



HAL
open science

NF- κ B2, RÉGULATEUR DE L'AUTOPHAGIE DANS LE CANCER COLORECTAL : IMPLICATION DANS LA SÉNESCENCE INDUITE PAR RAS ET LA CHIMIOTHÉRAPIE

Audrey Bélanger

► **To cite this version:**

Audrey Bélanger. NF- κ B2, RÉGULATEUR DE L'AUTOPHAGIE DANS LE CANCER COLORECTAL : IMPLICATION DANS LA SÉNESCENCE INDUITE PAR RAS ET LA CHIMIOTHÉRAPIE. Biologie cellulaire. Université d'Angers, 2014. Français. NNT : . tel-01080402v1

HAL Id: tel-01080402

<https://theses.hal.science/tel-01080402v1>

Submitted on 5 Nov 2014 (v1), last revised 22 May 2015 (v2)

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.

**NF- κ B2, RÉGULATEUR DE L'AUTOPHAGIE DANS LE CANCER COLORECTAL :
IMPLICATION DANS LA SÉNESCENCE INDUITE PAR RAS ET LA
CHIMIOTHÉRAPIE**

THÈSE DE DOCTORAT

SPÉCIALITÉ : Biologie Cellulaire
Ecole Doctorale Biologie Santé Nantes-Angers

Présentée et soutenue publiquement

le 27 Janvier 2014

  Angers, par

Audrey BÉLANGER

Devant le jury ci-dessous :

Véronique BAUD, rapporteur, Chargé de Recherche, Paris
Corinne ABBADIE, rapporteur, Professeur des Universités, Lille
Amélie REBILLARD, examinateur, Maître de Conférences, Angers
Eric LELIEVRE, examinateur, Maître de Conférences, Angers
Olivier COQUERET, directeur de thèse, Professeur des Universités, Angers
Benjamin BARRÉ, invité, co-encadrant, Maître de conférences, Angers

Directeur de Thèse : Pr Olivier COQUERET

Co-encadrant : Dr Benjamin BARRÉ

Institut de Cancérologie de l'Ouest Paul Papin
INSERM U892, CNRS UMR6299, Université d'Angers
2 rue Moll, 49933 Angers Cedex 09

REMERCIEMENTS



Mes premiers et respectueux remerciements vont à mon directeur de thèse, le Docteur Benjamin Barré, pour avoir encadré mon travail pendant ces années de thèse. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordé en tant que première étudiante. Merci pour la motivation partagée et l'éternel optimisme en toute occasion. Merci également de m'avoir permis de présenter mes travaux à différentes occasions et de m'avoir sans cesse poussée à me dépasser.

J'adresse également mes profonds remerciements au professeur Olivier Coqueret, co-encadrant de ce travail et directeur du laboratoire. Je le remercie de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pendant toutes ces années d'études, et de m'avoir permis de réaliser ces travaux. Je le remercie aussi pour sa précieuse aide ainsi que pour sa grande disponibilité.

Je remercie le Professeur François Régis Bataille, directeur de l'Institut de Cancérologie de l'Ouest Paul Papin dans lequel j'ai pu réaliser ces travaux.

Je tiens à remercier le Docteur Véronique Baud ainsi que le Professeur Corinne Abbadie d'avoir accepté, en tant que rapporteurs, de consacrer une partie de leur temps à examiner ce travail.

Je remercie également le Docteur Amélie Rebillard d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'examiner cette thèse.

Merci au Docteur Eric Lelièvre d'avoir accepté de siéger à ce jury et d'avoir bien voulu examiner cette thèse.

Je tiens également à remercier le Docteur Hélène Plun-Favreau et le Professeur Neil Perkins pour leur participation à mes comités de suivie de thèse. Je les remercie de m'avoir suivie pendant ces trois années malgré la distance. Leurs conseils ainsi que leurs encouragements m'ont été très précieux.

Mes remerciements s'adressent également au Docteur Catherine Guette. Je la remercie pour son écoute, sa gentillesse et son indulgence quant à nos éternelles questions de chimie parfois naïves. Merci pour la grande disponibilité et pour accepter que l'on mobilise régulièrement le Maldit.

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

Je remercie le Docteur Agnès Chassevent et le Docteur Isabelle Valo, ainsi que tous les membres du laboratoire d'anatomopathologie pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Je tiens à remercier Cécile pour sa grande écoute et ses nombreux conseils. Merci de l'implication que tu apportes à ce que l'on fait et de ta grande disponibilité, même quand on vient te chercher en anapath. Je te remercie pour toute l'aide que tu m'a apporté et pour ta bonne humeur quotidienne. Travailler avec toi est un réel plaisir.

Je remercie aussi Daniel Henrion pour l'utilisation du microscope confocal ainsi qu'Antoine pour sa patience dans l'explication du logiciel et pour sa disponibilité à toute heure. Bon courage pour ta fin de thèse et pour la suite.

Merci également à tous nos collègues angevins de l'équipe 15 pour nous avoir maintes et maintes fois dépanné en urgence.

J'adresse également mes remerciements aux anciens thésards du 4ème, Emilie, Sandy, Anthony, Andréa, Sory. A ceux qui m'ont vu arriver et grandir au labo (ça nous rajeunit pas tout ça !). Je pense notamment à Sophie, merci de m'avoir montré les ficelles du métier. Merci pour tous ces fous rires et ces bons moments à discuter de tout et n'importe quoi, et de science aussi (quand même). Ton expérience et tes compétences m'ont énormément apporté. Ta connaissance de la Bretagne aussi, sans toi je n'aurais peut-être jamais connu la chaumière (Quoi ? est-ce vraiment possible ???).

Je remercie aussi évidemment Hélène, mon ancienne voisine de bureau devenue maintenant une collègue de NF- κ B2 à travers la Manche. Il m'est impossible d'oublier les énormes éclats de rires à répétition que nous avons partagé pendant nos années de thèse en commun. Cette période où tu rédigeais m'a aussi fait vivre en quelque sorte les émotions de la dernière année de thèse avant l'heure ! Cela n'enlève bien évidemment en rien toute l'amitié que je te porte, et le bonheur de te voir t'épanouir à New Castle.

Merci à Chacha maintenant devenue Mme Bernard-Bouachour, merci pour tout. Pour ton dynamisme, ton efficacité, ta gentillesse, ta disponibilité, et ton écoute aussi. Merci d'avoir été si souvent là pour me soutenir, m'encourager et... compatir ! Merci aussi de m'avoir aidé à trouver un appartement que je n'aurais finalement pas gardé très longtemps... Bref, merci pour tout ce que tu as fait, la liste est longue. Je ne peux que te souhaiter tout le meilleur que tu mérites pour le futur.

Merci à Simon pour son indéniable sens de l'humour qui a su détendre l'atmosphère quand il le fallait. Et je ne pourrais oublier (et je sais ô combien ça va te faire plaisir) de te remercier de t'être occupé de colorier les scotchs autoclaves... ;). J'espère que votre séjour angevin vous aura laissé de bons souvenirs à Charlotte et toi. Je vous souhaite pleins de bonnes choses pour votre retour dans le sud, peut-être qu'on s'y croiera un de ces jours. Bises à vous deux.

Merci à Laurence et Zaza pour l'aide et la bonne humeur qu'elles ont su apporter le temps de leur passage au 4ème. Merci d'avoir toujours été là pour nous écouter et nous rassurer, que ce soit au CPP où en dehors.

À Damien, nos parcours se sont rejoints en master et nous voilà tous les deux en fin de thèse. Je dois dire que c'est assez réconfortant d'avoir pu vivre la même expérience en même temps, tous les thésards qui sont passés par là en conviendront. Je me rend compte que tu m'as supporté pendant cinq longues années, qui n'ont tout de même pas été des plus faciles ! Plus sérieusement, merci d'avoir justement été présent alors que tu rencontrais les mêmes difficultés ou presque. Je reste admirative de t'avoir vu devenir papa en pleine rédaction de thèse sans jamais broncher. Je te souhaite le meilleur pour le futur.

Merci au reste de l'équipe protéomique. Merci à Alice pour sa gentillesse, sa douceur et sa disponibilité quand il s'agit de nous apprendre le métier de protéomicien.

Merci aux autres thésards du 4ème.

À Barbara et ses «barboutades» que j'apprécie tant. Merci de ta gentillesse, de ta bonne humeur quotidienne et de ton soutien à toute épreuve. J'ai été heureuse d'avoir pu participer à la découverte de ce qui est devenu pour toi une véritable passion, le tarot. Je te remercie pour tous ces bons moments passés et je te souhaite un bon courage pour cette dernière année. Je ne me fais aucun souci pour toi, alors ne t'inquiète pas et dis stop aux cheveux blancs.

À Alexandra, qui dissuaderait n'importe quel voleur de s'aventurer au 4ème grâce à son "timer" qui ne cesse de hurler... Merci de veiller autant sur tes collègues, ton dévouement est exemplaire ;-). Je te souhaite également un bon courage pour la suite de l'aventure. Prend soin de toi et de tes tablettes de chocolats !

Merci à Julien pour son dynamisme, son impatience à propos de tout et surtout de n'importe quoi, et à son humour décalé qui le caractérise si bien. Merci pour les nombreux sujets de rigolade et de moqueries dont tu accepte de faire part. Merci aussi pour le coup de main sur les dernières manips. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite.

Merci aux nouveaux thésards. Merci à Marie et ses expressions si particulières (qu'elles viennent de St Quentin ou de ton imagination débordante) qui laissent de bons souvenirs, papuche ?! Merci à Alexis pour son calme et sa zénitude. Je vous souhaite à tous les deux bon courage pour votre thèse.

Je tiens également à remercier les salariés du centre Paul Papin et notamment toute l'équipe de pharmacologie. Marie-Claire, Catherine, Luc, Sabrina, Adélaïde, Julie, Vincent, Audrey et Marie, merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse au quotidien. Merci pour les pauses-café, les gâteaux et les nombreuses parties de rigolades. Je garderais un excellent souvenir de ces années à travailler dans le même laboratoire. Un merci tout particulier à Marie-Claire qui a toujours su veiller sur nous, et qui apporte régulièrement la fameuse brioche au chocolat blanc alors qu'on ne réclame jamais...

Merci également à Bruno pour sa disponibilité et son aide lors de l'impression de ce manuscrit. Merci aussi à Gino pour le coup de main lors de l'envoi de cette thèse.

Je remercie mes amis du basket. Peut-être sans vous en rendre compte vous m'avez aidé à me changer les idées quand j'en avais besoin. Merci pour votre bonne humeur et pour tous ces bons moments sportifs, sans oublier les troisièmes mi-temps.

J'aimerais adresser de tendres remerciements à ma famille.

Un grand merci à mes parents pour tout leur amour. Je vous remercie pour toute l'aide et le soutien que vous m'avez apportée durant ces années d'études. Vous avez toujours cru en moi et je

ne vous remercierais jamais assez pour tout ça. Aujourd'hui, j'ai l'immense honneur de vous dédier ma thèse.

Merci à mes frangins, Damien, Olivier, Stéphane et Matthieu, ainsi qu'à mes belles-soeurs, Hélène, Karine et Marion, à ma nièce Romane et à mon petit neveu Gabriel. Merci pour être toujours présent et pour votre soutien quoiqu'il arrive. Si je suis arrivée jusque-là, c'est aussi en partie grâce à vous. Avoir une famille aussi soudée est un réel bonheur et une vraie chance.

Je remercie également tout le reste de ma famille, aussi nombreuse soit-elle. A mes oncles, mes tantes, mes cousins et cousines, petits-cousins et petites-cousines. Vous citer un par un serait probablement aussi long que d'écrire ce manuscrit. Alors simplement merci d'avoir été à mes côtés tout au long de mes études.

Je remercie également ma belle-famille pour le soutien immédiat qu'ils m'ont apporté. Je remercie sincèrement Solange et Nicolas pour leur gentillesse, leur générosité et pour leurs encouragements. Au même titre, je remercie également Cam-Sui. Merci pour votre bonne humeur et votre accueil chaleureux. Merci aussi à Océanne et Aurélien, à Alexandra, et à Zaza et Loris et leur petite Célia. Merci pour tout ces bons moments partagés, qui seront je l'espère encore nombreux.

Mes derniers remerciements s'adressent à mon amour, David, qui partage ma vie pour mon plus grand bonheur. Merci pour ta compréhension, tes encouragements et ton soutien sans faille. Tu as su magnifiquement embellir cette dernière année. Sans ta présence à mes côtés, ce travail n'aurait pas la même saveur. Merci tout simplement d'être présent dans ma vie.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements

Abréviations

14

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le facteur de transcription NF- κ B

Découverte d'un nouveau facteur de transcription _____ **2**

Caractérisation du facteur nucléaire NF- κ B _____ 2

Plusieurs facteurs de transcription _____ 3

p65 et p50 _____ 3

c-rel _____ 3

RelB _____ 4

NF- κ B2 _____ 4

Structure et voies de signalisation de NF- κ B _____ **6**

Structure et domaines _____ 6

Domaine d'homologie Rel _____ 7

Domaine de transactivation (TAD) _____ 7

Domaine ankyrin repeat _____ 7

Domaine leucine zipper _____ 8

Domaine de mort _____ 8

Voies de signalisation _____ 9

Famille I κ B _____ 9

Famille I κ B kinase ou IKK _____ 12

Mécanismes d'activation _____ 13

Voie canonique ou classique _____ 13

Voie non-canonique ou alternative _____ 15

Voie atypique _____ 16

DNA-PK dans la régulation de NF- κ B _____ 17

Mécanismes de régulation _____ 19

Modifications post-traductionnelles de RelA _____ 19

Modifications post-traductionnelles de RelB _____ 21

Modifications post-traductionnelles de c-Rel _____ 22

Modifications post-traductionnelles de NF- κ B1 _____ 22

Modifications post-traductionnelles de NF- κ B2 _____ 23

NF- κ B dans la tumorigenèse _____ **25**

Rôles dans l'inflammation _____ 25

Implication dans le développement tumoral _____ 27

Fonctions connues de NF- κ B2 _____ 32

Régulateur de la prolifération _____ 34

Acteur de la survie _____ 35

Rôle dans l'invasion _____ 35

La sénescence cellulaire

Mécanismes et caractéristiques de la sénescence _____ **38**

Le gène suppresseur de tumeur p53 _____ 38

Découverte de p53 et de son rôle de suppresseur de tumeur _____ 39

<i>Régulation de p53</i>	39
<i>ATM et ATR</i>	40
<i>L'inhibiteur des cyclines Cdk, p21Waf1</i>	41
Le gène suppresseur de tumeur p16Ink4a	42
SA- β -Galactosidase	43
Focis d'hétérochromatine et focis de dommages de l'ADN	44
Phénotype sécrétoire (SASP)	45

Oncogène Ras et sénescence _____ **46**

L'oncogène	47
Sénescence induite par Ras	48

Dérégulations de la sénescence et échappement _____ **50**

Perte des gènes suppresseurs de tumeur	50
Sénescence et pathologies liées à l'âge	51
Sénescence et autophagie	51
Sénescence et croissance tumorale	52
Dérégulation de p21 dans l'échappement à la sénescence	53

Mécanisme de l'autophagie

Plusieurs formes d'autophagie _____ **57**

Les différentes étapes de l'autophagie _____ **58**

Régulation de l'autophagie	59
<i>Protéine kinase TOR</i>	59
<i>Complexes ULK</i>	60
<i>Voie AMPK</i>	61
<i>Autres régulations</i>	61
Initiation	63
<i>Complexes PI3-Kinase</i>	63
<i>ATG9</i>	65
Expansion et complétion	65
<i>LC3</i>	65
<i>Réaction de conjugaison de ATG8 et ATG12 à la membrane de l'autophagosome</i>	66
<i>Séquestosome 1 (p62)</i>	67
Fusion et dégradation vésiculaire	67

Rôles de l'autophagie : fonctions protectrices et pro-tumorales _____ **68**

L'autophagie lors de différents stress	69
L'autophagie dans le développement	70
Autophagie et cancer	71

RÉSULTATS

Le complexe NF- κ B2/RelA induit l'autophagie lors de l'OIS _____ **76**

L'induction de l'autophagie participe à l'entrée en sénescence des cellules après l'expression de H-RasV12 _____ **77**

Induction de la sénescence et de l'autophagie	77
L'autophagie participe à l'établissement de la sénescence	80

NF- κ B2 intervient dans l'établissement du phénotype de sénescence induit par Ras _____ **84**

Le complexe NF-κB2/RelA régule l'autophagie et participe à l'établissement de la sénescence induite par Ras	86
Approche globale	86
NF- κ B2 et RelA régulent de manière opposée les gènes de l'autophagie après induction de Ras	88
NF-κB2 régule l'autophagie lors de la sénescence induite par le sn38	96
L'autophagie participe à l'établissement de la sénescence induite par le sn38	97
NF- κ B2 régule la sénescence lors d'un stress génotoxique	103
La reprogrammation de NF-κB réduit le niveau d'autophagie et participe à l'échappement à la sénescence induite par Ras	108
Les cellules ayant échappé au stress oncogénique présentent un faible niveau d'autophagie	109
NF- κ B2 réduit le niveau d'autophagie dans les cellules ayant échappées à l'OIS	113
La phosphorylation sur la serine 222 de NF- κ B2 est perdue dans les cellules ayant échappées à l'OIS.	116
L'olfactomedin 4, un nouveau marqueur des tumeurs colorectales non-métastatiques régulé par la voie Ras-NF-κB2	122
Introduction	123
La voie Ras/NF- κ B2 régule l'expression de l'olfactomedine 4	124
Annexe I : L'échappement à l'OIS médiée par p21 conduit à la dédifférenciation cellulaire et à la dépendance aux protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl1	127
Annexe II : Travaux soumis pour publication	142
Annexe III : Une approche protéomique quantitative des différents stades du cancer colorectal établie l'OLFM4 comme un nouveau marqueur des tumeurs non-métastatiques	175
Travaux supplémentaires : Régulation alternative de l'autophagie par STAT3	190
DISCUSSION	
Le suppresseur de tumeur NF- κ B2 régule l'autophagie lors de la sénescence induite par l'oncogène et la chimiothérapie	199
L'autophagie est requise pour l'entrée en sénescence lors de l'OIS	199
L'hétérodimère p52/RelA est un régulateur de l'autophagie lors de l'OIS	200
L'autophagie et la sénescence sont régulées par NF- κ B2 en réponse à une chimiothérapie	201
La reprogrammation de NF- κ B2 favorise l'échappement à l'OIS	203

NF- κ B2 induit un défaut d'autophagie lors de l'échappement _____	203
La perte de la phosphorylation sur la sérine 222 intervient-elle dans l'échappement ? ____	204
Existe t-il d'autres kinases capables de phosphoryler NF- κ B2 sur son résidu 222 en réponse aux dommages de l'ADN ? _____	206
D'autres sites de phosphorylation de NF- κ B2 pourraient-ils intervenir lors de l'échappement à l'OIS? _____	207
Autres gènes cibles potentiels de NF- κ B2 _____	207
Le marqueur des tumeurs colorectales non-métastatique, l'OLFM4, est régulé par la voie Ras-NF- κ B2 _____	209
L'olfactomedin 4 comme marqueur des cellules souches cancéreuses ? _____	209
L'OLFM4 est sur-exprimée en réponse à la voie Ras-NF- κ B2 _____	210
L'inactivation de l'OLFM4, point de départ des métastases ? _____	211
Détection de l'OLFM4 à des fins thérapeutiques _____	211

