBL2/B-myb</i> .....	44
2.3.4. <i>eEF1A2</i> .....	45
2.3.5. <i>CAS/CSE1L</i> .....	45
2.3.6. <i>CYP24</i> .....	46
2.3.7. <i>PFDN4</i> .....	47
3. <i>Les membres de la famille KLF</i> .....	47
3.1. Structure des KLFs.....	47
3.2. Expression des KLFs.....	51
3.3. Mécanisme d'action des KLFs .....	51
3.3.1. Protéines interagissant avec les KLFs .....	51
3.3.1.1. Histones acétyltransférases.....	51
3.3.1.2. CtBP .....	52
3.3.1.3. Sin3A.....	52
3.3.2. Modifications post-traductionnelles .....	53
3.4. Fonction des KLFs .....	53

3.5. KLFs et cancers .....	55
3.4.1. KLF4/GKLF/EZF .....	55
3.4.2. KLF5/IKLF/BTEB2 .....	58
3.4.3. KLF6/ZF9/CPBP/GBF .....	59
3.4.4. KLF8/BKLF3 .....	61
3.4.5. KLF9/BTEB .....	61
3.4.6. KLF10/TIEG1 .....	63
3.4.6. KLF11/FKLF/TIEG2/MODY7 .....	63
3.4.7. KLF12/AP-2rep .....	64
4. ZNF217/ZABC1 .....	65
4.1. ZNF217, un oncogène putatif .....	65
4.1.1. Amplification de ZNF217 et cancers.....	65
4.1.2. Expression de ZNF217 et cancers .....	68
4.1.3. ZNF217, un oncogène putatif.....	69
4.2. ZNF217, un nouveau facteur de transcription .....	70
4.2.1. Structure de ZNF217 .....	70
4.2.2. ZNF217 fait partie de complexes transcriptionnels.....	74
4.2.3. Régulation de la transcription génique par ZNF217 .....	79
4.3. Mécanismes moléculaires impliqués dans les fonctions de survie ZNF217-dépendantes .	89
4.3.1. Rôle de ZNF217 dans les phases précoces du développement tumoral .....	89
4.3.2. Rôle de ZNF217 dans les phases tardives du développement tumoral .....	92
<b>TRAVAUX PERSONNELS .....</b>	<b>95</b>
OBJECTIFS DE MON TRAVAIL DE THESE .....	96
ARTICLE N°1.....	97
Objectifs de l'étude.....	98
Commentaires et discussion .....	106
ARTICLE N°2.....	110
Objectifs de l'étude.....	111
Commentaire et discussion.....	157
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>165</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>174</b>
ARTICLE N°3.....	175
<b>REFERENCES .....</b>	<b>208</b>

## *Liste des figures*

Figure 1 : Physiologie du sein .....	19
Figure 2 : Classification TNM. ....	23
Figure 3 : Hormonothérapie des cancers du sein. ....	32
Figure 4 : Cancer du sein : principes de la prise en charge thérapeutique (Guide ALD 30 «Cancer du sein», Haute Autorité de Santé, HAS). ....	34
Figure 5 : Modèle d'initiation du cancer.....	42
Figure 6 : Domaines fonctionnels des KLFs.....	48
Figure 7 : Représentation schématique d'une protéine KLF.....	50
Figure 8 : Mécanismes d'action de KLF4.....	57
Figure 9 : Variants d'épissage de KLF6.....	62
Figure 10 : Structure de la protéine ZNF217. ....	71
Figure 11 : Homologie entre ZNF217 et les facteurs KLFs.....	72
Figure 12 : Organisation génomique de ZNF217.....	75
Figure 13 : Modèle de mécanismes par lesquels ZNF217 réprimerait la transcription. ....	78
Figure 14 : Technique CAST. ....	81
Figure 15 : Bilan de ce travail : Implication de ZNF217 dans la cancérogénèse mammaire.	173

## ***Liste des tableaux***

Tableau 1: Classification histologique des cancers du sein selon l'OMS.....	20
Tableau 2 : Les différents stades de la classification TNM. ....	25
Tableau 3 : Grade histo-pronostique SBR.....	26
Tableau 4 : Principales cures de chimiothérapie dans le cancer du sein.....	30
Tableau 5 : Amplifications 20q13 et cancers. ....	36
Tableau 6 : Modifications post-traductionnelles des KLFs. ....	54
Tableau 7 : Amplification de <i>ZNF217</i> . ....	66
Tableau 8 : Séquences consensus de l'ADN génomique reconnues par <i>ZNF217</i> . ....	80
Tableau 9 : Gènes régulés par <i>ZNF217</i> .....	84
Tableau 10 : Gènes régulés par <i>ZNF217</i> .....	85
Tableau 11 : Gènes régulés par <i>ZNF217</i> .....	86

## *Liste des abréviations*

<b>3'UTR</b>	3' UnTranslated Region
<b>5-FU</b>	5-Fluoro-Uracile
<b>aa</b>	Acides aminés
<b>ABCB1</b>	ATP-binding cassette, sub-family B member 1
<b>AC</b>	Doxorubicine, Cyclophosphamide
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>ADRM1</b>	Adhesion regulating molecule 1
<b>Ag</b>	Antigène
<b>AICR</b>	American Institute of Cancer Research
<b>ALD</b>	Affection Longue Durée
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messager
<b>ATM</b>	Ataxia teleangiectasia mutated
<b>Bad</b>	Bcl-2 antagonist of cell death
<b>Bak</b>	Bcl-2 homologous antagonist
<b>Bax</b>	Bcl-2 interactive cell death susceptibility regulator
<b>BCAS1</b>	Breast carcinoma amplified sequence 1
<b>Bcl-2</b>	B-cell lymphoma 2
<b>Bcl-xL</b>	B-cell lymphoma-extra large
<b>Bmx</b>	Bone marrow tyrosine kinase gene in chromosome X protein
<b>BRCA1/2</b>	Breast cancer gene 1/2
<b>CAS</b>	Cellular Apoptosis Susceptibility
<b>CAST</b>	Cyclic Amplification and Selection of Target
<b>CBP</b>	CREB binding protein
<b>CCIS</b>	Carcinome Canalaire <i>In-situ</i>
<b>CCND1</b>	Cyclin D1
<b>CDH1</b>	Cadherin 1/ E-cadherin
<b>CDK</b>	Cyclin dependant kinase
<b>CEBPβ</b>	CCAAT enhancer-binding protein β
<b>CGH</b>	Comparative genomic hybridization
<b>CHEK2</b>	Checkpoint kinase 2
<b>ChIP</b>	Chromatin ImmunoPrecipitation
<b>ChIP-chip</b>	Chromatin ImmunoPrecipitation on Chip
<b>ChIP-DSL</b>	Chromatin ImmunoPrecipitation with Directed Selection and Ligation
<b>CLB</b>	Centre Léon Bérard
<b>CLIS</b>	Carcinome Lobulaire <i>In-situ</i>
<b>CMF</b>	Cyclophosphamide, Méthotrexate, 5-FU
<b>Co-IP</b>	Co-immunoprecipitation
<b>Co-REST</b>	REST corepressor
<b>CRB</b>	Centre de Ressources Biologiques
<b>CRH</b>	Centre René Huguenin
<b>CSE1L</b>	Chromosome segregation 1 like
<b>CtBP</b>	C-terminal binding protein

<b>CYP24</b>	Cytochrome P450, family 24
<b>DOP-PCR</b>	Degenerate oligo-nucleotide-primed-polymerase chain reaction
<b>eEF1A2</b>	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>EMT</b>	Epithelial mesenchymal transition
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinase
<b>EZH2</b>	Enhancer of zeste homolog
<b>FAC</b>	5-FU, Doxorubicine, Cyclophosphamide
<b>FEC</b>	5-FU, Epirubicine, Cyclophosphamide
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factor
<b>FISH</b>	Fluorescence In-situ Hybridization
<b>FoxO3</b>	Forkhead box O3
<b>GFAP</b>	Glial fibrillary acidic protein
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>H (suivi d'un numéro)</b>	Histone
<b>HAS</b>	Haute Autorité de Santé
<b>HAT</b>	Histone acetyltransferase
<b>HDAC</b>	Histone deacetylase
<b>HER2/neu/ErbB2</b>	Human epidermal growth factor receptor 2
<b>HER+</b>	Présence du récepteur HER2
<b>HER-</b>	Absence du récepteur HER2
<b>HGF</b>	Hepatocyte growth factor
<b>HIF</b>	Hypoxia Inducible Factor
<b>HLH</b>	Helix loop helix
<b>HMEC</b>	Human mammary epithelial cell
<b>hTERT</b>	Telomerase reverse transcriptase
<b>IGF</b>	Insulin-like growth factor
<b>IGF-1R</b>	Insulin-like growth factor 1 receptor
<b>INCa</b>	Institut National du Cancer
<b>INK4</b>	Inhibitor of cyclin-dependant kinase 4
<b>InVS</b>	Institut National de Veille Sanitaire
<b>is</b>	<i>In-situ</i>
<b>Kb</b>	Kilo-base
<b>KLF</b>	Krüppel-like factor
<b>KRAS</b>	Kristen RAS
<b>Lck</b>	Lymphocyte specific protein tyrosine kinase
<b>LH-RH</b>	Luteinizing Hormone-Releasing Hormone
<b>LOH</b>	Loss of heterozygosity
<b>LSD1</b>	Lysin specific demethylase 1
<b>Mad</b>	Max dimerization protein 1
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>Mb</b>	Mega-base
<b>MeCP2</b>	Methyl CpG binding protein 2
<b>mic</b>	Micro-invasion
<b>MPLA</b>	Multiplex ligation-dependant Probe Amplification
<b>MYBL2</b>	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2
<b>NABC1/BCAS1</b>	Novel Amplified in Breast Cancer-1
<b>N-CoR</b>	Nuclear receptor corepressor

<b>NCT</b>	National clinical trial
<b>NLS</b>	Nuclear Localization Signal
<b>OCT4</b>	Octamer-binding transcription factor 4
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>p300</b>	E1A binding protein p300
<b>PARP</b>	Poly (ADP-ribose) polymerase
<b>pb</b>	Paire de base
<b>P/CAF</b>	P300/CBP-associated factor
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PFDN4</b>	Prefoldin subunit 4
<b>PgP</b>	P-glycoprotein
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-3-kinase
<b>PSMA7</b>	Proteasome subunit alpha type 7
<b>PTB1B</b>	Protein tyrosin phosphatase 1B
<b>PTEN</b>	Phosphatase and tensin homolog
<b>RAE1</b>	RNA export 1 homolog
<b>REα</b>	Récepteurs des œstrogènes alpha
<b>RE-</b>	Absence de récepteur des œstrogènes alpha
<b>RE+</b>	Présence de récepteurs des œstrogènes alpha
<b>RLGS</b>	Restriction Landmark Genome Scanning
<b>RIZ</b>	Retinoblastoma protein-interacting zinc finger protein
<b>RP</b>	Récepteur de la progestérone
<b>RP-</b>	Absence de récepteurs de la progestérone
<b>RP+</b>	Présence de récepteurs de la progestérone
<b>RPN2</b>	Ribophorin II
<b>RPS21</b>	Ribosomal protein S21
<b>RTQ-PCR</b>	Real time quantitative PCR
<b>SAI</b>	Sans Autre Indication
<b>SBR</b>	Score de Scarff, Bloom et Richardson
<b>SERD</b>	Selective Estrogen Receptor Down-regulator
<b>SERM</b>	Selective Estrogen Receptor Modulator
<b>siRNA</b>	Small interfering RNA
<b>SLMO2</b>	Slowmo homolog 2
<b>SMRT</b>	Silencing mediator of retinoic and thyroid receptor
<b>SNAI1/Snail</b>	Snail homolog 1
<b>SNAI2/Slug</b>	Snail homolog 2
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism
<b>SP1</b>	Specificity protein 1
<b>Src</b>	v-src sarcoma
<b>STK15/BTK/AURKA</b>	Serin/Threonin kinase 15
<b>Syk</b>	Spleen tyrosine kinase
<b>TAC</b>	Taxotère, Doxorubicine, Cyclophosphamide
<b>TGF-β</b>	Transforming growth factor-β
<b>TIE</b>	TGF- β-inhibitory element
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor
<b>TNM</b>	Tumeur Node ou envahissement ganglionnaire Métastase
<b>TOMM34</b>	Translocase of outer mitochondrial membrane 34
<b>TP53</b>	Tumor protein 53
<b>UBE2C</b>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C

<b>VAPB</b>	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B and C
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>ZEB</b>	Zinc finger homeodomain enhancer-binding protein
<b>ZNF</b>	Zinc finger
<b>WCRF</b>	World Cancer Research Fund
<b>wt</b>	wild type

## ***Publications et communications issues de ce travail***

### **Publications**

---

- **Thollet A\***, Vendrell JA\*, Payen L, Ghayad SE, Ben Larbi S, Grisard E, Collins C, Villedieu M, Cohen PA. ZNF217 confers resistance to the pro-apoptotic signals of paclitaxel and aberrant expression of Aurora-A in breast cancer cells. *Molecular Cancer*. (2010), **9**, 291-307.
- Vendrell JA\*, **Thollet A\***, Ghayad SE, Vinot S, Treilleux I, Bièche I, Grisard E, Roux P, Corbo L, Rimokh R, Cohen PA. Upregulated ZNF217 expression, a novel marker for poor prognosis in breast cancer, is associated with migration, invasion and EMT. (En revision, *Cancer Research*).

\* Les auteurs ont contribué de façon équivalente à ce travail.

### **Collaboration**

---

- Prestat E, Rodrigues de Morais S, Vendrell J, **Thollet A**, Gautier C, Cohen P, Aussem A. Learning the local Bayesian network structure around the ZNF217 oncogene in breast tumours. (En soumission).

### **Communications écrites**

---

- **Thollet A**, Vendrell JA, Payen L, Ghayad SE, Ben Larbi S, Grisard E, Collins C, Villedieu M and Cohen PA. ZNF217 over-expression confers a proliferative and a paclitaxel-resistant phenotype in breast cancer cells. 6<sup>èmes</sup> journées scientifiques du CLARA, Lyon, France. 28-29 mars 2011. Abstract n°11, *Bulletin du Cancer*, (2011), **98**.
- **Thollet A**, Vendrell JA, Payen L, Ghayad SE, Ben Larbi S, Grisard E, Collins C, Villedieu M and Cohen PA. ZNF217 conferred increased cell proliferation and resistance to the pro-apoptotic action of paclitaxel in breast cancer cells. 21<sup>st</sup> conference of the European Association for Cancer Research, Oslo, Norvège, 26-29 juin 2010. Abstract n°694, *EJC supplements*, (2010), **5**, 170.
- **Thollet A**, Vendrell JA, Payen L, Ghayad SE, Ben Larbi S, Villedieu M and Cohen PA. ZNF-X conferred increased cell proliferation and resistance to the pro-apoptotic action of paclitaxel in breast cancer cells. 5<sup>èmes</sup> journées scientifiques du CLARA, Lyon, France. 30-31 mars 2010. Abstract n°113, *Bulletin du Cancer*, (2010), **97**.
- **Thollet A**, Villedieu M, Vendrell JA, Ghayad SE, Ben Larbi S, Payen L, Cohen PA. ZNF-X, a new oncogene involved in apoptotic response and sensitivity to paclitaxel in breast cancer cells. 4<sup>èmes</sup> journées scientifiques du CLARA, Lyon, France. 24-25 mars 2009. Abstract n°63, *Bulletin du Cancer*, (2009), **96**.

## *Avant-propos*

Le cancer du sein est un problème de santé publique majeur. Il s'agit du cancer le plus fréquent chez les femmes dans le monde et représente actuellement la première cause de mortalité par cancer chez les femmes. Les mécanismes de l'oncogénèse mammaire ne sont pas totalement connus et il est donc important de les étudier afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux biomarqueurs pronostics ou prédictifs. Dans ce but, il est fondamental d'identifier les oncogènes et leurs mécanismes d'action. En 1998, Collins *et al.* ont décrit un nouvel oncogène situé dans la région chromosomique 20q13, *ZNF217*, qui serait impliqué dans la cancérogénèse mammaire. Ses fonctions et ses mécanismes d'action sont encore très mal connus à l'heure actuelle et des études ultérieures approfondies sont donc nécessaires pour déterminer si *ZNF217* pourrait représenter une cible thérapeutique ou un marqueur pronostic intéressant.

La partie bibliographique de ce travail présente dans un premier temps le cancer du sein. Ensuite nous décrirons les amplifications 20q13, une région fréquemment amplifiée dans les cancers, et les oncogènes présents au sein de cette région chromosomique. Puis nous nous intéresserons aux membres de la famille Krüppel-like dont fait partie *ZNF217* en décrivant leur structure, leurs fonctions, leurs mécanismes d'action ainsi que leur implication en cancérologie. Enfin, nous terminerons cette partie par la présentation de *ZNF217*. Nous décrirons dans un premier temps le rôle putatif d'oncogène de *ZNF217*, puis sa fonction de facteur de transcription et enfin les mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans les fonctions de *ZNF217*.

Dans la partie Travaux personnels, seront présentés les deux axes de recherche qui constituent le travail de mon Doctorat et les résultats qui en sont issus. Ainsi, nous avons montré que *ZNF217* induit la résistance aux signaux apoptotiques du paclitaxel. Cette

résistance s'explique en partie au moins par la dérégulation de l'expression des membres de la famille Bcl-2 et par la surexpression d'Aurora-A. Nous avons ensuite démontré que des forts niveaux d'expression d'ARNm de *ZNF217* sont un marqueur de mauvais pronostic dans le cancer du sein. Enfin, nous avons mis en évidence que la surexpression de *ZNF217* est associée à une augmentation de l'agressivité, de l'invasion, de la migration et à l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) *via* l'activation de la voie du TGF- $\beta$ .

Nous terminerons enfin notre propos par l'exposé des conclusions et perspectives majeures découlant de ce travail.

# BIBLIOGRAPHIE

## **1. Cancer du sein**

### **1.1. Epidémiologie**

Le cancer du sein est un problème de santé publique majeur dans le monde entier. En effet, le cancer du sein est le plus fréquent des cancers chez les femmes avec une incidence mondiale estimée à 1.38 millions de nouveaux cas en 2008 soit 23% de tous les cancers (données issues du projet Globocan de l'Organisation Mondiale de la Santé, OMS, 2008). Le taux d'incidence est très variable selon les pays : de 19.3 pour 100 000 femmes en Afrique de l'Est à 89.7 pour 100 000 femmes en Europe de l'Ouest. Le nombre de morts par cancer du sein est estimé à 458 000 cas en 2008 dans le monde. Le cancer du sein représente la 5<sup>ème</sup> cause de décès tous cancers confondus et la première cause de mortalité par cancer chez les femmes.

Avec une incidence de 52 600 nouveaux cas en France en 2010, le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme avant le cancer colorectal (18 900 cas) et le cancer du poumon (10 000 cas) (données de l'Institut de Veille Sanitaire, InVS, 2010). La probabilité pour une femme d'avoir un cancer du sein au cours de sa vie est de 10,1%. Aujourd'hui près de 300 000 personnes vivent avec un cancer du sein en France. Ce cancer est rare avant 30 ans puis son taux d'incidence augmente avec l'âge jusqu'à un pic aux alentours de 65 ans (données du Ministère de la santé, 2001). La moitié des nouveaux cas de cancers chez la femme depuis 30 ans est représentée par le cancer du sein. L'incidence du cancer du sein croît régulièrement depuis 1980 de + 2,4% par an en moyenne. Inversement le taux de mortalité diminue depuis les années 2000 de - 1,3% par an en moyenne (Henon, 2010). Le cancer est la deuxième cause de mortalité chez les femmes françaises et le cancer du sein constitue la première cause de mortalité par cancer chez les femmes avec 11 300 décès en 2010 (données de l'InVS, 2010).

## **1.2. Types de cancers**

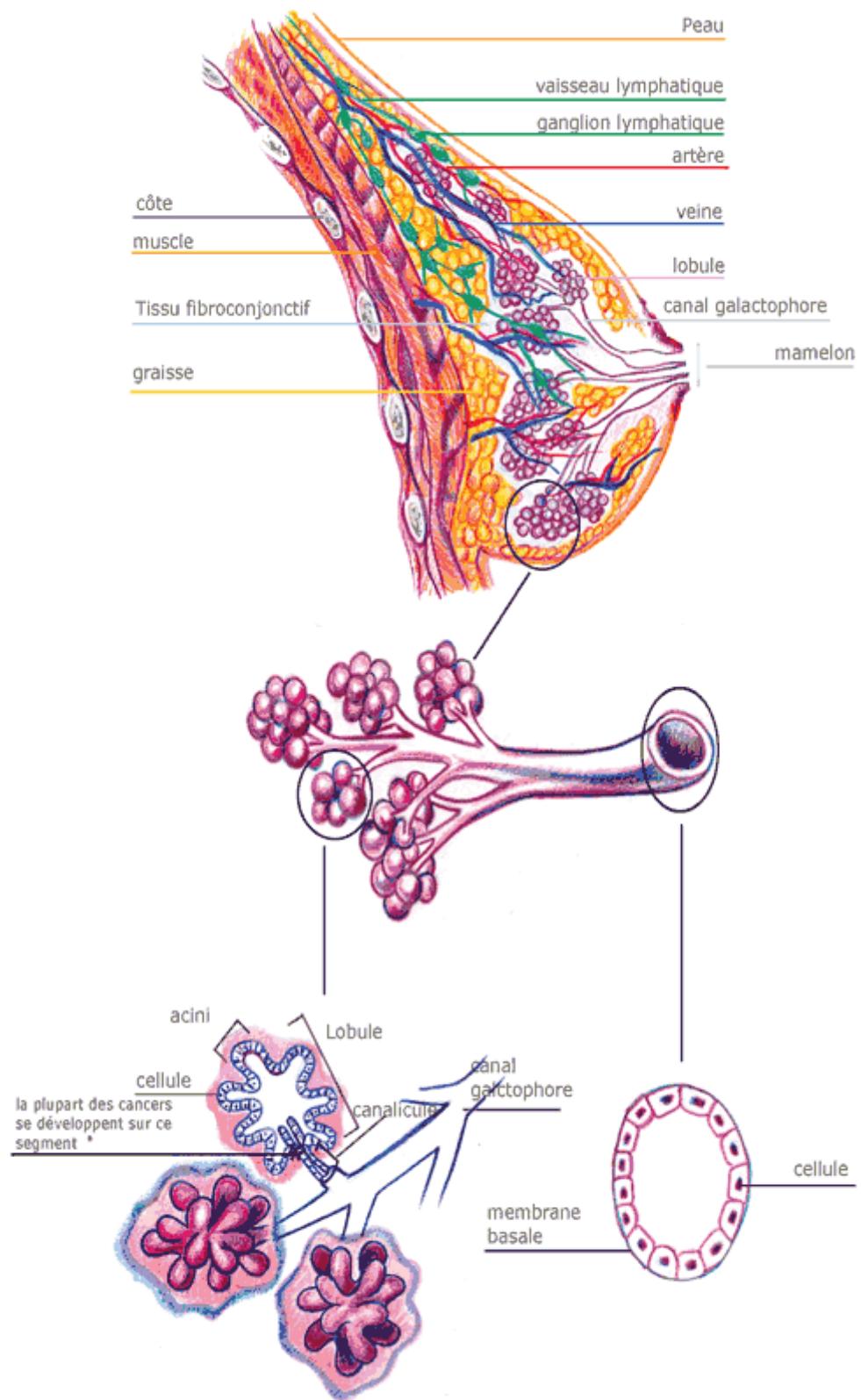
Il existe deux types de cancer du sein : les cancers *in-situ* et les cancers infiltrants. Le cancer *in-situ* se caractérise par une prolifération épithéliale maligne dans la lumière soit du canal galactophore (carcinome intracanalaire) soit des acini situés dans les lobules (carcinome intralobulaire) (Figure 1). Dans les deux cas, la membrane basale est toujours respectée. Il ne donne pas de localisation à distance ganglionnaire ou métastatique. Les carcinomes intracanalaires sont les plus fréquents puisqu'il s'agit de 80% des cancers *in-situ*.

Le cancer infiltrant est un cancer qui envahit le tissu mammaire, évoluant localement puis métastasant. Les carcinomes canalaires infiltrants sont plus fréquents que les carcinomes lobulaires infiltrants. En effet, 75% des tumeurs infiltrantes sont des carcinomes canalaires. Des études anatomo-pathologiques ont permis l'élaboration par l'OMS d'une classification histologique des cancers du sein utilisée actuellement par les pathologistes (Tableau 1).

## **1.3. Facteurs étiologiques**

L'étiologie du cancer du sein n'est pas totalement connue mais plusieurs facteurs de risques ont été identifiés :

- le sexe féminin : 99% des cancers du sein apparaissent chez la femme.
- un âge avancé : 1 cancer du sein invasif sur 8 a lieu chez les femmes de moins de 45 ans tandis que 2 cancers du sein invasif sur 3 sont retrouvés chez les femmes âgées de 55 ans ou plus. C'est pourquoi les programmes de dépistage du cancer du sein ont été mis en place à partir de 50 ans.



**Figure 1 : Physiologie du sein.**

**Tumeurs épithéliales non infiltrantes**

Carcinome canalaire *in-situ* (intracanalaire) (CCIS)

Carcinome lobulaire *in-situ* (CLIS)

**Tumeurs épithéliales infiltrantes**

Carcinome canalaire infiltrant SAI (sans autre indication)

Carcinome canalaire infiltrant avec composante intracanalaire prédominante

Carcinome lobulaire infiltrant

Carcinome mucineux (colloïde)

Carcinome médullaire

Carcinome papillaire

Carcinome tubuleux

Carcinome adénoïde kystique

Carcinome sécrétant juvénile

Carcinome apocrine

Carcinome métaplasique de type épidermoïde

Carcinome métaplasique de type à cellules fusiformes

Carcinome métaplasique de type chondroïde et osseux

Carcinome métaplasique de type mixte

Maladie de Paget du mamelon

**Tableau 1: Classification histologique des cancers du sein selon l'OMS.**

- Facteurs de risques génétiques : environ 5 à 10% des cancers du sein sont héréditaires (Sakorafas & Tsiotou, 2000). Le risque de cancer du sein est donc plus élevé pour les femmes ayant des antécédents familiaux de cancers du sein. Ainsi une femme ayant un parent du premier degré avec un cancer du sein a deux fois plus de risque de développer un cancer du sein et une femme ayant deux parents du premier degré avec un cancer du sein a trois fois plus de risque (Sattin *et al.*, 1985). Les causes les plus fréquentes des cancers du sein familiaux sont les mutations des gènes *BRCA1* (Miki *et al.*, 1994) et *BRCA2* (Wooster *et al.*, 1994; Wooster *et al.*, 1995). D'autres mutations ont été décrites telles les mutations dans les gènes *ATM* (Thompson *et al.*, 2005; Renwick *et al.*, 2006), *TP53* (Chappuis *et al.*, 2000; Holstege *et al.*, 2009), *CHEK2* (Allinen *et al.*, 2001; Vahteristo *et al.*, 2001), *PTEN* (Nelen *et al.*, 1996) ou *CDH1* (Keller *et al.*, 1999; Schrader *et al.*, 2008).
- Des lésions prolifératives dans les canaux ou les lobules du tissu mammaire augmentent le risque de cancer du sein de 2 à 5 fois selon le type de lésions (avec ou sans atypie) (Harris *et al.*, 1997)
- la durée d'exposition aux œstrogènes (puberté précoce, ménopause tardive, nulliparité ou première grossesse tardive, prise d'un traitement hormonal substitutif) (Dumitrescu & Cotarla, 2005).
- la consommation excessive de graisses animales et la surcharge pondérale, particulièrement après la ménopause (Sieri *et al.*, 2002).
- la consommation excessive d'alcool (Schatzkin *et al.*, 1987).

D'autres facteurs de risque ont été décrits mais les résultats des études sont contradictoires. Il s'agit de la prise de vitamines et de certains régimes (Key *et al.*, 2004;

Michels & Ekbom, 2004; WCRF/AICR, 2007), des sels d'aluminium (Mirick *et al.*, 2002; McGrath, 2003), de la cigarette (Johnson *et al.*, 2000) ou du travail de nuit (Villeneuve *et al.*, 2011). Inversement, l'exercice physique semble être un facteur protecteur contre le cancer du sein (Friedenreich *et al.*, 2001; WCRF/AICR, 2007).

## **1.4. Diagnostic**

Le diagnostic repose sur des arguments cliniques, radiologiques, cytologiques et histologiques. Au niveau clinique, on peut observer une tuméfaction dure et indolore, une adénopathie axillaire et beaucoup plus rarement une poussée inflammatoire avec rougeur et chaleur locales associées à la tuméfaction ou un envahissement cutané. Au niveau radiologique, l'examen de référence est la mammographie sur laquelle on peut observer une opacité et des micro-calcifications. Enfin on réalise une biopsie qui est l'examen de base du diagnostic afin de réaliser les examens cytologiques et histologiques.

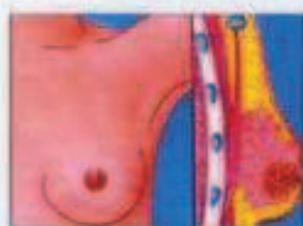
## **1.5. Facteurs pronostiques**

Différents facteurs pronostiques sont utilisés en pratique clinique afin d'évaluer le pronostic des patientes et choisir le traitement adjuvant le mieux adapté. Différents critères sont ainsi pris en compte : détermination de l'extension de la tumeur, étude du degré d'agressivité de la tumeur, étude des récepteurs hormonaux, analyse des ganglions axillaires et étude de l'expression d'oncogènes.

### **1.5.1. Détermination de l'extension de la tumeur**

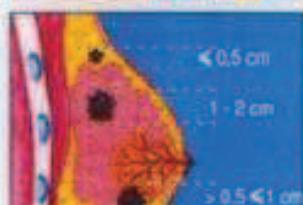
La classification internationale TNM (Figure 2) repose sur l'examen histologique de la tumeur primaire (T), du statut ganglionnaire régional anatomo-pathologique (N) et l'existence de métastases (M).

## Tumeur primitive



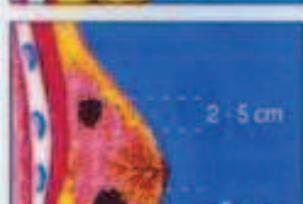
*T<sub>x</sub>*: aucune information sur la tumeur  
*T<sub>0</sub>*: pas de tumeur primitive

*T<sub>is</sub>*: carcinome in situ



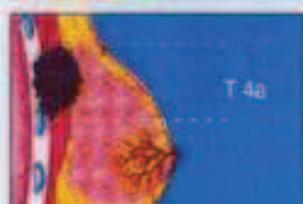
*T<sub>1</sub>*: tumeur de moins de 2 cm

*T<sub>1a</sub>*: < 0.5 cm  
*T<sub>1b</sub>*: 0,5 à 1 cm  
*T<sub>1c</sub>*: 1 à 2 cm



*T<sub>2</sub>*: tumeur de 2 à 5 cm

*T<sub>3</sub>*: tumeur de plus de 5 cm



*T<sub>4a</sub>*: tumeur étendue à la paroi thoracique, quelle que soit sa taille

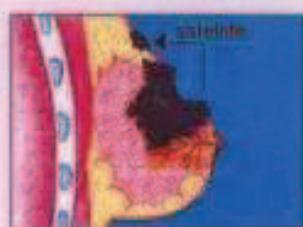


*T<sub>4c</sub>*: *T<sub>4a</sub>* + *T<sub>4b</sub>*



*T<sub>4d</sub>*: cancer inflammatoire

## Tumeur évoluée



*T<sub>4b</sub>*: tumeur étendue à la peau, quelle que soit sa taille : œdème, peau d'orange, ulcération, nodules internes sur le sein



*N<sub>x</sub>*: aucune information sur les adénopathies  
*N<sub>0</sub>*: pas d'adénopathie régionale

*N<sub>1</sub>*: adénopathie homolatérale mobile



*N<sub>2</sub>*: adénopathie homolatérale fixée



*N<sub>3</sub>*: adénopathie mammaire interne homolatérale

## Métastases à distance



*M<sub>x</sub>*: aucune information sur les métastases  
*M<sub>0</sub>*: pas de métastase

*M<sub>1</sub>*: métastase(s) à distance (y compris adénopathie sus-claviculaire)

Figure 2 : Classification TNM.

Cette classification permet de définir plusieurs stades cliniques dans les cancers du sein compris entre 0 et IV (Tableau 2). Le stade ainsi défini servira pour planifier le traitement et estimer l'évolution du pronostic.

### **1.5.2. Etude du degré d'agressivité de la tumeur**

Le grade histo-pronostique de Scarff Bloom et Richardson (SBR) (Bloom & Richardson, 1957) est utilisé dans la pratique courante pour évaluer le degré d'agressivité de la tumeur (Tableau 3). Le SBR est calculé par addition de trois critères côtés de 1 à 3 : architecture, atypie nucléaire et nombres de mitoses. Cela donne trois grades de I à III qui évaluent le pronostic : le grade I a un pronostic favorable, le II un pronostic intermédiaire et le III un pronostic défavorable.

### **1.5.3. Etude des récepteurs hormonaux**

Les récepteurs hormonaux sont étudiés par immunohistochimie à l'aide d'anticorps monoclonaux. Pour être positif il faut que plus de 10% des cellules tumorales soient marquées (Pertschuk & Axiotis, 1999). L'intensité est également évaluée mais n'est pas considérée comme un marqueur pronostique. Les récepteurs hormonaux recherchés dans la pratique courante sont les récepteurs aux œstrogènes alpha (RE $\alpha$ ) et à la progestérone (RP). Le statut RE est utilisé à la fois comme un indicateur de la réponse à l'hormonothérapie (marqueur prédictif) mais aussi comme un facteur pronostic de récidive précoce. Les tumeurs RE+ sont corrélées à un bon pronostic clinique (Murphy & Watson, 2002; Dunnwald *et al.*, 2007). De même, les tumeurs RP+ ont un meilleur pronostic que les tumeurs RP- (Green *et al.*, 2008a). De plus, des études montrent que le statut RP peut aider à prédire la réponse à l'hormonothérapie à la fois chez les patientes avec un cancer métastatique (Ravdin *et al.*, 1992) et dans les traitements adjuvants (Bardou *et al.*, 2003).

<b>Stade 0</b>		Tis	N0	M0
<b>Stade I</b>		T1 et T1mic	N0	M0
<b>Stade II</b>				
	IIA	T0 T1 et T1mic T2	N1 N1 N0	M0 M0 M0
	IIB	T2 T3	N1 N0	M0 M0
<b>Stade III</b>				
	IIIA	T0 T1 et T1mic T2 T3	N2 N2 N2 N1, N2	M0 M0 M0 M0
	IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
	IIIC	tous T	N3	M0
<b>Stade IV</b>		tous T	tous N	M1

is: *in-situ* ; mic : micro-invasion

**Tableau 2 : Les différents stades de la classification TNM.**

SBR = 3 critères			
Critères	Différenciation glandulaire	Pléiomorphisme nucléaire	Mitoses/champ x 400
	Prédominante : 1	Discret : 1	$\leq 1 : 1$
	Modérée : 2	Modéré : 2	2 : 2
	Faible ou nulle : 3	Marqué : 3	$\geq 3 : 3$

Scores possibles :

SBR I = 3, 4 ou 5 : pronostic favorable ; SBR II = 6 ou 7 : pronostic intermédiaire ; SBR III = 8 ou 9 : pronostic défavorable.

**Tableau 3 : Grade histo-pronostique SBR.**

La combinaison RE/RP permet d'établir 3 groupes phénotypiques distincts : RE+/RP+, RE+/RP- ou RE-/RP+, et RE-/RP- qui représente respectivement 63%, 13%, 3% et 21 % des tumeurs du sein (Grann *et al.*, 2005). Ces groupes ont des caractéristiques biologiques différentes, un pronostic différent et une réponse aux traitements différente. Ainsi les tumeurs RE+/RP+ sont considérées comme de bon pronostic alors que les tumeurs RE-/RP- sont considérées comme de mauvais pronostic (pour revue, (Rakha *et al.*, 2010)).

#### **1.5.4. Analyse des ganglions axillaires**

Les ganglions axillaires sont des petits organes situés au niveau des aisselles et qui contiennent uniquement des lymphocytes. L'analyse des ganglions axillaires permet d'orienter le traitement. Au moment de l'intervention chirurgicale, une dizaine de ganglions axillaires sont prélevés et analysés pour savoir s'ils renferment ou non des cellules cancéreuses provenant de la tumeur ce qui permet d'orienter le traitement.

#### **1.5.5. Etude de l'expression d'oncogènes**

Des oncogènes tels que *myc* et surtout *HER2/neu/ErbB2* sont amplifiés et surexprimés dans le cancer du sein. En effet, 13 à 22% des tumeurs mammaires présentent une amplification de *myc* (Aulmann *et al.*, 2006; Corzo *et al.*, 2006) ; 22 à 33% des tumeurs surexpriment c-myc au niveau ARNm (Bieche *et al.*, 1999; Le *et al.*, 1999; Scorilas *et al.*, 1999) et 40 à 45% au niveau protéique (Chrzan *et al.*, 2001; Naidu *et al.*, 2002). L'amplification et la surexpression de HER2 sont quant à elles observées dans 15% des tumeurs primitives du sein (Weigel & Dowsett, 2010). L'amplification et la surexpression de *myc* et HER2 ont été associées à un mauvais pronostic (pour revues, (Chen & Olopade, 2008; Rakha *et al.*, 2010)). L'amplification du gène *HER2* ou la surexpression de la protéine est également un marqueur de mauvaise réponse à la chimiothérapie (pour revue, (Rakha *et al.*,

2010). Depuis qu'un anticorps monoclonal anti-HER2, trastuzumab ou Herceptin®, a été développé le statut HER2 est devenu plus important en clinique et est exploré en routine.

## **1.6. Traitement**

### **1.6.1. La chirurgie**

Il existe deux types de chirurgie : la chirurgie radicale et la chirurgie conservatrice. La chirurgie radicale consiste en la mastectomie simple ou associée à une exérèse des pectoraux qui n'est réalisée aujourd'hui qu'en cas d'envahissement de ces muscles. La mastectomie simple est souvent associée à une reconstruction mammaire réalisée en prenant du tissu au niveau des muscles du grand dorsal ou du grand droit de l'abdomen et avec parfois une prothèse incluse. La chirurgie conservatrice est la tumorectomie pour signifier qu'on enlève la tumeur et non le sein entier. Dans cette intervention on enlève la tumeur et une partie de tissu sain autour de la tumeur. En France, cette opération est possible pour des tumeurs dont la taille ne dépasse pas 3 centimètres.

### **1.6.2. La radiothérapie**

La radiothérapie complète souvent la chirurgie dans le traitement du cancer du sein. Elle permet de réduire la fréquence par 3 ou 4 des récidives loco-régionales après chirurgie et permet ainsi les traitements conservateurs. Elle a également un intérêt palliatif pour les métastases osseuses et cérébrales. Enfin, la radiothérapie a une action modeste mais non négligeable sur la survie (5 à 10% à 5 ans). Le schéma de référence est de 50 Gy en 25 fractions sur 33 jours quel que soit le volume irradié (données de l'Institut National du Cancer, INCa, novembre 2008). Le sein total et les aires ganglionnaires sont irradiés. Il est recommandé de débuter la radiothérapie dans les 12 semaines après la chirurgie s'il n'y a pas de traitement adjuvant associé et dans les 5 semaines suivant la chimiothérapie en cas de traitement adjuvant.

### **1.6.3. La chimiothérapie**

La chimiothérapie est utilisée : (i) en traitement adjuvant après les traitements loco-régionaux afin d'éviter les rechutes, (ii) en traitement néo-adjuvant c'est-à-dire en première intention avant tout traitement local afin de réduire la taille de la tumeur avant la chirurgie et enfin (iii) pour le traitement des métastases. Pour éviter les résistances croisées, on utilise des associations avec des produits efficaces en monothérapie dont les mécanismes d'action sont différents et, si possible, sans toxicité cumulative. Les principales molécules utilisées en chimiothérapie dans le traitement du cancer du sein sont (pour revue (Frenel & Campone, 2010)):

- les anthracyclines : doxorubicine (Adryamycine<sup>TM</sup>) et épirubicine (Farmorubicine<sup>TM</sup>) dont le mécanisme d'action le plus probable est la compétition avec les topoisomérases.
- les antimétabolites anti-pyrimidiques dont le 5 Fluoro-Uracile (5-FU) qui inhibe la synthèse des acides nucléiques.
- les alkylants simple brin : cyclophosphamides (Endoxan<sup>TM</sup>) qui crée des liaisons covalentes avec l'ADN empêchant ainsi sa réPLICATION.
- les taxanes : paclitaxel (Taxol<sup>TM</sup>) et docétaxel (Taxotère<sup>TM</sup>) qui sont des stabilisants des microtubules. Ces molécules favorisent l'assemblage des microtubules et bloquent leur désassemblage empêchant ainsi la division cellulaire.

Généralement, le traitement adjuvant ou néo-adjuvant est composé d'une combinaison à base d'antracyclines et de taxanes (Tableau 4). Six cycles de chimiothérapies sont habituellement réalisés (Frenel & Campone, 2010).

<b>Schéma</b>	<b>Molécules utilisées</b>	<b>Administration</b>	<b>Nombre de cures</b>
FAC	5-FU Cyclophosphamide Doxorubicine	1/3semaines	6
FEC	5-FU Cyclophosphamide Epirubicine	1/3semaines	6
AC	Doxorubicine Cyclophosphamide	1/3semaines	4
FEC100-taxotère	5-FU Cyclophosphamide Epirubicine Taxotère	1/3semaines	3 FEC100 suivie de 3 Taxotère
TAC	Taxotère Doxorubicine Cyclophosphamide	1/3semaines	6
AC-taxol	Doxorubicine Cyclophosphamide Taxol	1/3semaines	4 AC suivie de 4 Taxol
CMF	Cyclophosphamide Méthotrexate 5-FU	2 cures en une semaine/mois	6

**Tableau 4 : Principales cures de chimiothérapie dans le cancer du sein.**

De plus, dans les cancers surexprimant l'oncogène *HER2* (environ 1 cancer sur 4), un anticorps monoclonal spécifique (Trastuzumab ou Herceptin<sup>TM</sup>) est utilisé en association avec la chimiothérapie, souvent un taxane, pendant 12 mois.

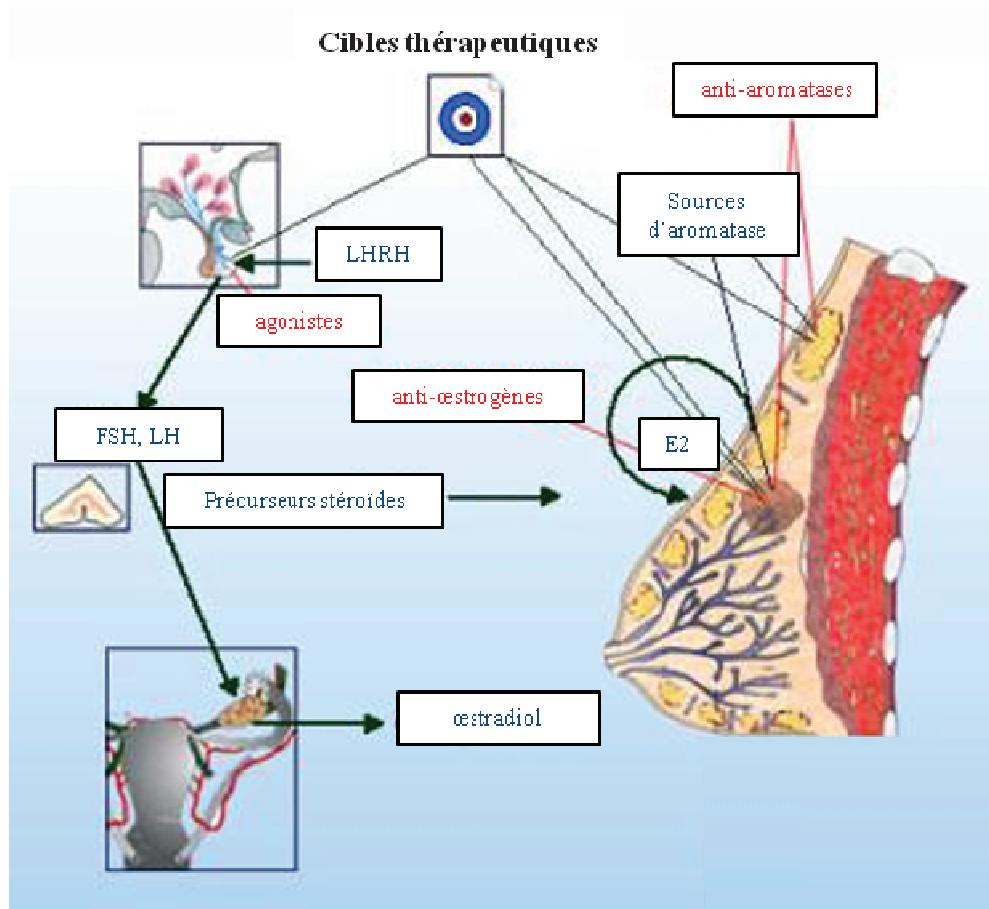
#### **1.6.4. L'hormonothérapie**

L'hormonothérapie est utilisée pour les cancers dits hormono-dépendants c'est-à-dire exprimant des récepteurs hormonaux nucléaires RE et/ou RP. Ils représentent environ 70% des cas des cancers du sein (Grann *et al.*, 2005). Différentes hormonothérapies sont utilisées pour bloquer l'action des œstrogènes (Figure 3). En effet, les œstrogènes jouent un rôle fondamental dans le processus de癌érogénèse de part les effets mitogéniques qu'ils exercent *via* le REα (Hanash, 2004).

La première stratégie consiste à réduire le taux d'œstrogènes circulant arrivant au niveau de la tumeur. Chez les femmes pré-ménopausées 75% des œstrogènes proviennent de la sécrétion ovarienne d'où l'intérêt de la castration ovarienne qui peut être chirurgicale, radiothérapeutique ou pharmacologique grâce aux analogues de la LH-RH (Luteinising Hormone-Releasing Hormone). Les principaux analogues de la LH-RH sont la buséréline (Biganist<sup>TM</sup>, Suprefact<sup>TM</sup>), la goséréline (Zoladex<sup>TM</sup>), la leuproréline (Enantone<sup>TM</sup>, Lucrin<sup>TM</sup>, Eligard<sup>TM</sup>) et la triptoréline (Decapeptyl<sup>TM</sup>).

La deuxième stratégie consiste à inhiber l'action des œstrogènes au niveau du REα par des antagonistes :

- les SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators) comme le tamoxifène (Nolvadex<sup>TM</sup>) qui présente une activité antagoniste du REα au niveau mammaire et une action agoniste au niveau de l'os, du système cardio-vasculaire et de l'endomètre.



**Figure 3 : Hormonothérapie des cancers du sein.**

Le tamoxifène est utilisé : (i) en première intention dans le traitement adjuvant des patientes pré-ménopausées quel que soit le stade de cancer, (ii) en deuxième intention dans le traitement adjuvant après chirurgie, chez des patientes post-ménopausées avec ou sans envahissement ganglionnaire et dans le traitement palliatif du cancer du sein métastatique.

- les SERDs (Selective Estrogen Receptor Down-regulator) comme le Fulvestrant (Faslodex<sup>TM</sup>) qui présente une activité antagoniste du RE $\alpha$  quel que soit le tissu considéré et induit la dégradation du récepteur RE $\alpha$ . Le Fulvestrant est utilisé pour le traitement en seconde ligne des patientes post-ménopausées ayant rechuté après un traitement par le tamoxifène.

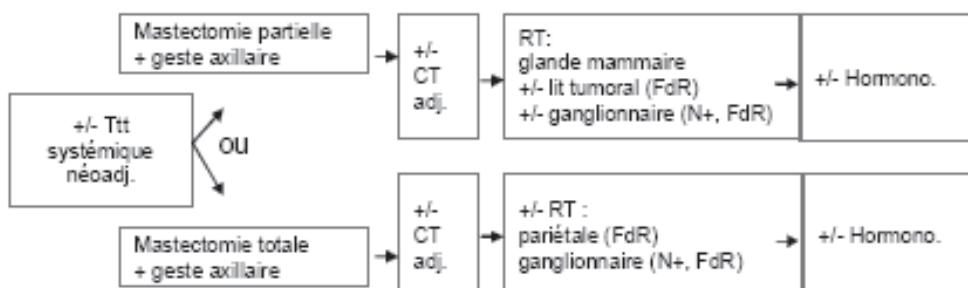
La troisième stratégie consiste à inhiber l'aromatase (au niveau périphérique ou intra-tumoral) des androgènes en œstrogènes, en ciblant et en inhibant l'aromatase, enzyme qui catalyse la dernière étape de biosynthèse des œstrogènes à partir des androgènes. L'aromatase a été retrouvée surexprimée et présente une activité augmentée dans des tumeurs mammaires (Chen *et al.*, 1999). Les anti-aromatases utilisés actuellement sont le Létrozole (Femara<sup>®</sup>), l'Anastrozole (Arimidex<sup>®</sup>) et l'Exemestane (Aromasine<sup>®</sup>). Les anti-aromatases sont utilisés en première intention chez les patientes post-ménopausées.

Les principes de la prise en charge thérapeutique des cancers du sein sont résumés dans la Figure 4.

## CARCINOME IN SITU



## CARCINOME INFILTRANT \*



## MALADIE METASTATIQUE



\* Hors cancer du sein inflammatoire

CT : chimiothérapie (incluant les thérapies ciblées)

RT : radiothérapie

Hormono. : hormonothérapie

Ttt : traitement

Néoadj. : néoadjuvant

FdR : indication discutée selon les facteurs de risque de récidive

N+ : indication discutée selon l'envahissement ganglionnaire

**Figure 4 : Cancer du sein : principes de la prise en charge thérapeutique (Guide ALD 30 «Cancer du sein», Haute Autorité de Santé, HAS).**

## **2. Les amplifications 20q13**

Les amplifications de l'ADN sont fréquentes dans les cancers humains et peuvent résulter en la surexpression des gènes amplifiés. Ces amplifications ont souvent été identifiées comme le site d'oncogènes qui confèrent aux cellules hôtes un avantage prolifératif et/ou de survie. Il y a donc plusieurs avantages à étudier les amplifications. Premièrement, les amplifications peuvent corrélérer avec un pronostic particulier. Deuxièmement, les mécanismes d'oncogenèse peuvent être étudiés à partir des fonctions des gènes présents au sein des amplifications. Troisièmement, l'identification d'oncogène peut permettre l'élaboration de thérapie ciblée. C'est pourquoi de nombreuses études se sont focalisées sur l'étude des amplifications 20q13.

### **2.1. Amplifications 20q13 et cancers**

Les amplifications chromosomiques en 20q13 ont été retrouvées dans de nombreux cancers et ce de manière fréquente, suggérant que cette amplification joue un rôle important dans la progression tumorale de nombreux cancers tels que les cancers du sein, de l'ovaire, du col de l'utérus, de l'estomac, du pancréas, de l'œsophage, de la vessie, de la tête et du cou, du foie, de la thyroïde, le cancer colo-rectal, le mélanome et le lymphome (Tableau 5). Dans le cancer du sein, les amplifications 20q13 sont retrouvées dans 6% à 66% des tumeurs mammaires (Kallioniemi *et al.*, 1994; Tanner *et al.*, 1994; Isola *et al.*, 1995; Tanner *et al.*, 1995; Courjal *et al.*, 1996; Tanner *et al.*, 1996; Courjal *et al.*, 1997; Courjal & Theillet, 1997; Schwendel *et al.*, 1998; Fiche *et al.*, 2000; Forozan *et al.*, 2000; Hodgson *et al.*, 2003; Ginestier *et al.*, 2006; Marchio *et al.*, 2008; Simpson *et al.*, 2008). La fréquence des amplifications 20q13 dépend du type histologique des tumeurs mammaires et de la méthode utilisée. Cette différence de fréquence est aussi retrouvée dans les autres cancers (Tableau 5).

<b>Types de cancer</b>	<b>Nombre et nature des échantillons</b>	<b>Méthode d'analyse du nombre de copies</b>	<b>% d'échantillons amplifiés</b>	<b>Références</b>
<b>Cancer du sein</b>	15 lignées cellulaires 33 carcinomes	CGH/FISH	40% 18%	(Kallioniemi <i>et al.</i> , 1994)
<b>Cancer du sein</b>	14 lignées cellulaires 36 tumeurs	FISH	35% 8%	(Tanner <i>et al.</i> , 1994)
<b>Cancer du sein</b>	48 tumeurs	CGH	15%	(Isola <i>et al.</i> , 1995)
<b>Cancer du sein</b>	132 tumeurs 11 métastases	FISH	29% 27%	(Tanner <i>et al.</i> , 1995)
<b>Cancer du sein</b>	14 lignées cellulaires	FISH	21%	(Tanner <i>et al.</i> , 1996)
<b>Cancer du sein</b>	1358 tumeurs	Southern-blot	6%	(Courjal <i>et al.</i> , 1997)
<b>Cancer du sein</b>	61 tumeurs	CGH	39%	(Courjal & Theillet, 1997)
<b>Cancer du sein</b>	39 carcinomes invasifs ductaux	CGH	38%	(Schwendel <i>et al.</i> , 1998)
<b>Cancer du sein</b>	23 carcinomes <i>in-situ</i>	FISH	9%	(Fiche <i>et al.</i> , 2000)
<b>Cancer du sein</b>	38 lignées cellulaires	CGH	29%	(Forozan <i>et al.</i> , 2000)
<b>Cancer du sein</b>	466 carcinomes	FISH	8%	(Ginestier <i>et al.</i> , 2006)
<b>Cancer du sein</b>	24 carcinomes micropapillaires	CGH-array	25%	(Marchio <i>et al.</i> , 2008)
<b>Cancer du sein</b>	15 carcinomes lobulaires pléomorphiques	CGH-array	66%	(Simpson <i>et al.</i> , 2008)
<b>Cancer de l'ovaire</b>	44 tumeurs	CGH	20%	(Iwabuchi <i>et al.</i> , 1995)
<b>Cancer de l'ovaire</b>	27 tumeurs	CGH	48%	(Sonoda <i>et al.</i> , 1997)
<b>Cancer de l'ovaire</b>	66 tumeurs	FISH	20%	(Diebold <i>et al.</i> , 2000)

Tableau 5 : Amplifications 20q13 et cancers.

<b>Types de cancer</b>	<b>Nombre et nature des échantillons</b>	<b>Méthode d'analyse du nombre de copies</b>	<b>% d'échantillons amplifiés</b>	<b>Références</b>
<b>Cancer du col de l'utérus</b>	84 tumeurs	FISH	30%	(Zhang <i>et al.</i> , 2002)
<b>Cancer du col de l'utérus</b>	9 lignées cellulaires	CGH-array/ FISH	55%	(Narayan <i>et al.</i> , 2007)
<b>Cancer gastrique</b>	8 xénogreffes	CGH	62%	(El-Rifai <i>et al.</i> , 1998)
<b>Cancer gastrique</b>	58 tumeurs	CGH	45%	(Sakakura <i>et al.</i> , 1999)
<b>Cancer gastrique</b>	62 adénocarcinomes	CGH	48%	(Wu <i>et al.</i> , 2002)
<b>Cancer gastrique</b>	34 tumeurs	CGH	54%	(Morohara <i>et al.</i> , 2005)
<b>Cancer gastrique</b>	38 adénocarcinomes	CGH-array	21%	(Myllykangas <i>et al.</i> , 2008)
<b>Cancer gastrique</b>	30 tumeurs	CGH-array	97%	(Tsukamoto <i>et al.</i> , 2008)
<b>Cancer gastrique</b>	50 carcinomes	MLPA	54%	(Zhang <i>et al.</i> , 2011)
<b>Cancer du pancréas</b>	30 lignées cellulaires	FISH	56%	(Mahlamaki <i>et al.</i> , 2002)
<b>Cancer du pancréas</b>	13 lignées cellulaires 6 tumeurs	CGH-array	31% 50%	(Holzmann <i>et al.</i> , 2004)
<b>Cancer de l'œsophage</b>	6 lignées cellulaires	CGH	67%	(Tada <i>et al.</i> , 2000)
<b>Cancer de l'œsophage</b>	14 tumeurs	CGH-array	79%	(van Dekken <i>et al.</i> , 2006)
<b>Cancer de l'œsophage</b>	51 tumeurs	CGH	69%	(Sakai <i>et al.</i> , 2009)

**Tableau 5 suite : Amplifications 20q13 et cancers.**

<b>Types de cancer</b>	<b>Nombre et nature des échantillons</b>	<b>Méthode d'analyse du nombre de copies</b>	<b>% d'échantillons amplifiés</b>	<b>Références</b>
<b>Barrett's (adénocarcinome de l'œsophage distal</b>	36 tumeurs non dysplasiques 25 tumeurs de bas grade 22 tumeurs de haut grade 16 adéno-carcinomes	FISH	8% 12% 5% 25%	(Rygiel <i>et al.</i> , 2008)
<b>Cancer colo- rectal</b>	20 tumeurs	CGH	65%	(De Angelis <i>et al.</i> , 1999)
<b>Cancer colo- rectal</b>	13 tumeurs	FISH	46%	(Korn <i>et al.</i> , 1999)
<b>Cancer colo- rectal</b>	146 tumeurs	FISH	53%	(Aust <i>et al.</i> , 2004)
<b>Cancer colo- rectal</b>	48 lignées cellulaires 37 tumeurs	CGH-array	65% 81%	(Douglas <i>et al.</i> , 2004)
<b>Cancer colo- rectal</b>	24 tumeurs	CGH	54%	(Xiao <i>et al.</i> , 2007)
<b>Cancer colo- rectal</b>	24 tumeurs primaires 24 métastases du foie associées	FISH	80% 80%	(Sayagues <i>et al.</i> , 2010)
<b>Cancer urothélial</b>	96 tumeurs	FISH	63%	(Akao <i>et al.</i> , 2006)
<b>Cancer de la  vessie</b>	100 tumeurs	FISH	42%	(Yamamoto <i>et al.</i> , 2006)
<b>Cancer de la tête et du cou</b>	30 tumeurs	CGH	33%	(Bockmuhl <i>et al.</i> , 1996)
<b>Cancer de la tête et du cou</b>	12 lignées cellulaires	CGH	8%	(Singh <i>et al.</i> , 2001)
<b>Cancer de la tête et du cou</b>	41 tumeurs	RLGS	7%	(Lin <i>et al.</i> , 2006)

Tableau 5 suite : Amplifications 20q13 et cancers.

<b>Types de cancer</b>	<b>Nombre et nature des échantillons</b>	<b>Méthode d'analyse du nombre de copies</b>	<b>% d'échantillons amplifiés</b>	<b>Références</b>
<b>Astrocytome</b>	33 tumeurs	CGH	27%	(Nishizaki <i>et al.</i> , 1998)
<b>Chondrosarcome</b>	29 tumeurs	CGH	35%	(Laramendy <i>et al.</i> , 1997)
<b>Cancer de la thyroïde</b>	8 lignées cellulaire	CGH	75%	(Lee <i>et al.</i> , 2007)
<b>Cancer du foie</b>	63 tumeurs	CGH-array	43%	(Schlaeger <i>et al.</i> , 2008)
<b>Mélanome</b>	28 tumeurs	FISH	3%	(Balazs <i>et al.</i> , 2001)
<b>Lymphome</b>	4 lignées cellulaires	CGH-array	50%	(Fadlelmola <i>et al.</i> , 2008)

**Tableau 5 suite : Amplifications 20q13 et cancers.**

Le plus souvent, le nombre de copies amplifiées est faible mais de haut niveaux d'amplifications ont été retrouvés dans tous les types de cancers où sont présentes ces amplifications. Une étude s'est intéressée à la différence de fréquence des amplifications entre les formes familiales et sporadiques dans les cancers colo-rectaux. Les résultats sont contradictoires : on observe deux fois plus d'amplifications 20q13 dans les cancers familiaux que dans les cancers sporadiques dans deux cohortes de patients mais ces résultats ne sont pas confirmés dans la troisième cohorte (Laiho *et al.*, 2003). Enfin, une étude visant à caractériser les différentes altérations génétiques des tumeurs du sein HER+ et HER-, a montré que l'amplification 20q13 est plus fréquente dans les tumeurs du sein HER+ que dans les tumeurs HER- (respectivement 83% et 12%) (Somiari *et al.*, 2004).

D'un point de vue pronostic, les amplifications 20q13 ont été associées à un mauvais pronostic et une survie sans récidive diminuée dans les cancers du sein, de l'ovaire, du côlon et les cancers urothéliaux (Isola *et al.*, 1995; Tanner *et al.*, 1995; Diebold *et al.*, 2000; Aust *et al.*, 2004; Akao *et al.*, 2006) ainsi qu'à une survie globale diminuée dans les cancers du sein et du côlon (De Angelis *et al.*, 2001; Aust *et al.*, 2004; Chin *et al.*, 2007). Les amplifications 20q13 ont été également associées à des critères clinico-pathologiques telles l'augmentation de l'agressivité et l'augmentation du grade de la tumeur dans les cancers du sein, de l'ovaire, du côlon et de la vessie (Isola *et al.*, 1995; Tanner *et al.*, 1995; Diebold *et al.*, 2000; Akao *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2009); la taille de la tumeur dans l'hépatocarcinome (Guan *et al.*, 2000), l'augmentation de la prolifération cellulaire dans le cancer colo-rectal (De Angelis *et al.*, 1999), l'instabilité chromosomique dans le cancer du sein, le cancer urothélial et le cancer de la vessie (Tanner *et al.*, 1995; Akao *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2006), la progression tumorale dans le cancer du côlon, du col de l'utérus et le cancer colo-rectal (Aust *et al.*, 2004; Scotto *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2009) et enfin l'apparition de métastases dans les cancers du sein, du pancréas, de la prostate et les cancers

colo-rectaux (Hidaka *et al.*, 2000; Mahlamaki *et al.*, 2002; Nakopoulou *et al.*, 2002; Wullich *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2007).

## 2.2. Amplifications 20q13 et progression tumorale

Les amplifications 20q13 sembleraient apparaître de manière précoce au cours du développement du cancer du sein (Werner *et al.*, 1999), du col de l'utérus (Scotto *et al.*, 2008) et de la prostate (Alers *et al.*, 2001; van Dekken *et al.*, 2004; Tabach *et al.*, 2011). De plus, l'amplification d'une copie de la région 20q13 a été associée avec le dépassement de la sénescence et l'immortalisation des cellules tandis que de forts niveaux d'amplifications 20q13 apparaîtraient plus tard et corrèleraient avec l'instabilité génomique et la croissance sélective des cellules (Savelieva *et al.*, 1997; Cuthill *et al.*, 1999).

Tabach *et al.* ont proposé un modèle décrivant l'initiation de la progression tumorale induite par l'amplification 20q dans le cancer de la prostate (Tabach *et al.*, 2011). Dans un premier temps, l'amplification du 20q apparaît dans une sous-population de cellules et induirait la surexpression de gènes situés sur le bras long du chromosome 20 (Figure 5). Ainsi 13 gènes ont été identifiés comme ayant un potentiel oncogénique important : *TOMM34*, *ADRM1*, *RAE1*, *PSMA7*, *PFDN4*, *SLMO2*, *RPS21*, *CSE1L*, *AURKA*, *RPN2*, *MYBL2*, *UBE2C* et *VAPB*. *eEF1A2* et *ZNF217*, des oncogènes décrits de la région 20q13, n'ont pas été identifiés dans cette étude. Deuxièmement, la surexpression de ces gènes induirait, de façon directe ou indirecte, l'activation de nombreux facteurs de transcription et des voies de signalisation impliquées dans le cancer dont les voies PI3K/Akt, p53, Wnt/β-catenine et ERK/MAPK. Troisièmement, l'activation de ces voies aurait pour conséquence une augmentation de la prolifération cellulaire, de l'activité métabolique et ribosomale et inhibrait les gènes associés à l'adhésion cellulaire.

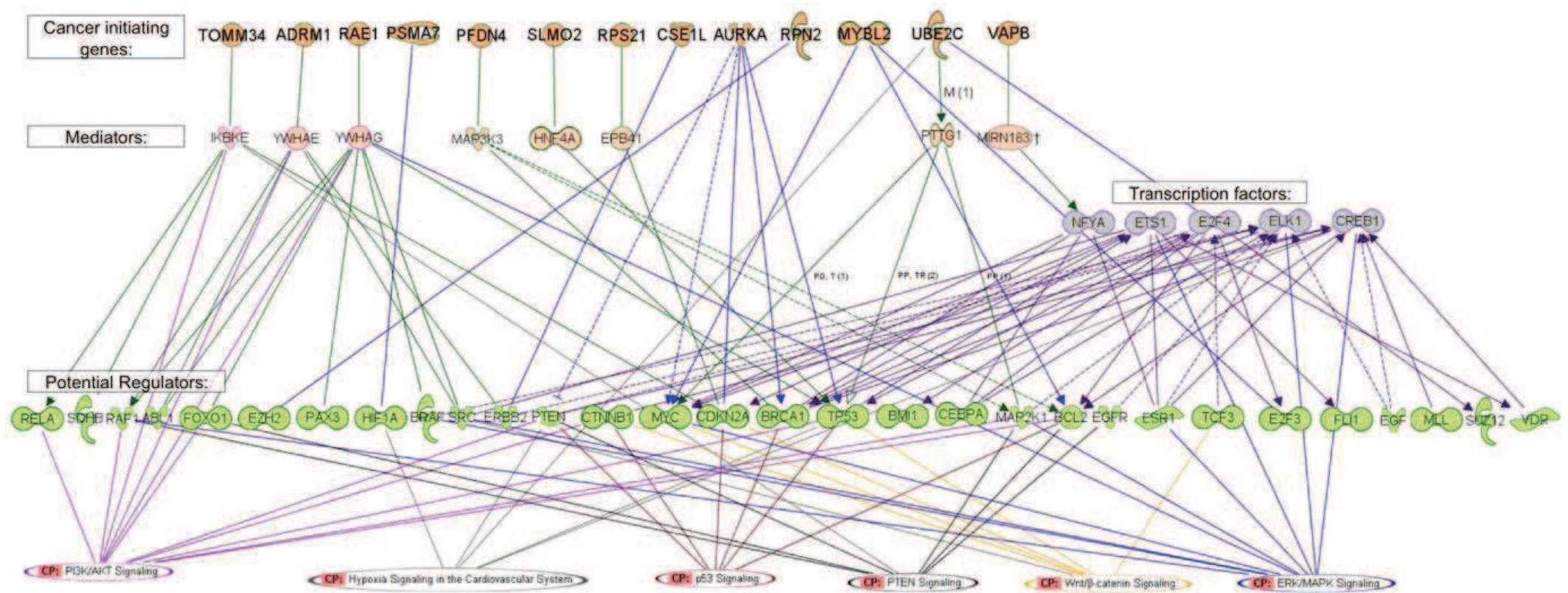


Figure 5 : Modèle d'initiation du cancer. D'après Tabach *et al.*, 2011.

Les modifications de l'expression des gènes identifiés auraient donc pour conséquence une prolifération cellulaire accrue et une perte de l'inhibition de contact des cellules dans les phases précoces du développement tumoral puis la progression tumorale, l'agressivité et un mauvais pronostic dans les phases tardives du cancer de la prostate.

### **2.3. Oncogènes présents au sein de l'amplification 20q13**

Plusieurs oncogènes ont été identifiés au sein de l'amplification 20q13 dont les gènes *PTB1B* (Bjorge *et al.*, 2000), *STK15/BTK/AURKA* (Courtneidge, 1994; Sen *et al.*, 1997), *MYBL2/B-myb* (Lipsick & Wang, 1999), *eEF1A2* (Lee, 2003), *CAS/CSE1L* (Brinkmann *et al.*, 1996; Savelieva *et al.*, 1997), *CYP24* (Albertson *et al.*, 2000), *PFDN4* (Heidenblad *et al.*, 2005), *NABC1/BCAS1* (Heidenblad *et al.*, 2005) et *ZNF217* (Collins *et al.*, 1998). Il est probable qu'il y ait plus d'un oncogène dans la région 20q13 et que plusieurs de ces gènes puissent contribuer au développement tumoral. Ginestier *et al.* ont confirmé cette hypothèse et décrit deux types d'amplification 20q13 : le type 1 où seul le locus de *ZNF217* est amplifié et le type 2 où *ZNF217* et plusieurs autres loci sont amplifiés et pourraient coopérer dans le développement tumoral (Ginestier *et al.*, 2006). La valeur pronostique de *ZNF217* diffère selon le type d'amplification. Dans le type 1, l'amplification de *ZNF217* est associée à l'absence d'invasion ganglionnaire et de façon surprenante à un mauvais pronostic tandis que les amplifications du groupe 2 sont associées à l'envahissement ganglionnaire et à un bon pronostic (Ginestier *et al.*, 2006).

#### **2.3.1. *PTB1B***

Le rôle de *PTB1B* en oncogénèse est mal connu mais des éléments laissent penser que *PTB1B* pourrait jouer un rôle important dans la tumorigénèse. En effet, *PTB1B* code pour une protéine tyrosine phosphatase qui déphosphoryle et active en autre la kinase Src, connue pour son implication dans la cancérogénèse (Bjorge *et al.*, 2000). Src intervient dans la régulation

de la prolifération cellulaire, la survie, la migration, l'invasion et l'angiogénèse (pour revue, (Guarino, 2010)). De plus, la surexpression de PTB1B induit le développement de tumeur spontanée dans les glandes mammaires de souris (Julien *et al.*, 2007).

### **2.3.2. *STK15/BTK/AURKA***

*STK15/BTK/AURKA* code pour une protéine kinase qui contrôle l'entrée en mitose des cellules, la maturation et la séparation des centrosomes, la distribution des chromosomes pendant la mitose et la cytokinèse (Hirota *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2008). La surexpression d'Aurora-A est observée dans de nombreux cancers dont les cancers du sein, de l'ovaire, du côlon, de l'estomac et du pancréas (Tanaka *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2003a; Tong *et al.*, 2004; Comperat *et al.*, 2007; Lassmann *et al.*, 2007a; Nishida *et al.*, 2007). De plus, la surexpression d'Aurora-A induit la transformation des fibroblastes de souris NIH3T3 (Zhou *et al.*, 1998). Enfin, l'expression d'Aurora-A est corrélée à l'agressivité et à un mauvais pronostic dans les cancers du sein, de l'ovaire, du col de l'utérus et le neuroblastome (Nadler *et al.*, 2008; Shang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Lassus *et al.*, 2011).

### **2.3.3. *MYBL2/B-myb***

*MYBL2/B-myb* code pour un facteur de transcription de la famille v-myb dont le membre fondateur est l'oncogène *c-myb*. MYBL2 intervient dans le développement, la prolifération cellulaire et la survie (Okada *et al.*, 2002; Davidson *et al.*, 2005). Comme les autres membres de la famille myb, la surexpression de MYBL2 pourrait transformer des fibroblastes NIH3T3 (Masselink *et al.*, 2001). De plus, *MYBL2* est amplifié et/ou surexprimé dans de nombreux cancers dont les cancers du sein, de la prostate, du foie et de l'ovaire (Sala, 2005). Enfin, de forts niveaux d'expression d'ARNm de *MYBL2* ont été associés à un mauvais pronostic dans les cancers du sein (Thorner *et al.*, 2009) et le neuroblastome (Raschella *et al.*, 1999).

#### **2.3.4. *eEF1A2***

*eEF1A2* est un oncogène qui code pour un facteur d'elongation de la traduction. *eEF1A2* est amplifié et surexprimé dans les cancers ovariens (Anand *et al.*, 2002; Tomlinson *et al.*, 2007) et surexprimé dans les cancers du sein et du poumon (Tomlinson *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2007). *eEF1A2* transforme les fibroblastes NIH3T3 (Anand *et al.*, 2002). De plus, *eEF1A2* inhibe l'apoptose et régule la migration, la croissance indépendante de l'ancrage et l'invasion *via* la voie de signalisation PI3K/Akt (Anand *et al.*, 2002; Ruest *et al.*, 2002; Amiri *et al.*, 2007; Chang & Wang, 2007; Jeganathan & Lee, 2007). Enfin, la surexpression protéique d'*eEF1A2* a été associée à un mauvais pronostic dans les cancers du poumon (Li *et al.*, 2006). De façon surprenante, deux études ont montré qu'une forte expression protéique d'*eEF1A2* serait un marqueur de bon pronostic dans les tumeurs du sein (Kulkarni *et al.*, 2007) et les tumeurs séreuses de l'ovaire (Pinke *et al.*, 2008). *eEF1A2* n'a pas de valeur pronostique dans d'autres types histologiques de tumeurs ovariennes comme les tumeurs endométriales, les tumeurs à cellules claires ou les tumeurs mucineuses. Les auteurs ont proposé plusieurs mécanismes pouvant expliquer le fait qu'*eEF1A2* soit un marqueur de bon pronostic : *eEF1A2* pourrait (i) contrecarrer la résistance à la chimiothérapie ; (ii) altérer la dissémination de la tumeur primaire ; (iii) altérer d'autres processus oncogéniques comme l'angiogénèse ou l'auto-renouvellement des cellules cancéreuses. A l'heure actuelle aucune de ces hypothèses n'a pu être validée et des études ultérieures doivent être menées pour comprendre ce paradoxe.

#### **2.3.5. *CAS/CSE1L***

*CAS/CSE1L* code pour un facteur de transcription qui joue un rôle dans la prolifération cellulaire et l'apoptose (Brinkmann *et al.*, 1996). *CAS* est fortement exprimé dans divers cancers dont les cancers du sein (Behrens *et al.*, 2001), de l'ovaire (Brustmann, 2004), de l'endomètre (Peiro *et al.*, 2001), du foie (Wellmann *et al.*, 2001), colo-rectal (Uen *et al.*,

2010), le carcinome nasopharyngé (Fang *et al.*, 2005) et le mélanome (Boni *et al.*, 1999). L'expression de CAS corrèle avec un grade élevé dans les cancers de l'ovaire (Peiro *et al.*, 2002; Ouellet *et al.*, 2006) et le mélanome (Boni *et al.*, 1999) ; un grade important dans les cancers de l'ovaire (Brustmann, 2004) et de l'endomètre (Peiro *et al.*, 2001) et un mauvais pronostic dans les cancers de l'ovaire (Brustmann, 2004), de l'endomètre (Peiro *et al.*, 2001) et le mélanome (Boni *et al.*, 1999). La surexpression de CAS augmente l'invasion des cellules de mélanome B16-F10 et la formation des métastases chez la souris (Liao *et al.*, 2008). Enfin, des études récentes montrent que CAS est sécrété dans le sérum avec une plus grande prévalence chez les patients atteints de cancers colo-rectaux, du sein, de l'ovaire, du poumon, de l'œsophage, de la tête et du cou, du col de l'utérus et présentant des métastases (Tung *et al.*, 2009; Stella Tsai *et al.*, 2010). Ainsi, un fort niveau d'expression de CAS pourrait être un marqueur sérologique utile pour le diagnostic, le pronostic, le suivi de la réponse aux traitements et le suivi des rechutes.

### **2.3.6. CYP24**

*CYP24* fait partie de la superfamille des cytochromes P450 qui comprend 57 gènes codant pour des enzymes qui métabolisent un grand nombre de médicaments mais également des substances endogènes tels les stéroïdes, les eicosanoïdes, les acides gras, les acides biliaires ou les vitamines. *CYP24* code pour une enzyme qui hydrolyse le calcitriol, forme active de la vitamine D3 ou 1,25-dihydroxy-vitamine D3, en acide calcitroïque, forme inactive de la vitamine D3 (Deeb *et al.*, 2007). *CYP24* est amplifié et/ou surexprimé dans de nombreux cancers dont les cancers du sein (Albertson *et al.*, 2000; Friedrich *et al.*, 2003), de l'ovaire (Friedrich *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2006), du col de l'utérus (Friedrich *et al.*, 2003), du poumon (Parise *et al.*, 2006) et du côlon (Bareis *et al.*, 2001; Cross *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2006) induisant la diminution de calcitriol qui a un effet anti-prolifératif sur les cellules (Friedrich *et al.*, 2003; Cross *et al.*, 2005). Enfin, un fort niveau d'expression

d'ARNm de *CYP24* est associé à une survie globale diminuée dans le cancer de l'œsophage (Mimori *et al.*, 2004).

### **2.3.7. *PFDN4***

*PFDN4* code pour un facteur de transcription qui régule le cycle cellulaire. Il est surexprimé dans les tumeurs du sein et les lignées cellulaires de cancer du sein (Collins *et al.*, 2001). Il pourrait être un marqueur pronostic dans le cancer du côlon (Miyoshi *et al.*, 2010).

**Enfin, le gène *ZNF217* a été décrit pour la première fois en 1998 par Collins *et al.* (Collins *et al.*, 1998). Les auteurs ont cloné une zone de l'amplification 20q13 de 1 Mb et défini une région d'environ 260 kb où l'amplification était maximale dans une série de tumeurs du sein (Collins *et al.*, 1998). Ainsi, les auteurs ont identifié un nouveau gène, *ZNF217*, qui fait partie par homologie aux membres de la famille des protéines Krüppel-like à doigts de zinc (KLF).**

## **3. Les membres de la famille KLF**

### **3.1. Structure des KLFs**

En dehors de *ZNF217*, la famille KLF comporte à l'heure actuelle 17 membres qui sont des facteurs de transcription, activateurs ou répresseurs. Les KLFs possèdent tous trois domaines en doigts de zinc et des domaines fonctionnels variables. Il existe différents motifs doigts de zinc dont le plus fréquent est le motif de type C2H2 dans lequel un atome de zinc est tétracoordonné avec deux cystéines et deux histidines (Brayer & Segal, 2008). Tous les membres de la famille KLF possèdent 3 motifs doigts de zinc C2H2 hautement conservés dans la partie C-terminale de la protéine (Figure 6).

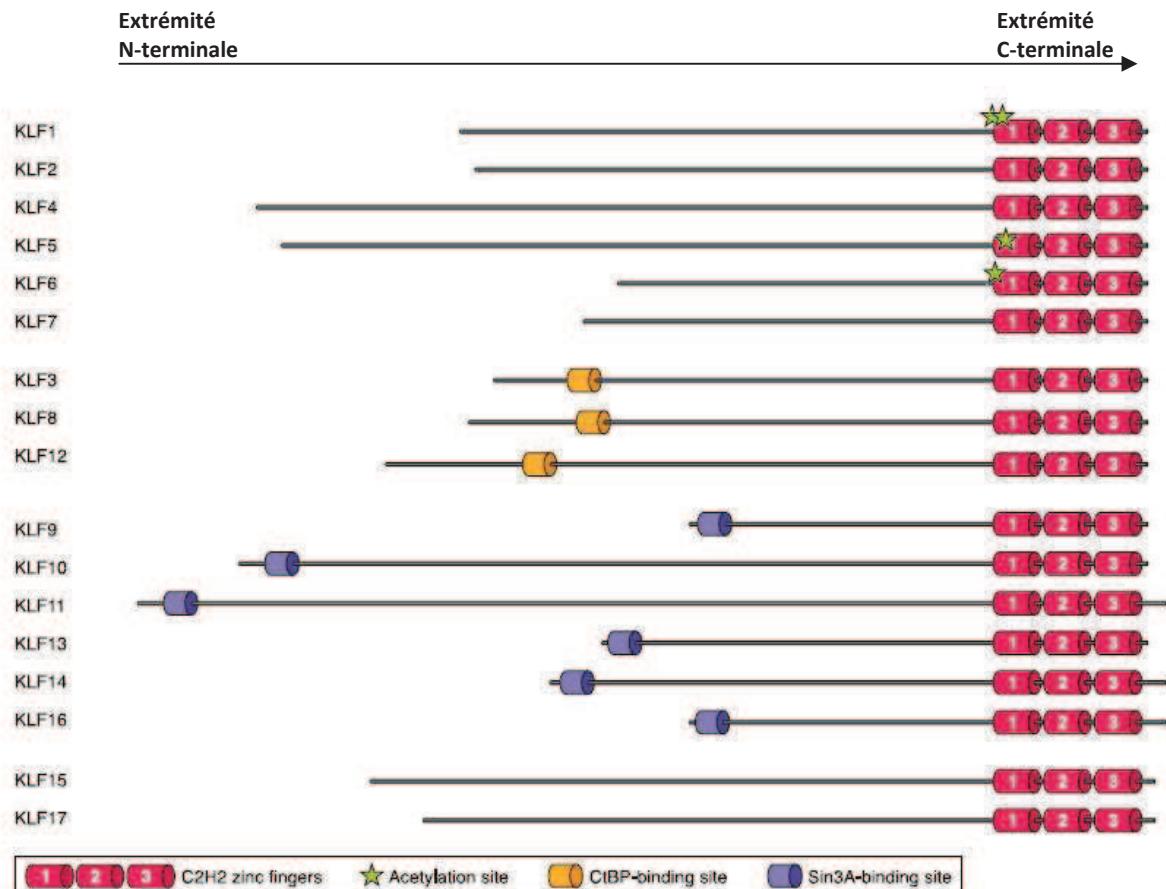


Figure 6 : Domaines fonctionnels des KLFs. D'après McConnell *et al.*, 2010.

Le premier et deuxième doigt de zinc contiennent 25 acides aminés (aa) et le troisième 23 aa. Chaque doigt de zinc reconnaît trois paires de base (pb) de la séquence d'ADN et interagit au total avec 9 pb (Nagai *et al.*, 2009). Les doigts de zinc lient l'ADN en se fixant sur les boîtes GC et le motif CACCC présents dans les promoteurs des gènes cibles (Kaczynski *et al.*, 2003; Suske *et al.*, 2005). Les doigts de zinc sont séparés par une séquence de 7 aa TGEKP(Y/F)X hautement conservée parmi les membres de la famille (Dang *et al.*, 2000b) (Figure 7).

Des signaux de localisation nucléaire (NLS) ont été identifiés dans les domaines doigts de zinc des KLF 1, 4, 8 et 11 (Shields *et al.*, 1996; Pandya & Townes, 2002; Spittau *et al.*, 2007; Mehta *et al.*, 2009) ainsi que dans une région amino-terminale de KLF4 (Shields *et al.*, 1996).

D'autres domaines fonctionnels sont présents dans la région amino-terminale des KLFs (Figure 6). Ceux-ci diffèrent selon les membres et permettent la liaison à des activateurs ou des répresseurs de la transcription résultant en une diversité fonctionnelle des KLFs. Sur la base des caractéristiques fonctionnelles des KLFs, la famille KLF peut être divisée en trois groupes (McConnell & Yang, 2010) :

- Le groupe 1 comporte les membres KLFs 3, 8 et 12 qui fonctionnent comme des répresseurs transcriptionnels *via* leur interaction avec le co-répresseur CtBP.
- Le groupe 2 comporte les membres KLFs 1, 2, 4, 5, 6 et 7 qui fonctionnent principalement comme des activateurs de la transcription mais pas exclusivement.
- Le groupe 3 comporte les membres KLFs 9, 10, 11, 13, 14 et 16 qui agiraient principalement comme des répresseurs transcriptionnels *via* leur interaction avec le co-répresseur Sin3A.

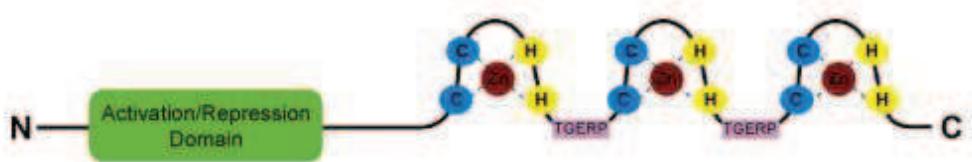


Figure 7 : Représentation schématique d'une protéine KLF. D'après Pearson *et al.*, 2008.

KLF15 et 17 ne font partie d'aucun groupe car aucun motif d'interaction avec des protéines n'a été identifié. Cette classification n'est pas exhaustive. En effet, certains KLFs peuvent agir à la fois comme un activateur et un répresseur de la transcription.

### **3.2. Expression des KLFs**

La plupart des KLFs sont des protéines largement exprimées dans l'organisme humain mais certaines protéines KLFs présentent une expression préférentielle pour certains tissus ou cellules. Ainsi, KLF1 est exprimé dans les globules rouges et les mastocytes (Perkins *et al.*, 1995), KLF2 dans les poumons, les globules rouges, les vaisseaux sanguins, les lymphocytes et le tissu adipeux blanc (Kuo *et al.*, 1997; Wani *et al.*, 1998; Katz *et al.*, 2002), KLF4 dans la peau, l'intestin, les yeux et les lymphocytes (Segre *et al.*, 1999; Katz *et al.*, 2002) et KLF5 dans les vaisseaux sanguins, l'intestin et le tissu adipeux blanc (Shindo *et al.*, 2002; Oishi *et al.*, 2005).

### **3.3. Mécanisme d'action des KLFs**

#### **3.3.1. Protéines interagissant avec les KLFs**

Les KLFs régulent la transcription de nombreux gènes en formant un complexe avec des protéines qui modifient la chromatine et des activateurs ou des répresseurs de la transcription. Les principales protéines interagissant avec les KLFs sont les histones acétyltransférases (HAT), les corépresseurs CtBP et Sin3A.

##### **3.3.1.1. Histones acétyltransférases**

Beaucoup de KLFs du groupe 2 lient des protéines qui ont une activité acétyltransférase telles les protéines CBP, p300 et P/CAF (Zhang & Bieker, 1998; Song *et al.*, 2002; Miyamoto *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2007). Ces protéines acétylent les

KLFs et modulent ainsi leur activité. Pour plus de détails se reporter au Tableau 6 de la partie 3.3.2. Modifications post-traductionnelles.

### **3.3.1.2. CtBP**

Les KLF 3, 8 et 12 lient les protéines CtBPs via la séquence consensus PXDLS située dans la partie amino-terminale des protéines KLFs (Turner & Crossley, 1998; van Vliet *et al.*, 2000; Schuierer *et al.*, 2001). Les CtBPs inhibent la transcription *via* plusieurs mécanismes. Premièrement, les CtBPs recrutent des protéines histones déacétylases (HDACs) et des protéines histones méthyltransférases dans leur complexe transcriptionnel. Ces protéines déacétylent et méthylent les histones afin de compacter la chromatine et ainsi conduire à l'inhibition de la transcription (Chinnadurai, 2007). Deuxièmement, les protéines CtBPs inhibent la transcription par un mécanisme HDAC-indépendant (Chinnadurai, 2007). En effet, CtBP1 et CtBP2 peuvent lier et inhiber des activateurs des HAT comme p300/CBP (Chinnadurai, 2007) et recruter d'autres répresseurs tels Ikaros (Koipally & Georgopoulos, 2000) et les membres du groupe polycomb (Sewalt *et al.*, 1999) qui inhibent la transcription.

### **3.3.1.3. Sin3A**

Les KLFs 9, 10, 11, 13, 14 et 16 contiennent une séquence consensus hydrophobe dans leur partie amino-terminale qui permet le recrutement du répresseur transcriptionnel Sin3A (Zhang *et al.*, 2001a). Sin3A possède de nombreux sites d'interaction qui lui permet d'assembler diverses protéines en un complexe qui modifie la conformation de la chromatine (Knoepfler & Eisenman, 1999) et inhibe la transcription. Ainsi, Sin3A lie (1) des protéines enzymatiques dont HDAC1 et HDAC2, (2) des protéines liant l'ADN dont Mad et MeCP2 et (3) des co-répresseurs dont Ikaros et SMRT (Cunliffe, 2008). Les HDACs sont des composants essentiels de ce complexe puisque lorsque le site de fixation des HDACs dans Sin3A est muté ou lorsque l'on utilise des inhibiteurs des HDACs la répression de la transcription est inhibée (Sommer *et al.*, 1997; Kadosh & Struhl, 1998).

### **3.3.2. Modifications post-traductionnelles**

Plusieurs enzymes régulent l'activité transcriptionnelle des KLFs grâce à des modifications post-traductionnelles telles l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitination ou la sumoylation (Tableau 6) (pour revue, (McConnell & Yang, 2010)).

## **3.4. Fonction des KLFs**

Les KLFs sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques. Beaucoup de KLFs jouent un rôle dans la régulation de la prolifération soit en l'activant soit en l'inhibant. Ainsi, les KLFs régulent la prolifération cellulaire dans de nombreuses lignées cellulaires en contrôlant la transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire dont les cyclines D1 (Shie *et al.*, 2000a; Zhao *et al.*, 2003; Nandan *et al.*, 2004), B1 (Yoon & Yang, 2004; Nandan *et al.*, 2005), A (Fernandez-Zapico *et al.*, 2011), E (Yoon *et al.*, 2005) ; les inhibiteurs des CDK p21<sup>Cip1/Waf1</sup> (Zhang *et al.*, 2000; Johnsen *et al.*, 2002; Benzeno *et al.*, 2004; Wu & Lingrel, 2004), p15 (Chen *et al.*, 2006), p27 (Chen *et al.*, 2006) ainsi que le facteur de transcription c-myc (Buckley *et al.*, 2001; Ellenrieder *et al.*, 2004; Buck *et al.*, 2006). Les KLFs jouent également un rôle dans la différentiation, le développement et la maintenance de l'homéostasie tissulaire. Enfin, les KLFs sont impliqués dans la régulation de l'apoptose. Les KLFs 4, 5 et 6 ont été les plus étudiés dans ce rôle. Ainsi il a été montré que KLF4 et KLF5 inhibent l'apoptose (Rowland *et al.*, 2005; Rowland & Peepoer, 2006; Zhu *et al.*, 2006; Ghaleb *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008). Le rôle de KLF6 dans l'apoptose est quant à lui controversé. En effet, KLF6 induit l'apoptose dans plusieurs lignées cellulaires (Ito *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2008) mais des variants d'épissage de KLF6 inhiberaient au contraire l'apoptose (DiFeo *et al.*, 2006; Narla *et al.*, 2008; Sangodkar *et al.*, 2009a).

Nom	Modifications post-traductionnelles	Conséquences	Références
<b>KLF1</b>	Acétylation	Activation de la transcription	(Sengupta <i>et al.</i> , 2008)
	Phosphorylation	Augmentation de l'activité transcriptionnelle	(Ouyang <i>et al.</i> , 1998)
	Ubiquitination	Dégradation	(Quadrini & Bieker, 2006)
	Sumoylation	Nécessaire pour la répression de la transcription	(Siatecka <i>et al.</i> , 2007)
<b>KLF2</b>	Ubiquitination	Dégradation	(Zhang <i>et al.</i> , 2004)
<b>KLF3</b>	Sumoylation	Augmentation de l'activité transcriptionnelle	(Perdomo <i>et al.</i> , 2005)
<b>KLF4</b>	Acétylation	Augmentation de l'activité transcriptionnelle	(Evans <i>et al.</i> , 2007)
	Ubiquitination	Dégradation	(Chen <i>et al.</i> , 2005b)
	Sumoylation	Dégradation	(Kawai-Kowase <i>et al.</i> , 2005)
<b>KLF5</b>	Acétylation	Augmentation de l'activité transcriptionnelle	(Miyamoto <i>et al.</i> , 2003)
	Phosphorylation	Modifie la liaison à ses effecteurs	(Zhang & Teng, 2003)
	Ubiquitination	Dégradation	(Chen <i>et al.</i> , 2005a)
	Sumoylation	Activation ou répression de la transcription selon le statut de sumoylation	(Oishi <i>et al.</i> , 2008)
<b>KLF6</b>	Acétylation	Augmentation de l'activité transcriptionnelle	(Li <i>et al.</i> , 2005)
	Ubiquitination	Dégradation	(Banck <i>et al.</i> , 2006)
<b>KLF8</b>	Sumoylation	Inhibition de l'activité transcriptionnelle	(Wei <i>et al.</i> , 2006)
<b>KLF10</b>	Ubiquitination	Augmentation de l'activité transcriptionnelle	(Venuprasad <i>et al.</i> , 2008)
<b>KLF11</b>	Phosphorylation	Inhibition de l'activité transcriptionnelle	(Ellenrieder <i>et al.</i> , 2004)
<b>KLF13</b>	Acétylation	Augmentation de l'activité transcriptionnelle	(Song <i>et al.</i> , 2002)
	Phosphorylation	Localisation nucléaire	(Huang <i>et al.</i> , 2007)
		Augmentation de l'activité transcriptionnelle	

**Tableau 6 : Modifications post-traductionnelles des KLFs.**

## 3.5. KLFs et cancers

### 3.4.1. KLF4/GKLF/EZF

De nombreuses études mettent en évidence un rôle de KLF4 dans l'oncogénèse. Il a été suggéré initialement que KLF4 soit un gène suppresseur de tumeur, car d'une part il réprime la transcription du gène *CCND1* qui code pour la cycline D1, un activateur du cycle cellulaire (Shie *et al.*, 2000a; Chen *et al.*, 2002b) et d'autre part KLF4 active la transcription de p21<sup>Cip1/Waf1</sup>, un inhibiteur du cycle cellulaire (Chen *et al.*, 2001). De plus, la surexpression de KLF4 dans des cellules de cancer du côlon est associée à une diminution de l'agressivité, de l'invasion, de la migration *in vitro* et de la tumorigénéité *in vivo* (Dang *et al.*, 2003). Au niveau moléculaire, plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer les fonctions suppressives de tumeur de KLF4 : inhibition de la voie Wnt (Stone *et al.*, 2002) et régulation de l'expression de KLF4 par Notch (Ghaleb *et al.*, 2008). Des études supportent le rôle suppresseur de tumeur de KLF4 dans des échantillons tumoraux. Ainsi, l'expression de l'ARNm de *KLF4* est diminuée dans les tumeurs du côlon (Dang *et al.*, 2000a; Shie *et al.*, 2000b; Zhao *et al.*, 2003), de l'œsophage (Wang *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2004), de l'estomac (Wei *et al.*, 2005; Kanai *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2007), du pancréas, des poumons (Bialkowska *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2009) et de la vessie (Ohnishi *et al.*, 2003) par rapport aux tissus sains. Plusieurs mécanismes seraient impliqués dans la diminution de l'expression de KLF4 dont la perte d'hétérozygotie, l'hyperméthylation du promoteur et des mutations inhibant l'activité de la protéine (Zhao *et al.*, 2003).

Il existe des données contradictoires dans le cancer du sein sur le fait que *KLF4* soit un gène suppresseur de tumeur ou au contraire un oncogène. Ainsi, l'ARNm et la protéine KLF4 sont plus fortement exprimés dans le tissu tumoral comparés au tissu sain adjacent (Foster *et al.*, 2000). De plus, la localisation de KLF4 au niveau nucléaire est associée à un phénotype plus agressif et une survie plus courte dans les carcinomes ductaux du sein (Pandya *et al.*,

2004) suggérant un rôle d'oncoprotéine de KLF4 dans les cancers du sein. KLF4 participerait à la progression tumorale dans le cancer du sein en se liant à la mucine 1, une protéine fréquemment surexprimée dans les cancers du sein (Li *et al.*, 2003b), afin de réprimer la transcription de p53 (Wei *et al.*, 2007). Des résultats contradictoires ont été rapportés et suggèreraient plutôt un rôle suppresseur de tumeur de KLF4 dans les cancers du sein. En effet, l'analyse de différentes bases de données montre que l'expression de l'ARNm de *KLF4* est diminuée dans les tumeurs mammaires par rapport au tissu sain dans 9 bases de données sur 11 et que l'expression de *KLF4* est inversement corrélée avec le grade de la tumeur (Akaogi *et al.*, 2009). De plus, KLF4 interagit directement avec le RE $\alpha$  et inhibe la prolifération cellulaire RE-dépendante (Akaogi *et al.*, 2009). Des études complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer si *KLF4* est un gène suppresseur de tumeur ou un oncogène dans le cancer du sein.

Un modèle décrivant les mécanismes d'action par lesquels KLF4 pourrait fonctionner à la fois comme un suppresseur de tumeur ou une oncoprotéine a été proposé (Figure 8) (Ghaleb *et al.*, 2007). Le rôle de KLF4 dépendrait du statut de p21. Dans les cellules non transformées, KLF4 agirait comme un suppresseur de tumeur en inhibant la prolifération cellulaire *via* l'activation de p21. En présence de l'oncogène RAS activé, KLF4 agirait comme une oncoprotéine : (i) RAS activé augmenterait l'expression de la cycline D1 qui inhibe p21 induisant ainsi la prolifération cellulaire ; (ii) KLF4 se fixerait sur le promoteur de TP53 et réprimerait sa transcription induisant l'inhibition de l'apoptose et contribuant ainsi à la tumorigénèse. Un mécanisme similaire a été décrit avec E1A (Foster *et al.*, 1999; McConnell & Yang, 2010).

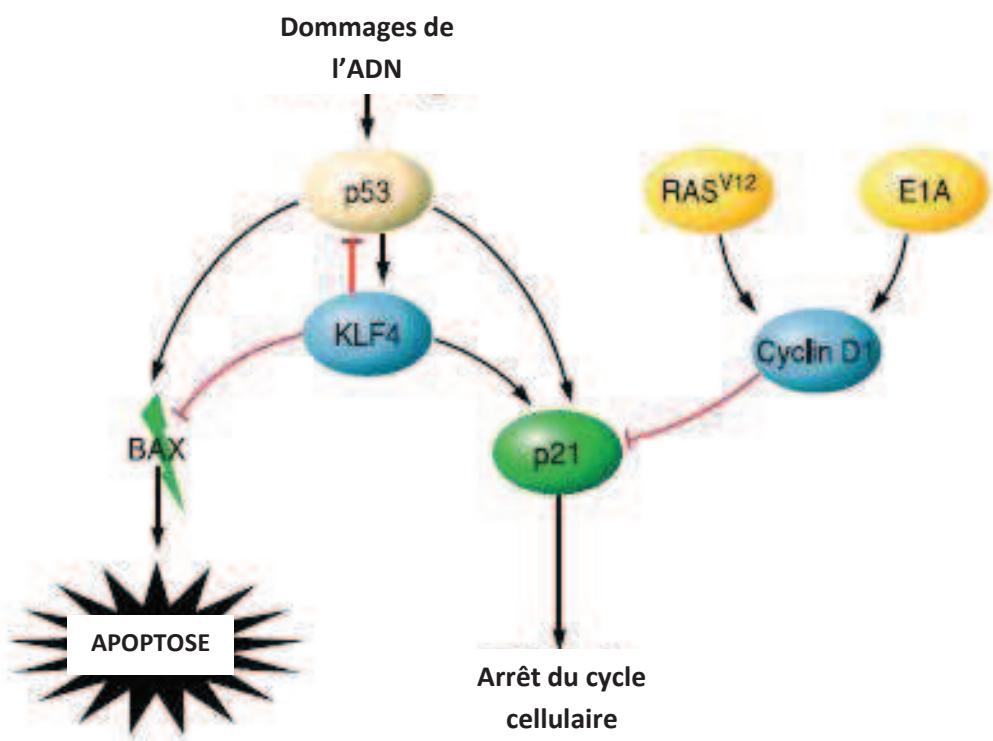


Figure 8 : Mécanismes d'action de KLF4. D'après McConnell, 2010.

### **3.4.2. KLF5/IKLF/BTEB2**

KLF5 participe au développement tumoral en induisant la prolifération cellulaire et dans certains cas la croissance indépendante de l’ancrage dans des cellules épithéliales intestinales (Bateman *et al.*, 2004; Chanchevalap *et al.*, 2004), des cellules de cancer du côlon (Du *et al.*, 2008), des fibroblastes (Sun *et al.*, 2001) et des cellules épithéliales squameuses de l’œsophage (Goldstein *et al.*, 2007).

Le rôle de KLF5 dans le cancer du sein et de la prostate n’est pas clair. Certaines études montrent que KLF5 induit la formation de tumeurs du sein, la prolifération et la survie de cellules cancéreuses mammaires (Liu *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2009). De plus dans une étude comportant 90 échantillons de tumeurs mammaires, il a été montré que des forts niveaux d’expression d’ARNm de *KLF5* sont associés à une survie sans récidive et une survie globale plus courte (Tong *et al.*, 2006). Cependant, *KLF5* est fréquemment délété et son expression diminuée dans les cancers du sein suggérant que *KLF5* pourrait fonctionner comme un gène suppresseur de tumeur (Chen *et al.*, 2002a). Le rôle de gène suppresseur de tumeur ou d’oncogène de *KLF5* dans le cancer du sein n’est pas élucidé mais pourrait s’expliquer par le statut RE (Guo *et al.*, 2010). En effet, KLF5 inhibe la prolifération cellulaire dans les cellules RE+ mais pas dans les cellules RE-. Les auteurs ont proposé un mécanisme d’action de KLF5 qui serait un co-facteur du RE $\alpha$ . Ainsi, la protéine se lierait au RE $\alpha$  et inhiberait la liaison du RE $\alpha$  sur les promoteurs de ses gènes cibles induisant une diminution de leur expression. Ces résultats suggèrent un rôle de gène suppresseur de tumeur de *KLF5* dans les cancers du sein RE+.

Le rôle de KLF5 est aussi ambigu dans le cancer de la prostate. Le locus de *KLF5* est fréquemment délété et le gène est sous-exprimé dans les tumeurs de la prostate (Chen *et al.*, 2003a). De plus, la surexpression de la protéine KLF5 dans des cellules de cancer de la prostate inhibe leur croissance (Chen *et al.*, 2003a). Une autre étude présente des résultats

contradictoires en montrant que le niveau d'expression de l'ARNm de *KLF5* est plus élevé dans des tumeurs de la prostate par rapport à l'épithélium normal (Chaib *et al.*, 2001).

*KLF5* a une action proliférative ou anti-proliférative selon le contexte. Plusieurs études essayent de comprendre le mécanisme d'action impliqué. Il a été montré dans des kératinocytes humains (cellules HaCaT) que *KLF5* a une action proliférative en absence de TGF- $\beta$  et une action anti-proliférative en présence de TGF- $\beta$  (Guo *et al.*, 2009a). En effet, *KLF5* inhibe l'expression de p15, un inhibiteur du cycle cellulaire, en absence de TGF- $\beta$ . Après un traitement au TGF- $\beta$ , *KLF5* est acétylé et active la transcription de p15 qui inhibe la prolifération cellulaire. Une étude similaire montre que *KLF5* active c-myc en absence de TGF- $\beta$  et inhibe son expression après un traitement par le TGF- $\beta$  (Guo *et al.*, 2009b). Des études ultérieures doivent être faites pour éclaircir le rôle de *KLF5* dans les cancers.

### **3.4.3. KLF6/ZF9/CPBP/GBF**

*KLF6* a initialement été impliqué dans la cancérogénèse car un allèle de *KLF6* est délété et l'autre allèle est muté dans la plupart des tumeurs primitives de la prostate (Narla *et al.*, 2001). Dans cette étude, 26 mutations ont été identifiées (25 mutations faux-sens et une mutation non-sens) dont 23 dans l'exon 2 codant pour le domaine de transactivation de *KLF6*. Une autre étude confirme la perte d'hétérozygotie et la présence de mutations de *KLF6* dans les tumeurs de la prostate mais ces évènements apparaissent moins fréquemment dans cette cohorte que dans la cohorte de Narla *et al.* (Chen *et al.*, 2003a). Dans cette étude, 15 mutations somatiques ont été identifiées : 7 mutations faux-sens dans l'exon 2, 4 mutations silencieuses et 4 mutations dans la partie 3'UTR. En revanche, d'autres études rapportent que les mutations de *KLF6* sont rares dans les cancers sporadiques et les formes non héréditaires de cancer de la prostate (Muhlbauer *et al.*, 2003; Koivisto *et al.*, 2004; Agell *et al.*, 2008).

La perte d'expression ou d'activité de KLF6, dûe au LOH, à une mutation ou la méthylation du promoteur, a été montrée dans de nombreux autres cancers dont le cancer du foie (Kremer-Tal *et al.*, 2004; Hirasawa *et al.*, 2006; Kremer-Tal *et al.*, 2007; Narla *et al.*, 2007; Bureau *et al.*, 2008), le cancer colo-rectal (Reeves *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2006a; Cho *et al.*, 2006b; Miyaki *et al.*, 2006; Mukai *et al.*, 2007), le cancer du poumon (Ito *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2007), le cancer de l'estomac (Cho *et al.*, 2005; Sangodkar *et al.*, 2009a), le cancer de la tête et du cou (Teixeira *et al.*, 2007), le cancer de l'ovaire (DiFeo *et al.*, 2006) et le cancer du cerveau (Camacho-Vanegas *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2007).

La surexpression de KLF6 dans des cellules tumorales de prostate diminue la prolifération cellulaire et induit l'apoptose suggérant que KLF6 soit un suppresseur de tumeur (Cheng *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2008). De façon intéressante, il a été montré que les mutations somatiques de KLF6 entraînent une perte de la fonction anti-proliférative de la protéine dans le cancer de la prostate (Narla *et al.*, 2001), le cancer du foie (Kremer-Tal *et al.*, 2004) et le glioblastome (Yin *et al.*, 2007). Sangodkar *et al.* ont montré que les mutations de KLF6 ont un effet dominant négatif dans le cancer gastrique (Sangodkar *et al.*, 2009b). De plus, les mutations de KLF6 augmentent la tumorigénicité et diminuent la différentiation cellulaire (Sangodkar *et al.*, 2009b).

Au niveau pronostic, Glinsky *et al.* ont montré que de faibles niveaux d'expression d'ARNm de *KLF6* sont associés à un mauvais pronostic dans le cancer de la prostate (Glinsky *et al.*, 2004). De plus, l'expression d'ARNm de *KLF6* est diminuée dans les tumeurs de la prostate métastatiques, agressives et androgène-indépendantes (Stanbrough *et al.*, 2006). Narla *et al.* ont montré qu'il existe un SNP (Single Nucleotide Polymorphism) dans le gène *KLF6* qui augmenterait le risque de cancer de la prostate (Narla *et al.*, 2005a). Ce polymorphisme, situé dans le premier intron de *KLF6*, génère un site de liaison fonctionnel pour le facteur d'épissage SRp40 qui augmente la transcription des trois formes épissées de

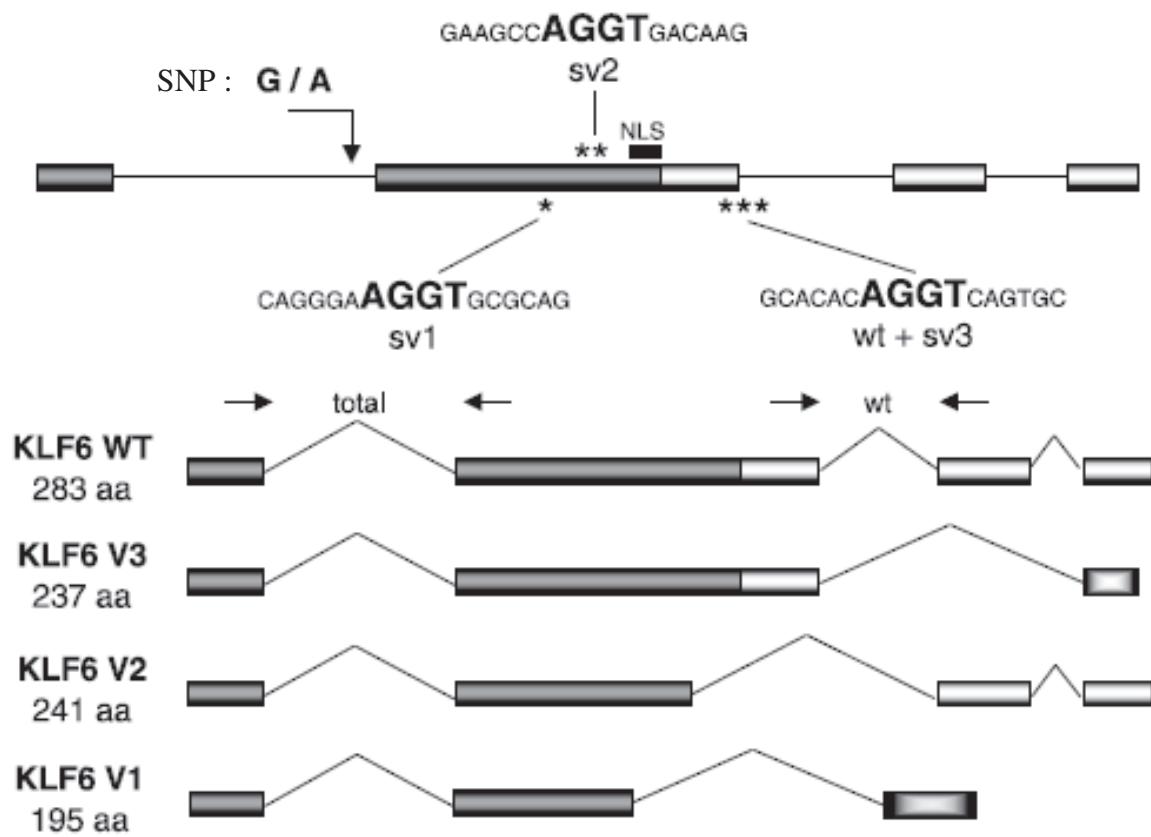
KLF6 : KLF6-SV1, KLF6-SV2 et KLF6-SV3 (Figure 9). Ces variants diffèrent de la protéine KLF6-wt par l'absence d'une partie ou de la totalité du domaine d'activation et des domaines de liaison à l'ADN. Les variants KLF6-SV1 et KLF6-SV2 se localisent dans le cytoplasme suite à la perte du NLS et antagonisent les effets de KLF6-wt. L'expression de ces variants est augmentée dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain de la prostate (Narla *et al.*, 2005a). De plus, la surexpression du variant KLF6-SV1 accélère la progression tumorale et la formation des métastases (Narla *et al.*, 2008). Inversement, l'inhibition de KLF6-SV1 inhibe la prolifération cellulaire, la formation des colonies et l'invasion (Narla *et al.*, 2005b). Ces variants ont depuis été décrits dans de nombreux cancers : cancer du foie (Yea *et al.*, 2008), cancer de l'ovaire (DiFeo *et al.*, 2006; Difeo *et al.*, 2009), cancer du poumon (DiFeo *et al.*, 2008; Sangodkar *et al.*, 2009b), cancer de l'estomac (Sangodkar *et al.*, 2009b), cancer du pancréas (Hartel *et al.*, 2008) et glioblastome (Camacho-Vanegas *et al.*, 2007) .

#### **3.4.4. KLF8/BKLF3**

L'expression de KLF8 est augmentée dans de nombreuses lignées cellulaires de cancers et l'expression ectopique de KLF8 induit la transformation suggérant un rôle d'oncogène de *KLF8* (Wang & Zhao, 2007). La surexpression de KLF8 dans des cellules épithéliales mammaires immortalisées induit l'EMT, augmente la motilité cellulaire et l'invasion des cellules de cancer du sein (Wang *et al.*, 2007).

#### **3.4.5. KLF9/BTEB**

KLF9 est impliqué dans les cancers de l'appareil reproducteur femelle comme le cancer endométrial (Simmen *et al.*, 2010). La surexpression de la protéine KLF9 dans une lignée cellulaire humaine de carcinome endométrial Hec-1-A augmente la synthèse d'ADN et stimule le cycle cellulaire en activant la transcription de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (Zhang *et al.*, 2001b; Simmen *et al.*, 2002).



\* : site d'épissage alternatif

**Figure 9 : Variants d'épissage de KLF6.** D'après Narla *et al.*, 2005.

KLF9 pourrait contrôler la prolifération endométriale *via* les voies de signalisation RE et RP qui ont des effets opposés sur la prolifération (Velarde *et al.*, 2007). En effet, KLF9 serait un activateur de RP qui inhibe la prolifération cellulaire alors qu’au contraire KLF9 inhiberait le RE $\alpha$  qui active la prolifération. Enfin, le niveau d’expression d’ARNm de *KLF9* est diminué dans les tumeurs endométriales de haut grade (grade II à IV) comparé au tissu normal endométrial et aux tumeurs de bas grade (grade I) (Simmen *et al.*, 2008). Cependant comme la corrélation est faible, ces résultats nécessitent d’être confirmés avec une cohorte plus importante.

### **3.4.6. KLF10/TIEG1**

KLF10 est un gène inductible par le TGF- $\beta$  qui est normalement exprimé dans les cellules épithéliales acinaires et ductales du pancréas exocrine (Tachibana *et al.*, 1997). La surexpression de KLF10 dans des lignées cellulaires de pancréas induit l’apoptose donc KLF10 aurait des effets suppresseurs de tumeurs. KLF10 est impliqué dans la pathogénicité d’autres cancers dont le cancer du sein et du côlon. Ainsi, l’expression de KLF10 est progressivement perdue pendant la transition de l’épithélium mammaire normal vers le carcinome invasif (Subramaniam *et al.*, 1998; Reinholtz *et al.*, 2004). De plus, KLF10 est régulé par les œstrogènes dans le cancer du sein et fait partie d’une signature qui discrimine les tumeurs RE+ et RE- (Sorbello *et al.*, 2003). Dans le cancer du côlon, l’expression de KLF10 est diminuée dans les tumeurs par rapport à la muqueuse normale et KLF10 induit l’apoptose (Chen *et al.*, 2003b).

### **3.4.6. KLF11/FKLF/TIEG2/MODY7**

KLF11 médie les effets du TGF- $\beta$  sur la croissance cellulaire et a un rôle dans la progression tumorale dans le pancréas. En effet, KLF11 potentialise l’effet du TGF- $\beta$  en liant le corépresseur Sin3A et en inhibant la transcription de smad7, un inhibiteur de la voie du

TGF- $\beta$  (Ellenrieder *et al.*, 2004). Ces évènements sont inhibés dans les cellules cancéreuses du pancréas portant une mutation KRAS dans lesquelles ERK/MAPK phosphoryle KLF11 conduisant à la dissociation du complexe KLF11/Sin3A. De la même façon, en réponse à la stimulation par le TGF- $\beta$ , KLF11 et smad3 lient le TIE (TGF- $\beta$ -inhibitory element) et inhibe la transcription de c-myc menant à l'inhibition de la prolifération cellulaire (Buck *et al.*, 2006). Dans les cellules cancéreuses du pancréas portant une mutation KRAS, ERK dissocie le complexe KLF11/Sin3A qui ne peut plus réprimer c-myc et induit donc la prolifération cellulaire. Ainsi, la voie de signalisation ERK antagonise les effets anti-prolifératifs du TGF- $\beta$  en bloquant la capacité de KLF11 à inhiber c-myc.

### **3.4.7. KLF12/AP-2rep**

KLF12 est localisé dans la région chromosomique 13q21-q22 qui est le site de délétions somatiques dans différentes tumeurs (Rozenblum *et al.*, 2002). Au contraire, cette région est souvent amplifiée dans les cancers des glandes salivaires (Giefing *et al.*, 2008) et les cancers gastriques (Nakamura *et al.*, 2009). L'inhibition de l'expression de KLF12 induit l'arrêt de la croissance cellulaire dans des cellules de cancer gastrique (Nakamura *et al.*, 2009). La surexpression de KLF12 dans les cellules NIH3T3 et AZ-521 augmente leur potentiel invasif (Nakamura *et al.*, 2009). Enfin, les niveaux d'expression d'ARNm de *KLF12* sont augmentés dans 40% des tumeurs gastriques par rapport à l'épithélium sain et corrèle avec la taille de la tumeur (Nakamura *et al.*, 2009).

## **4. ZNF217/ZABC1**

### **4.1. ZNF217, un oncogène putatif**

#### **4.1.1. Amplification de ZNF217 et cancers**

En 1998, Collins *et al.*, ont cloné une zone de l'amplification 20q13 de 1 Mb et défini une région d'environ 260 kb où l'amplification était maximale dans une série de tumeurs du sein (Collins *et al.*, 1998). Ainsi, ils ont décrit un nouveau gène *ZNF217* situé au sein de cette zone d'amplification maximale. *ZNF217* a ensuite été retrouvé amplifié dans de nombreux autres cancers tels que les cancers du sein, de l'ovaire, du col de l'utérus, de l'estomac du pancréas, du côlon, de l'œsophage, de la tête et du cou, le cancer urothelial, le glioblastome, le mélanome et le lymphome primaire cutané (Tableau 7).

L'amplification de *ZNF217* a été associée à différents paramètres cliniques : à un grade élevé dans le cancer du sein (Shimada *et al.*, 2005); au type histologique intestinal et mixte dans le cancer gastrique (Buffart *et al.*, 2009) et au type histologique médullaire dans le cancer du sein (Plevova *et al.*, 2010); à l'absence de récepteurs RE et RP dans le cancer du sein et à l'envahissement ganglionnaire quand l'amplification de *ZNF217* est associée à une autre amplification dans le cancer du sein, soit *MYBL2* soit *AURKA* (Letessier *et al.*, 2006). Il a également été démontré que la fréquence des amplifications 20q13 comprenant le locus *ZNF217* est plus importante dans les tumeurs primaires et les métastases des cancers colo-rectaux donnant des métastases du foie que dans les cancers colo-rectaux non métastatiques (Hidaka *et al.*, 2000). De plus, aucun des cancers colo-rectaux non métastatiques du foie ne présente d'amplification de *ZNF217*. Ces résultats suggèrent que l'amplification de *ZNF217* pourrait être associée à une augmentation du potentiel métastatique dans les cancers colo-rectaux. Enfin, l'amplification de *ZNF217* n'est pas associée aux mutations *BRCA1* ou *BRCA2* (Plevova *et al.*, 2010).

Type de cancer	Nombre et nature des échantillons	Méthode d'analyse du nombre de copies de ZNF217	% d'échantillons où ZNF217 est amplifié	Références
Cancer du sein	18 lignées cellulaires 10 tumeurs	DOP-PCR CGH-array	39%	(Daigo <i>et al.</i> , 2001)
Cancer du sein	26 tumeurs	FISH	23%	(Shimada <i>et al.</i> , 2005)
Cancer du sein	233 tumeurs invasives	FISH	10%	(Letessier <i>et al.</i> , 2006)
Cancer du sein	466 tumeurs	FISH	7%	(Ginestier <i>et al.</i> , 2006)
Cancer du sein	148 tumeurs	CGH-array	7%	(Chin <i>et al.</i> , 2007)
Cancer du sein	60 tumeurs	FISH	8%	(Plevova <i>et al.</i> , 2010)
Cancer de l'ovaire	8 lignées cellulaires 31 tumeurs	CGH/FISH FISH	38% 26%	(Tanner <i>et al.</i> , 2000)
Cancer de l'ovaire	60 tumeurs	QuMA	15%	(Ginzinger <i>et al.</i> , 2000)
Cancer de l'ovaire	18 lignées cellulaires 19 tumeurs primaires	FISH RTQ-PCR	33% 63%	(Watanabe <i>et al.</i> , 2002)
Cancer de l'ovaire	76 tumeurs	FISH	21%	(Fejzo <i>et al.</i> , 2008)
Carcinosarcomes de l'ovaire et utérus	30 tumeurs	CGH/FISH	70% / 87%	(Schipf <i>et al.</i> , 2008)
Carcinome ovarien à cellules claires	12 tumeurs 21 tumeurs 10 lignées cellulaires	SNP-array RTQ-PCR SNP-array	42% 33% 10%	(Kuo <i>et al.</i> , 2010)
Cancer cervical	22 dysplasies de grade I 10 dysplasies de grade II 14 dysplasies de grade III 7 carcinomes	FISH	80% 50% 85% 100%	(Costa <i>et al.</i> , 2009)
Cancer de l'estomac	27 adénomes	CGH-array	11%	(Weiss <i>et al.</i> , 2003)
Cancer de l'estomac	30 tumeurs	QuMA	17%	(Suzuki <i>et al.</i> , 2004)
Cancer de l'estomac	30 tumeurs	CGH-array	10%	(Yang <i>et al.</i> , 2005)

Tableau 7 : Amplification de ZNF217.

Type de cancer	Nombre et nature des échantillons	Méthode d'analyse du nombre de copies de ZNF217	% d'échantillons où ZNF217 est amplifié	Références
Cancer du pancréas	13 lignées cellulaires	CGH-array	31%	(Holzmann <i>et al.</i> , 2004)
Cancer colo-rectal	17 tumeurs colorectales sans métastase 18 tumeurs primaires colorectales avec métastases du foie 18 métastases du foie	FISH	41% 89% 94%	(Hidaka <i>et al.</i> , 2000)
Cancer du côlon	100 carcinomes	RTQ-PCR	61%	(Rooney <i>et al.</i> , 2004)
Cancer colo-rectal	22 tumeurs	CGH/FISH	32%	(Lassmann <i>et al.</i> , 2007b)
Cancer du côlon	13 tumeurs	FISH	54%	(Gaiser <i>et al.</i> , 2010)
Glioblastome multiforme	TGCA data set		32%	(Mao <i>et al.</i> , 2011)
Cancer de l'oesophage	23 adénocarcinomes	SNP-array	52%	(Nancarrow <i>et al.</i> , 2008)
Barrett's (adénocarcinome de l'œsophage distal)	18 adénocarcinomes	CGH-array	39%	(Albrecht <i>et al.</i> , 2004)
Barrett's	28 dysplasies de bas grade 25 dysplasies de haut grade 16 adénocarcinomes	FISH	4% 4% 13%	(Brankley <i>et al.</i> , 2011)
Carcinome à cellules squameuses de la tête et du cou	609 carcinomes	FISH	6.2%	(Freier <i>et al.</i> , 2003)
Lymphome primaire cutané	7 lymphomes primaires cutanés	CGH-array	43%	(Mao <i>et al.</i> , 2003)
Mélanome	91 tumeurs primaires 45 mélanomes métastatiques	FISH	29% 53%	(Koynova <i>et al.</i> , 2007)
Cancer urothélial	38 tumeurs invasives	FISH	36%	(Toncheva & Zaharieva, 2005)

Tableau 7 suite : Amplification de ZNF217.

La valeur pronostique des amplifications de *ZNF217* n'est pas claire. En effet, l'amplification de *ZNF217* est associée à un mauvais pronostic dans le cancer de l'ovaire (Ginzinger *et al.*, 2000; Peiro *et al.*, 2002), le cancer du côlon (Rooney *et al.*, 2004) et le cancer du sein (Chin *et al.*, 2007). En ce qui concerne le cancer du sein, des données contradictoires émergent. Ginestier *et al.* ont ainsi défini deux types d'amplifications 20q13 dans le cancer du sein : la première où seul le locus de *ZNF217* est amplifié (type 1) et la deuxième impliquant une région chromosomique plus large où deux ou trois loci sont amplifiés dont *ZNF217* et un ou deux autres loci, *MYBL2* et/ou *AURKA* (type 2) (Ginestier *et al.*, 2006). La valeur pronostique de *ZNF217* diffère selon le type d'amplification. Dans le type 1, l'amplification de *ZNF217* est associée à l'absence d'invasion ganglionnaire et de façon surprenante à un mauvais pronostic tandis que les amplifications du groupe 2 sont associées à l'envahissement ganglionnaire et à un bon pronostic (Ginestier *et al.*, 2006). Cependant d'autres études n'observent pas d'impact de l'amplification de *ZNF217* sur le pronostic d'autres cancers dont les cancers gastriques (Suzuki *et al.*, 2004) ou les carcinomes à cellules squameuses de la tête et du cou (Freier *et al.*, 2003).

#### **4.1.2. Expression de *ZNF217* et cancers**

Peu d'études se sont intéressées au niveau d'expression de *ZNF217* dans les cancers. Les niveaux d'expression d'ARNm ou de protéine de *ZNF217* semblent plus élevés dans les tumeurs de la prostate (Bar-Shira *et al.*, 2002), les tumeurs cervicales squameuses (Zhu *et al.*, 2009) et le glioblastome (Mao *et al.*, 2011) par rapport au tissu sain correspondant. L'expression protéique de *ZNF217* a également été retrouvée plus élevée dans 10 lignées cellulaires de cancer du sein portant l'amplification 20q13 par rapport aux lignées ne portant pas l'amplification (Collins *et al.*, 1998). Ainsi, la surexpression de *ZNF217* a initialement été imputée à l'amplification du gène (Collins *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2002; Kuo *et al.*, 2010) mais d'autres mécanismes sont également mis en jeu. En effet, la

surexpression de *ZNF217* a été retrouvée dans des lignées cellulaires ne portant pas l'amplification 20q13 (Collins *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 2001). De plus, l'amplification de *ZNF217* et son expression ne sont pas corrélées dans 24 lignées cellulaires de cancer du sein (Mackay *et al.*, 2009), ni dans des tumeurs ovariennes (Fejzo *et al.*, 2008). Ginestier *et al.*, n'observe pas non plus de corrélation entre l'expression de *ZNF217* et l'amplification 20q13 où seul le locus de *ZNF217* est amplifié (amplification de type 1). De plus, l'expression de l'ARNm de *ZNF217* ne permet pas de distinguer les tumeurs avec ou sans amplification au locus de *ZNF217* (Ginestier *et al.*, 2006). Enfin, dans le glioblastome l'amplification de *ZNF217* est retrouvée principalement dans les tumeurs où *ZNF217* est surexprimé mais pas seulement car 53% des tumeurs qui surexpriment *ZNF217* ne présentent pas d'amplification du gène (Mao *et al.*, 2011). Il a donc été suggéré que d'autres mécanismes comme des mécanismes épigénétiques, en particulier la méthylation de l'ADN, puissent réguler l'expression de *ZNF217* (Etcheverry *et al.*, 2010).

Une étude récente a montré qu'un fort niveau d'expression d'ARNm de *ZNF217* est associé à un grade tumoral élevé dans le glioblastome et ce résultat a été confirmé au niveau protéique (Mao *et al.*, 2011). Dans une étude rétrospective, les auteurs ont analysé les résultats d'une base de données et montré que de forts niveaux d'expression d'ARNm de *ZNF217* sont associés à un mauvais pronostic dans le glioblastome. Une autre étude a montré la présence d'un SNP dans la partie 3'UTR de *ZNF217*, celui-ci est associé à une diminution du risque de développer un cancer du sein (Shi *et al.*, 2011).

#### **4.1.3. *ZNF217*, un oncogène putatif**

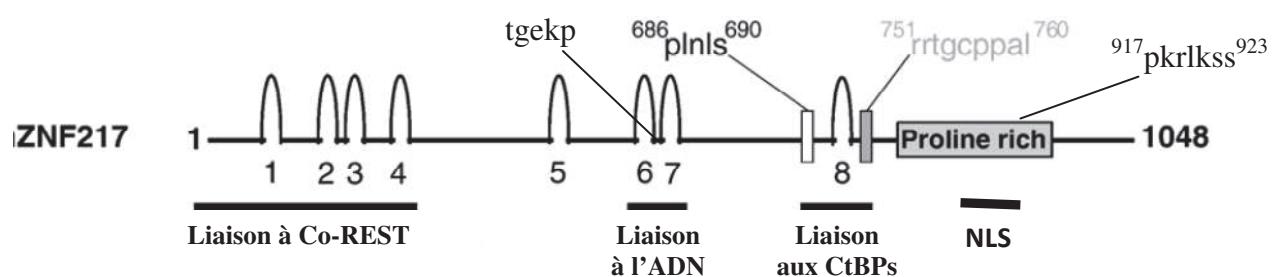
La première étude démontrant la contribution de *ZNF217* dans le développement cancéreux, et donc un rôle putatif d'oncogène, met en évidence que la transduction de *ZNF217* dans des cellules épithéliales mammaires humaines (cellules HMEC) aboutit à

l'immortalisation de ces cellules (Nonet *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent que l'amplification sélective de *ZNF217* peut permettre aux cellules cancéreuses d'échapper à la sénescence et de devenir immortelles, évènement qui semble être crucial dans le développement de nombreux cancers (Li *et al.*, 2007). De plus, les cellules immortalisées par *ZNF217* ont une activité télomérase élevée, des télomères de longueur stable et sont résistantes à l'action anti-proliférative du TGF- $\beta$  (Nonet *et al.*, 2001). Ces résultats ont été confirmés par une autre étude, démontrant que la transduction de *ZNF217*, associée à un traitement à l'EGF, induit l'immortalisation des cellules épithéliales de surface ovariennes (Li *et al.*, 2007). Bien que le traitement à l'EGF soit nécessaire pour l'établissement des lignées immortelles, celles-ci peuvent ensuite croître en absence de traitement. De plus, ces cellules acquièrent des propriétés de cellules malignes telles la perte de la dépendance vis-à-vis de l'ancrage, l'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance et une activité télomérase augmentée.

## 4.2. *ZNF217*, un nouveau facteur de transcription

### 4.2.1. Structure de *ZNF217*

*ZNF217* est un gène de 15 700 pb situé sur le bras long du chromosome 20, plus précisément dans la région chromosomique 20q13 (Collins *et al.*, 1998). *ZNF217* fait partie des protéines à doigts de zinc de la famille Krüppel-like. En effet, *ZNF217* possède 8 doigts de zinc C2H2 répartis tout au long de la séquence de la protéine (Figure 10). L'analyse de la séquence protéique de *ZNF217* montre une homologie comprise entre 38% et 47% avec les protéines KLFs (Figure 11). Au niveau des domaines fonctionnels, on observe une forte homologie entre la séquence protéique de *ZNF217* et des KLFs. En effet, les cinquième, sixième et septième doigts de zinc de *ZNF217* présentent respectivement 75%, 74% et 70% d'homologie avec les trois doigts de zinc des 17 membres KLFs connus.



- Doigt de zinc
- Site de liaison avec CtBP : motif classique PXDLS
- Site de liaison avec CtBP : motif RRT récemment identifié
- Domaine d'activation de la transcription riche en proline
- NLS** Signal de localisation nucléaire.

**Figure 10 : Structure de la protéine ZNF217. D'après Quinlan *et al.*, 2007.**

KLF9	-MSAAAYMDFVAAQCLVSIS-	19	KLF9	-GD	52
KLF13	-MAAAAYVDHFAAECILVSMS-	19	KLF13	-RR	53
KLF14	-MSAAVACLDYFAAECILVSMS-	20	KLF14	-PS	73
KLF16	-MSAAVACDVYFAADVLMAIS-	20	KLF16	-PG	69
KLF10	-MEERMEMISERPESMSWNKTAEKSDFEAVEALMSMS-CSWK-	42	KLF10	TVHFKSLSD	TAKPHIAAPFKE-EEKSPVSAPKLP-KAQATS VIRH
KLF11	MHTPDFAGPDDARAVDIMICESILERKHDSESTERCSILEQTDMEAVEALVCMSWQR	60	KLF11	SKACTATDV	LQSSAVVARALSGGAERGLLGLPEPVSSPCRAKGTSVIRH
KLF2	-MALESEPILPSFSTFAS-PCREGLQER	26	KLF2	-PG	APPYYS-APAGGLVSELLRPELD-
KLF4	-MRQPPGESDMAVSDALLPSFSTFASGPGAREKTLRQA	37	KLF4	NDPGVAPGGTGGGLLYGRESAPPPTAPFNLAINDVSPSGGFVAELLRPELDPPVYIPPQQ	
KLF1	-MATAETALPSISTLTALGPFPDTQDFL	28	KLF1	-PGG	APQTCALAPSEAGAQYPBPETLG
KLF8	-MVDMDKLINNLEVQ-LNSEGSMQVFQVFTASVRNR-	35	KLF8	-PQSSPQTIVVSTSTS-	127
KLF12	-MNIHMKRKTIKNINTFENRMLMLDGMPAVRKVT-	33	KLF12	-SASSPSSTSTSSSSSRЛАSSPTVI	130
KLF3	-MLMFDPPVKQEAM-	14	KLF3	-HRRASPGLSMPESSSSPP-	103
KLF5	MATRVLSMSARLGPPVQPPAPQDEPVFAQLKVLGAANPARDAA	44	KLF5	PYS	INMNVFLPDITHLRTGLYKSQRPCVTHIKTEPVAIFSHQSE
KLF6	-MDVLPMCSIFQELQIVHETG-	20	KLF6	R-	EKKEESELKISSPP-
KLF7	-MDVLASYSIFQELQLVHDTG-	20	KLF7	I-	CEKS-SAVDILLS-
KLF15	-MVDHLLPVDENFSSPKCPVGYLGDRLGVRAYHMLPS-	37	KLF15	WG-	PWRRAAAPVKGEHFCLPEFPLGD
KLF17	-MYGRPQAEMEQEAGELSRWQAHQAAQDN-	29	KLF17	-	ERGMSYCPQATLTPSRMIYC
ZNF217	-MQSKVTGNMPTQSLLMYMDGPEVIGSSLGSPMEMEDALSMKGTAVVPF	49	ZNF217	TFR	VAFDVEIHMRTHKDSFTYGCNCGRRKEPWFKNHMRTNG
KLF9	-NRAAVPE	26	KLF9	TWKD-YCTLVTIAKSLLDLNKYRP	75
KLF13	-SRAVHV	26	KLF13	DGKD-SASLFVVARILADLNQOAP	
KLF14	-AGAVVHR	27	KLF14	PGAGGAAPHLLAASVWADLRGSSGEGS	
KLF16	-SGAVVHR	27	KLF16	PGAA-AAPHLLAASILADLRGGPG	
KLF10	S-DFKYVEN	51	KLF10	TADAQCNHQCPCMKAASILINYQNNSFRRRTHLNVEAARKNIPCAAVSPNRSKCEERNVA	
KLF11	S-QKGDLRLI	69	KLF11	TGEESPAACPFITQPTDCRSLSDREGEQQLGHFETLQD-THLTDSLSTNLVSCQPCFLHK	
KLF2	WPRAEP-ESGGT-DD	39	KLF2	-APLGPALHGFLLLAP-PGR	
KLF4	GAPNNRWREELSHMKRLLPPVLPGRPYDIAAATVATDLESQGAGAACGGSNLAPLPRRETE	97	KLF4	PQPPGGGLMGKFPVLAISLAPSSEYVGSP	
KLF1	K-WWRSEE-AQDMGPG-PD	45	KLF1	AYAGGPGLVAGLLPGSEDHSGWVR	
KLF8	-DPPEIYRSNMTSPTLDDANPM	57	KLF8	-DMSTSANSIPVLTTPGSVLTTSQ	
KLF12	-ELLESEQGS-PNVHNYPDM	51	KLF12	TSVSSASSSSTVLTPGPLVASAS	
KLF3	-DPVSVSYPS-NYMESMKP	31	KLF3	-IKKYSPPSPVGQPGVPLSMSPP	
KLF5	LF-PGEELKHAHHRPQAQPAPQAPQP	70	KLF5	TTAPPAPPTQALPEFTSIFSSHQ	
KLF6	-YFSALPS	27	KLF6	DTLISPFCYNELETNSLNSDVS	
KLF7	-YFSALPS	27	KLF7	DKLLS-ETCLSLQPASSLDSYT	
KLF15	-PVSEDDS	44	KLF15	PDDVPRPFQPTLEEIEFLEENMEPGVKEVP	
KLF17	-ENSAPIL	36	KLF17	QRMSPPQQEMTIFSGPQLMPVGEP	
ZNF217	ATQ-EKNVIQIEGYMP	75	ZNF217	KSGARSKLLQQLESSPATINEVVQVHAAES	
KLF9	HGVAPDAE-RRLRPERE-VTKEHGDP-	50	KLF9	IQTSPVCSD-	84
KLF13	PREGPESR-PEGAAVAAT-PTLPRVEE-	51	KLF13	APAPAERREGAARKART	94
KLF14	RPPDPEGAGGAAGSEVGAAHPESALPVGPGPSGPASVQLQLPQVPA-	71	KLF14	-WENSGEAPRASSGFSDP--	118
KLF16	GRPGPEGAGPAAGLDVRAARREAASPG-TPGPP-PPPPAASG-	67	KLF16	AAPGGAS-	99
KLF10	RPVTPVS-DLSEENILLPGTP-DFHTIPAFCLTPYSPSPDFEPSQSVSNLMAPAPS	104	KLF10	D-VDEKASAALYDFSPVSSSETVICRSQPAVSPQQKSVLVSPPAVSVAGVPP-MP	260
KLF11	RPLTFVSDSGVTTTVHMDAATPELKDFHSLSTLCITPPQSPDLVPESTRTPVSPVQVTD	129	KLF11	SGLLLITDKQQAGWPGAVQTCSPKNYENDLPRKTTPLISVSPVAPPVLCQMP-VT	293
KLF2	DLNLSVLD-FILSMLLDG-----LGAEEAAPPFFFFF-AYYPE-	77	KLF2	-LVKAEPPEADGGGGYGCAPGLTRGFRGLKRE-GAPGPAASCMRGPGGRP	167
KLF4	EFNDLDDLFILSNSLTHPPESVAATVSSASASSSSSPSSGSPASAPSTCSFTYPIRAG	157	KLF4	-SVISVSKSPDGSHPVVVA-YNGGPPRTC PK-IKQEAVSSCTHLAG-G-P	292
KLF1	PTEPPLH-VKSEDQPG-EEDERGADATWDLNDLLNTNFGPE	86	KLF1	-PALRARAPDAFVGPALAPAPAPEKALALQPVYGPAGSS-GGYF	182
KLF8	EN-PALFNDIKEPEEL-LASDFSLPQEVPLDSFHPKAPLQPSMLQAPIRPPK	112	KLF8	-STGSQQ-ILHVIHTIPS---LPNKMGGLKTIP-VVVQSLPMVYTTL	192
KLF12	EAVPLNNNVKGEPEDS-LSVDFHOTQTEPVLDLSINKART-SPTAVSSSPVMSMA	105	KLF12	-GVGGQQ-FLIHVPVPSSPMNLSQNSLN SHVHRIP-VVVQSPVYVYAV	200
KLF3	NKYGVYISTPLPEKFQT-PEGLSHGIQMEPVDLTVNKRSSPPSAGNSPSSLKFPSS	87	KLF3	-VMAAAL-SRHGIRSPGILP-VIQPVVQPVPMY-TSHLQQPLMVSL	170
KLF5	AQPPATGPRLPPEDLVQTRCEMEKYLTQPLPPVIIPEHKYRDRSASVVDQFTTDEGL	130	KLF5	-TAAPEVNNIFIKQELPTPDHLHSVPTQQGHLYQLLNTPDLDMPSSTNQT	246
KLF6	LEEYWQQTCLERYLQSEP-CYVSAS-EIKFDQSQEDLWTKIILA	70	KLF6	-ESSDSSEELSFTAFTSDP-IGEVLVSSSGKLSSSV	145
KLF7	LEETWQQTCLERYLQTEPRRISETFGEDLDCFLHASPPPCTIESFRRLDPLLLPVVEA	87	KLF7	-AVNQAQLNAVTSLTPSSPE-LSRHLVKTSQLSAVD	159
KLF15	DASSPCCSSPDSQALCSCYGGGLGTESQDSILDLLSQATLGSGGGSSIGASSGPVA	104	KLF15	-EGNSKDLDACSLQSAGPHKSHLHPGSSGRERCSPPGGASAGGAQPGGG	210
KLF17	NMSSSSGGSGVHTSWNQGLPSIQHFPHSAEMLGSPLVSEAPGQNVNVEGQPQFSMPL	94	KLF17	-NIPRVARPFGGNLRMPPNGLPVSASTGIPIMSHTGNNPPVYVG	181
ZNF217	HSEIDLNKHVLQMHRPLTCEPAVLVEAEYLSPLDKSQVRTEPPKEKNCKENEFSCEVCQG	135	ZNF217	-ISSPYKICMVCGLFLFPNKESLIEHRKVHTKTAFTGTTSAQTDSPQGGMP	259

\* résidus entièrement conservés, : résidus avec des propriétés similaires fortes, score > 0.5 dans la matrice PAM 250 de Gonnet, . résidus avec des propriétés similaires faibles, score < 0.5 dans la matrice PAM 250 de Gonnet  
Acides aminés (aa) : aa : neutres, aa : acides, aa : basique, aa : hydroxyl, sulphydryl et amine. Doigts de zinc de ZNF217.

Figure 11 (a) : Homologie entre ZNF217 et les facteurs KLFs.