CONCLUSION GÉNÉRALE

BIBLIOGRAPHIE

MATÉRIELS ET MÉTHODES

ABRÉVIATIONS

~

Abréviations

3-MA	3-MethylAdenine	CoIP	CoImmunoPrecipitation
53BP1	p53-binding protein 1	COX2	Cytochrome c oxidase subunit II
ADN	Acide Désoxyribonucléique	CpG	Cytosine-phosphate-Guanine
ADNc	ADN complémentaire	CQ	Chloroquine
AGR2	Antérieur gradient homolog 2	Cre	Causes recombination
Akt	PKB Protein Kinase B	c-Rel	Cellular Réticuloendotheliosis
Ambra1	Activating Molecule in Beclin 1-Regulated Autophagy	CSC	Cellules Souches Cancéreuses
AMPK	Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase	CXCR2	CXC chemokine Receptor 2
ANK	Ankyrin	DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern
APC	Adenomatous Polyposis Coli	DAP	Death Associated Protein kinase
AREG	AmphiREGulin	DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
ARF	Alternate Reading Frame	DD	Death domain
ARN	Aide RiboNucléique	DFCP1	Double FYVE Domain Containing Protein 1
ATG	Autophagy-related Gene	DIF	Dorsal-related Immunity Factor
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated	DNA-PK	DNA-dependent Protein Kinase
ATP	Adenosine Triphosphate	DR5	Death Récepteur 5
ATR	ATM and Rad3-related	DRAM1	Damage-Regulated Autophagy Modulator 1
ATRIP	ATR-interacting-protein	E2F	E2 promoter binding Factor
BAFF	B-cell activating factor	EBV	Epstein-Barr virus
Bax	Bcl-2 Associated X protein	EGF	Epidermal growth factor
Bcl-2 / Bcl-3	B-cell leukemia protein 2 / 3	EGFR	Epidermal growth factor Receptor 1
Bcl-xl	B-cell lymphoma extra large	EMSA	Electrophoretic Mobility Shift assay
Bif-1	Bax-interacting Factor 1	EMT	Epithelial-to-Mesenchymal Transition
Bmi-1	B lymphoma Mo-MLV Insertion region 1	ERK	Extracellular signal Related Kinase
BNIP3	BCL2/adenovirus E18 19kDA protein-interacting protein 3	ETS2	c-Ets erythroblastosis virus E26 oncogene homologue 2
BRCA1	Breast cancer 1	Fas	Apoptosis Stimulating Fragment
CARD	CAspase Recruitment Domain	Fbxw7	F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligase
C/EBP	CCAAT/Enhanceur Binding Protein	Foxo3a	Forkhead box O3
CBP	CREB-binding protein	FYVE	motif <u>F</u> ab 1 (yeast orthologue of PIKfyve), <u>Y</u> OTB, <u>V</u> ac 1 (vesicle transport protein), and <u>E</u> EA1
CC	Coiled-Coil domain	GABARA P	GABA Receptor-Associated Protein
CD	Cluster of differentiation	Gadd45	Growth Arrest and DNA Damage inducible
CDC25	Cell Division Cycle protein 25	GAP	GTPase Activating Protein
Cdk	Cyclin-Dependent Kinase	GDP	Guanine nucleotide Exchange Fector
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A	GLP	G9A-like protein
c-Fos	Cellular oncogene fos	Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
ChAT	Choline AcetylTransferase	GSK3β	Glycogen Synthase Kinase 3 beta
ChIP	Chromatin ImmunoPrécipitation	GTP	Guanosine Triphosphate
Chk	Checkpoint protein kinase	H2Ax	H2A histone family member x
Cip	Cdk interacting protein		
CKII	Caseine Kinase II		
CMA	Chaperone-Mediated Autophagy		
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité		

Abréviations

HCQ	Hydroxychloroquine	MSK1	Nuclear mitogen and stress-activated protein kinase 1
HDAC	Histone DeAcetylase	MVB	Multi-Vesicular body
HDM2	Human Double Minute 2	Myd88	Myeloid Differentiation Primary Response
HIF	Hypoxia Inducible Factor	NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
HIV	Human Immunodeficiency Virus	NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
HLH	Helix-Loop-Helix	NBD	Nemo Binding Domain
HP1	Heterochromatin Protein 1	NEMO	NF- κ B Essential Modifier
Hsp90	Heat Shock Proteins	NES	Nuclear Export Signal
HSV	Herpes Simplex Virus	Nf1	Neurofibromin 1
HTLV-1	Human T-Lymphotropic Virus type 1	NF-κB	Nuclear Factor bound to κ B
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1	NIK	NF- κ B Inducing Kinase
IFN	Interferon	NLS	Nuclear Localization Signal
IGFBP7	Insulin-like Growth Factor (IGF) Binding Protein 7	NOD	Nucleotid-binding Oligomerization Domain protein
IKK	I-Kappa B Kinase	Notch1	Neurogenic locus notch homolog protein 1
IL	Interleukine	NRF2	Nuclear factor erythroid-2-Related Factor 2
Ink4	Inhibitory cyclin associated kinase 4	OIS	Oncogene Induced senescence
IκB	Inhibitor of kappa B	PAI-1	Plasminogen 1
JNK	c-Jun N-terminal protein Kinase	PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
kb	kilo base	PAS	Phagophore Assembly site
kDa	kilo Dalton	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
KEAP1	Kelch-like ECH-Associated Protein 1	PE	Phosphatidyl-ethanolamine
Kip	Kinase Inhibitor Protein	PEST	proline (P), gluamic acid (E), serine (S), and threonine (T) domaine
KIR	Killer cell immunoglobulin-like Receptor	pH	potentiel Hydrogène
KO	Knock out	PI(3)-P	PhosphatidyInositol (3)-Phosphate
KSR	Kinase suppressor of Ras	PI3-K	PhosphatidyInositol 3-Kinase
LC3	Light Chain 3B	PIAS	Protein Inhibitor of Activated STAT
LKB1	Liver Kinase B1	PIN1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1
LLC	Leucémies Lymphocytaires Chroniques	PINK1	PTEN-Induced Putative Kinase 1
LMP1	Latent Membrane Protein 1	PKA	Protein Kinase A
LoxP	Locus of X-over P1	PKC	Protein Kinase C
LPS	Lipopolysaccharide	PLA2R	Phospholipase A2 Receptor
lyt-10	Lymphocyte Translocation chromosome 10	Plk1	Polo-like kinase 1
LZ	Leucine Zipper domain	Prb1	Proline-rich protein 1
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases	PRR	Pathogen Recognition Receptor
MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1	PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
MDC1	Mediator of DNA damage Checkpoint 1	PUMA	p53 up-regulated modulator of apoptosis
MDM2	Mouse Double minute 2	PX	Phosphoinositide-binding structural domain
μE	enhanceur des chaînes lourdes	Rac	Ras-related C3 botulinum toxin
Mek	Mitogen-activated protein kinase		
MET	Mesenchymal-to-Epithelial Transition		
MMP	Matrix Metalloprotease		
MRN	MRE-Rad50-NSB1		

Abréviations

Ras	Rat sarcoma (K Kirsten, H Harvey, N Neuroblastoma)	TRIF	TIR domain containing adapter inducing interferon- β
RasL	Ras induction Longue	TRP53IN 2	Tumor Protein 53-Induced Nuclear Protein 2
Rb	Retinoblastoma-associated protein	ULK	Unc-51-Like Kinase
RelA	Reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A	uPA	Urokinase-type plasminogen activator
RelB	Reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	UV	Ultra Violet
Rev-T	Reticuloendotheliosis Virus strain T	UVRAG	UltraViolet irradiation Resistance-Associated Gene
RFC	Replication Factor C	VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
RHD	Rel Homology domain	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
RIG-1	Retinoid acid inducible gene I-like Receptor	VMP1	Vacuole Membrane Protein 1
ROS	Reactive Oxygen Species	v-Rel	Viral Reticuloendotheliosis
RPA	Replication Protein A	Vps	Vacuolar protein sorting
SA-β-Gal	Senescence Associated β -Galactosidase	WIPI	WD-40 repeat containing protein
SAHF	Senescence Associated heterochromatin Foci	Wisp39	Waf1/Cip1 stabilizing protein 39
SASP	Senescence Associated Secretory Phenotype	Wnt	Wingless int
SCF	Skp1-Cullin-F-box	XRCC4	X-ray repair cross-complementing protein 4
SH	SRC homology	κB	séquence consensus de NF- κ B
SISP	Stress Induced Premature Senescence	κE	Enhanceur des chaînes légères
siRNA	small interfering Ribonucleic Acid	κpr	promoteur des chaînes légères
Sirt1	Sirtuine 1		
Skp2	S-phase kinase associated protein 2		
sn38	7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin		
snARN	small nuclear ARN		
Sos	Son of sevenless		
Sp1	Specificity protein 1		
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription		
SUMO	Small Ubiquitin-related MOdifier		
SUV39	Suppressor of variegation 3-9		
SV40	Simian Vacuolating Virus 40		
TAD	Trans-Activating Domain		
TAK1	Transforming growth factor-bêta-Activated Kinase A		
TANK	NF- κ B Activating Kinase		
Tax	Transcriptional Activator Protein		
TCR	T cell Receptor		
Th	T helper cells		
TLR	Toll-like Receptor		
TNF	Tumor Necrosis Factors		
TOR	Target of Rapamycin		
TORC	Target of Rapamycin Complex		
TRAF	TNF Receptor Associated Factors		

INTRODUCTION GÉNÉRALE

~

Chapitre 1

Le facteur de transcription NF- κ B

I. Découverte d'un nouveau facteur de transcription

A. Caractérisation du facteur nucléaire NF-κB

Il y a maintenant 30 ans, l'équipe de Baltimore appuyait ses travaux sur un modèle selon lequel des éléments de l'ADN appelés activateurs ou enhancers, pouvaient considérablement augmenter l'activité transcriptionnelle de certains gènes eucaryotes (Weiher et al, 1983). En 1983, Queen et Baltimore ont souligné l'existence d'une séquence située en amont du promoteur et nécessaire à la transcription correcte du gène de la chaîne kappa des immunoglobulines (Queen & Baltimore, 1983). Un peu plus tard, un facteur nucléaire spécifique des cellules B se fixant au sein d'une région retrouvée à la fois sur le promoteur des chaînes lourdes et sur celui des chaînes légères kappa est décrit. Nommé IgNF-A (ou NF-A puis plus tard Oct-1), ce facteur nucléaire spécifique des cellules B interagit avec une séquence spécifique, un octamère ATTTGCAT hautement conservé. De manière intéressante, IgNF-A a également été trouvé dans les cellules HeLa. Par ailleurs, le motif spécifique de liaison de IgNF-A est retrouvé sur le promoteur de plusieurs snARN (small nuclear RNA) de vertébrés, suggérant que IgNF-A n'est finalement pas un facteur strictement spécifique des cellules B (Singh et al, 1986).

Ces données soulèvent la question du rôle de ce facteur nucléaire capable de se fixer sur une séquence spécifique conservée des cellules B. Afin de caractériser les protéines qui se lient aux enhancers des chaînes lourdes et des chaînes légères kappa des immunoglobulines, Sen et Baltimore ont eu recours à la technique EMSA (electrophoretic mobility shift assay). Cette technique permet de mettre en évidence une interaction entre une protéine ou parfois un ensemble de protéines et une séquence d'ADN ou d'ARN connue. Sen et Baltimore ont généré des amorces couvrant l'enhancer des chaînes lourdes μ (μ E), le promoteur des chaînes légères κ (κ pr), et l'enhancer des chaînes légères κ (κ E). Incubé avec des extraits nucléaires de lignées cellulaires B représentant les différentes étapes de différenciation, ils ont identifié trois différentes protéines. Deux sites ont été localisés au sein de l'enhancer μ , dont l'octamère ATTTGCAT sur lequel NF-A se fixe. La seconde séquence correspond à un motif (μ E3) où se lie un facteur des cellules B (NF- μ E3), cependant des analyses complémentaires ont montré que ces facteurs n'étaient pas spécifiques des cellules B. L'analyse de l'enhancer κ a révélé un troisième site, GGGGACTTTCC, correspondant à un facteur non seulement spécifique des cellules B mais aussi stade-spécifique au sein de la lignée lymphoïde, puisqu'il est retrouvé exprimé dans les B matures et dans le plasma et non dans les cellules pré-B et cellules T. La séquence de fixation a été ainsi définie comme site κ B pour le site de liaison spécifique des cellules B, et le facteur associé NF- κ B pour Nuclear Factor bound to κ B (Sen & Baltimore, 1986a).

Dans la continuité, et en utilisant une lignée cellulaire pré-B 70Z/3 répondant au lipopolysaccharide bactérien (LPS) par une maturation en cellule B, Sen et Baltimore ont montré l'activation de NF-κB dans les extraits nucléaires de cellules pré-B en réponse au LPS. Ils ont également observé l'activation de NF-κB suite à de nombreux stimuli dans d'autres types cellulaires ne présentant pas de phénotype pré-B, soulignant pour la première fois la nature non spécifique du type cellulaire de ce facteur. Étonnamment, ils ont pu observer que l'induction de NF-κB se produit même en présence de cycloheximide et d'anisomysine, des inhibiteurs de la synthèse protéique. Ces données démontrent que l'induction de NF-κB ne requiert pas de synthèse protéique, et les auteurs concluent que NF-κB pré-existe dans un état inactif dans la cellule et qu'une stimulation entraînerait un événement qui l'activerait (Sen & Baltimore, 1986b).

B. Plusieurs facteurs de transcription

1. p65 et p50

La purification de NF-κB par Baeuerle a permis de mettre en évidence que la forme activée de NF-κB contient deux polypeptides respectivement de 50 (p50,) et 65 kDa (p65, aussi appelé RelA pour Reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A) (Baeuerle & Baltimore, 1989). L'hétérodimère p50/RelA a été largement étudié puisqu'il est le premier dimère de NF-κB à avoir été identifié, et qu'il est retrouvé dans la plupart des types cellulaires.

2. c-rel

La protéine c-rel a été identifiée de part son homologie avec l'oncogène v-rel (Reticuloendotheliosis viral), codé par le virus Rev-T (reticuloendotheliosis virus strain T). Rev-T est un virus aviaire transformant qui a été isolé à partir d'un lymphome chez la dinde. Rev-T est survenu lorsqu'un autre virus de réticuloendothéliose plus faible, Rev-A, a infecté une cellule de dinde, s'est recombinaisonné avec le proto-oncogène c-rel puis a subi d'autres modifications conduisant à la formation de Rev-T (Wilhelmsen et al, 1984; Wilhelmsen & Temin, 1984). La protéine c-rel est également retrouvée chez la souris et l'humain, et sa séquence a notamment été alignée avec la sous-unité de NF-κB p50. De manière surprenante, il s'est avéré que l'homologie entre ces deux protéines est à hauteur de 68%. En effet, c-rel et p50 partagent toutes deux un domaine de liaison à l'ADN et un domaine d'homologie rel, leur conférant la possibilité de former des dimères (Kieran et al, 1990).

3. RelB

Le membre RelB (Reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B) a été identifié parmi une large banque de gènes induits par des facteurs de croissance. La séquence de RelB est similaire à la séquence de c-rel, et c'est ce qui a retenu l'attention des auteurs qui l'ont nommé ainsi (Ryseck et al, 1992). RelB possède une région de 288 acides aminés qui présente une forte similitude avec les autres membres de la famille NF-κB. Cette région n'est autre que le domaine d'homologie rel que partagent tous les membres NF-κB, et qui leur permet notamment d'interagir et de former des dimères. A noter que RelB est un régulateur de la transcription uniquement lorsqu'il forme un hétérodimère avec p50 ou p52, et qu'il est le seul membre de la famille NF-κB à ne pas pouvoir former un homodimère. En parallèle, la liaison à l'ADN de RelB est négativement régulée par la séquestration au sein de complexes RelA/RelB et p100/RelB, ou par des événements de phosphorylation (Marienfeld et al, 2003; Derudder et al, 2003; Maier et al, 2003). Le domaine N-terminal de RelB présente une instabilité, ce qui rend RelB susceptible à la dégradation et la formation d'un homodimère difficile. Les dimères contenant RelB sont quant à eux stables, probablement dû au fait que la région sensible à la dégradation de RelB est protégée par la structure du second partenaire formant le dimère (Dobrzanski et al, 1994; Huang et al, 2005).

4. NF-κB2

Dans le but de caractériser les membres NF-κB et leurs modes d'activation, leurs séquences ont été analysées puis digérées par la trypsine. C'est ainsi qu'un peptide présentant 75% d'homologie avec p105 a été identifié. L'analyse par southern blot a permis de montrer que ce gène est présent en une seule copie, tandis que l'analyse par northern blot révèle quant à elle deux transcrits, de 1,9 et 3,5 kb codant respectivement pour une protéine de 49 et 100 kDa. Ces deux séquences ont en commun un domaine riche en glycine et le domaine d'homologie rel. Cependant, p100 contient également une séquence répétée située en C-terminal, qui présente une forte homologie avec les motifs retrouvés sur p105 correspondant à 41% de similarité. Ces résultats suggèrent que, tout comme p50/p105, la partie C-terminale de p100 est clivée pour produire un membre actif p49. Ainsi, au même titre que p50, p49 présenterait une forte activité de liaison à l'ADN. Afin de mesurer cette activité, les auteurs ont effectué une expérience de gel retard et ont montré que p49 était capable de se lier à des sites κB connus, et notamment un site κB identifié dans le cadre du virus de l'immunodéficience humaine (HIV). De plus, p49 et p65, par des expériences de co-transfection et de gène rapporteur, sont montrés comme agissant en synergie pour stimuler l'expression du virus HIV. La même expérience avec une forme tronquée de p100 –

suppression du domaine C-terminal aboutissant à une forme de 48,5 kDa – conduit à une stimulation comparable, alors que la forme totale de p100 n'a pas d'effet sur l'expression du virus. Ces résultats démontrent que la transcription des gènes contenant des sites κB est régulée par une autre sous-unité de NF-κB, p49/p100, capable d'interagir avec un autre membre de la famille pour conduire à l'activation de la transcription du virus HIV (Schmid et al, 1991). Dans la même année, l'étude des translocations chromosomiques associées aux lymphomes des cellules B a conduit à la découverte d'un nouveau locus intervenant dans la translocation t(10;14)(q24;q32). La région 10q24 est souvent associée à des lymphomes, et le clonage de cette région a permis d'identifier un nouveau proto-oncogène nommé *lyt-10* (lymphocyte translocation chromosome 10) qui se retrouve altéré par la translocation t(10;14)(q24;q32). L'analyse de la séquence de la protéine *lyt-10* a permis de mettre en évidence une forte homologie de séquence avec le domaine de liaison à l'ADN Rel de la famille NF-κB. Plus précisément, *lyt-10* partage 47 à 50% d'homologie avec les membres Rel et p65, et jusqu'à 67% avec le membre p50. La raison pour laquelle *lyt-10* présente plus d'homologie avec p50 que les autres membres de la famille NF-κB est que ces deux protéines partagent deux régions similaires : un premier domaine riche en glycine responsable du clivage protéolytique de p50, et un domaine constitué de séquences ankyrin répétées situé en c-terminal et intervenant dans la translocation nucléaire. La séquence de localisation nucléaire est par ailleurs conservée entre les membres *lyt-10*, p50, p65, v-rel et c-rel. La protéine *lyt-10* est également capable de se lier à des sites κB qui diffèrent de ceux liés par p50, faisant de cette sous-unité un membre à part entière de la famille NF-κB (Neri et al, 1991). Une troisième étude menée par Bours en 1992 met en évidence un autre gène dans le cadre d'une activation précoce des cellules T, nommé p50B/p97 de part sa forte similitude fonctionnelle et structurelle avec p50/p105. De la même manière que p50/p105, cette étude démontre que p50B provient du clivage de la partie C-terminale de p97, constituée de séquences ankyrin répétées. La protéine p50B, tout comme p50/p105, présente en N-terminal un domaine d'homologie Rel, lui permettant d'interagir avec les autres sous-unités de NF-κB, p65 et RelB, afin de former des complexes qui se lient sur les sites κB (Bours et al, 1992). Une autre étude a montré dans le cadre de la purification d'un complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), que le facteur de transcription H2TF1 est capable de se lier aux sites κB présents sur les gènes de CMH de classe I. Ce facteur de transcription est finalement identifié comme correspondant au membre p100 de NF-κB, et les auteurs montrent que le clivage de p100 peut donner forme à une nouvelle protéine distincte de p49 et détectée à 52 kDa. Appelée p52, cette protéine est constituée du domaine N-terminal de p100 et semble avoir des fonctions similaires à p49, puisqu'elle est également capable de se lier à l'ADN (Potter et al, 1993). Par la suite, il a donc été admis que le gène p49/p100 pouvait donner lieu à une forme alternative d'environ 50 kDa, soit par une

modification post-traductionnelle de p100, soit par la génération d'un épissage alternatif de p49. Ce gène a alors été nommé NF- κ B2 ou p52/p100, regroupant les formes p49/p100, p50B/p97, p52 et I κ B-10, en contraste avec p50/p105 désigné NF- κ B1 (Duckett et al, 1993).