KLF9	--SLESPD-EDMGSDSDVTTESGSSPSHS--PEERQDPGAPSPLS-----	125	KLF9	--WPDCLKFKFSRSDEL	190
KLF13	PCRLPPPAPEPPTSPGAEGAAAAPPSPAWSEPEPEAGLEPEREPGPAG-----	141	KLF13	--WQDCNKKFARSDEL	214
KLF14	PCSVQTCPCESELAPASGAAAVCAPESSSDAPAVSPAPAAGAPAAASGGFSG-----	168	KLF14	--WLDCDKKFTRSDDEL	242
KLF16	--PASSSSAASSPSSSGRAAPGA-----	118	KLF16	--WQGCDKKFARSDEL	174
KLF10	VICOMVPLPANNPVTTTVPSTPPSQPPAVCPVVFMGTQVPKGAVMFVVPQPVVQSSKP-----	320	KLF10	--WKGCERRFARSDEL	405
KLF11	GQSSMLPAFLKPPQLSVEVTVRPILAQAAAPAPQPVFVGPAVPOQAVMLVLPQGALPPAP-----	353	KLF11	--WDGCDKKFARSDEL	441
KLF2	PPPPDTPLSPDGPARLPAAPGPRASFPPPFGGPGFGAPGPGLHYAPPAPPAFGLFDDAAA-----	227	KLF2	--WDGCGWKFARSDEL	319
KLF4	PLSNHGRPAAHDFPLGRQLPSRTTPTLGLEEVLSRDRCHPALPLPFGFHPPGPNYPSFL-----	352	KLF4	--WDGCGWKFARSDEL	443
KLF1	PRTGLSPVAASGAPYGLLSC-----	236	KLF1	--WEGCCWRFARSDEL	326
KLF8	-YPMAPYPAQYQGHFOLFRGLQGPAPGP-ATSPSFL-----	236	KLF8	--WDGCSWKFARSDEL	321
KLF12	PADGGP-AAITVPLIGGDGNAG--SVKVDPTSMSPLEIPSDSEE-----	240	KLF12	--WEGCTWKFARSDEL	364
KLF3	RSPGNVNNTIVVPLLE-DGRGHH--KAQMDPRGLSPRQSCKSDSDDDLNPVNLDVNGETG-----	257	KLF3	--WEGCTWKFARSDEL	307
KLF5	EEMENNSSSMQVPVIESTYKPIQSQQKIKIEP-GIEPQRTDYYPEE-----	219	KLF5	--WEGCDWRFARSDEL	420
KLF6	AAMDTLNVSMSAAMAGLNTHTSAVPTAVKQFQGMPPCTYTMPSQFLPQQATYFPPSPS-----	306	KLF6	--WEGCEWRFARSDEL	247
KLF7	STP----PSSPELSPSQLWGVPGELPSPGKVRSGTSKGKPD-----	KG 187	KLF7	--WEGCEWRFARSDEL	266
KLF15	GTVTLKLVAKKAALSSVKVGGVATAAAVTAAGAVKSGQSDSDQG-----	GL 206	KLF15	--WPCCGWRFARSDEL	368
KLF17	PTPDGPIPVLLQIOPWPVKQESGTGPASPGQAPENVKVAQLLVNIQGOTFALVPQVVPVSS-----	270	KLF17	--WESCSWSFFRSDEL	330
ZNF217	LSTVFSDETLLGPTVPTSTEQAVALPSMAQMLPPQDAHDLGMPPAESQSLVLSQDSLVS-----	241	ZNF217	--PLDENGAVDRGEGGSEDGLPEGIHLDKNDDGGIKHLTSS	RECSYCGKFFRSNYYL 486
	SSREDFLQLFNRLRPKSHPETGKKPVRCIPQLDPTFTQAWQLATKGKVAICQEVKESGQE-----	319		*	*
KLF9	--LLHPGVAAKGKHAS-----	139	KLF9	--TRHYRHTHGEKQFRCPLCEKRFMRSDHDLTKHARRHTEFHPMSMIK-----	SK 237
KLF13	-SGEPGLQRVRRGRSR-----	ADL 160	KLF13	ARHYRHTHGEKFKSCPICEKRFMRSDHDLTKHARRHANFHPCMLQRRGGGRTGS-----	LSD 271
KLF14	GALGAGPAPAADQAPRR-----	RSV 188	KLF14	ARHYRHTHGEKRFSCPCLCPKQFQFSRSDHDLTKHARRHPTYHPDMEYFRRRTPRIDPPLTS-----	302
KLF16	--AP-----	120	KLF16	ARHHRHTHGEKFKSCPCLCSKRFTSDRDLAKHARRHPGFHPDLRPGARSTSPPSDSLPC-----	234
KLF10	--PVVS-PNGTRLSPPIAPAPGFSPSAAKVTP-----	QID 351	KLF10	SHRRHTHGEKFKACPMDRFLPMSRSDHDLTKHARRHLSAKKLPLNWQMEVS-----	KLND 458
KLF11	CAANVMAAGNTKLLPLAPAPVFITSQNCVP-----	QVD 387	KLF11	SHRRHTHGEKFKFVCPVCDRFRMPSRDLTHKARRHMTKPIPGWQAEVG-----	KLNR 494
KLF2	AAAALGLAPPAARGLLTPPASPLEELAKEAKPK-----	RGRSWP 265	KLF2	TRHYRHTHGEKPFQCHLCDRAFSRSDHDLALHMKRHM-----	355
KLF4	PDQMQPQVPLHYQELMPPGS-CMEEPFPK-----	RGRSWP 389	KLF4	TRHYRHTHGEKPFQCKCDRAFSRSDHDLALHMKRHF-----	479
KLF1	SCLGPQTVGTGLGTTAEDPGV--IAETAPS-----	RGRSWA 272	KLF1	TRHYRHTHGEKQRFRCQLCPRAFSRSDHDLALHMKRHL-----	362
KLF8	SSALQS--LQGLQQR-PAAMAQMGE-----	ESLDI 268	KLF8	TRHYRHTHGTICKPRTCDCNRFSRSRDLHSLRRHDTM-----	359
KLF12	STAISI--ARAVQEHVHPSPVSRVRGNRMNNQKFPCSISPFISIESTRRQRRSES-----	311	KLF12	TRHYRHTHGVKPKCADCDRSFSRSRDLHALHRRRHM-----	402
KLF3	MNSVSP--PQALLQENHPSVIVQPGKR-----	PLVESPD 253	KLF3	TRHYRHTHGTICKPQCFCDRSFSRSRDLHALHRRHMLV-----	345
KLF5	SEPGSPDRQAEMLQNLTPPPSYATIASKLAIHNPNLPTTLPVNSQNIQPVRYNRRSNPD-----	366	KLF5	TRHYRHTHGTICKPQFCGVCNRSFSRSRDLHALHMKRHQ-----	457
KLF6	NGDASP-----	193	KLF6	TRHYRHTHGTICKPKCSHCDRCFSRSRDLHALHMKRHL-----	283
KLF7	GAEACP-----	212	KLF7	TRHYRHTHGTICKPKCNHCDRCFSRSRDLHALHMKRHI-----	302
KLF15	NLNLPSSKFVRIAPVPIAAKPGVGSPLGPBPAG-----	LLMGQKFPKNA 314	KLF15	SRHRRSHSGVKPYQCPVCEKKFARSIDLHKHIVHFRPRSSRSVRV-----	416
KLF17	QPDSQEGPFLPEQPGPAPQTVEKNSRQPEGTG-----	RRG 276	KLF17	RRHMRVHTRYRFYKCDQCSREFMRSDHLKQHQKTHRPGPSDPQANNNNNG-----	E 380
ZNF217	GSTDNDDSSSEKELGETNKGSACAGLSQEKEKCKHSHG-----	EAPSVADPK 366	ZNF217	NTIHRHTHGEKPFYKCEFCEYAAAQKTSLRYHLEHKEQTDVAEEVKNDGKNQDTEDAL 546	
	* * : . : * * * . * * * .			* * : . : * * . * * * .	
KLF9	--EKRHKCPYSGGCKVYGGKSSHLLKAHYRVHT-----	176	KLF9	--KALANAL-----	244
KLF13	ESPQRKHCHYAGCEKVYGKSSHLLKAHLRHT-----	200	KLF13	YSRSDASSPTISPASSP-----	288
KLF14	TPAAKRHQCPFPGCTKAYYKSSHLLKSHQRHT-----	228	KLF14	EVESSASGSGPFPAPSFTTCL-----	323
KLF16	SAAAKSHRCPPDCAKAYYKSSHLLKSHLRHT-----	160	KLF16	LAGSPAPSPAPSPAPAGL-----	252
KLF10	SSRIRSHICSHRGCGKTYFKSSHLLKAHLRHT-----	391	KLF10	IALPPTPAPTO-----	469
KLF11	FSRRRNYVCSFPGCRKTYFKSSHLLKAHLRHT-----	427	KLF11	IASAESFGSPLVSMPSA-----	512
KLF2	RKRRTATHTCSYAGCGKTYTKSSHLLKAHLRHT-----	305	KLF2		
KLF4	RKRRTATHCDYAGCGKTYTKSSHLLKAHLRHT-----	429	KLF4		
KLF1	RKRQAHTCAHPGCCKSYTKSSHLLKAHLRHT-----	312	KLF1		
KLF8	KR-RRIHQCDFAGCSKVYTKSSHLLKAHLRHT-----	307	KLF8		
KLF12	RK-RRIHRCDFEGGCNKVYTKSSHLLKAHLRHT-----	350	KLF12		
KLF3	QRKRRRIHRCYDGNCNKVYTKSSHLLKAHLRHT-----	293	KLF3		
KLF5	LEKRRIHYCDYPGCTKVYTKSSHLLKAHLRHT-----	406	KLF5		
KLF6	DGRRRVHRCHFNGCRKVKYTSSHLLKAHLRHT-----	233	KLF6		
KLF7	ENKKRVHRQCNGCRKVKYTSSHLLKAHLRHT-----	252	KLF7		
KLF15	AELIKMHKCTFPGCSKMYTKSSHLLKAHLRHT-----	354	KLF15		
KLF17	SSEARPYCNYENCGKAYTKRSHLVLHSRHK-----	316	KLF17	QDSPAAAGP-----	389
ZNF217	LPSSKEKPTHCSECGRKAFRTYHQQLVLHSRHK-----	PDIAA 426	ZNF217	LTADSAQTNLKRFDFGAKDVTGSPPAKQLKEMPSVFQNVLSAVLSPAHDQDFHKNA 606 ... 1048	
	* * : . : * * * . * * * .			* * : . : * * . * * * .	

La séquence protéique de ZNF217 entre les résidus 607 et 1048 n'apparaît pas car elle est unique.

\* résidus entièrement conservés, : résidus avec des propriétés similaires fortes, score > 0.5 dans la matrice PAM 250 de Gonnet, . résidus avec des propriétés similaires faibles, score < 0.5 dans la matrice PAM 250 de Gonnet

Acides aminés (aa) : aa : neutres, aa : acides, aa : basique, aa : hydroxyl, sulfhydryl et amine. ■ Doigts de zinc de ZNF217. ■ Motif TGEKP caractéristique des KLFs

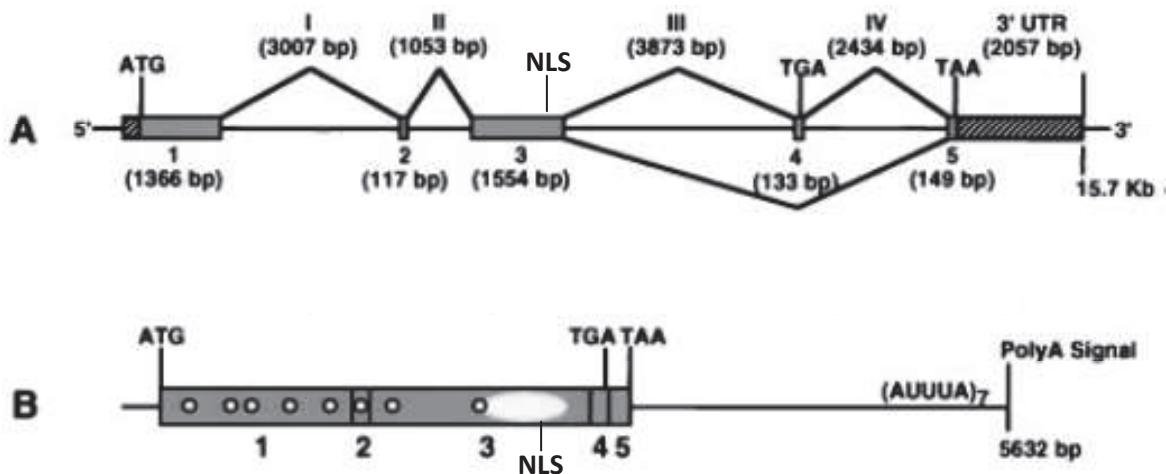
Figure 11 (b) : Homologie entre ZNF217 et les facteurs KLFs.

De plus, le sixième et septième doigt de zinc de ZNF217 est séparé par le motif TGEKP qui est caractéristique des protéines KLFs et hautement conservé au sein de cette famille. Selon une étude récente, ZNF217 se lierait à l'ADN *via* les doigts de zinc 6 et 7 (Nunez *et al.*, 2011). Enfin, ZNF217 possède un site de liaison au co-represseur de la transcription CtBP comme les KLFs 3, 8 et 12. Les KLFs étant connus pour être des facteurs de transcription, ces données suggèrent que ZNF217 soit aussi un facteur de transcription.

Par des analyses *in-silico*, il a été montré que ZNF217 serait composé de 5 exons et 4 introns (Collins *et al.*, 1998) (Figure 12). ZNF217 code pour une protéine de 1048 aa qui possède un domaine liant l'ADN (8 doigts de zinc) et un domaine d'activation de la transcription riche en proline entre les résidus 757-1005 (Figure 10). De plus, il a été montré que ZNF217 se localiserait au niveau du noyau dans des cellules HeLa (Collins *et al.*, 2001) suggérant que la séquence de ZNF217 comporterait une séquence NLS. Le NLS de ZNF217 (PKRLKSS) a été identifié à l'aide du logiciel NLS Mapper® et se situerait entre les résidus 917 et 923 (Figure 10). Collins *et al.* ont proposé que ZNF217 coderait pour une deuxième protéine après un putatif épissage alternatif de l'exon 4 (Collins *et al.*, 1998). L'existence de ce variant n'est pas validée à l'heure actuelle.

#### **4.2.2. ZNF217 fait partie de complexes transcriptionnels**

Des études utilisant des techniques de purification par chromatographie d'affinité couplée à la spectrométrie de masse et des techniques de co-immunoprecipitation (co-IP) ont montré que ZNF217 ferait partie de différents complexes contenant des co-represseurs transcriptionnels suggérant que ZNF217 serait un represseur de la transcription.



- 5' et 3'UTR
- I, II, III, IV Exons
- 1,2,3,4,5 Introns
- NLS Signal de localisation nucléaire
- | Liaison entre exons et introns
- Doigts de zinc
- Domaine d'activation de la transcription

Figure 12 : Organisation génomique de ZNF217. D'après Collins *et al.*, 1998.

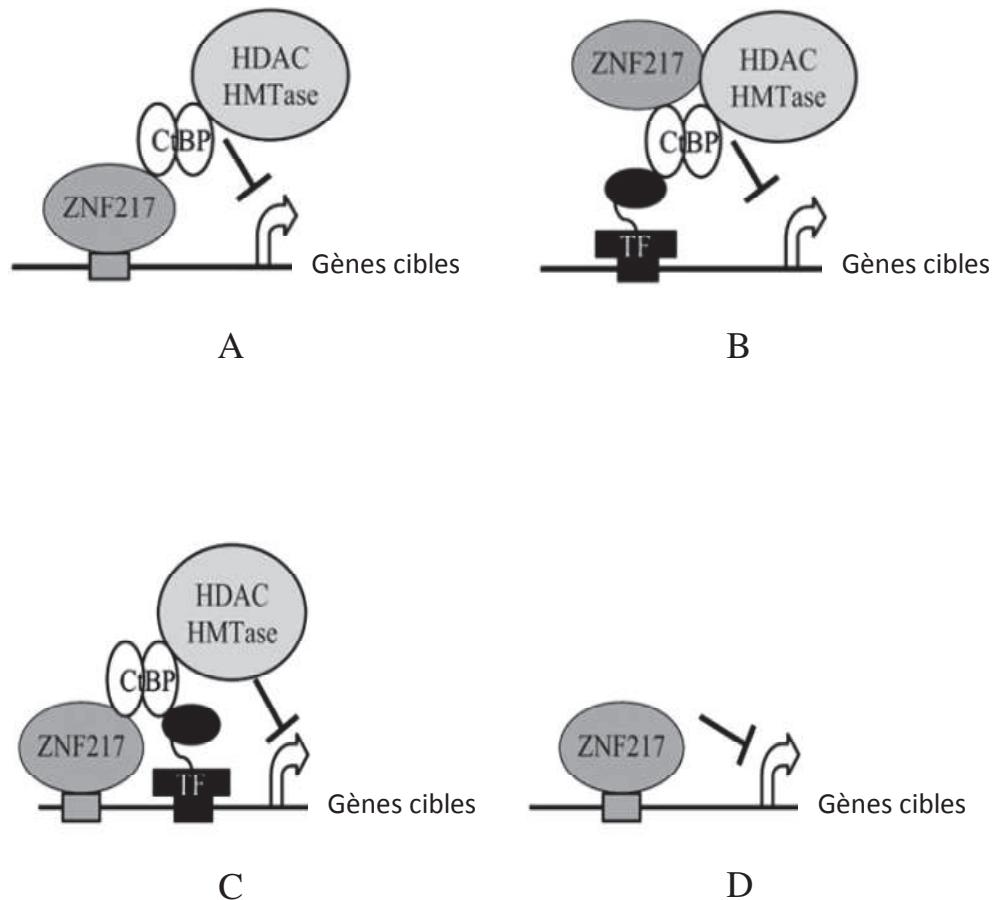
Ces complexes contiennent des co-répresseurs de la transcription tels Co-REST (REST corepressor) (You *et al.*, 2001; Hakimi *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Cowger *et al.*, 2007; Kuppuswamy *et al.*, 2008; Thillainadesan *et al.*, 2008; Banck *et al.*, 2009) et CtBP1/2 (C-terminal binding protein) (Shi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Cowger *et al.*, 2007; Kuppuswamy *et al.*, 2008; Thillainadesan *et al.*, 2008; Banck *et al.*, 2009) mais aussi des constituants enzymatiques tels les histones déacétylases HDAC1 et HDAC2 (You *et al.*, 2001; Hakimi *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Cowger *et al.*, 2007; Kuppuswamy *et al.*, 2008; Thillainadesan *et al.*, 2008) ou l'histone déméthylase BHC110/LSD1 (lysine specific demethylase) (Hakimi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Cowger *et al.*, 2007; Kuppuswamy *et al.*, 2008; Thillainadesan *et al.*, 2008; Banck *et al.*, 2009). ZNF217 est un partenaire direct de CtBP et les sites d'interaction entre les deux protéines ont été identifiés (Quinlan *et al.*, 2006; Kuppuswamy *et al.*, 2008). En effet, ZNF217 lie CtBP *via* le motif classique PXDLS mais également *via* le motif RRT nouvellement identifié par une approche de délétions couplée à des essais de double hybrides chez la levure (Quinlan *et al.*, 2006) (Figure 10). De façon intéressante, ce motif a été retrouvé dans d'autres protéines à doigts de zinc telles ZNF516 et RIZ suggérant que ZNF217, ZNF516 et RIZ pourrait représenter une nouvelle classe de partenaires de CtBP.

Un nouveau complexe a été identifié par Banck *et al.* (Banck *et al.*, 2009). Celui-ci comporte six protéines associées à ZNF217 : les protéines précédemment décrites CtBP1, Co-REST et LSD1 ainsi que les protéines Jarid 1 b/Plu-1, G9a et vraisemblablement EZH2, protéines connues pour être impliquées dans la modification post-traductionnelle des histones (Tachibana *et al.*, 2001; Schuettengruber *et al.*, 2007; Yamane *et al.*, 2007). Il est connu que des modifications post-traductionnelles des histones dont la déméthylation de H3K4 ou la méthylation de H3K9 et H3K27 est associée à la répression de la transcription (Berger, 2007). Ces activités ont été retrouvées dans le complexe de ZNF217 qui possède une activité H3K4

déméthylase médiée par Jarid 1 b/Plu-1 (Banck *et al.*, 2009) et LSD1 (Cowger *et al.*, 2007) ; une activité H3K9 méthylase médiée par G9a et une activité H3K27 méthylase qui pourrait être médiée par EZH2 (Banck *et al.*, 2009). Ainsi, ZNF217 pourrait méthyler ou déméthyler des histones conduisant à une répression aberrante de la transcription de certains gènes et ainsi induire la tumorigénèse.

Le mécanisme par lequel ZNF217 réprime la transcription n'est pas encore totalement élucidé. Plusieurs hypothèses ont été proposées (Figure 13) (Quinlan *et al.*, 2007) :

- ZNF217 pourrait se lier au promoteur de ses gènes cibles grâce à une partie ou la totalité de ses doigts de zinc et recruter le complexe transcriptionnel par des interactions protéine-proteine directes (Figure 13, A)
- d'autres facteurs liant l'ADN pourrait être le contact primaire entre le promoteur et le complexe incluant ZNF217 et ses co-répresseurs (Figure 13, B)
- ZNF217 et les autres facteurs de transcription pourraient lier le même promoteur sur des régions différentes et synergiser avec le complexe CtBP pour réprimer la transcription (Figure 13, C)
- ZNF217 pourrait se lier seul sur le promoteur et réprimer la transcription lui-même (Figure 13, D).



#### **4.2.3. Régulation de la transcription génique par ZNF217**

Plusieurs études se sont focalisées sur la recherche de séquences consensus (Tableau 8) et des promoteurs de gènes cibles sur lesquels ZNF217 se lierait (Cowger *et al.*, 2007; Krig *et al.*, 2007; Nunez *et al.*, 2011).

Par une approche CAST (Cyclic Amplification and Selection of Target) (Figure 14), Cowger *et al.* ont identifié une séquence consensus CAGAAY (avec Y représentant soit C soit T) sur laquelle se lierait ZNF217 (Cowger *et al.*, 2007). Cette séquence a été retrouvée dans le promoteur de l'*E-cadherine* humaine. Par des expériences d'immuno-précipitation de chromatine (ChIP), les auteurs ont montré que le complexe contenant ZNF217 se lierait au promoteur de l'*E-cadherine* dans des cellules de cancer du sein MCF7. Dans une approche de gène rapporteur contenant le promoteur de l'*E-cadherine*, la surexpression de ZNF217 induit une inhibition de l'activité luciférase tandis que l'inhibition de ZNF217 par un siRNA induit une augmentation de l'activité luciférase. Ces données confirment que ZNF217 régulerait négativement la transcription de certains gènes. La diminution du niveau d'expression d'ARNm ou de la protéine de l'E-cadherine au niveau cellulaire n'a pas encore été démontrée.

Une étude récente confirme la liaison de ZNF217 au promoteur de l'*E-cadherine* mais avec une faible liaison (Nunez *et al.*). Les auteurs ont identifié une nouvelle séquence consensus qui diffère de la séquence de Cowger (Cowger *et al.*, 2007) par deux résidus (TGCAGAAT) qui semblent importants pour la liaison à l'ADN. Le promoteur de l'*E-cadherine* ne contient pas cette séquence en entier (il manque ces deux résidus) ce qui expliquerait la faible affinité entre ZNF217 et le promoteur de l'*E-cadherine*. Les auteurs proposent que ZNF217 régulerait l'expression de l'*E-cadherine* via plusieurs mécanismes : premièrement directement, *via* l'interaction entre ZNF217 et son élément de réponse sur l'ADN génomique ; et deuxièmement indirectement, *via* des interactions avec d'autres protéines dans un complexe répresseur de la transcription.

<b>Etude</b>	<b>Technique utilisée</b>	<b>Séquence consensus identifiée</b>
<b>Cowger, 2007</b>	CAST	CAGAAY (Y=C ouT)
<b>Krig, 2007</b>	ChIP-chip	ATTCCNAC
<b>Nunez, 2011</b>	Mutations des sondes CAST utilisées par Cowger	TGCAGAAT

**Tableau 8 : Séquences consensus de l'ADN génomique reconnues par ZNF217.**

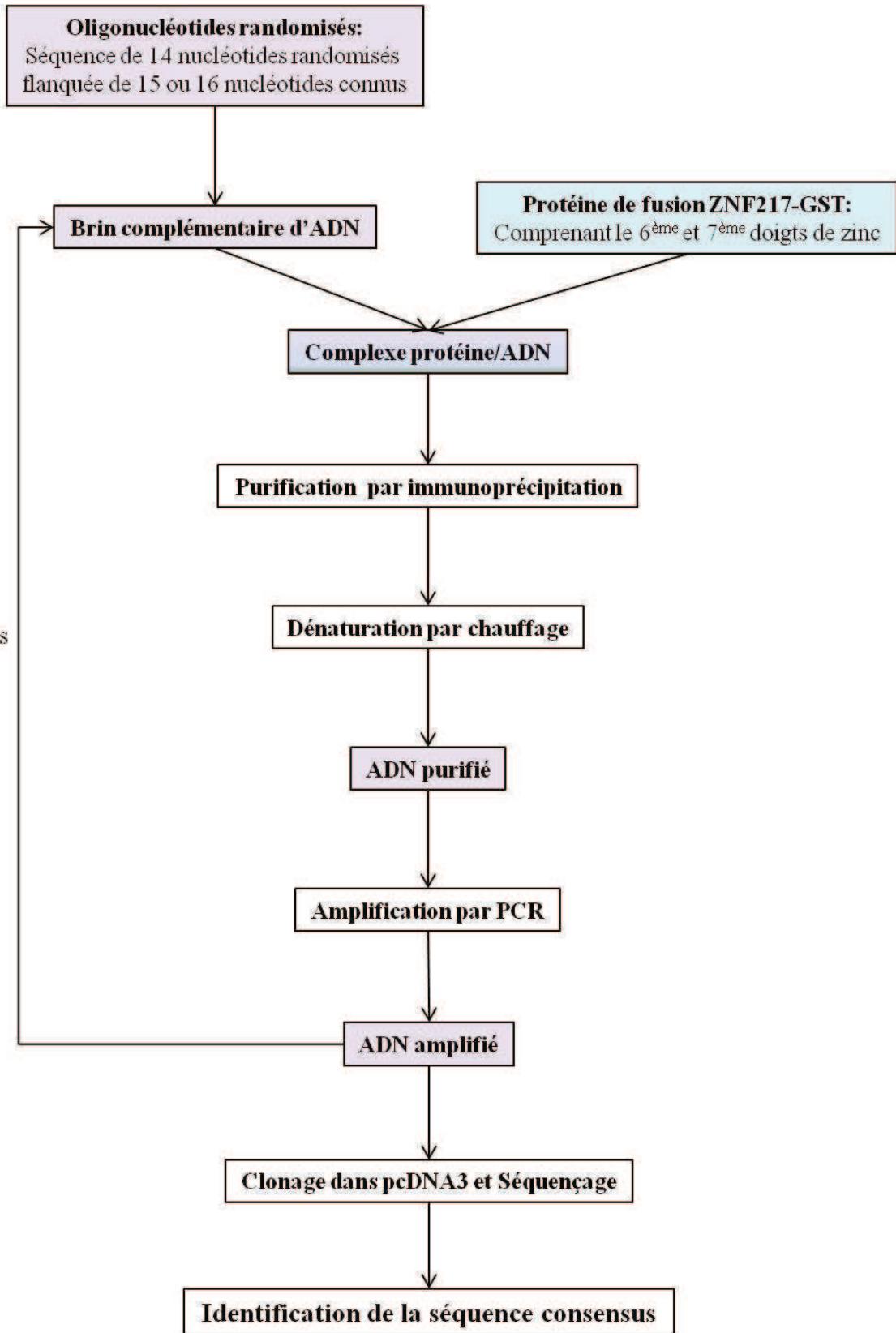


Figure 14 : Technique CAST.

Nunez *et al.* ont également confirmé le fait que ZNF217 agirait comme un répresseur de la transcription grâce à des expériences de gène rapporteur (3 copies de la séquence TGCAGAAT couplées au gène de la luciférase) et montré que ZNF217 inhibe la transcription de façon dose-dépendante. De façon intéressante, l'inhibition de la transcription est plus faible lorsqu'on utilise la séquence CAGAAT (Cowger *et al.*, 2007) confirmant l'importance des deux résidus (TG) identifiés par Nunez *et al.*

Dans une autre étude, Krig *et al.* ont confirmé le fait que ZNF217 soit un répresseur de la transcription en utilisant une approche de ChIP-chip (Krig *et al.*, 2007). Les auteurs ont identifiés 754 promoteurs liés par ZNF217 dans 3 lignées cellulaires différentes : la lignée cellulaire de cancer du sein MCF7, la lignée cellulaire de cancer du côlon SW480 et la lignée cellulaire de tératocarcinome Ntera2. L'analyse bioinformatique de ces promoteurs a conduit à l'identification d'une deuxième séquence consensus de 8 bases, ATTCCNAC, avec un cœur de 5 bases ATTCC. Soixante-cinq pour cent des promoteurs identifiés possède la séquence consensus CAGAAY identifiée par Cowger. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la différence entre les séquences consensus identifiées par Cowger par la technique de CAST et celle de Krig identifiée par la technique de ChIP-Chip. Premièrement, la technique CAST utilise un fragment de la protéine ZNF217, les doigts de zinc 6 et 7. Or il est connu que les KLFs, qui possèdent trois doigts de zinc, reconnaissent 3 nucléotides avec chacun de leur doigts de zinc (Nagai *et al.*, 2009). ZNF217 pourrait donc lier l'ADN par d'autres doigts de zinc que les doigts de zinc 6 et 7. Deuxièmement, les autres domaines de ZNF217 pourraient influer sur la liaison de ZNF217 à l'ADN *in-vivo*. De plus, selon les partenaires liés à la protéine entière ZNF217, les sites de liaisons peuvent être modifiés. Troisièmement, la technique CAST identifie seulement les sites de liaisons directes entre ZNF217 et l'ADN tandis que la technique ChIP-chip identifie aussi les sites de liaisons indirectes avec des protéines interagissant avec l'ADN.

Krig *et al.* ont identifiés le top 1000 des promoteurs liés par ZNF217 dans des cellules Ntera2 et étudié le niveau d'expression des ARNm dans des puces d'expression (Krig *et al.*, 2007). La majorité des gènes cibles (65%) ont de faibles niveaux d'expression d'ARNm confirmant l'hypothèse que ZNF217 soit un inhibiteur de la transcription et réprimerait les promoteurs sur lesquels il se fixe. Cependant un petit nombre de gènes cibles (12%) possèdent un niveau d'expression élevé d'ARNm suggérant que ZNF217, comme de nombreux autres facteurs de transcription, pourrait aussi agir comme un activateur de la transcription. Pour confirmer l'hypothèse que ZNF217 agirait principalement comme un répresseur de la transcription, les auteurs ont étudié le niveau d'expression de l'ARNm avant et après un traitement avec un siRNA-ZNF217 : 288 gènes identifiés ont une expression augmentée (suggérant que ces gènes sont réprimés par ZNF217) et 133 gènes identifiés ont une expression diminuée (suggérant que ces gènes sont activés par ZNF217) dans deux expériences sur trois (Tableaux 9 et 10). Les gènes dont l'expression serait régulée par ZNF217 codent pour des protéines impliquées dans la régulation de la transcription, le développement des organes, le développement embryonnaire et la morphogénèse. De plus, par des expériences de ChIP-chip, les promoteurs liés à ZNF217 et ceux liés à CtBP2, ont été comparé dans les cellules Ntera2 et les cellules MCF7. La majorité des promoteurs liés à ZNF217 est aussi liée par CtBP2 suggérant que ZNF217 et CtBP2 coopèrent pour réprimer la transcription.

Une autre étude a identifié des promoteurs liés et régulés par ZNF217 (Thillainadesan *et al.*, 2008). Pour cela, les auteurs ont utilisé une approche en deux étapes : premièrement, des puces d'expression sur des cellules MCF7 dont le niveau d'expression de ZNF217 est sous-exprimé par une approche de siRNA afin d'identifier les gènes dont l'expression est dérégulée ; deuxièmement une approche de ChIP-DSL (Chromatin Immunoprecipitation with Directed Selection and Ligation) pour identifier les promoteurs liés par ZNF217.

Etude	Techniques	Modèles cellulaires	Gènes sous-exprimés par ZNF217	Gènes surexprimés par ZNF217	Gènes dont les promoteurs sont liés par ZNF217	Gènes sous-exprimés dont les promoteurs sont liés par ZNF217	Gènes surexprimés dont les promoteurs sont liés par ZNF217
Krig, 2007	- Puces d'expression (Illumina Sentrix Expression BeadChips, human 6-v1) sur des cellules traitées ou non par siRNA-ZNF217 - CHIP-chip (NimbleGen ENCODE oligonucleotide array)	MCF7 Ntera2 SW480	288 <sup>a,b</sup>	133 <sup>a,b</sup>	754 <sup>c</sup>	41 <sup>a,b</sup> dont 13 <sup>a,d</sup>	13 <sup>a,b</sup> dont 3 <sup>a,d</sup>
Thillainadesan, 2008	- Puces d'expression (HGU133A+2 human Affymetrix DNA array) traitées ou non sur des cellules traitées siRNA-ZNF217 - CHIP-DSL (Hu20K array)	MCF7	176	875	1431	9	45

<sup>a</sup> : gènes identifiés dans au moins 2 expériences sur trois

<sup>b</sup> : dans les cellules Ntera2

<sup>c</sup> : commun aux 3 types cellulaires

<sup>d</sup> : commun aux cellules Ntera2 et MCF7

Tableau 9 : Gènes régulés par ZNF217.

Expression des gènes réprimée par ZNF217		Expression des gènes activée par ZNF217	
Symbole officiel	Description	Symbole officiel	Description
ADM	adrenomedullin	ARMCX5	armadillo repeat containing, X-linked 5
<b>ANK3</b>	<b>ankyrin 3</b>	<b>CCNE2</b>	<b>cyclin E2</b>
<b>ATP10D</b>	<b>ATPase, class V, type 10D</b>	EOMES	eomesodermin
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	GAD1	glutamate decarboxylase 1
COL8A1	collagen, type VIII, alpha 1	GATA4	GATA binding protein 4
<b>CREB5</b>	<b>c-AMP responsive element binding protein 5</b>	<b>KRT18</b>	<b>keratin 18</b>
<b>CXXC4</b>	<b>CXXC finger protein 4</b>	PUNC	immunoglobulin superfamily, DCC subclass, member 3
DPP6	dipeptidyl-peptidase 6	SOCS2	suppressor of cytokin signaling 2
EPHX4	epoxide hydrolase 4	ST3GAL6	ST3 beta-galactoside alpha-2,3 sialytransférase 6
<b>GPRC5A</b>	<b>G-protein-coupled receptor, family C, group 5, member A</b>	ST6GAL1	ST6 beta-galactoside alpha-2,6 sialytransférase 1
HAPLN1	hyaluronan and proteoglycan link protein 1	STRA6	stimulated by retinoic acid gene 6 homolog (mouse)
<b>HOXC6</b>	<b>homeobox C6</b>	WNT5B	wingless-type MMTV integration site family member 5B
IFI16	interferon, gamma-inducible protein 16	ZNF616	zinc finger protein 616
<b>IGFBP3</b>	<b>insulin-like growth factor binding protein 3</b>		
ITM2A	integral membrane protein 2A		
KLHL4	kelch-like 4		
LMO3	LIM domain only 3		
LYPD1	LY6/PLAUR domain containing 1		
MAP2K5	mitogen-activated protein kinase 5		
MPZL2	<b>myelin protein zero-like 2</b>		
<b>MYCBP2</b>	<b>MYC binding protein 2</b>		
NEFL	neurofilament, light polypeptide		
NLGN1	neuroligin 1		
NMNAT2	nicotinamide nucleotide adenyltransferase 2		
NMU	neuromedin U		
<b>NRK</b>	<b>nick related kinase</b>		
NRXN3	neurexin 3		
PAK3	p21 protein (cdc42/Rac)-activated kinase 3		
PIPOX	pipecolic acid oxidase		
PKP2	plakophilin 2		
PLAT	plasminogen activator, tissue		
RCAN1	regulator of calcineurin 1		
RGS20	regulator of G-protein signaling 20		
SEC14L2	SEC14-like 2		
SEMA3A	sema domain immunoglobulin domain, short basic domain, secreted (semaphorin) 3A		
<b>SH3RF2</b>	<b>SH3 domain containing ring finger 2</b>		
SLC6A15	solute carrier family 6 (neutral amino acid transporter), member 15		
<b>SPAG9</b>	<b>sperm associated antigen 9</b>		
SPG3A	atlastin GTPase 1		
<b>TP53AP1</b>	<b>TP53 target 1 (non-protein coding)</b>		
VSNL1	visinin-like 1		

Les gènes en gras sont retrouvés régulés par ZNF217 dans les cellules MCF7 et Ntera 2, les autres seulement dans les cellules Ntera 2.

**Tableau 10 : Gènes régulés par ZNF217 (Krig *et al.*, 2007).**

Expression des gènes réprimée par ZNF217		Expression des gènes activée par ZNF217	
Symbol officiel	Description	Symbol officiel	Description
ABCA12	ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 12	AD-017	glycosyltransferase 8 domain containing 1
C4orf32	chromosome 4 open reading frame 32	BRCA1	breast cancer 1, early onset
EFNB2	ephrin-B2	C18orf25	chromosome 18 open reading frame 25
FAM63A	family with sequence similarity 63, member A	CALM1	calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)
MAN1A1	mannosidase, alpha, class 1A, member 1	CAMK2A	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha
p15INK4b	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B	CDC25C	cell division cycle 25 homolog C
TCEAL8	transcription elongation factor A (SII)-like 8	CDCA8	cell division cycle associated 8
THY28	thymocyte nuclear protein 1	CECR5	cat eye syndrome chromosome region, candidate 5
VAV3	vav3 guanine nucleotide exchange factor	CNOT1	CCR4-NOT transcription complex, subunit 1
		CNPY3	canopy 3 homolog (zebrafish)
		DAZAP1	DAZ associated protein 1
		DCXR	dicarbonyl/L-xylulose reductase
		EIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
		ETF1	eukaryotic translation termination factor 1
		FAM105A	family with sequence similarity 105, member A
		FAM35A	family with sequence similarity 35, member A
		FAM43A	FAM43A family with sequence similarity 43, member A
		FGFRL1	fibroblast growth factor receptor-like 1
		HAUS2	HAUS augmin-like complex, subunit 2
		HAUS3	HAUS augmin-like complex, subunit 3
		IRX2	iroquois homeobox 2
		KCTD15	potassium channel tetramerisation domain containing 15
		LBR	lamin B receptor
		LMNB1	lamin B1
		LOC55971	insulin receptor tyrosine kinase substrate
		MCM8	minichromosome maintenance complex component 8
		MND1	meiotic nuclear divisions 1 homolog (S. cerevisiae)
		NUP50	nucleoporin 50kDa
		PDXP	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) phosphatase
		PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3
		PIR51	RAD51 associated protein 1
		POP7	processing of precursor 7, ribonuclease P/MRP subunit
		PRR11	proline rich 11
		RAC3	ras-related C3 botulinum toxin substrate 3
		SF3A1	splicing factor 3a, subunit 1, 120kDa
		SF3A1	splicing factor 3a, subunit 1, 120kDa
		SKA3	spindle and kinetochore associated complex subunit 3
		SRP72	signal recognition particle 72kDa
		SUSD2	sushi domain containing 2
		TCF3	transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)
		TUBB2A	tubulin, beta 2A class Ila
		XPO4	exportin 4
		YIPF3	Yip1 domain family, member 3
		ZBTB8A	zinc finger and BTB domain containing 8A
		ZNF395	zinc finger protein 395

Tableau 11 : Gènes régulés par ZNF217 (Thillainadesan *et al.*, 2008).

Ainsi, 1 051 gènes dont l'expression est dérégulée après un traitement par siRNA-ZNF217, ont été identifiés : 176 gènes ont une expression augmentée et 875 gènes ont une expression diminuée. De plus, les auteurs ont identifiés 1 431 promoteurs directement liés par ZNF217. Vingt cinq pour cent des gènes identifiés codent pour un facteur de transcription suggérant que ZNF217 pourrait jouer un rôle important dans de nombreux processus biologiques. Il est intéressant de noter que de nombreux gènes identifiés sont impliqués dans le développement tumoral, la morphologie cellulaire, le cycle cellulaire, la prolifération cellulaire, la mort cellulaire et l'interaction cellule-cellule. En comparant les gènes directement liés par ZNF217 et les gènes dont l'expression est dérégulée après un traitement par un siRNA-ZNF217, Thillainadesan *et al.* ont identifié 9 gènes directement liés par ZNF217 et surexprimés après un traitement par siRNA-ZNF217 (réprimés par ZNF217) et 45 gènes sous-exprimé après un traitement par siRNA-ZNF217 (activés par ZNF217) suggérant que ZNF217 pourrait également agir comme un activateur de la transcription (Tableaux 9 et 11). Enfin, des puces d'expression ont également été faites dans des cellules HO-8910 de cancer de l'ovaire sous-exprimant ZNF217 par shRNA et ont permis d'identifier 164 gènes dont l'expression est inhibée dans les transfectants stables sous-exprimant ZNF217 (Sun *et al.*, 2009). La liste des gènes identifiés n'est pas disponible. Les fonctions de ces gènes sont la transduction du signal, la communication cellulaire, la liaison des protéines et la régulation de processus biologiques comme l'apoptose, le cycle cellulaire et la croissance cellulaire (Sun *et al.*, 2009).

Les résultats des études identifiant les gènes régulés par ZNF217 sont récapitulés dans les tableaux 9, 10 et 11 (Krig *et al.*, 2007; Thillainadesan *et al.*, 2008). Aucun des gènes identifiés par Krig *et al.* n'a été retrouvé dans l'étude de Thillainadesan *et al.*. Ceci peut s'expliquer par la différence de méthode entre les deux études : Krig *et al.* ont utilisé une approche classique de ChIP-chip (avec la puce NimbleGen ENCODE oligonucleotide array) tandis que Thillainadesan *et al.* ont utilisé la technique de ChIP-DSL (avec la puce Hu20K)

pour identifier les promoteurs liés par ZNF217. Dans la technique de ChIP-chip, l'ADN immunoprécipité est lié dans un vecteur et amplifié par PCR avec des primers spécifiques du vecteur avant d'être hybride sur une puce contenant 380 000 sondes. Dans la technique de ChIP-DSL, l'ADN immunoprécipité est directement amplifié avec un mix de 20 000 oligonucléotides avant d'être hybride. Par conséquent, la technique de ChIP-chip permet une approche plus globale et l'identification d'un plus grand nombre de promoteurs liés par ZNF217 mais la technique de ChIP-DSL est plus spécifique. De plus, la technique de ChIP-DSL permet d'identifier seulement les sites de liaison présents dans la région de 1 kb en amont du site d'initiation de la transcription alors que la technique de ChIP-Chip utilisée permet d'identifier les sites de liaison entre 800 pb et 4,2 kb en amont du site d'initiation de la transcription. Toutefois ces différences sont surprenantes. Il se peut aussi que suivant le contexte cellulaire, la régulation transcriptionnelle par ZNF217 soit différente.

Au niveau fonctionnel, les gènes identifiés comme étant régulés par ZNF217, dans les deux études, sont impliqués dans le développement, les processus métaboliques et les processus de régulation biologique. Les principales autres fonctions identifiées sont la communication cellulaire et l'adhésion cellulaire dans l'étude de Krig *et al.* et la régulation du cycle cellulaire dans l'étude de Thillainadesan *et al.* De façon surprenante, Thillainadesan *et al.* ont identifié 45 gènes (sur 54 gènes identifiés au total) dont l'expression serait activée par ZNF217 suggérant que ZNF217 pourrait agir aussi comme un activateur de la transcription. Des études récentes ont montré que LSD1 pourrait soit activer soit réprimer la transcription des gènes sur lesquels LSD1 se fixe (Garcia-Bassets *et al.*, 2007; Kwon *et al.*, 2007). LSD1 fonctionnerait comme un répresseur de la transcription en déméthylant H3K4 et comme un activateur de la transcription en déméthylant H3K9 plutôt que H3K4. Les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas élucidés à l'heure actuelle mais il a été proposé que l'activité de LSD1 soit régulée de façon allostérique *via* l'interaction avec d'autres protéines

comme Co-REST, BHC80 et le récepteur aux androgènes (Lee *et al.*, 2005; Metzger *et al.*, 2005). LSD1, qui ferait partie du complexe transcriptionnel de ZNF217 (Hakimi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Cowger *et al.*, 2007; Kuppuswamy *et al.*, 2008; Thillainadesan *et al.*, 2008; Banck *et al.*, 2009), pourrait donc contribuer à la régulation de l'activité de ZNF217.

### **4.3. Mécanismes moléculaires impliqués dans les fonctions de survie ZNF217-dépendantes**

Les fonctions de ZNF217 sont actuellement peu connues mais ZNF217 semble être impliqué dans la tumorigénèse de plusieurs cancers. Dans un premier temps, ZNF217 pourrait jouer un rôle dans les phases précoce du développement tumoral en contribuant d'une part à la maintenance des cellules souches et à l'inhibition de leur différentiation *via* l'interaction avec la voie HIF (Mao *et al.*, 2011) et d'autre part en participant à la résistance à l'action anti-proliférative du TGF- $\beta$  *via* l'inhibition de la transcription de *p15<sup>ink4b</sup>* (Thillainadesan *et al.*, 2008). Dans un deuxième temps, ZNF217 pourrait jouer un rôle dans les phases plus tardives de la cancérogénèse *via* la surexpression d'ErbB3 (Krig *et al.*, 2010) et en conférant la résistance à la chimiothérapie *via* l'activation de la voie de survie Akt (Huang *et al.*, 2005) ou la surexpression du facteur d'elongation de la transcription eEF1A2 (Sun *et al.*, 2008b).

#### **4.3.1. Rôle de ZNF217 dans les phases précoce du développement tumoral**

Des cellules souches cancéreuses, qui seraient à l'origine du développement tumoral, ont récemment été identifiées dans plusieurs tumeurs solides et dans les leucémies (pour revue, (Rasheed *et al.*, 2011)). ZNF217 pourrait jouer un rôle dans l'initiation du développement tumoral en contribuant à la maintenance des cellules souches de glioblastome et en inhibant leur différentiation (Mao *et al.*, 2011). En effet, l'inhibition de l'expression de ZNF217 par une approche de siRNA inhibe la prolifération de cellules souches de

glioblastome et réduit le nombre de cellules positivement marquées pour la nestine, un marqueur des cellules souches neuronales non différenciées.

L'hypoxie est un facteur microenvironnemental prépondérant pour la tumeur car elle joue un rôle fondamental dans la pluripotence et la tumorigénéité des cellules souches cancéreuses (Li *et al.*, 2009; Soeda *et al.*, 2009; Bar *et al.*, 2010). Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas complètement élucidés mais font intervenir les facteurs HIFs, HIF1 $\alpha$  et HIF2 $\alpha$ . Les facteurs HIFs sont des facteurs de transcription qui ont un rôle central dans la réponse à l'hypoxie puisqu'ils régulent la transcription de nombreux gènes impliqués dans la tumorigénéité des cellules souches cancéreuses tels les gènes *VEGF* (Forsythe *et al.*, 1996; Kelly *et al.*, 2003; Manalo *et al.*, 2005), *Notch* (Manalo *et al.*, 2005), *OCT4* (Forristal *et al.*, 2010), *hTERT* (Nishi *et al.*, 2004; Yatabe *et al.*, 2004) et *c-myc* (Koshiji *et al.*, 2004). Une étude récente montre que *ZNF217* serait régulé par les facteurs HIFs telles que le prouve les données suivantes (Mao *et al.*, 2011) : (i) le niveau d'expression d'ARNm de *ZNF217* est positivement corrélé au niveau d'expression de HIF1 $\alpha$  et HIF2 $\alpha$  dans des tumeurs de glioblastome (Mao *et al.*, 2011) ; (ii) l'inhibition de HIF1 $\alpha$  ou HIF2 $\alpha$  par siRNA inhibe l'expression protéique de *ZNF217* dans des lignées de cellules souches de glioblastome ou des lignées cellulaires de glioblastome et (iii) l'expression protéique de *ZNF217* est augmentée dans des conditions hypoxiques mais ne l'est plus après l'inhibition par siRNA de HIF1 $\alpha$  ou HIF2 $\alpha$ . Ces résultats suggèrent que *ZNF217* serait une cible des facteurs HIFs. Par une approche de ChIP-chip, Mole *et al.* ont montré que des sites de liaisons des facteurs HIFs seraient présents sur le promoteur de *ZNF217* indiquant une liaison potentielle entre les facteurs HIFs et *ZNF217* (Mole *et al.*, 2009). Des études explorant comment les facteurs HIFs régulent l'expression de *ZNF217* pourraient ainsi aider à la compréhension des mécanismes de réponse des cellules souches de glioblastome à l'hypoxie.

En plus de son rôle dans la maintenance des cellules souches cancéreuses (Mao *et al.*, 2011), ZNF217 pourrait également intervenir dans les phases précoce du développement tumoral en étant impliqué dans la résistance à l'action anti-proliférative du TGF- $\beta$ . En effet, Nonet *et al.* ont montré que la transduction de ZNF217 dans les cellules épithéliales mammaires HMEC, induit la transformation de ces cellules et que celles-ci deviennent résistantes à l'action anti-proliférative du TGF- $\beta$  (Nonet *et al.*, 2001). Le TGF- $\beta$  joue un double rôle dans le développement tumoral : dans les phases précoce, le TGF- $\beta$  agit comme un suppresseur de tumeur en inhibant la prolifération cellulaire alors que dans les phases tardives, le TGF- $\beta$  augmente l'invasion et le développement de métastases (Akhurst & Derynck, 2001; Roberts & Wakefield, 2003). Beaucoup de tumeurs et de lignées cellulaires développent une résistance à l'action anti-proliférative du TGF- $\beta$  qui peut être causée par des mutations du récepteur du TGF- $\beta$  ou des protéines Smads (Pardali & Moustakas, 2007). Cependant, la majorité des tumeurs possèdent une voie de signalisation TGF- $\beta$  intacte ce qui suggère une régulation aberrante de la voie TGF- $\beta$  comme par exemple la surexpression de certaines protéines régulant la transcription des gènes cibles du TGF- $\beta$  aboutissant à la transcription aberrante de ces gènes. ZNF217 pourrait jouer un rôle dans la résistance des cellules cancéreuses au TGF- $\beta$  en réprimant de façon aberrante la transcription du gène suppresseur de tumeur *p15<sup>ink4b</sup>* (Thillainadesan *et al.*, 2008). *p15<sup>ink4b</sup>* est un membre de la famille INK4, qui inhibe directement CDK4 et CDK6 induisant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire (Kim & Sharpless, 2006). L'inactivation de *p15<sup>ink4b</sup>* a été retrouvée dans de nombreux cancers suggérant que l'inhibition de sa transcription par ZNF217 pourrait contribuer à ses propriétés tumorigènes (Thillainadesan *et al.*, 2008). Ainsi dans des conditions normales, le complexe ZNF217 est fixé sur le promoteur de *p15<sup>ink4b</sup>* qui est réprimé. Après un traitement au TGF- $\beta$  des cellules HaCaT, on observe un relargage du complexe ZNF217 du promoteur de *p15<sup>ink4b</sup>* et la fixation d'activateurs de la transcription tels

le complexe Smad2/3/4, CEBP $\beta$ , FoXO3 et SP1 sur le promoteur de  $p15^{ink4b}$  conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire. L'identification de  $p15^{ink4b}$  comme une cible directe du complexe répresseur de la transcription de ZNF217 représente donc un nouveau lien entre l'amplification de ZNF217 et la résistance au TGF- $\beta$  dans le cancer du sein (Nonet *et al.*, 2001).

#### **4.3.2. Rôle de ZNF217 dans les phases tardives du développement tumoral**

ZNF217 pourrait aussi jouer un rôle dans les phases plus tardives de la progression tumorale d'une part en augmentant l'agressivité tumorale dans le cancer de l'ovaire (Sun *et al.*, 2008a; Sun *et al.*, 2008b) et d'autre part en induisant la chimiorésistance dans le cancer du sein et de l'ovaire (Huang *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2008b).

Des études préliminaires ont montré que la dérégulation de l'expression de ZNF217, surexpression ou inhibition, augmente ou inhibe respectivement la formation de colonies cellulaires dans des cellules immortalisées ovariennes et des cellules de cancer de l'ovaire. Le facteur d'elongation de la transcription eEF1A2, oncogène également situé en 20q13, a été proposé pour médier les effets tumorigènes de ZNF217 dans le cancer de l'ovaire (Sun *et al.*, 2008b). En effet, eEF1A2 est surexprimé dans les cellules ovariennes qui surexpriment ZNF217. De façon intéressante, les cellules ovariennes surexprimant ZNF217 développent moins de colonies cellulaires après un traitement avec un siRNA-eEF1A2. Ces données suggèrent qu'eEF1A2 pourrait médier les effets de ZNF217. Utilisant une approche de ChiP-chip, Krig *et al.* ont identifié des gènes directement régulés par ZNF217 (Krig *et al.*, 2007) et ont rapporté une interaction faible entre ZNF217 et eEF1A2 suggérant qu'eEF1A2 pourrait être régulé de façon indirecte par ZNF217 par exemple par inhibition des inhibiteurs d'eEF1A2 (Sun *et al.*, 2008b). eEF1A2 pourrait donc médier les effets tumorigènes de

ZNF217 et/ou ZNF217 pourrait augmenter les effets néoplasiques d'eEF1A2 en augmentant son expression.

ZNF217 jouerait également un rôle dans les phases tardives de la progression tumorale en conférant la résistance aux signaux apoptotiques des traitements chimiothérapeutiques. En effet, Huang *et al.* ont montré que la surexpression de ZNF217 induit la résistance à l'apoptose induite par des facteurs physiologiques dans des cellules HeLa ou par la doxorubicine, un inhibiteur de la topoisomérase II, dans des cellules de cancer du sein MCF7, 600MPE et HBL100 ou des cellules HeLa (Huang *et al.*, 2005). Une autre étude confirme l'implication de ZNF217 dans la résistance à la chimiothérapie. Ainsi, la surexpression de ZNF217 dans des cellules ovariennes induit la résistance à l'apoptose de la camphothécine, un alcaloïde inhibiteur de la topoisomérase I (Sun *et al.*, 2008b).

Les fonctions de survie de ZNF217 pourraient s'expliquer par l'activation de la voie de survie Akt (Huang *et al.*, 2005). En effet, la surexpression de ZNF217 dans les cellules HBL100 induit la phosphorylation d'Akt sur la sérine 473. Inversement, la diminution de l'expression de ZNF217 par une approche de siRNA dans des cellules MCF7 inhibe la phosphorylation d'Akt suggérant que ZNF217 joue un rôle direct dans l'activation de la voie de survie Akt. Enfin de façon intéressante, un traitement des cellules MCF7 par un inhibiteur de PI3K, le Ly294002, induit une diminution du niveau d'expression protéique de ZNF217. Ces données suggèrent que les fonctions de survie de ZNF217 seraient dûes en partie au moins à l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt et qu'il existerait une boucle de régulation entre ZNF217 et la voie Akt.

ZNF217 pourrait aussi jouer un rôle dans les phases plus tardives de la Cancérogénèse via la surexpression d'ErbB3 (Krig *et al.*, 2010). Les auteurs ont montré que les niveaux d'expression d'ARNm et de protéine d'ErbB3 sont corrélés à ceux de ZNF217 dans des

lignées cellulaires de cancer du sein et des tumeurs primitives du sein humaines ou murines. De plus, l'expression ectopique de ZNF217 suffit pour augmenter l'expression du transcrit et de la protéine ErbB3 dans des cellules HMEC. Inversement, la sous-expression de ZNF217 dans des cellules MCF7 inhibe l'expression d'ErbB3 indiquant que ZNF217 joue un rôle direct dans la régulation de l'expression d'ErbB3. La surexpression du récepteur ErbB3 pourrait expliquer l'activation de la voie de survie Akt dans les cellules surexprimant ZNF217 et résistantes à la doxorubicine (Huang *et al.*, 2005). Par une approche de gène rapporteur, les auteurs ont montré que ZNF217 régule directement l'expression d'ErbB3 en se fixant sur son promoteur et active la transcription du gène (Krig *et al.*, 2007). De plus, par des expériences d'immunoprécipitation, les auteurs ont confirmé et montré que ZNF217 et CtBP1/2 se fixent sur le promoteur d'ErbB3. CtBP1/2 et ZNF217 auraient un rôle opposé dans la régulation de l'expression d'ErbB3 : ZNF217 activerait la transcription d'ErbB3 tandis que CtBP1/2 inhiberait sa transcription. Cette étude confirme que ZNF217 pourrait jouer un rôle d'activateur de la transcription en plus de son rôle d'inhibiteur de la transcription

Enfin, la résistance aux signaux pro-apoptotiques de la chimiothérapie dans les cellules surexprimant ZNF217 pourrait s'expliquer par la surexpression d'eEF1A2 dans le cancer de l'ovaire (Sun *et al.*, 2008b). En effet, les cellules ovariennes surexprimant ZNF217 et résistantes à l'action apoptotique de la camphothécine deviennent sensibles à celle-ci après un traitement avec un siRNA-eEF1A2, suggérant une nouvelle fois qu'eEF1A2 pourrait médier les effets tumorigènes de ZNF217 dans le cancer de l'ovaire.

**En conclusion, ZNF217 semblent jouer un rôle dans les phases précoces et les phases tardives de la progression tumorale dans différents cancers. Cependant les fonctions et les mécanismes d'action de ZNF217 sont mal connus et des études approfondies sont donc nécessaires pour mieux les identifier.**

# TRAVAUX PERSONNELS

## ***Objectifs de mon travail de thèse***

La résistance à la chimiothérapie et les rechutes cliniques sont des challenges majeurs dans la prise en charge des cancers du sein. Il est donc primordial de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux biomarqueurs pronostiques qui peuvent aider à orienter le traitement. Pour cela, il faut approfondir les mécanismes impliqués dans la cancérogénèse mammaire. En 1998, Collins *et al.* ont décrit un nouvel oncogène, ZNF217, dont les fonctions sont toujours mal connues actuellement. Nous avons donc étudié d'une part les fonctions de ZNF217 dans le cancer du sein ainsi que les mécanismes moléculaires associés et d'autre part nous avons déterminé si ZNF217 pourrait être un biomarqueur intéressant dans le cancer du sein. Les objectifs de mon projet de thèse sont basés sur deux axes principaux :

Axe n°1 : Rôle de ZNF217 dans la réponse à la chimiothérapie. Dans ce but, nous avons étudié l'impact de la dérégulation de l'expression de ZNF217 sur le phénotype cellulaire et sur la réponse à diverses chimiothérapies ayant divers mécanismes d'action dans des cellules de cancer du sein (Article n°1).

Axe n°2 : Valeur pronostique de ZNF217 et impact de la dérégulation de l'expression de ZNF217 sur l'agressivité, l'invasion, la migration et l'EMT et études des mécanismes associés (Article n°2).

Enfin, dans le cadre d'une collaboration avec le Dr A. Aussem, Laboratoire GAMA, Université Lyon I, Villeurbanne, France, nous avons exploré le réseau Bayésien de ZNF217 afin d'identifier *via* une méthode bioinformatique des partenaires probables de ZNF217 (Article n°3, présenté en annexe).

*Article n°1*

« ZNF217 confers resistance to the pro-apoptotic signals of paclitaxel and aberrant expression of Aurora-A in breast cancer cells »

**Thollet A\***, Vendrell JA\*, Payen L, Ghayad SE, Ben Larbi S, Grisard E,  
Collins C, Villedieu M, Cohen PA.

\* Les auteurs ont contribué de façon équivalente à ce travail

(*Molecular Cancer*, 2010, 9:291)

## **Objectifs de l'étude**

Cette étude a pour but d'explorer le rôle de ZNF217 dans la réponse à la chimiothérapie. Pour répondre à cette question, nous avons étudié l'impact de la dérégulation de l'expression de ZNF217 sur la prolifération cellulaire et sur la viabilité cellulaire de cellules traitées par chimiothérapie. Nous avons ensuite identifiés les mécanismes impliqués dans le phénotype observé.

Ce travail est en collaboration avec le Dr C. Collins, Département d'Urologie, Vancouver Prostate Center, Vancouver, Canada et le Dr L. Payen, INSERM U590, ISPB, Faculté de Pharmacie de Lyon, Université Lyon I, France.

RESEARCH

Open Access

# ZNF217 confers resistance to the pro-apoptotic signals of paclitaxel and aberrant expression of Aurora-A in breast cancer cells

Aurélie Thollet<sup>1,2,3,4†</sup>, Julie A Vendrell<sup>1,2,3,4†</sup>, Léa Payen<sup>1,2,3,4</sup>, Sandra E Ghayad<sup>1,2,3,4</sup>, Sabrina Ben Larbi<sup>1,2</sup>, Evelyne Grisard<sup>1,2,3,4</sup>, Colin Collins<sup>5</sup>, Marie Villedieu<sup>1,2,3,4</sup>, Pascale A Cohen<sup>1,2,3,4\*</sup>

## Abstract

**Background:** ZNF217 is a candidate oncogene located at 20q13, a chromosomal region frequently amplified in breast cancers. The precise mechanisms involved in ZNF217 pro-survival function are currently unknown, and utmost importance is given to deciphering the role of ZNF217 in cancer therapy response.

**Results:** We provide evidence that stable overexpression of ZNF217 in MDA-MB-231 breast cancer cells conferred resistance to paclitaxel, stimulated cell proliferation *in vitro* associated with aberrant expression of several cyclins, and increased tumor growth in mouse xenograft models. Conversely, siRNA-mediated silencing of ZNF217 expression in MCF7 breast cancer cells, which possess high endogenous levels of ZNF217, led to decreased cell proliferation and increased sensitivity to paclitaxel. The paclitaxel resistance developed by ZNF217-overexpressing MDA-MB-231 cells was not mediated by the ABCB1/PgP transporter. However, ZNF217 was able to counteract the apoptotic signals mediated by paclitaxel as a consequence of alterations in the intrinsic apoptotic pathway through constitutive deregulation of the balance of Bcl-2 family proteins. Interestingly, ZNF217 expression levels were correlated with the oncogenic kinase Aurora-A expression levels, as ZNF217 overexpression led to increased expression of the Aurora-A protein, whereas ZNF217 silencing was associated with low Aurora-A expression levels. We showed that a potent Aurora-A kinase inhibitor was able to reverse paclitaxel resistance in the ZNF217-overexpressing cells.

**Conclusion:** Altogether, these data suggest that ZNF217 might play an important role in breast neoplastic progression and chemoresistance, and that Aurora-A might be involved in ZNF217-mediated effects.

## Background

In breast cancer, the 20q13 region is amplified in up to 29% of tumors and is associated with early stage, aggressive phenotype and poor clinical prognosis [1]. A number of genes located on chromosome 20q13, such as *AURKA/STK15* [2], *EEF1A2* [3] and *ZNF217* [4], appear as possible oncogenic targets of amplification. *ZNF217* amplification correlates with shorter patient survival in breast [5] and in ovarian cancers [6]. The first direct evidence for a potentially oncogenic function of *ZNF217* was the demonstration that the transduction of finite life-span human mammary epithelial cells with *ZNF217*

could give rise to immortalized cells with increased telomerase activity and stabilized telomere length [7]. It has been hypothesized that the selective amplification of *ZNF217* allows cancer cells to overcome senescence and become immortal, a requirement likely essential for cancer development [8]. In support of this original study, *ZNF217* has also recently been shown to immortalize ovarian cells [9].

*ZNF217* is a Krüppel-like zinc finger protein that localizes to the nucleus [10] and interacts with co-repressors and histone modifying proteins [11-13], suggesting that *ZNF217* may be part of a transcriptional repressor complex. *ZNF217* promotes cell viability in HeLa cells by interfering with the apoptotic pathway and attenuates apoptotic signals resulting from doxorubicin-induced DNA damage or from functionally compromised

\* Correspondence: pascale.cohen@univ-lyon1.fr

† Contributed equally

<sup>1</sup>Université de Lyon, Lyon, France

Full list of author information is available at the end of the article

telomeres [14]. Silencing *ZNF217* in ovarian cells suppresses the formation of cell colonies and invasion [15]. Finally, activation of the Akt pathway [14] and overexpression of the oncogenic translation elongation factor eEF1A2 [16] have been proposed to mediate *ZNF217* tumorigenic functions, but the precise molecular mechanisms involved in *ZNF217* pro-survival function are currently unknown.

This study aimed to decipher the contribution of *ZNF217* in cancer therapy response and to determine whether *ZNF217* is able to counteract apoptotic signals other than those induced by DNA damage stimuli. Taxanes are microtubule-stabilizing agents that, by interfering with spindle microtubule dynamics, cause cell cycle arrest and apoptosis. While paclitaxel is recognized as an extremely active chemotherapeutic agent in the treatment of early-stage or metastatic breast cancers, resistance to paclitaxel has become a major concern [17]. In this study, we investigated the functional consequences of aberrant *ZNF217* expression on breast cancer cell behavior. We found that *ZNF217* confers a highly proliferative and paclitaxel-resistant phenotype to MDA-MB-231 breast cancer cells. To decipher the molecular mechanisms likely responsible for such phenotype, we investigated the possible involvement of the ABCB1/Pgp transporter, of the intrinsic apoptotic pathway and of the oncogenic kinase Aurora-A.

## Results

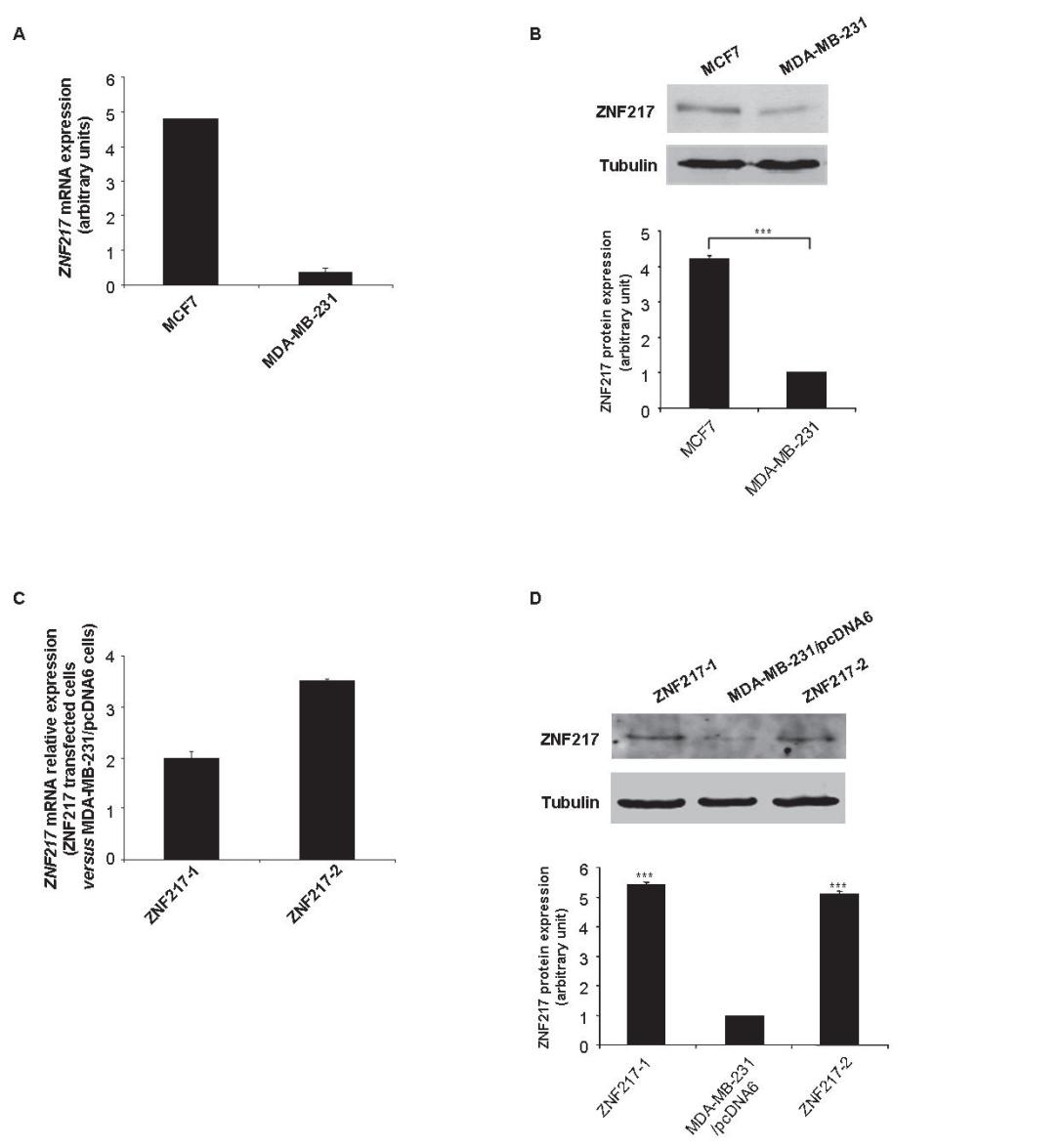
### Establishment of stable *ZNF217* transfectants of breast cancer cells

With the aim of selecting relevant breast cancer cell lines to study the impact of *ZNF217* expression on breast cancer cell phenotype, we analyzed *ZNF217* mRNA and *ZNF217* protein levels in MCF7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. As shown in Figures 1A and 1B, MCF7 and MDA-MB-231 cells possess, respectively, high and low endogenous *ZNF217* mRNA and protein levels. The high expression level of *ZNF217* in MCF7 cells is consistent with the amplification of the 20q13 region in these cells [4]. However, this correlation was more difficult to establish in MDA-MB-231 cells, as the 20q13 genomic status in these cells is controversial [18,19]. Given that MDA-MB-231 cells possess low endogenous levels of *ZNF217*, they were used to establish stable MDA-MB-231 cells constitutively overexpressing the *ZNF217* protein. After blasticidin selection, two cell clones overexpressing *ZNF217* mRNA and *ZNF217* protein (named *ZNF217*-1 and *ZNF217*-2), as well as a control cell clone transfected with the empty pcDNA6/V5-His vector (called MDA-MB-231/pcDNA6), were selected. *ZNF217* mRNA levels were respectively 2.0- and 3.5-fold greater in *ZNF217*-1 and *ZNF217*-2 cells

than in MDA-MB-231/pcDNA6 controls (Figure 1C). Accordingly, *ZNF217* protein expression was increased by 5.4- and 5.1-fold in *ZNF217*-1 and *ZNF217*-2 cells, respectively, as compared to controls (Figure 1D).

### Constitutive expression of *ZNF217* in MDA-MB-231 breast cancer cells promotes cell proliferation *in vitro* and tumor growth *in vivo*

By performing a BrdU incorporation assay (measurement of the proportion of cells entering S phase), we found that the constitutive expression of *ZNF217* led to a significant increased proliferation of both *ZNF217*-1 and *ZNF217*-2 cells, compared to MDA-MB-231/pcDNA6 controls (Figure 2A). The ability of *ZNF217* clones to proliferate more rapidly was correlated with the overexpression of Cyclin D1, Cyclin E1, Cyclin E2 and Cyclin A2 proteins, as assessed by western-blot analysis (Figure 2B). Using two siRNA molecules (-A and -B) that both specifically promote the knock-down of *ZNF217* expression at the mRNA (data not shown) and protein levels in MDA-MB-231/pcDNA6 and *ZNF217*-1 cells (Figures 3A and 3B), we could establish that *ZNF217* plays a direct role in conferring stimulation of cell proliferation. Indeed, transient transfections with the two *ZNF217*-targeted siRNAs led to a significant decrease in cell proliferation both in MDA-MB-231/pcDNA6 control cells (Figure 3C) and in *ZNF217*-overexpressing cells *ZNF217*-1 (Figure 3D). Again, when targeting the high endogenous levels of *ZNF217* present in MCF7 cells, a similar cytostatic activity could be obtained with the siRNAs -A and -B (Figures 3E and 3F). Interestingly, the most potent cytostatic effect was observed in the presence of siRNA-B which was able to induce complete knock-down of *ZNF217* protein expression, while siRNA-A, which promotes an intermediate knock-down of *ZNF217* protein, led to an intermediate but still significant decrease in cell proliferation (Figures 3E and 3F). Taken together, these data suggest that: (i) even though breast cancer cells possess low *ZNF217* levels, knock-down of *ZNF217* endogenous protein expression dramatically affects their proliferation (Figures 3C and 3F); (ii) the negative regulation of cell proliferation observed with decreased levels of *ZNF217* is exerted in a dose-dependent manner (Figure 3F). Finally, we examined whether the constitutive expression of *ZNF217* in MDA-MB-231 cells would affect their growth in nude mice. To address this question, xenografts were established by injecting MDA-MB-231/pcDNA6 control cells or *ZNF217*-1 cells into the mammary fat pads of female nude mice. A significant increase in tumor growth was observed in mice injected with *ZNF217*-1 cells as compared with those receiving control cells (Figure 4A). Western-blot analysis of



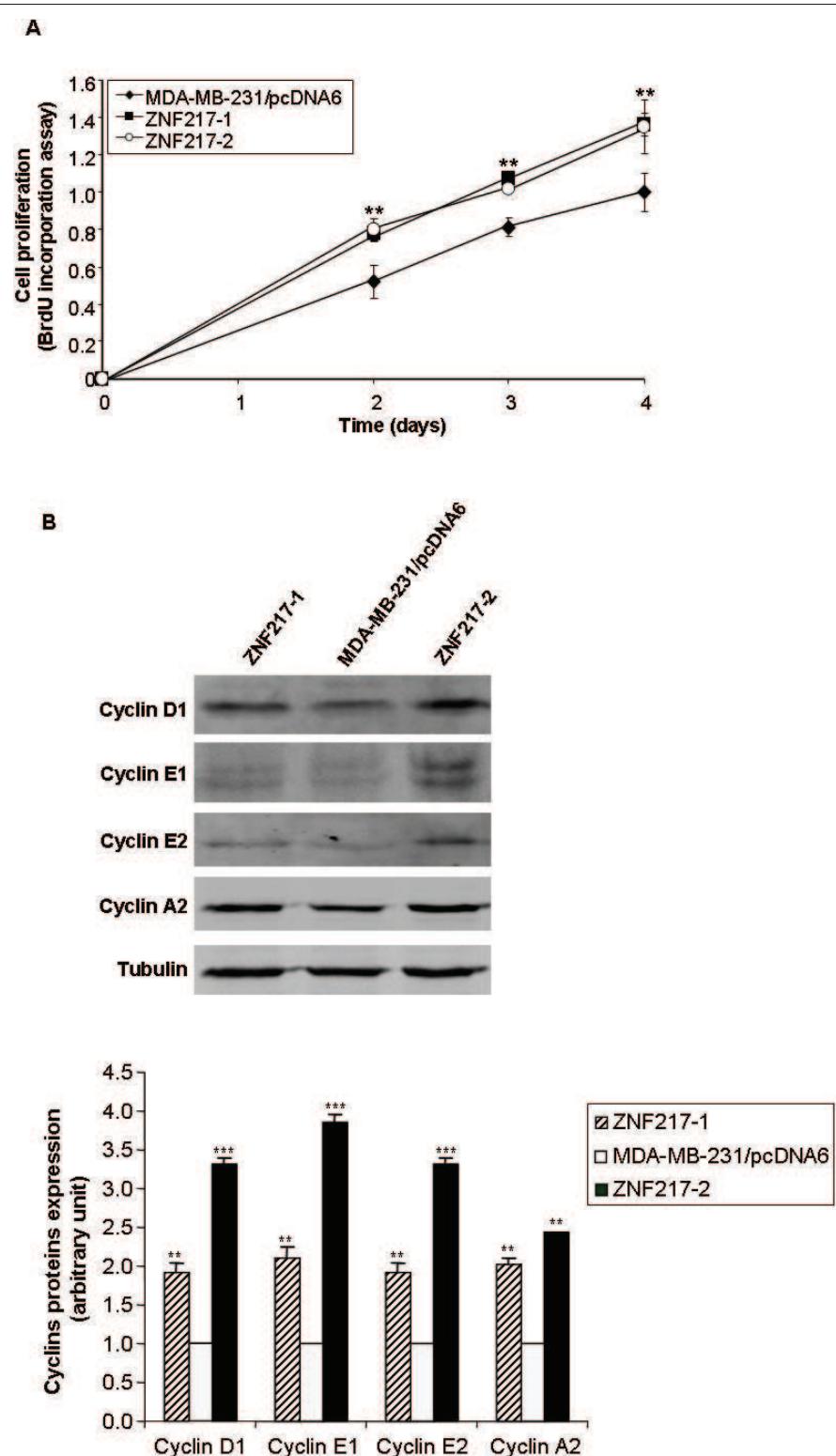
**Figure 1 ZNF217 expression in MCF7, MDA-MB-231 and pcDNA6/V5-His-ZNF217-transfected MDA-MB-231 cells.** (A) ZNF217 mRNA expression was analyzed by RTQ-PCR in MCF7 and MDA-MB-231 cells (means  $\pm$  s.d. of three independent experiments). (B) western-blots analysis of ZNF217 in MCF7 and MDA-MB-231 cell lines. Histograms represent quantification of protein expression levels normalized to tubulin expression (means  $\pm$  s.d. of three independent experiments). \*\*\*,  $P < 0.001$  (Student's t-test). (C) The same as (A) in ZNF217-overexpressing MDA-MB-231 cells, ZNF217-1 and ZNF217-2. (D) The same as (B) in ZNF217-1, ZNF217-2 and in control MDA-MB-231/pcDNA6 cells.

protein lysates collected from xenografts confirmed the high expression levels of both ZNF217 and Cyclin D1 in ZNF217 tumors (Figure 4B).

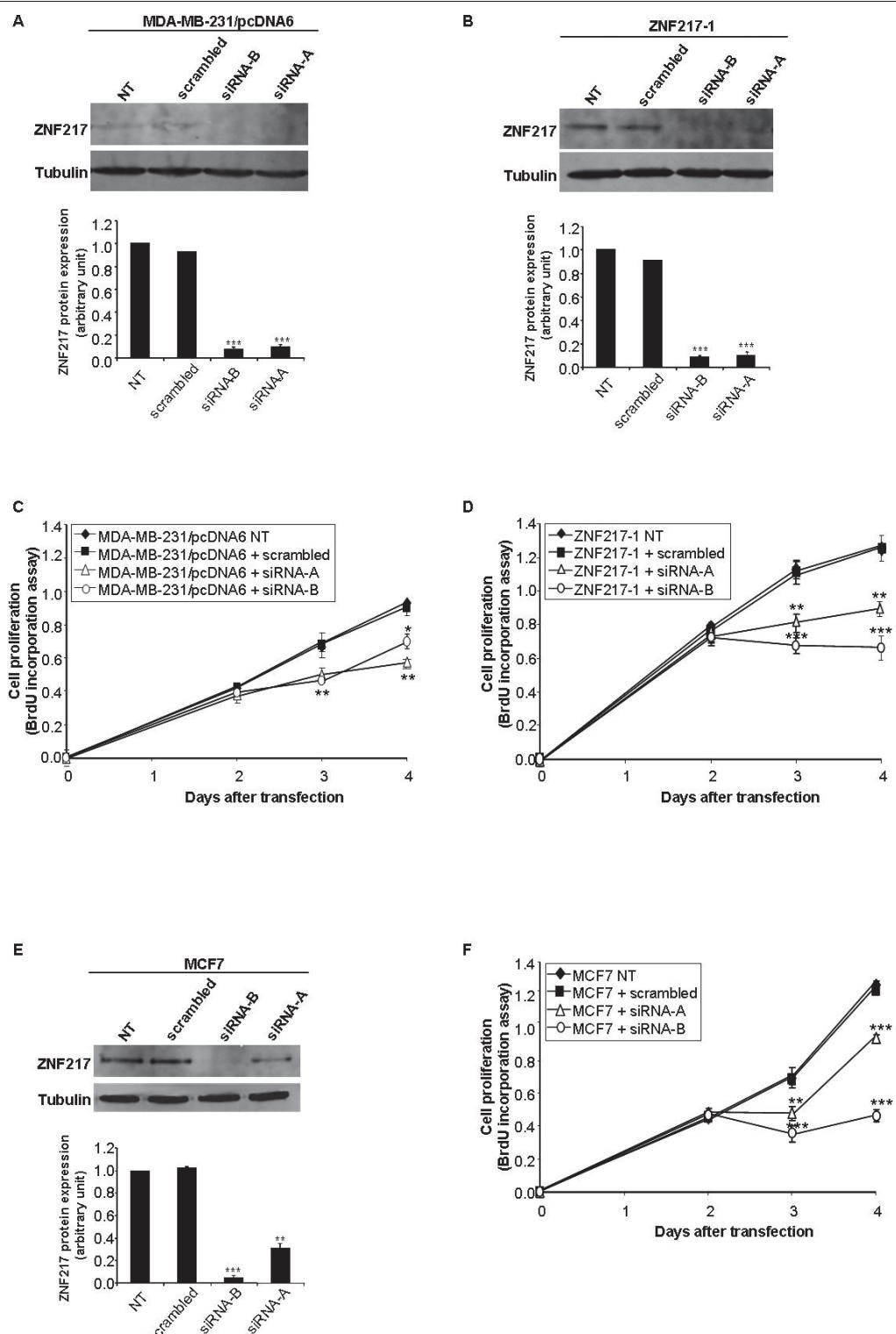
#### ZNF217 overexpression confers paclitaxel resistance in MDA-MB-231 cells

To test whether ZNF217 alters response to chemotherapy, we performed dose-response experiments (cytotoxicity assay) to measure IC<sub>50</sub> values under two cytotoxic stimuli: paclitaxel and gemcitabine. Strikingly, constitutive expression of ZNF217 led to significant increased

cell viability in the presence of the microtubule-stabilizing agent paclitaxel (Figure 5A), with a relative resistance of 7.5- and 12-fold, respectively, for ZNF217-1 and ZNF217-2 cells ( $IC_{50,MDA-MB-231/pcDNA6} = 6.5 \pm 1.4 \times 10^{-10}$  M,  $IC_{50,ZNF217-1} = 4.9 \pm 1.7 \times 10^{-9}$  M,  $IC_{50,ZNF217-2} = 7.8 \pm 0.6 \times 10^{-9}$  M). Interestingly, MCF7 cells, which possess high endogenous levels of ZNF217, displayed lower sensitivity to paclitaxel ( $IC_{50,MCF7} = 2.2 \pm 0.7 \times 10^{-7}$  M) than MDA-MB-231/pcDNA6 cells (Figure 5B). Moreover, the knock-down of ZNF217 expression in MCF7 cells by transient transfections with

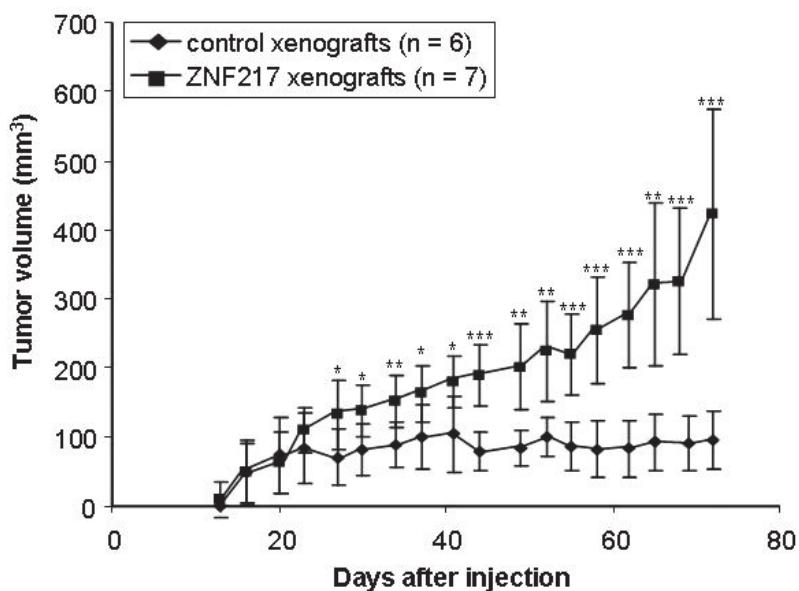


**Figure 2 Constitutive expression of ZNF217 stimulates cell proliferation *in vitro*.** (A) Cell proliferation was assessed at different time points by BrdU labeling (means  $\pm$  s.d. of three independent experiments). \*\*,  $P < 0.01$  versus MDA-MB-231/pcDNA6 cells (Student's t-test). (B) Western-blots analysis of Cyclin D1, Cyclin E1, Cyclin E2 and Cyclin A2. Histograms represent quantification of protein expression levels normalized to tubulin expression (means  $\pm$  s.d. of three independent experiments). \*\*,  $P < 0.01$  and \*\*\*,  $P < 0.001$  versus MDA-MB-231/pcDNA6 cells (Student's t-test).

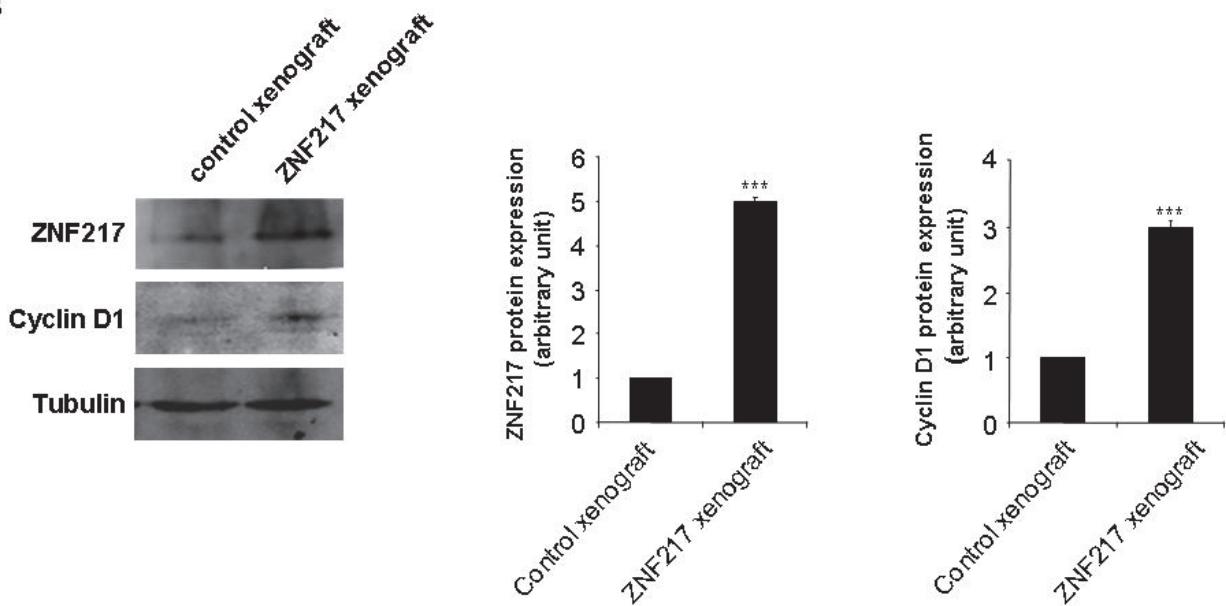


**Figure 3** Decreased levels of ZNF217 negatively regulates cell proliferation in vitro. (A) Western-blot analysis of ZNF217 expression in non-transfected (NT) or transfected MDA-MB-231/pcDNA6 cells with either scrambled RNA, siRNA-B or siRNA-A. Histograms represent quantification of protein expression levels normalized to tubulin expression (means  $\pm$  s.d. of three independent experiments). (B) the same as (A) using the ZNF217-1 cell line. (C) Cell proliferation of non-transfected (NT) or transfected MDA-MB-231/pcDNA6 cells with either scrambled RNA, siRNA-B or siRNA-A as assessed by BrdU test. (D) the same as (C) using the ZNF217-1 cell line. (E) and (F) respectively the same as (A) and (C) using MCF7 cells. \*, P < 0.05, \*\*, P < 0.01 and \*\*\*, P < 0.001 versus cells transfected with scrambled RNA (Student's t-test).

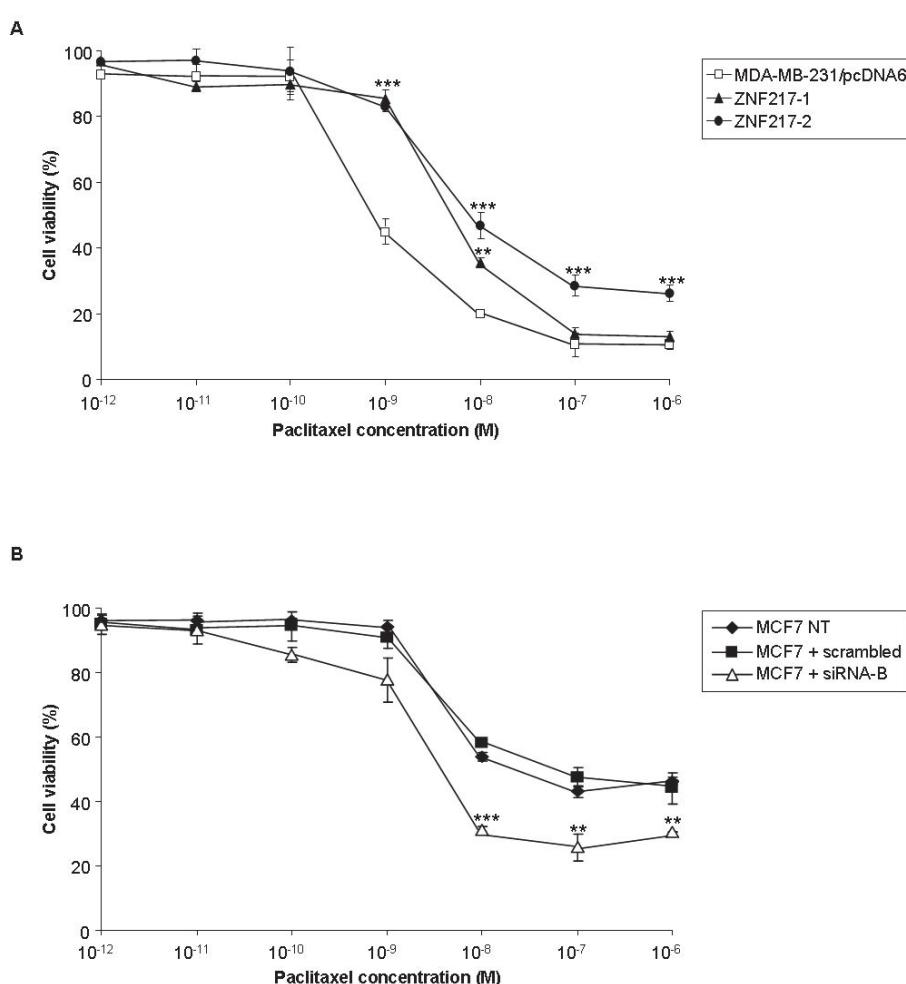
A



B



**Figure 4 Constitutive expression of ZNF217 stimulates tumor growth *in vivo*.** (A) Growth curves of control xenografts (n = 6) and ZNF217 xenografts (n = 7) in nude mice. Data are presented as means  $\pm$  s.d. of tumor volumes. \*, P < 0.05, \*\*, P < 0.01 and \*\*\*, P < 0.001 (Student's t-test). (B) Representative total protein extracts from control and ZNF217 xenografts were analyzed by western-blot with anti-ZNF217 and anti-Cyclin D1 antibodies. Histogram represents quantification of protein expression levels normalized to tubulin expression (means  $\pm$  s.d. of three independent experiments). \*\*\*, P < 0.001 (Student's t-test).

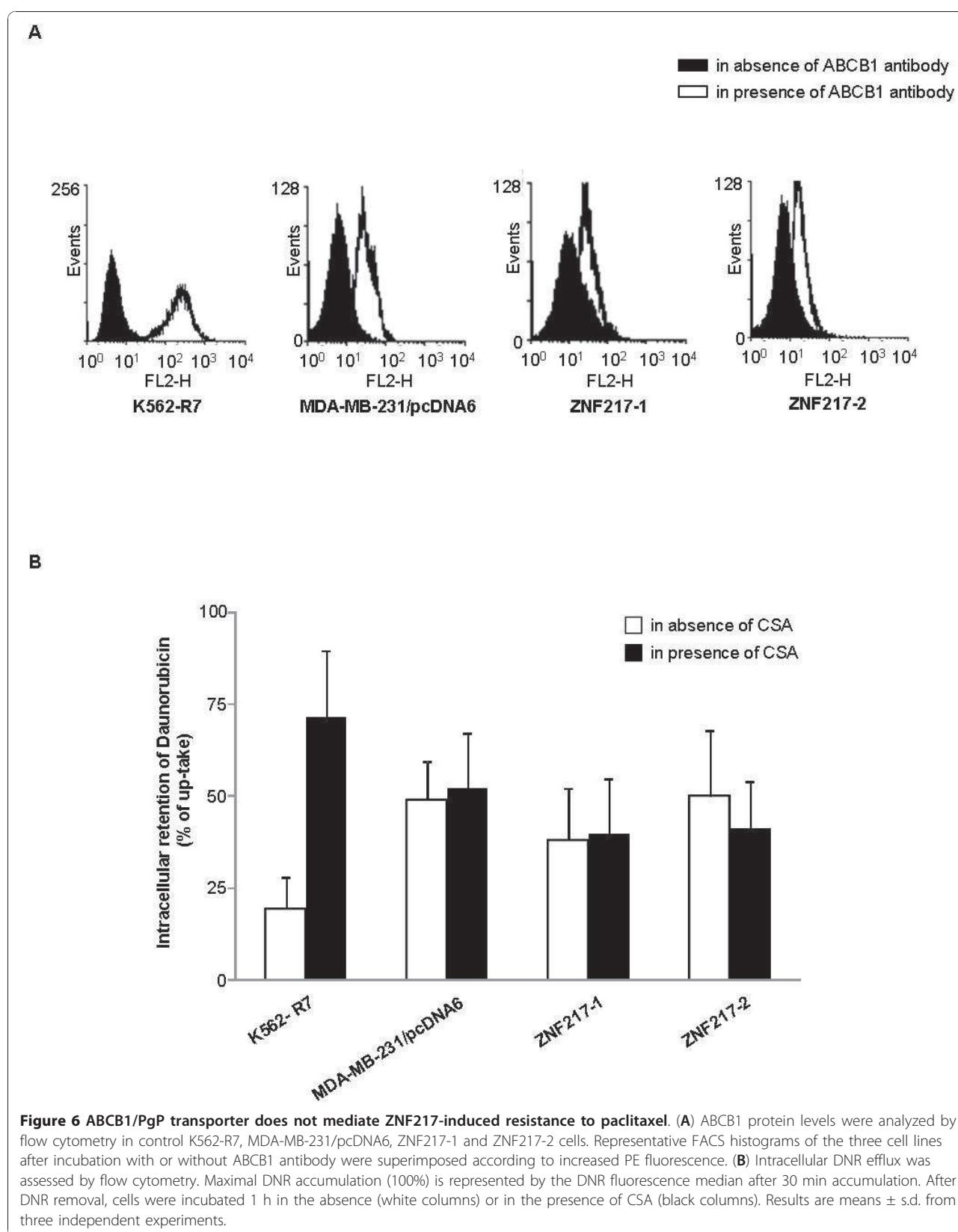


**Figure 5** ZNF217 expression induces resistance to paclitaxel. Cell viability of (A) MDA-MB-231/pcDNA6, ZNF217-1 and ZNF217-2 cells and (B) non-transfected (NT) or transfected MCF7 cells with either scrambled RNA or siRNA-B was assessed by cytotoxicity assay (means  $\pm$  s.d. from three independent experiments). \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$  (Student's t-test).

siRNA-B conferred increased sensitivity to paclitaxel ( $IC_{50}$ <sub>siRNA-B-transfected MCF7</sub> =  $4 \pm 0.7 \times 10^{-9}$  M,  $IC_{50}$ <sub>scrambled-transfected MCF7</sub> =  $2.2 \pm 0.7 \times 10^{-7}$  M) (Figure 5B). These data suggest that ZNF217 is able to modulate the cellular response to paclitaxel and that the constitutive expression of ZNF217 supports the survival of MDA-MB-231 cells in response to this microtubule-stabilizing molecule. In contrast, no significant difference in gemcitabine response could be observed between ZNF217-overexpressing cells and controls (data not shown). Finally, paclitaxel resistance could also be observed in an additional breast cancer cell line (MDA-MB-453) stably transfected with ZNF217 when compared to control cells (data not shown), suggesting that the paclitaxel-resistant phenotype developed by ZNF217-overexpressing cells occurs in different breast cancer cell lines.

#### ABCB1/PgP transporter is not involved in the paclitaxel resistance developed by ZNF217-overexpressing cells

Cancer cells frequently exhibit multidrug resistance mediated by ATP-binding cassette (ABC) membrane proteins. The ABCB1/PgP protein efficiently transports taxanes and its overexpression induces resistance to paclitaxel [20]. We thus evaluated ABCB1 expression levels and transport capabilities in MDA-MB-231/pcDNA6 controls, ZNF217-1 and ZNF217-2 cells. Very low and similar ABCB1 endogenous expression levels were detected in all three cell lines, while it was strongly detected in K562-R7 ABCB1-positive control cells (Figure 6A). To evaluate ABCB1 transport capabilities, we then used a standard test that investigates the efflux of daunorubicin (DNR), a well-known fluorescent substrate of ABCB1 that binds to the same binding sites as paclitaxel on the transporter [21-24]. Inhibitors such as



cyclosporin A (CSA), a reference ABC transporter inhibitor, reduce DNR efflux in cells that have an active mechanism for the outward transport of the drug [24]. We confirmed that CSA was able to strongly block DNR efflux in K562-R7 ABCB1-positive cells (Figure 6B). DNR intracellular levels were similarly decreased in MDA-MB-231/pcDNA6, ZNF217-1 and ZNF217-2 cells after a 1 h efflux period, thus revealing no difference between the three cell lines. Moreover, as DNR intracellular levels were not altered in the presence of CSA, CSA-insensitive elimination processes were probably responsible for the DNR efflux observed in the three cell lines. Since both ABCB1 was weakly expressed in cells and DNR efflux was not modified by CSA, our data strongly suggest that ABCB1 was not involved in the paclitaxel-resistance mechanisms developed by ZNF217-overexpressing MDA-MB-231 cells.

#### **Paclitaxel-induced apoptotic activity is altered in ZNF217-overexpressing MDA-MB-231 cells**

As paclitaxel has been shown to induce apoptosis in several cell lines in a dose-dependent manner [25,26], we investigated the impact of ZNF217 expression on paclitaxel pro-apoptotic signals. We confirmed that paclitaxel was able to elicit cell death in MDA-MB-231/pcDNA6 cells in a dose-dependent manner (10 nM and 100 nM paclitaxel induced apoptosis in respectively 45.1% and 69.6% of the cells, Figure 7A). In ZNF217-overexpressing cells, no decreased spontaneous cell death could be observed at basal level compared to control cells (Figure 7A), in contrast to results reported by Huang and collaborators in ZNF217-overexpressing HeLa cells [14] and no significant difference could be observed between the three cell lines (Figure 7A). However, 10 nM and 100 nM paclitaxel strikingly elicited a significant lower apoptotic response in ZNF217-overexpressing cells than in controls (Figure 7A). As the maximum paclitaxel-induced apoptotic response was observed with 100 nM paclitaxel, this dose was chosen for further investigations. Measurement of caspase 3 activity also provided evidence that apoptotic pathways were significantly less activated in ZNF217-1 and ZNF217-2 cells than in control cells (Figure 7B). Supporting data showed that, in MDA-MB-231/pcDNA6 controls, 100 nM paclitaxel induced cleavage of the PARP protein which was only faintly detectable in ZNF217-1 cells and absent in ZNF217-2 cells (Figure 7C). Finally, transient transfection of MCF7 cells with a ZNF217-targeted siRNA (compared to scrambled control RNA) led to a significant increase in caspase 3 activity on paclitaxel treatment (Figure 7D), suggesting that the knock-down of ZNF217 expression in MCF7 cells confers increased sensitivity to paclitaxel pro-apoptotic signals. Altogether, these data suggest that

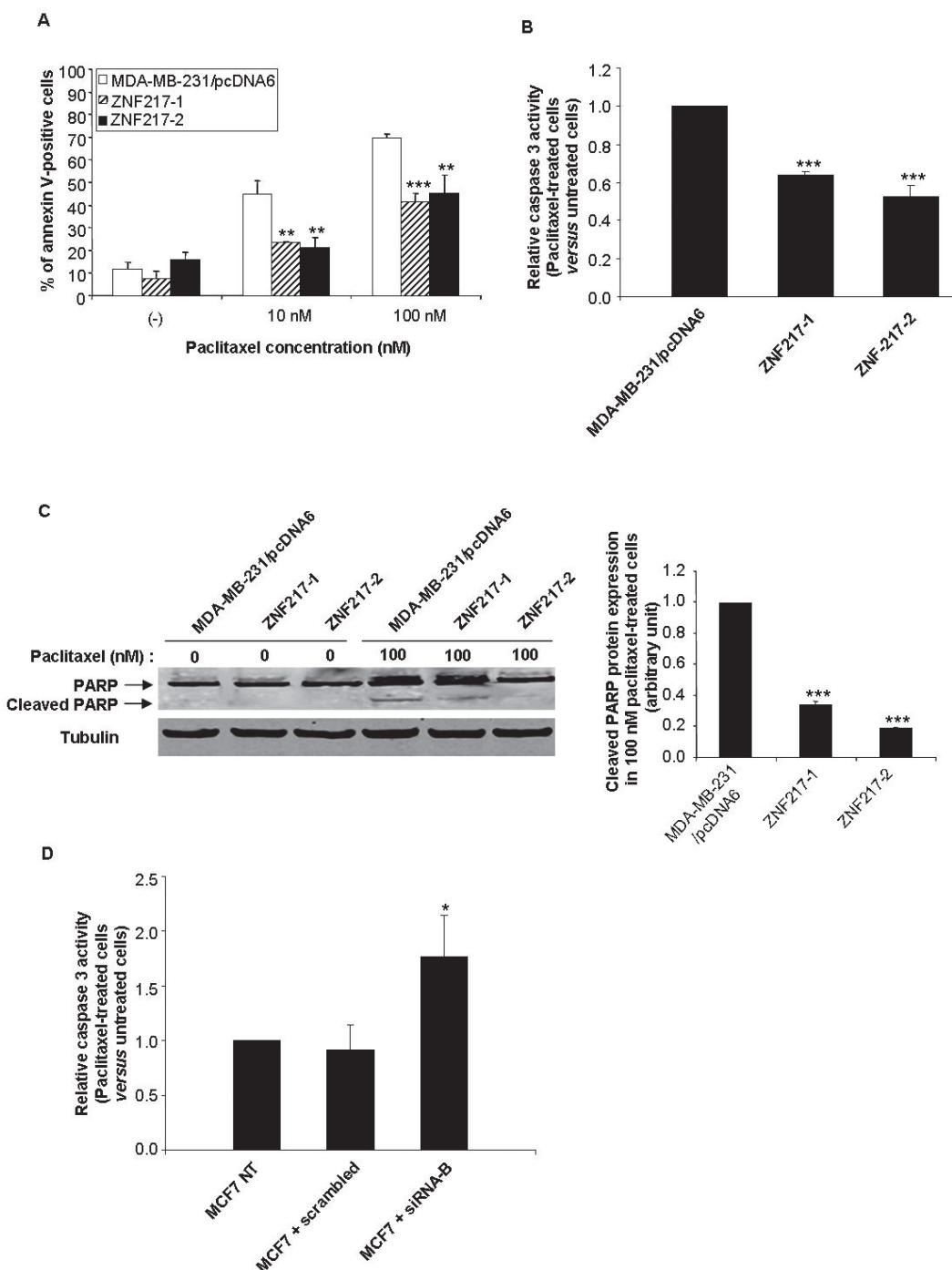
constitutive ZNF217 expression confers resistance to paclitaxel-mediated apoptosis.

#### **Acquired resistance to paclitaxel in ZNF217-overexpressing cells is mediated by alterations of proteins of the Bcl-2 family implicated in the mitochondrial apoptosis pathway**

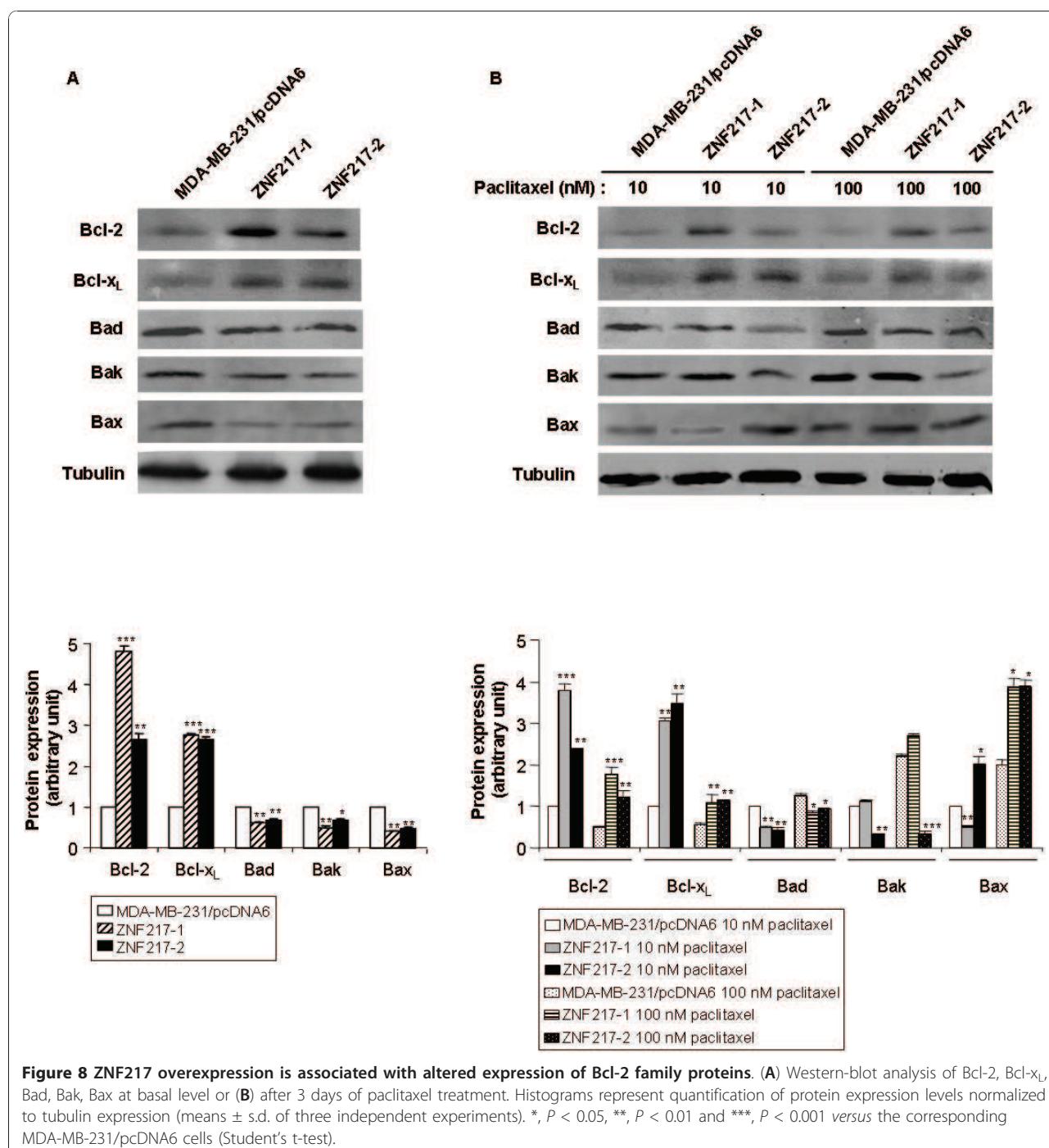
In breast cancer cells that acquired resistance to paclitaxel, it has been recently demonstrated that the mitochondrial (intrinsic) apoptosis pathway controlled by Bcl-2 protein family members is crucial for causing such resistance [27]. We thus examined whether changes in the mitochondrial apoptotic pathway were selected for in ZNF217-overexpressing cells. Because we were interested by permanent changes established under constitutive expression of ZNF217, we first evaluated the effect of ZNF217 on the levels of several Bcl-2 family proteins. In the two ZNF217-overexpressing cell lines studied, we observed a constitutive overexpression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub> and an under-expression of the pro-apoptotic proteins Bad, Bak and Bax (Figure 8A), as compared to MDA-MB-231/pcDNA6 controls. Moreover, as shown in Figure 8B, treatment with 10 nM or 100 nM paclitaxel was still associated with the over-expression of Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub> and the down-regulation of Bad in both ZNF217-1 and ZNF217-2 cell lines. The persistence of the deregulated expression levels observed for Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> and Bad under paclitaxel exposure was less obvious for Bak and Bax proteins, as it depended on the paclitaxel dose and on the ZNF217-overexpressing clone considered. Taken together, these results indicate that the resistance to paclitaxel displayed by ZNF217-overexpressing cells might be promoted by deregulations of the intrinsic apoptosis pathway through aberrant expression of several members of the Bcl-2 family.

#### **Increased protein expression of the Aurora kinase A/AURKA/STK15 is correlated with constitutive expression of ZNF217 and ZNF217-mediated paclitaxel resistance is reversed in the presence of an Aurora-A inhibitor**

Since high expression levels of Aurora-A have been associated with increased taxane resistance in breast cancer and with resistance to taxol-mediated apoptosis in breast cancer cell lines [28,29], we investigated Aurora-A expression levels in our cellular models. Strikingly, high protein expression levels of Aurora-A could be detected in the two ZNF217-overexpressing cell lines (Figure 9A) and in ZNF217 xenografts (Figure 9B). ZNF217 was demonstrated to play a direct role in Aurora-A overexpression, as transient transfections with a ZNF217-targeted siRNA led to a significant decrease in Aurora-A protein expression both in ZNF217-1 and in MCF7 cells (that possess naturally high endogenous levels of ZNF217) (Figure 9C). As ZNF217 has been

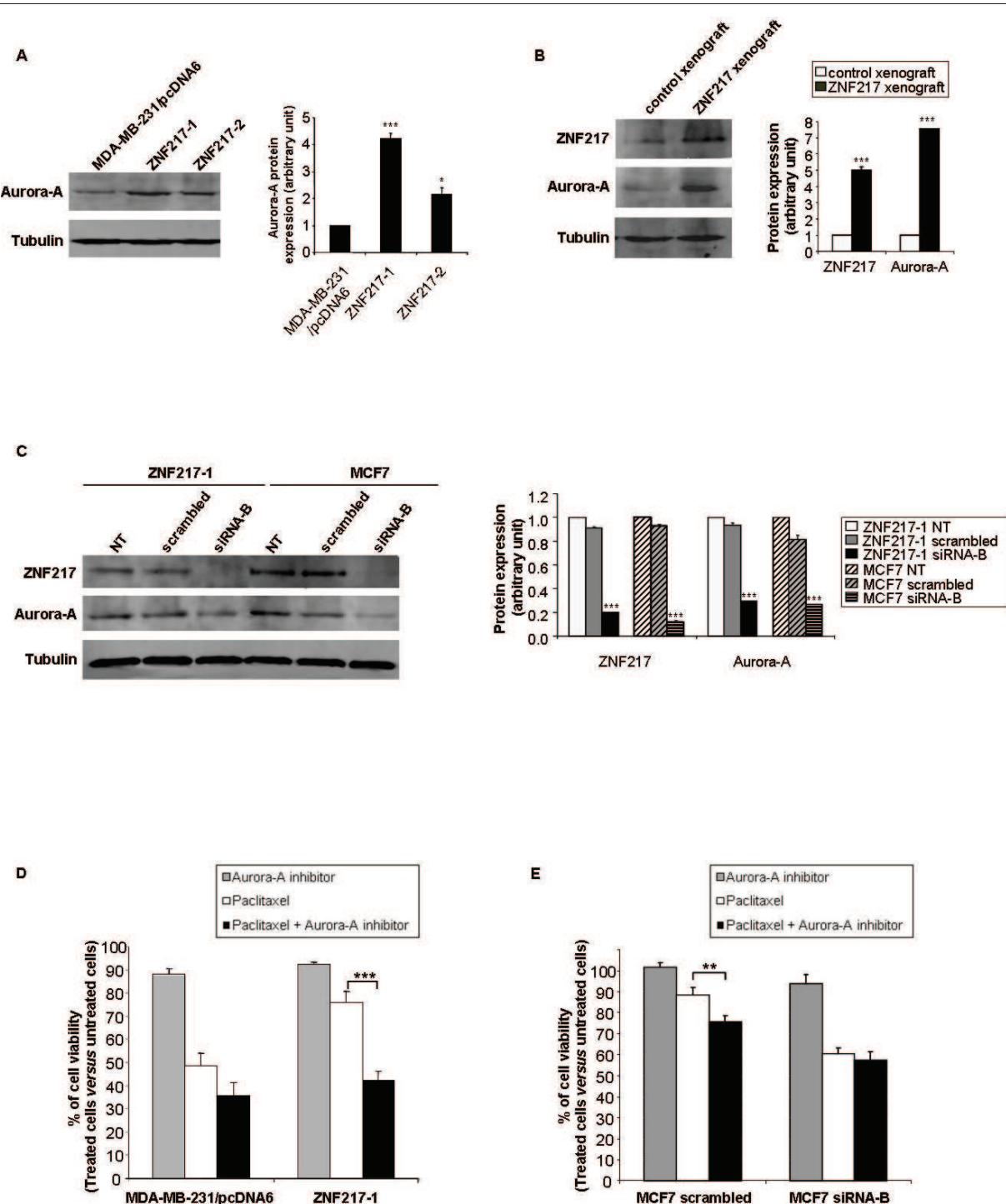


**Figure 7** ZNF217 overexpression alters paclitaxel-induced apoptosis. **(A)** MDA-MB-231/pcDNA6, ZNF217-1 and ZNF217-2 cells were untreated (-) or treated with 10 or 100 nM paclitaxel, stained with Annexin-V-Fluos and propidium iodide and analyzed by flow cytometry (means  $\pm$  s.d. from three independent experiments). \*\*,  $P < 0.01$  and \*\*\*,  $P < 0.001$  versus the corresponding MDA-MB-231/pcDNA6 cells (Student's t-test). **(B)** MDA-MB-231/pcDNA6, ZNF217-1 and ZNF217-2 cells were treated with 100 nM paclitaxel. Caspase 3 activity was assessed (means  $\pm$  s.d. from three independent experiments). \*\*\*,  $P < 0.001$  versus MDA-MB-231/pcDNA6 cells (Student's t-test). **(C)** Western-blot analysis of PARP cleavage in response to 100 nM paclitaxel. Histogram represents quantification of the cleaved PARP in 100 nM paclitaxel-treated cells and tubulin expression was used for normalization (means  $\pm$  s.d. of three independent experiments). \*\*\*,  $P < 0.001$  versus paclitaxel-treated MDA-MB-231/pcDNA6 cells (Student's t-test). **(D)** Non-transfected (NT) or transfected MCF7 cells with either scrambled RNA or siRNA-B were treated with 100 nM paclitaxel. Caspase 3 activity was assessed (means  $\pm$  s.d. from three independent experiments). \*,  $P < 0.05$  versus MCF7 cells transfected with scrambled RNA (Student's t-test).



identified as a transcription factor, we explored by RTQ-PCR *AURKA* transcript levels in MDA-MB-231/pcDNA6, ZNF217-1, and ZNF217-2 cells, but we did not find any difference between the three cell lines (data not shown). This suggests that the ZNF217-mediated aberrant expression of Aurora-A is probably controlled by a post-transcriptional mechanism.

With the aim to decipher whether Aurora-A is involved in the paclitaxel resistance developed by the ZNF217-overexpressing cells, we then sought to investigate the impact of an Aurora-A kinase inhibitor on paclitaxel response. The Aurora kinase inhibitor III is a compound known to act as an ATP-competitive and potent inhibitor of Aurora-A (Merck). This inhibitor



**Figure 9** ZNF217 modulates Aurora-A protein expression and ZNF217-mediated paclitaxel resistance is reversed by an Aurora-A inhibitor. Western-blot analysis of Aurora-A expression in (A) MDA-MB-231/pcDNA6, ZNF217-1 and ZNF217-2 cells, (B) in representative control and ZNF217 xenograft cells, (C) in ZNF217-1 or MCF7 cells transfected or not (NT) with either scrambled RNA or siRNA-B. (A), (B) and (C) Histograms represent quantification of protein expression levels normalized to tubulin expression (means  $\pm$  s.d. of three independent experiments). \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$  (Student's t-test). (D) The viability of MDA-MB-231/pcDNA6 and ZNF217-1 cells treated with 5  $\mu$ M Aurora-A kinase inhibitor III, 2.5 nM paclitaxel or a combination of both was assessed by cytotoxicity assay (means  $\pm$  s.d. from three independent experiments). \*\*\* $P < 0.001$  (Student's t-test). (E) MCF7 cells transfected with either scrambled RNA or siRNA-B were treated with 1  $\mu$ M Aurora-A kinase inhibitor III, 2.5 nM paclitaxel or a combination of both. Cell viability was assessed by cytotoxicity assay (means  $\pm$  s.d. from three independent experiments). \*\* $P < 0.01$  (Student's t-test).

(5 μM) exerted a weak and similar inhibitory effect (~10%) on viability of both MDA-MB-231/pcDNA6 and ZNF217-1 cells (Figure 9D). In control MDA-MB-231/pcDNA6 cells, combining 5 μM Aurora-A kinase inhibitor with paclitaxel led to an additive inhibitory effect of the two molecules on cell viability (51.5% inhibition under paclitaxel exposure and 63.6% inhibition when combining the Aurora-A kinase inhibitor with paclitaxel). Strikingly, in ZNF217-1 cells, combining 5 μM Aurora-A kinase inhibitor with paclitaxel potentialized paclitaxel cytotoxic effect (Figure 9D, 57% of inhibition of cell viability in Aurora-A kinase inhibitor- and paclitaxel-treated ZNF217-1 cells compared to 24% inhibition of cell viability in paclitaxel-treated ZNF217-1 cells,  $P < 0.001$ ), and induced a pharmacological response close to that of control paclitaxel-treated MDA-MB-231/pcDNA6 cells. We next investigated the impact of the Aurora-A kinase inhibitor on paclitaxel response in MCF7 cells transfected with either a ZNF217-targeted siRNA or scrambled RNA (Figure 9E). In MCF7 cells transiently transfected with scrambled control RNA (*i.e.* still possessing high endogenous levels of ZNF217), combining the Aurora-A kinase inhibitor with paclitaxel led to an additive inhibitory effect on cell viability, as observed in ZNF217-overexpressing MDA-MB-231 cells (Figure 9D). More interestingly, combining paclitaxel with the Aurora-A inhibitor in MCF7 cells transiently transfected with a ZNF217-targeted siRNA induced no significant alteration of cell viability (as observed in the control MDA-MB-231/pcDNA6 cells that possess low endogenous levels of ZNF217, Figure 9D). Taken together, these data strongly suggest that the impact of the Aurora-A inhibitor on paclitaxel response is clearly associated with ZNF217 expression levels. Therefore Aurora-A is certainly part of the mechanism by which ZNF217 controls resistance to paclitaxel, and the use of a potent Aurora-A inhibitor could be sufficient to reverse ZNF217-mediated paclitaxel resistance in MDA-MB-231 breast cancer cells.

## Discussion

It has been shown that ZNF217 is able to immortalize human mammary epithelial cells, to overcome senescence and to attenuate apoptotic signals emanating from DNA damage after doxorubicin exposure or from functionally compromised telomeres [7,14]. The precise mechanisms involved in ZNF217 pro-survival function are currently unknown, and it is thus of utmost importance to decipher the role of ZNF217 in response to cancer therapy.

In this study, we provide evidence that ectopic expression of ZNF217 in MDA-MB-231 breast cancer cells is associated with a highly proliferative phenotype, as constitutive expression of ZNF217 stimulates breast cancer

cell proliferation *in vitro* and tumor growth *in vivo* in association with aberrant expression of several cyclins. We have also found that high expression levels of ZNF217 in MDA-MB-231 breast cancer cells promote strong resistance (~10-fold) to the microtubule-stabilizing molecule paclitaxel, while no resistance to the nucleoside analogue gemcitabine is concomitantly developed. In accordance with the previous observation that overexpression of ZNF217 decreases doxorubicin-induced cell death in cervical (HeLa) and breast (HBL100) cancer cell lines [14], the two ZNF217-overexpressing MDA-MB-231 cell lines studied also displayed a ~2.3-fold relative resistance to the topoisomerase inhibitor doxorubicin (data not shown). Our data suggest, firstly, that the chemoresistance mediated by ZNF217 is drug-specific and, secondly, that the molecular mechanisms involved in paclitaxel response are probably more sensitive to the ZNF217-mediated protective action than those involved in response to doxorubicin.

After pointing out that the ABCB1 transporter, known to be involved in taxane and doxorubicin transport, is not responsible for the resistant phenotype developed by ZNF217-overexpressing cells, we aimed to determine which molecular mechanisms are involved in the ZNF217-mediated phenotype. A critical determinant in cellular responses to cytotoxic drugs is the ease with which tumor cells undergo apoptosis [30]. The two major apoptotic pathways rely on either signals transduced through death receptors or signals from mitochondria. Both pathways are involved in the activation of a cascade of caspases, and caspase 3 is a major executioner caspase that cleaves substrates such as PARP, resulting in caspase-dependent apoptosis [31]. In this study, we found that ZNF217 attenuates the apoptotic signals induced by paclitaxel, in association with decreased caspase 3 activity and PARP cleavage. More interestingly, ZNF217-mediated protective effects were associated with alterations in the intrinsic mitochondrial apoptosis pathway, as demonstrated by the deregulation of the balance between pro- and anti-apoptotic members of the Bcl-2 family. Indeed, in both ZNF217-1 and ZNF217-2 cells, high constitutive expression levels of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub> and low constitutive expression levels of the pro-apoptotic proteins Bad, Bax and Bak were detected. Since ectopic overexpression of Bcl-2 or Bcl-x<sub>L</sub> is necessary to confer resistance to paclitaxel-induced apoptosis [32] and ectopic overexpression of Bad or Bax have been shown to enhance paclitaxel-induced apoptosis [33], our data strongly suggest that acquisition of aberrant expression of several members of the Bcl-2 family may be part of the mechanisms developed by ZNF217-1 and ZNF217-2 cells to counteract paclitaxel-induced apoptotic signals.

The p53 pathway has been suggested to be involved in ZNF217 functions [14], but the ZNF217-driven survival phenotype observed in this study is p53-independent, given that MDA-MB-231 cells possess a non functional mutated p53.

Aurora-A, a serine/threonine kinase located at the centrosome, is overexpressed in 10-60% of breast cancers [29], functions as a pro-survival protein that promotes tumor cell proliferation, counteracts apoptosis and induces drug resistance in tumor cells [29,34]. Indeed, Aurora-A overexpression has been associated in cancer cells with spindle checkpoint dysfunction, increased resistance to paclitaxel and docetaxel [28,29], increased expression of Bcl-2 [34] or of Bcl-x<sub>L</sub> [35]. Conversely, Aurora kinase inhibitors synergize with paclitaxel to induce apoptosis in ovarian cancer cells [36]. In this study, we show for the first time that ZNF217 modulates Aurora-A expression, probably at a post-transcriptional level. Post-transcriptional mechanisms such as phosphorylation-dephosphorylation events [37] or ubiquitin-dependent proteolysis [38,39] have been shown to regulate the protein levels of Aurora-A and to play an important role in the functions of this protein [40-42]. Thus ZNF217 may modulate Aurora-A protein turn-over (synthesis or degradation) by still unknown mechanisms. We also newly demonstrated that treatment with a potent Aurora-A kinase inhibitor is able to reverse paclitaxel resistance in ZNF217-over-expressing breast cancer cells. Altogether, these data strongly suggest that the oncogenic Aurora-A kinase could represent a key actor of ZNF217-mediated effects. Finally, as observed for most of kinase inhibitors, the Aurora kinase inhibitor III is also able to target (but at higher concentrations) the activities of other kinases (Lck, Bmx, IGF-1R and Syk). Thus, one cannot exclude that these kinases could also be involved in ZNF217-mediating effects.

Since the *AURKA* gene is located, like the *ZNF217* gene, at 20q13, a region frequently amplified in human cancers, our finding is of particular interest for several reasons. Our data suggest that two known oncogenes, ZNF217 and Aurora-A, may cooperate in breast neoplastic progression and chemoresistance, thus revealing a possible mechanism by which ZNF217 exerts its oncogenic and protective effects. The positive control of ZNF217 on Aurora-A could induce a self-reinforcing amplification of the effect of high levels of ZNF217 expression and/or of increased *ZNF217* copy number. As 20q13 amplified breast tumors can either display *ZNF217* amplification only or both *ZNF217* and *AURKA* amplifications [5], one of the mechanisms of breast neoplastic progression could involve the cooperation between the two proteins, either through genomic

co-amplification or through ZNF217-mediated regulation of Aurora-A protein expression.

## Conclusions

This study demonstrates that ZNF217 counteracts apoptotic signals other than those induced by DNA damage stimuli [14], and that the protective effects of ZNF217 are associated with constitutive alterations in the balance of Bcl-2 proteins and with constitutive aberrant overexpression of Aurora-A. Given that ZNF217 amplifications have been detected in 8-29% of breast cancers [1] and that high ZNF217 expression levels are not necessarily correlated to increased ZNF217 gene copy numbers in breast cancer cells [4,5,10], increased protein expression of ZNF217 could represent a new mechanism by which breast cancer cells without *ZNF217* gene amplification become resistant to paclitaxel. Most importantly, our data suggest that clinical strategies counteracting ZNF217-mediated effects, either by targeting ZNF217 directly and/or by targeting its possible key-mediators like Aurora-A, would be a valuable approach for the management of breast cancer.

## Materials and methods

### Cell culture

MCF7 and MDA-MB-231 breast cancer cells were purchased from ATCC and grown according to recommendations in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Cergy Pontoise, Paris). The identity of MDA-MB-231 cells was confirmed by genomic DNA sequencing (*KRAS* and *TP53* genes) and that of MCF7 cells by their estrogen receptor and progesterone receptor status.

### MDA-MB-231-ZNF217 stable transfectants

The full-length *ZNF217* cDNA was obtained by adding the missing cDNA sequence, corresponding to the last 6 C-terminal amino acids of the ZNF217 protein, to the pEGFP-N1-ZNF217 plasmid provided by C. Collins, then subcloned into the pcDNA6/V5-His plasmid (Invitrogen) (pcDNA6/V5-His-ZNF217). MDA-MB-231 breast cancer cells were stably transfected with pcDNA6/V5-His or pcDNA6/V5-His-ZNF217 plasmids, then selected in the presence of 20 µg/ml blasticidin (Invitrogen).

### Real-time quantitative PCR (RTQ-PCR)

Total RNA from cell culture was prepared using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). One microgram of total RNA was reversed-transcribed, and RTQ-PCR measurements were performed as described previously [43].

### Western-blot

Western-blot analysis was performed as previously described [43]. For each sample, total proteins were quantified using a Bradford protein assay and 50 µg of total protein were separated on SDS/PAGE gels before transferring to a PVDF membrane (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). ZNF217 antibody was obtained from C. Collins [14], Cyclin D1, PARP, Bax and Aurora-A antibodies were from Cell Signaling (Beverly, MA, USA), Cyclin E2 and Bcl-x<sub>L</sub> antibodies from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA), Bcl-2 antibody from Neomarker (Fremont, CA, USA), Bad antibody from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA), Bak and Cyclin E1 antibodies from Calbiochem (San Diego, CA, USA) and Cyclin A2 and α-tubulin antibodies from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All western-blots presented are from one experiment representative of at least two independent experiments and cell lysates, and at least three western-blots. Signals were quantified by pixel densitometry using the VisionWorksLS Analysis Software.

### Gene silencing

Stealth™ siRNAs (siRNA-A and siRNA-B) targeting ZNF217 and scrambled control RNA (scrambled) were obtained from Invitrogen. Five nanomoles of ZNF217-siRNAs or scrambled were transfected into cell lines with lipofectamine RNAimax (Invitrogen).

### Cell proliferation analysis

Cells (4 000 cells per well) were plated onto a 96-well plate. Proliferating cells were analyzed using a Cell Proliferation ELISA 5-bromodeoxyuridine (BrdU) Kit (Roche, Meylan, France) as previously described [44].

### Tumor growth assay

A total of  $2 \times 10^6$  MDA-MB-231/pcDNA6 or ZNF217-1 cells were suspended in PBS/matrigel v/v (BD Biosciences) and injected into the mammary fat pad of 4-week-old female Swiss nude (nu/nu) mice (Charles River, L'arbresle, France) (control xenografts n = 6 and ZNF217 xenografts n = 7). Tumors were measured with calipers every 3-4 days. All animal studies were performed in accordance with the European Union guidelines and use committee of Centre Léon Bérard.

### Cytotoxicity assay

Cells (8 000 cells per well) were plated onto a 96-well plate, treated for 4 days with  $10^{-12}$  to  $10^{-6}$  M of paclitaxel (Paxene®, Ivax, Miami, USA). Cell viability was then assessed with the CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation assay (Promega, Madison, WI, USA). Cytotoxic experiments were also conducted as described above in the presence of Aurora kinase

inhibitor III, a potent inhibitor of Aurora-A (Merck, Nottingham, UK), alone or combined with 2.5 nM paclitaxel.

### Flow cytometry analysis of ABCB1 protein expression levels

ABCB1 protein levels were quantified by flow cytometry in ABCB1-positive control K562-R7, MDA-MB-231/pcDNA6, ZNF217-1 and ZNF217-2 cells using the ABCB1-C219 (phycoerythrin PE)-conjugated antibody (Santa Cruz) according to the manufacturer's instructions.

### Efflux assay

At the end of uptake phase (30 min, 37°C), daunorubicin (17 µM DNR, DaunoXome®, San Dimas, CA, USA) was removed and cells were re-incubated for 1 h in DNR-free medium in the presence or absence of 4 µg/ml cyclosporin A (CSA). After trypsinization, DNR fluorescence was monitored with a FACscan flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) as previously described [23].

### Detection of apoptosis by annexin-V staining

The cells were grown for 3 days and treated or not with 10 nM or 100 nM of paclitaxel. Apoptotic cells were detected using the Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche). FITC fluorescence was then analyzed in  $2 \times 10^4$  cells by a FACscan flow cytometer. The percentage of apoptotic cells was determined by analysis with cell-Quest™ software (Becton Dickinson).

### Caspase 3 activity assay

Briefly, cells were treated or not with 100 nM of paclitaxel for 10 h. Caspase 3 activity was determined using the Caspase-3/CPP32 fluorometric assay kit (Clinis ciences, Montrouge, France).

### Acknowledgements

We thank Ms. MD Reynaud for editing the manuscript and Dr I Puisieux for helpful advice concerning mouse xenograft experiments. This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité du Rhône, Comité de la Saône-et-Loire).

### Author details

<sup>1</sup>Université de Lyon, Lyon, France. <sup>2</sup>ISPB, Faculté de Pharmacie de Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France. <sup>3</sup>INSERM, U590, Lyon, France. <sup>4</sup>Centre Léon Bérard, FNCLCC, Lyon, France. <sup>5</sup>Department of urology, Vancouver Prostate Centre, Vancouver, Canada.

### Authors' contributions

AT and JAV carried out the cell and molecular biology experiments and drafted the manuscript. LP performed the ABCB1 expression and activity experiments. SEG and SBL carried out the mouse xenograft experiments. EG performed cytotoxicity assays. CC developed the pEGFP-N1-ZNF217 plasmid and the ZNF217 antibody used in this study. MV and AT performed the apoptosis experiments. PAC conceived the study, its design and coordination and drafted the manuscript. All authors critically read the manuscript and approved the final version.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 10 April 2010 Accepted: 8 November 2010

Published: 8 November 2010

### References

1. Quinlan KG, Verger A, Yaswen P, Crossley M: Amplification of zinc finger gene 217 (ZNF217) and cancer: when good fingers go bad. *Biochim Biophys Acta* 2007, 1775:333-340.
2. Sen S, Zhou H, White RA: A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 1997, 14:2195-2200.
3. Lee JM: The role of protein elongation factor eEF1A2 in ovarian cancer. *Reprod Biol Endocrinol* 2003, 1:69.
4. Collins C, Rommens JM, Kowbel D, Godfrey T, Tanner M, Hwang SI, Polikoff D, Nonet K, Cochran J, Myambo K, et al: Positional cloning of ZNF217 and NABC1: genes amplified at 20q13.2 and overexpressed in breast carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:8703-8708.
5. Ginestier C, Cervera N, Finetti P, Esteyries S, Esterri B, Adelaide J, Xerri L, Viens P, Jacquemier J, Charafe-Jauffret E, et al: Prognosis and gene expression profiling of 20q13-amplified breast cancers. *Clin Cancer Res* 2006, 12:4533-4544.
6. Ginzinger DG, Godfrey TE, Nigro J, Moore DH, Suzuki S, Pallavicini MG, Gray JW, Jensen RH: Measurement of DNA copy number at microsatellite loci using quantitative PCR analysis. *Cancer Res* 2000, 60:5405-5409.
7. Nonet GH, Stampfer MR, Chin K, Gray JW, Collins CC, Yaswen P: The ZNF217 gene amplified in breast cancers promotes immortalization of human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2001, 61:1250-1254.
8. Chin K, de Solorzano CO, Knowles D, Jones A, Chou W, Rodriguez EG, Kuo WL, Ljung BM, Chew K, Myambo K, et al: In situ analyses of genome instability in breast cancer. *Nat Genet* 2004, 36:984-988.
9. Li P, Maines-Bandiera S, Kuo WL, Guan Y, Sun Y, Hills M, Huang G, Collins CC, Leung PC, Gray JW, et al: Multiple roles of the candidate oncogene ZNF217 in ovarian epithelial neoplastic progression. *Int J Cancer* 2007, 120:1863-1873.
10. Collins C, Volik S, Kowbel D, Ginzinger D, Ylstra B, Cloutier T, Hawkins T, Predki P, Martin C, Wernick M, et al: Comprehensive genome sequence analysis of a breast cancer amplicon. *Genome Res* 2001, 11:1034-1042.
11. Banck MS, Li S, Nishio H, Wang C, Beutler AS, Walsh MJ: The ZNF217 oncogene is a candidate organizer of repressive histone modifiers. *Epigenetics* 2009, 4:100-106.
12. Cowger JJ, Zhao Q, Iovicic M, Torchia J: Biochemical characterization of the zinc-finger protein 217 transcriptional repressor complex: identification of a ZNF217 consensus recognition sequence. *Oncogene* 2007, 26:3378-3386.
13. Quinlan KG, Nardini M, Verger A, Francescato P, Yaswen P, Corda D, Bolognesi M, Crossley M: Specific recognition of ZNF217 and other zinc finger proteins at a surface groove of C-terminal binding proteins. *Mol Cell Biol* 2006, 26:8159-8172.
14. Huang G, Krig S, Kowbel D, Xu H, Hyun B, Volik S, Feuerstein B, Mills GB, Stokoe D, Yaswen P, et al: ZNF217 suppresses cell death associated with chemotherapy and telomere dysfunction. *Hum Mol Genet* 2005, 14:3219-3225.
15. Sun G, Zhou J, Yin A, Ding Y, Zhong M: Silencing of ZNF217 gene influences the biological behavior of a human ovarian cancer cell line. *Int J Oncol* 2008, 32:1065-1071.
16. Sun Y, Wong N, Guan Y, Salamanca CM, Cheng JC, Lee JM, Gray JW, Auersperg N: The eukaryotic translation elongation factor eEF1A2 induces neoplastic properties and mediates tumorigenic effects of ZNF217 in precursor cells of human ovarian carcinomas. *Int J Cancer* 2008, 123:1761-1769.
17. McGrogan BT, Gilmartin B, Carney DN, McCann A: Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1785:96-132.
18. Mackay A, Tamber N, Fenwick K, Iravani M, Grigoriadis A, Dexter T, Lord CJ, Reis-Filho JS, Ashworth A: A high-resolution integrated analysis of genetic and expression profiles of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2009, 118:481-498.
19. Shadeo A, Lam WL: Comprehensive copy number profiles of breast cancer cell model genomes. *Breast Cancer Res* 2006, 8:R9.
20. Jang SH, Wientjes MG, Au JL: Kinetics of P-glycoprotein-mediated efflux of paclitaxel. *J Pharmacol Exp Ther* 2001, 298:1236-1242.
21. Martin C, Berridge G, Higgins CF, Mistri P, Charlton P, Callaghan R: Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* 2000, 58:624-632.
22. Shapiro AB, Ling V: Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur J Biochem* 1997, 250:130-137.
23. Wang EJ, Casciano CN, Clement RP, Johnson WW: In vitro flow cytometry method to quantitatively assess inhibitors of P-glycoprotein. *Drug Metab Dispos* 2000, 28:522-528.
24. Wang EJ, Casciano CN, Clement RP, Johnson WW: Active transport of fluorescent P-glycoprotein substrates: evaluation as markers and interaction with inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 289:580-585.
25. Jordan MA: Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2002, 2:1-17.
26. Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Derry WB, Copp H, Wilson L: Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res* 1996, 56:816-825.
27. Kutuk O, Letai A: Alteration of the mitochondrial apoptotic pathway is key to acquired paclitaxel resistance and can be reversed by ABT-737. *Cancer Res* 2008, 68:7985-7994.
28. Noguchi S: Predictive factors for response to docetaxel in human breast cancers. *Cancer Sci* 2006, 97:813-820.
29. Anand S, Penrhyn-Lowe S, Venkitaraman AR: AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* 2003, 3:51-62.
30. Blagosklonny MV: How cancer could be cured by 2015. *Cell Cycle* 2005, 4:269-278.
31. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE: Cell death. *N Engl J Med* 2009, 361:1570-1583.
32. Ibrado AM, Liu L, Bhalla K: Bcl-xL overexpression inhibits progression of molecular events leading to paclitaxel-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia HL-60 cells. *Cancer Res* 1997, 57:1109-1115.
33. Strobel T, Tai YT, Korsmeyer S, Cannistra SA: BAD partly reverses paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Oncogene* 1998, 17:2419-2427.
34. Wang XX, Liu R, Jin SQ, Fan FY, Zhan QM: Overexpression of Aurora-A kinase promotes tumor cell proliferation and inhibits apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cell line. *Cell Res* 2006, 16:356-366.
35. Yao JE, Yan M, Guan Z, Pan CB, Xia LP, Li CX, Wang LH, Long ZJ, Zhao Y, Li MW, et al: Aurora-A down-regulates IkappaBalphalambda via Akt activation and interacts with insulin-like growth factor-1 induced phosphatidylinositol 3-kinase pathway for cancer cell survival. *Mol Cancer* 2009, 8:95.
36. Scharer CD, Laycock N, Osunkoya AO, Logani S, McDonald JF, Benigno BB, Moreno CS: Aurora kinase inhibitors synergize with paclitaxel to induce apoptosis in ovarian cancer cells. *J Transl Med* 2008, 6:79.
37. Littlepage LE, Wu H, Andresson T, Deanehan JK, Amundadottir LT, Ruderman JV: Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:15440-15445.
38. Castro A, Arlot-Bonnemains Y, Vigneron S, Labbe JC, Prigent C, Lorca T: APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis. *EMBO Rep* 2002, 3:457-462.
39. Littlepage LE, Ruderman JV: Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev* 2002, 16:2274-2285.
40. Fukuda T, Mishina Y, Walker MP, DiAugustine RP: Conditional transgenic system for mouse aurora A kinase: degradation by the ubiquitin proteasome pathway controls the level of the transgenic protein. *Mol Cell Biol* 2005, 25:5270-5281.
41. Cha TL, Chuang MJ, Wu ST, Sun GH, Chang SY, Yu DS, Huang SM, Huan SK, Cheng TC, Chen TT, et al: Dual degradation of aurora A and B kinases by the histone deacetylase inhibitor LBH589 induces G2-M arrest and apoptosis of renal cancer cells. *Clin Cancer Res* 2009, 15:840-850.
42. Lim SK, Gopalan G: Aurora-A kinase interacting protein 1 (AURKAIP1) promotes Aurora-A degradation through an alternative ubiquitin-independent pathway. *Biochem J* 2007, 403:119-127.

43. Vendrell JA, Magnino F, Danis E, Duchesne MJ, Pinloche S, Pons M, Birnbaum D, Nguyen C, Theillet C, Cohen PA: **Estrogen regulation in human breast cancer cells of new downstream gene targets involved in estrogen metabolism, cell proliferation and cell transformation.** *J Mol Endocrinol* 2004, **32**:397-414.
44. Vendrell JA, Bieche I, Desmetz C, Badia E, Tozlu S, Nguyen C, Nicolas JC, Lidereau R, Cohen PA: **Molecular changes associated with the agonist activity of hydroxy-tamoxifen and the hyper-response to estradiol in hydroxy-tamoxifen-resistant breast cancer cell lines.** *Endocr Relat Cancer* 2005, **12**:75-92.

doi:10.1186/1476-4598-9-291

**Cite this article as:** Thollet et al.: ZNF217 confers resistance to the pro-apoptotic signals of paclitaxel and aberrant expression of Aurora-A in breast cancer cells. *Molecular Cancer* 2010 **9**:291.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## Commentaires et discussion

Il a été montré que ZNF217 est capable d'immortaliser des cellules épithéliales mammaires, leur permet d'échapper à la sénescence (Nonet *et al.*, 2001) et modifie la réponse cellulaire à l'apoptose induite par la doxorubicine ou par le dysfonctionnement des télomères (Huang *et al.*, 2005). Les mécanismes impliqués dans les fonctions de survie de ZNF217 ne sont pas encore connus et il est donc primordial de connaître le rôle joué par ZNF217 dans la réponse à la chimiothérapie.

Pour ce travail, nous avons établi des transfectants stables surexprimant ZNF217 dans des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 qui possèdent un taux endogène faible en ZNF217 (Figure 1 de l'article).

Dans cette étude, nous avons montré que la surexpression de ZNF217 dans les cellules MDA-MB-231 de cancer du sein induit une augmentation de la prolifération cellulaire *in vitro* (Figure 2A de l'article) et l'augmentation de la croissance tumorale *in vivo* (Figure 4A de l'article) associée à l'augmentation de l'expression de plusieurs cyclines (Figures 2B et 4B de l'article). Inversement, la sous-expression de ZNF217 par une approche de siRNA induit une diminution de la prolifération cellulaire à la fois dans les cellules contrôle et les cellules surexprimant ZNF217 de façon endogène ou exogène (Figures 2C, D, E et F de l'article). Ces résultats suggèrent que ZNF217 est directement impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire. De plus, la surexpression de ZNF217 induit une résistance spécifique à certaines molécules utilisées en chimiothérapie. En effet, nous observons une résistance au paclitaxel (Figure 5 de l'article), un agent stabilisant des microtubules mais pas à la gemcitabine, un analogue des nucléosides (data not shown). Nous avons également confirmé dans un autre modèle cellulaire que ZNF217 induit la résistance à la doxorubicine comme Huang *et al.* l'avait décrit précédemment dans des cellules HBL100 de cancer du sein et des cellules HeLa

du col de l'utérus (Huang *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent que ZNF217 induirait la résistance à la chimiothérapie *via* des mécanismes moléculaires différents selon la molécule utilisée.

Afin d'élucider les mécanismes impliqués dans la résistance au paclitaxel des cellules surexprimant ZNF217, nous avons étudié l'expression et l'efflux des transporteurs ABCB1/PgP qui interviennent dans l'élimination des anticancéreux des cellules tumorales. Bien que les transporteurs ABCB1/PgP soient connus pour être impliqués dans la résistance aux taxanes (Jang *et al.*, 2001), dans cette étude nous avons montré que les transporteurs ABCB1/PgP ne jouent pas un rôle dans la résistance au paclitaxel des transfectants stables surexprimant ZNF217 (Figure 6 de l'article).

Le paclitaxel a été décrit comme induisant l'apoptose dans diverses lignées cellulaires de façon dose-dépendante (Jordan *et al.*, 1996; Jordan, 2002). Il existe deux voies majeures d'apoptose : la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale (Hotchkiss *et al.*, 2009). Ces deux voies aboutissent à l'activation des caspases, notamment la caspase 3 qui clive son substrat majeur PARP pour induire l'apoptose. Dans notre étude, nous avons montré que ZNF217 inhibe les signaux pro-apoptotiques du paclitaxel en association avec la diminution de l'activité caspase 3 et la diminution du clivage de PARP (Figure 7 de l'article). De façon intéressante, la résistance aux signaux pro-apoptotiques du paclitaxel est associée à une altération de la voie mitochondriale de l'apoptose avec une dérégulation de l'expression des membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Figure 8 de l'article). Ainsi, l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> est augmentée tandis que l'expression des protéines pro-apoptotiques Bad, Bax et Bak est diminuée dans les cellules surexprimant ZNF217. Il a été décrit que la surexpression ectopique de Bcl-2 ou Bcl-x<sub>L</sub> induit la résistance à l'apoptose induite par le paclitaxel (Ibrado *et al.*, 1997) tandis que la surexpression de Bad ou Bax augmente l'apoptose induite par le paclitaxel (Strobel *et al.*,

1998a; Strobel *et al.*, 1998b). Nos résultats suggèrent donc que la résistance au paclitaxel induite par ZNF217 est fortement corrélée à l'expression aberrante des membres de la famille Bcl-2.