II. Structure et voies de signalisation de NF- κ B

A. Structure et domaines

La famille des facteurs de transcription NF- κ B compte donc au final cinq sous-unités : RelA (p65), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF- κ B1), et p100/p52 (NF- κ B2). De nombreuses fonctions leur sont attribuées dont celle de régulateur de l'expression des gènes et de transducteur du signal. Au cours de l'évolution, les membres de la famille NF- κ B ont conservé leurs différents domaines (figure 1).

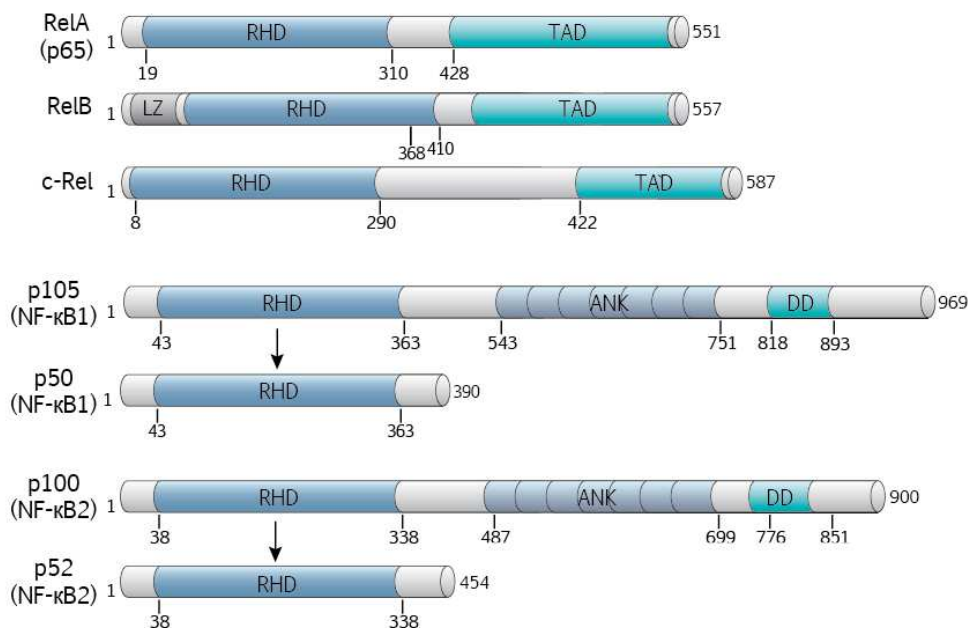


Figure 1 | Les membres de la famille NF- κ B et leur structure. Le domaine RHD permet l'interaction entre les sous-unités de NF- κ B. Le domaine de transactivation (TAD, TA1, TA2), est responsable de l'activation transcriptionnelle des sous-unités. Le domaine leucine-zipper est complémentaire au domaine TAD pour l'activation complète de RelB. Les séquences répétées ankyrin (ANK) interviennent dans l'interaction des membres NF- κ B avec le séquestreur cytoplasmique I κ B. Enfin, le domaine de mort (DD) intervient dans la régulation de l'apoptose (Perkins, 2007).

1. Domaine d'homologie Rel

Chaque membre de la famille présente une région conservée de 300 acides aminés en N-terminal connue sous le nom de domaine homologue Rel ou Rel homology domain. Cette région se compose de deux sous-domaines de feuillets β qui entrent en contact avec l'ADN (Müller et al, 1995). La partie N-terminal de ce domaine contient une boucle de reconnaissance qui interagit avec les bases d'ADN. Le domaine RDH contient également un domaine de dimérisation localisé en C-terminal qui permet l'interaction avec les autres sous-unités de la famille NF- κ B ainsi qu'avec les membres I κ B, la famille d'inhibiteurs de NF- κ B. La phosphorylation des résidus sérine présents dans ce domaine joue un rôle dans la régulation des sous-unités NF- κ B en modulant leurs activités transcriptionnelles et la spécificité pour des gènes cibles. Des fibroblastes RelA^{-/-} reconstitués avec soit une forme non-mutée de p65, soit des formes mutantes déficientes pour différents sites de phosphorylation au sein du domaine RHD de p65, présentent des profils d'expression de gènes cibles différents (Anrather et al, 2005).

2. Domaine de transactivation (TAD)

Les membres de la famille NF- κ B peuvent être classés en deux groupes selon leur structure et leur mode d'activation. Seuls les trois membres RelA, RelB et c-rel présentent un domaine de transactivation (TAD) localisé dans la partie C-terminale. Ce domaine est constitué d'une ou plusieurs hélices α et favorise la transcription en facilitant le recrutement de co-activateurs ou de co-répresseurs transcriptionnels comme CBP, Oct1 ou PIAS1 (O'shea & Perkins, 2008). Les membres Rel utilisent la phosphorylation de leurs résidus sérine présents au sein de ce domaine pour réguler leur fonction transcriptionnelle. Par exemple, parmi les nombreuses phosphorylations possibles de RelA, la sérine 529 située au sein du domaine TAD de RelA a été montrée comme étant phosphorylée par la kinase CKII (casein kinase II) lors d'une stimulation par le TNF α . Cette phosphorylation augmente l'activation transcriptionnelle de RelA sans pour autant modifier son habilité à se lier à l'ADN (Wang & Baldwin, 1998; Wang et al, 2000). Il est donc probable que cette phosphorylation puisse favoriser l'interaction de p65 avec des co-facteurs afin de réguler la transcription des gènes cibles de RelA.

3. Domaine ankyrin repeat

Les membres p105 (NF- κ B1) et p100 (NF- κ B2) constituent le second groupe et sont deux précurseurs cytoplasmiques, composés du domaine RHD en N-terminal et d'une région avec des motifs ankyrin répétés en C-terminal. Ces motifs sont représentés par deux hélices α séparées par

une boucle. NF- κ B1 et NF- κ B2 ne présentent pas de domaine TAD, et par conséquent ne présentent pas de transcription intrinsèque. Ces membres vont subir une dégradation protéolytique qui va cliver le domaine C-terminal comprenant les motifs ankyrin, conduisant à la production des protéines matures et actives, respectivement p50 (NF- κ B1) et p52 (NF- κ B2). La conformation des motifs ankyrin masquent la séquence NLS de p105 et p100, qui sont alors majoritairement cytoplasmiques. La dégradation des motifs ankyrin expose la séquence NLS des protéines p50 et p52 qui vont être fonctionnelles sous la forme de dimères et transloquées dans le noyau (Mercurio et al, 1993; Karin & Ben-Neriah, 2000).

RelA, RelB et c-Rel qui ne possèdent pas de motifs ankyrin répétés, sont séquestrés dans le cytoplasme par les protéines I κ Bs. Cette famille d'inhibiteur possède des motifs ankyrin qui leur permettent de retenir ces trois membres hors du noyau. La conformation de l'interaction entre RelA, RelB ou c-Rel, et les membres de la famille I κ B est telle que l'inhibiteur masque leur séquence NLS. Les protéines I κ Bs doivent nécessairement être dégradées pour que les membres Rel puissent être actifs et transloqués dans le noyau (Cervantes et al, 2009).

4. Domaine leucine zipper

RelB contient également un domaine leucine zipper représenté par deux hélices α enroulées en forme de Y l'une avec l'autre grâce à deux résidus leucine. Le domaine leucine zipper intervient dans la transactivation de RelB, probablement en étant responsable de l'interaction avec d'autres protéines. En effet, l'altération de cette structure, par exemple par mutation, réduit significativement l'activité transcriptionnelle de RelB (Dobrzanski et al, 1993). Ainsi, RelB est le seul membre de la famille NF- κ B à nécessiter un domaine leucine zipper en plus de son domaine de transactivation pour être totalement actif.

5. Domaine de mort

La superfamille des domaines de mort comprend la sous-famille à domaine de mort (Death Domain ou DD), la sous-famille à domaine effecteur de mort (Death Effector Domain ou DED), la sous-famille à domaine de recrutement des caspases (Caspase Recruitment Domain ou CARD), et la sous-famille à domaine pyrin (PYD). Seuls les membres p100 et p105 possèdent un domaine de mort qui se compose de six hélices α . Il a été montré que ce domaine conférait à p100 une fonction pro-apoptotique puisque p100 est recruté au sein des voies d'apoptose via ce domaine (Wang et al, 2002b). De plus, la délétion de ce domaine a pour conséquence de bloquer le clivage de p100. En effet, les sérines 866, 870 et 872 de p100 qui sont notamment les cibles de la kinase NIK

– elle-même responsable du clivage de p100 – sont situées juste à côté de ce domaine. Au niveau conformationnel, la suppression du domaine de mort entraîne l'exposition de la séquence NLS, ce qui conduit au clivage constitutif de p100 et à la translocation nucléaire de p52 (Qing et al, 2005).

B. Voies de signalisation

Etant donné que les cinq membres présentent des caractéristiques différentes au niveau de leur structure, la famille NF- κ B présente plusieurs modes d'activation distincts. Ces voies d'activations dépendent de deux familles importantes, les inhibiteurs I κ B et les kinases IKK. Les inhibiteurs I κ B constituent un premier niveau de régulation en étant responsables de la séquestration cytoplasmique des membres NF- κ B. Un second niveau de régulation est régi par les modifications post-traductionnelles des sous-unités, qui confèrent des fonctions spécifiques et parfois opposées aux dimères NF- κ B.

1. Famille I κ B

La famille d'inhibiteurs de NF- κ B se compose de six membres : I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , I κ B ζ , BCL-3. Tous les membres de la famille possèdent un domaine de plusieurs motifs ankyrin nécessaire à l'interaction protéine-protéine et à la séquestration cytoplasmique, et caractéristique de cette famille (figure 2). En outre, p105 et p100 qui présentent ce même domaine ankyrin en C-terminal sont également considérés comme des inhibiteurs (Liou et al, 1992). Ce sont aussi des événements de phosphorylation qui vont conduire à leur ubiquitinylation et à leur dégradation par le protéasome. La seule différence réside dans le fait qu'avant d'être dégradés, ces précurseurs subissent un clivage protéolytique en C-terminal qui aboutit à la formation des formes actives, respectivement p50 pour p105 et p52 pour p100, et à la seule dégradation par le protéasome de la partie C-terminale qui a été clivée. L'association des dimères NF- κ B avec l'un des membres de la famille I κ B, ou avec les précurseurs p105 et p100, détermine leur localisation cytosolique et prévient la liaison à l'ADN ce qui fait de I κ B une famille essentielle dans la signalisation de NF- κ B. Quand il n'est pas dégradé, l'inhibiteur I κ B peut être transloqué dans le noyau et se lier à NF- κ B, conduisant à la dissociation du dimère avec l'ADN et à la ré-exportation de NF- κ B vers le cytoplasme (Arenzana-Seisdedos et al, 1997). En outre, RelB n'est que très peu affecté par les membres I κ B mais est majoritairement régulé par p100 ou p105 lors de la formation des hétérodimères p100/RelB et p105/RelB (Yilmaz et al, 2003). C'est ensuite la dégradation du domaine C-terminale de p100 et p105 qui va permettre d'une part de générer p52 et p50, et d'autre

part de permettre la translocation nucléaire d'un dimère p52/RelB ou p50/RelB actif.

L'isoforme I κ B α est la plus décrite dans la littérature. Ce membre possède deux domaines partagés entre les membres de la famille I κ B : un domaine N-terminal qui est phosphorylé lors de signaux et un domaine de plusieurs motifs ankyrin nécessaire pour l'interaction protéine-protéine. Le domaine N-terminal se compose de résidus sérine qui sont conservés – par exemple la sérine 32 et la sérine 36 de I κ B α , I κ B β et I κ B ϵ – et qui sont les cibles du complexe IKK (I κ B kinase) lors de l'activation de NF- κ B. Ces phosphorylations favorisent l'ubiquitinylation qui va conduire à la dégradation de I κ B par le protéasome. Les motifs ankyrin communs à tous les membres I κ B, permettent l'interaction avec le domaine RHD des membres NF- κ B. De plus, comme pour p105 et p100, ce domaine répété en ankyrin a pour fonction de masquer la séquence NLS de NF- κ B, conduisant à la rétention cytoplasmique de celui-ci. Un troisième domaine que seul I κ B α et I κ B β possèdent est le domaine PEST (domaine riche en Proline, Glutamate, Sérine et Thréonine) situé en C-terminal. Sa fonction est d'agir comme un peptide signal intervenant dans la dégradation et le recyclage basal de la protéine (Ghosh et al, 1998).

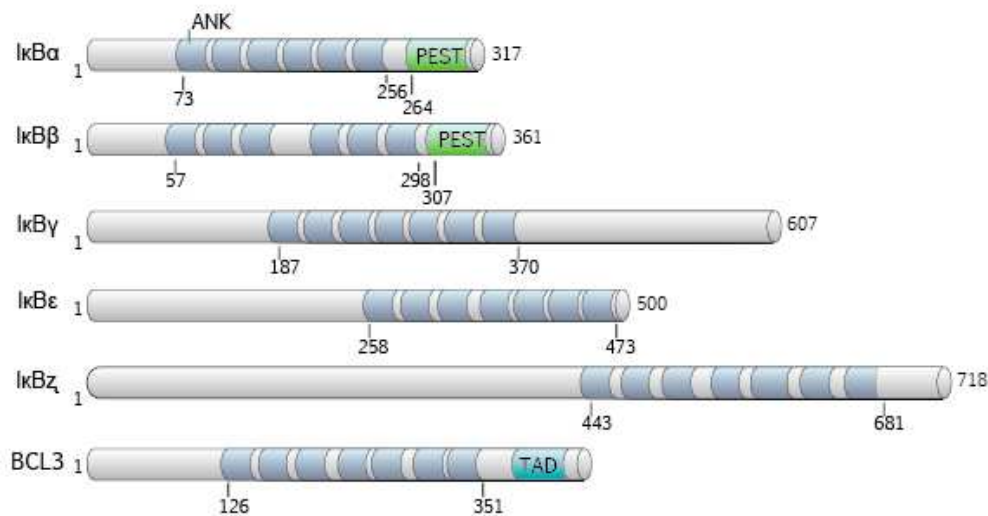


Figure 2 | Les inhibiteurs de NF- κ B et leur structure. Le domaine de motifs ankyrin répétés (ANK) permet l'interaction inhibitrice de I κ B avec les membres NF- κ B. Cette interaction se fait entre domaine ankyrin de I κ B et le domaine RHD de NF- κ B. Le domaine PEST que seul I κ B α et I κ B β possèdent, agit comme un peptide signal qui aide à la dégradation. BCL3 possède également un domaine de transactivation (TAD).

I κ B α est le membre le plus étudié et inhibe de manière préférentielle et non exclusive les dimères p65-p65 et p65-p50. En outre, les hétérodimères comprenant RelB ne s'associent pas efficacement à I κ B α ni avec les autres membres I κ B, puisque très peu d'interactions entre ces

dimères et I κ B sont observées. Les hétérodimères comprenant RelB sont ainsi moins susceptibles à l'inhibition par I κ B que les autres membres NF- κ B, et leur régulation repose principalement sur le clivage de p105 et p100 (Dobrzanski et al, 1994; Lernbecher et al, 1994). La protéine I κ B α possède une particularité en plus par rapport aux autres membres de la famille I κ B puisqu'elle présente au sein de sa structure une séquence d'export nucléaire (NES). Il a été montré par cristallographie qu'au sein du complexe I κ B α -p65-p50, seule la séquence NLS de p65 est masquée par I κ B α tandis que la séquence NLS de p50 reste accessible. Ainsi, la dégradation de I κ B α déséquilibre ce ratio entre la séquence NLS de p50 et la séquence NES de I κ B α , et libère en plus la séquence NLS de p65 aboutissant à l'import nucléaire du dimère (Oeckinghaus & Ghosh, 2009). D'autre part, I κ B α est également un inhibiteur de la liaison à l'ADN des membres NF- κ B. En effet, ce séquestreur cytoplasmique est aussi retrouvé dans le noyau où il peut de nouveau s'associer aux dimères et conduire à leur exportation vers le cytoplasme (Sachdev et al, 1998). Les rôles des autres membres de la famille I κ B sont beaucoup moins établis. I κ B β montre beaucoup de similitude avec I κ B α en s'associant de manière préférentielle et non exclusive avec les dimères composés de p65 et de c-Rel (Thompson et al, 1995). I κ B ϵ est un membre de la famille I κ B très peu décrit. C'est un inhibiteur spécifique des dimères comprenant c-Rel et RelA qui régule ainsi l'expression de gènes précis (Lee & Hannink, 2002).

BCL-3 est le plus insolite des membres puisqu'il est considéré à la fois comme un inhibiteur et un activateur de la transcription de NF- κ B. Contrairement à I κ B α et I κ B β qui sont retrouvés majoritairement dans le cytoplasme, BCL-3 est localisé dans le noyau (Nolan et al, 1993). Il présente en plus des autres membres I κ B un domaine TAD, ce qui lui permet notamment de conférer un pouvoir transcriptionnel à p50 et p52 qui ne possèdent pas ce domaine. Toutefois, BCL-3 présente également une spécificité pour inhiber la liaison à l'ADN des membres p50 et p52 (Franzoso et al, 1992; Fujita et al, 1993). En effet, BCL-3 contient une séquence NLS en N-terminal et entre en compétition avec I κ B α pour la liaison à p50 et p52. De plus, l'interaction entre BCL-3 et p50 se fait de sorte que structurellement BCL-3 ne masque pas la séquence NLS de p50 et p52 (Zhang et al, 1994). Le choix entre être un coactivateur des homodimères p50 et p52 ou un inhibiteur de la liaison à l'ADN de ces complexes est régi par les modifications post-traductionnelles de Bcl3 (Bundy & McKeithan, 1997).

Enfin, les derniers membres I κ B ζ et I κ B γ sont beaucoup moins connus. Comme BCL-3, l'inhibiteur I κ B ζ est localisé dans le noyau lors d'une induction (Yamazaki et al, 2005). I κ B ζ est capable d'augmenter la transcription en association avec des dimères de NF- κ B contenant préférentiellement p50, même s'il ne contient pas de domaine TAD. Toutefois, cette fonction ne

semble pas être régulée par les modifications post-traductionnelles mais par le niveau d'expression de la protéine. En réponse à une stimulation des récepteurs Toll et IL1-R, la transcription de $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ est rapidement induite favorisant son association avec p50, et le recrutement de ce complexe sur le promoteur de l'IL6 participant à la réponse inflammatoire (Yamamoto et al, 2004). $\text{I}\kappa\text{B}\gamma$ a été identifiée par sa forte homologie avec le domaine c-terminal de p105 (Liou et al, 1992). Chez la bactérie, la protéine recombinante prévient la liaison à l'ADN des hétérodimères p50-p65, de l'homodimère p50, et de c-rel (Inoue et al, 1992), mais les fonctions de $\text{I}\kappa\text{B}\gamma$ restent très peu décrites chez l'homme.

2. Famille $\text{I}\kappa\text{B}$ kinase ou IKK

Le complexe enzymatique IKK intervient en amont de la cascade de signalisation de NF- κ B en phosphorylant $\text{I}\kappa\text{B}$, le ciblant pour la dégradation et libérant les dimères NF- κ B. Le complexe IKK se compose de deux sous-unités catalytiques nommées $\text{IKK}\alpha$ et $\text{IKK}\beta$, ainsi que d'une sous-unité régulatrice NEMO (NF- κ B essential modifier) aussi appelée $\text{IKK}\gamma$ (figure 3). Les sous-unités $\text{IKK}\alpha$ et $\text{IKK}\beta$ sont des protéines hautement homologues de part leurs domaines en commun. Toutes deux possèdent un domaine protéine kinase en N-terminal, en plus d'un domaine leucine zipper (LZ), de motifs hélice-boucle-hélice (helix-loop-helix, HLH) et d'un domaine de liaison à NEMO (NBD pour NEMO binding domain) situé en C-terminal (Oeckinghaus & Ghosh, 2009). NEMO quant à lui dispose de deux principaux domaines coiled-coil (CC) et d'un domaine zinc-finger en C-terminal. Il partage également un domaine LZ en commun avec les sous-unités catalytiques (Karin & Ben-Neriah, 2000). Le domaine leucine zipper de $\text{IKK}\alpha$ et $\text{IKK}\beta$ est responsable de la dimérisation des kinases et le domaine HLH potentialise l'activité kinase. NEMO forme un complexe trimérique avec $\text{IKK}\alpha$ et $\text{IKK}\beta$, via son domaine coiled coil et le domaine NBD de $\text{IKK}\alpha$ et $\text{IKK}\beta$. Le domaine zinc finger de NEMO forme un complexe spécifique avec l'ubiquitine qui est nécessaire à la signalisation de NF- κ B. $\text{IKK}\beta$ est capable de former un homodimère et de s'associer avec NEMO, et ce complexe est nécessaire et suffisant pour phosphoryler $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ou $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ (Li et al, 1999). $\text{IKK}\alpha$ est également capable de former un homodimère qui va sélectivement activer p100, préférentiellement en dimère avec p65, et ce de manière indépendante de $\text{IKK}\beta$ et de NEMO (Scheidereit, 2006).

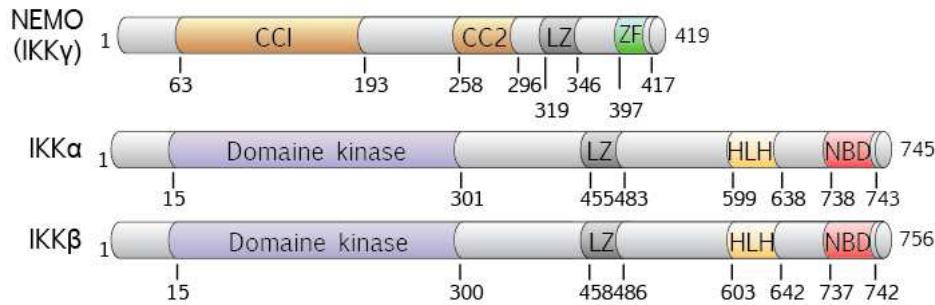


Figure 3 | Le complexe enzymatique IKK. Ce complexe est composé de deux sous-unités catalytique (IKK α et IKK β) et d'une sous-unité régulatrice (NEMO). Le domaine coiled-coil 1 (CC1) est responsable de l'interaction de NEMO avec le domaine leucine-zipper de IKK α et IKK β . Le domaine coiled-coil 2 (CC2) ainsi que le domaine leucine-zipper (LZ) de NEMO interviennent dans les signaux activateurs de NF- κ B en réponse aux stimuli. Le domaine zinc-finger (ZF) quant à lui est le lieu d'ubiquitinylation de NEMO. Le domaine kinase confère l'activité kinase au complexe. Le domaine leucine-zipper (LZ) de IKK α et IKK β intervient dans l'homo- ou l'hétérodimérisation des kinases. Le domaine helix-loop-helix module l'activité kinase de IKK et le domaine NEMO-binding-domaine (NBD) est nécessaire à l'interaction entre NEMO et IKK α , IKK β .

C. Mécanismes d'activation

Tous les membres de la famille NF- κ B peuvent former divers homo et hétérodimères entre eux, à l'exception de RelB qui ne peut pas former d'homodimère. Chaque dimère formé est régulé selon une voie majeure appelée voie canonique. Toutefois, il existe également deux autres modes de régulation de NF- κ B nommés voie alternative et voie atypique.

1. Voie canonique ou classique

Cette voie est la plus fréquemment rencontrée et concerne majoritairement le membre NF- κ B1 associé aux membres RelA, c-Rel ou RelB. Divers stimuli conduisent à son activation parmi lesquels sont retrouvés des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α (Tumor necrosis factor- α) et l'interleukine 1 (IL-1), le récepteur des cellules T (TCR) ou bien encore l'exposition à des produits bactériens comme le lipopolysaccharide (LPS) (Hayden & Ghosh, 2004). Cette voie est caractéristique d'une rapide phosphorylation de I κ B α sur les sérines 32 et 36, deux résidus conservés et localisés en N-terminal. En réponse à ces stimuli, le complexe IKK (I κ B kinase) est activé et responsable de la rapide phosphorylation de I κ B (figure 4).

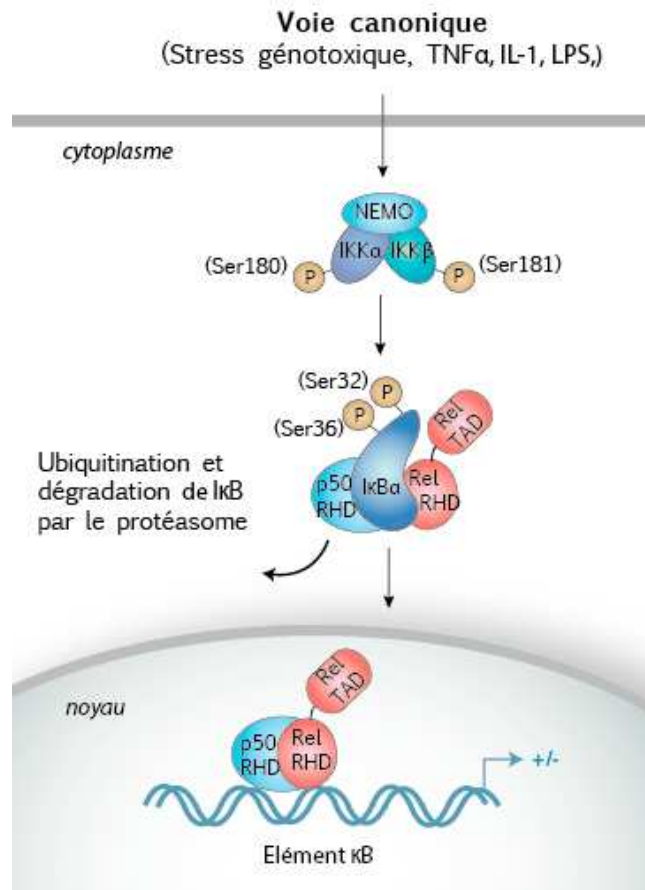


Figure 4 | Voie d'activation classique de NF- κ B. En réponse à divers signaux, le complexe IKK est activé via la voie des TRAFs puis phosphorylé. Le complexe IKK actif va induire la phosphorylation de I κ B et sa séparation du complexe avec NF- κ B. La protéine I κ B est alors ubiquitinylée puis dégradée par le protéasome 26S, ce qui permet à l'hétérodimère p50-Rel d'être transloqué dans le noyau et de réguler la transcription.

De manière plus précise, les divers stimuli provoquent le recrutement de deux complexes : la protéine TRAF6 est recrutée au niveau du récepteur comme les récepteurs TLR grâce à des protéines adaptatrices telles que MyD88 et les kinases IRAK. Le deuxième complexe se compose de TRAF2, avec les protéines TRADD et RIP1. TRAF2 et TRAF6 sont des E3 ligases, qui en association avec des enzymes de type E2 vont synthétiser des chaînes d'ubiquitines K63. Ces chaînes nouvellement formées vont servir de plateforme de recrutement du complexe composé de TAK1, une kinase nécessaire à l'activation de IKK, et de IKK par la liaison de la sous-unité NEMO (Liu & Chen, 2010; Oeckinghaus et al, 2011). TAK1 phosphoryle IKK α et IKK β respectivement sur la sérine 180 et la sérine 181. Le complexe NEMO/IKK α /IKK β ainsi actif va permettre la phosphorylation de la protéine I κ B, qui va alors être rapidement reconnue par le complexe F-box/ β -TrCP. I κ B subit alors une polyubiquitinylation sur les lysines 21 et 22 par le complexe d'ubiquitine ligases de type 3, Skp1-Cullin-F-box (SCF). Ces modifications ciblent I κ B

pour la rapide dégradation par le protéasome 26S et libère le membre Rel (Dai, 1998). Par ailleurs, la protéine HSP27 (Heat Shock Protein 27) participe à l'activation de NF-κB en favorisant la dégradation par le protéasome de l'inhibiteur IκBα phosphorylé dans des conditions de stress (Parcellier et al, 2003). La dégradation de cet inhibiteur expose la séquence NLS des membres Rel et conduit à la translocation du dimère p50/Rel dans le noyau, où il joue son rôle de facteur de transcription. Le mécanisme par lequel p50 est généré n'est pas encore complètement établi et différents systèmes ont été proposés. Le premier mécanisme décrit est basé sur un modèle de clivage co-translationnel qui suggère que p50 n'est pas généré à partir d'une protéine p105 entièrement traduite, mais provient d'une pause du ribosome après la synthèse d'environ 530 résidus – avant le domaine répété en ankyrin – suivie du recrutement du protéasome 26S, conduisant à la génération de p50 (Lin et al, 1998a). Cependant, d'autres études ont montré que la synthèse du domaine répété en ankyrin de p105 est nécessaire au clivage complet de p105 en p50, et donc que la protéine p105 doit être entièrement traduite. Le protéasome 20S serait alors responsable du clivage et de la dégradation de la partie C-terminale de p105 aboutissant à la génération de p50 (Moorthy et al, 2006). Il a également été montré que IKKβ est capable de phosphoryler p105 sur des sérines situées en C-terminal de la même manière que IκB, conduisant à sa dégradation et à la libération du dimère NF-κB, (Lang et al, 2003).

2. Voie non-canonique ou alternative

Cette deuxième voie concerne préférentiellement la sous-unité p52 sous la forme d'un hétérodimère avec RelB, toutefois d'autres combinaisons avec c-Rel, RelA et p50 sont possibles. Il est important de noter que la voie canonique et la voie non-canonique ne sont pas indépendantes l'une de l'autre. En effet, la synthèse des membres RelB et p52 qui sont impliqués dans la voie non-canonique peut être contrôlée par la voie canonique via IKKβ, IκB et RelA-p50 (Basak et al, 2008). La voie non canonique intervient entre autres en réponse au CD40 et à la lymphotoxine B qui sont deux récepteurs de la super famille des TNF, au facteur de la famille des TNF activant les cellules B (BAFF), au LPS et au LMP1 (latent membrane protein 1) du virus de Epstein-Barr (Bonizzi & Karin, 2004; Hayden & Ghosh, 2004). Ces divers signaux conduisent au recrutement de plusieurs E3 ligases telles que TRAF2, TRAF3 et cIAPs. Les événements de polyubiquitinylation de ce complexe permettent l'activation de la kinase NIK (NF-κB inducing kinase) (Liu & Chen, 2010). Il s'ensuit alors une série de modifications post-translationnelles : une fois active, la kinase NIK va s'associer et phosphoryler un dimère dépendant de IKKα sur la sérine 176 et 180 (Lin et al, 1998b). NIK est la kinase la plus répandue mais n'est pas la seule capable de phosphoryler IKK. La kinase Akt, par exemple, phosphoryle IKKα et intervient dans la régulation de la voie alternative

(Gustin et al, 2006). Une fois active, la sous-unité IKK α va venir phosphoryler un dimère composé de p100 sur la sérine 866, 870 et 872 (Xiao et al, 2001; Senftleben et al, 2001; Xiao et al, 2004). Ces trois phosphorylations permettent la formation d'un site de liaison pour le complexe SCF- β TrCP, conduisant à l'ubiquitinylation de type K68 sur le résidu lysine 856 de p100 (Amir et al, 2004). Le précurseur p100 est alors clivé au niveau de l'alanine 454 et de la glutamine 455, libérant la partie C-terminal ubiquitinylée qui sera dégradée par le protéasome. Le clivage de p100 aboutit à la formation du membre p52, actif sous la forme d'un dimère préférentiellement avec RelB ou encore en homodimère p52-p52. Le dimère formé est alors transloqué dans le noyau, où il peut exercer ses fonctions de facteur de transcription (figure 5).

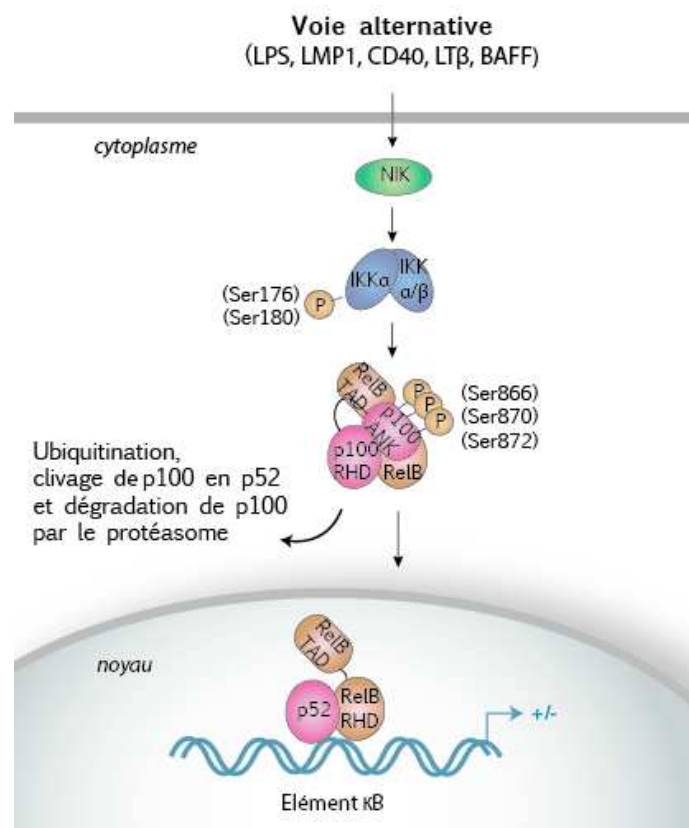


Figure 5 | Voie d'activation alternative de NF- κ B. En réponse à d'autres signaux, la kinase NIK est activée et conduit à la phosphorylation de l'homodimère IKK α . Une fois actif, le complexe IKK va phosphoryler p100 et induire l'ubiquitinylation et la dégradation de la partie C-terminale de p100. Le complexe p52/Rel ainsi formé est transloqué dans le noyau où il peut réguler la transcription.

3. Voie atypique

Les radiations ionisantes et les inhibiteurs de topoisomérase induisent des cassures doubles brin de l'ADN qui peuvent être responsables de l'activation de NF- κ B via une troisième voie de signalisation. Certains signaux de stress sont capables de promouvoir la sumoylation de NEMO sur

les lysines 277 et 309, ces modifications étant associées à l'accumulation de NEMO dans le noyau et à son activation. La sumoylation de NEMO se produit grâce à la ligase PIASy, l'enzyme PARP1 et l'enzyme Ubc9 via leur association (figure 6) (Mabb et al, 2006; Miyamoto, 2011). En parallèle, les doubles cassures de l'ADN conduisent à l'activation de la kinase ATM (Ataxia-telangiectasia mutated), à son auto-phosphorylation et à sa dimérisation. Une fois activée, ATM s'associe à la sous-unité NEMO dans le noyau et phosphoryle celle-ci sur la sérine 85, ce qui conduit à la suppression de la sumoylation en faveur d'une mono-ubiquitinylation responsable cette fois-ci de l'export nucléaire. ATM reste associée à NEMO et ces deux protéines sont transloquées dans le cytoplasme où elles contribuent à l'activation de IKK. En effet, les événements de polyubiquitinylation de TRAF6 et ELKS (protéine riche en glutamate, leucine, lysine et sérine) sont dépendants de ATM et conduisent à l'activation de IKK par TAK1 (Wu et al, 2010; Miyamoto, 2011). Le complexe IKK activé phosphoryle l'inhibiteur IκBα et conduit à la dégradation de celui-ci par le protéasome, ce qui libère l'hétérodimère p65-p50 pour la translocation nucléaire (Wu & Miyamoto, 2007). La voie de signalisation impliquant ATM peut aussi être activée par un stress réplicatif, par exemple induit par l'hydroxyurée ou l'aphidicoline (Wu & Miyamoto, 2008). NF-κB a également été décrit comme pouvant être activé suite à des conditions d'hypoxie, pendant lesquelles l'inhibiteur IκBα est phosphorylé sur le résidu tyrosine 42 et dégradé par le protéasome, libérant NF-κB.