Aurora-A est une sérine/thréonine kinase surexprimée dans 10 à 60% des cancers du sein (Anand *et al.*, 2003) et a été associée à la résistance au paclitaxel et au docétaxel (Anand *et al.*, 2003; Noguchi, 2006) ainsi qu'à l'augmentation de l'expression des membres anti-apoptotiques Bcl-2 (Wang *et al.*, 2006) ou Bcl-x<sub>L</sub> (Yao *et al.*, 2009). Inversement, il a été montré qu'un inhibiteur des kinases Aurora synergise avec le paclitaxel pour induire l'apoptose dans des cellules cancéreuses ovaries (Scharer *et al.*, 2008). Nous avons montré pour la première fois que ZNF217 est associé à la dérégulation d'expression d'Aurora-A, probablement en conséquence d'un mécanisme post-transcriptionnel (Figures 9 A, B et C de l'article). Il a été montré que l'expression d'Aurora-A est régulée par des mécanismes de phosphorylation (Littlepage *et al.*, 2002) et d'ubiquitination (Castro *et al.*, 2002; Littlepage & Ruderman, 2002) qui jouent un rôle important dans la fonction de la protéine (Fukuda *et al.*, 2005; Lim & Gopalan, 2007; Cha *et al.*, 2009). ZNF217 pourrait réguler directement ou indirectement la synthèse ou la dégradation d'Aurora-A par des mécanismes encore inconnus. De plus, de façon intéressante, un traitement avec un inhibiteur d'Aurora-A (Aurora kinase inhibitor III, Merck) réverse la résistance au paclitaxel induite par la surexpression de ZNF217 (Figures 9 D et E de l'article). Ces résultats suggèrent qu'Aurora-A pourrait médier les effets de ZNF217. Enfin, l'inhibiteur utilisé inhibant d'autres kinases (Lck, Bmx, IGF-1R et Syk) à des concentrations plus élevées, nous ne pouvons pas éliminer le fait que ces kinases puissent jouer un rôle dans la résistance induite par ZNF217.

Les gènes *ZNF217* et *AURKA* sont situés dans la même région chromosomique en 20q13, une région fréquemment amplifiée dans de nombreux cancers (Tableau 5). Nos travaux suggèrent, pour la première fois, que *ZNF217* et *AURKA* pourraient coopérer pour

induire la progression tumorale et la résistance à la chimiothérapie dans le cancer du sein. La régulation positive de l'expression d'Aurora-A par ZNF217 pourrait renforcer les effets d'un fort niveau d'expression de ZNF217 et/ou de l'amplification de *ZNF217*. Ginestier *et al.* ont montré qu'il existe deux types d'amplifications 20q13 : celles où seul le locus de *ZNF217* est amplifié et d'autres où plusieurs loci sont amplifiés dont le locus d'*AURKA* et celui de *ZNF217* (Ginestier *et al.*, 2006). Nos résultats suggèrent pour la première fois que les deux protéines pourraient coopérer *via* deux mécanismes, soit grâce à une co-amplification génique soit par la régulation de l'expression d'Aurora-A par ZNF217.

**En conclusion**, nous avons montré que ZNF217 peut contrecarrer d'autres signaux apoptotiques que ceux induits par les dommages à l'ADN (Huang *et al.*, 2005) et que les effets protecteurs de ZNF217 sont associés à des altérations constitutives de l'expression des membres de la famille Bcl-2 ainsi qu'à une surexpression constitutive aberrante d'Aurora-A. Etant donné que les amplifications de ZNF217 ont été détectées dans 9% à 39% des cancers du sein (Pour revue, (Quinlan *et al.*, 2007)) et que de forts niveaux d'expression de ZNF217 ne corrèlent pas forcément avec une amplification de *ZNF217* (Collins *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 2001; Ginestier *et al.*, 2006), la surexpression protéique de ZNF217 pourrait représenter un nouveau mécanisme par lequel les cellules ne présentant pas d'amplification de *ZNF217* deviennent résistantes au paclitaxel. Enfin de façon plus importante, nos travaux suggèrent que des molécules ciblant directement ZNF217 et/ou ciblant ses médiateurs comme Aurora-A pourraient être utilisées en clinique pour traiter les cancers du sein présentant des forts niveaux d'expression de ZNF217.

## *Article n°2*

« Upregulated *ZNF217* expression, a novel marker for poor prognosis in breast cancer, is associated with migration, invasion and EMT »

Vendrell JA\*, Thollet A\*, Ghayad SE, Vinot S, Treilleux I, Bieche I, Grisard E,  
Roux P, Corbo L, Rimokh R, Cohen PA

\* Les auteurs ont contribué de façon équivalente à ce travail

(En révision, *Cancer Research*)

## **Objectifs de l'étude**

L'objectif de cette étude est d'explorer la valeur pronostique de *ZNF217* dans des échantillons de tumeurs du sein et d'étudier *in vitro* l'impact de la dérégulation de l'expression de *ZNF217* sur l'agressivité, la migration, l'invasion et l'EMT.

Ce travail est un travail collaboratif avec :

- Dr R. Rimokh, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052, CNRS UMR5286, Lyon ;
- Dr I. Treilleux, Centre Léon Bérard, Lyon ;
- Dr I. Bièche, Laboratoire d'Oncogénétique, Institut Curie - Hôpital René Huguenin, FNCLCC, St-Cloud ;
- Dr P. Roux, Université Montpellier 2, CRBM - CNRS, UMR5237, IFR 122, Montpellier, France ;
- le Centre de Ressources Biologiques (CRB) du Centre Léon Bérard, Lyon.

**Upregulated ZNF217 expression, a novel marker for poor prognosis in breast cancer, is associated with migration, invasion and EMT**

Julie A. Vendrell<sup>1,2,3,4,‡</sup>, Aurélie Thollet<sup>1,2,3,4,‡</sup>, Sandra E. Ghayad<sup>1,3,4</sup>, Stéphanie Vinot<sup>5</sup>, Isabelle Treilleux<sup>6</sup>, Ivan Bieche<sup>7</sup>, Evelyne Grisard<sup>1,2,3,4</sup>, Pierre Roux<sup>5</sup>, Laura Corbo<sup>1,3,4</sup>, Ruth Rimokh<sup>1,3,4</sup>, and Pascale A. Cohen<sup>1,2,3,4,6</sup>

<sup>1</sup>Université de Lyon, Lyon, France

<sup>2</sup>ISPB, Faculté de Pharmacie, Université Lyon 1, Lyon, France

<sup>3</sup>INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

<sup>4</sup>CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

<sup>5</sup>Université Montpellier 2, CRBM - CNRS, UMR5237, IFR 122, Montpellier, France

<sup>6</sup>Centre Léon Bérard, Lyon, France

<sup>7</sup>Laboratoire d'Oncogénétique, Institut Curie - Hôpital René Huguenin, FNCLCC, St-Cloud, France

<sup>‡</sup>JAV and AT contributed equally to this work

**Corresponding author:** PA Cohen, ISPB, Faculté de Pharmacie de Lyon, 8 Av Rockefeller, 69008 Lyon, France, Phone: +33-4-78-77-28-94; Fax: +33-4-78-77-72-49; E-mail: [pascale.cohen@univ-lyon1.fr](mailto:pascale.cohen@univ-lyon1.fr)

**Running title:** ZNF217, poor prognosis and EMT in breast cancer

**Text word count:** 4995 words

## **Abstract**

ZNF217 is a candidate oncogene that is involved in many cancers, including breast cancer. We report here for the first time that high levels of expression of ZNF217 mRNA are associated with poor prognosis and with the development of metastases in breast-cancer patients in several independent cohorts. A strong prognostic signature based on both ZNF217 mRNA-expression levels and lymph-node status allowed a more accurate re-stratification of breast-cancer patients into three classes with different prognoses (good, intermediate or poor) in terms of RFS. In *in vitro* experiments, overexpression of ZNF217 promotes anchorage-independent growth and stimulates migration and invasion of breast cancer cells. Strikingly, overexpression of ZNF217 also induces epithelial–mesenchymal transition (EMT) in human mammary epithelial cells, and is associated with decreased E-cadherin expression, at the level of both endogenous mRNA and protein. This work also demonstrates that the TGF- $\beta$  pathway is a major driver of ZNF217-induced EMT: (i) in ZNF217-overexpressing mammary epithelial cells, a sustained activated TGF- $\beta$  pathway is present, as the consequence of a TGF- $\beta$  autocrine loop; (ii) inhibition of the TGF- $\beta$  pathway, either by the SB431542 inhibitor of TGF- $\beta$  type I receptor kinase activity or by silencing of Smad4, leads to the reversal of ZNF217-dependent features of EMT. Finally, our study strongly suggests that a high level of ZNF217 mRNA expression is a novel marker for poor prognosis in breast cancer and that silencing ZNF217 or disrupting the TGF- $\beta$  pathway could both represent candidate therapeutic strategies for patients with high levels of ZNF217 mRNA expression.

**Keywords:** ZNF217, Breast cancer, Prognosis, EMT, TGF- $\beta$  pathway

## Introduction

*ZNF217* is a candidate oncogene located on chromosome 20q13.2, a region that is frequently amplified in many tumors, including those of the breast (Kallioniemi *et al.*, 1994). The first direct evidence for a role for *ZNF217* in oncogenesis was the demonstration that the transduction of finite life-span human mammary epithelial cells or ovarian cells with *ZNF217* could give rise to immortalized cells (Nonet *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007). *ZNF217* is a Krüppel-like zinc-finger protein that localizes to the nucleus (Collins *et al.*, 2001) and interacts with co-repressors and histone-modifying proteins, suggesting that it may be part of a transcriptional repressor complex (Quinlan *et al.*, 2006; Cowger *et al.*, 2007; Banck *et al.*, 2009). However, the role of *ZNF217* in transcriptional regulation is likely to be complex, since *ZNF217* has also been shown to induce positive transcriptional regulation of target genes (Krig *et al.*, 2007; Thillainadesan *et al.*, 2008). Previous studies have found that overexpression of *ZNF217* can provide a selective advantage to cancer cells by interfering with survival pathways, and high levels of *ZNF217* expression have been associated with resistance to doxorubicin and to paclitaxel, and with deregulated apoptotic signals in breast-cancer cells (Huang *et al.*, 2005; Thollet *et al.*, 2010). The precise molecular mechanisms involved in *ZNF217* pro-survival functions are currently unknown, but activation of the Akt pathway (Huang *et al.*, 2005), ErbB3 overexpression (Krig *et al.*, 2010), Aurora-A overexpression (Thollet *et al.*, 2010), deregulated expression of several Bcl-2 members family (Thollet *et al.*, 2010), eEF1A2 overexpression (Sun *et al.*, 2008b) and interaction with the HIF pathway (Mao *et al.*, 2011) have been proposed to mediate such functions.

High-level amplification of 20q13 is found in 6.8% (Tanner *et al.*, 1995), 8% (Ginestier *et al.*, 2006) and 18% (Letessier *et al.*, 2006) of breast cancers. Although amplification of 20q13 has been correlated with poor prognosis in breast cancer (Tanner *et al.*, 1995), contradictory data have emerged (Letessier *et al.*, 2006). Ginestier *et al.* have

reported two types of 20q13 amplification. In the first type, the *ZNF217* locus was amplified but amplification was not detected at two other loci in 20q13 (Ginestier *et al.*, 2006). In the second type, the amplified region was apparently larger and involved two or three loci, *ZNF217*, *MYBL2* and *STK6*. Strikingly, amplification at two or three loci was associated with good prognosis, while amplification at *ZNF217* only was more frequently associated with poor prognosis.

While high levels of *ZNF217* expression have been mainly attributed to amplification of *ZNF217* (Collins *et al.*, 1998), other mechanisms may be important in regulating *ZNF217* expression in cancer cells. Indeed, high levels of *ZNF217* expression have been observed in breast tumors and breast-cancer cell lines in the absence of amplification (Collins *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 2001). Moreover, Mackay *et al.* did not find any significant correlation between *ZNF217* expression and *ZNF217* gene copy number in breast-cancer cell lines (Mackay *et al.*, 2009). Ginestier *et al.* found no statistical correlation between *ZNF217* mRNA-expression levels and *ZNF217* amplification in breast tumors in which only the *ZNF217* locus of the 20q13 region was amplified, and *ZNF217* mRNA-expression levels could not be used to discriminate these tumors from those without amplification (Ginestier *et al.*, 2006).

In this context, we thus sought to explore the value of *ZNF217* mRNA-expression levels (independently from the amplification status of the *ZNF217* gene) as a biomarker in breast cancer using samples collected from patients prone to relapse and/or to develop metastases. The present study reports for the first time the strong prognostic value of *ZNF217* mRNA-expression levels in several independent breast-cancer cohorts. With aim of identifying candidate targets for therapy in breast-cancer patients with high levels of *ZNF217* mRNA expression, we also investigated the biological function of *ZNF217* *in vitro* to characterize the phenotype of breast-cancer cells and of mammary epithelial cells in which ectopic expression of *ZNF217* has been induced and/or silenced.

## **Materials and Methods**

### **Breast tumor cohorts**

The CLB1 cohort is composed of 47 samples of primary breast tumor obtained from the Centre de Ressources Biologiques of the Centre Léon Bérard (CRB of CLB, Lyon, France, Supplementary Table S1). The tumor samples were taken from women who had not received endocrine therapy, chemotherapy or radiotherapy before surgery. Fourteen patients developed metastases while on chemotherapy and/or endocrine therapy (Met+ group), whereas 33 patients did not (Met- group). The CRH cohort is composed of 48 samples of ER+ primary breast tumor obtained from the Centre René Huguenin (St Cloud, France). The tumor samples were taken from women treated with primary surgery followed by adjuvant endocrine therapy only. Twenty-seven patients relapsed while on endocrine therapy and developed metastases (Met+ group) and 21 did not (Met- group) (Ghayad *et al.*, 2009). The CLB2 cohort is composed of 100 samples of primary breast tumor obtained from the CRB of CLB (Supplementary Table S2). The tumor samples were taken from women who had not received endocrine therapy, chemotherapy or radiotherapy before surgery. Twenty-five patients relapsed while receiving chemotherapy and/or endocrine therapy (Met+ group), whereas 75 patients did not (Met- group). Informed consent was obtained from all patients and the study was approved by the ethics committee of the corresponding institutions. Total RNA was extracted from frozen tumor samples using a Qiagen RNA extraction kit and RNA quality was assessed using the BioAnalyzer 2100<sup>TM</sup> (Agilent Technologies).

Publically available gene-expression data sourced from a published study by Ma *et al.* (Ma *et al.*, 2004) (GSE1379) or using KM plotter, an online tool that incorporates public microarray data from 2414 breast-cancer patients (Gyorffy *et al.*, 2010) were also used to study ZNF217 prognostic value.

## **Real-Time Quantitative PCR (RTQ-PCR)**

RTQ-PCR measurements were performed as described previously (Ghayad *et al.*, 2009), using a LightCycler (Roche) or an ABI Prism 7700 Sequence Detection system (Perkin Elmer Applied Biosystems) with the corresponding SYBR Green Kit.

## **Statistical analyses**

The log-rank test (univariate analysis), Kaplan-Meier plots and Cox proportional hazards model (multivariate analysis) were performed using SPSS® Software. The data are divided at the median value of *ZNF217* mRNA expression into two groups with either high or low expression. A *P*-value of < 0.05 was considered to be statistically significant. The likelihood ratio test was used to select the best fit between models (Harrell, 2001).

## **Cell culture**

MDA-MB-231, D3H2LN and HEK-293T cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen). The identity of MDA-MB-231 cells was confirmed by genomic DNA sequencing (*KRAS* and *TP53* genes). MCF10A cells (human mammary epithelial cells) were cultured as previously described (Soule *et al.*, 1990).

## ***ZNF217* stable transfectants**

The MDA-MB-231-pcDNA6 and MDA-MB-231-ZNF217 and the method used to obtain stable transfectants of MCF10A-pcDNA6 and MCF10A-ZNF217 have been described previously (Thollet *et al.*, 2010).

## **Western blots**

Antibodies used were: anti-*ZNF217* (Abcam Ltd); anti-phospho-FAK Y397 and phospho-FAK Y577 (Invitrogen); anti-FAK (Santa-Cruz Biotechnology Inc.); antibodies to E-cadherin,  $\alpha$ -catenin,  $\beta$ -catenin and N-cadherin were from BD Biosciences; anti-occludin (Zymed Laboratories); anti-vimentin (Dako); anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich).

## **Gene silencing**

Stealth<sup>TM</sup> siRNAs targeting *ZNF217* were from Invitrogen (Thollet *et al.*, 2010) and siRNAs targeting Smad4 were from Dharmacon (Hesling *et al.*, 2011). Scrambled control RNA was from Invitrogen. Five nanomoles of siRNA or scrambled were transfected using lipofectamine RNAimax (Invitrogen).

## **Soft-agar colony-formation assay**

Six-well plates were first covered with an agar layer containing 0.75% agar (Seaplaque Agarose<sup>®</sup>, Lonza) in 10% FBS-DMEM (Invitrogen). Cells were then suspended in 10% FBS-DMEM containing 0.45% agar and plated into wells. Twenty days later, the cells were stained with 0.005% Cristal violet (Sigma-Aldrich) for 1h. Photos were then taken using an inverted microscope.

## **Wound-healing assay**

Cells were plated and 16h before scratching, the medium was removed and replaced by FBS-free medium. The confluent monolayer was wounded by scratching. Photomicrographs were taken using an inverted microscope.

## **Matrigel invasion analysis**

$10^6$  cells were suspended in 1  $\mu$ l DMEM and seeded in the middle of a Matrigel layer (BD Biosciences).

## **Boyden-chamber invasion assay**

50,000 cells were plated in 2% FBS-DMEM on top of a thick layer of Matrigel within the upper chamber of a Transwell apparatus (Fluoroblock; BD Biosciences; pore size, 8  $\mu$ m) (Vinot *et al.*, 2008). The upper and lower chambers were filled with 2% and 10% FBS-DMEM respectively. After incubation for 24h to allow migration of the cells through the gel, cells were fixed for 15 min in 3.7% formaldehyde and the cells that had invaded through the

Matrigel were detected by fluorescence. The whole surface of the filter was counted and each assay was performed twice in triplicate for each condition.

### **Immunofluorescence microscopy**

For E-cadherin staining (Hesling *et al.*, 2011), the E-cadherin antibody (BD Biosciences) and the Alexa Fluor 488 anti-mouse antibody (Invitrogen) were used. For actin staining (Hesling *et al.*, 2011), cells were incubated with tetramethyl rhodamine isothiocyanate-conjugated phalloidin (Sigma-Aldrich). Images were acquired using an Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss). Recombinant human TGF- $\beta$ 1 was from Peprotech and SB431542 from Sigma.

### **Luciferase assay**

HEK-293T cells were plated then transfected with 150 ng of CAGA-luc plasmid (Dennler *et al.*, 1998) and 10 ng of pTK-RL (Renilla luciferase plasmid). The promoter of the CAGA-luc plasmid has repeated CAGA Smad-binding elements that control transcription of the firefly luciferase gene. Twenty-four hours after transfection, supernatants from MCF10A-pcDNA6 or MCF10A-ZNF217 cells were incubated for 24h with transfected HEK-293T cells. Luciferase activity was then assessed using the Dual luciferase reporter assay (Promega).

## Results

### High levels of expression of *ZNF217* mRNA are associated with poor prognosis in breast cancer

To investigate the clinical relevance of *ZNF217*, we used RTQ-PCR to explore *ZNF217* mRNA levels in a test set of 47 samples of primary breast tumors (CLB1 cohort, Supplementary Table S1). The cohort was composed of women who had developed metastases while on therapy (Met+ group, n = 14), or who had not (Met– group, n = 33). High levels of *ZNF217* mRNA in the primary tumor were significantly associated with the subsequent development of metastases (significant overexpression of *ZNF217* mRNA in the Met+ group,  $P = 0.002$ , Mann-Whitney test, Supplementary Table S3) and shorter relapse-free survival (RFS) (univariate analysis, Log-rank test,  $P = 0.003$ , Fig. 1A).

These findings were verified in an independent cohort from a different geographical location (CRH cohort). Again, levels of *ZNF217* mRNA expression were significantly higher in the Met+ group (n = 27) than in the Met– group (n = 21) ( $P = 0.0008$ , Mann-Whitney test, Supplementary Table S3), and high expression levels of *ZNF217* were significantly associated with shorter RFS ( $P = 0.017$ , Log-rank test, Fig. 1B).

We then performed retrospective statistical analyses of gene-expression array data from previous studies exploring the transcriptome of primary breast tumors using samples from patients who had or had not relapsed under treatment. Strikingly, in the cohort described by Ma *et al.* (Ma *et al.*, 2004), levels of *ZNF217* mRNA were still significantly higher in the Met+ group (n = 28) than in the Met– group (n = 32) ( $P = 0.0007$ , Mann-Whitney test, Supplementary Table S3), and high levels of expression of *ZNF217* were significantly associated with shorter RFS ( $P = 0.01$ , Log-rank test, Fig. 1C). Finally, the most striking results arose from our analysis of publicly available microarray data for 2414 breast-cancer patients (Gyorffy *et al.*, 2010), where high levels of expression of *ZNF217* were associated

with poor prognosis with a  $P$ -value of  $1 \times 10^{-11}$  (Log-rank test, Fig. 1D). The observation that upregulated expression of *ZNF217* mRNA is correlated with relapse and/or development of metastases in all the cohorts tested strongly suggests that this is a novel and powerful biomarker for poor prognosis in breast cancer.

### **Clinical relevance of *ZNF217* mRNA levels for prognosis of patients with breast cancer in an independent cohort ( $n = 100$ )**

We next investigated an independent cohort (CLB2 cohort) using samples ( $n = 100$ ) from patients with breast cancer (Supplementary Table S2). Again, we found that *ZNF217* mRNA was significantly overexpressed in samples from patients who relapsed and/or developed metastases (Met+ group,  $n = 25$ ) compared with those who did not (Met- group,  $n = 75$ ) ( $P = 0.025$ , Mann-Whitney test, Supplementary Table S3), and high levels of expression of *ZNF217* were significantly associated with shorter RFS ( $P = 0.02$ , Log-rank test, Fig. 1E). We then compared the expression of *ZNF217* with other clinical and pathological parameters using the Mann-Whitney test: no significant association was observed in any case (Supplementary Table S4). When we assessed the prognostic value of a number of clinical and pathological parameters by univariate analysis (Log-rank test) in this cohort, we didn't find any prognostic value for ER, PR or HER2 (Table 1), suggesting that *ZNF217* mRNA was more informative than these conventional biomarkers in this cohort. We found that only lymph-node status was associated with shorter RFS ( $P = 0.013$ , Log-rank test, Table 1). Prognostic factors for RFS with a 0.05 significance level in univariate analysis were then entered in a multivariate Cox model, and a backward selection procedure was used to build the final model. Both *ZNF217* mRNA levels and lymph-node status persisted in the model ( $P < 0.05$ ), revealing that these two biomarkers are independent prognostic markers (Table 1).

We then defined a signature based on *ZNF217* mRNA expression levels and lymph-node status. This signature was constructed by dividing patients into three groups: patients who expressed low levels of *ZNF217* mRNA and had no or few ( $\leq 3$ ) involved lymph nodes (Group A, n = 32); patients who expressed high levels of *ZNF217* mRNA expression and no or  $\leq 3$  involved lymph nodes or those who presented with  $> 3$  involved lymph nodes and low expression of *ZNF217* mRNA (Group B, n = 46); and finally, patients who expressed high levels of expression of *ZNF217* and had  $> 3$  involved lymph nodes (Group C, n = 22). Patients who expressed either high levels of expression of *ZNF217* mRNA and no or  $\leq 3$  involved lymph nodes and those who presented  $> 3$  involved lymph nodes and low expression of *ZNF217* mRNA were all classed in group B because their respective Kaplan-Meier curves for RFS could be superimposed (data not shown). The Kaplan-Meier curves for RFS according to *ZNF217* mRNA levels/lymph-node status for groups A, B and C are shown in Fig. 1F ( $P = 0.004$ , Log-rank test). Finally, we tested the *ZNF217* mRNA levels/lymph-node status signature with respects to RFS to determine which final model was a better fit. We found that the model associating *ZNF217* mRNA levels and lymph-node status was a better fit (likelihood = 199.83) than the model with *ZNF217* mRNA levels only (likelihood = 208.16,  $P = 0.001$ ) or the model with lymph-node status only (likelihood = 207.74,  $P = 0.001$ ), demonstrating that, in this cohort, the *ZNF217* mRNA level/lymph-node status signature has a better prognostic value than *ZNF217* mRNA expression levels only or lymph-node status only with respect to RFS. Overall, these data demonstrate that, in this cohort, *ZNF217* mRNA expression is a prognostic marker that possesses an added value to current biomarkers. Assessing *ZNF217* mRNA-expression levels (alone or associated with lymph-node status) would thus allow the re-stratification of patients with breast cancer into outcome-dependent subclasses. To complement our observations in breast tumors and in order to understand the biological pathways involved in *ZNF217*-mediated events, we next investigated the impact of

*ZNF217* expression on the behavior of breast-cancer cells *in vitro*, with the aim of identifying candidate therapeutic strategies for patients with high levels of *ZNF217* mRNA expression.

### **Overexpression of *ZNF217* promotes anchorage-independent growth and stimulates migration and invasiveness of breast-carcinoma cells**

The MDA-MB-231 cells, which have low endogenous levels of *ZNF217*, have been previously used by our group to establish two stable cell lines (*ZNF217-1* and *ZNF217-2*) that constitutively overexpress the *ZNF217* protein (Thollet *et al.*, 2010). Cell proliferation/viability assays performed in these cell lines demonstrate that overexpression of *ZNF217* strongly simulates cell survival and/or proliferation ( $P < 0.001$ , Fig. S1B). Transient transfections with two *ZNF217*-targeted siRNAs resulted in a spectacular inhibition of cell proliferation/viability both in control (possessing low endogenous level of *ZNF217*) and in *ZNF217*-overexpressing cells ( $P < 0.001$ , Fig. S1C), supporting our previous results obtained by BrdU incorporation assay (11). Anchorage-independent growth, a hallmark of malignant cells that form tumors *in vivo*, is thought to be associated with aggressiveness and metastasis and can be measured by assays for colony formation on soft agar. We found that the number of colonies formed when *ZNF217* was overexpressed was greater in *ZNF217-1* and *ZNF217-2* cells than in control cells ( $P < 0.001$ , Fig. 2A).

A strong capacity for migration or for invasion is another hallmark of tumor malignancy and could be demonstrated by the wound-healing assay, the matrigel assay or the Boyden chamber assay. We carried out wound-healing experiments at short time-points (15h and 24h) and in serum-free medium, to exclude interference attributable to the pro-proliferative action of *ZNF217*. Overexpression of *ZNF217* in *ZNF217-1* and *ZNF217-2* cells stimulated cell migration compared to control cells (Fig. 2B) and this was associated with increased levels of phosphorylated FAK, the Focal Adhesion Kinase that plays a central role

in cell migration and invasion (Fig. 2C). Cell migration was entirely reversed in the presence of siRNA-A ZNF217 or siRNA-B ZNF217, in both ZNF217-1 cells (Fig. 2D) and ZNF217-2 cells (Supplementary Fig. S2).

Matrigel invasion assays showed that ZNF217-overexpressing cells are also more invasive than control cells (Fig. 2E). Supporting data came from the Boyden chamber assay *in vitro*; results showed that 24h after plating the cells onto a thick layer of Matrigel, mimicking the physiological basement membrane, invasiveness significantly increased with ZNF217 expression ( $P < 0.001$ , Fig. 2F). One can note that the ZNF217-1 clone was more invasive than the ZNF217-2 cells in Matrigel invasion assays, but not in Boyden chamber assays. As shown in Fig. S1B, the ZNF217-1 cells also proliferate more rapidly than the ZNF217-2 cells. The data obtained in the Matrigel assays (performed for 18 days) could thus be the consequence of both the invasive and pro-proliferative properties of the ZNF217-overexpressing cells, while in the Boyden chamber assays (performed 24h after plating cells), interference attributable to the pro-proliferative action of ZNF217 was excluded and the data presented in Fig. 2F were the only consequence of the invasive properties of the tested cell lines. Altogether, we thus concluded that ectopic overexpression of ZNF217 triggers an increased migratory and invasive phenotype in MDA-MB-231 breast-cancer cells.

We next explored the reciprocal question, *i.e.* can deregulation of endogenous ZNF217 expression be detected in a breast-cancer cell model of invasion? The D3H2LN cell line is a clonal subline of MDA-MB-231 cells passaged twice in mice and the resulting D3H2LN mouse xenografts demonstrate early and increased frequency of spontaneous lymph-node metastasis *in vivo* (Jenkins *et al.*, 2005). Strikingly, we found that endogenous expression of ZNF217 protein was significantly higher in D3H2LN cells than in MDA-MB-231 control cells (~9-fold,  $P < 0.001$ , Fig. 3A), and D3H2LN possessed increased migratory properties than control cells (Fig. 3B). Moreover, silencing of endogenous ZNF217 expression by a

siRNA strategy was sufficient to decrease the migratory and invasive properties of the D3H2LN cells, as demonstrated by the wound-healing assay (Fig. 3B) and the Boyden chamber assay (Fig. 3C). Overall, these data indicate that ZNF217 plays a direct role in promoting anchorage-independent growth and in stimulating migration and invasion of breast-cancer cells.

### **ZNF217 promotes epithelial–mesenchymal transition (EMT) in mammary epithelial cells**

EMT is known to be involved in the invasive capacity of transformed epithelial cells (Kalluri & Weinberg, 2009), and chromatin immunoprecipitation assays have previously shown that the ZNF217 complex is present on the *E-cadherin* promoter in breast-cancer cells, driving downregulation of luciferase activity in a reporter-gene assay (Cowger *et al.*, 2007). We then examined the effects of overexpressing ZNF217 in human mammary epithelial cells, MCF10A (Soule *et al.*, 1990). Compared with MCF10A-pcDNA6 control cells, overexpression of ZNF217 in MCF10A cells stably transfected with ZNF217 was paired with significant decreased expression of *CDH1/E-cadherin* mRNA ( $P < 0.001$ , Fig. 4A) and was sufficient to trigger some features of EMT, including fibroblastic morphology (Fig. 4B), a significant decrease in the protein expression of epithelial markers and an increase in levels of mesenchymal proteins (Fig. 4C). These data show for the first time that ZNF217 can induce the downregulation of *CDH1/E-cadherin* expression at the endogenous level, both at the mRNA and protein levels. Interestingly, ZNF217-induced EMT was also associated with significant increased mRNA levels of several transcriptional factors known to be major drivers of EMT (Fig. 4D).

In addition to the loss of or decrease in expression of E-cadherin protein, non-polar or cytoplasmic expression of this protein is a hallmark of EMT in cancer progression (Thiery *et*

*al.*, 2009). In a control experiment, we showed by immunofluorescence (IF) assay that MCF10A-pcDNA6 cells exhibit cytoplasmic expression of E-cadherin when EMT is induced by exposing cells to transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) (Fig. 5A). When we carried out the IF assay in MCF10A-ZNF217 cells, there was low expression of E-cadherin (validating the Western-blot data presented in Fig. 4C) together with cytoplasmic localization of this protein (Fig. 5A). Moreover, and like TGF- $\beta$ 1-treated MCF10A-pcDNA6 cells, MCF10A-ZNF217 cells also displayed increased actin polymerization, reorganization of stress fibers into large linear and parallel bundles and fibroblast-like elongated morphology (Fig. 5A). Similar data were obtained in a second model of human mammary epithelial cells (HMLE cells) (Elenbaas *et al.*, 2001): HMLE cells stably-transfected with *ZNF217* also displayed features of EMT, as demonstrated by cell morphology, expression levels of several epithelial and mesenchymal proteins, cellular localization of E-cadherin, and reorganization of actin-based fibers (Supplementary Fig. S3). We therefore propose that promotion of EMT is another important feature of the deleterious role of ZNF217 in tumorigenesis.

### The TGF- $\beta$ pathway is a major driver of the ZNF217-induced features of EMT

In late stages of breast-cancer tumorigenesis, TGF- $\beta$  is known to promote cancer progression and to contribute to the acquisition and development of metastatic phenotypes, partly through its ability to stimulate EMT and cell migration (Massague, 2008; Thiery *et al.*, 2009). TGF- $\beta$  canonically elicits its cellular responses via TGF- $\beta$  receptors and Smad proteins which regulate the transcription of target genes (ten Dijke & Hill, 2004). We next sought to determine whether the TGF- $\beta$  pathway is involved in ZNF217-induced EMT. For this purpose, we used SB431542, an ATP analogue and inhibitor of the kinase activity of the TGF- $\beta$  type I receptor and a siRNA-based strategy targeting Smad4. A control experiment showed that exposing MCF10A-pcDNA6 cells to both TGF- $\beta$ 1 and SB431542 potently

inhibited TGF- $\beta$ 1-induced features of EMT (Fig. 5A). Strikingly, treating MCF10A-ZNF217 cells with SB431542 was sufficient to reverse the ZNF217-induced EMT phenotype (Fig. 5A). Smad4 silencing in MCF10A-pcDNA6 cells led to a complete block in TGF- $\beta$ 1-induced EMT (Fig. 5B), supporting the idea that Smad4 plays a key role in TGF- $\beta$ 1-induced EMT (Valcourt *et al.*, 2005). Moreover, in MCF10A-ZNF217 cells, Smad4 silencing caused reversal of ZNF217-induced EMT (Fig. 5B). Similar data were obtained in HMLE-ZNF217 cells exposed to SB431542 or transfected with siRNA Smad4 (Supplementary Fig. S4A and S4B). Disrupting the TGF- $\beta$  pathway using SB431542 was also able to prevent ZNF217-overexpressing MCF10A cells from ZNF217-promoted migration (Fig. 5C). Overall, these data thus strongly suggest that, firstly, ZNF217-induced EMT and migration in mammary epithelial cells is reversible; and secondly, that ZNF217-induced EMT is TGF- $\beta$  type I receptor-dependent and Smad4-dependent. These data were supported by the observation that the expression of *TGFB1*, *TGFB2* and *TGFB3* mRNA was significantly higher in MCF10A-ZNF217 cells than in the control cells (Fig. 5D). To investigate whether TGF- $\beta$ s autocrine production was paired with TGF- $\beta$  pathway activation, supernatant from MCF10A-ZNF217 cells was used to analyze the transcriptional activity of a CAGA (Smad binding elements)-luciferase reporter plasmid in HEK-293T cells. We found that supernatant from MCF10A-ZNF217 cells induced a significant increase in CAGA-driven luciferase activity (in comparison to CAGA-luciferase-transfected HEK-293T cells exposed to supernatant from MCF10A-pcDNA6 cells) (Fig. 5E,  $P < 0.01$ ). Overall, these data indicate that ZNF217 overexpression in MCF10A cells is paired with secretion of active TGF- $\beta$ s.

In conclusion, these observations strongly suggest that increased expression of TGF- $\beta$ s may contribute, *via* an autocrine mechanism, to the constitutive activation of the TGF- $\beta$  pathway in MCF10-ZNF217 cells, and that the TGF- $\beta$  pathway is a major driver of ZNF217-induced EMT features.

## Discussion

The major findings of our study were that expression of *ZNF217* mRNA is significantly upregulated in the primary breast tumors of patients who subsequently relapsed and developed metastases and that high levels of expression of *ZNF217* mRNA are significantly associated with shorter RFS. Our findings were strongly supported by validation in three independent cohorts of patients with breast tumors and in two retrospective analyses of publically available transcriptomic data sets. To our knowledge, this is the first report that *ZNF217* mRNA levels have prognostic value in cancer patients, except for a very recent study that found elevated expression of *ZNF217* to be associated with poor survival in patients with glioma (Mao *et al.*, 2011).

We were thus able to classify breast tumors on the basis of *ZNF217* mRNA expression as those with “good prognosis” (low expression of *ZNF217*) or those with “poor prognosis” (high expression of *ZNF217*). This stratification could be refined in the CLB2 cohort using a signature based on both *ZNF217* mRNA-expression levels and lymph-node status, which allowed to define three classes of breast-cancer patients in this cohort (good, intermediate or poor prognosis). In the CRH cohort, lymph-node status was, as in the CLB2 cohort, also associated with shorter RFS ( $P = 0.03$ , log-rank test, data not shown). When *ZNF217* mRNA-expression levels and lymph-node status were then entered into a multivariate Cox model, only *ZNF217* persists in the model ( $P = 0.01$ , data not shown); this suggests firstly, that *ZNF217* is an independent prognostic marker and secondly, that *ZNF217* mRNA expression is more informative as a prognostic marker than is lymph-node status in this cohort. In the cohort described by Ma *et al.* (Ma *et al.*, 2004) and in the CLB1 cohort, lymph-node status had no prognostic value (data not shown), demonstrating that, in these cohorts, the prognostic value of *ZNF217* was again more informative than lymph-node status. Moreover, in these two cohorts, no association between ER, PR or HER2 and RFS was found (data not shown),

suggesting once more that *ZNF217* was more informative than these conventional biomarkers in these two cohorts. Overall, these data from four independent cohorts of patients with breast cancer suggest that either: (i) *ZNF217* mRNA expression is of higher prognostic value in relation to RFS than other conventional biomarkers, including lymph-node status, allowing stratification of patients into two classes (with poor or good prognosis); or (ii) a strong prognostic signature based on both *ZNF217* mRNA-expression levels and lymph-node status could be considered to allow a more accurate re-stratification of breast-cancer patients into three classes with different prognoses (good, intermediate or poor) in terms of RFS. In both cases, it is clear that the *ZNF217* mRNA-expression level of a breast tumor is informative and provides a novel and powerful biomarker of poor prognosis that could aid clinicians in therapeutic decisions.

With the aim of identifying candidate targets for therapy in breast-cancer patients with high levels of *ZNF217* mRNA expression, we investigated the impact of overexpression of *ZNF217* on the behavior of breast-cancer cells. To our knowledge, only one study has briefly reported that silencing *ZNF217* in human ovarian-cancer cells is associated with decreased invasion (Sun *et al.*, 2008a). Our study demonstrates that overexpression of *ZNF217* in breast-cancer cells *in vitro* triggers anchorage-independent growth and stimulates migration and invasion. Conversely, silencing endogenous expression of *ZNF217* in D3H2LN invasive breast-cancer cells leads to a significant decrease in migration and invasion.

During oncogenesis, epithelial tumor cells undergo EMT and acquire a phenotype that features enhanced migratory capacity and invasiveness (Kalluri & Weinberg, 2009; Xu *et al.*, 2009). Another major finding of our study was that *ZNF217* promotes features of EMT in two independent models of human mammary epithelial cells, paired with the downregulation of *CDH1/E-cadherin* expression (Fig. 6), both at the mRNA and protein levels. A previous work has shown that a consensus core-recognition sequence has been identified as a *ZNF217*

binding site within the *E-cadherin* promoter and that the ZNF217 complex is present on the *E-cadherin* promoter in breast-cancer cells, driving downregulation of luciferase activity in a reporter-gene assay (Cowger *et al.*, 2007). Our study clearly showed that ZNF217 overexpression is able to promote the downregulation of endogenous mRNA levels of *E-cadherin*, supporting for the first time at the endogenous cellular level the observations made by Cowger *et al.* (Cowger *et al.*, 2007). During tumor progression, *E-cadherin* is known to be functionally inactivated or silenced by different mechanisms, and more importantly by transcriptional repression at the promoter level *via* several transcription factors, like HLH factors, zinc-fingers factors, or ZEB family factors (Xu *et al.*, 2009). ZNF217 could thus represent a new important transcription factor promoting EMT and belonging to the family of zinc-finger factors, like Snail or Slug transcription factors.

Several lines of evidence have implicated upregulation in the TGF- $\beta$  signaling pathway as a key effector of EMT in cancer progression and metastasis (Thiery *et al.*, 2009). Sustained TGF- $\beta$ R signaling (caused by, for example, an autocrine TGF- $\beta$  loop) can be required for the maintenance of EMT in epithelial cells and for metastasis in several mouse models (Grunert *et al.*, 2003). Our study demonstrates that the TGF- $\beta$  pathway is a major driver of ZNF217-induced EMT (Fig. 6). We clearly show that in ZNF217-overexpressing mammary epithelial cells, a sustained activated TGF- $\beta$  pathway is present, as the consequence of a TGF- $\beta$  autocrine loop. Indeed, we showed that ZNF217 overexpression is paired with autocrine secretion of active TGF- $\beta$ s, leading to activation of TGF- $\beta$  pathway (Smad binding elements-luciferase reporter assay data). When searching for ZNF217-binding sites (Cowger *et al.*, 2007; Krig *et al.*, 2007), one ZNF217-binding site was found for *TGF- $\beta$ 1*, four for *TGF- $\beta$ 2* and three for *TGF- $\beta$ 3* genes (-2 Kb to +1 Kb promoter region analyzed). These analyses suggest that ZNF217 could directly and positively regulate the transcription of genes coding for these TGF- $\beta$ RII ligands, to sustain a constitutively activated TGF- $\beta$  signaling

pathway. Moreover, we detected increased mRNA levels of several transcription factors known to be up-regulated at the transcriptional level by TGF- $\beta$  (Fuxe *et al.*, 2010)Fig. 6). Our work also shows that inhibition of the TGF- $\beta$  pathway leads to the at least partial reversal of ZNF217-dependent features of EMT. Our data strongly support the novel finding that the TGF- $\beta$  pathway plays a major role in ZNF217 function, and more precisely, that TGF- $\beta$ -activated Smad signaling is clearly involved in ZNF217-induced EMT. Previous work has shown that transduction of human mammalian epithelial cells with *ZNF217* leads to cell immortalization and resistance to TGF- $\beta$  growth inhibition (Nonet *et al.*, 2001), and this observation, together with our own data, strongly indicates that close cross-talk exists between ZNF217 and the TGF- $\beta$  signaling pathway.

Overall, our new findings have very important medical applications: (i) ZNF217 mRNA-expression level of a breast tumor is informative and provides a novel and powerful biomarker of poor prognosis that could aid clinicians in therapeutic decisions; (ii) clinical strategies to counteract ZNF217-mediated effects, either by targeting ZNF217 directly and/or by targeting TGF- $\beta$  signaling using clinically-tested inhibitors (Korpal & Kang, 2010), could be a potentially valuable approach to the management of breast cancer, in particular for the sub-population of breast tumors we have identified that possesses high levels of ZNF217 mRNA expression and poor prognosis.

## **Acknowledgments**

We are grateful to the Centre de Ressources Biologiques of the Centre Léon Bérard and of the Centre René Huguenin for providing breast tumor samples and to the RIO Imaging platform of the CRBM (Montpellier, France). We thank Dr H. Mattock for editing the manuscript, S. Léon-Goddard for technical support, Dr Weinberg for providing HMEL cells and Dr C. Nguyen for fruitful discussions.

## **Grant Support**

This work was supported by Lyon Science Transfert (Université Claude Bernard Lyon 1) and the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité Saône-et-Loire).

## References

1. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Piper J, Tanner M, Stokke T, Chen L, et al. Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2156-60.
2. Nonet GH, Stampfer MR, Chin K, Gray JW, Collins CC, Yaswen P. The ZNF217 gene amplified in breast cancers promotes immortalization of human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2001;61:1250-4.
3. Li P, Maines-Bandiera S, Kuo WL, Guan Y, Sun Y, Hills M, et al. Multiple roles of the candidate oncogene ZNF217 in ovarian epithelial neoplastic progression. *Int J Cancer* 2007;120:1863-73.
4. Collins C, Volik S, Kowbel D, Ginzinger D, Ylstra B, Cloutier T, et al. Comprehensive genome sequence analysis of a breast cancer amplicon. *Genome Res* 2001;11:1034-42.
5. Quinlan KG, Nardini M, Verger A, Francescato P, Yaswen P, Corda D, et al. Specific recognition of ZNF217 and other zinc finger proteins at a surface groove of C-terminal binding proteins. *Mol Cell Biol* 2006;26:8159-72.
6. Cowger JJ, Zhao Q, Isovic M, Torchia J. Biochemical characterization of the zinc-finger protein 217 transcriptional repressor complex: identification of a ZNF217 consensus recognition sequence. *Oncogene* 2007;26:3378-86.
7. Banck MS, Li S, Nishio H, Wang C, Beutler AS, Walsh MJ. The ZNF217 oncogene is a candidate organizer of repressive histone modifiers. *Epigenetics* 2009;4:100-6.
8. Krig SR, Jin VX, Bieda MC, O'Geen H, Yaswen P, Green R, et al. Identification of genes directly regulated by the oncogene ZNF217 using chromatin immunoprecipitation (ChIP)-chip assays. *J Biol Chem* 2007;282:9703-12.
9. Thillainadesan G, Isovic M, Loney E, Andrews J, Tini M, Torchia J. Genome analysis identifies the p15ink4b tumor suppressor as a direct target of the ZNF217/CoREST complex. *Mol Cell Biol* 2008;28:6066-77.
10. Huang G, Krig S, Kowbel D, Xu H, Hyun B, Volik S, et al. ZNF217 suppresses cell death associated with chemotherapy and telomere dysfunction. *Hum Mol Genet* 2005;14:3219-25.
11. Thollet A, Vendrell JA, Payen L, Ghayad SE, Ben Larbi S, Grisard E, et al. ZNF217 confers resistance to the pro-apoptotic signals of paclitaxel and aberrant expression of Aurora-A in breast cancer cells. *Mol Cancer* 2010;9:291.
12. Krig SR, Miller JK, Frietze S, Beckett LA, Neve RM, Farnham PJ, et al. ZNF217, a candidate breast cancer oncogene amplified at 20q13, regulates expression of the ErbB3 receptor tyrosine kinase in breast cancer cells. *Oncogene* 2010;29:5500-10.
13. Sun Y, Wong N, Guan Y, Salamanca CM, Cheng JC, Lee JM, et al. The eukaryotic translation elongation factor eEF1A2 induces neoplastic properties and mediates tumorigenic effects of ZNF217 in precursor cells of human ovarian carcinomas. *Int J Cancer* 2008;123:1761-9.
14. Mao XG, Yan M, Xue XY, Zhang X, Ren HG, Guo G, et al. Overexpression of ZNF217 in glioblastoma contributes to the maintenance of glioma stem cells regulated by hypoxia-inducible factors. *Lab Invest* 2011;91:1068-78.
15. Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Holli K, Collins C, Kowbel D, et al. Amplification of chromosomal region 20q13 in invasive breast cancer: prognostic implications. *Clin Cancer Res* 1995;1:1455-61.
16. Ginestier C, Cervera N, Finetti P, Esteyries S, Esterni B, Adelaide J, et al. Prognosis and gene expression profiling of 20q13-amplified breast cancers. *Clin Cancer Res* 2006;12:4533-44.

17. Letessier A, Sircoulomb F, Ginestier C, Cervera N, Monville F, Gelsi-Boyer V, et al. Frequency, prognostic impact, and subtype association of 8p12, 8q24, 11q13, 12p13, 17q12, and 20q13 amplifications in breast cancers. *BMC Cancer* 2006;6:245.
18. Collins C, Rommens JM, Kowbel D, Godfrey T, Tanner M, Hwang SI, et al. Positional cloning of ZNF217 and NABC1: genes amplified at 20q13.2 and overexpressed in breast carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8703-8.
19. Mackay A, Tamber N, Fenwick K, Iravani M, Grigoriadis A, Dexter T, et al. A high-resolution integrated analysis of genetic and expression profiles of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2009;118:481-98.
20. Ghayad SE, Vendrell JA, Bieche I, Spyros F, Dumontet C, Treilleux I, et al. Identification of TACC1, NOV, and PTTG1 as new candidate genes associated with endocrine therapy resistance in breast cancer. *J Mol Endocrinol* 2009;42:87-103.
21. Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, Isakoff SJ, Barmettler A, Fuller A, et al. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell* 2004;5:607-16.
22. Gyorffy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q, et al. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat* 2010;123:725-31.
23. Harrell FE. Regression modeling strategies. New York: Springer 2001.
24. Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WD, Brenz R, McGrath CM, et al. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res* 1990;50:6075-86.
25. Hesling C, Fattet L, Teyre G, Jury D, Gonzalo P, Lopez J, et al. Antagonistic regulation of EMT by TIF1gamma and Smad4 in mammary epithelial cells. *EMBO Rep* 2011;12:665-72.
26. Vinot S, Anguille C, de Toledo M, Gadea G, Roux P. Analysis of cell migration and its regulation by Rho GTPases and p53 in a three-dimensional environment. *Methods Enzymol* 2008;439:413-24.
27. Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *Embo J* 1998;17:3091-100.
28. Jenkins DE, Hornig YS, Oei Y, Dusich J, Purchio T. Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive *in vivo* detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice. *Breast Cancer Res* 2005;7:R444-54.
29. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009;119:1420-8.
30. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139:871-90.
31. Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, et al. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev* 2001;15:50-65.
32. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell* 2008;134:215-30.
33. ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 2004;29:265-73.
34. Valcourt U, Kowanetz M, Niimi H, Heldin CH, Moustakas A. TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol Biol Cell* 2005;16:1987-2002.
35. Sun G, Zhou J, Yin A, Ding Y, Zhong M. Silencing of ZNF217 gene influences the biological behavior of a human ovarian cancer cell line. *Int J Oncol* 2008;32:1065-71.

36. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 2009;19:156-72.
37. Grunert S, Jechlinger M, Beug H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:657-65.
38. Fuxe J, Vincent T, Garcia de Herreros A. Transcriptional crosstalk between TGF-beta and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle* 2010;9:2363-74.
39. Korpal M, Kang Y. Targeting the transforming growth factor-beta signalling pathway in metastatic cancer. *Eur J Cancer* 2010;46:1232-40.

## Figure Legends

**Figure 1.** *ZNF217* mRNA expression is associated with shorter RFS. Kaplan-Meier analyses (log-rank test) for RFS are shown (A) in the CLB1 cohort ( $n = 47$ ); (B) in the CRH cohort ( $n = 48$ ); (C) in the Ma's cohort ( $n = 60$ ) (Ma *et al.*, 2004); (D) for all patients using KM plotter ( $n = 2414$ ) (Gyorffy *et al.*, 2010); (E) in the CLB2 cohort ( $n = 100$ ). (F) Effect of the *ZNF217* mRNA levels/lymph-node status signature on RFS among the CLB2 cohort ( $n = 100$ ). Group A ( $n = 32$ ) contains the breast-cancer samples expressing low levels of *ZNF217* mRNA and with  $\leq 3$  involved lymph nodes. Group B ( $n = 46$ ) comprises breast-cancer samples with either high expression of *ZNF217* mRNA and  $\leq 3$  involved lymph nodes or low expression of *ZNF217* mRNA and  $> 3$  involved lymph nodes. Group C ( $n = 22$ ) contains the breast-cancer samples expressing high levels of *ZNF217* mRNA and with  $> 3$  involved lymph nodes.

**Figure 2.** *ZNF217* promotes anchorage-independent growth, migration and invasion of breast-cancer cells. (A) Overexpression of *ZNF217* in MDA-MB-231 cells increases the ability of these cells to form colonies in soft agar. Photographs taken 20 days after plating (Scale bar, 1 mm). Histogram represents the counting of colonies (means  $\pm$  SD from at least three independent experiments). (B) Wound-healing assay. Images ( $\times 2.5$  magnification) are representative of at least three independent experiments. (C) Western-blot analysis of phospho-FAK Y397, phospho-FAK Y577 and FAK expression. Histograms represent quantification of western-blot signals (means  $\pm$  SD of three independent experiments). (D) Confluent monolayers of *ZNF217*-1 transfected or not (NT) with either scrambled RNA, siRNA-A *ZNF217* or siRNA-B *ZNF217* wounded by scratching. Images ( $\times 2.5$  magnification) are representative of at least three independent experiments. (E) Representative images of cell invasion Matrigel assay from at least three independent experiments (Scale bar, 200  $\mu$ m). (F) Boyden chamber assay performed in triplicate. Results are means  $\pm$  SD. \*\*\* $P < 0.001$  (Student t-test).

**Figure 3.** Silencing of ZNF217 in D3H2LN cells decreases cell migration and invasion. (A) Western-blot analysis of ZNF217. Histograms represent quantification of western-blot signals (means ± SD of independent experiments). (B) Confluent monolayers of D3H2LN cells transfected or not with either scrambled RNA, siRNA-A ZNF217 or siRNA-B ZNF217 wounded by scratching. Images ( $\times 2.5$  magnification) are representative of at least two independent experiments. (C) Boyden chamber assay performed in triplicate. Results are expressed as means ± SD. \*\*\* $P < 0.001$  (Student t-test).

**Figure 4.** ZNF217 induces EMT in MCF10A cells. (A) Gene expression of *E-Cadherin/CDH1* measured by RTQ-PCR (means ± SD of at least three independent experiments). (B) Representative images of MCF10A-pcDNA6 and MCF10A-ZNF217 cell morphology ( $\times 10$  magnification). (C) Western-blot analysis of ZNF217, epithelial markers and mesenchymal markers. Signal quantifications of at least three independent western-blot are presented in Supplementary Fig. S5. (D) Gene expression of transcription factors known to be major driver of EMT were measured by RTQ-PCR (means ± SD of at least three independent experiments). \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  (Student t-test).

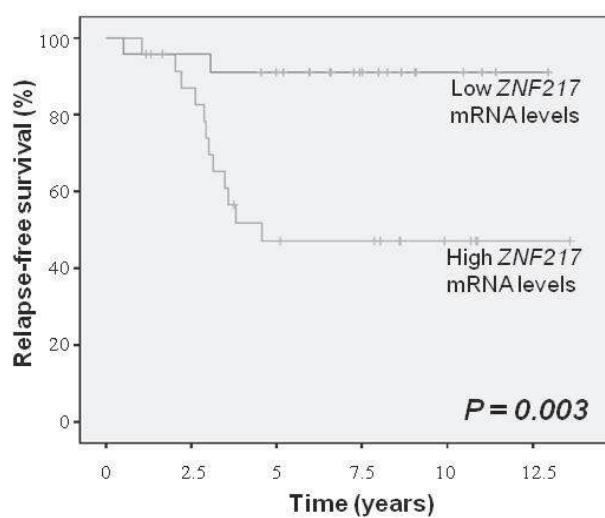
**Figure 5.** Inhibition of the TGF- $\beta$  signaling pathway reverses ZNF217-induced EMT and migration. (A) Immunofluorescence acquisition (Scale bar, 25  $\mu\text{m}$ ) showing E-cadherin and actin subcellular localization in MCF10A-pcDNA6 cells and in MCF10A-ZNF217 cells in the absence or after 48h exposure to TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) or TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) + SB431542 (10 nM). (B) Immunofluorescence acquisition (Scale bar, 25  $\mu\text{m}$ ) showing E-cadherin and actin subcellular localization in MCF10A-pcDNA6 cells and in MCF10A-ZNF217 cells transfected with scrambled RNA, siRNA-A Smad4 or siRNA-B Smad4. TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) exposure was for 72h post-transfection. Western-blot analysis of Smad4 expression in MCF10A-pcDNA6 and MCF10A-ZNF217 cells transfected or not with either scrambled RNA, siRNA-A Smad4 or siRNA-B Smad4 is presented in Supplementary Fig. S6. (C) Confluent monolayers of

MCF10A-pcDNA6 and MCF10A-ZNF217 were wounded by scratching and then treated or not with SB431542 (10 nM). Images ( $\times 2.5$  magnification) are representative of at least three independent experiments. Histograms represent the distance between edges of the wound. (D) Gene expression of TGF- $\beta$  family members measured by RTQ-PCR (means  $\pm$  SD of at least three independent experiments). (E) HEK-293T cells were cotransfected with the CAGA-Luc plasmid and the pTK-RL plasmid. HEK-293T cells were then incubated with supernatant (1:1 and 1:2 dilutions) from MCF10A-pcDNA6 and MCF10A-ZNF217 cells. Firefly luciferase activity was measured and normalized to the Renilla luciferase activity. The results presented are means  $\pm$  SD of at least three independent experiments. \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  (Student t-test).

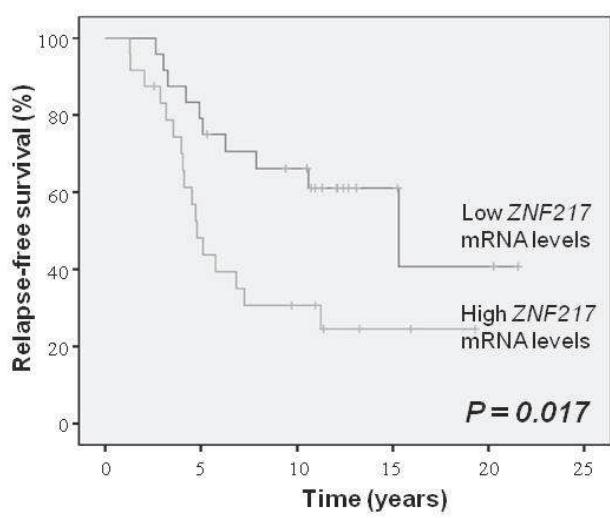
**Figure 6.** ZNF217 and EMT

**Figure 1**

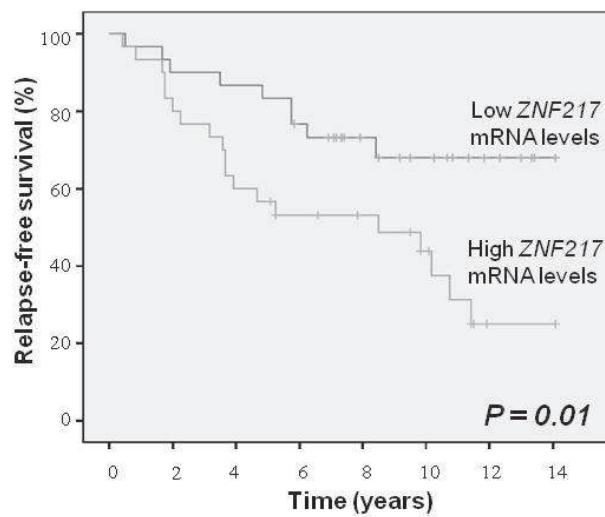
A



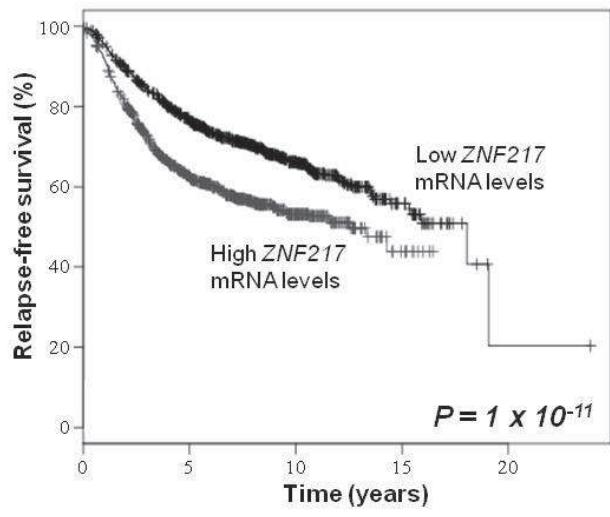
B



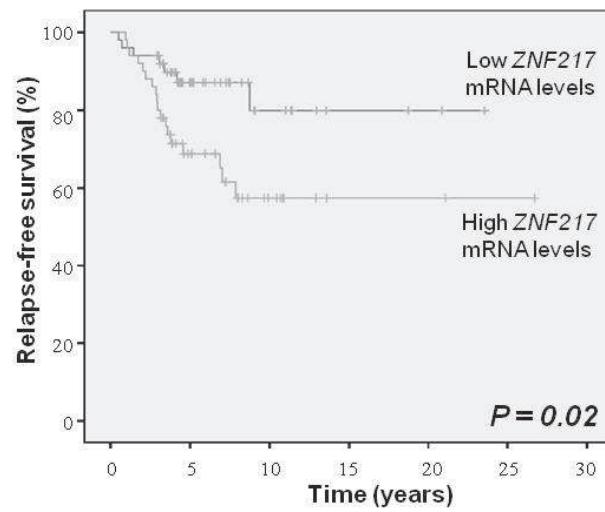
C



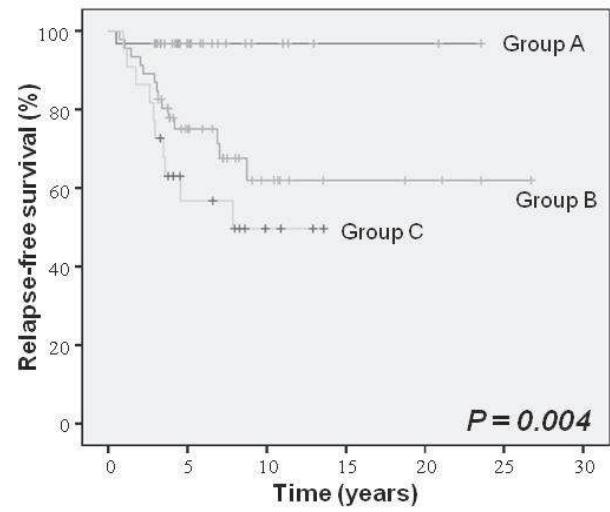
D



E

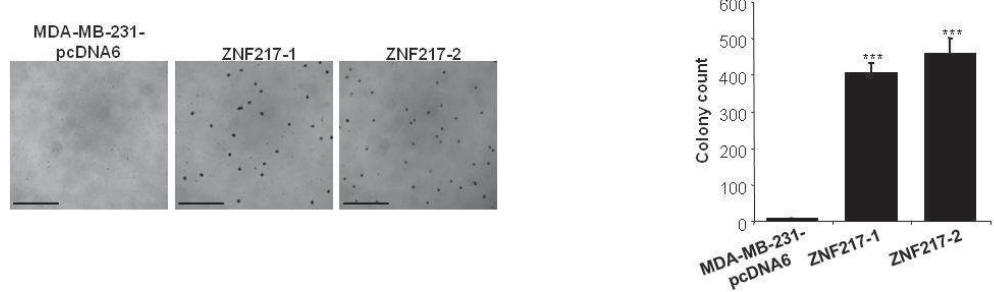


F

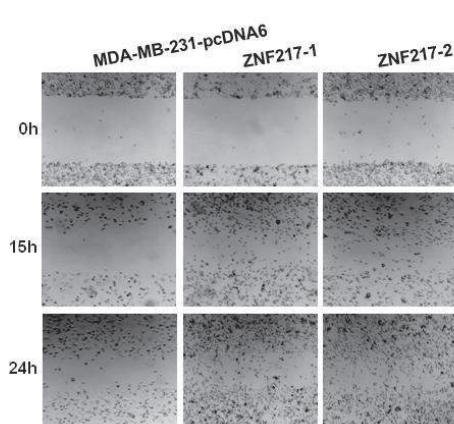


**Figure 2**

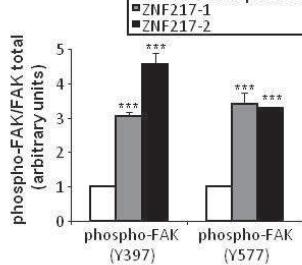
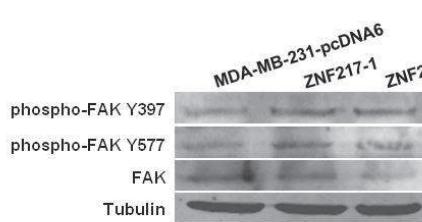
**A**



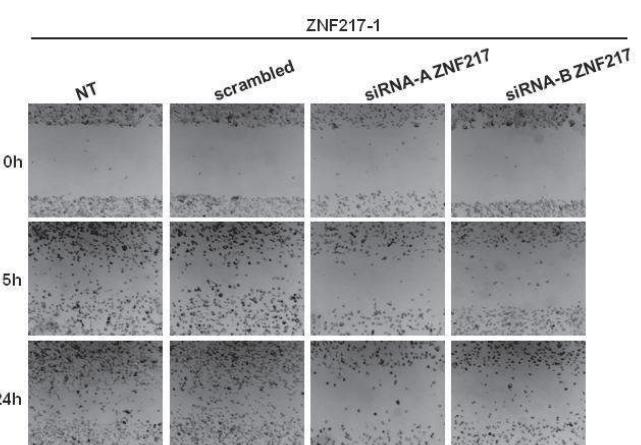
**B**



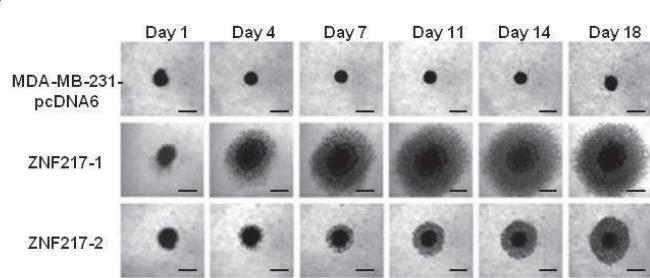
**C**



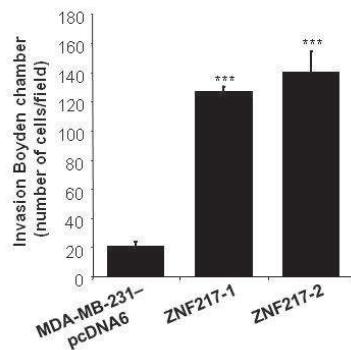
**D**



**E**

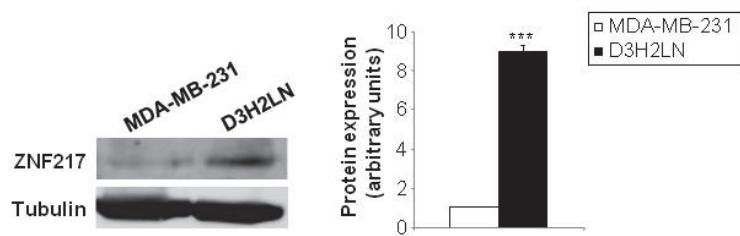


**F**

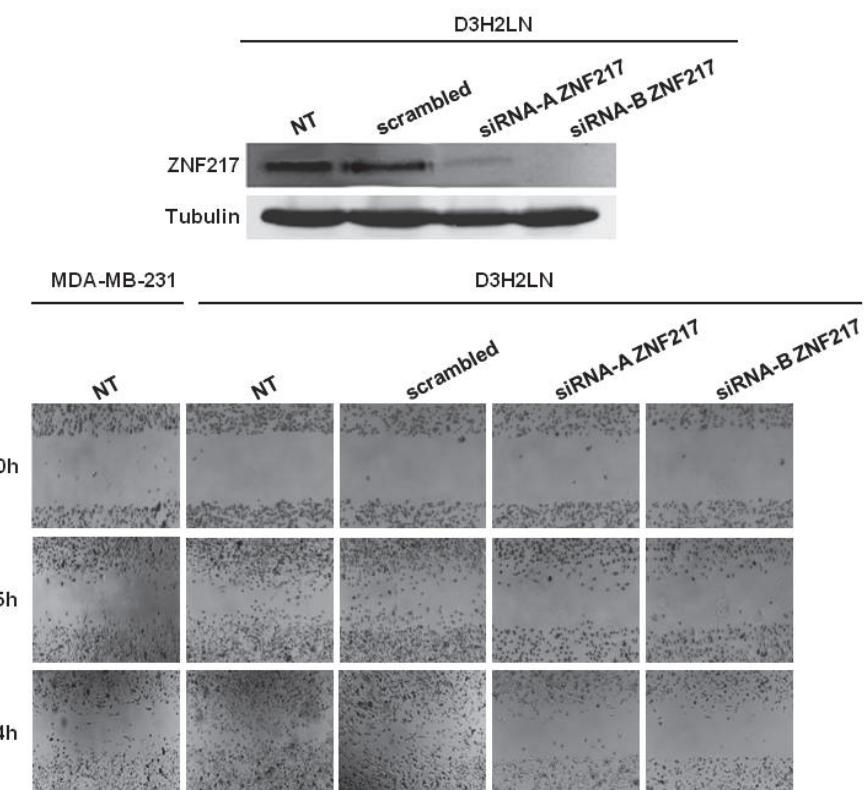


**Figure 3**

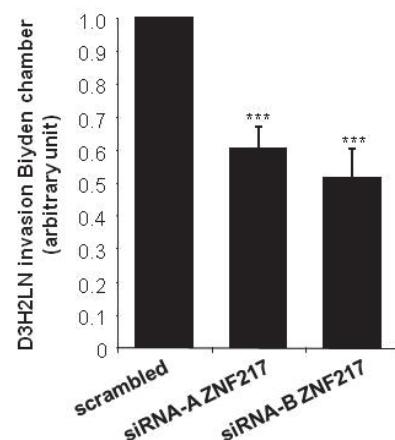
**A**



**B**

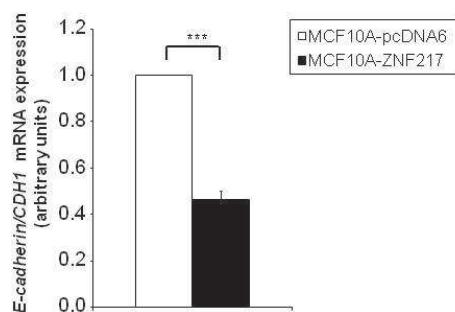


**C**

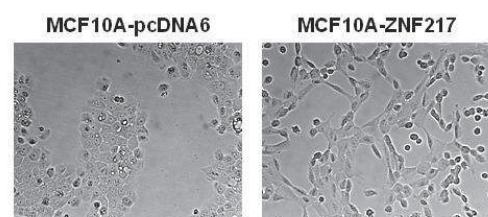


**Figure 4**

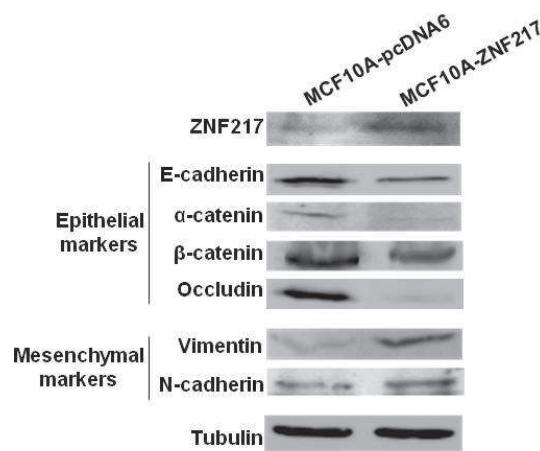
**A**



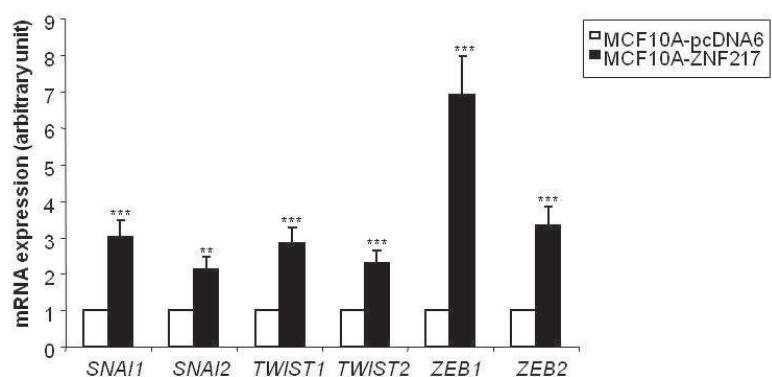
**B**

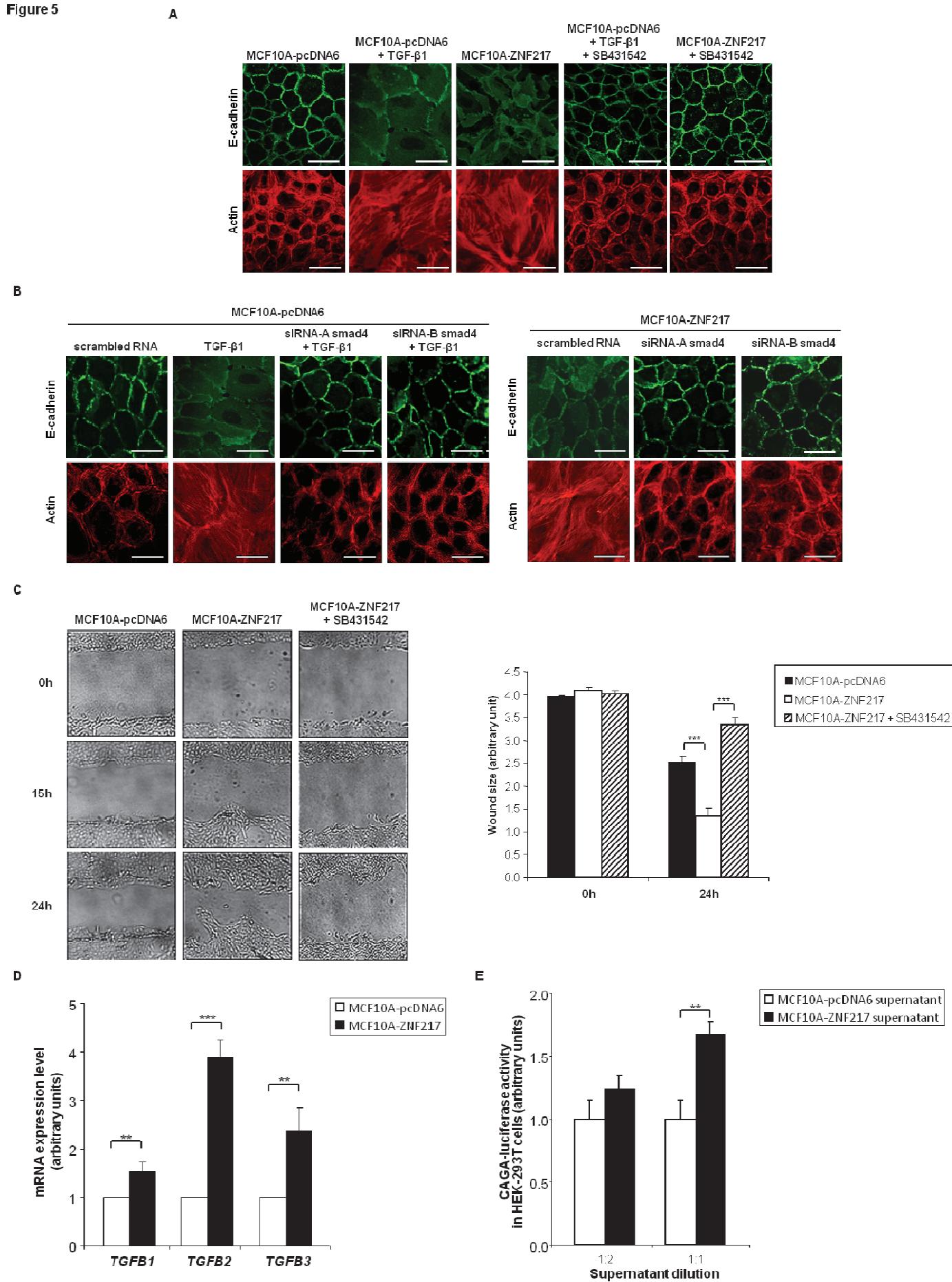


**C**

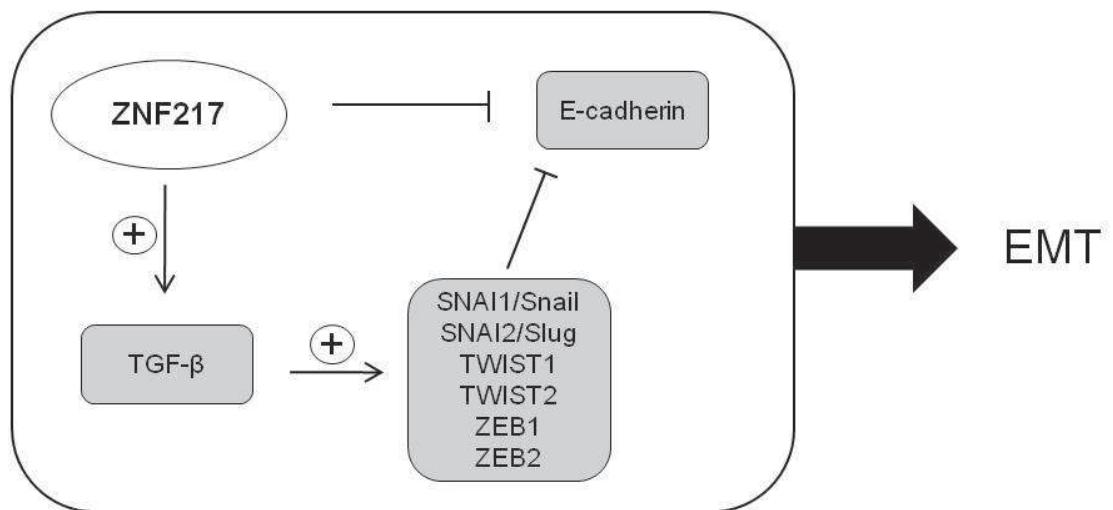


**D**



**Figure 5**

**Figure 6**



## SUPPLEMENTARY INFORMATION

### Supplementary Materials and Methods

#### Cell culture

HMLE cells, which are human mammary epithelial cells that have been transformed by introduction of *hTERT* and the SV40 large-T antigen, were cultured as described previously (Elenbaas *et al.*, 2001).