- *DNA-PK dans la régulation de NF-κB*

En réponse aux dommages de l'ADN, Basu *et al* ont montré un rôle de la kinase DNA-PK dans l'activation de NF-κB. Suite à des rayonnements ionisants, DNA-PK est capable de phosphoryler les inhibiteurs IκBα et IκBβ, permettant l'activation des sous-unités de NF-κB. IκBα semble être un plus faible substrat que IκBβ puisque DNA-PK conduit à sa phosphorylation sur deux régions distinctes au sein du domaine de séquences ankyrin répétées et de la région C-terminale (Basu et al, 1998). Cependant, une autre étude a montré à l'inverse un rôle négatif de DNA-PK sur l'activation de NF-κB. Cette fois-ci, DNA-PK interagit avec le domaine répété en séquence ankyrin et avec le domaine PEST de IκBα. DNA-PK phosphoryle alors IκBα sur deux résidus, la sérine 36 et la thréonine 273. Cependant, ces phosphorylations renforcent la fonction d'inhibiteur de IκBα en favorisant son accumulation, via un blocage de la phosphorylation de IκBα par IKKα et IKKβ, et en augmentant ainsi l'association entre IκBα et NF-κB (Liu et al, 1998). Ces deux résultats démontrent une complexité dans la régulation de NF-κB par DNA-PK. Toutefois, une récente étude met en évidence un nouveau rôle de DNA-PK en tant qu'activateur de NF-κB

en réponse au TNF. Dans ce contexte, DNA-PK est à l'origine de la phosphorylation de p50 sur la sérine 20. Cette modification a pour conséquence d'augmenter l'affinité de p50 sur les sites κ B et de favoriser la formation d'homodimères p50/p50 et d'hétérodimères p50/p65. Ces complexes sont retrouvés sur le promoteur de VCAM-1, induisant son expression nécessaire à la réponse inflammatoire (Ju et al, 2010). De plus, la kinase DNA-PK est également impliquée dans la réponse pro-inflammatoire médiée par CD158d, et ceci via l'activation de NF- κ B. CD158d est membre de la famille de récepteur KIR (Killer cell immunoglobulin-like receptor) présent à la surface des endosomes. DNA-PK est capable de s'associer à ce récepteur, où est aussi recrutée Akt. DNA-PK phosphoryle alors directement Akt sur la Ser473, qui va phosphoryler à son tour IKK β , conduisant à l'activation de RelA et décrivant une nouvelle voie de réponse pro-inflammatoire (Rajagopalan et al, 2010).

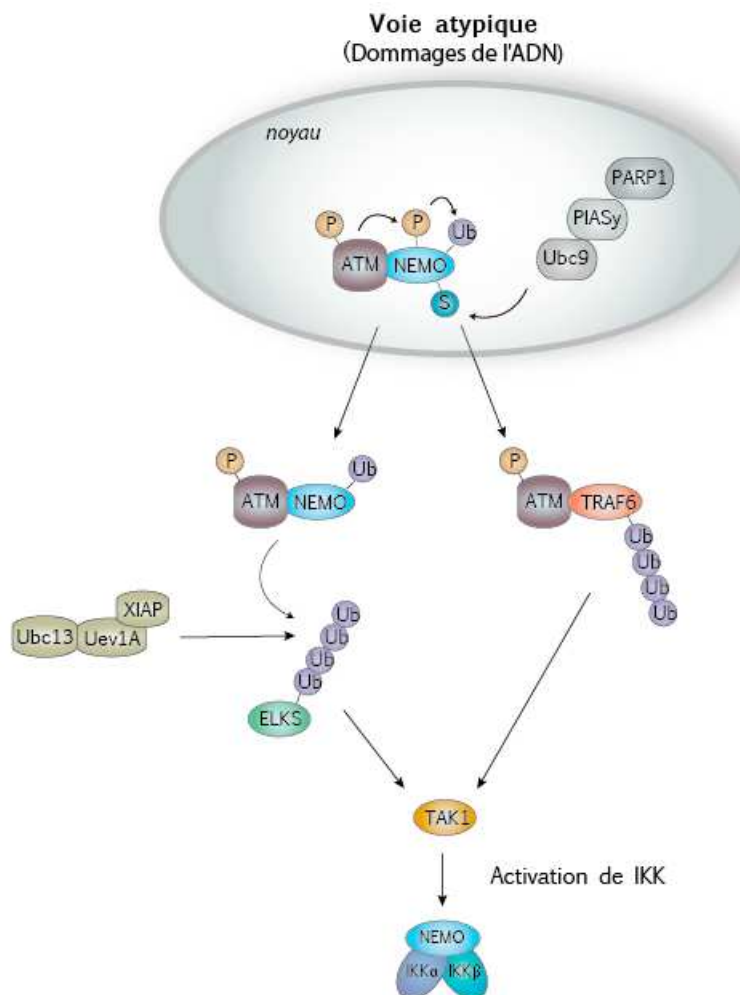


Figure 6 | Voie d'activation atypique de NF- κ B. Lors de dommages de l'ADN, la sous-unité NEMO est sumoylée et transloquée dans le noyau. L'activation parallèle de ATM favorise la formation d'un complexe ATM-NEMO, dépendant de PAPR1, PIASy et Ubc9. ATM phosphoryle NEMO, entraînant la suppression de la sumoylation et l'apparition d'une monoubiquitination. Le complexe est alors redirigé dans le cytoplasme, dans lequel la polyubiquitinylation de TRAF6 et ELKS est dépendante de ATM. Ces complexes conduisent ensuite à l'activation de IKK par TAK1, de manière similaire à la voie d'activation classique (Miyamoto, 2011).

Ces trois voies d'activation qui présentent des différences et des spécificités peuvent pourtant coopérer ensemble pour l'activation de NF-κB. La voie alternative conduisant à la génération de p52 est dépendante de IKKα. Or, en réponse à des dommages de l'ADN, IKKα se retrouve activée par ATM/NEMO, conduisant à l'activation de p52 dépendante de IKKα et de ATM/NEMO (Barré et al, 2010). D'autre part, le gène NFKB2 est lui-même un gène cible des facteurs NF-κB, créant une boucle d'amplification qui offre une première activation de NF-κB2, en parallèle de son activation par la voie alternative habituelle (Liptay et al, 1994). En réponse à des dommages de l'ADN, des expériences de Re-ChIP ont montré un premier recrutement d'un complexe p50/RelA sur le promoteur du gène NFKB2, ainsi que la liaison plus tardive de complexes p52/RelB et p52/c-Rel (Barré et al, 2010). Ces expériences montrent une coopération entre la voie alternative, classique et atypique pour l'activation de NF-κB.

D. Mécanismes de régulation

Il est largement établi que l'activation transcriptionnelle de NF-κB requiert le plus souvent l'interaction avec des coactivateurs de la transcription, pouvant influencer la structure de la chromatine ou d'autres événements nécessaires à l'activation transcriptionnelle. Une fois les dimères NF-κB activés, ce sont les modifications de NF-κB et la composition du dimère qui vont majoritairement réguler ces interactions avec des cofacteurs. En outre, les modifications post-traductionnelles et les interactions avec des co-régulateurs qui peuvent en dépendre, jouent un rôle majeur dans la spécificité de la réponse et contribuent ainsi à l'activation d'un sous-ensemble de gènes cibles. De cette manière, une même sous-unité peut présenter des fonctions totalement opposées en fonction des conditions d'activations. Tous les membres de la famille NF-κB semblent être largement modifiés, et la liste ne cesse de s'agrandir. Néanmoins, face à l'étendue des techniques d'analyse globale d'aujourd'hui, beaucoup de modifications sont observées mais très peu sont étudiées.

1. Modifications post-traductionnelles de RelA

Le membre RelA reste la sous-unité de NF-κB la plus étudiée. La première modification post-traductionnelle décrite pour NF-κB est la phosphorylation de RelA sur la sérine 276 chez la souris. Cette phosphorylation est induite par la sous-unité catalytique de la protéine kinase A (PKAc), et conduit à la translocation nucléaire de RelA où il peut s'associer à CBP/p300 et être transcriptionnellement actif (Mosialos et al, 1991; Zhong et al, 1998). L'association entre RelA

phosphorylé et CBP/p300 permet de déplacer et de remplacer les complexes p50-HDAC-1 liés à l'ADN avec des complexes activateurs afin de favoriser la transcription (Zhong et al, 2002). Les membres p50 et c-Rel peuvent être également phosphorylés par PKAc respectivement sur la sérine 337 et la sérine 267, des sites équivalents à la sérine 276 de RelA (Hou et al, 2003; Guan et al, 2005; Yu et al, 2004). La sérine 276 de RelA a aussi été décrite comme un site de phosphorylation de la kinase de stress MSK1 (mitogen- and stress- activated protein kinase-1), favorisant l'activation de l'expression de gènes cibles de RelA tel que l'IL-6 en réponse au TNF (Vermeulen, 2003).

En tout, cinq sites différents de sérine pouvant être phosphorylés ont été étudiés pour RelA en plus de la sérine 276 : les sérines 281, 311, 468, 529 et 536, impliquant d'autres kinases telles que la protéine kinase C (PKC), la caséine kinase II (CKII), TANK (NAK, NF- κ B activating kinase aussi connu sous TBK1), Pin1 ou encore GSK3 β . Ces phosphorylations interviennent dans l'activité transcriptionnelle de RelA. Par exemple, la phosphorylation de la sérine 311 par PKC a été montrée comme essentielle pour le rôle anti-apoptotique de RelA en réponse au TNF- α (Duran et al, 2003). A l'inverse, la sérine 468 phosphorylée par GSK3 β exerce une fonction de régulateur négatif de l'activation de RelA, puisque qu'un mutant négatif de cette sérine augmente l'activité transcriptionnelle de RelA (Buss et al, 2004). Par ailleurs, le résidu thréonine 505 occupe une place importante dans la régulation de RelA. En réponse à l'oncogène, le suppresseur de tumeur ARF est activé afin d'induire l'expression de p53 et l'apoptose des cellules (voir Chapitre 2). En parallèle, il est décrit que ARF active également les kinases de dommages de l'ADN ATR et Chk1 intervenant dans la régulation de RelA, optimisant ainsi l'envoi de signaux pro-apoptotiques. Plus précisément, ATR active la kinase Chk1 qui est requise pour la phosphorylation de RelA sur la thréonine 505. Cette phosphorylation favorise l'association de RelA avec l'histone déacétylase HDAC1, ayant pour conséquence la répression plutôt que l'activation des gènes cibles de RelA (Rocha et al, 2005). Dans ce contexte, l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL qui fait partie des gènes cibles de RelA est réprimée, sensibilisant ainsi les cellules aux signaux apoptotiques (Rocha et al, 2003a).

Le membre RelA peut être aussi acétylé sur de nombreux sites, tous ayant des effets différents sur son activité. Les co-activateurs CBP/p300 peuvent acétyler RelA sur les lysines 218, 221 et 310. Les deux premières associées sont responsables de la dissociation du complexe RelA-I κ B, et favorisent la liaison à l'ADN (Chen, 2002). L'acétylation de la lysine 310 stimule quant à elle la transactivation de RelA (Chen, 2002; Perkins, 2006). Des événements de méthylation sur les lysines de RelA peuvent également se produire, cependant les conséquences de ces modifications sont encore peu caractérisées. Il a notamment été décrit que la lysine 310 pouvait être

spécifiquement monométhylée par la méthylase SETD6, dans des conditions non-stimulées. Cette méthylation a pour conséquence d'atténuer la transcription des gènes cibles de RelA et notamment la réponse inflammatoire médiée par RelA. Lorsqu'il est monométhylé sur la lysine 310, RelA est capable de se lier à un domaine ankyrin présent sur la protéine GLP (G9A-like protein). GLP est un partenaire connu de la méthyltransférase G9a de l'histone H3, ce qui laisse sous-entendre que la forme méthylée de RelA pourrait favoriser la méthylation H3K9 et ainsi la répression d'un ensemble de gènes cibles de NF-κB (Levy et al, 2010).

Il a récemment été montré que RelA pouvait également subir une sumoylation. Cette modification se produit grâce à la ligase PIAS3 qui est une E3 ligase faisant partie de la famille de protéines PIAS (protein inhibitor of activated STAT). La sumoylation de RelA conduit à sa répression. De manière intéressante, la sumoylation de RelA médiée par PIAS3 est induite par l'activation de NF-κB en réponse au TNFα, fournissant un modèle de boucle de régulation négative de NF-κB. De plus, la liaison de RelA à l'ADN est à l'origine du signal de sumoylation par PIAS3 depuis que les mutants de RelA qui ont perdu cette capacité de liaison à l'ADN ne sont plus sumoylés par PIAS3 (Liu et al, 2012).

2. Modifications post-traductionnelles de RelB

Les modifications post-traductionnelles des sous-unités de NF-κB autres que RelA sont moins décrites. Le membre RelB présente trois sites de phosphorylation pour lesquels des rôles ont été décrits : la tyrosine 84, la sérine 552 et la sérine 368. Les deux premiers altèrent le pouvoir transcriptionnel de RelB en favorisant sa dégradation. Lors de l'activation des cellules T, RelB est rapidement phosphorylé sur ces deux résidus, conduisant au clivage du domaine N-terminal et à sa complète dégradation par le protéasome (Marienfeld et al, 2001). Récemment, il a été montré que dans un même contexte de cellules T activées, le résidu sérine 552 de RelB était une cible de phosphorylation de la kinase GSK-3β (glycogen synthase kinase-3β). Cette sérine/thréonine kinase cible RelB pour la dégradation, l'utilisation d'inhibiteurs de GSK-3β conduisant à un défaut de dégradation de RelB (Neumann et al, 2011). La phosphorylation sur la sérine 368 est quant à elle requise pour la dimérisation de RelB avec les autres membres de la famille. Elle joue même un rôle plus important dans la régulation du clivage de p100. En effet, comparé à un mutant de RelB sur la sérine 368, l'expression d'un RelB non-muté réduit la génération de p52 en faveur d'une accumulation du précurseur p100. Ainsi, cette phosphorylation intervient dans la régulation négative du clivage de p100 (Maier et al, 2003).

3. Modifications post-traductionnelles de c-Rel

Concernant le membre c-Rel, il est décrit cinq phosphorylations importantes : la phosphorylation sur la sérine 267, les sérines 454 et 460, la sérine 471, et la sérine 525. La sérine 267, au même titre que la phosphorylation de RelA sur la sérine 276, est induite par la kinase PKA et est requise pour l'activation transcriptionnelle de c-Rel. L'expression de c-MYC conduit à une augmentation de l'activité de PKA, corrélant avec une augmentation de l'expression de c-Rel dans des cellules sur-exprimant c-MYC. c-Rel est une cible directe de PKA et la stimulation de l'activité transcriptionnelle de c-Rel par sa phosphorylation sur la sérine 276 est renforcée par la présence de CBP/p300 (Mosialos et al, 1991; Yu et al, 2004). Les sérines 454 et 460 sont également décrites comme étant impliquées dans l'activation transcriptionnelle de c-Rel depuis que la mutation de ces sites a pour effet d'augmenter le pouvoir transformant de c-Rel. Ces mutations modifient la capacité de c-Rel à activer certains gènes cibles, modifiant ainsi leurs expressions et révélant l'implication de mutations du domaine TAD de c-Rel dans le développement de certains lymphomes (Starczynowski et al, 2005). La phosphorylation de la sérine 471 est observée suite à une stimulation par le TNF α et est nécessaire à l'activation de c-Rel par le TNF α . En effet, l'utilisation d'un mutant de c-Rel rendant cette phosphorylation inactive inhibe l'activation de NF- κ B par le TNF α (Martin & Fresno, 2000). Le membre c-Rel peut être également phosphorylé sur la sérine 471 par la kinase NIK dans la régulation de l'activation des cellules T. De même, l'utilisation de mutants de c-rel a démontré le rôle de NIK dans l'activation de c-Rel afin de réguler la synthèse de l'IL2 et l'activation des cellules T (Sánchez-Valdepeñas et al, 2006). La phosphorylation sur la sérine 525 par la kinase IKK α lors d'une stimulation au TNF intervient également dans l'activation de c-rel et dans la transcription de ses gènes cibles. La mutation de cette sérine a pour effet d'augmenter la résistance des cellules à la mort induite par le TNF α (Starczynowski et al, 2007).

Concernant les membres p105/p50 (NF- κ B1) et p100/p52 (NF- κ B2), de nombreuses phosphorylations sont connues et interviennent à deux niveaux dans l'activation de ces membres : dans le clivage et la dégradation au niveau du précurseur (p105, p100), et à un deuxième niveau dans la stabilisation, la dimérisation, la régulation et la fonction spécifique du membre actif (p50, p52).

4. Modifications post-traductionnelles de NF- κ B1

Plusieurs sites de phosphorylation ont été décrits concernant NF- κ B1. Les premiers travaux à propos des modifications post-traductionnelles de NF- κ B1 indiquent la phosphorylation par

IKK β sur trois sérines situées en C-terminal. Les sérines 923, 927 et 932 sont ainsi responsables de l'ubiquitinylation et de la dégradation de p105, notamment lors d'une stimulation par le TNF α (Heissmeyer et al, 1999; 2001; Lang et al, 2003). Deux autres phosphorylations sur p105 sont rapportées : lors d'un traitement par le TNF α , la kinase GSK-3 β est capable de phosphoryler p105 sur les sérines 903 et 907, favorisant sa stabilisation et sa dégradation. L'inhibition de cette kinase suffit à diminuer le niveau de phosphorylation sur ces deux résidus, ainsi GSK-3 β stabilise le membre p105 et le prépare à la dégradation (Demarchi et al, 2003). Une autre phosphorylation, sur la sérine 337, se produit cette fois-ci sur p50 par interaction avec la kinase PKA, et conduit à la liaison constante d'un homodimère p50-p50 sur l'ADN dans des cellules non stimulées. Cet homodimère étant principalement connu pour agir comme répresseur de la transcription, cette phosphorylation représente un point important dans le maintien d'une régulation négative des gènes cibles de NF- κ B dans des conditions non stimulées (Hou et al, 2003; Guan et al, 2005). Récemment, il a été également décrit un rôle de la phosphorylation de p50 sur la sérine 20 par DNA-PK. Cette phosphorylation favorise l'association d'un homodimère p50-p50 et d'un hétérodimère p50-p65 sur l'ADN, et potentialise la fixation de p50 sur le promoteur de VCAM-1 pour induire son expression (Ju et al, 2010). A l'inverse, la phosphorylation sur la sérine 329 de p50 qui se produit via Chk1, conduit à l'inhibition de la liaison de l'ADN de p50. L'utilisation d'un mutant non phosphorylable lève l'inhibition de l'expression des gènes anti-apoptotiques cibles de NF- κ B, sensibilisant les cellules aux stress induits par des cassures de l'ADN (Schmitt et al, 2011). Mise à part les événements de phosphorylation, la sous-unité NF- κ B1 peut également être acétylée au niveau de trois lysines en positions 431, 440 et 441. Ces modifications interviennent sur p50 par CBP/p300 et ont pour rôle d'augmenter sa translocation nucléaire et sa capacité à se lier à l'ADN ce qui augmente son pouvoir transcriptionnel (Furia et al, 2002).