#### Cell proliferation/viability assay

Cells (20,000 per well) were plated in DMEM onto a 24-well plate. Proliferating cells were counted using a Malassez chamber.

#### ZNF217 stable transfectants

To obtain stable transfectants of HMLE-pcDNA6 and HMLE-ZNF217, transfections were performed as described previously (Thollet *et al.*, 2010).

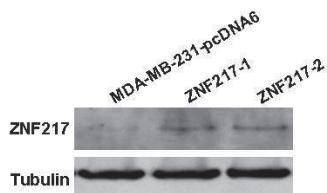
#### Western blot

Antibodies used were: anti-ZNF217 (Abcam Ltd); antibodies to  $\alpha$ -catenin and fibronectin were from BD Biosciences; anti-occludin (Zymed Laboratories); anti-vimentin (Dako); anti-Smad4 (Cell Signaling) and anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich).

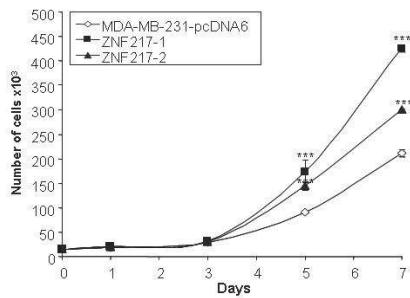
## **Supplementary references**

1. Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, et al. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev* 2001;15:50-65.
2. Thollet A, Vendrell JA, Payen L, Ghayad SE, Ben Larbi S, Grisard E, et al. ZNF217 confers resistance to the pro-apoptotic signals of paclitaxel and aberrant expression of Aurora-A in breast cancer cells. *Mol Cancer* 2010;9:291.
3. Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, Isakoff SJ, Barmettler A, Fuller A, et al. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell* 2004;5:607-16.

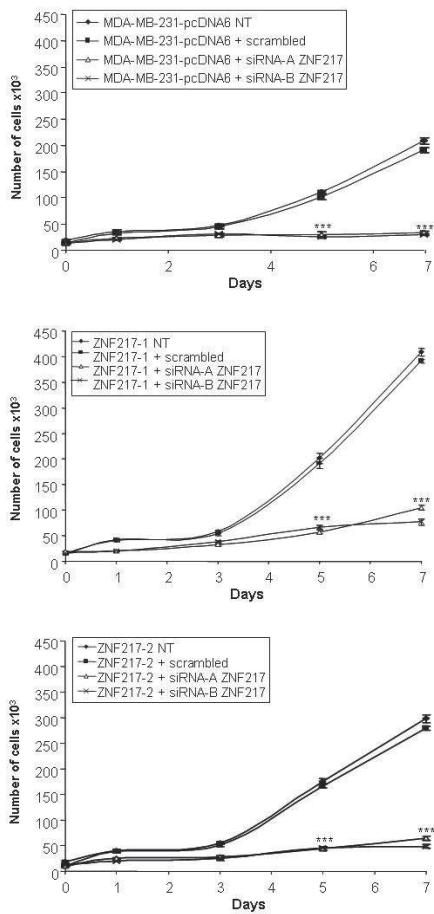
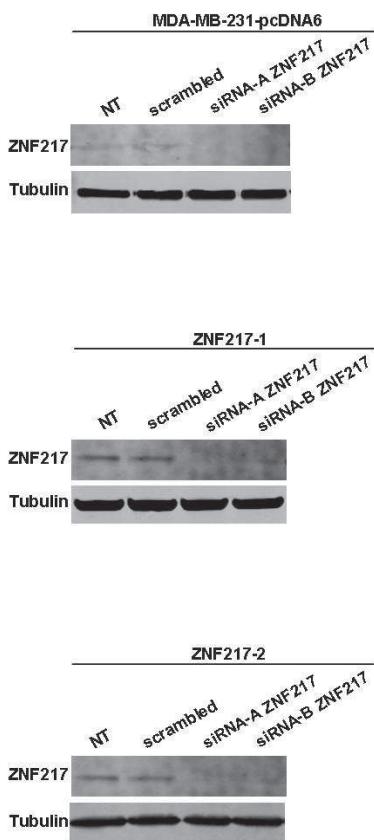
A



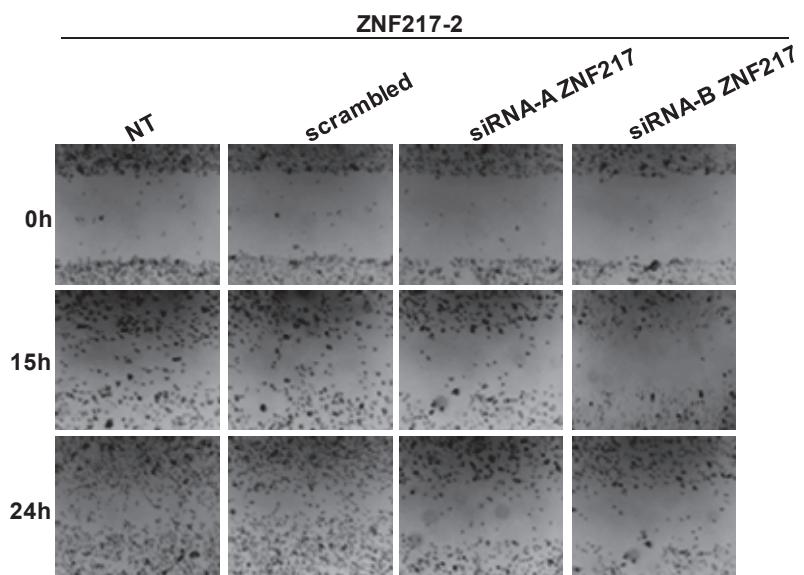
B



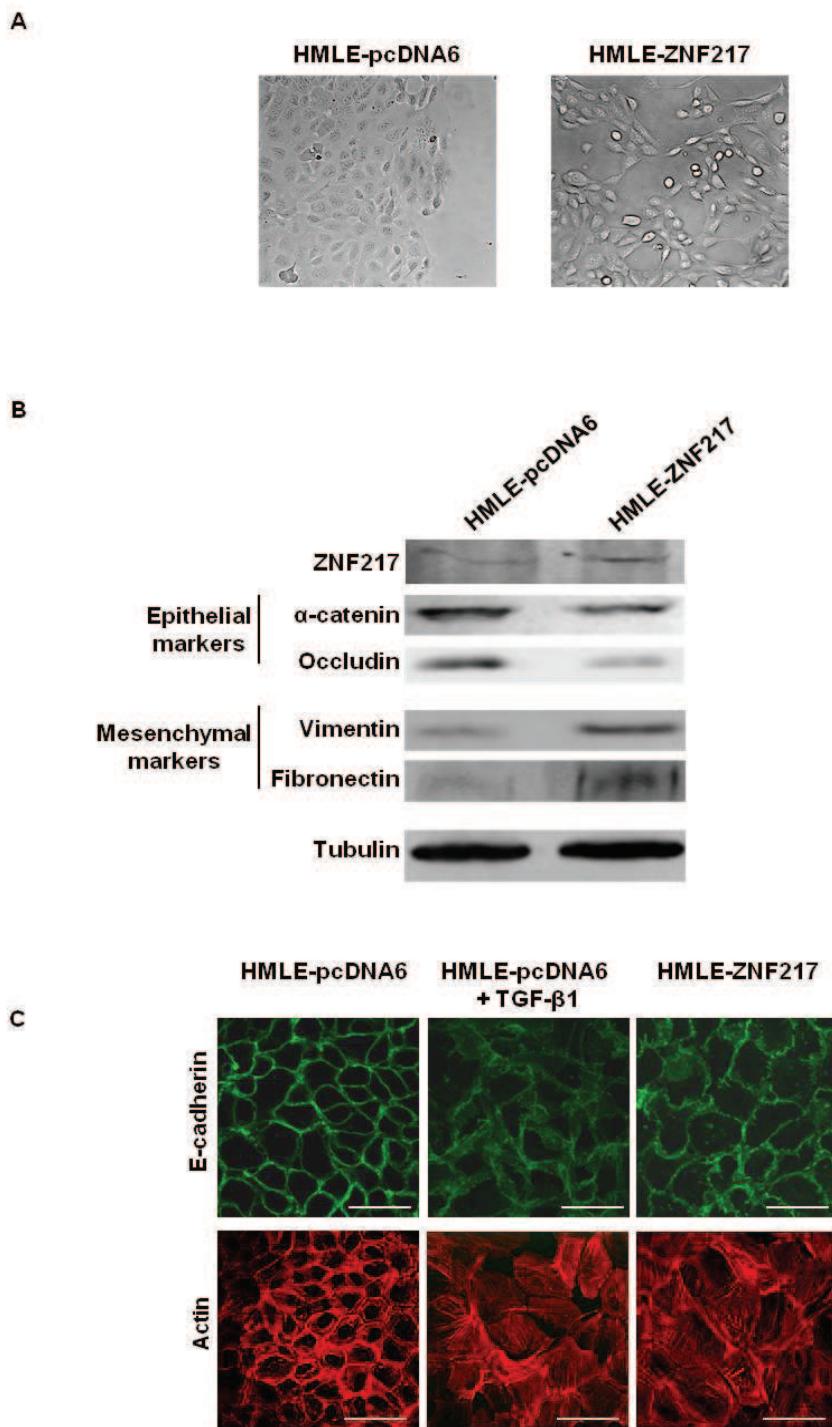
C



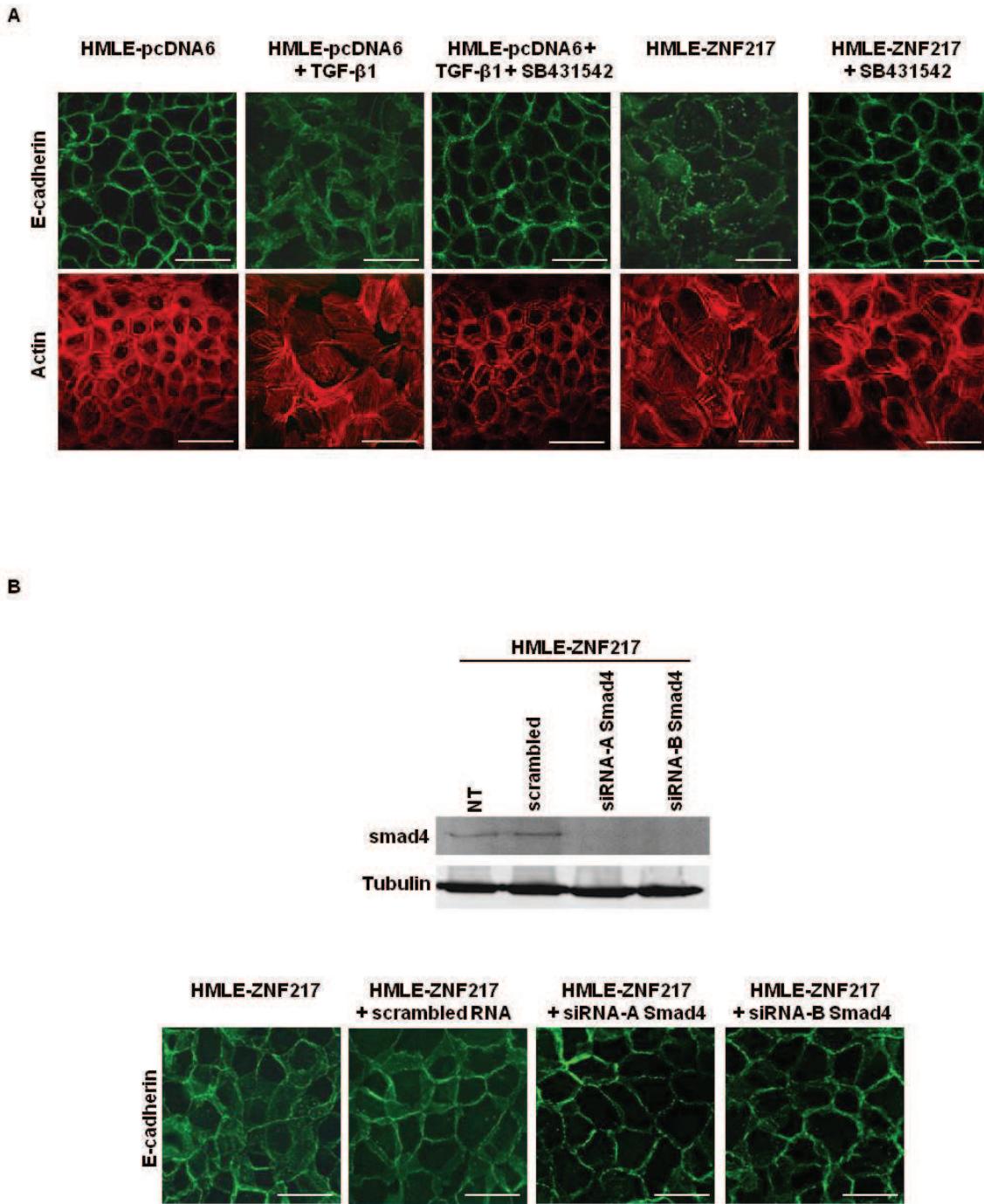
**Supplementary Figure S1.** ZNF217-overexpressing stable cells, ZNF217-1 and ZNF217-2 (Thollet *et al.*, 2010), display increased cell proliferation/viability. (A) Western-blot analysis of ZNF217. (B) Cell proliferation/viability was analyzed by counting the number of cells after 0, 1, 3, 5 and 7 days of culture. Results are expressed as means  $\pm$  SD from three independent experiments. (C) Western-blot analysis of ZNF217 in cells transfected or not (NT) with either scrambled RNA, siRNA-A ZNF217 or siRNA-B ZNF217. Cell proliferation/viability was analyzed by counting the number of cells after 0, 1, 3, 5 and 7 days of culture. Results are expressed as means  $\pm$  SD from three independent experiments. \*\*\* $P$  < 0.001 (Student *t*-test).



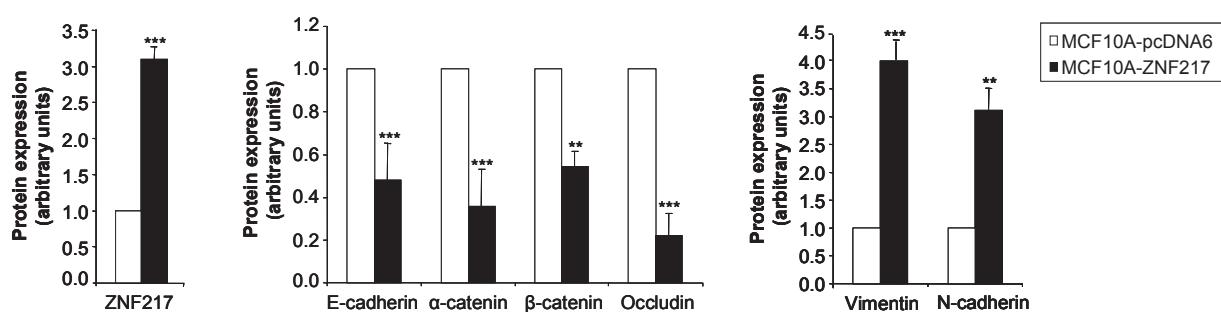
**Supplementary Figure S2.** ZNF217 silencing inhibits ZNF217-2 cells migration. Confluent monolayers of ZNF217-2 cells transfected or not (NT) with either scrambled RNA, siRNA-A ZNF217 or siRNA-B ZNF217 were wounded by scratching and photographed at 0, 15 or 24 hours. Images ( $\times 2.5$  magnification) are representative of at least three independent experiments.



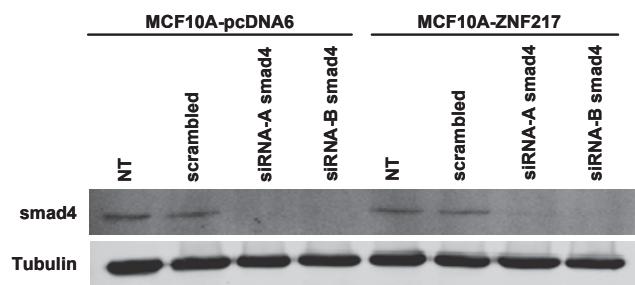
**Supplementary Figure S3.** ZNF217 induces EMT in HMLE cells. (A) Representative images of HMLE-pcDNA6 and HMLE-ZNF217 cell morphology at  $\times 10$  magnification. (B) Western-blot analysis of ZNF217, epithelial markers and mesenchymal markers. (C) Immunofluorescence acquisition showing E-cadherin and actin subcellular localization in HMLE-pcDNA6 cells (treated or not for 48 hours with 5 ng/ml of TGF- $\beta$ 1) and in HMLE-ZNF217 cells. Scale bar, 25  $\mu$ m.



**Supplementary Figure S4.** Inhibition of the TGF- $\beta$  signaling pathway reverses ZNF217-induced EMT in HMLE cells. (A) Immunofluorescence acquisition showing E-cadherin and actin subcellular localization in HMLE-pcDNA6 and HMLE-ZNF217 cells treated (for 48 hours) or not with 10 nM of SB431542. (B) Western-blot analysis of Smad4 in HMLE-ZNF217 cells transfected or not with either scrambled RNA, siRNA-A Smad4 or siRNA-B Smad4. Immunofluorescence acquisition shows E-cadherin subcellular localization in these cells (Scale bar, 25  $\mu$ m).



**Supplementary Figure S5.** Quantification of western-blot signals (Fig. 4C) for ZNF217, epithelial markers (E-cadherin,  $\alpha$ -catenin,  $\beta$ -catenin and occludin) and mesenchymal markers (vimentin and N-cadherin) in MCF10A-pcDNA6 cells and in MCF10A-ZNF217 cells. Histograms represent quantification of protein expression normalized to tubulin expression (means  $\pm$  SD of at least three independent experiments). \*\* $P$  < 0.01 and \*\*\* $P$  < 0.001 (Student  $t$ -test).



**Supplementary Figure S6.** In addition to Figure 5B, western-blot analysis (72 hours post-transfection) of Smad4 in cells transfected or not with either scrambled RNA, siRNA-A Smad4 or siRNA-B Smad4.

**Supplementary Table S1.** Patients from the CLB1 cohort: Characteristics of the 47 patients with primary breast cancer

	Number of patients		<i>P</i> <sup>a</sup>
	Met- group (n = 33)	Met+ group (n = 14)	
Age (years)			
≤ 50	15	10	NS (0.19)
> 50	18	4	
Histological grade <sup>b</sup>			
I + II	15	10	NS (0.22)
III	17	4	
Lymph-node status			
≤ 3 involved	19	7	NS (0.88)
> 3 involved	14	7	
Macroscopic tumor size			
≤ 20 mm	3	1	NS (0.72)
> 20 mm	30	13	
Estrogen-receptor status <sup>c</sup>			
Positive	25	7	NS (0.16)
Negative	8	7	
HER2 status <sup>d</sup>			
Positive	7	5	NS (0.41)
Negative	26	8	

<sup>a</sup>*P*-value ( $\chi^2$  test) was considered significant when *P* < 0.05. <sup>b</sup>Scarff-Bloom-Richardson classification. Information available for 46 patients. <sup>c</sup>Measured by immunohistochemistry. <sup>d</sup>Measured by immunohistochemistry (validated by FISH for few samples). Information available for 46 patients

NOTE: Met- group, patients who had not developed metastases subsequent to post-operative chemotherapy and/or endocrine therapy; Met+ group, patients who had developed metastases subsequent to post-operative chemotherapy and/or endocrine therapy; NS, not significant.

**Supporting Table S2.** Patients from the CLB2 cohort: Characteristics of the 100 patients with primary breast cancer

	Number of patients		<i>P</i> <sup>a</sup>
	Met- group (n = 75)	Met+ group (n = 25)	
Age (years)			
≤ 50	39	14	NS (0.91)
> 50	36	11	
Histological grade <sup>b</sup>			
I + II	28	13	NS (0.31)
III	46	12	
Lymph-node status			
≤ 3 involved	51	9	0.009
> 3 involved	24	16	
Macroscopic tumor size			
≤ 20 mm	6	1	NS (0.82)
> 20 mm	69	24	
Estrogen-receptor status <sup>c</sup>			
Positive	48	12	NS (0.24)
Negative	27	13	
Progesterone-receptor status <sup>c</sup>			
Positive	50	13	NS (0.28)
Negative	25	12	
HER2 status <sup>d</sup>			
Positive	18	10	NS (0.16)
Negative	57	14	

<sup>a</sup>*P*-value ( $\chi^2$  test) was considered significant when *P* < 0.05. <sup>b</sup>Scarff-Bloom-Richardson classification. Information available for 99 patients. <sup>c</sup>Measured by immunohistochemistry. <sup>d</sup>Measured by immunohistochemistry (validated by FISH for few samples). Information available for 99 patients.

NOTE: Met- group, patients who had not developed metastases subsequent to post-operative chemotherapy and/or endocrine therapy; Met+ group, patients who had developed metastases subsequent to post-operative chemotherapy and/or endocrine therapy; NS, not significant.

**Supplementary Table S3.** RTQ-PCR analysis of levels of *ZNF217* mRNA expression. Statistical comparison in women who did (Met+) or did not (Met-) subsequently develop metastases

Cohort	Tumor samples	Number of samples	mRNA levels (arbitrary units)		
			Median	Range	P <sup>a</sup>
CLB1 cohort	Met-	33	1.00	0.06-7.17	0.002
	Met+	14	2.52	0.42-11.26	
CRH cohort	Met-	21	1.00	0-2.75	0.0008
	Met+	27	2.39	0.31-18.71	
Ma's cohort (Ref. 3)	Met-	32	1.00	0.001-9.04	0.0007
	Met+	28	4.20	0.001-13.15	
CLB2 cohort	Met-	75	1.00	0.03-152.55	0.025
	Met+	25	1.65	0.05-28.48	

<sup>a</sup>P-value (Mann-Whitney test) was considered significant when P < 0.05

NOTE: RTQ-PCR, Real-time quantitative PCR.

**Supplementary Table S4.** Relationship between levels of *ZNF217* mRNA expression in breast-tumor samples and clinical and pathological parameters in women from the CLB2 cohort

	Number of samples	mRNA levels (arbitrary units)		
		Median	Range	P <sup>a</sup>
Age (years)				
≤ 50	53	1.24	0.03-152.55	NS (0.75)
> 50	47	1.08	0.03-133.38	
Histological grade <sup>b</sup>				
I + II	41	1.48	0.03-133.38	NS (0.47)
III	58	1.00	0.03-152.55	
Lymph-node status				
≤ 3 involved	60	1.08	0.03-133.38	NS (0.58)
> 3 involved	40	1.27	0.03-152.55	
Macroscopic tumor size				
≤ 20 mm	7	1.78	0.43-133.48	NS (0.14)
> 20 mm	93	1.08	0.03-152.55	
Estrogen-receptor status <sup>c</sup>				
Positive	60	1.11	0.03-152.55	NS (0.44)
Negative	40	1.24	0.03-33.56	
Progesterone-receptor status <sup>c</sup>				
Positive	63	1.08	0.03-152.55	NS (0.65)
Negative	37	1.21	0.03-33.56	
HER2 status <sup>d</sup>				
Positive	28	1.32	0.11-152.55	NS (0.70)
Negative	71	1.08	0.03-133.38	

<sup>a</sup>P-value (Mann-Whitney test) was considered significant when P < 0.05. <sup>b</sup>Scarff-Bloom-Richardson classification. Information available for 99 patients. <sup>c</sup>Measured by immunohistochemistry. <sup>d</sup>Measured by immunohistochemistry (validated by FISH for few samples). Information available for 99 patients.

## **Commentaire et discussion**

### **Valeur pronostique de ZNF217**

Dans un premier temps, nous avons étudié la valeur pronostique de *ZNF217* dans le cancer du sein. Pour cela, trois cohortes composées de tumeurs du sein ont été utilisées. La première cohorte, cohorte CLB1, est composée de 47 échantillons de tumeurs primitives du sein obtenus du CRB du Centre Léon Bérard (CLB, Lyon, France). Ces tumeurs ont été prélevées chez des patientes n'ayant reçu ni hormonothérapie, ni chimiothérapie, ni radiothérapie avant la chirurgie. Quatorze patientes ont développé des métastases pendant qu'elles étaient traitées par chimiothérapie ou hormonothérapie et 33 n'ont pas développé de métastases pendant leur traitement.

La deuxième cohorte, cohorte CRH, est composée de 48 échantillons de tumeurs primitives RE+ obtenues du Centre René Huguenin (Saint Cloud, France). Ces tumeurs ont été prélevées chez des patientes ayant été traitées seulement par hormonothérapie après leur chirurgie. Vingt-sept patientes ont rechuté et développé des métastases pendant leur traitement à l'hormonothérapie et 21 patientes n'ont pas rechuté.

La troisième cohorte, cohorte CLB2, est composée de 100 échantillons de tumeurs primitives du sein obtenus du CRB du CLB. Ces tumeurs ont été prélevées chez des patientes n'ayant reçu ni hormonothérapie, ni chimiothérapie, ni radiothérapie avant la chirurgie. Vingt-cinq patientes ont développé des métastases pendant qu'elles étaient traitées par chimiothérapie ou hormonothérapie et 75 n'ont pas développé de métastase pendant leur traitement.

Ces échantillons ont été utilisés pour explorer au niveau transcriptionnel (par RTQ-PCR) l'expression de *ZNF217* et évaluer sa valeur pronostique dans le cancer du sein.

En outre, les résultats de deux bases de données transcriptomiques déjà publiées ont été analysés (Ma *et al.*, 2004; Gyorffy *et al.*, 2010). Ces cohortes sont respectivement composées de 60 et 2414 patientes ayant ou non rechuté pendant leur traitement.

Un des résultats majeurs de notre étude est la démonstration que des forts niveaux d'expression d'ARNm de *ZNF217* sont associés à un mauvais pronostic et au développement de métastases dans le cancer du sein. Ces résultats ont été clairement validés dans 3 cohortes indépendantes et confirmés par l'analyse rétrospective de deux bases de données de transcriptomique déjà publiées (Ma *et al.*, 2004; Gyorffy *et al.*, 2010) (Figures 1 A, B, C, D et E de l'article). C'est, à notre connaissance, la première fois que l'expression de *ZNF217* est associée à une valeur pronostique si ce n'est dans une étude récente où l'analyse rétrospective de bases de données de transcriptomique a montré qu'un fort niveau d'expression d'ARNm de *ZNF217* est associée à un mauvais pronostic dans le gliome (Mao *et al.*, 2011). Nos résultats montrent que le niveau d'expression d'ARNm de *ZNF217* nous permet donc de classer les tumeurs mammaires en deux groupes de bon pronostic (niveau d'expression faible de *ZNF217*) ou de mauvais pronostic (niveau d'expression élevé de *ZNF217*).

Par ailleurs, dans la cohorte CLB2, nous avons comparé les niveaux d'expression de *ZNF217* avec les autres paramètres cliniques et pathologiques en utilisant un test de Mann-Whitney : aucune association n'a été observée. De plus, nous avons étudié la valeur pronostique des autres paramètres cliniques et pathologiques par une analyse univariée (Log rank test) et n'avons observé aucune valeur pronostique pour RE, RP et HER2 suggérant que le niveau d'expression d'ARNm de *ZNF217* est plus informatif que ces biomarqueurs couramment utilisés en clinique. Seul l'envahissement ganglionnaire est associé à une survie diminuée dans cette cohorte (Table I de l'article). Nous avons ensuite rentré les facteurs pronostiques significatifs de

l'analyse univariée ( $p < 0,05$ ) dans un modèle de Cox multivarié. Le niveau d'expression de *ZNF217* et l'envahissement ganglionnaire persistent dans ce modèle suggérant que ces deux marqueurs sont indépendants.

Nous avons ensuite construit une signature combinant l'expression de *ZNF217* et l'envahissement ganglionnaire. Cette signature a été construite en divisant les patientes en 3 groupes : patientes ayant un niveau d'expression faible d'ARNm de *ZNF217* et pas ou peu de ganglions envahis ( $\leq 3$ ) (groupe A) ; les patientes ayant un niveau d'expression élevé d'ARNm de *ZNF217* et pas ou peu de ganglions envahis ( $\leq 3$ ) ou les patientes ayant un niveau d'expression faible d'ARNm de *ZNF217* et  $> 3$  ganglions envahis (groupe B) ; les patientes ayant un niveau d'expression élevé d'ARNm de *ZNF217* et  $> 3$  ganglions envahis (groupe C). Cette signature permet de reclasser les tumeurs en 3 groupes de pronostic plus précis : bon, intermédiaire et mauvais pronostic (Figure 1F de l'article). Cette signature a une meilleure valeur pronostique que l'expression de *ZNF217* seule ou que le statut ganglionnaire seul.

Dans la cohorte CRH, l'envahissement ganglionnaire est également associé à une survie sans récidive diminuée. Quand nous avons entré le niveau d'expression de *ZNF217* et l'envahissement ganglionnaire dans un modèle de Cox multivarié, seul *ZNF217* persiste suggérant que le niveau d'expression d'ARNm de *ZNF217* est un marqueur indépendant et de meilleure valeur pronostique que le statut ganglionnaire dans cette cohorte.

Dans la cohorte CLB1 et la cohorte de Ma, le statut ganglionnaire n'a pas de valeur pronostique alors que *ZNF217* a une valeur pronostique. Cela confirme le fait que *ZNF217* a une meilleure valeur pronostique que le statut ganglionnaire. De plus dans ces deux cohortes, aucune association n'a été observée entre les biomarqueurs utilisés couramment en clinique comme RE,

RP ou l'oncogène HER2 et la survie sans récidive, suggérant une fois encore que *ZNF217* a une meilleure valeur pronostique que ces marqueurs conventionnels.

*ZNF217* est donc un nouveau et puissant biomarqueur de mauvais pronostic qui pourrait aider les cliniciens dans leurs décisions thérapeutiques. Comme nous avons montré qu'un fort niveau d'expression d'ARNm de *ZNF217* est associé à un mauvais pronostic et au développement de métastases, nous avons étudié l'impact de la surexpression de *ZNF217* sur le phénotype de cellules épithéliales mammaires ou de cellules cancéreuses mammaires afin d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles pour traiter les tumeurs présentant de forts niveaux d'expression de *ZNF217*.

### **Modèles cellulaires**

Pour cela, nous avons utilisé différents modèles cellulaires. Dans un premier temps, nous avons utilisés les transfectants stables *ZNF217-1* et *ZNF217-2*, établis dans les cellules MDA-MB-231 (et possèdant un faible niveau endogène en *ZNF217*). D'autres transfectants stables *ZNF217* ont été élaborés pour cette étude à partir des cellules MCF10A et les cellules HMLE. Les cellules MCF10A sont des cellules épithéliales mammaires immortalisées mais non transformées qui dérivent de tissu du sein (Soule *et al.*, 1990). Les cellules HMLE sont des cellules qui dérivent des cellules HMEC (human mammary epithelial cells) et qui ont été immortalisées par l'introduction de hTERT puis transformées par l'antigène T du SV40 (Elenbaas *et al.*, 2001). Enfin, nous avons utilisé les cellules D3H2LN qui sont des cellules dérivées des cellules MDA-MB-231, passées deux fois en xénogreffe dans la souris. Les cellules D3H2LN sont plus agressives que les cellules parentales MDA-MB-231 puisque lorsqu'on injecte ces cellules en xénogreffe chez la souris la croissance tumorale de la tumeur primaire est

augmentée et la fréquence des métastases ganglionnaires spontanées est plus importante (Jenkins *et al.*, 2005).

### **Impact de la dérégulation de l'expression de ZNF217 sur l'agressivité, l'invasion et la migration**

Nous avons montré que la surexpression de ZNF217 dans des cellules de cancer du sein induit une augmentation de l'agressivité des cellules caractérisées par une augmentation (i) de la croissance cellulaire indépendante de l'ancrage (Figure 2A de l'article); (ii) de la migration (Figure 2B de l'article) associé à une augmentation du niveau d'expression de FAK phosphorylé qui joue un rôle central dans la migration cellulaire et l'invasion (Figure 2C de l'article); (iii) de l'invasion cellulaire (Figures 2E, F de l'article).

Nous avons ensuite exploré la question inverse c'est-à-dire : peut-on détecter une dérégulation de l'expression de ZNF217 dans un modèle cellulaire connu d'invasion de cancer du sein ? Pour cela, nous avons utilisé les cellules D3H2LN et montré que les cellules D3H2LN surexpriment ZNF217 endogène par rapport aux cellules contrôle MDA-MB-231 (Figure 3A de l'article) et qu'elles possèdent des capacités migratoires accrues par rapport aux cellules contrôle (Figure 3B de l'article). L'inhibition de l'expression endogène de ZNF217 par une approche de siRNA induit une diminution de la migration (Figure 3B de l'article) et de l'invasion (Figure 3C de l'article) suggérant que ZNF217 est directement impliqué dans ces mécanismes. A notre connaissance, seule une étude rapporte brièvement que l'inhibition de ZNF217 dans des cellules de cancer de l'ovaire inhibe l'invasion (Sun *et al.*, 2008a).

### **Impact de la dérégulation de l'expression de ZNF217 sur l'EMT**

Pendant la progression tumorale, les cellules épithéliales peuvent subir l'EMT pour acquérir un phénotype plus invasif et augmenter leur capacité migratoire afin de se disséminer et

former des foyers cancéreux secondaires (pour revue, (Kalluri & Weinberg, 2009; Xu *et al.*, 2009)). Un autre résultat majeur de notre étude est que ZNF217 induit l'EMT dans deux modèles de cellules épithéliales mammaires, les cellules MCF10A et les cellules HMLE. En effet, la surexpression de ZNF217 dans les cellules MCF10A induit une diminution de l'expression de l'*E-cadherine* au niveau ARNm (Figure 4A de l'article), un changement de morphologie (les cellules deviennent fibroblastiques) (Figure 4B de l'article), une diminution de l'expression protéique des marqueurs épithéliaux (Figure 4C de l'article), une augmentation d'expression protéique des marqueurs mésenchymateux (Figure 4C de l'article), la relocalisation au niveau cytoplasmique de l'*E-cadherine* et la formation de fibres d'actine (Figure 5A de l'article). Ces résultats ont été confirmés dans les cellules HMLE (Figure supplémentaire S3 de l'article). Durant l'EMT, la transcription de l'*E-cadherine* est inhibée par différents facteurs de transcription dont les facteurs à doigts de zinc tels Snail ou Slug (Xu *et al.*, 2009). Dans les cellules surexprimant ZNF217 on observe une augmentation d'ARNm des ces facteurs de transcription (SNAI1/Snail, SNAI2/Slug, TWIST1, TWIST2, ZEB1 et ZEB2) (Figure 4D de l'article). ZNF217 pourrait donc faire partie de cette famille de facteurs de transcription inhibant l'EMT. Nous avons montré pour la première fois que ZNF217 peut induire au niveau endogène la sous-expression de l'*E-cadherine/CDH1* au niveau ARNm et au niveau protéique. Une étude antérieure a identifié une séquence consensus sur laquelle se fixerait ZNF217 et présente dans le promoteur de l'*E-cadherine* (Cowger *et al.*, 2007). Les auteurs ont montré que ZNF217 se fixerait sur le promoteur de l'*E-cadherine* et qu'il réprimerait la transcription de l'*E-cadherine* comme le suggère la diminution de l'activité luciférase dans des expériences de gène rapporteur. Nos résultats confirment pour la première fois au niveau endogène les résultats de Cowger.

Le TGF- $\beta$  est un inducteur bien connu de l'EMT qui favorise la migration et la formation de métastases (pour revue, (Massague, 2008; Thiery *et al.*, 2009)). Il a été montré que le TGF- $\beta$ 1, le TGF- $\beta$ 2 et le TGF- $\beta$ 3 peuvent induire l'EMT (Miettinen *et al.*, 1994; Piek *et al.*, 1999; Valcourt *et al.*, 2005) *via* notamment la voie des Smads mais aussi par d'autres voies (Deckers *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2009). Notre étude montre que ZNF217 induit l'EMT *via* la voie du TGF- $\beta$ . En effet, l'inhibition de la voie du TGF- $\beta$  : (1) par le SB431542, un inhibiteur de l'activité kinase du récepteur au TGF- $\beta$  de type I (Figure 5A de l'article), (2) par un siRNA ciblant smad4 (Figure 5B de l'article), permet de réverser, en partie au moins, l'EMT induite par ZNF217 dans des cellules mammaires MCF10A. Ces résultats ont été confirmés dans les cellules HMLE (Figure supplémentaire S4 de l'article). Ces données suggèrent que la voie des Smads est impliquée dans l'EMT induite par ZNF217 mais d'autres voies pourraient aussi être impliquées notamment les facteurs autocrines (membres de la famille de l'EGF, FGFs, HGF and IGF1/2), la voie Wnt/ $\beta$ catenin, la voie Notch, la voie Hedgehog ou la voie Akt/PI3K connues pour être impliquées dans l'EMT (pour revue (Huber *et al.*, 2005)). De plus, dans notre étude, l'expression des ARNm du *TGF-β1*, du *TGF-β2* et du *TGF-β3* est augmentée dans les cellules surexprimant ZN217 (Figure 5D de l'article). Enfin, nous avons montré que l'activation de la voie du TGF- $\beta$  est associée à une sécrétion accrue de TGF- $\beta$  actif dans les cellules surexprimant ZNF217 (Figure 5E de l'article). Nous avons ensuite utilisé MatInspector (Genomatix Software) pour rechercher les sites de liaison de ZNF217 dans la région -2 Kb à +1 Kb des promoteurs du *TGF-β1*, *TGF-β2* et *TGF-β3*. Deux séquences consensus sur lesquelles se fixeraient ZNF217 ont été précédemment décrites (Cowger *et al.*, 2007; Krig *et al.*, 2007). En utilisant la séquence consensus de Cowger (CAGAAY où Y est A, G ou T) (Cowger *et al.*, 2007), nous avons trouvé 2 sites de liaisons dans les promoteurs du *TGF-β2* et du *TGF-β3* mais aucun dans le promoteur du *TGF-β1*. En ce qui concerne la séquence de Krig (ATTCNAC) (Krig *et al.*, 2007), nous avons trouvé un site de

liaison dans le promoteur du TGF- $\beta$ 1, deux dans le promoteur du TGF- $\beta$ 2 et un dans le promoteur du *TGF- $\beta$ 3*. Ces données suggèrent que ZNF217 pourrait réguler directement la transcription des *TGF- $\beta$ 1*, *TGF- $\beta$ 2* et *TGF- $\beta$ 3* pour activer la voie du TGF- $\beta$  via une boucle autocrine. Des études supplémentaires sont nécessaires pour identifier les mécanismes directs ou indirects de l'activation de la transcription des gènes *TGF- $\beta$*  par ZNF217 ainsi que des autres gènes cibles de ZNF217 impliqués dans la migration, l'invasion et l'EMT. Enfin, une étude a montré que ZNF217 induit l'immortalisation de cellules mammaires épithéliales et la résistance à l'inhibition de croissance du TGF- $\beta$  (Nonet *et al.*, 2001). Ces données suggèrent qu'il existe un cross-talk entre ZNF217 et la voie du TGF- $\beta$ .

### **Conclusion**

En conclusion, de forts niveaux d'expression d'ARNm de *ZNF217* représentent un nouveau et puissant marqueur de mauvais pronostic dans le cancer du sein et sont associés à la formation de métastases. De plus, la surexpression de *ZNF217* induit une augmentation de l'agressivité, de la migration et de l'invasion ainsi que l'EMT dans des cellules mammaires. De ce fait, des schémas thérapeutiques ciblant les effets de *ZNF217* pourraient être utilisés en clinique en inhibant directement *ZNF217* et/ou en utilisant des inhibiteurs du TGF- $\beta$  qui sont actuellement en validation clinique. Ces traitements seraient particulièrement efficaces pour les tumeurs de mauvais pronostic où l'expression de *ZNF217* est élevée.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le cancer du sein est un problème de Santé publique majeur. Il s'agit du cancer le plus fréquent chez les femmes dans le monde et représente actuellement la première cause de mortalité par cancer chez les femmes. Deux principaux problèmes ont émergés : (1) le développement de résistance aux traitements actuellement utilisés en clinique et (2) l'amélioration de l'estimation du pronostic des patients. En effet, le pronostic est souvent déterminé sur des critères histologiques et cliniques comme la taille de la tumeur, l'invasion, l'envahissement ganglionnaire, la présence de métastases et la recherche de biomarqueurs tels RE, RP ou HER2. Cependant, l'estimation du pronostic est souvent difficile dans les cancers en phase précoce quand les symptômes et les données histologiques ne sont pas encore évidents. De plus, les biomarqueurs actuels ne suffisent pas toujours à prédire la survie. C'est pourquoi l'identification de nouveaux biomarqueurs qui permettent de classer les tumeurs selon le pronostic est nécessaire afin d'aider les cliniciens dans leurs décisions thérapeutiques. Nous avons donc étudié l'oncogène *ZNF217* afin de déterminer s'il pouvait être un biomarqueur pronostic intéressant potentiellement utilisable en clinique. D'autre part, nous avons étudié les fonctions de *ZNF217* afin de déterminer si *ZNF217* pourrait représenter une potentielle cible thérapeutique.

Dans un premier temps, des forts niveaux d'expression de *ZNF217* ont été attribués à l'amplification du gène (Collins *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 2002). Cependant, il semblerait que l'amplification et l'expression de *ZNF217* ne soit pas corrélées. En effet, la surexpression de *ZNF217* a été retrouvée dans des lignées cellulaires mammaires ne portant pas l'amplification 20q13 (Collins *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 2001). De plus, l'amplification de *ZNF217* et son expression ne sont pas corrélées dans 24 lignées cellulaires de cancer du sein (Mackay *et al.*, 2009), ni dans des tumeurs ovariennes (Fejzo *et al.*, 2008). Ginestier *et al.*, n'observe pas non plus de corrélation entre l'expression de *ZNF217* et l'amplification 20q13

où seul le locus de *ZNF217* est amplifié. De plus, l'expression de l'ARNm de *ZNF217* ne permet pas de distinguer les tumeurs avec ou sans amplification au locus de *ZNF217* (Ginestier *et al.*, 2006). Enfin, dans le glioblastome l'amplification de *ZNF217* est retrouvée principalement dans les tumeurs où *ZNF217* est surexprimé mais pas seulement car 53% des tumeurs qui surexpriment *ZNF217* ne présentent pas d'amplification du gène (Mao *et al.*, 2011). Il a donc été suggéré que d'autres mécanismes comme des mécanismes épigénétiques, en particulier la méthylation de l'ADN, puissent réguler l'expression de *ZNF217* (Etcheverry *et al.*, 2010). Il serait donc intéressant d'étudier les mécanismes de régulation de *ZNF217*. Pour cela, nous pourrions cloner le promoteur de *ZNF217* dans un plasmide contenant la luciférase et identifier des protéines qui pourraient réguler la transcription de *ZNF217*. Ayant démontré qu'il existe un cross-talk entre *ZNF217* et la voie du TGF- $\beta$  nous pourrions, dans un premier temps, étudier si le TGF- $\beta$  régule l'expression de *ZNF217*.

Dans le premier axe de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'impact de la dérégulation de l'expression de *ZNF217* dans des cellules de cancer du sein. Nous avons montré que *ZNF217* induit une augmentation de la prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo* associée à l'expression de certaines cyclines. De plus, nous avons démontré que *ZNF217* induit la résistance à diverses molécules de chimiothérapie ayant des mécanismes d'action différents. Ainsi, *ZNF217* induit la résistance à la doxorubicine, un inhibiteur de la topoisomérase II, confirmant ainsi les résultats de Huang (Huang *et al.*, 2005). Nous avons montré pour la première fois que *ZNF217* est associé à la résistance au paclitaxel, un agent stabilisant des microtubules, mais pas à la gemcitabine, un analogue des nucléosides. Ces résultats suggèrent que *ZNF217* induirait la résistance à la chimiothérapie *via* des mécanismes moléculaires différents selon la molécule utilisée. La dérégulation de l'expression des

membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 impliqués dans la voie mitochondriale de l’apoptose pourraient en partie au moins expliquer la résistance au paclitaxel induite par ZNF217.

De manière intéressante, un traitement par un inhibiteur d’Aurora-A réverse la résistance au paclitaxel suggérant un rôle d’Aurora-A dans les fonctions de survie de ZNF217. ZNF217 et *AURKA* sont tous deux situés en 20q13, une région chromosomique fréquemment amplifiée dans le cancer du sein (Tanner *et al.*, 1995; Courjal *et al.*, 1997; Schwendel *et al.*, 1998). Comme il a été montré que les amplifications 20q13 pouvaient atteindre seulement le locus de ZNF217 ou le locus de ZNF217 et *AURKA* (Ginestier *et al.*, 2006), les fonctions de ZNF217 pourraient s’expliquer par une co-amplification génomique des deux gènes ou par la régulation de l’expression d’Aurora-A par ZNF217. En conclusion, cibler Aurora-A semble donc être une approche thérapeutique intéressante dans les cancers du sein surexprimant ZNF217.

Il existe plusieurs types d’inhibiteurs d’Aurora-A qui sont soit spécifiques d’Aurora-A soit qui inhibent en plus les autres kinases de la famille, Aurora-B et/ou Aurora-C (pour revues (Green *et al.*, 2008b; Cheung *et al.*, 2009; Cheung *et al.*, 2011). Il est intéressant de noter qu’une étude préclinique récente a montré que l’inhibiteur pan-aurora kinase AMG-900 inhibe la prolifération de 26 lignées cellulaires dont des cellules résistantes au paclitaxel (Payton *et al.*, 2010). Les inhibiteurs d’Aurora-A sont actuellement testés dans des essais de phase I ou II chez des patients ayant des tumeurs solides dont des tumeurs du sein ou des cancers hématologiques (pour revue, (Green *et al.*, 2008b; Cheung *et al.*, 2009; Cheung *et al.*, 2011)). Actuellement, plusieurs études montrent que l’on obtient de meilleurs résultats en combinant un inhibiteur d’Aurora-A et une molécule de chimiothérapie connue plutôt que d’utiliser l’inhibiteur d’Aurora-A en monothérapie. Les combinaisons testées sont des inhibiteurs spécifiques d’Aurora-A en association avec le bortezomib (NCT01034553), la gemcitabine

(NCT01097512), le docetaxel (NCT00543387) et le paclitaxel (NCT01091428) (données du U.S. National Institutes of Health). Il serait donc intéressant de (1) tester *in-vivo* l'efficacité d'un inhibiteur Aurora-A, seul ou en association avec d'autres molécules de chimiothérapie, sur des tumeurs surexprimant ZNF217, (2) étudier si les inhibiteurs d'Aurora-A réverse la résistance induite par ZNF217 à d'autres molécules de chimiothérapie et (3) tester sur nos modèles cellulaires surexprimant ZNF217 l'efficacité des inhibiteurs d'Aurora-B et comparer leur efficacité à celle des inhibiteurs d'Aurora-A.

Dans notre deuxième axe de travail, nous nous sommes intéressés à la valeur pronostique de *ZNF217* dans le cancer du sein. Ainsi, de forts niveaux d'expression en ARNm de *ZNF217* sont associés à un mauvais pronostic et au développement de métastases. Nous avons également proposé une signature couplant l'expression de *ZNF217* et l'envahissement ganglionnaire qui permet d'affiner le pronostic en classant les patients en 3 groupes de mauvais pronostic, pronostic intermédiaire et bon pronostic. Dans notre étude, *ZNF217* a une meilleure valeur pronostique que les marqueurs classiques (RE, RP, HER2) utilisés en clinique. Dans nos transfectants stables surexprimant *ZNF217*, *ZNF217-1* et *ZNF217-2*, nous avons observé une corrélation entre le niveau d'expression d'ARNm de *ZNF217* et le niveau protéique. Ces résultats sont encourageants et permettent d'envisager d'étudier la valeur pronostique de *ZNF217* dans les cancers du sein par immunohistochimie, qui est la technique couramment utilisée en anathomo-pathologie. Ces travaux sont actuellement en cours de réalisation avec la collaboration du Dr I. Treilleux, Centre Léon Bérard, Lyon.

Nos travaux ont donc montré pour la première fois que (1) *ZNF217* est associé à la résistance au paclitaxel et (2) *ZNF217* est un marqueur de mauvais pronostic dans le cancer du sein. Le paclitaxel est une des molécules de chimiothérapie les plus utilisées pour le traitement

des cancers du sein primaires ou métastatiques. Il n'existe pas à l'heure actuelle de biomarqueur satisfaisant utilisé en routine pour prédire la réponse au paclitaxel. Il serait donc intéressant d'étudier la valeur prédictive de *ZNF217* en ce qui concerne la réponse à la chimiothérapie en général et plus particulièrement au paclitaxel. Soixante quinze pour cent des cancers expriment les récepteurs RE $\alpha$  et/ou PR et sont traités par hormonothérapie. De plus, des études antérieures de notre équipe ont montré que *ZNF217* est un gène œstrogéno-régulé (Vendrell *et al.*, 2004) et que son expression est dérégulée dans des lignées cellulaires de cancer du sein résistantes au tamoxifène (Vendrell *et al.*, 2005). Il serait donc également intéressant d'étudier la valeur prédictive de *ZNF217* à l'hormonothérapie.

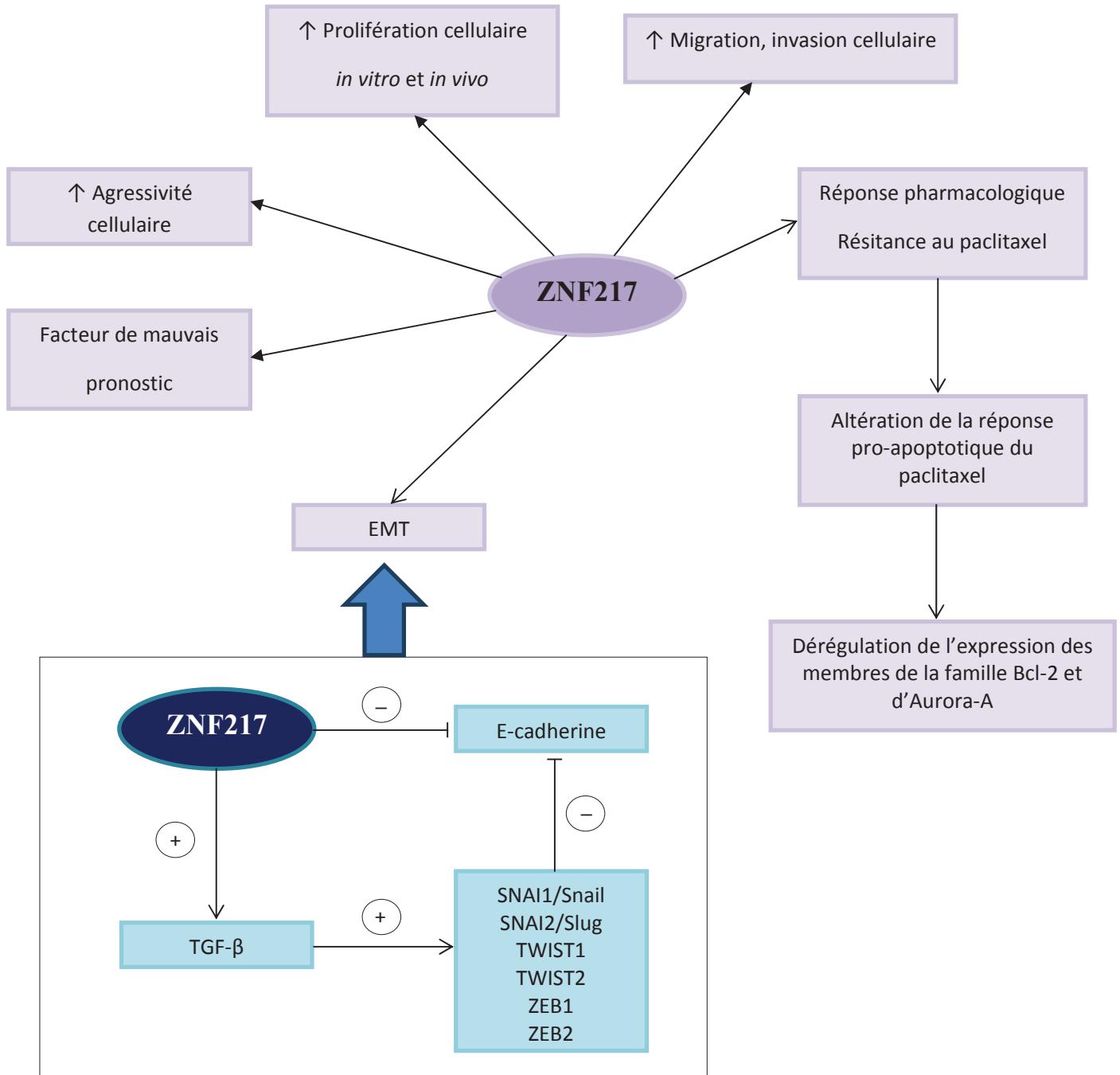
Dans le but de trouver des cibles thérapeutiques pour traiter les tumeurs de mauvais pronostic présentant de fortes expressions d'ARNm de *ZNF217*, nous avons étudié *in vitro* le phénotype des cellules surexprimant *ZNF217*. La surexpression de *ZNF217* induit une augmentation de l'agressivité, de l'invasion et de la migration. Il serait intéressant de tester *in vivo* si les cellules surexprimant *ZNF217* induisent la formation de métastases après xénogreffes chez la souris nude. De plus, *ZNF217* initie l'EMT *via* l'activation de la voie du TGF- $\beta$  comme le montre (1) la réversion de l'EMT par un inhibiteur du récepteur TGF- $\beta$ 1 ou un siRNA-smad4, (2) l'expression plus élevée de *TGFB1*, *TGFB2* et *TGFB3* dans les cellules surexprimant *ZNF217* et (3) une sécrétion accrue de TGF- $\beta$  actif dans les cellules surexprimant *ZNF217*. Une étude antérieure a montré que *ZNF217* induit l'immortalisation de cellules mammaires épithéliales et la résistance à l'inhibition de croissance du TGF- $\beta$  (Nonet *et al.*, 2001). Ces données couplées à nos résultats suggèrent qu'il existe un cross-talk entre *ZNF217* et la voie du TGF- $\beta$ . Ainsi, les tumeurs présentant de forts niveaux d'ARNm de *ZNF217* et de mauvais pronostic pourraient être traitées par des inhibiteurs du TGF- $\beta$ . De nombreux inhibiteurs du TGF- $\beta$  sont actuellement en développement clinique (pour revue (Kelly & Morris, 2009; Korpal

& Kang, 2010)) dans des essais de phase I, II ou III pour le traitement du mélanome malin, du cancer du poumon, du cancer colo-rectal, du cancer du pancréas, du cancer du rein et les glioblastomes. Dans les cancers du sein, de nombreuses études précliniques ont montré que les inhibiteurs du TGF- $\beta$  potentialisent l'apoptose (Muraoka *et al.*, 2002) et réduisent la tumorigénéité, la motilité cellulaire et le pouvoir métastatique des cellules cancéreuses mammaires chez la souris (Bandyopadhyay *et al.*, 1999; Bandyopadhyay *et al.*, 2002; Muraoka *et al.*, 2002; Muraoka-Cook *et al.*, 2004; Ge *et al.*, 2006). Ces résultats laissent espérer leur futur développement dans le cancer du sein. En effet, un essai clinique de phase I est actuellement en cours pour évaluer l'efficacité et la sécurité d'un vaccin contenant un oligonucléotide antisens TGF- $\beta$ 2 pour le traitement de divers carcinomes métastatiques dont des tumeurs du sein (NCT00684294).

ZNF217 fait partie de la famille KLF. Il a été montré qu'il existe trois variants d'épissage de KLF6 (Narla *et al.*, 2005a) et que ceux-ci peuvent avoir des fonctions opposées à la protéine wt. Ainsi KLF6 induit l'apoptose (Ito *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2008) alors que son variant KLF6-SV1 inhibe au contraire l'apoptose (DiFeo *et al.*, 2006; Narla *et al.*, 2008; Sangodkar *et al.*, 2009a). Collins *et al.* ont prédit que ZNF217 coderait pour deux protéines après épissage alternatif de l'exon 4 (Collins *et al.*, 1998) (Figure 11). Même si l'existence de ces deux protéines n'est pas à l'heure actuelle validée, il serait intéressant de confirmer cette hypothèse et d'étudier si ce variant de ZNF217 est retrouvé au niveau cellulaire et si ce variant a des fonctions spécifiques ou une valeur pronostique particulière. Par ailleurs, l'activité transcriptionnelle des KLFs est régulée par de nombreuses modifications post-traductionnelles : phosphorylation, acétylation, ubiquitination et sumoylation (Tableau 6). Il serait intéressant d'étudier les modifications post-traductionnelles de ZNF217 et leur impact sur l'activité transcriptionnelle et/ou les fonctions de ZNF217. Enfin, les KLF4 (Akaogi *et al.*, 2009) et

KLF5 (Guo *et al.*, 2010) interagissent directement avec le RE $\alpha$ . Il serait intéressant d'étudier le cross-talk putatif entre ZNF217 et le RE $\alpha$ .

**En conclusion**, notre travail renforce l'idée que ZNF217 semble jouer un rôle important dans la cancérogénèse mammaire en induisant d'une part l'agressivité de la tumeur et d'autre part la résistance au traitement (Figure 15). Par ailleurs, ZNF217 est un nouveau et puissant marqueur de mauvais pronostic qui pourrait aider les cliniciens dans leurs décisions thérapeutiques. Enfin, nous avons identifié des stratégies thérapeutiques pour traiter les tumeurs du sein présentant un fort niveau d'expression de ZNF217. Celles-ci pourraient être traitées soit en ciblant directement ZNF217 ou en ciblant les médiateurs de ZNF217 par des inhibiteurs du TGF- $\beta$  ou d'Aurora-A, actuellement en développement clinique.



**Figure 15 : Bilan de ce travail : Implication de ZNF217 dans la cancérogénèse mammaire.**

## ANNEXE

*Article n°3*

« Learning the local Bayesian network structure around the  
ZNF217 oncogene in breast tumours »

Prestat E, Rodrigues de Morais S, Vendrell JA, **Thollet A**, Gautier C,  
Cohen PA, Aussem A

(En soumission)

# Learning the local Bayesian network structure around the ZNF217 oncogene in breast tumours

Emmanuel Prestat<sup>a,b,c,d,e</sup>, Sérgio Rodrigues de Morais<sup>a,b,f</sup>, Julie Vendrell<sup>a,b,g,h,i</sup>, Aurélie Thollet<sup>a,b,g,h,i</sup>, Christian Gautier<sup>a,b,c,d</sup>, Pascale Cohen<sup>a,b,g,h,i</sup>, Alex Aussem<sup>a,b,f,\*</sup>

<sup>a</sup>Université de Lyon, 69000, Lyon, France

<sup>b</sup>Université Lyon 1, 69000 Lyon, France

<sup>c</sup>CNRS, UMR5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, Université Lyon 1, 69622, Villeurbanne, France

<sup>d</sup>BAMBOO team, INRIA Rhône-Alpes, France

<sup>e</sup>Environmental Microbial Genomics, Ecole Centrale de Lyon, 36 avenue Guy de Collongue, 69134 Ecully, France

<sup>f</sup>Department of Computer Science, Graphs, Machine Learning and Multi-Agents Models (GAMA), Villeurbanne, France

<sup>g</sup>Inserm U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, 69000 Lyon, France

<sup>h</sup>CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, 69000 Lyon, France

<sup>i</sup>Centre Léon Bérard, 69000 Lyon, France

---

## Abstract

In this study, we discuss and apply a novel and efficient algorithm for learning a local Bayesian network model in the vicinity of the *ZNF217* oncogene from breast cancer microarray data without having to decide in advance which genes have to be included in the learning process. *ZNF217* is a candidate oncogene located at *20q13*, a chromosomal region frequently amplified in breast and ovarian cancer, and correlated with shorter patient survival in these cancers. To properly address the difficulties in managing complex gene interactions given our limited sample, statistical significance of edge strengths was evaluated using bootstrapping and the less reliable edges were pruned to increase the network robustness. We found that 13 out of the 35 genes

---

\*Corresponding author

Email address: [aaussem@univ-lyon1.fr](mailto:aaussem@univ-lyon1.fr) (Alex Aussem)

URL: [www710.univ-lyon1.fr/~aaussem](http://www710.univ-lyon1.fr/~aaussem) (Alex Aussem)

associated with deregulated *ZNF217* expression in breast tumours have been previously associated with survival and/or prognosis in cancers. Identifying genes involved in lipid metabolism opens new fields of investigation to decipher the molecular mechanisms driven by the *ZNF217* oncogene. Moreover, 6 of the 13 genes have already been identified as putative *ZNF217* targets by independent biological studies. We therefore suggest that the algorithms for inferring local BNs are valuable data mining tools for unraveling complex mechanisms of biological pathways from expression data. The source code is available at <http://www710.univ-lyon1.fr/~aaussem/Software.html>.

*Keywords:* Machine learning, Bayesian networks, feature selection, microarray data, breast cancer, ovarian cancer

---

## 1. Background

In the northern hemisphere, breast cancer is the most lethal cancer among women. In the USA, breast cancer represented 31% of all new cancer cases in women in 2006 [1]. Nowadays, with the help of technologies that can take "snapshots" of the whole human transcriptome (SAGE, DNA microarrays, and now RNA-SEQ [2]), it is possible to measure gene expression behavior on a global scale. In the last decade, DNA microarrays have been the most used tool to explore cancer transcriptomes. In breast cancer, this technology succeeded on improving the classification system [3, 4] and to propose new genes signatures [5]. However, there is still room for improvement in diagnostics and prognosis, as the exact mechanisms of this disease are not all revealed.

*ZNF217* is a candidate oncogene located at 20q13, a chromosomal region frequently amplified in breast [6–8] and ovarian [9, 10] cancers, and *ZNF217* amplification in these cancers correlates with shorter patient survival [11, 12]. The first direct evidence for a potential oncogenic function of *ZNF217* was the demonstration that the transduction of finite life-span human mammary epithelial cells with *ZNF217* could give rise to immortalized cells [13]. *ZNF217* is a Krüppel-like zinc finger protein that localizes in

the nucleus and interacts with co-repressors and histone-modifying proteins [14–16], suggesting that *ZNF217* may be part of a transcriptional repressor complex. In order to decipher gene expression deregulation associated with *ZNF217* expression, DNA array studies have been performed [17, 18] and suggest that, while suspected to be mainly a negative regulator of transcription, *ZNF217* could retain a double activity and also be a positive regulator of transcription. Since the molecular mechanisms involved in the pro-survival functions driven by *ZNF217* are still enigmatic, it is of much interest to decipher the putative partners of *ZNF217*.

Recently, Bayesian networks (BNs) have become a very popular tool for biological network reconstruction [19–23], for genotype-to-phenotype relationship studies [24], for gene selection [25] and for clinical and microarray data aggregation [26, 27]. BN are directed acyclic graphs (DAG) that model the conditional independencies underlying the data. These graphical models are highly attractive for their ability to describe complex probabilistic interactions between variables. The computational inference of network structure is currently very much an open challenge in computational statistics [28]. To appreciate the complexity of learning a DAG, we note that the number of DAGs is super-exponential as a function of the number of nodes [29]. Considerable advances have been made in the past years in the design of scalable divide-and-conquer constraint-based (CB) methods [30–36] for local BN structure learning from data. They construct a DAG around the target node without having to construct the whole BN first, hence their scalability. Therefore, CB methods can handle high dimensional gene expression databases without having to decide in advance which genes (typically no more than a few hundred) have to be included in the learning process.

The purpose of this study is to extract the gene network in the vicinity of the *ZNF217* oncogene based on a public breast cancer dataset using one of these CB algorithms, named Recursive Hybrid Parents and Children (RHPC), proposed by [37]. RHPC was recently shown to outperform several prototypical and state-of-the-art CB and search-and-score algorithm propos-

als by extensive empirical experiments on various public synthetic and real-world data [23, 34, 37]. The number of calls to the statistical test, hence the run-time, is empirically on the order  $O(n^{1.2})$ , where  $n$  is the number of variables, thus its ability to handle thousands of variables at once. The algorithm is run recursively on the adjacent nodes of *ZNF217*, our candidate oncogene, in order to establish a local graph without having to construct the whole BN first. The recursive procedure is very similar to the “growing BN model” approach discussed in [21]. We use the bootstrapping method to generate more robust network structures, as discussed in [27, 38]. We end up with a local BN up to a certain radius around the target node where the statistical significance of edge strengths are evaluated using the bootstrapping approach. In this study, we restrict our attention to inferring the BN skeleton (*i.e.*, a graph with non-oriented edges) as we are only interested in identifying the genes interacting with *ZNF217*.

The rest of the paper is organized as follows. In Section 2, we review BNs and we describe the RHPC algorithm in detail. In Section 3, we run our algorithm on breast cancer microarray data with satisfactory results. Our findings are compared with the genes published recently in the oncology literature. Finally, we conclude on the potential of local BN learning.

### Breast cancer microarray data

Sixty to seventy percent of breast cancers are hormone-dependent, *i.e.* they are positive for the presence of the Estrogen Receptor (*ER+*) and/or the Progesterone Receptor (*PR+*). The microarray data used in this local interaction network investigation can be found in [39]. The authors used an *Aminolink* DNA microarray that targets 21329 different human genes with 70-nt probes. 132 chips were hybridized with *Cyanine-5* fluorophore-marked RNA extracted from 132 *ER+* and/or *PR+* tumours. A normalisation procedure has been applied by subtracting the background signal from the foreground intensities and by doing a quantile normalisation, using the *Bioconductor marray* package [40].

## Methods

### 1.1. Bayesian networks

Formally, a BN is a tuple  $\langle \mathbb{G}, P \rangle$ , where  $\mathbb{G} = \langle \mathbf{U}, \mathbf{E} \rangle$  is a DAG with nodes representing the variables in the domain  $\mathbf{U}$ , and edges representing direct probabilistic dependencies between them.  $P$  denotes the joint probability distribution in  $\mathbf{U}$ . The BN structure encodes a set of conditional independence assumptions: that each node  $X_i$  is conditionally independent of all of its nondescendants in  $\mathbb{G}$  given its parents  $\mathbf{Pa}_i^{\mathbb{G}}$ . These independence assumptions, in turn, imply many other conditional independence statements, which can be extracted from the network using a simple graphical criterion called d-separation [41].

We denote by  $X \perp_P Y | \mathbf{Z}$  the conditional independence between  $X$  and  $Y$  given the set of variables  $\mathbf{Z}$  where  $P$  is the underlying probability distribution. Note that an exhaustive search of  $\mathbf{Z}$  such that  $X \perp_P Y | \mathbf{Z}$  is a combinatorial problem and can be intractable for high dimension data sets. We use  $X \perp_{\mathbb{G}} Y | \mathbf{Z}$  to denote the assertion that  $X$  is d-separated from  $Y$  given  $\mathbf{Z}$  in  $\mathbb{G}$ . We denote by  $\mathbf{dSep}(X, Y)$ , a set that d-separates  $X$  from  $Y$ . If  $\langle \mathbb{G}, P \rangle$  is a BN,  $X \perp_P Y | \mathbf{Z}$  if  $X \perp_{\mathbb{G}} Y | \mathbf{Z}$ . The converse does not necessarily hold. We say that  $\langle \mathbb{G}, P \rangle$  satisfies the *faithfulness condition* if the d-separations in  $\mathbb{G}$  identify *all and only* the conditional independencies in  $P$ , *i.e.*,  $X \perp_P Y | \mathbf{Z}$  if and only if (iff)  $X \perp_{\mathbb{G}} Y | \mathbf{Z}$ . Two graphs are said *equivalent* iff they encode the same set of conditional independencies via the d-separation criterion. The equivalence class of a DAG  $\mathbb{G}$  is a set of DAGs that are equivalent to  $\mathbb{G}$ . [41] established that two DAGs are equivalent iff they have the same underlying undirected graph and the same set of v-structures (*i.e.*, uncoupled head-to-head meetings  $X \rightarrow Y \leftarrow Z$ ). So we define an *essential* graph (also called a DAG pattern) for a Markov equivalence class to be the partially directed acyclic graph (PDAG), that has the same links as the DAGs in the equivalence class and has oriented all and only the edges common to all of the DAGs in the equivalence class. The directed links in the essential graph are called the *compelled* edges [29].

An important concept of BN is the Markov blanket of a variable. The Markov blanket of a variable is the set of variables that completely shields off this variable from the other variables. In other words, a Markov blanket  $\mathbf{M}_T$  of  $T$  is any set of variables such that  $T$  is conditionally independent of all the remaining variables given  $\mathbf{M}_T$ . A Markov boundary,  $\mathbf{MB}_T$ , of  $T$  is any Markov blanket such that none of its proper subsets is a Markov blanket of  $T$ . Suppose  $\langle \mathbb{G}, P \rangle$  satisfies the faithfulness condition. Then, for all  $X$ , the set of parents, children of  $X$ , and other parents of children of  $X$  is the unique Markov boundary of  $X$ . A proof can be found for instance in [29]. We denote by  $\mathbf{PC}_T^{\mathbb{G}}$ , the set of parents and children of  $T$  in  $\mathbb{G}$ , and by  $\mathbf{SP}_T^{\mathbb{G}}$ , the set of *spouses* of  $T$  in  $\mathbb{G}$ , *i.e.*, the variables that have common children with  $T$ . These sets are unique for all  $\mathbb{G}$ , such that  $\langle \mathbb{G}, P \rangle$  satisfies the faithfulness condition and so we will drop the superscript  $\mathbb{G}$ .

### 1.2. Bayesian network structure learning

Automatically learning the graph structure of a BN is a challenging topic of pattern recognition that has attracted much attention over the last few years. Broadly speaking, there are two main approaches to BN structure learning [29, 42]. Both approaches have advantages and disadvantages. Score-and-search methods search over the space of structures (or the space of equivalence BN classes) employing a scoring function to guide the search. Another approach for learning BN structures, known as the constraint-based (CB) approach, follows more closely the definition of BN as encoders of conditional independence relationships. According to this approach, some judgments are made about the (conditional) dependencies that follow from the data and use them as constraints to construct a partially oriented DAG (PDAG for short) representative of a BN equivalence class. While none has been proven to be superior for learning the full BN structure, the ability to scale up to several thousands of variables is a key advantage of CB methods over score-and-search methods.

Considerable advances have been made in the past years in the design of highly scalable divide-and-conquer CB methods [31–35, 37, 43–45] for local

BN structure learning with high dimensional data sets and very few samples. In this study, we apply one of these CB algorithms, named Recursive Hybrid Parents and Children (RHPC) [34, 37]. In [23], RHPC has recently been used for the analysis of visceral obesity and its determinants in women, based on a small clinical data set of only thirty-four predictors. In this work, RHPC is employed to reconstruct a local graph in the vicinity of target gene, here the *ZNF217* oncogene, from a much larger breast cancer microarray data set that consists of 132 chips and 21329 expression values. Note that other similar divide-and-conquer CB learning procedures were proposed recently in the machine learning literature [35] and GetPC [31]. They could be used as well. Nonetheless RHPC was favored in a recent evaluation using the same conditional independence test, over a range of different networks, sample sizes and number of variables [34, 46].

### *1.3. The Recursive Hybrid Parents and Children algorithm*

In this Section, we present a detailed description of the RHPC algorithm. The source code (C++) of RHPC is available at <http://www710.univ-lyon1.fr/~aaussem/Software.html>. As aforementioned, the essential graph is obtained by running RHPC (Algorithm 1), based on the faithfulness assumption. As RHPC calls HPC (Algorithm 2) on each node, we start discussing HPC first. HPC receives a node  $X$  and returns its adjacent nodes  $\mathbf{PC}_X$ . Under this faithfulness assumption,  $X$  and  $Y$  are not adjacent in  $\mathcal{G}$  if and only if  $\exists \mathbf{Z} \in \mathbf{U} \setminus \{X \cup Y\}$  such that  $X \perp Y | \mathbf{Z}$  [29]. As an exhaustive search of  $\mathbf{Z}$  is intractable for high dimension data sets. HPC performs a heuristic search with a severe restriction on the maximum conditioning size in order to significantly increase the reliability of the statistical independence tests.

Formally, HPC can be viewed as an ensemble method for combining many weak PC learners in an attempt to produce a stronger PC learner. The algorithm was designed in order to endow the search procedure with the ability to: 1) handle efficiently data sets with thousands of variables but comparably few instances, 2) deal with datasets which present some deterministic relationships among the variables, 3) be correct under the faithfulness

condition, and 4) be able to learn large neighborhoods. HPC is based on three subroutines: *Data-Efficient Parents and Children Superset* (DE-PCS), *Data-Efficient Spouses Superset* (DE-SPS), and *Interleaved Incremental Association Parents and Children* (Inter-IAPC), a weak PC learner based on Inter-IAMB [36] that requires little computation. HPC may be thought of as a way to compensate for the large number of false negative nodes, at the output of the weak PC learner with few data cases, by performing extra computations. HPC receives a target node  $T$ , a data set  $\mathcal{D}$  and a set of variables  $\mathbf{U}$  as input and returns an estimation of  $\mathbf{PC}_T$ . It is hybrid in that it combines the benefits of incremental and divide-and-conquer methods. The procedure starts by extracting a superset  $\mathbf{PCS}_T$  of  $\mathbf{PC}_T$  (line 1) and a superset  $\mathbf{SPS}_T$  of  $\mathbf{SP}_T$  (line 2) with a severe restriction on the maximum conditioning size ( $\mathbf{Z} \leq 2$ ) in order to significantly increase the reliability of the tests. A first candidate PC set is then obtained by running the weak PC learner on  $\mathbf{PCS}_T \cup \mathbf{SPS}_T$  (line 3). The key idea is the decentralized search at lines 4-8 that includes, in the candidate PC set, all variables in the superset  $\mathbf{PCS}_T \cup \mathbf{SPS}_T$  that have  $T$  in their vicinity. Note that, in theory,  $X$  is in the output of Inter-IAPC( $Y$ ) if and only if  $Y$  is in the output of Inter-IAPC( $X$ ). However, in practice, this may not always be true due to statistical test errors, especially with few data samples. The decentralized search enables the algorithm to handle large neighborhoods while still being correct under faithfulness condition. The correctness is demonstrated in [37].

The essential graph is obtained by running HPC on every node and by directing the *complelled* edges as shown in Algorithm 1. Note that HPC must have found  $dSep(X, Y)$  (at line 5 of RHP) and have cached it for later retrieval. Alternatively, HPC can be run recursively on the adjacent nodes of a target variable in order to establish a local graph without having to construct the whole BN first as discussed in [21]. RHP applies standard techniques at lines 4-19 to identify the compelled edges. The reader is directed to [29], pp. 538, for further details. The *correctness* and *completeness* of the edge orientation in RHP are demonstrated in [47]. The correctness of RHP

---

**Algorithm 1** *Recursive HPC*

---

**Require:**  $\mathcal{D}$ : data set;  $\mathbf{U}$ : the set of variables

**Ensure:** A PDAG  $\mathcal{G}$  representative of the equivalence class containing the compelled edges

```
1: for all pair of nodes  $X, Y \in \mathbf{U}$  do
2:   Create the link  $X - Y$  in  $\mathcal{G}$  if  $X \in HPC(Y)$  OR  $Y \in HPC(X)$ 
3: end for
4: for all uncoupled meeting  $X - Z - Y \in \mathcal{G}$  do
5:   if  $Z \notin dSep(X, Y)$  then
6:     Orient  $X - Z - Y$  as  $X \rightarrow Z \leftarrow Y$ 
7:   end if
8: end for
9: repeat
10:   for all uncoupled meeting  $X \rightarrow Z - Y$  do
11:     Orient  $Z - Y$  as  $Z \rightarrow Y$ 
12:   end for
13:   for all link  $X - Y$  such that there is a path from  $X$  to  $Y$  do
14:     Orient  $X - Y$  as  $X \rightarrow Y$ 
15:   end for
16:   for all uncoupled meeting  $X - Z - Y$  such that  $X \rightarrow W$ ,  $Y \rightarrow W$  and
17:      $Z - W$  do
18:     Orient  $Z - W$  as  $Z \rightarrow W$ 
19:   end for
20: until no more edges can be oriented

---


```

---

**Algorithm 2** *HPC*

---

**Require:**  $T$ : target;  $\mathcal{D}$ : data set;  $\mathbf{U}$ : the set of variables

**Ensure:**  $\mathbf{PC}_T$ : Parents and Children of  $T$

```
1:  $[\mathbf{PCS}_T, \mathbf{dSep}] \leftarrow DE\text{-}PCS(T, \mathcal{D})$ 
2:  $\mathbf{SPS}_T \leftarrow DE\text{-}SPS(T, \mathcal{D}, \mathbf{PCS}_T, \mathbf{dSep})$ 
3:  $\mathbf{PC}_T \leftarrow Inter\text{-}IAPC(T, \mathcal{D}(T \cup \mathbf{PCS}_T \cup \mathbf{SPS}_T))$ 
4: for all  $X \in \mathbf{PCS}_T \setminus \mathbf{PC}_T$  do
5:   if  $T \in Inter\text{-}IAPC(X, \mathcal{D}(T \cup \mathbf{PCS}_T \cup \mathbf{SPS}_T))$  then
6:      $\mathbf{PC}_T \leftarrow \mathbf{PC}_T \cup X$ 
7:   end if
8: end for
```

---

follows from the correctness of HPC.

We now discuss the subroutines in more detail. Inter-IAPC (Algorithm 3) is a fast incremental method that receives a data set  $\mathcal{D}$  and a target node  $T$  as its input and promptly returns a rough estimation of  $\mathbf{PC}_T$ , hence the term “weak” PC learner. Inter-IAPC is an straightforward extension of the algorithm Inter-IAMB [36]. Notice that neither MMPC [35] nor GetPC [31] should be used to implement this weak PC learner. The reason is that any break of symmetry of the PC relation in the output of these algorithm is an indication of a false positive member; the decentralized search would not aid in reducing the number of false positives variables at all. Inter-IAPC starts with a two-phase approach to infer  $\mathbf{MB}_T$ , that is, the Markov boundary of  $T$ . A growing phase attempts to iteratively add the best candidate variables to  $\mathbf{MB}_T$ , followed by a shrinking phase that attempts to remove as many irrelevant variables as possible, that is, the false positives in the current set  $\mathbf{MB}_T$ . The function  $dep(T, X | \mathbf{MB}_T)$  at line 4 returns a statistical estimation of the association between  $T$  and  $X$  given the current set  $\mathbf{MB}_T$ . The shrinking phase is interleaved with the growing phase. Interleaving the two phases allows to eliminate as soon as possible some of the false positives in the current Markov blanket as the algorithm progresses during the Markov

---

**Algorithm 3** *Inter-IAPC*

---

**Require:**  $T$ : target;  $D$ : data set;  $\mathbf{U}$ : set of variables;

**Ensure:**  $\mathbf{PC}_T$ : Parents and children of  $T$ ;

```
1:  $\mathbf{MB}_T \leftarrow \emptyset$ 
2: repeat
3:   * Add true positives to  $\mathbf{MB}_T$ 
4:    $Y \leftarrow \operatorname{argmax}_{X \in (\mathbf{U} \setminus \mathbf{MB}_T \setminus T)} dep(T, X | \mathbf{MB}_T)$ 
5:   if  $T \not\perp Y | \mathbf{MB}_T$  then
6:      $\mathbf{MB}_T \leftarrow \mathbf{MB}_T \cup Y$ 
7:   end if

         * Remove false positives from  $\mathbf{MB}_T$ 
8:   for all  $X \in \mathbf{MB}_T$  do
9:     if  $T \perp X | (\mathbf{MB}_T \setminus X)$  then
10:       $\mathbf{MB}_T \leftarrow \mathbf{MB}_T \setminus X$ 
11:    end if
12:   end for
13: until  $\mathbf{MB}_T$  has not changed

         * Remove spouses of  $T$  from  $\mathbf{MB}_T$ 
14:  $\mathbf{PC}_T \leftarrow \mathbf{MB}_T$ 
15: for all  $X \in \mathbf{MB}_T$  do
16:   if  $\exists \mathbf{Z} \subseteq (\mathbf{MB}_T \setminus X)$  such that  $T \perp X | \mathbf{Z}$  then
17:      $\mathbf{PC}_T \leftarrow \mathbf{PC}_T \setminus X$ 
18:   end if
19: end for
```

---

---

**Algorithm 4** *DE-PCS*

---

**Require:**  $T$ : target;  $\mathcal{D}$ : data set;  $\mathbf{U}$ : set of variables;

**Ensure:**  $\text{PCS}_T$ : parents and children superset of  $T$ ;  $\text{dSep}$ : d-separating sets;

**Phase I:** *Remove  $X$  if  $T \perp X$*

```
1:  $\text{PCS}_T \leftarrow \mathbf{U} \setminus T$ 
2: for all  $X \in \text{PCS}_T$  do
3:   if  $(T \perp X)$  then
4:      $\text{PCS}_T \leftarrow \text{PCS}_T \setminus X$ 
5:      $\text{dSep}(X) \leftarrow \emptyset$ 
6:   end if
7: end for
```

**Phase II:** *Remove  $X$  if  $T \perp X | Y$*

```
8: for all  $X \in \text{PCS}_T$  do
9:   for all  $Y \in \text{PCS}_T \setminus X$  do
10:    if  $(T \perp X | Y)$  then
11:       $\text{PCS}_T \leftarrow \text{PCS}_T \setminus X$ 
12:       $\text{dSep}(X) \leftarrow Y$ 
13:      break loop FOR
14:    end if
15:  end for
16: end for
```

---

---

**Algorithm 5** *DE-SPS*

---

**Require:**  $T$ : target;  $\mathcal{D}$ : data set;  $\mathbf{U}$ : the set of variables;  $\mathbf{PCS}_T$ : parents and children superset of  $T$ ; **dSep**: d-separating sets;  
**Ensure:**  $\mathbf{SPS}_T$ : Superset of the spouses of  $T$ ;

```
1:  $\mathbf{SPS}_T \leftarrow \emptyset$ 
2: for all  $X \in \mathbf{PCS}_T$  do
3:    $\mathbf{SPS}_T^X \leftarrow \emptyset$ 
4:   for all  $Y \in \mathbf{U} \setminus \{T \cup \mathbf{PCS}_T\}$  do
5:     if  $(T \not\perp Y | \mathbf{dSep}(Y) \cup X)$  then
6:        $\mathbf{SPS}_T^X \leftarrow \mathbf{SPS}_T^X \cup Y$ 
7:     end if
8:   end for
9:   for all  $Y \in \mathbf{SPS}_T^X$  do
10:    for all  $Z \in \mathbf{SPS}_T^X \setminus Y$  do
11:      if  $(T \perp Y | X \cup Z)$  then
12:         $\mathbf{SPS}_T^X \leftarrow \mathbf{SPS}_T^X \setminus Y$ 
13:        break loop FOR
14:      end if
15:    end for
16:  end for
17:   $\mathbf{SPS}_T \leftarrow \mathbf{SPS}_T \cup \mathbf{SPS}_T^X$ 
18: end for
```

---

boundary search.  $\mathbf{PC}_T$  is obtained by removing the spouses of the target from the final  $\mathbf{MB}_T$  (lines 14-19). Inter-IAPC is very fast and sound (the proof of soundness is provided in [37]).

The subroutines DE-PCS (Algorithm 4) and DE-SPS (Algorithm 5) search a superset of  $\mathbf{PC}_T$  and  $\mathbf{SP}_T$  respectively with a severe restriction on the maximum conditioning size ( $|\mathbf{Z}| \leq 1$  in DE-PCS and  $|\mathbf{Z}| \leq 2$  in DE-SPS) in order to significantly increase the reliability of the tests. The variable filtering has two advantages : i) it allows HPC to scale to hundreds of thousands of variables by restricting the search to a subset of relevant variables, and ii) it eliminates many true or approximate deterministic relationships that produce many false negative errors in the output of the algorithm, as explained in [34, 37]. DE-SPS works in two steps. First, a growing phase (lines 4-8) adds the variables that are d-separated from the target but still remain associated with the target when conditioned on another variable from  $\mathbf{PCS}_T$ . The shrinking phase (lines 9-16) discards irrelevant variables that are ancestors or descendants of a target’s spouse. Pruning such irrelevant variables speeds up HPC.

#### *1.4. Network aggregation*

As discussed in the introduction, our practical goal is to extract a local BN structure around *ZNF217* that encodes the conditional independencies between the selected genes (out of 21329) given our sample of 132 chips. The most common approach to discovering the structure is to use learning with model selection to provide us with a single model. However, model selection is known to be sensitive to the particular data set, especially with few instances. Had we sampled another data set of the same size from the same distribution, model selection would have learned a different model [38]. So we cannot simply accept our chosen structure as a true representation of the underlying distribution. Averaging over the sampled structures that are generated by a sampling process produces models that are more robust, have greater confidence and place less reliance on a single dataset. Several approaches exist: generating samples of the BN structure from its marginal

posterior distribution using Monte Carlo Markov Chain (MCMC) [38, 48–50], or using bootstrapping methods for computing a statistical confidence features within a BN [27, 38]. In this study, we make use of the bootstrapping method to generate a more robust network structure. The ‘re-shuffled’ dataset is generated from the original dataset (re-sampling with replacement), the graph is built from this re-shuffled set and then the procedure is repeated a sufficient number of times. Confidence in a particular edge is measured as a percentage of the number of times this edge actually appears in the set of reconstructed graphs. If an edge has a confidence above the threshold, it is included in the consensus network. Thus, if dependencies have enough support in the bootstrapping process, they are captured and represented in the final consensus network. When computing confidence estimates, we define a feature as the existence of an edge between two nodes in the PDAG. Thus, the bootstrapped network has a confidence estimate assigned to each network edge. Thus, if dependencies have enough support in the bootstrapping process, they will be captured and represented in the final PDAG.

## 2. Results and Discussion

The consensus BN skeleton obtained by running HPC recursively on the present sample of women is shown in figure 1. Line thickness corresponds to the relative confidence of the edges. The edges that appeared in more than 25% of the networks were included in the aggregate skeleton. The graph illustrates the genes belonging to the first layer (square shaped nodes, 5 genes) or to the second layer (circles, 30 genes). The functions of these genes are detailed below.

Compiling literature reports indicate that *ZNF217* is a transcription factor that seems to drive oncogenic and pro-survival events in a variety of cancers. Interestingly, among the five genes belonging to the first layer, *CNOT2* codes for a proteic subunit of the general *CCR4-NOT* complex, which has been identified as a transcriptional regulator complex [51] and

as an important actor for RNA silencing [52]. Thus, one can suggest that *ZNF217* and the *CCR4-NOT* complex cooperate directly or indirectly for transcription regulation. The three other genes located in the first layer (*EPS15L2*, *FBOX11*, *LASS2*) also possess biological functions related to oncogenic and survival processes (pale green colored). *EPS15L2* codes for a protein (epidermal growth factor receptor pathway substrate 15-like 2) that may interact with the *EGFR/ErbB* system, and thus might be involved in two important survival pathways (*MAPK* and *PI3K/Akt* pathways) that are frequently activated in a variety of cancers, in particular in breast cancers [53–58]. The *F-box* protein encoded by the *FBXO11* gene constitutes one of the four subunits of an ubiquitin protein ligase complex which mediates the ubiquitination and subsequent proteasomal degradation of target proteins. More specifically, the *FBXO11* protein has been shown to lead to inhibition of the tumours suppressor *p53* functions [59] and to play an important role in regulating proliferation and apoptosis [60]. The *LASS2* gene is homologous to the yeast longevity assurance gene *LAG1*. In a human cellular context, the *LASS2* protein has been shown to inhibit the colony formation of human hepatoma cells *in vitro*, suggesting that this gene may be involved in the regulation of cell growth [61]. Moreover, high expression levels of *LASS2* transcript have been identified in breast tumours compared to normal breast tissue [62]. Finally, *PFDN4* codes for a subunit of a prefoldin protein, a complex that stabilizes newly synthesized polypeptides, thereby allowing them to fold correctly.

In the second layer, the genes in pale green: *RAP1B*, *ARF3*, *RAB21*, *ASF1A*, *SNX6*, *CTNNA3*, *MAPK1IP1L*, *FMO5*, *MUC1*, and *SLC4A3* code for proteins also described as strongly involved in oncogenic and survival pathways. Interestingly, *RAP1B*, *RAB21* and *ARF3* are all connected to *CNOT2* and all code for proteins belonging to the *RAS* oncogene family, a protein family known to control cell proliferation and metastasis [63, 64]. The *ASF1A* protein is involved in chromatin remodeling and senescence-associated cell cycle exit [65]. [66] demonstrated that the *sorting nexin 6*

protein (*SNX6*) is involved in the tumour suppressor *p27Kip1*-mediated functions. The proteins encoded by the *CTNNA3* and *MUC1* genes participate in the cell adhesion processes, and deregulated expression patterns of these proteins have been observed in a variety of cancers [67, 68]. The *FMO5* gene has been shown to be over-expressed in *ER+* breast tumours compared to normal breast tissue and associated with prognosis [69]. The *SLC4A3* protein that acts as an anion exchange protein has been associated with relapse time in lung cancer [70]. Finally *MAPK1IP1L* encoded protein interacts with the survival *MAPK* pathway.

More surprisingly, we also identified that 6 out of the 35 genes code for proteins involved in lipid metabolism (*CYB5R1*, *MTX1*, *ACSL1*, *LPCAT1*, *PIGT* and *LASS2*, orange in figure 1). Deregulated lipogenesis plays an important role in tumour cell survival and is under extensive investigation in the field of oncology, as enzymes that control these pathways are possible therapeutic targets for cancer [71]. Since interaction between *ZNF217* and lipid metabolism has yet to be experimentally demonstrated, one cannot exclude that deregulated lipid synthesis could represent one still undiscovered mechanism by which *ZNF217* acts.

In breast cancer, the *20q13* region where the *ZNF217* gene is located is amplified in up to 29% of tumours and is associated with early stage, aggressive phenotype and poor clinical prognosis [72]. Consequently, genes located on chromosome *20q13* appear as possible oncogenic targets of amplification. Interestingly, two genes (*PFDN4* and *PIGT*) identified by our study as connected with *ZNF217* also belong to the *20q13* chromosomal region, suggesting putative interaction with *ZNF217* at the genomic and/or at the expression level.

### 3. Conclusions

Our work describes candidate genes involved in and/or associated with *ZNF217* deregulated expression in breast tumours. The analysis was performed with a novel scalable and effective local BN structure learning algo-

rithm called HPC. The relevance of the genes identified is supported by the observation that at least 13 out of the 35 genes present in the first or second layer of our graph have been previously associated with survival and/or prognosis in cancers. In addition, identifying genes involved in lipid metabolism supplies new clues to investigate the molecular mechanisms driven by the *ZNF217* oncogene. However, future studies are needed to validate all these target genes and interactions. Strikingly, very strong supportive data for our work come from previous genome-wide expression profiling and chromatin precipitation studies aimed at identifying genes regulated by *ZNF217* in breast cancer cells [17, 73]. Indeed, these two studies identified significant binding of *ZNF217* to the *RAP1B*, *PFDN4* and *PIGT* gene promoters, suggesting that these three genes might be directly regulated by the *ZNF217* transcription activity [17, 73]. Moreover, silencing *ZNF217* in an adenocarcinoma breast cancer cells by a siRNA strategy has been demonstrated to lead to *FMO5*, *LASS2* and *RAB21* aberrant expression levels [17]. Taken together, these observations highlight that 6 out of the 35 genes we identified by this BN approach were also validated as putative *ZNF217* targets by independent experimental biological studies.

Inferring the local BN structure to discover the expression neighbourhood of a given gene could represent a new tool to help biologists understand the molecular mechanisms association with a given gene.

In conclusion, we suggest that local BN structure learning methods are valuable data mining tools to infer the local gene network around a target gene from the microarray data, without having to construct the whole BN first. Such methods can rapidly handle high dimensional gene expression databases without having to decide in advance which genes have to be included in the learning process. The advantage of this method is not that it will identify the "true gene interactions", but rather that it will perform initial data exploration to unearth new knowledge in an automated and rapid fashion.

Future substantiation through more experiments on other key genes known

to be involved in breast cancer, such as Her2, P53 and ESR1, will be undertaken in the near future. We hope to get more data to be able to separate the patients into two classes (poor and good survival), build networks for each of them and then compare the networks to identify whether (and how) the central gene in each case is associated with poor diagnosis.

### Authors contributions

SRM and AA designed and implemented the learning algorithms; EP and SRM performed the tests; PC, JV, AT analyzed the results; EP and AA chose the mathematical framework; CG and PC supervised the work; EP made the figure; EP, AA, JV and PC wrote the manuscript; CG critically reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

The authors thank the anonymous reviewers for helpful comments and references. The experiments reported here were performed on computers funded by a French Institute for Complex Systems (IXXI) grant.

### References

- [1] A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, T. Murray, J. Xu, C. Smigal, M. J. Thun, Cancer statistics, 2006, CA Cancer J Clin 56 (2) (2006) 106–30.
- [2] U. Nagalakshmi, Z. Wang, K. Waern, C. Shou, D. Raha, M. Gerstein, M. Snyder, The transcriptional landscape of the yeast genome defined by rna sequencing, Science 320 (5881) (2008) 1344–9. doi:10.1126/science.1158441.
- [3] C. M. Perou, T. Sørlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lønning, A. L. Børresen-Dale, P. O. Brown, D. Botstein, Molecular

portraits of human breast tumours, *Nature* 406 (6797) (2000) 747–52.  
doi:10.1038/35021093.

- [4] T. Sørlie, C. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, T. Thorsen, H. Quist, J. C. Matese, P. O. Brown, D. Botstein, P. E. Lønning, A. L. Børresen-Dale, Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications, *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (19) (2001) 10869–74. doi:10.1073/pnas.191367098.
- [5] L. J. van't Veer, H. Dai, M. J. van de Vijver, Y. D. He, A. A. M. Hart, M. Mao, H. L. Peterse, K. van der Kooy, M. J. Marton, A. T. Witteveen, G. J. Schreiber, R. M. Kerkhoven, C. Roberts, P. S. Linsley, R. Bernards, S. H. Friend, Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer, *Nature* 415 (6871) (2002) 530–6. doi:10.1038/415530a.
- [6] F. Courjal, M. Cuny, C. Rodriguez, G. Louason, P. Speiser, D. Katsaros, M. M. Tanner, R. Zeillinger, C. Theillet, Dna amplifications at 20q13 and mdm2 define distinct subsets of evolved breast and ovarian tumours, *Br J Cancer* 74 (12) (1996) 1984–9.
- [7] F. Courjal, M. Cuny, J. Simony-Lafontaine, G. Louason, P. Speiser, R. Zeillinger, C. Rodriguez, C. Theillet, Mapping of dna amplifications at 15 chromosomal localizations in 1875 breast tumors: definition of phenotypic groups, *Cancer Res* 57 (19) (1997) 4360–7.
- [8] A. Kallioniemi, O. P. Kallioniemi, J. Piper, M. Tanner, T. Stokke, L. Chen, H. S. Smith, D. Pinkel, J. W. Gray, F. M. Waldman, Detection and mapping of amplified dna sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization, *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (6) (1994) 2156–60.
- [9] H. Iwabuchi, M. Sakamoto, H. Sakunaga, Y. Y. Ma, M. L. Carcangiu, D. Pinkel, T. L. Yang-Feng, J. W. Gray, Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumors, *Cancer Res* 55 (24) (1995) 6172–80.

- [10] G. Sonoda, J. Palazzo, S. du Manoir, A. K. Godwin, M. Feder, M. Yakushiji, J. R. Testa, Comparative genomic hybridization detects frequent overrepresentation of chromosomal material from 3q26, 8q24, and 20q13 in human ovarian carcinomas, *Genes Chromosomes Cancer* 20 (4) (1997) 320–8.
- [11] C. Ginestier, N. Cervera, P. Finetti, S. Esteyries, B. Esterni, J. Adélaïde, L. Xerri, P. Viens, J. Jacquemier, E. Charafe-Jauffret, M. Chaffanet, D. Birnbaum, F. Bertucci, Prognosis and gene expression profiling of 20q13-amplified breast cancers, *Clin Cancer Res* 12 (15) (2006) 4533–44. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2339.
- [12] D. G. Ginzinger, T. E. Godfrey, J. Nigro, D. H. Moore, S. Suzuki, M. G. Pallavicini, J. W. Gray, R. H. Jensen, Measurement of dna copy number at microsatellite loci using quantitative pcr analysis, *Cancer Res* 60 (19) (2000) 5405–9.
- [13] G. H. Nonet, M. R. Stampfer, K. Chin, J. W. Gray, C. C. Collins, P. Yaswen, The znf217 gene amplified in breast cancers promotes immortalization of human mammary epithelial cells, *Cancer Res* 61 (4) (2001) 1250–4.
- [14] M. S. Banck, S. Li, H. Nishio, C. Wang, A. S. Beutler, M. J. Walsh, The znf217 oncogene is a candidate organizer of repressive histone modifiers, *Epigenetics* 4 (2) (2009) 100–6.
- [15] J. J. M. Cowger, Q. Zhao, M. Isovic, J. Torchia, Biochemical characterization of the zinc-finger protein 217 transcriptional repressor complex: identification of a znf217 consensus recognition sequence, *Oncogene* 26 (23) (2007) 3378–86. doi:10.1038/sj.onc.1210126.
- [16] K. G. R. Quinlan, M. Nardini, A. Verger, P. Francescato, P. Yaswen, D. Corda, M. Bolognesi, M. Crossley, Specific recognition of znf217 and other zinc finger proteins at a surface groove of c-terminal binding proteins, *Mol Cell Biol* 26 (21) (2006) 8159–72. doi:10.1128/MCB.00680-06.

- [17] G. Thillainadesan, M. Isovic, E. Loney, J. Andrews, M. Tini, J. Torchia, Genome analysis identifies the p15ink4b tumor suppressor as a direct target of the znf217/corest complex, *Mol Cell Biol* 28 (19) (2008) 6066–77. doi:10.1128/MCB.00246-08.
- [18] P. Li, S. Maines-Bandiera, W.-L. Kuo, Y. Guan, Y. Sun, M. Hills, G. Huang, C. C. Collins, P. C. K. Leung, J. W. Gray, N. Auersperg, Multiple roles of the candidate oncogene znf217 in ovarian epithelial neoplastic progression, *Int J Cancer* 120 (9) (2007) 1863–73. doi:10.1002/ijc.22300.
- [19] N. Friedman, M. Linial, I. Nachman, D. Pe'er, Using Bayesian networks to analyze expression data, *Journal of Computational Biology* 7 (3-4) (2000) 601–620.
- [20] M. Grzegorczyk, et al., Modelling non-stationary gene regulatory processes with a non-homogeneous Bayesian network and the allocation sampler, *Bioinformatics* 24 (18) (2008) 2071–2078.
- [21] J. M. Peña, J. Björkegren, J. Tegnér, Growing Bayesian network models of gene networks from seed genes, *Bioinformatics* 40 (2005) 224–229.
- [22] C. Auliac, V. Frouin, X. Gidrol, F. d'Alché Buc, Evolutionary approaches for the reverse-engineering of gene regulatory networks: A study on a biologically realistic dataset, *BMC Bioinformatics* 9.
- [23] A. Aussem, A. Tchernof, S. Rodrigues de Morais, S. Rome, Analysis of lifestyle and metabolic predictors of visceral obesity with bayesian networks, *BMC Bioinformatics* 11 (2010) 487.
- [24] A. Rodin, E. Boerwinkle, Mining genetic epidemiology data with Bayesian networks I: Bayesian networks and example application (plasma apoE levels), *Bioinformatics* 21 (15) (2005) 3273–3278.

- [25] A. Aussem, S. Rodrigues de Morais, F. Perraud, S. Rome, Robust gene selection from microarray data with a novel Markov boundary learning method: Application to diabetes analysis, in: European Conference on Symbolic and Quantitative Approaches to Reasoning with Uncertainty ECSQARU'09, Vol. 5590 of Lecture Notes in Artificial Intelligence, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Verona, Italy, 2009, pp. 724–735.
- [26] O. Gevaert, F. D. Smet, D. Timmerman, Y. Moreau, B. D. Moor, Predicting the prognosis of breast cancer by integrating clinical and microarray data with Bayesian networks, *Bioinformatics* 22 (14) (2006) E184–E190.
- [27] E. Steele, A. Tucker, Consensus and Meta-analysis regulatory networks for combining multiple microarray gene expression datasets, *Journal of Biomedical Informatics* 41 (6) (2008) 914–926.
- [28] A. Aussem, Special issue on bayesian networks guest editorial, *Neurocomputing* 73 (2010) 561–562.
- [29] R. E. Neapolitan, *Learning Bayesian Networks*, Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 2004.
- [30] A. Aussem, S. Rodrigues de Morais, A conservative feature subset selection algorithm with missing data, *Neurocomputing* 73 (2010) 585–590.
- [31] J. Peña, R. Nilsson, J. Björkegren, J. Tegnér, Towards scalable and data efficient learning of Markov boundaries, *International Journal of Approximate Reasoning* 45 (2) (2007) 211–232.
- [32] S. Fu, M. Desmarais, Tradeoff analysis of different Markov blanket local learning approaches, in: *Advances in Knowledge Discovery and Data Mining, 12th Pacific-Asia Conference, PAKDD 2008*, 2008, pp. 562–571.

- [33] J. Peña, Learning gaussian graphical models of gene networks with false discovery rate control, in: Proceedings of 6th European Conference on Evolutionary Computation, Machine Learning and Data Mining in Bioinformatics, 2008, pp. 165–176.
- [34] S. Rodrigues de Moraes, A. Aussem, A novel Markov boundary based feature subset selection algorithm, *Neurocomputing* 73 (2010) 578–584.
- [35] I. Tsamardinos, L. Brown, C. Aliferis, The max-min hill-climbing Bayesian network structure learning algorithm., *Machine Learning* 65 (1) (2006) 31–78.
- [36] I. Tsamardinos, C. Aliferis, A. Statnikov, Algorithms for large scale Markov blanket discovery., in: Florida Artificial Intelligence Research Society Conference FLAIRS’03, 2003, pp. 376–381.
- [37] S. Rodrigues de Moraes, A. Aussem, An efficient learning algorithm for local bayesian network structure discovery, in: European Conference on Machine Learning and Principles and Practice of Knowledge Discovery in Databases, ECML-PKDD’10, Lecture Notes in Computer Science, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, to appear, Barcelona, Spain, 2010.
- [38] N. Friedman, D. Koller, Being bayesian about network structure. a bayesian approach to structure discovery in bayesian networks, *Machine Learning* 50 (1-2) (2003) 95–125.
- [39] M. Chanrion, V. Negre, H. Fontaine, N. Salvetat, F. Bibeau, G. M. Grogan, L. Mauriac, D. Katsaros, F. Molina, C. Theillet, J.-M. Darbon, A gene expression signature that can predict the recurrence of tamoxifen-treated primary breast cancer., *Clin Cancer Res* 14 (6) (2008) 1744–1752. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1833.
- [40] Y. H. Yang, S. Dudoit, P. Luu, D. M. Lin, V. Peng, J. Ngai, T. P. Speed, Normalization for cdna microarray data: a robust composite method

addressing single and multiple slide systematic variation, Nucleic Acids Research 30 (4) (2002) e15.

- [41] J. Pearl, Probabilistic Reasoning in Intelligent Systems: Networks of Plausible Inference., Morgan Kaufmann, San Francisco, CA, USA, 1988.
- [42] A. Darwiche, Modeling and Reasoning with Bayesian Networks, Cambridge University Press, New York, 2009.
- [43] I. Tsamardinos, L. E. Brown, Bounding the false discovery rate in local Bayesian network learning, in: Proceedings AAAI National Conference on AI AAAI'08, 2008, pp. 1100–1105.
- [44] C. F. Aliferis, A. R. Statnikov, I. Tsamardinos, S. Mani, X. D. Koutsoukos, Local causal and markov blanket induction for causal discovery and feature selection for classification part ii: Analysis and extensions, Journal of Machine Learning Research 11 (2010) 235–284.
- [45] C. F. Aliferis, A. R. Statnikov, I. Tsamardinos, S. Mani, X. D. Koutsoukos, Local causal and markov blanket induction for causal discovery and feature selection for classification part i: Algorithms and empirical evaluation, Journal of Machine Learning Research 11 (2010) 171–234.
- [46] S. Rodrigues de Moraes, A. Aussem, A novel scalable and data efficient feature subset selection algorithm, in: European Conference on Machine Learning and Principles and Practice of Knowledge Discovery in Databases, ECML-PKDD'08, Vol. 5212 of Lecture Notes in Computer Science, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Antwerp, Belgium, 2008, pp. 298–312.
- [47] C. Meek, Causal inference and causal explanation with background knowledge, in: Proceedings of Eleventh Conference on Uncertainty in Artificial Intelligence, Morgan Kaufmann, 1995, pp. 403–418.

- [48] D. Heckerman, D. Geiger, D. Chickering, Learning bayesian networks: The combination of knowledge and statistical data, *Machine Learning* 20 (3) (1995) 197–243.
- [49] D. Madigan, J. York, Bayesian graphical models for discrete data, *International Statistical Review* 63 (2) (1995) 215–232.
- [50] B. Ellis, W. H. Wong, Learning causal bayesian network structures from experimental data, *Journal of the American Statistical Association* 103 (2008) 778–789.
- [51] G. S. Winkler, K. W. Mulder, V. J. Bardwell, E. Kalkhoven, H. T. M. Timmers, Human ccr4-not complex is a ligand-dependent repressor of nuclear receptor-mediated transcription, *EMBO J* 25 (13) (2006) 3089–99. doi:10.1038/sj.emboj.7601194.
- [52] X. Piao, X. Zhang, L. Wu, J. G. Belasco, Ccr4-not deadenylates mrna associated with rna-induced silencing complexes in human cells, *Mol Cell Biol* 30 (6) (2010) 1486–94. doi:10.1128/MCB.01481-09.
- [53] E. Atlas, M. Cardillo, I. Mehmi, H. Zahedkargaran, C. Tang, R. Lupu, Heregulin is sufficient for the promotion of tumorigenicity and metastasis of breast cancer cells *in vivo*, *Mol Cancer Res* 1 (3) (2003) 165–75.
- [54] D. J. Britton, I. R. Hutcheson, J. M. Knowlden, D. Barrow, M. Giles, R. A. McClelland, J. M. W. Gee, R. I. Nicholson, Bidirectional cross talk between eralpha and egfr signalling pathways regulates tamoxifen-resistant growth, *Breast Cancer Res Treat* 96 (2) (2006) 131–46. doi:10.1007/s10549-005-9070-2.
- [55] J. C. Donovan, A. Milic, J. M. Slingerland, Constitutive mek/mapk activation leads to p27(kip1) deregulation and antiestrogen resistance in human breast cancer cells, *J Biol Chem* 276 (44) (2001) 40888–95. doi:10.1074/jbc.M106448200.

- [56] H. Kurokawa, A. E. Lenferink, J. F. Simpson, P. I. Pisacane, M. X. Sliwkowski, J. T. Forbes, C. L. Arteaga, Inhibition of her2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against her2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells, *Cancer Res* 60 (20) (2000) 5887–94.
- [57] R. I. Nicholson, R. A. McClelland, J. M. Gee, D. L. Manning, P. Cannon, J. F. Robertson, I. O. Ellis, R. W. Blamey, Transforming growth factor-alpha and endocrine sensitivity in breast cancer, *Cancer Res* 54 (7) (1994) 1684–9.
- [58] S. Tovey, B. Dunne, C. J. Witton, A. Forsyth, T. G. Cooke, J. M. S. Bartlett, Can molecular markers predict when to implement treatment with aromatase inhibitors in invasive breast cancer?, *Clin Cancer Res* 11 (13) (2005) 4835–42. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0196.
- [59] W. M. Abida, A. Nikolaev, W. Zhao, W. Zhang, W. Gu, Fbxo11 promotes the neddylation of p53 and inhibits its transcriptional activity, *J Biol Chem* 282 (3) (2007) 1797–804. doi:10.1074/jbc.M609001200.
- [60] C. Guan, F. Lin, M. Zhou, W. Hong, L. Fu, W. Xu, D. Liu, Y. Wan, A. Xu, The role of vit1/fbxo11 in the regulation of apoptosis and tyrosinase export from endoplasmic reticulum in cultured melanocytes, *Int J Mol Med* 26 (1) (2010) 57–65.
- [61] H. Pan, W. X. Qin, K. K. Huo, D. F. Wan, Y. Yu, Z. G. Xu, Q. D. Hu, K. T. Gu, X. M. Zhou, H. Q. Jiang, P. P. Zhang, Y. Huang, Y. Y. Li, J. R. Gu, Cloning, mapping, and characterization of a human homologue of the yeast longevity assurance gene lag1, *Genomics* 77 (1-2) (2001) 58–64. doi:10.1006/geno.2001.6614.
- [62] R. Erez-Roman, R. Pienik, A. H. Futerman, Increased ceramide synthase 2 and 6 mRNA levels in breast cancer tissues and correlation with sphingosine kinase expression, *Biochem Biophys Res Commun* 391 (1) (2010) 219–23. doi:10.1016/j.bbrc.2009.11.035.

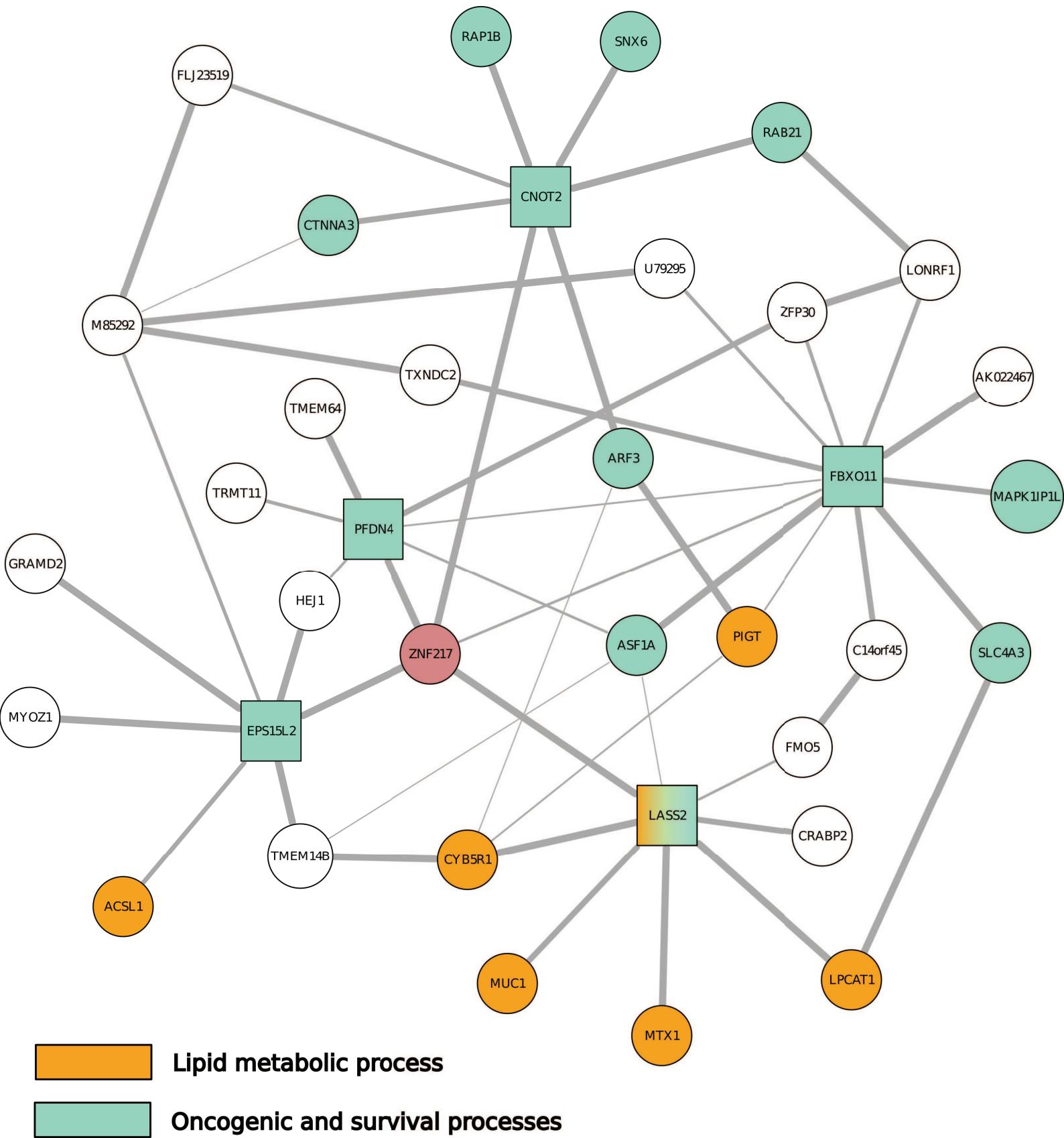
- [63] P.-L. Boulay, A. Claing, Arf proteins: molecular switches controlling tumour proliferation and metastasis, *Med Sci (Paris)* 25 (10) (2009) 783–5.
- [64] B. L. Tang, E. L. Ng, Rabs and cancer cell motility, *Cell Motil Cytoskeleton* 66 (7) (2009) 365–70. doi:10.1002/cm.20376.
- [65] S. Degerman, J. K. Siwicki, P. Osterman, K. Lafferty-Whyte, W. N. Keith, G. Roos, Telomerase upregulation is a postcrisis event during senescence bypass and immortalization of two nijmegen breakage syndrome t cell cultures, *Aging Cell* 9 (2) (2010) 220–35. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00550.x.
- [66] J. J. Fuster, J. M. González, M. D. Edo, R. Viana, P. Boya, J. Cervera, M. Verges, J. Rivera, V. Andrés, Tumor suppressor p27kip1 undergoes endolysosomal degradation through its interaction with sorting nexin 6, *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* doi:10.1096/fj.09-138255.
- [67] M. Meehan, A. Melvin, E. Gallagher, J. Smith, A. McGoldrick, C. Moss, S. Goossens, M. Harrison, E. Kay, J. Fitzpatrick, P. Dervan, A. M. Cann, Alpha-t-catenin (ctnna3) displays tumour specific monoallelic expression in urothelial carcinoma of the bladder, *Genes Chromosomes Cancer* 46 (6) (2007) 587–93. doi:10.1002/gcc.20443.
- [68] M. A. Tarp, A. L. Sørensen, U. Mandel, H. Paulsen, J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, H. Clausen, Identification of a novel cancer-specific immunodominant glycopeptide epitope in the muc1 tandem repeat, *Glycobiology* 17 (2) (2007) 197–209. doi:10.1093/glycob/cwl061.
- [69] I. Bièche, I. Girault, E. Urbain, S. Tozlu, R. Lidereau, Relationship between intratumoral expression of genes coding for xenobiotic-metabolizing enzymes and benefit from adjuvant tamoxifen in estrogen receptor alpha-positive postmenopausal breast carcinoma, *Breast Cancer Res* 6 (3) (2004) R252–63. doi:10.1186/bcr784.

- [70] Y. Qiu, H. Yang, H. Chen, L. Ge, X. Xu, X. Xiong, J. He, Detection of cea mrna, p53 and ae1/ae3 in haematoxylin-eosin-negative lymph nodes of early-stage non-small cell lung cancer may improve veracity of n staging and indicate prognosis, *Jpn J Clin Oncol* 40 (2) (2010) 146–52. doi:10.1093/jjco/hyp144.
- [71] T. Mashima, H. Seimiya, T. Tsuruo, De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy, *Br J Cancer* 100 (9) (2009) 1369–72. doi:10.1038/sj.bjc.6605007.
- [72] K. G. R. Quinlan, A. Verger, P. Yaswen, M. Crossley, Amplification of zinc finger gene 217 (znf217) and cancer: when good fingers go bad, *Biochim Biophys Acta* 1775 (2) (2007) 333–40. doi:10.1016/j.bbcan.2007.05.001.
- [73] S. R. Krig, V. X. Jin, M. C. Bieda, H. O'Geen, P. Yaswen, R. Green, P. J. Farnham, Identification of genes directly regulated by the oncogene znf217 using chromatin immunoprecipitation (chip)-chip assays, *J Biol Chem* 282 (13) (2007) 9703–12. doi:10.1074/jbc.M611752200.

## Figures

*Figure 1 - Local BN skeleton in the vicinity of ZNF217 oncogene*

Nodes with a direct connection to *ZNF217* (in dark pink) are square shaped. The thickness of the edges grows with the level of confidence. Pale green nodes are known to be related to oncogenic or survival processes, and orange nodes to lipid metabolic process.



## REFERENCES

- Agell L, Hernandez S, de Muga S, *et al.* (2008). "KLF6 and TP53 mutations are a rare event in prostate cancer: distinguishing between Taq polymerase artifacts and true mutations". *Mod Pathol* **21**: 1470-8.
- Akao J, Matsuyama H, Yamamoto Y, *et al.* (2006). "Chromosome 20q13.2 gain may predict intravesical recurrence after nephroureterectomy in upper urinary tract urothelial tumors". *Clin Cancer Res* **12**: 7004-8.
- Akaogi K, Nakajima Y, Ito I, *et al.* (2009). "KLF4 suppresses estrogen-dependent breast cancer growth by inhibiting the transcriptional activity of ERalpha". *Oncogene* **28**: 2894-902.
- Akhurst RJ, Deryck R (2001). "TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword". *Trends Cell Biol* **11**: S44-51.
- Albertson DG, Ylstra B, Segraves R, *et al.* (2000). "Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene". *Nat Genet* **25**: 144-6.
- Albrecht B, Hausmann M, Zitzelsberger H, *et al.* (2004). "Array-based comparative genomic hybridization for the detection of DNA sequence copy number changes in Barrett's adenocarcinoma". *J Pathol* **203**: 780-8.
- Alers JC, Krijtenburg PJ, Vis AN, *et al.* (2001). "Molecular cytogenetic analysis of prostatic adenocarcinomas from screening studies : early cancers may contain aggressive genetic features". *Am J Pathol* **158**: 399-406.
- Allinen M, Huusko P, Mantyniemi S, *et al.* (2001). "Mutation analysis of the CHK2 gene in families with hereditary breast cancer". *Br J Cancer* **85**: 209-12.
- Amiri A, Noei F, Jeganathan S, *et al.* (2007). "eEF1A2 activates Akt and stimulates Akt-dependent actin remodeling, invasion and migration". *Oncogene* **26**: 3027-40.
- Anand N, Murthy S, Amann G, *et al.* (2002). "Protein elongation factor EEF1A2 is a putative oncogene in ovarian cancer". *Nat Genet* **31**: 301-5.
- Anand S, Penrhyn-Lowe S, Venkitaraman AR (2003). "AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol". *Cancer Cell* **3**: 51-62.
- Anderson MG, Nakane M, Ruan X, *et al.* (2006). "Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors". *Cancer Chemother Pharmacol* **57**: 234-40.
- Aulmann S, Adler N, Rom J, *et al.* (2006). "c-myc amplifications in primary breast carcinomas and their local recurrences". *J Clin Pathol* **59**: 424-8.
- Aust DE, Muders M, Kohler A, *et al.* (2004). "Prognostic relevance of 20q13 gains in sporadic colorectal cancers: a FISH analysis". *Scand J Gastroenterol* **39**: 766-72.
- Balazs M, Adam Z, Treszl A, *et al.* (2001). "Chromosomal imbalances in primary and metastatic melanomas revealed by comparative genomic hybridization". *Cytometry* **46**: 222-32.
- Banck MS, Beaven SW, Narla G, *et al.* (2006). "KLF6 degradation after apoptotic DNA damage". *FEBS Lett* **580**: 6981-6.
- Banck MS, Li S, Nishio H, *et al.* (2009). "The ZNF217 oncogene is a candidate organizer of repressive histone modifiers". *Epigenetics* **4**: 100-6.
- Bandyopadhyay A, Lopez-Casillas F, Malik SN, *et al.* (2002). "Antitumor activity of a recombinant soluble betaglycan in human breast cancer xenograft". *Cancer Res* **62**: 4690-5.
- Bandyopadhyay A, Zhu Y, Cibull ML, *et al.* (1999). "A soluble transforming growth factor beta type III receptor suppresses tumorigenicity and metastasis of human breast cancer MDA-MB-231 cells". *Cancer Res* **59**: 5041-6.

- Bar-Shira A, Pinthus JH, Rozovsky U, *et al.* (2002)."Multiple genes in human 20q13 chromosomal region are involved in an advanced prostate cancer xenograft". *Cancer Res* **62**: 6803-7.
- Bar EE, Lin A, Mahairaki V, *et al.* (2010)."Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres". *Am J Pathol* **177**: 1491-502.
- Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, *et al.* (2003)."Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases". *J Clin Oncol* **21**: 1973-9.
- Bareis P, Bises G, Bischof MG, *et al.* (2001)."25-hydroxy-vitamin d metabolism in human colon cancer cells during tumor progression". *Biochem Biophys Res Commun* **285**: 1012-7.
- Bateman NW, Tan D, Pestell RG, *et al.* (2004)."Intestinal tumor progression is associated with altered function of KLF5". *J Biol Chem* **279**: 12093-101.
- Behrens P, Brinkmann U, Fogt F, *et al.* (2001)."Implication of the proliferation and apoptosis associated CSE1L/CAS gene for breast cancer development". *Anticancer Res* **21**: 2413-7.
- Benzeno S, Narla G, Allina J, *et al.* (2004)."Cyclin-dependent kinase inhibition by the KLF6 tumor suppressor protein through interaction with cyclin D1". *Cancer Res* **64**: 3885-91.
- Berger SL (2007)."The complex language of chromatin regulation during transcription". *Nature* **447**: 407-12.
- Bialkowska AB, Du Y, Fu H, *et al.* (2009)."Identification of novel small-molecule compounds that inhibit the proproliferative Kruppel-like factor 5 in colorectal cancer cells by high-throughput screening". *Mol Cancer Ther* **8**: 563-70.
- Bieche I, Laurendeau I, Tozlu S, *et al.* (1999)."Quantitation of MYC gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-PCR assay". *Cancer Res* **59**: 2759-65.
- Bjorge JD, Pang A, Fujita DJ (2000)."Identification of protein-tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines". *J Biol Chem* **275**: 41439-46.
- Bloom HJ, Richardson WW (1957)."Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years". *Br J Cancer* **11**: 359-77.
- Bockmuhl U, Schwendel A, Dietel M, *et al.* (1996)."Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinomas". *Cancer Res* **56**: 5325-9.
- Boni R, Wellmann A, Man YG, *et al.* (1999)."Expression of the proliferation and apoptosis-associated CAS protein in benign and malignant cutaneous melanocytic lesions". *Am J Dermatopathol* **21**: 125-8.
- Brankley SM, Fritcher EG, Smyrk TC, *et al.* (2011)."Fluorescence in situ hybridization mapping of esophagectomy specimens from patients with Barrett's esophagus with high-grade dysplasia or adenocarcinoma". *Hum Pathol*
- Brayer KJ, Segal DJ (2008)."Keep your fingers off my DNA: protein-protein interactions mediated by C2H2 zinc finger domains". *Cell Biochem Biophys* **50**: 111-31.
- Brinkmann U, Brinkmann E, Gallo M, *et al.* (1996)."Role of CAS, a human homologue to the yeast chromosome segregation gene CSE1, in toxin and tumor necrosis factor mediated apoptosis". *Biochemistry* **35**: 6891-9.

- Brustmann H (2004). "Expression of cellular apoptosis susceptibility protein in serous ovarian carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study". *Gynecol Oncol* **92**: 268-76.
- Buck A, Buchholz M, Wagner M, et al. (2006). "The tumor suppressor KLF11 mediates a novel mechanism in transforming growth factor beta-induced growth inhibition that is inactivated in pancreatic cancer". *Mol Cancer Res* **4**: 861-72.
- Buckley AF, Kuo CT, Leiden JM (2001). "Transcription factor LKLF is sufficient to program T cell quiescence via a c-Myc--dependent pathway". *Nat Immunol* **2**: 698-704.
- Buffart TE, van Grieken NC, Tijssen M, et al. (2009). "High resolution analysis of DNA copy-number aberrations of chromosomes 8, 13, and 20 in gastric cancers". *Virchows Arch* **455**: 213-23.
- Bureau C, Peron JM, Bouisson M, et al. (2008). "Expression of the transcription factor Klf6 in cirrhosis, macronodules, and hepatocellular carcinoma". *J Gastroenterol Hepatol* **23**: 78-86.
- Camacho-Vanegas O, Narla G, Teixeira MS, et al. (2007). "Functional inactivation of the KLF6 tumor suppressor gene by loss of heterozygosity and increased alternative splicing in glioblastoma". *Int J Cancer* **121**: 1390-5.
- Carvalho B, Postma C, Mongera S, et al. (2009). "Multiple putative oncogenes at the chromosome 20q amplicon contribute to colorectal adenoma to carcinoma progression". *Gut* **58**: 79-89.
- Castro A, Arlot-Bonnemains Y, Vigneron S, et al. (2002). "APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis". *EMBO Rep* **3**: 457-62.
- Cha TL, Chuang MJ, Wu ST, et al. (2009). "Dual degradation of aurora A and B kinases by the histone deacetylase inhibitor LBH589 induces G2-M arrest and apoptosis of renal cancer cells". *Clin Cancer Res* **15**: 840-50.
- Chaib H, Cockrell EK, Rubin MA, et al. (2001). "Profiling and verification of gene expression patterns in normal and malignant human prostate tissues by cDNA microarray analysis". *Neoplasia* **3**: 43-52.
- Chanchevalap S, Nandan MO, Merlin D, et al. (2004). "All-trans retinoic acid inhibits proliferation of intestinal epithelial cells by inhibiting expression of the gene encoding Kruppel-like factor 5". *FEBS Lett* **578**: 99-105.
- Chang R, Wang E (2007). "Mouse translation elongation factor eEF1A-2 interacts with Prdx-I to protect cells against apoptotic death induced by oxidative stress". *J Cell Biochem* **100**: 267-78.
- Chappuis PO, Nethercot V, Foulkes WD (2000). "Clinico-pathological characteristics of BRCA1- and BRCA2-related breast cancer". *Semin Surg Oncol* **18**: 287-95.
- Chen C, Benjamin MS, Sun X, et al. (2006). "KLF5 promotes cell proliferation and tumorigenesis through gene regulation and the TSU-Pr1 human bladder cancer cell line". *Int J Cancer* **118**: 1346-55.
- Chen C, Bhalala HV, Qiao H, et al. (2002a). "A possible tumor suppressor role of the KLF5 transcription factor in human breast cancer". *Oncogene* **21**: 6567-72.
- Chen C, Hytytin ER, Sun X, et al. (2003a). "Deletion, mutation, and loss of expression of KLF6 in human prostate cancer". *Am J Pathol* **162**: 1349-54.
- Chen C, Sun X, Ran Q, et al. (2005a). "Ubiquitin-proteasome degradation of KLF5 transcription factor in cancer and untransformed epithelial cells". *Oncogene* **24**: 3319-27.
- Chen GG, Xu H, Lee JF, et al. (2003b). "15-hydroxy-eicosatetraenoic acid arrests growth of colorectal cancer cells via a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway". *Int J Cancer* **107**: 837-43.

- Chen S, Zhou D, Okubo T, *et al.* (1999)."Breast tumor aromatase: functional role and transcriptional regulation". *Endocr Relat Cancer* **6**: 149-56.
- Chen X, Johns DC, Geiman DE, *et al.* (2001)."Kruppel-like factor 4 (gut-enriched Kruppel-like factor) inhibits cell proliferation by blocking G1/S progression of the cell cycle". *J Biol Chem* **276**: 30423-8.
- Chen Y, Olopade OI (2008)."MYC in breast tumor progression". *Expert Rev Anticancer Ther* **8**: 1689-98.
- Chen ZY, Shie JL, Tseng CC (2002b)."Gut-enriched Kruppel-like factor represses ornithine decarboxylase gene expression and functions as checkpoint regulator in colonic cancer cells". *J Biol Chem* **277**: 46831-9.
- Chen ZY, Wang X, Zhou Y, *et al.* (2005b)."Destabilization of Kruppel-like factor 4 protein in response to serum stimulation involves the ubiquitin-proteasome pathway". *Cancer Res* **65**: 10394-400.
- Cheng XF, Li D, Zhuang M, *et al.* (2008)."Growth inhibitory effect of Kruppel-like factor 6 on human prostatic carcinoma and renal carcinoma cell lines". *Tohoku J Exp Med* **216**: 35-45.
- Cheung CH, Coumar MS, Chang JY, *et al.* (2011)."Aurora kinase inhibitor patents and agents in clinical testing: an update (2009-10)". *Expert Opin Ther Pat* **21**: 857-84.
- Cheung CH, Coumar MS, Hsieh HP, *et al.* (2009)."Aurora kinase inhibitors in preclinical and clinical testing". *Expert Opin Investig Drugs* **18**: 379-98.
- Chin SF, Wang Y, Thorne NP, *et al.* (2007)."Using array-comparative genomic hybridization to define molecular portraits of primary breast cancers". *Oncogene* **26**: 1959-70.
- Chinnadurai G (2007)."Transcriptional regulation by C-terminal binding proteins". *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 1593-607.
- Cho YG, Choi BJ, Kim CJ, *et al.* (2006a)."Genetic alterations of the KLF6 gene in colorectal cancers". *Apmis* **114**: 458-64.
- Cho YG, Choi BJ, Song JW, *et al.* (2006b)."Aberrant expression of kruppel-like factor 6 protein in colorectal cancers". *World J Gastroenterol* **12**: 2250-3.
- Cho YG, Kim CJ, Park CH, *et al.* (2005)."Genetic alterations of the KLF6 gene in gastric cancer". *Oncogene* **24**: 4588-90.
- Cho YG, Song JH, Kim CJ, *et al.* (2007)."Genetic and epigenetic analysis of the KLF4 gene in gastric cancer". *Apmis* **115**: 802-8.
- Chrzan P, Skokowski J, Karmolinski A, *et al.* (2001)."Amplification of c-myc gene and overexpression of c-Myc protein in breast cancer and adjacent non-neoplastic tissue". *Clin Biochem* **34**: 557-62.
- Collins C, Rommens JM, Kowbel D, *et al.* (1998)."Positional cloning of ZNF217 and NABC1: genes amplified at 20q13.2 and overexpressed in breast carcinoma". *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 8703-8.
- Collins C, Volik S, Kowbel D, *et al.* (2001)."Comprehensive genome sequence analysis of a breast cancer amplicon". *Genome Res* **11**: 1034-42.
- Comperat E, Camparo P, Haus R, *et al.* (2007)."Aurora-A/STK-15 is a predictive factor for recurrent behaviour in non-invasive bladder carcinoma: a study of 128 cases of non-invasive neoplasms". *Virchows Arch* **450**: 419-24.
- Corzo C, Corominas JM, Tusquets I, *et al.* (2006)."The MYC oncogene in breast cancer progression: from benign epithelium to invasive carcinoma". *Cancer Genet Cytogenet* **165**: 151-6.
- Costa C, Espinet B, Molina MA, *et al.* (2009)."Analysis of gene status in cervical dysplastic lesions and squamous cell carcinoma using tissue microarrays". *Histol Histopathol* **24**: 821-9.

- Courjal F, Cuny M, Simony-Lafontaine J, *et al.* (1997)."Mapping of DNA amplifications at 15 chromosomal localizations in 1875 breast tumors: definition of phenotypic groups". *Cancer Res* **57**: 4360-7.
- Courjal F, Theillet C (1997)."Comparative genomic hybridization analysis of breast tumors with predetermined profiles of DNA amplification". *Cancer Res* **57**: 4368-77.
- Courtneidge SA (1994)."Protein tyrosine kinases, with emphasis on the Src family". *Semin Cancer Biol* **5**: 239-46.
- Cowger JJ, Zhao Q, Isovic M, *et al.* (2007)."Biochemical characterization of the zinc-finger protein 217 transcriptional repressor complex: identification of a ZNF217 consensus recognition sequence". *Oncogene* **26**: 3378-86.
- Cross HS, Bises G, Lechner D, *et al.* (2005)."The Vitamin D endocrine system of the gut--its possible role in colorectal cancer prevention". *J Steroid Biochem Mol Biol* **97**: 121-8.
- Cunliffe VT (2008)."Eloquent silence: developmental functions of Class I histone deacetylases". *Curr Opin Genet Dev* **18**: 404-10.
- Cuthill S, Agarwal P, Sarkar S, *et al.* (1999)."Dominant genetic alterations in immortalization: role for 20q gain". *Genes Chromosomes Cancer* **26**: 304-11.
- Daigo Y, Chin SF, Gorringe KL, *et al.* (2001)."Degenerate oligonucleotide primed-polymerase chain reaction-based array comparative genomic hybridization for extensive amplicon profiling of breast cancers : a new approach for the molecular analysis of paraffin-embedded cancer tissue". *Am J Pathol* **158**: 1623-31.
- Dang DT, Bachman KE, Mahatan CS, *et al.* (2000a)."Decreased expression of the gut-enriched Kruppel-like factor gene in intestinal adenomas of multiple intestinal neoplasia mice and in colonic adenomas of familial adenomatous polyposis patients". *FEBS Lett* **476**: 203-7.
- Dang DT, Chen X, Feng J, *et al.* (2003)."Overexpression of Kruppel-like factor 4 in the human colon cancer cell line RKO leads to reduced tumorigenicity". *Oncogene* **22**: 3424-30.
- Dang DT, Pevsner J, Yang VW (2000b)."The biology of the mammalian Kruppel-like family of transcription factors". *Int J Biochem Cell Biol* **32**: 1103-21.
- Davidson CJ, Tirouvanziam R, Herzenberg LA, *et al.* (2005)."Functional evolution of the vertebrate Myb gene family: B-Myb, but neither A-Myb nor c-Myb, complements Drosophila Myb in hemocytes". *Genetics* **169**: 215-29.
- De Angelis PM, Clausen OP, Schjolberg A, *et al.* (1999)."Chromosomal gains and losses in primary colorectal carcinomas detected by CGH and their associations with tumour DNA ploidy, genotypes and phenotypes". *Br J Cancer* **80**: 526-35.
- De Angelis PM, Stokke T, Beigi M, *et al.* (2001)."Prognostic significance of recurrent chromosomal aberrations detected by comparative genomic hybridization in sporadic colorectal cancer". *Int J Colorectal Dis* **16**: 38-45.
- Deckers M, van Dinther M, Buijs J, *et al.* (2006)."The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells". *Cancer Res* **66**: 2202-9.
- Deeb KK, Trump DL, Johnson CS (2007)."Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics". *Nat Rev Cancer* **7**: 684-700.
- Dennler S, Itoh S, Vivien D, *et al.* (1998)."Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene". *Embo J* **17**: 3091-100.
- Diebold J, Mosinger K, Peiro G, *et al.* (2000)."20q13 and cyclin D1 in ovarian carcinomas. Analysis by fluorescence in situ hybridization". *J Pathol* **190**: 564-71.
- DiFeo A, Feld L, Rodriguez E, *et al.* (2008)."A functional role for KLF6-SV1 in lung adenocarcinoma prognosis and chemotherapy response". *Cancer Res* **68**: 965-70.