5. Modifications post-traductionnelles de NF- κ B2

Presque autant de modifications ont été décrites pour le membre NF- κ B2. Les premières phosphorylations décrites concernent le précurseur p100 et interviennent dans son clivage. La kinase NIK est capable de phosphoryler p100 sur les sérines 866 et 870 ce qui va favoriser l'ubiquitinylation de p100, son clivage et sa dégradation. La mutation du gène codant pour NIK empêche le clivage de p100, entraînant un défaut de production de p52 (Xiao et al, 2001). D'autres sites de phosphorylation de p100 sur les sérines 99, 108, 115, 123 et 872 induites par la kinase IKK α sont également décrites comme favorisant la formation de la forme active p52, via l'ubiquitinylation de p100. En effet, NIK favorise l'activation de IKK α mais également son interaction avec p100. Une fois activée et en complexe avec p100, IKK α phosphoryle p100 sur ces

cinq résidus, nécessaires pour l'ubiquitinylation et le clivage de p100 (Senfleben et al, 2001; Xiao et al, 2004). Il a récemment été décrit deux nouveaux sites de phosphorylation de p100 qui régissent cette fois-ci son interaction avec un cofacteur. En effet, la kinase GSK-3 β est capable de phosphoryler p100 sur les sérines 707 et 711 qui sont requises pour l'interaction de p100 avec Fbxw7 α . Fbxw7 α appartient à la famille de protéine F-box et a pour rôle dans ce cas de cibler constitutivement p100 pour la dégradation par le protéasome. GSK-3 β et Fbxw7 α ont alors un rôle dans la promotion de la survie via la dégradation de p100 dans les myélomes multiples (Busino et al, 2012). De la même manière que pour p50, p52 peut également subir des modifications. Lors de dommages de l'ADN, le membre p52 est phosphorylé sur la sérine 222 par la kinase GSK-3 β . De manière intéressante, cette modification est décrite comme contrôlant la dimérisation de p52, favorisant un changement de complexe d'un homodimère p52 qui est activateur de la transcription, en un hétérodimère p52/c-rel répresseur. Ainsi, lorsqu'il est phosphorylé sur la sérine 222, l'hétérodimère p52/c-rel va venir spécifiquement réprimer l'expression de Skp2, membre de la famille des protéines F-box intervenant dans les complexes SCFs (SKP1-cullin-F-box) qui participent notamment à la dégradation des inhibiteurs du cycle comme les complexes Cyclines/Cdks, p21 et p27. Dans ce cas précis, en réponse aux dommages de l'ADN, le membre p52 phosphorylé sur la sérine 222 a un rôle d'inducteur de l'autophagie médiée par p27 par cette inhibition de Skp2 (Barré & Perkins, 2010a). Un autre site de phosphorylation correspondant à la sérine 226 a été identifié par analyse globale (Olsen et al, 2010). Cependant aucune kinase ni aucun rôle de cette phosphorylation n'ont été décrits.

Outre la phosphorylation, le membre NF- κ B2 peut être régulé par ubiquitinylation et sumoylation (figure 7). Un unique site d'ubiquitinylation sur la lysine 855 est décrit jusqu'à présent, servant de résidu d'ancrage requis pour déclencher le signal conduisant au clivage de p100. La délétion de cette lysine suffit à empêcher l'ubiquitinylation (Amir et al, 2004). En revanche, plusieurs sites de sumoylation sont retrouvés sur p100. Au nombre de quatre, les lysines 90, 298, 689 et 863 sumoylées sont nécessaires aux stimuli induits par p100 lorsqu'il est phosphorylé, depuis que la mutation de ces sites a pour effet d'inhiber divers stimuli physiologiques induits par le clivage de p100 (Vatsyayan et al, 2008). La sous-unité p52 peut aussi être acétylée par l'histone acétylase CBP/p300, ce qui augmente la fixation de p52 à l'ADN et potentialise sa fonction de transactivateur (Deng et al, 2006).

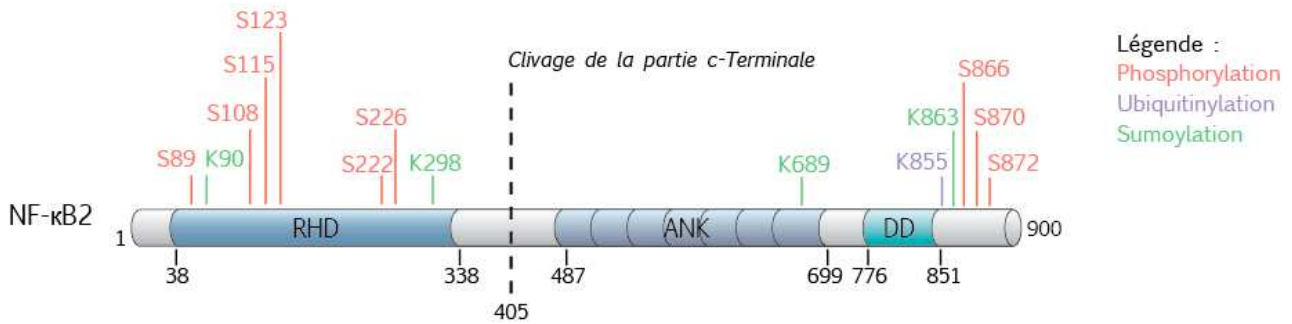


Figure 7 | Modifications post-traductionnelles de NF- κ B2. Le facteur de transcription est phosphorylé sur différents résidus intervenant dans le clivage de la partie c-Terminale de p100 (S89, S108, S115, S123, S866, S870 et S872). Les phosphorylations sur les sérines 222 et 226 sont moins décrites : la sérine 222 participe à l'activation de p52 tandis qu'aucun rôle de la sérine 226 n'est décrit jusqu'à présent. Les sites de sumoylation et ubiquitinylation participent également au clivage de p100.

III. NF- κ B dans la tumorigénèse

A. Rôles dans l'inflammation

La famille NF- κ B joue un rôle crucial dans la réponse inflammatoire du fait de son activation par des molécules inflammatoires comme le TNF, mais aussi par son habilité à induire l'expression de nombreuses cytokines et chemokines (Pasparakis, 2009).

L'absence de la sous-unité RelA est montrée comme étant létale pour l'embryon à partir du quinzième jour de gestation. Les souris RelA^{-/-} présentent une dégénération du foie due à l'induction du programme d'apoptose (Beg et al, 1995). Cependant, l'implication de RelA dans la réponse au TNF α a tout de même été démontrée à l'aide de souris adultes RelA^{Flox/Flox}. Ces souris sont obtenues à l'aide du système Cre-lox qui consiste en une perte de fonction du gène. Des courtes séquences (34 bp) appelées LoxP sont introduites de chaque côté du gène cible, ici RelA, générant des souris RelA^{Flox/Flox}. Ces séquences sont reconnues par la protéine recombinase Cre qui va éliminer la séquence d'ADN située entre les deux sites LoxP. Le gène Cre introduit au départ est inactif et est rendu actif par un système inductible. La recombinase Cre est induite chez les souris RelA^{Flox/Flox} ayant de 8 à 12 semaines conduisant à la délétion du gène encadré par les sites LoxP. Les souris RelA^{Flox/Flox}MxCre ainsi obtenues peuvent être alors utilisées pour étudier la fonction de RelA dans des souris adultes. Ainsi, cette étude a montré que les souris RelA^{Flox/Flox}MxCre traitées avec du TNF α présentent une viabilité diminuée, ce qui les rend plus sensibles à l'apoptose induite par le TNF α tandis que les souris contrôles restent non-affectées par le traitement (Geisler et al, 2007).

Les modèles murins KO des autres sous-unités de NF- κ B sont viables mais présentent une immunité humorale incomplète. De manière générale, l'analyse des souris c-Rel^{-/-} révèle

d'importants rôles de c-Rel dans le développement de l'auto-immunité, dans l'atténuation des allergies, dans la sensibilité face aux infections par des pathogènes, et dans la transplantation d'allogreffes (Liou & Hsia, 2003). Concernant ce dernier, les souris déficientes pour c-Rel montrent une diminution marquante du nombre de rejet et une durée de tolérance au greffon plus importante que les souris non-mutées, dont les rejets de greffe sont observés dès le 8ème jour dans le cadre de transplantations cardiaques (Finn et al, 2002). Ces données supportent le fait que les souris c-Rel^{-/-} présentent une réponse défectueuse des lymphocytes T. Plus récemment, il a été démontré une défaillance de la réponse des Th17 dans les souris c-Rel^{-/-}. Cette étude montre que c-Rel et RelA interviennent dans la voie de transcription qui régule la différenciation des lymphocytes T en Th17 (Ruan et al, 2011).

L'absence de RelB se répercute aussi sur le développement des cellules thymiques médullaires, suggérant une fonction de RelB dans la régulation de gènes nécessaires à la différenciation de ces deux types cellulaires. Les souris déficientes pour RelB présentent très tôt dans leur développement, dès 8 à 10 jours après la naissance, de nombreuses anomalies phénotypiques : une population réduite de cellules dendritiques, une hyperplasie myéloïde, une immunité altérée, des foyers d'infiltrations de cellules immunitaires dans plusieurs organes. Pour certains animaux, cette infiltration résulte au bout de 3 semaines à un dysfonctionnement de l'organe et à une mort prématurée (Weih et al, 1995).

L'implication de NF-κB1 dans la réponse immunitaire a également été montrée. Les souris déficientes pour p50 sont plus susceptibles aux infections et meurent à des âges précoces, sans toutefois montrer de développement anormal (Sha et al, 1995). Chez les souris NF-κB1^{-/-}, les cellules dendritiques non-stimulées sécrètent spontanément du TNF-α conduisant à une augmentation de granzyme B et à l'activation des cellules T CD8⁺, démontrant un rôle de NF-κB1 dans la prévention de la réponse auto-immune par la régulation négative de la production de TNF-α (Dissanayake et al, 2011). De plus, ces cellules T CD8⁺ qui sont plus nombreuses dans les souris NF-κB1^{-/-} sont des cellules T mémoires, suggérant une rôle de NF-κB1 dans la prévention du développement des cellules T CD8⁺ mémoires et une fonction critique dans le thymus (Gugasyan et al, 2012). NF-κB1 n'intervient pas seulement dans la maturation mais aussi dans la différenciation des cellules dendritiques. En effet, les souris déficientes pour NF-κB1 présentent une production réduite de GM-CSF par les cellules T CD4⁺ lors d'une réponse inflammatoire. Lors d'un stimulus inflammatoire, les monocytes sont recrutés et se différencient en monocytes inflammatoires dérivants des cellules dendritiques (MoDC), et ceci de manière GM-CSF dépendante. NF-κB1 intervient cette fois-ci dans la production de GM-CSF par les cellules T CD4⁺ activées, ce qui va promouvoir le développement des MoDC et favoriser la réponse immune

lors des maladies inflammatoires (Campbell et al, 2011).

Un rôle primordial de NF-κB2 dans le développement et le fonctionnement des cellules B est décrit. En effet, les souris NF-κB2^{-/-} présentent une importante réduction du nombre de cellules B dans les organes lymphoïdes périphériques. Malgré ce défaut de prolifération, les cellules B issues des souris NF-κB2^{-/-} ont une maturation normale. Cependant, ces souris ne possèdent pas de réponse immune des cellules T (Caamaño et al, 1998). Plus précisément, les souris p52^{-/-} ont une habilité plus faible à générer des anticorps dirigés contre les antigènes dépendants des cellules T. De manière intéressante, le même phénotype est observé avec les souris déficientes pour Bcl-3, supportant un rôle du complexe entre p52 et Bcl-3 (Franzoso et al, 1998). Les souris knock-out pour NF-κB2 présentent également un défaut dans l'architecture des ganglions et de la rate, renforçant le fait que NF-κB2 intervient dans le développement des organes lymphoïdes secondaires (Weih & Caamano, 2003). Les souris NF-κB2^{-/-} présentent une auto-immunité importante, avec l'infiltration de cellules T activées dans de nombreux organes et la présence élevée d'anticorps, soulignant un rôle de NF-κB2 dans le développement thymique et dans la tolérance au soi (Zhang et al, 2006). De manière intéressante, les souris déficientes spécifiquement pour p100, conduisant à l'activation constitutive de p52, ont une transition des cellules pré-pro-B en cellules pro-B bloquée lors du développement, due à une augmentation de l'activité de RelB. Ainsi, l'activation constitutive d'un hétérodimère p52-RelB intervient dans la lymphopoïèse précoce des cellules B (Guo et al, 2008). Récemment, une étude a montré un rôle différent entre p100 et p52 dans la régulation des cellules T. Les souris NF-κB2^{-/-} qui sont incapables de générer le membre actif p52 ne présentent pas de co-stimulation des cellules T, tandis que des souris NF-κB2^{+/-} spécifiquement capables de cliver p100 et d'augmenter le niveau d'expression de p52, retrouvent cette co-stimulation. Ainsi, c'est un ratio entre p100 et p52 qui régule la dépendance des cellules T aux signaux de co-stimulation, dans lequel p100 est un répresseur et p52 un activateur (Giardino Torchia et al, 2013).

B. Implication dans le développement tumoral

Il est maintenant plus qu'évident qu'en plus d'avoir un rôle dans la réponse immune, NF-κB a un rôle critique dans le développement et la progression du cancer par sa capacité à stimuler la prolifération cellulaire, à inhiber l'apoptose et par sa capacité à augmenter la formation de métastases (Karin et al, 2002). Le développement de la tumeur se caractérise par une accumulation d'altérations génétiques conférant à la cellule un ou plusieurs avantages qui lui permettent de proliférer. Ces altérations ont récemment été ré-évaluées par Hanahan et Weinberg et sont au

nombre de huit : l'auto-suffisance aux facteurs de croissances, l'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, l'échappement au programme de mort cellulaire (apoptose), un potentiel réplcatif illimité, un maintien de l'angiogénèse, l'invasion des tissus et métastases, la reprogrammation du métabolisme énergétique et l'échappement à la destruction immunitaire (Hanahan & Weinberg, 2000; 2011). La famille de facteur de transcription NF- κ B est capable de promouvoir plusieurs de ces altérations (figure 8).

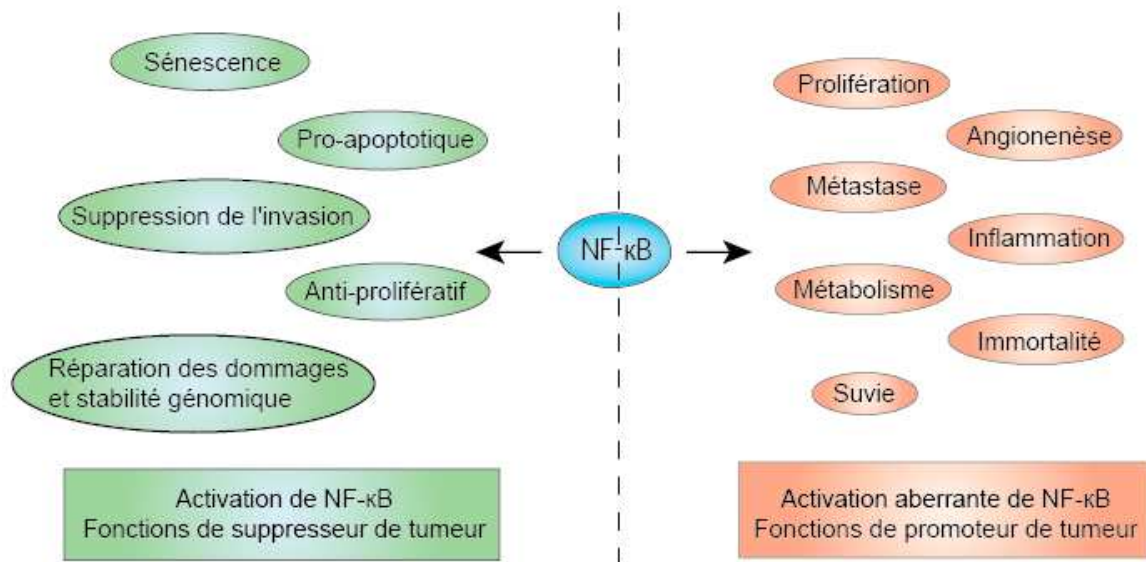


Figure 8 | Conséquences de l'activation de NF- κ B. L'expression des gènes dépendants de NF- κ B contribue à la mise en place de mécanismes suppresseurs de tumeur. Néanmoins, la dérégulation de NF- κ B influe sur la capacité proliférative et sur la survie des cellules cancéreuses, participant à la tumorigénèse (Perkins, 2012).

La mutation sur le gène suppresseur de tumeur APC, un régulateur négatif de la voie Wnt qui conduit à la dégradation de la β -caténine via le protéasome, fait partie des premiers événements qui aboutissent à la tumorigénèse dans les cancers colorectaux. La perte de APC résulte en une accumulation de la β -caténine dans le noyau et à l'activation des gènes cibles de la voie Wnt notamment impliqués dans la prolifération et la survie comme c-Myc et la cycline D (He, 1998; Tetsu & McCormick, 1999). La β -caténine est notamment capable d'interagir avec RelA dans le but de réprimer sa fonction pro-apoptotique. En effet, la diminution de l'activité de RelA et de ses gènes cibles est trouvée dans les cellules cancéreuses exprimant fortement la β -caténine. Plus précisément, le rôle de RelA en tant qu'inducteur de l'expression du récepteur de mort Fas est contré lorsque la β -caténine s'associe à celui-ci (Deng et al, 2002). Cette étude met en évidence un modèle d'instabilité et de dérégulation associé à la voie β -caténine-RelA dans le cancer du colon. Une autre étude a montré une régulation de la prolifération des cellules souches intestinales par RelA, lors de la perte de APC (Myant et al, 2013). En effet, la GTPase RAC1 favorise la prolifération des cellules qui expriment l'OLFM4 (olfactomedine 4), une glycoprotéine sécrétée, et

Lgr5, un marqueur des cellules souches intestinales, lorsque APC est perdu. L'activation de RAC1 suite à la perte de APC conduit à la production de ROS et à l'activation de la signalisation de RelA, qui sont nécessaires à la prolifération des cellules exprimant PLOFM4 et Lgr5. L'activation de la voie RAC1-ROS-NF-κB favorise donc la prolifération des cellules souches des cryptes intestinales, suggérant un rôle critique de cette voie dans l'initiation tumorale.

Les membres NF-κB sont potentiellement oncogéniques et promoteurs de tumeur par leur capacité à induire l'expression de gènes qui favorisent la résistance à l'apoptose et induisent la prolifération cellulaire. Un rôle de NF-κB dans la transformation a été proposé par l'équipe de Karin selon lequel, dans les cellules inflammatoires, une infection par *Helicobacter pylori* conduit à l'activation de NF-κB et que cette infection constitue un facteur de risque d'apparition de cancer gastrique (Karin et al, 2002). Cette activation de NF-κB est constitutive et favorise à la fois la production de ROS ainsi que l'apparition de dommages de l'ADN, et stimule la transcription de la cycline D1 favorisant la prolifération de cellules transformées. En outre, la sous-unité RelA peut, par exemple, contribuer à la survie tumorale en induisant l'expression de gènes anti-apoptotiques tels que Bcl-xL (Kucharczak et al, 2003). En parallèle, RelA lorsqu'il est phosphorylé sur la sérine 468 est capable de se fixer sur le promoteur de la cycline D1 et de Skp2 afin de respectivement induire et réprimer leur expression, et de stimuler la prolifération par l'entrée en phase S des cellules (Barré & Perkins, 2007). Toutefois, lorsque la phosphorylation de la sérine 468 de RelA est remplacée par la phosphorylation sur la thréonine 505, celui-ci va subir un changement de fonction et va réprimer l'expression de la cycline D1 et induire l'expression de Skp2 afin de stopper la prolifération (Barré & Perkins, 2007). Ces données soulignent de nouveau l'importance et la spécificité des modifications post-traductionnelles des facteurs NF-κB dans l'attribution d'une fonction. D'autre part, des gènes suppresseurs de tumeur comme ARF, peuvent induire l'association des sous-unités de NF-κB avec des complexes co-répresseurs, interactions également médiées par les modifications post-traductionnelles de NF-κB. Par exemple, ARF est capable de favoriser l'interaction du membre RelA avec l'histone déacétylase 1 (HDAC1) en conduisant à la phosphorylation de RelA sur son résidu thréonine 505, qui va alors réprimer spécifiquement l'expression du gène anti-apoptotique Bcl-xL (Rocha et al, 2005). Les phosphorylations de c-Rel sur les sérines 454 et 460 régissent son rôle puisqu'elles ont pour effet de modifier l'activation de certains gènes cibles et par la même occasion d'augmenter le pouvoir transformant de c-Rel (Starczynowski et al, 2005). Ces exemples fournissent un modèle selon lequel les sous-unités de NF-κB peuvent dans certains cas conférer une sensibilité aux signaux pro-apoptotiques, et ainsi fonctionner eux-mêmes comme suppresseurs de tumeur (Perkins, 2004).

Les facteurs NF- κ B sont également reliés au processus d'angiogénèse. Dans des carcinomes rénaux, le membre p50 est associé par immunohistochimie à des marqueurs d'apoptose comme Bcl-2 et p53 mais aussi à des marqueurs d'angiogénèse tels que le VEGF (Meteoglu et al, 2008). RelA a également été associé à l'angiogénèse dans des carcinomes à fortes métastases en comparaison à des carcinomes à faibles métastases. En effet, une augmentation de l'expression de RelA et du VEGF est observée dans les carcinomes à fortes métastase par rapport aux carcinomes présentant de faibles métastases (Zhang & Peng, 2007). Une autre illustration de l'implication de NF- κ B dans la stimulation de la prolifération cellulaire et de l'angiogénèse provient de l'étude des glioblastomes. En effet, il a été décrit que dans ces tumeurs, la perte du suppresseur de tumeur ING4 est directement corrélée avec la progression tumorale. L'expression de ING4 est réduite de manière significative dans les gliomes et cette perte est directement liée à une augmentation de l'angiogénèse et de la croissance tumorale. Pour réguler l'angiogénèse, ING4 interagit avec RelA et réprime l'expression transcriptionnelle des gènes cibles de NF- κ B tels que l'interleukine 8, COX2 (Cytochrome c oxidase 2) et l'interleukine 6, qui interviennent dans le recrutement de cellules inflammatoires (Garkavtsev et al, 2004).

Les sous-unités de NF- κ B ont été montrées comme étant constitutivement activées dans plusieurs types de cellules cancéreuses. Il existe plusieurs mécanismes par lesquels les facteurs de transcription NF- κ B sont détournés de leur mode de régulation normale, et cela a été associé au cancer. Par exemple, l'oncovirus aviaire REV-T produit l'oncoprotéine v-Rel qui, à la suite de mutations, présente par exemple une affinité fortement diminuée envers I κ B, conduisant à son activation associée à la progression rapide de lymphomes et de leucémies (Gilmore, 1999). D'autres oncoprotéines virales ont été démontrées comme dérégulant l'activité de NF- κ B, comme la protéine Tax issue du génome viral de rétrovirus HTLV-1 qui est associée au développement de la leucémie des cellules T chez l'adulte (Mosialos, 1997). D'autre part, des oncogènes comme STAT3 sont capable de maintenir l'activation de RelA au sein de la tumeur. STAT3 intervient ainsi dans la transformation en favorisant l'acétylation de RelA par p300 et ainsi son activité nucléaire (Lee et al, 2009). Les cancers associés aux translocations, délétions ou mutations chromosomiques peuvent aussi perturber les gènes qui encodent NF- κ B et les protéines I κ B, séparant les facteurs NF- κ B de leurs régulateurs et causant l'activation constitutive de NF- κ B, comme les sous-unités Rel dans les lymphomes B humains. En outre, la production autocrine et paracrine de cytokines pro-inflammatoires, l'activation oncogénique et les infections peuvent stimuler l'activité de IKK conduisant à l'activation constitutive de NF- κ B. Cette activation constitutive des facteurs de

transcription NF- κ B a été associée à plusieurs aspects de la tumorigénèse, incluant la prolifération cellulaire excessive, l'inhibition de l'apoptose et l'augmentation du potentiel angiogénique et métastatique de la tumeur. De nombreux cancers montrent une dérégulation de NF- κ B participant à une augmentation de la résistance aux traitements chimio- et radio-thérapeutiques (Lee et al, 2007)(table 1).

Tumeurs primaires	Sous-unités concernées	Référence
Sein	RelA, c-Rel, p50, p52	Nakshatri et al, 1997; Sovak et al, 1997; Cogswell, P. C. et al, 2000
Utérus	RelA, p50, p52	Nair et al, 2003; Shehata, 2005
Ovaire	p100, RelB, c-Rel	Dejardin et al, 1999
Prostate	RelA, p52, RelB	Huang et al, 2001; Nadiminty et al, 2010; Xu et al, 2009
Rein	RelA, p50	Oya et al, 2001; 2003
Vessie	RelA	Levidou et al, 2008
Poumon	RelA, p50, c-Rel	Tang et al, 2006; Motadi et al, 2007
Foie	RelA	Arsura & Cavin, 2005; Qiao et al, 2006
Pancréas	RelA, p52	Wang et al, 1999
Estomac	RelA, p52, c-Rel	Sasaki et al, 2001
Oesophage/gastrique	RelA, p50	Lee et al, 2005; Levidou et al, 2007
Colon	RelA, p50, p52, RelB, c-Rel	Aranha et al, 2007; Puvvada et al, 2010
Thyroïde	RelA	Visconti et al, 1997; Pacifico et al, 2004
Glioblastome	RelA, p50	Raychaudhuri et al, 2007
Neuroblastome	RelA, p50	Bian et al, 2002; Brown et al, 2007
Leucémie	RelA, p50	Guzman et al, 2001

Table 1 | Surexpression des sous-unités NF- κ B dans les cancers. Données obtenues à partir des publications citées et de la base de donnée «The human protein atlas» (Uhlen et al, 2010).

A. Fonctions connues de NF- κ B2

De nombreuses observations ont suggéré un rôle de NF- κ B2 dans les cancers. NF- κ B est également impliqué dans le développement de cancers des cellules du sang par sa fonction de régulateur de gènes impliqués dans l'immunité. Des réarrangements chromosomiques qui affectent le locus NFKB2 sur la région du chromosome 10q24 ont été associés à de nombreux lymphomes de cellules B et T, incluant la leucémie lymphocytaire chronique (CLL) et le myélome multiple (Migliazza et al, 1994). Bien qu'ils présentent des différences moléculaires, tous ces réarrangements ou délétions conduisent au déplacement de la séquence I κ B-like située en C-terminale de p100 et à la production constitutive de p52. Par ailleurs, une délétion en 3' du locus NFKB2 générée par ciblage du gène chez la souris, résulte en une hyperplasie lymphoïde. Cette délétion cause également la production constitutive de p52 (Attar et al, 1997). Les premières corrélations entre NF- κ B2 et les lymphomes remontent à la découverte de NF- κ B2, encore appelé *lyt-10*. L'étude décrit une translocation chromosomique du gène *lyt-10* dans le cas du lymphome diffus à grandes cellules B, responsable de la délétion du domaine ankyrin et de l'activation constitutive de la protéine et de la voie non-canonique (Neri et al, 1991). Il est important de noter que ces tronctions de NF- κ B2 sont associées à un pouvoir transformant. En effet, des fibroblastes murins exprimant un mutant représentatif de la délétion en 3' sont capables de former des colonies en agar, et l'injection de ces fibroblastes dans des souris avec un système immunitaire déficient conduit à la formation de tumeurs (Ciana et al, 1997). Le virus d'epstein-barr (EBV) est souvent associé à l'apparition de lymphomes des cellules B. L'infection de lymphocytes B primaires *in vitro* avec le virus EBV conduit à l'immortalisation des cellules, et cette transformation requiert la présence de la protéine LMP1 (Latent membrane protein 1). LMP1 est une protéine membranaire qui est capable d'induire le clivage de p100 en p52, via l'activation des TRAFs et le recrutement de NIK (Atkinson et al, 2003; Eliopoulos et al, 2003). De manière générale, l'inhibition de NF- κ B a pour conséquence de bloquer la transformation induite par LMP1 et de favoriser la mort cellulaire par apoptose (Cahir-McFarland et al, 2000). D'autres protéines dans le cadre des leucémies atteignant les cellules T conduisent également à l'activation du clivage de p100 en p52. Toutefois, il est montré que dans ces cas, l'activation de NF- κ B2 est dépendante de la voie IKK γ /NEMO et que Tax est capable d'interagir directement avec IKK pour induire la dégradation de I κ B α et ainsi le clivage de p100 (Uhlik et al, 1998).

En plus de son rôle dans la promotion de l'inflammation, NF- κ B2 peut stimuler la prolifération de l'épithélium gastrique. En effet, des souris présentant une délétion pour le domaine C-terminale de p100, et exprimant ainsi constitutivement p52, ont développé une hyperplasie de

l'épithélium gastrique, soulignant le rôle important de NF- κ B2 dans la tumorigénèse des cancers intestinaux (Ishikawa et al, 1997). L'activation de NF- κ B2 devient alors dramatique. Les mutations activatrices qui affectent le gène Notch1 sont assez fréquentes dans les cas des leucémies lymphoblastiques des cellules T aiguës, et elles sont associées à une activation de la voie NF- κ B. Notch1 est en effet capable d'induire l'activation transcriptionnelle de NF- κ B2 et RelB de manière directe mais également de manière indirecte par l'interaction et l'activation du complexe IKK, conduisant à la transformation (Vilimas et al, 2007) (figure 9).

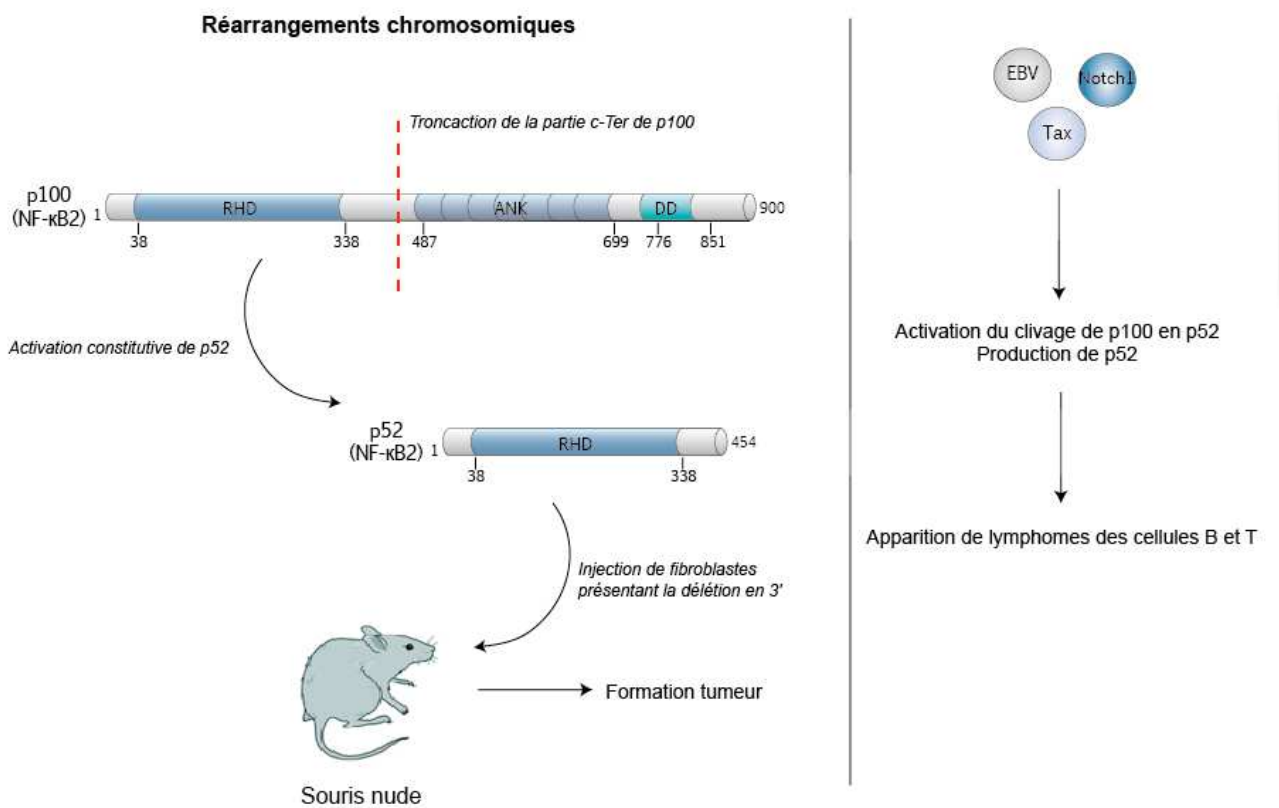


Figure 9 | Implication de NF- κ B2 dans la transformation. Lors de réarrangements chromosomiques du locus NF κ B2, la partie c-terminale de p100 peut être tronquée, conduisant à la production et à l'activation constitutive de p52. L'injection de fibroblastes exprimant cette délétion en 3' de p100 dans des souris avec un système immunitaire déficient aboutit à la formation de tumeur. D'autre part, l'activation de p52 peut se faire par une stimulation de clivage de p100 suite à des virus comme l'Epstein-barr (EBV) ou la protéine virale Tax, ou encore suite à l'activation de Notch1. Ces événements sont associés à l'apparition de lymphomes.

L'implication de NF- κ B2 dans le développement de carcinomes comme le cancer du sein a également été montrée. Des hauts niveaux d'expression de NF- κ B2 (p100 et p52) ont été observés dans des lignées cellulaires de carcinome mammaire et dans des tumeurs primaires (Cogswell, P. C. et al, 2000). Le précurseur p100 interagit avec RelB, et une expression élevée de RelB a été

rapportée dans les carcinomes primaires du sein (Cogswell, P. C. et al, 2000). La cause de l'augmentation de l'activité de NF- κ B dans les cancers du sein est peu connue. Il est possible que des oncoprotéines qui sont connues pour être activées dans les cancers du sein, comme ERBB2 ou H-Ras, peuvent induire des voies de signalisation qui conduisent à une suractivation de NF- κ B (Finco et al, 1997; Pianetti et al, 2001).

1. Régulateur de la prolifération

Le contexte dans lequel le facteur NF- κ B2 est le plus décrit concerne sa fonction dans la stimulation de la prolifération. Nous avons vu que l'activation constitutive de p52 chez la souris aboutit à l'hyperplasie de certains tissus, en accord avec un rôle pro-prolifératif de NF- κ B2. Les souris knock-out pour NF- κ B2 présentent un défaut dans l'architecture des ganglions et de la rate, mettant en évidence un rôle de NF- κ B2 dans le développement des organes lymphoïdes secondaires (Weih & Caamano, 2003). Les effets sont renforcés dans les souris à la fois NF- κ B2^{-/-} et NF- κ B1^{-/-}, puisque ces souris présentent un ralentissement de la prolifération cellulaire, une réduction du nombre d'ostéoclastes et un blocage de la maturation des cellules B (Franzoso et al, 1998). L'expression de NF- κ B2 a été associée *in vitro* à la régulation du gène de la cycline D1. Lors de l'expression de p53, le gène de la cycline D1 est réprimé pour entraîner l'arrêt du cycle. Cette régulation n'est pas directe mais se fait par l'intermédiaire de p52. A la suite de signaux pro-prolifératifs, le membre p52 est activé sous la forme d'un homodimère et interagit avec le co-activateur Bcl-3 afin d'induire spécifiquement l'expression de la cycline D1. p53 inhibe Bcl3, ce qui favorise l'interaction de l'homodimère p52 avec le co-répresseur HDAC1, conduisant à l'inhibition de l'expression de la cycline D1 (Rocha et al, 2003b). En plus de la cycline D1, p52 régule d'autres gènes cibles de p53 comme p21, PUMA, DR5, Gadd45 α et Chk1. Ainsi, p52 peut stimuler la prolifération à deux niveaux : en induisant l'expression de la cycline D1 et en réprimant celle de p21 (Schumm et al, 2006). Par ailleurs, des travaux ont montré qu'une suractivation de NF- κ B2 dans les cellules mammaires épithéliales pouvait induire une hyper-prolifération, via l'augmentation de l'expression du gène de la cycline D1. Cette surexpression de la cycline D1 requise pour la carcinogenèse du sein illustre le rôle de NF- κ B dans le contrôle de la prolifération de l'épithélium mammaire (Cao et al, 2001; Demicco et al, 2005).

p52 est capable de réguler un autre inhibiteur du cycle, p27, par l'intermédiaire de l'expression de Skp2. Dans un contexte de dommages de l'ADN, p52 forme un hétérodimère avec c-Rel et tous deux interagissent avec le co-répresseur HDAC1 afin d'inhiber l'expression de Skp2 et d'induire la mort dépendante de p53. En l'absence de dommages, c'est un homodimère p52 avec le

cofacteur Bcl-3 qui stimule l'expression de Skp2, entraînant l'inhibition de p27 et ainsi la suppression de l'autophagie. Ce changement de dimère à l'origine de l'induction ou de la répression de Skp2 s'explique par le fait que lors des dommages, p52 est phosphorylé sur son résidu sérine 222. Cette modification empêche la formation d'un homodimère p52/Bcl-3 en faveur d'un complexe p52/c-Rel qui va réprimer l'expression de Skp2 (Barré & Perkins, 2010a).

2. Acteur de la survie

En plus de réguler la prolifération, NF-κB2 joue également un rôle dans la survie afin de promouvoir la tumorigenèse. Dans le cancer du sein ainsi que dans les leucémies lymphocytaires chroniques (LLC), la sur-expression de NF-κB2 est associée à la forte expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Le promoteur de Bcl-2 présente de multiples sites de liaison de NF-κB2, et les homodimères p50 et les homodimères p52 associés à Bcl-3 sont capables de se fixer sur le promoteur de Bcl-2 afin d'induire sa transcription (Viatour et al, 2003).

Le facteur de transcription STAT3 appartenant à la famille STAT (signal transducers and activators of transcription) a de nombreux rôles dans la prolifération, la différenciation cellulaire, l'apoptose et l'inflammation. Une sur-expression de STAT3 est associée à de nombreuses pathologies comme par exemple le cancer du sein, du colon et de la prostate. Afin de protéger les cellules de l'apoptose, STAT3 active NF-κB2 en induisant le clivage de p100 en p52 par l'activation de IKKα. Dans ce contexte, STAT3 requiert une acétylation pour être actif, et l'utilisation d'un mutant de STAT3 incapable d'être acétylé bloque la production de p52 et augmente la mort cellulaire par apoptose. Ainsi, l'activation du clivage de p100 en p52 par STAT3 conduit à la survie des cellules et représente une voie importante intervenant dans la résistance aux thérapies (Nadiminty et al, 2006).

3. Rôle dans l'invasion

La protéine CNK (scaffold protein connector enhancer of KSR, Kinase Suppressor of Ras) intervient dans la régulation des voies de signalisation de ERK et de JNK. L'activation de CNK dans le cancer du sein est corrélée avec l'expression des protéines de la matrice MMP-9 (matrix metalloprotease 9) et MT1-MMP (membrane type-1 MMP), intervenant dans l'invasion, la croissance et l'angiogenèse. L'inhibition de CNK1 par knockdown interfère avec l'expression de ces protéines. MMP9 et MT1-MMP possèdent des sites de liaison κB sur leur promoteur, et l'inhibition de CNK1 interfère également sur le clivage de p100 en p52. En effet, CNK1 induit l'expression de MMP9 et MT1-MMP en favorisant la fixation de p52 sur le promoteur de ces deux protéines.

Ainsi, NF-κB2 devient un important promoteur de la tumorigenèse (Fritz & Radziwill, 2010).