- Difeo A, Huang F, Sangodkar J, *et al.* (2009). "KLF6-SV1 is a novel antiapoptotic protein that targets the BH3-only protein NOXA for degradation and whose inhibition extends survival in an ovarian cancer model". *Cancer Res* **69**: 4733-41.
- DiFeo A, Narla G, Hirshfeld J, *et al.* (2006). "Roles of KLF6 and KLF6-SV1 in ovarian cancer progression and intraperitoneal dissemination". *Clin Cancer Res* **12**: 3730-9.
- Douglas EJ, Fiegler H, Rowan A, *et al.* (2004). "Array comparative genomic hybridization analysis of colorectal cancer cell lines and primary carcinomas". *Cancer Res* **64**: 4817-25.
- Du JX, Bialkowska AB, McConnell BB, *et al.* (2008). "SUMOylation regulates nuclear localization of Kruppel-like factor 5". *J Biol Chem* **283**: 31991-2002.
- Dumitrescu RG, Cotarla I (2005). "Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005?" *J Cell Mol Med* **9**: 208-21.
- Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI (2007). "Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients". *Breast Cancer Res* **9**: R6.
- El-Rifai W, Harper JC, Cummings OW, *et al.* (1998). "Consistent genetic alterations in xenografts of proximal stomach and gastro-esophageal junction adenocarcinomas". *Cancer Res* **58**: 34-7.
- Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, *et al.* (2001). "Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells". *Genes Dev* **15**: 50-65.
- Ellenrieder V, Buck A, Harth A, *et al.* (2004). "KLF11 mediates a critical mechanism in TGF-beta signaling that is inactivated by Erk-MAPK in pancreatic cancer cells". *Gastroenterology* **127**: 607-20.
- Etcheverry A, Aubry M, de Tayrac M, *et al.* (2010). "DNA methylation in glioblastoma: impact on gene expression and clinical outcome". *BMC Genomics* **11**: 701.
- Evans PM, Zhang W, Chen X, *et al.* (2007). "Kruppel-like factor 4 is acetylated by p300 and regulates gene transcription via modulation of histone acetylation". *J Biol Chem* **282**: 33994-4002.
- Fadlelmola FM, Zhou M, de Leeuw RJ, *et al.* (2008). "Sub-megabase resolution tiling (SMRT) array-based comparative genomic hybridization profiling reveals novel gains and losses of chromosomal regions in Hodgkin Lymphoma and Anaplastic Large Cell Lymphoma cell lines". *Mol Cancer* **7**: 2.
- Fang WY, Liu TF, Xie WB, *et al.* (2005). "Reexploring the possible roles of some genes associated with nasopharyngeal carcinoma using microarray-based detection". *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **37**: 541-6.
- Fejzo MS, Dering J, Ginther C, *et al.* (2008). "Comprehensive analysis of 20q13 genes in ovarian cancer identifies ADRM1 as amplification target". *Genes Chromosomes Cancer* **47**: 873-83.
- Fernandez-Zapico ME, Lomberk GA, Tsuji S, *et al.* (2011). "A functional family-wide screening of SP/KLF proteins identifies a subset of suppressors of KRAS-mediated cell growth". *Biochem J* **435**: 529-37.
- Fiche M, Avet-Loiseau H, Maugard CM, *et al.* (2000). "Gene amplifications detected by fluorescence in situ hybridization in pure intraductal breast carcinomas: relation to morphology, cell proliferation and expression of breast cancer-related genes". *Int J Cancer* **89**: 403-10.
- Forozan F, Mahlamaki EH, Monni O, *et al.* (2000). "Comparative genomic hybridization analysis of 38 breast cancer cell lines: a basis for interpreting complementary DNA microarray data". *Cancer Res* **60**: 4519-25.

- Forristal CE, Wright KL, Hanley NA, *et al.* (2010). "Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions". *Reproduction* **139**: 85-97.
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, *et al.* (1996). "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1". *Mol Cell Biol* **16**: 4604-13.
- Foster KW, Frost AR, McKie-Bell P, *et al.* (2000). "Increase of GKLF messenger RNA and protein expression during progression of breast cancer". *Cancer Res* **60**: 6488-95.
- Foster KW, Ren S, Louro ID, *et al.* (1999). "Oncogene expression cloning by retroviral transduction of adenovirus E1A-immortalized rat kidney RK3E cells: transformation of a host with epithelial features by c-MYC and the zinc finger protein GKLF". *Cell Growth Differ* **10**: 423-34.
- Freier K, Joos S, Flechtenmacher C, *et al.* (2003). "Tissue microarray analysis reveals site-specific prevalence of oncogene amplifications in head and neck squamous cell carcinoma". *Cancer Res* **63**: 1179-82.
- Frenel JS, Campone M (2010). "[Chemotherapy for early breast cancer: practices in 2010]". *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **39**: F79-84.
- Friedenreich CM, Courneya KS, Bryant HE (2001). "Influence of physical activity in different age and life periods on the risk of breast cancer". *Epidemiology* **12**: 604-12.
- Friedrich M, Rafi L, Mitschke T, *et al.* (2003). "Analysis of the vitamin D system in cervical carcinomas, breast cancer and ovarian cancer". *Recent Results Cancer Res* **164**: 239-46.
- Fu J, Bian M, Jiang Q, *et al.* (2007). "Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis". *Mol Cancer Res* **5**: 1-10.
- Fukuda T, Mishina Y, Walker MP, *et al.* (2005). "Conditional transgenic system for mouse aurora a kinase: degradation by the ubiquitin proteasome pathway controls the level of the transgenic protein". *Mol Cell Biol* **25**: 5270-81.
- Fuxe J, Vincent T, Garcia de Herreros A (2010). "Transcriptional crosstalk between TGF-beta and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes". *Cell Cycle* **9**: 2363-74.
- Gaiser T, Berroa-Garcia L, Kemmerling R, *et al.* (2010). "Automated analysis of protein expression and gene amplification within the same cells of paraffin-embedded tumour tissue". *Anal Cell Pathol (Amst)* **33**: 105-12.
- Garcia-Bassets I, Kwon YS, Telesse F, *et al.* (2007). "Histone methylation-dependent mechanisms impose ligand dependency for gene activation by nuclear receptors". *Cell* **128**: 505-18.
- Ge R, Rajeev V, Ray P, *et al.* (2006). "Inhibition of growth and metastasis of mouse mammary carcinoma by selective inhibitor of transforming growth factor-beta type I receptor kinase in vivo". *Clin Cancer Res* **12**: 4315-30.
- Ghaleb AM, Aggarwal G, Bialkowska AB, *et al.* (2008). "Notch inhibits expression of the Kruppel-like factor 4 tumor suppressor in the intestinal epithelium". *Mol Cancer Res* **6**: 1920-7.
- Ghaleb AM, Katz JP, Kaestner KH, *et al.* (2007). "Kruppel-like factor 4 exhibits antiapoptotic activity following gamma-radiation-induced DNA damage". *Oncogene* **26**: 2365-73.
- Ghayad SE, Vendrell JA, Bieche I, *et al.* (2009). "Identification of TACC1, NOV, and PTTG1 as new candidate genes associated with endocrine therapy resistance in breast cancer". *J Mol Endocrinol* **42**: 87-103.
- Giefing M, Wierzbicka M, Rydzanicz M, *et al.* (2008). "Chromosomal gains and losses indicate oncogene and tumor suppressor gene candidates in salivary gland tumors". *Neoplasma* **55**: 55-60.

- Ginestier C, Cervera N, Finetti P, *et al.* (2006)."Prognosis and gene expression profiling of 20q13-amplified breast cancers". *Clin Cancer Res* **12**: 4533-44.
- Ginzinger DG, Godfrey TE, Nigro J, *et al.* (2000)."Measurement of DNA copy number at microsatellite loci using quantitative PCR analysis". *Cancer Res* **60**: 5405-9.
- Glinsky GV, Glinskii AB, Stephenson AJ, *et al.* (2004)."Gene expression profiling predicts clinical outcome of prostate cancer". *J Clin Invest* **113**: 913-23.
- Goldstein BG, Chao HH, Yang Y, *et al.* (2007)."Overexpression of Kruppel-like factor 5 in esophageal epithelia in vivo leads to increased proliferation in basal but not suprabasal cells". *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**: G1784-92.
- Grann VR, Troxel AB, Zojwalla NJ, *et al.* (2005)."Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma". *Cancer* **103**: 2241-51.
- Green AR, Burney C, Granger CJ, *et al.* (2008a)."The prognostic significance of steroid receptor co-regulators in breast cancer: co-repressor NCOR2/SMRT is an independent indicator of poor outcome". *Breast Cancer Res Treat* **110**: 427-37.
- Green MR, Woolery JE, Mahadevan D (2008b)."Update on Aurora Kinase Targeted Therapeutics in Oncology". *Expert Opin Drug Discov* **6**: 291-307.
- Grunert S, Jechlinger M, Beug H (2003)."Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis". *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 657-65.
- Guan XY, Fang Y, Sham JS, *et al.* (2000)."Recurrent chromosome alterations in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization". *Genes Chromosomes Cancer* **29**: 110-6.
- Guarino M (2010)."Src signaling in cancer invasion". *J Cell Physiol* **223**: 14-26.
- Guo P, Dong XY, Zhang X, *et al.* (2009a)."Pro-proliferative factor KLF5 becomes anti-proliferative in epithelial homeostasis upon signaling-mediated modification". *J Biol Chem* **284**: 6071-8.
- Guo P, Dong XY, Zhao K, *et al.* (2009b)."Opposing effects of KLF5 on the transcription of MYC in epithelial proliferation in the context of transforming growth factor beta". *J Biol Chem* **284**: 28243-52.
- Guo P, Dong XY, Zhao KW, *et al.* (2010)."Estrogen-induced interaction between KLF5 and estrogen receptor (ER) suppresses the function of ER in ER-positive breast cancer cells". *Int J Cancer* **126**: 81-9.
- Gyorffy B, Lanczky A, Eklund AC, *et al.* (2010)."An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients". *Breast Cancer Res Treat* **123**: 725-31.
- Hakimi MA, Dong Y, Lane WS, *et al.* (2003)."A candidate X-linked mental retardation gene is a component of a new family of histone deacetylase-containing complexes". *J Biol Chem* **278**: 7234-9.
- Hanash S (2004)."Integrated global profiling of cancer". *Nat Rev Cancer* **4**: 638-44.
- Harrell FE (2001). Regression modeling strategies. New York, Springer
- Harris J, Morrow M, Norton L (1997). Cancer principles and Practice of Oncology. Lippincott-Raven: 1557-1616. Philadelphia.
- Hartel M, Narla G, Wente MN, *et al.* (2008)."Increased alternative splicing of the KLF6 tumour suppressor gene correlates with prognosis and tumour grade in patients with pancreatic cancer". *Eur J Cancer* **44**: 1895-903.
- Heidenblad M, Lindgren D, Veltman JA, *et al.* (2005)."Microarray analyses reveal strong influence of DNA copy number alterations on the transcriptional patterns in pancreatic cancer: implications for the interpretation of genomic amplifications". *Oncogene* **24**: 1794-801.
- Henon D (2010). La santé des femmes en France, Avis et rapports du conseil économique, social et environnemental.

- Hesling C, Fattet L, Teyre G, *et al.* (2011). "Antagonistic regulation of EMT by TIF1gamma and Smad4 in mammary epithelial cells". *EMBO Rep* **12**: 665-72.
- Hidaka S, Yasutake T, Takeshita H, *et al.* (2000). "Differences in 20q13.2 copy number between colorectal cancers with and without liver metastasis". *Clin Cancer Res* **6**: 2712-7.
- Hirasawa Y, Arai M, Imazeki F, *et al.* (2006). "Methylation status of genes upregulated by demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine in hepatocellular carcinoma". *Oncology* **71**: 77-85.
- Hirota T, Kunitoku N, Sasayama T, *et al.* (2003). "Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells". *Cell* **114**: 585-98.
- Holstege H, Joosse SA, van Oostrom CT, *et al.* (2009). "High incidence of protein-truncating TP53 mutations in BRCA1-related breast cancer". *Cancer Res* **69**: 3625-33.
- Holzmann K, Kohlhammer H, Schwaenen C, *et al.* (2004). "Genomic DNA-chip hybridization reveals a higher incidence of genomic amplifications in pancreatic cancer than conventional comparative genomic hybridization and leads to the identification of novel candidate genes". *Cancer Res* **64**: 4428-33.
- Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, *et al.* (2009). "Cell death". *N Engl J Med* **361**: 1570-83.
- Hu W, Hofstetter WL, Li H, *et al.* (2009). "Putative tumor-suppressive function of Kruppel-like factor 4 in primary lung carcinoma". *Clin Cancer Res* **15**: 5688-95.
- Huang B, Ahn YT, McPherson L, *et al.* (2007). "Interaction of PRP4 with Kruppel-like factor 13 regulates CCL5 transcription". *J Immunol* **178**: 7081-7.
- Huang G, Krig S, Kowbel D, *et al.* (2005). "ZNF217 suppresses cell death associated with chemotherapy and telomere dysfunction". *Hum Mol Genet* **14**: 3219-25.
- Huang X, Li X, Guo B (2008). "KLF6 induces apoptosis in prostate cancer cells through up-regulation of ATF3". *J Biol Chem* **283**: 29795-801.
- Huber MA, Kraut N, Beug H (2005). "Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression". *Curr Opin Cell Biol* **17**: 548-58.
- Ibrado AM, Liu L, Bhalla K (1997). "Bcl-xL overexpression inhibits progression of molecular events leading to paclitaxel-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia HL-60 cells". *Cancer Res* **57**: 1109-15.
- Isola JJ, Kallioniemi OP, Chu LW, *et al.* (1995). "Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer". *Am J Pathol* **147**: 905-11.
- Ito G, Uchiyama M, Kondo M, *et al.* (2004). "Kruppel-like factor 6 is frequently down-regulated and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells". *Cancer Res* **64**: 3838-43.
- Iwabuchi H, Sakamoto M, Sakunaga H, *et al.* (1995). "Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumors". *Cancer Res* **55**: 6172-80.
- Jang SH, Wientjes MG, Au JL (2001). "Kinetics of P-glycoprotein-mediated efflux of paclitaxel". *J Pharmacol Exp Ther* **298**: 1236-42.
- Jeganathan S, Lee JM (2007). "Binding of elongation factor eEF1A2 to phosphatidylinositol 4-kinase beta stimulates lipid kinase activity and phosphatidylinositol 4-phosphate generation". *J Biol Chem* **282**: 372-80.
- Jenkins DE, Hornig YS, Oei Y, *et al.* (2005). "Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive *in vivo* detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice". *Breast Cancer Res* **7**: R444-54.

- Johnsen SA, Subramaniam M, Janknecht R, *et al.* (2002). "TGFbeta inducible early gene enhances TGFbeta/Smad-dependent transcriptional responses". *Oncogene* **21**: 5783-90.
- Johnson KC, Hu J, Mao Y (2000). "Passive and active smoking and breast cancer risk in Canada, 1994-97". *Cancer Causes Control* **11**: 211-21.
- Jordan MA (2002). "Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin". *Curr Med Chem Anticancer Agents* **2**: 1-17.
- Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, *et al.* (1996). "Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death". *Cancer Res* **56**: 816-25.
- Julien SG, Dube N, Read M, *et al.* (2007). "Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis". *Nat Genet* **39**: 338-46.
- Kaczynski J, Cook T, Urrutia R (2003). "Sp1- and Kruppel-like transcription factors". *Genome Biol* **4**: 206.
- Kadosh D, Struhl K (1998). "Histone deacetylase activity of Rpd3 is important for transcriptional repression in vivo". *Genes Dev* **12**: 797-805.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Piper J, *et al.* (1994). "Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization". *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 2156-60.
- Kalluri R, Weinberg RA (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition". *J Clin Invest* **119**: 1420-8.
- Kanai M, Wei D, Li Q, *et al.* (2006). "Loss of Kruppel-like factor 4 expression contributes to Sp1 overexpression and human gastric cancer development and progression". *Clin Cancer Res* **12**: 6395-402.
- Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, *et al.* (2002). "The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon". *Development* **129**: 2619-28.
- Kawai-Kowase K, Kumar MS, Hoofnagle MH, *et al.* (2005). "PIAS1 activates the expression of smooth muscle cell differentiation marker genes by interacting with serum response factor and class I basic helix-loop-helix proteins". *Mol Cell Biol* **25**: 8009-23.
- Keller G, Vogelsang H, Becker I, *et al.* (1999). "Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation". *Am J Pathol* **155**: 337-42.
- Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, *et al.* (2003). "Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1". *Circ Res* **93**: 1074-81.
- Kelly RJ, Morris JC (2009). "Transforming growth factor-beta: a target for cancer therapy". *J Immunotoxicol* **7**: 15-26.
- Key TJ, Schatzkin A, Willett WC, *et al.* (2004). "Diet, nutrition and the prevention of cancer". *Public Health Nutr* **7**: 187-200.
- Kim WY, Sharpless NE (2006). "The regulation of INK4/ARF in cancer and aging". *Cell* **127**: 265-75.
- Knoepfler PS, Eisenman RN (1999). "Sin meets NuRD and other tails of repression". *Cell* **99**: 447-50.
- Koipally J, Georgopoulos K (2000). "Ikaros interactions with CtBP reveal a repression mechanism that is independent of histone deacetylase activity". *J Biol Chem* **275**: 19594-602.
- Koivisto PA, Hytyinen ER, Matikainen M, *et al.* (2004). "Kruppel-like factor 6 germ-line mutations are infrequent in Finnish hereditary prostate cancer". *J Urol* **172**: 506-7.

- Korn WM, Yasutake T, Kuo WL, *et al.* (1999)."Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in colorectal cancer metastatic to liver, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization". *Genes Chromosomes Cancer* **25**: 82-90.
- Korpal M, Kang Y (2010)."Targeting the transforming growth factor-beta signalling pathway in metastatic cancer". *Eur J Cancer* **46**: 1232-40.
- Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, *et al.* (2004)."HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc". *Embo J* **23**: 1949-56.
- Koynova DK, Jordanova ES, Milev AD, *et al.* (2007)."Gene-specific fluorescence in-situ hybridization analysis on tissue microarray to refine the region of chromosome 20q amplification in melanoma". *Melanoma Res* **17**: 37-41.
- Kremer-Tal S, Narla G, Chen Y, *et al.* (2007)."Downregulation of KLF6 is an early event in hepatocarcinogenesis, and stimulates proliferation while reducing differentiation". *J Hepatol* **46**: 645-54.
- Kremer-Tal S, Reeves HL, Narla G, *et al.* (2004)."Frequent inactivation of the tumor suppressor Kruppel-like factor 6 (KLF6) in hepatocellular carcinoma". *Hepatology* **40**: 1047-52.
- Krig SR, Jin VX, Bieda MC, *et al.* (2007)."Identification of genes directly regulated by the oncogene ZNF217 using chromatin immunoprecipitation (ChIP)-chip assays". *J Biol Chem* **282**: 9703-12.
- Krig SR, Miller JK, Frietze S, *et al.* (2010)."ZNF217, a candidate breast cancer oncogene amplified at 20q13, regulates expression of the ErbB3 receptor tyrosine kinase in breast cancer cells". *Oncogene* **29**: 5500-10.
- Kulkarni G, Turbin DA, Amiri A, *et al.* (2007)."Expression of protein elongation factor eEF1A2 predicts favorable outcome in breast cancer". *Breast Cancer Res Treat* **102**: 31-41.
- Kuo CT, Veselits ML, Barton KP, *et al.* (1997)."The LKLF transcription factor is required for normal tunica media formation and blood vessel stabilization during murine embryogenesis". *Genes Dev* **11**: 2996-3006.
- Kuo KT, Mao TL, Chen X, *et al.* (2010)."DNA copy numbers profiles in affinity-purified ovarian clear cell carcinoma". *Clin Cancer Res* **16**: 1997-2008.
- Kuppuswamy M, Vijayalingam S, Zhao LJ, *et al.* (2008)."Role of the PLDLS-binding cleft region of CtBP1 in recruitment of core and auxiliary components of the corepressor complex". *Mol Cell Biol* **28**: 269-81.
- Kwon YS, Garcia-Bassets I, Hutt KR, *et al.* (2007)."Sensitive ChIP-DSL technology reveals an extensive estrogen receptor alpha-binding program on human gene promoters". *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 4852-7.
- Laiho P, Hienonen T, Karhu A, *et al.* (2003)."Genome-wide allelotyping of 104 Finnish colorectal cancers reveals an excess of allelic imbalance in chromosome 20q in familial cases". *Oncogene* **22**: 2206-14.
- Larramendy ML, Tarkkanen M, Valle J, *et al.* (1997)."Gains, losses, and amplifications of DNA sequences evaluated by comparative genomic hybridization in chondrosarcomas". *Am J Pathol* **150**: 685-91.
- Lassmann S, Shen Y, Jutting U, *et al.* (2007a)."Predictive value of Aurora-A/STK15 expression for late stage epithelial ovarian cancer patients treated by adjuvant chemotherapy". *Clin Cancer Res* **13**: 4083-91.
- Lassmann S, Weis R, Makowiec F, *et al.* (2007b)."Array CGH identifies distinct DNA copy number profiles of oncogenes and tumor suppressor genes in chromosomal- and microsatellite-unstable sporadic colorectal carcinomas". *J Mol Med (Berl)* **85**: 293-304.

- Lassus H, Staff S, Leminen A, *et al.* (2011)."Aurora-A overexpression and aneuploidy predict poor outcome in serous ovarian carcinoma". *Gynecol Oncol* **120**: 11-7.
- Le MG, Mathieu MC, Douc-Rasy S, *et al.* (1999)."c-myc, p53 and bcl-2, apoptosis-related genes in infiltrating breast carcinomas: evidence of a link between bcl-2 protein over-expression and a lower risk of metastasis and death in operable patients". *Int J Cancer* **84**: 562-7.
- Lee JJ, Foukakis T, Hashemi J, *et al.* (2007)."Molecular cytogenetic profiles of novel and established human anaplastic thyroid carcinoma models". *Thyroid* **17**: 289-301.
- Lee JM (2003)."The role of protein elongation factor eEF1A2 in ovarian cancer". *Reprod Biol Endocrinol* **1**: 69.
- Lee MG, Wynder C, Cooch N, *et al.* (2005)."An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation". *Nature* **437**: 432-5.
- Letessier A, Sircoulomb F, Ginestier C, *et al.* (2006)."Frequency, prognostic impact, and subtype association of 8p12, 8q24, 11q13, 12p13, 17q12, and 20q13 amplifications in breast cancers". *BMC Cancer* **6**: 245.
- Li D, Yea S, Dolios G, *et al.* (2005)."Regulation of Kruppel-like factor 6 tumor suppressor activity by acetylation". *Cancer Res* **65**: 9216-25.
- Li D, Zhu J, Firozi PF, *et al.* (2003a)."Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora A kinase in human pancreatic cancer". *Clin Cancer Res* **9**: 991-7.
- Li P, Maines-Bandiera S, Kuo WL, *et al.* (2007)."Multiple roles of the candidate oncogene ZNF217 in ovarian epithelial neoplastic progression". *Int J Cancer* **120**: 1863-73.
- Li R, Wang H, Bekele BN, *et al.* (2006)."Identification of putative oncogenes in lung adenocarcinoma by a comprehensive functional genomic approach". *Oncogene* **25**: 2628-35.
- Li Y, Liu D, Chen D, *et al.* (2003b)."Human DF3/MUC1 carcinoma-associated protein functions as an oncogene". *Oncogene* **22**: 6107-10.
- Li Z, Bao S, Wu Q, *et al.* (2009)."Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells". *Cancer Cell* **15**: 501-13.
- Liao CF, Luo SF, Li LT, *et al.* (2008)."CSE1L/CAS, the cellular apoptosis susceptibility protein, enhances invasion and metastasis but not proliferation of cancer cells". *J Exp Clin Cancer Res* **27**: 15.
- Lim SK, Gopalan G (2007)."Aurora-A kinase interacting protein 1 (AURKAIP1) promotes Aurora-A degradation through an alternative ubiquitin-independent pathway". *Biochem J* **403**: 119-27.
- Lin M, Smith LT, Smiraglia DJ, *et al.* (2006)."DNA copy number gains in head and neck squamous cell carcinoma". *Oncogene* **25**: 1424-33.
- Lipsick JS, Wang DM (1999)."Transformation by v-Myb". *Oncogene* **18**: 3047-55.
- Littlepage LE, Ruderman JV (2002)."Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit". *Genes Dev* **16**: 2274-85.
- Littlepage LE, Wu H, Andresson T, *et al.* (2002)."Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A". *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15440-5.
- Liu R, Zheng HQ, Zhou Z, *et al.* (2009)."KLF5 promotes breast cell survival partially through fibroblast growth factor-binding protein 1-pERK-mediated dual specificity MKP-1 protein phosphorylation and stabilization". *J Biol Chem* **284**: 16791-8.
- Lu LY, Wood JL, Ye L, *et al.* (2008)."Aurora A is essential for early embryonic development and tumor suppression". *J Biol Chem* **283**: 31785-90.

- Luo A, Kong J, Hu G, et al. (2004)."Discovery of Ca<sup>2+</sup>-relevant and differentiation-associated genes downregulated in esophageal squamous cell carcinoma using cDNA microarray". *Oncogene* **23**: 1291-9.
- Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, et al. (2004)."A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen". *Cancer Cell* **5**: 607-16.
- Mackay A, Tamber N, Fenwick K, et al. (2009)."A high-resolution integrated analysis of genetic and expression profiles of breast cancer cell lines". *Breast Cancer Res Treat* **118**: 481-98.
- Mahlamaki EH, Barlund M, Tanner M, et al. (2002)."Frequent amplification of 8q24, 11q, 17q, and 20q-specific genes in pancreatic cancer". *Genes Chromosomes Cancer* **35**: 353-8.
- Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, et al. (2005)."Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1". *Blood* **105**: 659-69.
- Mao X, Orchard G, Lillington DM, et al. (2003)."Amplification and overexpression of JUNB is associated with primary cutaneous T-cell lymphomas". *Blood* **101**: 1513-9.
- Mao XG, Yan M, Xue XY, et al. (2011)."Overexpression of ZNF217 in glioblastoma contributes to the maintenance of glioma stem cells regulated by hypoxia-inducible factors". *Lab Invest* **91**: 1068-78.
- Marchio C, Iravani M, Natrajan R, et al. (2008)."Genomic and immunophenotypical characterization of pure micropapillary carcinomas of the breast". *J Pathol* **215**: 398-410.
- Massague J (2008)."TGFbeta in Cancer". *Cell* **134**: 215-30.
- Masselink H, Vastenhouw N, Bernards R (2001)."B-myb rescues ras-induced premature senescence, which requires its transactivation domain". *Cancer Lett* **171**: 87-101.
- McConnell BB, Yang VW (2010)."Mammalian Kruppel-like factors in health and diseases". *Physiol Rev* **90**: 1337-81.
- McGrath KG (2003)."An earlier age of breast cancer diagnosis related to more frequent use of antiperspirants/deodorants and underarm shaving". *Eur J Cancer Prev* **12**: 479-85.
- Mehta TS, Lu H, Wang X, et al. (2009)."A unique sequence in the N-terminal regulatory region controls the nuclear localization of KLF8 by cooperating with the C-terminal zinc-fingers". *Cell Res* **19**: 1098-109.
- Metzger E, Wissmann M, Yin N, et al. (2005)."LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription". *Nature* **437**: 436-9.
- Michels KB, Ekbom A (2004)."Caloric restriction and incidence of breast cancer". *Jama* **291**: 1226-30.
- Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, et al. (1994)."TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors". *J Cell Biol* **127**: 2021-36.
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. (1994)."A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1". *Science* **266**: 66-71.
- Mimori K, Tanaka Y, Yoshinaga K, et al. (2004)."Clinical significance of the overexpression of the candidate oncogene CYP24 in esophageal cancer". *Ann Oncol* **15**: 236-41.
- Mirick DK, Davis S, Thomas DB (2002)."Antiperspirant use and the risk of breast cancer". *J Natl Cancer Inst* **94**: 1578-80.
- Miyaki M, Yamaguchi T, Iijima T, et al. (2006)."Difference in the role of loss of heterozygosity at 10p15 (KLF6 locus) in colorectal carcinogenesis between sporadic and familial adenomatous polyposis and hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients". *Oncology* **71**: 131-5.
- Miyamoto S, Suzuki T, Muto S, et al. (2003)."Positive and negative regulation of the cardiovascular transcription factor KLF5 by p300 and the oncogenic regulator SET

- through interaction and acetylation on the DNA-binding domain". *Mol Cell Biol* **23**: 8528-41.
- Miyoshi N, Ishii H, Mimori K, et al. (2010)."Abnormal expression of PFDN4 in colorectal cancer: a novel marker for prognosis". *Ann Surg Oncol* **17**: 3030-6.
- Mole DR, Blancher C, Copley RR, et al. (2009)."Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts". *J Biol Chem* **284**: 16767-75.
- Morohara K, Nakao K, Tajima Y, et al. (2005)."Analysis by comparative genomic hybridization of gastric cancer with peritoneal dissemination and/or positive peritoneal cytology". *Cancer Genet Cytogenet* **161**: 57-62.
- Muhlbauer KR, Grone HJ, Ernst T, et al. (2003)."Analysis of human prostate cancers and cell lines for mutations in the TP53 and KLF6 tumour suppressor genes". *Br J Cancer* **89**: 687-90.
- Mukai S, Hiyama T, Tanaka S, et al. (2007)."Involvement of Kruppel-like factor 6 (KLF6) mutation in the development of nonpolypoid colorectal carcinoma". *World J Gastroenterol* **13**: 3932-8.
- Muraoka-Cook RS, Kurokawa H, Koh Y, et al. (2004)."Conditional overexpression of active transforming growth factor beta1 in vivo accelerates metastases of transgenic mammary tumors". *Cancer Res* **64**: 9002-11.
- Muraoka RS, Dumont N, Ritter CA, et al. (2002)."Blockade of TGF-beta inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases". *J Clin Invest* **109**: 1551-9.
- Murphy LC, Watson P (2002)."Steroid receptors in human breast tumorigenesis and breast cancer progression". *Biomed Pharmacother* **56**: 65-77.
- Myllykangas S, Junnila S, Kokkola A, et al. (2008)."Integrated gene copy number and expression microarray analysis of gastric cancer highlights potential target genes". *Int J Cancer* **123**: 817-25.
- Nadler Y, Camp RL, Schwartz C, et al. (2008)."Expression of Aurora A (but not Aurora B) is predictive of survival in breast cancer". *Clin Cancer Res* **14**: 4455-62.
- Nagai R, Friedman SL, Kasuga M (2009). The Biology of Kruppel-like Factors. New York: Springer.
- Naidu R, Wahab NA, Yadav M, et al. (2002)."Protein expression and molecular analysis of c-myc gene in primary breast carcinomas using immunohistochemistry and differential polymerase chain reaction". *Int J Mol Med* **9**: 189-96.
- Nakamura Y, Migita T, Hosoda F, et al. (2009)."Kruppel-like factor 12 plays a significant role in poorly differentiated gastric cancer progression". *Int J Cancer* **125**: 1859-67.
- Nakopoulou L, Tsirmpa I, Giannopoulou I, et al. (2002)."Aneuploidy of chromosome 20 in invasive breast cancer correlates with poor outcome". *Cancer Genet Cytogenet* **134**: 127-32.
- Nancarrow DJ, Handoko HY, Smithers BM, et al. (2008)."Genome-wide copy number analysis in esophageal adenocarcinoma using high-density single-nucleotide polymorphism arrays". *Cancer Res* **68**: 4163-72.
- Nandan MO, Chanchevalap S, Dalton WB, et al. (2005)."Kruppel-like factor 5 promotes mitosis by activating the cyclin B1/Cdc2 complex during oncogenic Ras-mediated transformation". *FEBS Lett* **579**: 4757-62.
- Nandan MO, Yoon HS, Zhao W, et al. (2004)."Kruppel-like factor 5 mediates the transforming activity of oncogenic H-Ras". *Oncogene* **23**: 3404-13.
- Narayan G, Bourdon V, Chaganti S, et al. (2007)."Gene dosage alterations revealed by cDNA microarray analysis in cervical cancer: identification of candidate amplified and overexpressed genes". *Genes Chromosomes Cancer* **46**: 373-84.

- Narla G, DiFeo A, Fernandez Y, *et al.* (2008). "KLF6-SV1 overexpression accelerates human and mouse prostate cancer progression and metastasis". *J Clin Invest* **118**: 2711-21.
- Narla G, Difeo A, Reeves HL, *et al.* (2005a). "A germline DNA polymorphism enhances alternative splicing of the KLF6 tumor suppressor gene and is associated with increased prostate cancer risk". *Cancer Res* **65**: 1213-22.
- Narla G, DiFeo A, Yao S, *et al.* (2005b). "Targeted inhibition of the KLF6 splice variant, KLF6 SV1, suppresses prostate cancer cell growth and spread". *Cancer Res* **65**: 5761-8.
- Narla G, Heath KE, Reeves HL, *et al.* (2001). "KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer". *Science* **294**: 2563-6.
- Narla G, Kremer-Tal S, Matsumoto N, *et al.* (2007). "In vivo regulation of p21 by the Kruppel-like factor 6 tumor-suppressor gene in mouse liver and human hepatocellular carcinoma". *Oncogene* **26**: 4428-34.
- Nelen MR, Padberg GW, Peeters EA, *et al.* (1996). "Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23". *Nat Genet* **13**: 114-6.
- Nishi H, Nakada T, Kyo S, *et al.* (2004). "Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT)". *Mol Cell Biol* **24**: 6076-83.
- Nishida N, Nagasaka T, Kashiwagi K, *et al.* (2007). "High copy amplification of the Aurora-A gene is associated with chromosomal instability phenotype in human colorectal cancers". *Cancer Biol Ther* **6**: 525-33.
- Nishizaki T, Ozaki S, Harada K, *et al.* (1998). "Investigation of genetic alterations associated with the grade of astrocytic tumor by comparative genomic hybridization". *Genes Chromosomes Cancer* **21**: 340-6.
- Noguchi S (2006). "Predictive factors for response to docetaxel in human breast cancers". *Cancer Sci* **97**: 813-20.
- Nonet GH, Stampfer MR, Chin K, *et al.* (2001). "The ZNF217 gene amplified in breast cancers promotes immortalization of human mammary epithelial cells". *Cancer Res* **61**: 1250-4.
- Nunez N, Clifton MM, Funnell AP, *et al.* The multi-zinc finger protein ZNF217 contacts DNA through a two finger domain". *J Biol Chem*
- Nunez N, Clifton MM, Funnell AP, *et al.* (2011). "The multi-zinc finger protein ZNF217 contacts DNA through a two finger domain". *J Biol Chem*
- Ohnishi S, Ohnami S, Laub F, *et al.* (2003). "Downregulation and growth inhibitory effect of epithelial-type Kruppel-like transcription factor KLF4, but not KLF5, in bladder cancer". *Biochem Biophys Res Commun* **308**: 251-6.
- Oishi Y, Manabe I, Tobe K, *et al.* (2008). "SUMOylation of Kruppel-like transcription factor 5 acts as a molecular switch in transcriptional programs of lipid metabolism involving PPAR-delta". *Nat Med* **14**: 656-66.
- Oishi Y, Manabe I, Tobe K, *et al.* (2005). "Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation". *Cell Metab* **1**: 27-39.
- Okada M, Akimaru H, Hou DX, *et al.* (2002). "Myb controls G(2)/M progression by inducing cyclin B expression in the Drosophila eye imaginal disc". *Embo J* **21**: 675-84.
- Ouellet V, Guyot MC, Le Page C, *et al.* (2006). "Tissue array analysis of expression microarray candidates identifies markers associated with tumor grade and outcome in serous epithelial ovarian cancer". *Int J Cancer* **119**: 599-607.
- Ouyang L, Chen X, Bieker JJ (1998). "Regulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) transcriptional activity by phosphorylation of a protein kinase casein kinase II site within its interaction domain". *J Biol Chem* **273**: 23019-25.

- Pandya AY, Talley LI, Frost AR, *et al.* (2004). "Nuclear localization of KLF4 is associated with an aggressive phenotype in early-stage breast cancer". *Clin Cancer Res* **10**: 2709-19.
- Pandya K, Townes TM (2002). "Basic residues within the Kruppel zinc finger DNA binding domains are the critical nuclear localization determinants of EKLF/KLF-1". *J Biol Chem* **277**: 16304-12.
- Pardali K, Moustakas A (2007). "Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer". *Biochim Biophys Acta* **1775**: 21-62.
- Parise RA, Egorin MJ, Kanterewicz B, *et al.* (2006). "CYP24, the enzyme that catabolizes the antiproliferative agent vitamin D, is increased in lung cancer". *Int J Cancer* **119**: 1819-28.
- Payton M, Bush TL, Chung G, *et al.* (2010). "Preclinical evaluation of AMG 900, a novel potent and highly selective pan-aurora kinase inhibitor with activity in taxane-resistant tumor cell lines". *Cancer Res* **70**: 9846-54.
- Peiro G, Diebold J, Baretton GB, *et al.* (2001). "Cellular apoptosis susceptibility gene expression in endometrial carcinoma: correlation with Bcl-2, Bax, and caspase-3 expression and outcome". *Int J Gynecol Pathol* **20**: 359-67.
- Peiro G, Diebold J, Lohrs U (2002). "CAS (cellular apoptosis susceptibility) gene expression in ovarian carcinoma: Correlation with 20q13.2 copy number and cyclin D1, p53, and Rb protein expression". *Am J Clin Pathol* **118**: 922-9.
- Perdomo J, Verger A, Turner J, *et al.* (2005). "Role for SUMO modification in facilitating transcriptional repression by BKLF". *Mol Cell Biol* **25**: 1549-59.
- Perkins AC, Sharpe AH, Orkin SH (1995). "Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF". *Nature* **375**: 318-22.
- Pertschuk LP, Axiotis CA (1999). "Steroid Hormone Receptor Immunohistochemistry in Breast Cancer: Past, Present, and Future". *Breast J* **5**: 3-12.
- Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, *et al.* (1999). "TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells". *J Cell Sci* **112 ( Pt 24)**: 4557-68.
- Pinke DE, Kalloger SE, Francetic T, *et al.* (2008). "The prognostic significance of elongation factor eEF1A2 in ovarian cancer". *Gynecol Oncol* **108**: 561-8.
- Plevova P, Cerna D, Balcar A, *et al.* (2010). "CCND1 and ZNF217 gene amplification is equally frequent in BRCA1 and BRCA2 associated and non-BRCA breast cancer". *Neoplasma* **57**: 325-32.
- Quadrini KJ, Bieker JJ (2006). "EKLF/KLF1 is ubiquitinated in vivo and its stability is regulated by activation domain sequences through the 26S proteasome". *FEBS Lett* **580**: 2285-93.
- Quinlan KG, Nardini M, Verger A, *et al.* (2006). "Specific recognition of ZNF217 and other zinc finger proteins at a surface groove of C-terminal binding proteins". *Mol Cell Biol* **26**: 8159-72.
- Quinlan KG, Verger A, Yaswen P, *et al.* (2007). "Amplification of zinc finger gene 217 (ZNF217) and cancer: when good fingers go bad". *Biochim Biophys Acta* **1775**: 333-40.
- Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO (2010). "Combinatorial biomarker expression in breast cancer". *Breast Cancer Res Treat* **120**: 293-308.
- Raschella G, Cesi V, Amendola R, *et al.* (1999). "Expression of B-myb in neuroblastoma tumors is a poor prognostic factor independent from MYCN amplification". *Cancer Res* **59**: 3365-8.
- Rasheed ZA, Kowalski J, Smith BD, *et al.* (2011). "Concise review: Emerging concepts in clinical targeting of cancer stem cells". *Stem Cells* **29**: 883-7.

- Ravdin PM, Green S, Dorr TM, *et al.* (1992)."Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study". *J Clin Oncol* **10**: 1284-91.
- Reeves HL, Narla G, Ogunbiyi O, *et al.* (2004)."Kruppel-like factor 6 (KLF6) is a tumor-suppressor gene frequently inactivated in colorectal cancer". *Gastroenterology* **126**: 1090-103.
- Reinholz MM, An MW, Johnsen SA, *et al.* (2004)."Differential gene expression of TGF beta inducible early gene (TIEG), Smad7, Smad2 and Bard1 in normal and malignant breast tissue". *Breast Cancer Res Treat* **86**: 75-88.
- Renwick A, Thompson D, Seal S, *et al.* (2006)."ATM mutations that cause ataxiatelangiectasia are breast cancer susceptibility alleles". *Nat Genet* **38**: 873-5.
- Roberts AB, Wakefield LM (2003)."The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis". *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8621-3.
- Rooney PH, Boonsong A, McFadyen MC, *et al.* (2004)."The candidate oncogene ZNF217 is frequently amplified in colon cancer". *J Pathol* **204**: 282-8.
- Rowland BD, Bernards R, Peeper DS (2005)."The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene". *Nat Cell Biol* **7**: 1074-82.
- Rowland BD, Peeper DS (2006)."KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer". *Nat Rev Cancer* **6**: 11-23.
- Rozenblum E, Vahteristo P, Sandberg T, *et al.* (2002)."A genomic map of a 6-Mb region at 13q21-q22 implicated in cancer development: identification and characterization of candidate genes". *Hum Genet* **110**: 111-21.
- Ruest LB, Marcotte R, Wang E (2002)."Peptide elongation factor eEF1A-2/S1 expression in cultured differentiated myotubes and its protective effect against caspase-3-mediated apoptosis". *J Biol Chem* **277**: 5418-25.
- Rygiel AM, Milano F, Ten Kate FJ, *et al.* (2008)."Gains and amplifications of c-myc, EGFR, and 20.q13 loci in the no dysplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence of Barrett's esophagus". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**: 1380-5.
- Sakai N, Kajiyama Y, Iwanuma Y, *et al.* (2009)."Study of abnormal chromosome regions in esophageal squamous cell carcinoma by comparative genomic hybridization: relationship of lymph node metastasis and distant metastasis to selected abnormal regions". *Dis Esophagus* **23**: 415-21.
- Sakakura C, Mori T, Sakabe T, *et al.* (1999)."Gains, losses, and amplifications of genomic materials in primary gastric cancers analyzed by comparative genomic hybridization". *Genes Chromosomes Cancer* **24**: 299-305.
- Sakorafas GH, Tsiotou AG (2000)."Genetic predisposition to breast cancer: a surgical perspective". *Br J Surg* **87**: 149-62.
- Sala A (2005)."B-MYB, a transcription factor implicated in regulating cell cycle, apoptosis and cancer". *Eur J Cancer* **41**: 2479-84.
- Sangodkar J, DiFeo A, Feld L, *et al.* (2009a)."Targeted reduction of KLF6-SV1 restores chemotherapy sensitivity in resistant lung adenocarcinoma". *Lung Cancer* **66**: 292-7.
- Sangodkar J, Shi J, DiFeo A, *et al.* (2009b)."Functional role of the KLF6 tumour suppressor gene in gastric cancer". *Eur J Cancer* **45**: 666-76.
- Sattin RW, Rubin GL, Webster LA, *et al.* (1985)."Family history and the risk of breast cancer". *Jama* **253**: 1908-13.
- Savelieva E, Belair CD, Newton MA, *et al.* (1997)."20q gain associates with immortalization: 20q13.2 amplification correlates with genome instability in human papillomavirus 16 E7 transformed human uroepithelial cells". *Oncogene* **14**: 551-60.

- Sayagues JM, Abad Mdel M, Melchor HB, *et al.* (2010)."Intratumoural cytogenetic heterogeneity of sporadic colorectal carcinomas suggests several pathways to liver metastasis". *J Pathol* **221**: 308-19.
- Scharer CD, Laycock N, Osunkoya AO, *et al.* (2008)."Aurora kinase inhibitors synergize with paclitaxel to induce apoptosis in ovarian cancer cells". *J Transl Med* **6**: 79.
- Schatzkin A, Jones DY, Hoover RN, *et al.* (1987)."Alcohol consumption and breast cancer in the epidemiologic follow-up study of the first National Health and Nutrition Examination Survey". *N Engl J Med* **316**: 1169-73.
- Schipf A, Mayr D, Kirchner T, *et al.* (2008)."Molecular genetic aberrations of ovarian and uterine carcinosarcomas--a CGH and FISH study". *Virchows Arch* **452**: 259-68.
- Schlaeger C, Longerich T, Schiller C, *et al.* (2008)."Etiology-dependent molecular mechanisms in human hepatocarcinogenesis". *Hepatology* **47**: 511-20.
- Schrader KA, Masciari S, Boyd N, *et al.* (2008)."Hereditary diffuse gastric cancer: association with lobular breast cancer". *Fam Cancer* **7**: 73-82.
- Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, *et al.* (2007)."Genome regulation by polycomb and trithorax proteins". *Cell* **128**: 735-45.
- Schuierer M, Hilger-Eversheim K, Dobner T, *et al.* (2001)."Induction of AP-2alpha expression by adenoviral infection involves inactivation of the AP-2rep transcriptional corepressor CtBP1". *J Biol Chem* **276**: 27944-9.
- Schwendel A, Richard F, Langreck H, *et al.* (1998)."Chromosome alterations in breast carcinomas: frequent involvement of DNA losses including chromosomes 4q and 21q". *Br J Cancer* **78**: 806-11.
- Scorilas A, Trangas T, Yotis J, *et al.* (1999)."Determination of c-myc amplification and overexpression in breast cancer patients: evaluation of its prognostic value against c-erbB-2, cathepsin-D and clinicopathological characteristics using univariate and multivariate analysis". *Br J Cancer* **81**: 1385-91.
- Scotto L, Narayan G, Nandula SV, *et al.* (2008)."Identification of copy number gain and overexpressed genes on chromosome arm 20q by an integrative genomic approach in cervical cancer: potential role in progression". *Genes Chromosomes Cancer* **47**: 755-65.
- Segre JA, Bauer C, Fuchs E (1999)."Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin". *Nat Genet* **22**: 356-60.
- Sen S, Zhou H, White RA (1997)."A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines". *Oncogene* **14**: 2195-200.
- Sengupta T, Chen K, Milot E, *et al.* (2008)."Acetylation of EKLF is essential for epigenetic modification and transcriptional activation of the beta-globin locus". *Mol Cell Biol* **28**: 6160-70.
- Sewalt RG, Gunster MJ, van der Vlag J, *et al.* (1999)."C-Terminal binding protein is a transcriptional repressor that interacts with a specific class of vertebrate Polycomb proteins". *Mol Cell Biol* **19**: 777-87.
- Shang X, Burlingame SM, Okcu MF, *et al.* (2009)."Aurora A is a negative prognostic factor and a new therapeutic target in human neuroblastoma". *Mol Cancer Ther* **8**: 2461-9.
- Shi H, Bevier M, Johansson R, *et al.* (2011)."Single nucleotide polymorphisms in the 20q13 amplicon genes in relation to breast cancer risk and clinical outcome". *Breast Cancer Res Treat*
- Shi Y, Sawada J, Sui G, *et al.* (2003) "Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex". *Nature* **422**: 735-8.
- Shie JL, Chen ZY, Fu M, *et al.* (2000a)."Gut-enriched Kruppel-like factor represses cyclin D1 promoter activity through Sp1 motif". *Nucleic Acids Res* **28**: 2969-76.

- Shie JL, Chen ZY, O'Brien MJ, et al. (2000b)."Role of gut-enriched Kruppel-like factor in colonic cell growth and differentiation". *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**: G806-14.
- Shields JM, Christy RJ, Yang VW (1996)."Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest". *J Biol Chem* **271**: 20009-17.
- Shimada M, Imura J, Kozaki T, et al. (2005)."Detection of Her2/neu, c-MYC and ZNF217 gene amplification during breast cancer progression using fluorescence in situ hybridization". *Oncol Rep* **13**: 633-41.
- Shindo T, Manabe I, Fukushima Y, et al. (2002)."Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling". *Nat Med* **8**: 856-63.
- Siatecka M, Xue L, Bieker JJ (2007)."Sumoylation of EKLF promotes transcriptional repression and is involved in inhibition of megakaryopoiesis". *Mol Cell Biol* **27**: 8547-60.
- Sieri S, Krogh V, Muti P, et al. (2002)."Fat and protein intake and subsequent breast cancer risk in postmenopausal women". *Nutr Cancer* **42**: 10-7.
- Simmen FA, Su Y, Xiao R, et al. (2008)."The Kruppel-like factor 9 (KLF9) network in HEC-1-A endometrial carcinoma cells suggests the carcinogenic potential of dys-regulated KLF9 expression". *Reprod Biol Endocrinol* **6**: 41.
- Simmen RC, Pabona JM, Velarde MC, et al. (2010)."The emerging role of Kruppel-like factors in endocrine-responsive cancers of female reproductive tissues". *J Endocrinol* **204**: 223-31.
- Simmen RC, Zhang XL, Michel FJ, et al. (2002)."Molecular markers of endometrial epithelial cell mitogenesis mediated by the Sp/Kruppel-like factor BTEB1". *DNA Cell Biol* **21**: 115-28.
- Simpson PT, Reis-Filho JS, Lambros MB, et al. (2008)."Molecular profiling pleomorphic lobular carcinomas of the breast: evidence for a common molecular genetic pathway with classic lobular carcinomas". *J Pathol* **215**: 231-44.
- Singh B, Gogineni SK, Sacks PG, et al. (2001)."Molecular cytogenetic characterization of head and neck squamous cell carcinoma and refinement of 3q amplification". *Cancer Res* **61**: 4506-13.
- Soeda A, Park M, Lee D, et al. (2009)."Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha". *Oncogene* **28**: 3949-59.
- Somiari SB, Shriver CD, He J, et al. (2004)."Global search for chromosomal abnormalities in infiltrating ductal carcinoma of the breast using array-comparative genomic hybridization". *Cancer Genet Cytogenet* **155**: 108-18.
- Sommer A, Hilfenhaus S, Menkel A, et al. (1997)."Cell growth inhibition by the Mad/Max complex through recruitment of histone deacetylase activity". *Curr Biol* **7**: 357-65.
- Song A, Patel A, Thamatrakoln K, et al. (2002)."Functional domains and DNA-binding sequences of RFLAT-1/KLF13, a Kruppel-like transcription factor of activated T lymphocytes". *J Biol Chem* **277**: 30055-65.
- Sonoda G, Palazzo J, du Manoir S, et al. (1997)."Comparative genomic hybridization detects frequent overrepresentation of chromosomal material from 3q26, 8q24, and 20q13 in human ovarian carcinomas". *Genes Chromosomes Cancer* **20**: 320-8.
- Sorbello V, Fuso L, Sfiligoi C, et al. (2003)."Quantitative real-time RT-PCR analysis of eight novel estrogen-regulated genes in breast cancer". *Int J Biol Markers* **18**: 123-9.
- Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, et al. (1990)."Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10". *Cancer Res* **50**: 6075-86.

- Spittau B, Wang Z, Boinska D, *et al.* (2007). "Functional domains of the TGF-beta-inducible transcription factor Tieg3 and detection of two putative nuclear localization signals within the zinc finger DNA-binding domain". *J Cell Biochem* **101**: 712-22.
- Stanbrough M, Bubley GJ, Ross K, *et al.* (2006). "Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer". *Cancer Res* **66**: 2815-25.
- Stella Tsai CS, Chen HC, Tung JN, *et al.* (2010). "Serum cellular apoptosis susceptibility protein is a potential prognostic marker for metastatic colorectal cancer". *Am J Pathol* **176**: 1619-28.
- Stone CD, Chen ZY, Tseng CC (2002). "Gut-enriched Kruppel-like factor regulates colonic cell growth through APC/beta-catenin pathway". *FEBS Lett* **530**: 147-52.
- Strobel T, Kraeft SK, Chen LB, *et al.* (1998a). "BAX expression is associated with enhanced intracellular accumulation of paclitaxel: a novel role for BAX during chemotherapy-induced cell death". *Cancer Res* **58**: 4776-81.
- Strobel T, Tai YT, Korsmeyer S, *et al.* (1998b). "BAD partly reverses paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells". *Oncogene* **17**: 2419-27.
- Subramaniam M, Hefferan TE, Tau K, *et al.* (1998). "Tissue, cell type, and breast cancer stage-specific expression of a TGF-beta inducible early transcription factor gene". *J Cell Biochem* **68**: 226-36.
- Sun G, Qin J, Qiu Y, *et al.* (2009). "Microarray analysis of gene expression in the ovarian cancer cell line HO-8910 with silencing of the ZNF217 gene". *Mol Med Report* **2**: 851-5.
- Sun G, Zhou J, Yin A, *et al.* (2008a). "Silencing of ZNF217 gene influences the biological behavior of a human ovarian cancer cell line". *Int J Oncol* **32**: 1065-71.
- Sun R, Chen X, Yang VW (2001). "Intestinal-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 5) is a positive regulator of cellular proliferation". *J Biol Chem* **276**: 6897-900.
- Sun Y, Wong N, Guan Y, *et al.* (2008b). "The eukaryotic translation elongation factor eEF1A2 induces neoplastic properties and mediates tumorigenic effects of ZNF217 in precursor cells of human ovarian carcinomas". *Int J Cancer* **123**: 1761-9.
- Suske G, Bruford E, Philipsen S (2005). "Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family". *Genomics* **85**: 551-6.
- Suzuki S, Egami K, Sasajima K, *et al.* (2004). "Comparative study between DNA copy number aberrations determined by quantitative microsatellite analysis and clinical outcome in patients with stomach cancer". *Clin Cancer Res* **10**: 3013-9.
- Tabach Y, Kogan-Sakin I, Buganim Y, *et al.* (2011). "Amplification of the 20q chromosomal arm occurs early in tumorigenic transformation and may initiate cancer". *PLoS One* **6**: e14632.
- Tachibana I, Imoto M, Adjei PN, *et al.* (1997). "Overexpression of the TGFbeta-regulated zinc finger encoding gene, TIEG, induces apoptosis in pancreatic epithelial cells". *J Clin Invest* **99**: 2365-74.
- Tachibana M, Sugimoto K, Fukushima T, *et al.* (2001). "Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3". *J Biol Chem* **276**: 25309-17.
- Tada K, Oka M, Hayashi H, *et al.* (2000). "Cytogenetic analysis of esophageal squamous cell carcinoma cell lines by comparative genomic hybridization: relationship of cytogenetic aberrations to in vitro cell growth". *Cancer Genet Cytogenet* **117**: 108-12.
- Tanaka T, Kimura M, Matsunaga K, *et al.* (1999). "Centrosomal kinase AIK1 is overexpressed in invasive ductal carcinoma of the breast". *Cancer Res* **59**: 2041-4.

- Tanner MM, Grenman S, Koul A, *et al.* (2000). "Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer". *Clin Cancer Res* **6**: 1833-9.
- Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, *et al.* (1994). "Increased copy number at 20q13 in breast cancer: defining the critical region and exclusion of candidate genes". *Cancer Res* **54**: 4257-60.
- Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, *et al.* (1995). "Amplification of chromosomal region 20q13 in invasive breast cancer: prognostic implications". *Clin Cancer Res* **1**: 1455-61.
- Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, *et al.* (1996). "Independent amplification and frequent co-amplification of three non-syntenic regions on the long arm of chromosome 20 in human breast cancer". *Cancer Res* **56**: 3441-5.
- Teixeira MS, Camacho-Vanegas O, Fernandez Y, *et al.* (2007). "KLF6 allelic loss is associated with tumor recurrence and markedly decreased survival in head and neck squamous cell carcinoma". *Int J Cancer* **121**: 1976-83.
- ten Dijke P, Hill CS (2004). "New insights into TGF-beta-Smad signalling". *Trends Biochem Sci* **29**: 265-73.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, *et al.* (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease". *Cell* **139**: 871-90.
- Thillainadesan G, Isovic M, Loney E, *et al.* (2008). "Genome analysis identifies the p15INK4b tumor suppressor as a direct target of the ZNF217/CoREST complex". *Mol Cell Biol* **28**: 6066-77.
- Thollet A, Vendrell JA, Payen L, *et al.* (2010). "ZNF217 confers resistance to the pro-apoptotic signals of paclitaxel and aberrant expression of Aurora-A in breast cancer cells". *Mol Cancer* **9**: 291.
- Thompson D, Duedal S, Kirner J, *et al.* (2005). "Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers". *J Natl Cancer Inst* **97**: 813-22.
- Thorner AR, Hoadley KA, Parker JS, *et al.* (2009). "In vitro and in vivo analysis of B-Myb in basal-like breast cancer". *Oncogene* **28**: 742-51.
- Tomlinson VA, Newbery HJ, Bergmann JH, *et al.* (2007). "Expression of eEF1A2 is associated with clear cell histology in ovarian carcinomas: overexpression of the gene is not dependent on modifications at the EEF1A2 locus". *Br J Cancer* **96**: 1613-20.
- Tomlinson VA, Newbery HJ, Wray NR, *et al.* (2005). "Translation elongation factor eEF1A2 is a potential oncoprotein that is overexpressed in two-thirds of breast tumours". *BMC Cancer* **5**: 113.
- Toncheva D, Zaharieva B (2005). "Coexistence of copy number changes of different genes (INK4A, erbB-1, erbB-2, CMYC, CCND1 and ZNF217) in urothelial tumors". *Tumour Biol* **26**: 88-93.
- Tong D, Czerwenka K, Heinze G, *et al.* (2006). "Expression of KLF5 is a prognostic factor for disease-free survival and overall survival in patients with breast cancer". *Clin Cancer Res* **12**: 2442-8.
- Tong T, Zhong Y, Kong J, *et al.* (2004). "Overexpression of Aurora-A contributes to malignant development of human esophageal squamous cell carcinoma". *Clin Cancer Res* **10**: 7304-10.
- Tsukamoto Y, Uchida T, Karnan S, *et al.* (2008). "Genome-wide analysis of DNA copy number alterations and gene expression in gastric cancer". *J Pathol* **216**: 471-82.
- Tung MC, Tsai CS, Tung JN, *et al.* (2009). "Higher prevalence of secretory CSE1L/CAS in sera of patients with metastatic cancer". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**: 1570-7.

- Turner J, Crossley M (1998)."Cloning and characterization of mCtBP2, a co-repressor that associates with basic Kruppel-like factor and other mammalian transcriptional regulators". *Embo J* **17**: 5129-40.
- Uen WC, Tai CJ, Shen SC, et al. (2010)."Differential distributions of CSE1L/CAS and E-cadherin in the polarized and non-polarized epithelial glands of neoplastic colorectal epithelium". *J Mol Histol* **41**: 259-66.
- Vahteristo P, Tamminen A, Karvinen P, et al. (2001)."p53, CHK2, and CHK1 genes in Finnish families with Li-Fraumeni syndrome: further evidence of CHK2 in inherited cancer predisposition". *Cancer Res* **61**: 5718-22.
- Valcourt U, Kowanetz M, Niimi H, et al. (2005)."TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition". *Mol Biol Cell* **16**: 1987-2002.
- van Dekken H, Paris PL, Albertson DG, et al. (2004)."Evaluation of genetic patterns in different tumor areas of intermediate-grade prostatic adenocarcinomas by high-resolution genomic array analysis". *Genes Chromosomes Cancer* **39**: 249-56.
- van Dekken H, Vissers K, Tilanus HW, et al. (2006)."Genomic array and expression analysis of frequent high-level amplifications in adenocarcinomas of the gastro-esophageal junction". *Cancer Genet Cytogenet* **166**: 157-62.
- van Vliet J, Turner J, Crossley M (2000)."Human Kruppel-like factor 8: a CACCC-box binding protein that associates with CtBP and represses transcription". *Nucleic Acids Res* **28**: 1955-62.
- Velarde MC, Zeng Z, McQuown JR, et al. (2007)."Kruppel-like factor 9 is a negative regulator of ligand-dependent estrogen receptor alpha signaling in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells". *Mol Endocrinol* **21**: 2988-3001.
- Vendrell JA, Bieche I, Desmetz C, et al. (2005)."Molecular changes associated with the agonist activity of hydroxy-tamoxifen and the hyper-response to estradiol in hydroxy-tamoxifen-resistant breast cancer cell lines". *Endocr Relat Cancer* **12**: 75-92.
- Vendrell JA, Magnino F, Danis E, et al. (2004)."Estrogen regulation in human breast cancer cells of new downstream gene targets involved in estrogen metabolism, cell proliferation and cell transformation". *J Mol Endocrinol* **32**: 397-414.
- Venuprasad K, Huang H, Harada Y, et al. (2008)."The E3 ubiquitin ligase Itch regulates expression of transcription factor Foxp3 and airway inflammation by enhancing the function of transcription factor TIEG1". *Nat Immunol* **9**: 245-53.
- Villeneuve S, Fevotte J, Anger A, et al. (2011)."Breast cancer risk by occupation and industry: analysis of the CECILE study, a population-based case-control study in France". *Am J Ind Med* **54**: 499-509.
- Vinot S, Anguille C, de Toledo M, et al. (2008)."Analysis of cell migration and its regulation by Rho GTPases and p53 in a three-dimensional environment". *Methods Enzymol* **439**: 413-24.
- Wang N, Liu ZH, Ding F, et al. (2002)."Down-regulation of gut-enriched Kruppel-like factor expression in esophageal cancer". *World J Gastroenterol* **8**: 966-70.
- Wang X, Zhao J (2007)."KLF8 transcription factor participates in oncogenic transformation". *Oncogene* **26**: 456-61.
- Wang X, Zheng M, Liu G, et al. (2007)."Kruppel-like factor 8 induces epithelial to mesenchymal transition and epithelial cell invasion". *Cancer Res* **67**: 7184-93.
- Wang XX, Liu R, Jin SQ, et al. (2006)."Overexpression of Aurora-A kinase promotes tumor cell proliferation and inhibits apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cell line". *Cell Res* **16**: 356-66.
- Wani MA, Means RT, Jr., Lingrel JB (1998)."Loss of LKLF function results in embryonic lethality in mice". *Transgenic Res* **7**: 229-38.

- Watanabe T, Imoto I, Katahira T, *et al.* (2002). "Differentially regulated genes as putative targets of amplifications at 20q in ovarian cancers". *Jpn J Cancer Res* **93**: 1114-22.
- WCRF/AICR (2007). Expert report. Food, nutrition and the prevention of cancer : a global perspective. Washington, DC : American Institute for Cancer Research.
- Wei D, Gong W, Kanai M, *et al.* (2005). "Drastic down-regulation of Kruppel-like factor 4 expression is critical in human gastric cancer development and progression". *Cancer Res* **65**: 2746-54.
- Wei H, Wang X, Gan B, *et al.* (2006). "Sumoylation delimits KLF8 transcriptional activity associated with the cell cycle regulation". *J Biol Chem* **281**: 16664-71.
- Wei X, Xu H, Kufe D (2007). "Human mucin 1 oncoprotein represses transcription of the p53 tumor suppressor gene". *Cancer Res* **67**: 1853-8.
- Weigel MT, Dowsett M (2010). "Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction". *Endocr Relat Cancer* **17**: R245-62.
- Weiss MM, Snijders AM, Kuipers EJ, *et al.* (2003). "Determination of amplicon boundaries at 20q13.2 in tissue samples of human gastric adenocarcinomas by high-resolution microarray comparative genomic hybridization". *J Pathol* **200**: 320-6.
- Wellmann A, Flemming P, Behrens P, *et al.* (2001). "High expression of the proliferation and apoptosis associated CSE1L/CAS gene in hepatitis and liver neoplasms: correlation with tumor progression". *Int J Mol Med* **7**: 489-94.
- Werner M, Mattis A, Aubele M, *et al.* (1999). "20q13.2 amplification in intraductal hyperplasia adjacent to in situ and invasive ductal carcinoma of the breast". *Virchows Arch* **435**: 469-72.
- Wooster R, Bignell G, Lancaster J, *et al.* (1995). "Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2". *Nature* **378**: 789-92.
- Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, *et al.* (1994). "Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13". *Science* **265**: 2088-90.
- Wu CW, Chen GD, Fann CS, *et al.* (2002). "Clinical implications of chromosomal abnormalities in gastric adenocarcinomas". *Genes Chromosomes Cancer* **35**: 219-31.
- Wu J, Lingrel JB (2004). "KLF2 inhibits Jurkat T leukemia cell growth via upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1". *Oncogene* **23**: 8088-96.
- Wullich B, Riedinger S, Brinck U, *et al.* (2004). "Evidence for gains at 15q and 20q in brain metastases of prostate cancer". *Cancer Genet Cytogenet* **154**: 119-23.
- Xiao XY, Zhou XY, Yan G, *et al.* (2007). "Chromosomal alteration in Chinese sporadic colorectal carcinomas detected by comparative genomic hybridization". *Diagn Mol Pathol* **16**: 96-103.
- Xu J, Lamouille S, Deryck R (2009). "TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition". *Cell Res* **19**: 156-72.
- Yamamoto Y, Matsuyama H, Kawauchi S, *et al.* (2006). "Biological characteristics in bladder cancer depend on the type of genetic instability". *Clin Cancer Res* **12**: 2752-8.
- Yamane K, Tateishi K, Klose RJ, *et al.* (2007). "PLU-1 is an H3K4 demethylase involved in transcriptional repression and breast cancer cell proliferation". *Mol Cell* **25**: 801-12.
- Yang SH, Seo MY, Jeong HJ, *et al.* (2005). "Gene copy number change events at chromosome 20 and their association with recurrence in gastric cancer patients". *Clin Cancer Res* **11**: 612-20.
- Yao JE, Yan M, Guan Z, *et al.* (2009). "Aurora-A down-regulates IkappaBalpha via Akt activation and interacts with insulin-like growth factor-1 induced phosphatidylinositol 3-kinase pathway for cancer cell survival". *Mol Cancer* **8**: 95.
- Yatabe N, Kyo S, Maida Y, *et al.* (2004). "HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells". *Oncogene* **23**: 3708-15.

- Yea S, Narla G, Zhao X, *et al.* (2008). "Ras promotes growth by alternative splicing-mediated inactivation of the KLF6 tumor suppressor in hepatocellular carcinoma". *Gastroenterology* **134**: 1521-31.
- Yin D, Komatsu N, Miller CW, *et al.* (2007). "KLF6: mutational analysis and effect on cancer cell proliferation". *Int J Oncol* **30**: 65-72.
- Yoon HS, Ghaleb AM, Nandan MO, *et al.* (2005). "Kruppel-like factor 4 prevents centrosome amplification following gamma-irradiation-induced DNA damage". *Oncogene* **24**: 4017-25.
- Yoon HS, Yang VW (2004). "Requirement of Kruppel-like factor 4 in preventing entry into mitosis following DNA damage". *J Biol Chem* **279**: 5035-41.
- You A, Tong JK, Grozinger CM, *et al.* (2001). "CoREST is an integral component of the CoREST- human histone deacetylase complex". *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1454-8.
- Zhang A, Maner S, Betz R, *et al.* (2002). "Genetic alterations in cervical carcinomas: frequent low-level amplifications of oncogenes are associated with human papillomavirus infection". *Int J Cancer* **101**: 427-33.
- Zhang D, Wang Z, Luo Y, *et al.* (2011). "Analysis of DNA copy number aberrations by multiple ligation-dependent probe amplification on 50 intestinal type gastric cancers". *J Surg Oncol* **103**: 124-32.
- Zhang JS, Moncrieffe MC, Kaczynski J, *et al.* (2001a). "A conserved alpha-helical motif mediates the interaction of Sp1-like transcriptional repressors with the corepressor mSin3A". *Mol Cell Biol* **21**: 5041-9.
- Zhang W, Bieker JJ (1998). "Acetylation and modulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases". *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9855-60.
- Zhang W, Geiman DE, Shields JM, *et al.* (2000). "The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter". *J Biol Chem* **275**: 18391-8.
- Zhang W, Wang J, Liu SJ, *et al.* (2009). "Correlation between Aurora-A expression and the prognosis of cervical carcinoma patients". *Acta Obstet Gynecol Scand* **88**: 521-7.
- Zhang X, Srinivasan SV, Lingrel JB (2004). "WWP1-dependent ubiquitination and degradation of the lung Kruppel-like factor, KLF2". *Biochem Biophys Res Commun* **316**: 139-48.
- Zhang XL, Simmen FA, Michel FJ, *et al.* (2001b). "Increased expression of the Zn-finger transcription factor BTEB1 in human endometrial cells is correlated with distinct cell phenotype, gene expression patterns, and proliferative responsiveness to serum and TGF-beta1". *Mol Cell Endocrinol* **181**: 81-96.
- Zhang Z, Teng CT (2003). "Phosphorylation of Kruppel-like factor 5 (KLF5/IKLF) at the CBP interaction region enhances its transactivation function". *Nucleic Acids Res* **31**: 2196-208.
- Zhao J, Bian ZC, Yee K, *et al.* (2003). "Identification of transcription factor KLF8 as a downstream target of focal adhesion kinase in its regulation of cyclin D1 and cell cycle progression". *Mol Cell* **11**: 1503-15.
- Zhao Y, Hamza MS, Leong HS, *et al.* (2008). "Kruppel-like factor 5 modulates p53-independent apoptosis through Pim1 survival kinase in cancer cells". *Oncogene* **27**: 1-8.
- Zheng HQ, Zhou Z, Huang J, *et al.* (2009). "Kruppel-like factor 5 promotes breast cell proliferation partially through upregulating the transcription of fibroblast growth factor binding protein 1". *Oncogene* **28**: 3702-13.

- Zhou H, Kuang J, Zhong L, *et al.* (1998). "Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation". Nat Genet **20**: 189-93.
- Zhu H, Lam DC, Han KC, *et al.* (2007). "High resolution analysis of genomic aberrations by metaphase and array comparative genomic hybridization identifies candidate tumour genes in lung cancer cell lines". Cancer Lett **245**: 303-14.
- Zhu N, Gu L, Findley HW, *et al.* (2006). "KLF5 Interacts with p53 in regulating survivin expression in acute lymphoblastic leukemia". J Biol Chem **281**: 14711-8.
- Zhu X, Lv J, Yu L, *et al.* (2009). "Proteomic identification of differentially-expressed proteins in squamous cervical cancer". Gynecol Oncol **112**: 248-56.

---

## RESUME en français

ZNF217, un nouveau membre de la famille krüppel-like, est un facteur de transcription qui interagit avec des co-répresseurs et des protéines modifiant les histones suggérant que ZNF217 ferait partie d'un complexe répresseur de la transcription. ZNF217 serait un oncogène mais ses fonctions sont encore mal connues à l'heure actuelle. Les objectifs de ce travail ont été d'étudier le rôle de ZNF217 dans l'échappement tumoral et sa valeur pronostique dans le cancer du sein. Ainsi, nous avons montré que de forts niveaux d'expression de ZNF217 sont associés à : (i) une augmentation de la prolifération cellulaire *in vitro* et de la croissance tumorale *in vivo*, (ii) la stimulation de l'invasion et de la migration cellulaire, (iii) l'induction de l'EMT *via* la voie du TGF- $\beta$ . De plus, les cellules surexprimant ZNF217 sont résistantes au paclitaxel et cette résistance est associée à la dérégulation de l'expression des membres de la famille Bcl-2 et d'Aurora-A. Enfin, nous avons montré pour la première fois que des forts niveaux d'expression d'ARNm de ZNF217 représentent un nouveau marqueur de mauvais pronostic dans le cancer du sein et sont associés au développement de métastases. ZNF217 semble donc jouer un rôle important dans la cancérogénèse mammaire et des stratégies thérapeutiques ciblant directement ZNF217 ou ciblant ses médiateurs (Aurora-A ou TGF- $\beta$ ) pourraient être utilisées en clinique dans le traitement des tumeurs mammaires surexprimant ZNF217.

---

## TITRE en anglais

ZNF217, a new oncogene in breast cancer: role in tumor escape and prognostic value.

---

## RESUME en anglais

ZNF217, a new member of the Krüppel-like family, is a transcription factor which interacts with co-repressors and histone-modifying proteins suggesting that ZNF217 may be part of a transcriptional repressor complex. ZNF217 may be an oncogene but little is known about the functions that ZNF217 could play. The aim of this work is to study the role of ZNF217 in tumor escape and its prognostic value in breast cancer. We showed that ZNF217 is associated with (i) increased proliferation *in vitro* and tumoral growth *in vivo*, (ii) stimulation of cell invasion and migration (iii) induction of EMT *via* the TGF- $\beta$  pathway. Moreover, ZNF217-overexpressed cells are resistant to paclitaxel and ZNF217-induced resistance is associated with deregulated expression of the Bcl-2 family members and Aurora-A. Finally, we showed for the first time that high ZNF217 mRNA level is a novel marker of poor prognosis in breast cancer and is associated with the development of metastasis. Thus, ZNF217 seems to be important in mammary cancerogenesis. Clinical strategies targeting either ZNF217 directly or targeting ZNF217 mediators (eg Aurora-A or TGF- $\beta$ ) could be used for the treatment of breast cancer with ZNF217 overexpression.

---

## DISCIPLINE : Cancérologie

## MOTS-CLES :

ZNF217, cancer du sein, pronostic, chimiorésistance, invasion, migration, transition épithélio-mésenchymateuse

ZNF217, breast cancer, prognosis, chemotherapy, invasion, migration, epithelial-mesenchymal transition

---

## INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

INSERM1052/CNRS UMR5286, Equipe « Signalisation œstrogénique et cancer du sein »

8 avenue Rockefeller - F69373 LYON Cedex 08 - France