Ainsi, NF-κB est un acteur de la tumorigenèse par la régulation de la prolifération, de la survie et de l'invasion, ces processus permettant aux cellules de contourner les signaux de mort cellulaire et d'initier la croissance tumorale. Que ce soit la composition du dimère de NF-κB, les modifications post-traductionnelles associées ou encore l'interaction avec des partenaires, tous ces paramètres rentrent en compte dans la définition de la fonction de NF-κB et contrastent les rôles parfois opposés de ces facteurs de transcription. Ainsi selon le contexte, NF-κB est aussi bien capable d'induire l'expression de protéines anti-apoptotiques afin de favoriser la croissance tumorale, que d'être responsable de la répression de ces mêmes protéines et de faciliter la mort par apoptose. En plus de la régulation du processus apoptotique, nous avons vu que la famille NF-κB contrôle de nombreux autres processus tels que l'angiogenèse et l'invasion qui sont décisifs pour le développement et la progression du cancer. D'autre part, d'autres mécanismes comme la sénescence ont été mis en lien avec la famille NF-κB. Il a été montré que NF-κB s'accumule au sein des cellules sénescents et est un régulateur majeur du phénotype sécrétoire nécessaire à l'induction et au maintien de la sénescence dans le lymphome (Yuchen Chien, 2011).

Chapitre 2

La sénescence cellulaire

Les dommages cellulaires et les altérations génétiques sont des événements incontournables dans la vie d'une cellule. Etant donné les différentes mutations oncogéniques qui peuvent intervenir et le nombre de cellules dans un organisme, la possibilité qu'une cellule puisse potentiellement devenir cancéreuse à un instant donné reste élevée. Toutefois, la cellule est capable d'évaluer son propre niveau de dommages et lorsque cela est nécessaire d'ordonner son autodestruction par deux mécanismes majeurs : l'apoptose et la sénescence. Nous nous sommes intéressés ci-dessous à la sénescence et à ses fonctions intervenant dans la suppression et la promotion tumorale.

La sénescence a été initialement définie comme un arrêt permanent du cycle cellulaire. A l'origine, la sénescence est observée comme une conséquence d'une capacité de prolifération limitée de fibroblastes humains diploïdes maintenus en culture, qui se termine par un arrêt du cycle cellulaire (Hayflick, 1965). Ce type de sénescence est appelée sénescence répllicative, et a été reliée au stress dû au raccourcissement des télomères, à une surexpression du locus CDKN2A codant pour p16Ink4a et p14ARF, et à une accumulation de dommages de l'ADN (Collado et al, 2007). Plus tard, une autre source d'établissement de la sénescence a été définie, indépendante de la réduction des télomères, où cette fois-ci ce sont des conditions de stress qui vont induire ce genre de phénotype. Dans cette voie appelée SIPS (stress induced premature senescence), est retrouvé le stress induit par les oncogènes, ou OIS (Oncogene Induced Senescence), conséquence d'une suractivation de voies de prolifération cellulaire. Cette prolifération excessive due à l'oncogène induit, entre autres, une pression sur les fourches de réplication, des cassures de l'ADN, une suractivation de l'activité mitochondriale, et favorise la formation d'espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species ou ROS).

I. Mécanismes et caractéristiques de la sénescence

L'apparition de dommages de l'ADN est la principale cause de l'établissement de la sénescence. L'arrêt du cycle cellulaire qui en découle constitue une caractéristique de la cellule sénescence, et est induit par deux voies majeures : la voie p53/p21 et la voie p16/Rb.

B. Le gène suppresseur de tumeur p53

Selon le type cellulaire, l'activation de p53 conduit soit à la mort cellulaire par apoptose, soit à l'entrée en sénescence. Lorsqu'elle est activée, la protéine p53 induit entre autres l'expression de l'inhibiteur du cycle p21Waf1, conduisant à un arrêt du cycle via l'inhibition des kinases dépendantes des cyclines nécessaires à la progression de la prolifération. p21waf1 intervient

également dans l'inactivation de E2F, requis pour la progression des cellules en phase S.

1. Découverte de p53 et de son rôle de suppresseur de tumeur

La protéine p53 a été identifiée à partir d'expériences menées sur l'antigène T du virus SV40, un virus à ADN capable d'induire la transformation tumorale de cellules infectées. Dans ces cellules transformées par le virus SV40, l'immunoprécipitation de l'antigène T produit par ce virus révèle son interaction avec une protéine de 53 kDa. Il est alors pensé que l'antigène T pouvait interagir avec p53 pour permettre l'expression d'oncoprotéines intervenant dans la transformation tumorale (Lane & Crawford, 1979). En effet, p53 a été retrouvée fortement exprimée dans des souris qui développent des tumeurs, et le simple fait d'injecter un anticorps anti-p53 dans une lignée cellulaire murine conduit à un blocage de la prolifération cellulaire (Rotter, 1983; Mercer et al, 1982). Peu après, le clonage de l'ADNc de p53 a permis de mettre en évidence que p53 était capable de coopérer avec l'oncoprotéine H-RAS pour transformer des cellules embryonnaires normales et des fibroblastes embryonnaires (Parada et al, 1984; Eliyahu et al, 1984). Cependant, il a été noté que la capacité de p53 à transformer les cellules pouvait varier selon l'origine de son clonage, et que la cause de ces différences provenait du fait que les ADNc de p53 contenaient des mutations. En effet, la forme sauvage de p53 est incapable d'induire la transformation cellulaire (Finlay et al, 1988). Les mutations modifient la fonction de p53 et favorisent la progression tumorale. Depuis, p53 a alors été définie comme un gène suppresseur de tumeur et il est maintenant estimé qu'environ un cancer sur deux présente le gène p53 muté, augmentant le risque de transformation maligne. Les trois mutations de p53 les plus fréquemment rencontrées dans le cancer du colon sont les substitutions G175A, G248A et C248T (Soussi & Bérout, 2003; Vousden & Lu, 2002). Ces mutations touchent le domaine de liaison à l'ADN de p53, affectant ainsi son activité. En fonction des conditions de son activation, p53 cible des gènes différents et peut conduire soit à un arrêt du cycle, soit à l'apoptose.

2. Régulation de p53

Le principal régulateur de p53 est l'ubiquitine ligase HDM2 (Human double minute 2), l'analogue de MDM2 (Mouse double minute 2). En l'absence d'activation, HDM2 se lie à p53 conduisant à l'ubiquitinylation de ce dernier et à sa dégradation par le protéasome (Honda et al, 1997). De plus, HDM2 se fixe à p53 au niveau de son domaine de transactivation et masque celui-ci de manière à inhiber l'activité de facteur de transcription de p53 (Oliner et al, 1993). Cette interaction entre HDM2 et p53 est indispensable à l'inhibition de p53, contre cette association favorise alors la stabilisation de la protéine p53 et permet à celle-ci de réguler ses gènes cibles. En

réponse aux dommages de l'ADN, ATM phosphoryle p53 sur les sérines 15 et 20, empêchant la fixation de HDM2 sur p53. Le suppresseur de tumeur ARF participe également à la stabilisation de p53 en interagissant directement avec HDM2 (Stott et al, 1998). Dans certaines conditions, NF- κ B peut aussi se présenter comme un régulateur de l'activité de p53. En réponse au virus HTLV-1 Tax (human T-lymphotropic virus type I transcriptional activator protein), la kinase IKK β est activée et phosphoryle p65 sur la sérine 536. Une fois phosphorylée sur la sérine 536, la sous-unité p65 se lie à p53 afin de former un complexe qui va alors se fixer sur le promoteur des gènes de p53. L'association de ce complexe est corrélée à un faible recrutement de la machinerie transcriptionnelle, résultant en une inhibition de l'activité transcriptionnelle de p53 par p65 (Jeong et al, 2004; 2005). Un autre membre de la famille NF- κ B peut se lier à p53 afin de régir sa fonction. La sous-unité p52 coopère avec p53 afin de réguler sa fonction et est requise pour l'expression de gènes apoptotiques cibles de p53 tels que PUMA, DR5, Bax et Gadd45 α en réponse aux dommages de l'ADN (Schumm et al, 2006).

3. ATM et ATR

Il existe deux grandes voies majeures de réponse aux cassures de l'ADN : ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (ATM and Rad3-related), sont des sérine/thréonine kinases qui conduisent respectivement à l'activation de Chk2 et Chk1. ATM est activée en réponse aux cassures doubles brins, tandis que ATR répond d'avantage à un blocage des fourches de réplication. ATM est activée par le complexe MRN (MRE-Rad50-NSB1), le premier médiateur recruté sur les cassures double brin, et est capable d'autophosphorylation pour à son tour phosphoryler l'histone H2Ax sur le site de cassure. Afin de propager le signal de dommages de l'ADN, la protéine MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint 1) est recrutée par γ H2Ax ce qui va favoriser le recrutement et l'accumulation de complexes MRN, conduisant à une amplification de l'activité de ATM et de nouveau à la phosphorylation de H2Ax sur une zone qui peut s'étendre sur l'ADN (d'Adda di Fagagna, 2008). Un autre médiateur des dommages de l'ADN, 53BP1 (p53-binding protein 1), est également capable d'induire cette boucle d'amplification de l'activation d'ATM en favorisant le recrutement d'ATM sur l'histone H2Ax phosphorylée, par son interaction directe avec MDC1. Une fois activée, ATM phosphoryle Chk2 conduisant à un arrêt du cycle cellulaire via d'une part l'inhibition de la phosphatase du cycle CDC25, et d'autre part la phosphorylation de p53 sur les sérines 15 et 20 aboutissant à sa dissociation de HDM2 et à sa stabilisation (Bartek & Lukas, 2003). Lorsque l'ADN simple brin est sous forme linéaire, celui-ci est reconnu par la protéine RPA (Replication protein A) qui se fixe alors à cette région. ATR interagit avec la protéine ATRIP, une sous-unité qui se lie à l'ADN, afin de reconnaître l'ADN simple brin lié par RPA. L'activité d'ATR

est amplifiée par la présence d'un complexe formé des protéines RAD9-HUS1-RAD1 et d'un complexe RAD17-RFC. Une fois activée, ATR phosphoryle Chk1, qui comme Chk2, inhibe CDC25 et phosphoryle p53 sur la serine 20, ce dernier conduisant à l'activation de l'inhibiteur du cycle p21 (figure 10).

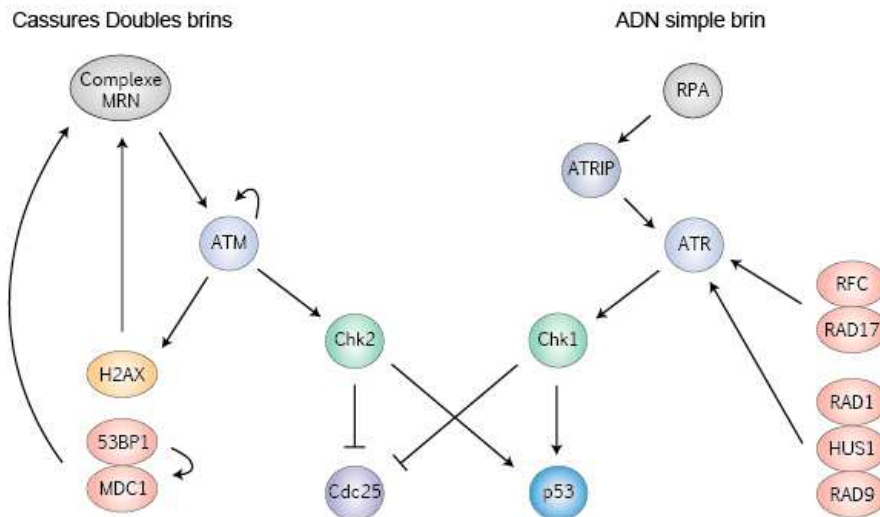


Figure 10 | Réponse aux cassures de l'ADN. En réponse aux cassures de l'ADN doubles brins ou lorsque l'ADN est sous forme simple brin (par exemple par un blocage des fourches de réplication), les voies de signalisations ATM-Chk2 et ATR-Chk1 sont respectivement activées. Ces voies favorisent la propagation de signaux de dommages de l'ADN tout au long des cassures par le recrutement successif des différents complexes, et permettent de stopper le cycle cellulaire.

4. L'inhibiteur des cyclines Cdk, p21Waf1

p53 est donc capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire via la régulation d'un de ces principaux gènes cibles, p21Waf1. p21Waf1 est un inhibiteur des cyclines Cdk appartenant à la famille des Cip et Kip parmi laquelle est également retrouvé la protéine p27. L'activité de p21 se porte principalement sur l'inhibition de Cdk2. p21 se lie à Cdk2 et empêche ainsi son interaction avec la cycline E, interrompant l'entrée en phase S des cellules (Obaya & Sedivy, 2002). Dans certains cas, l'inhibition du cycle par p21 passe aussi par la répression de Cdk1 pour induire un arrêt du cycle en G2 (Martín et al, 2005). p21 est également capable d'interagir directement avec E2F1 et d'inhiber son activité d'activateur de la transcription des cyclines requises pour l'entrée en phase S des cellules. L'inhibition des complexes cycline/Cdk par p21 entraîne également l'hypophosphorylation du régulateur négatif du cycle cellulaire Rb (Stein et al, 1990). Rb titre le facteur de transcription E2F1 empêchant la progression du cycle. Lorsqu'il est phosphorylé, Rb est inactivé et ne peut plus interagir avec E2F1. La forme libre de E2F1 peut alors activer la transcription des gènes nécessaires à l'entrée en phase S. Des facteurs de transcriptions comme

STAT3 sont capables de s'associer avec Rb et p21 dans le but de réprimer la transcription (Barré et al, 2005) (Giraud, 2001).

Toutefois, une étude menée au laboratoire dans un contexte où le suppresseur de tumeur p53 est muté conduisant à son incapacité à se lier à l'ADN et ainsi à son inactivation, a montré que l'entrée en sénescence des cellules se faisait étonnamment via l'expression de p21Waf1. En réponse à l'expression de l'oncogène Ras, la protéine p21 est activée via les voies de réponse aux cassures de l'ADN faisant intervenir la protéine ATR, et ceci indépendamment de p53, pour permettre l'arrêt de la prolifération. L'activation en parallèle de la kinase de stress p38 participe à la stabilisation protéique de p21, qui va ensuite se fixer sur le promoteur des gènes du cycle cellulaire Cdc25A et Plk1 afin d'inhiber leur transcription. De cette manière, l'expression de p21 induite par l'oncogène indépendamment de p53 participe à l'entrée en sénescence des cellules (De Carne Trecesson et al, 2011).

p53 a également d'autres cibles transcriptionnelles qui interviennent dans l'établissement de la sénescence. Il a notamment été montré que GADD45 α (growth arrest and DNA damage inducible) est une cible directe de p53 et participe à l'établissement de la sénescence induite par Ras en induisant l'expression des kinases JNK et p38 (Tront et al, 2006). Dans certaines conditions, p53 peut conduire à l'induction de l'apoptose plutôt qu'à un arrêt du cycle, en favorisant entre autre l'expression de gènes pro-apoptotiques à un seul domaine BH3 tels que Puma, Bid ou Noxa (Yee & Vousden, 2005).

C. Le gène suppresseur de tumeur p16Ink4a

La protéine p16Ink4a est un des produits du locus INK4a-ARF, lequel code aussi pour la protéine ARF (p19ARF chez l'homme et p14ARF chez la souris), et p15Ink4b. Cette voie constitue un deuxième niveau de contrôle de l'établissement de la sénescence.

La principale fonction de p16Ink4a et p15Ink4b est de se lier à Cdk4 et Cdk6 afin d'empêcher la phosphorylation de Rb par ces kinases. L'hypophosphorylation de Rb maintenue par p16Ink4a et p15Ink4b conserve l'interaction de Rb avec E2F, aboutissant à un arrêt du cycle en phase G1 (Lukas et al, 1995). La protéine ARF est quant à elle reconnue pour sa capacité à réguler p53. En se liant à la protéine MDM2, ARF inactive celle-ci conduisant à la stabilisation de p53 et à un arrêt en phases G1 et G2 (Quelle et al, 1995). Par la stabilisation de p53, ARF participe également indirectement à l'hypophosphorylation de Rb via la transcription de p21. Le locus INK4a/ARF/INK4b fait partie des sites les plus fréquemment inhibés dans les cancers humains, entraînant la perte d'expression d'une des trois protéines, p16Ink4a, p15Ink4b, ou ARF, ou des trois protéines simultanément. L'activation de p16Ink4a et ARF conduit à l'entrée en sénescence

des cellules et leur inactivation est associée à une altération de la sénescence et au déclenchement de la progression maligne. Toutefois, les études montrent un rôle plus marqué de p16Ink4a dans la sénescence chez l'homme tandis que ARF a un rôle prédominant chez la souris (Kim & Sharpless, 2006).

La régulation de p16Ink4a et ARF se fait par les voies de signalisation médiées par les oncogènes qui les activent et conduisent à l'entrée en sénescence. L'expression de p16Ink4a et ARF dans des conditions de non-stress est faible. C'est à la suite d'un signal oncogénique que ces protéines se retrouvent fortement exprimées et activées (Collado et al, 2007). La voie Ras/Mek/Erk est la signalisation majoritaire qui affecte l'expression de p16Ink4a. En réponse à Ras, le facteur de transcription ETS2 est phosphorylé, augmentant sa liaison sur le promoteur de p16Ink4a et provoquant une accumulation de p16Ink4a et l'entrée en sénescence (Ohtani et al, 2001). Un autre facteur important, Bmi-1 (facteur de transcription de la famille polycomb), est quant à lui un répresseur de p16Ink4a et de ARF. Bmi-1 est une cible transcriptionnelle de Myc qui inhibe le locus INK4/ARF lorsqu'il est activé, bloquant à la fois l'expression de p16Ink4a et dans une moindre mesure celle de ARF (Jacobs et al, 1999; Park et al, 2004). Lors de la sénescence, l'expression de Bim-1 est diminuée, rétablissant l'expression de p16INK4a et ARF (Guney et al, 2006). La voie de signalisation impliquant la kinase de stress p38 est un autre moyen de réguler l'expression de p16Ink4a. En parallèle de la voie Mek-Erk activée en réponse à Ras ou bien suite à un stress oxydatif, p38 est activée et phosphorylée par la MKK6 ce qui est associé à une accumulation de p16Ink4a et à l'hypophosphorylation de Rb (Iwasa et al, 2003; Ito et al, 2006).

L'étude des cellules sénescents a permis de mettre en évidence plusieurs marqueurs de la sénescence. Cependant, il n'existe pas à ce jour de marqueurs qui soient propres aux cellules sénescents, et toutes les cellules sénescents n'expriment pas forcément tous les marqueurs possibles. Néanmoins, les cellules sénescents peuvent être identifiées par l'acquisition de certaines caractéristiques reconnues : une augmentation de l'activité de l'enzyme SA- β -Galactosidase (SA- β -Gal), une accumulation de foci de dommages de l'ADN et de foci d'hétérochromatine ou SAHF (Senescence associated heterochromatin foci), une instabilité chromosomique et la présence d'un fort sécrétome inflammatoire.

D. SA- β -Galactosidase

L'enzyme SA- β -Gal est présente dans toutes les cellules, qu'elles soient saines ou sénescents. Cependant, son activité augmente lorsque la cellule présente un phénotype de sénescence. La détection de l'activité de l'enzyme SA- β -Gal consiste en une détection

histochimique à pH 6, qui se concrétise par une coloration bleue des cellules sénescents. En effet, l'augmentation de l'activité de la β -galactosidase dans les lysosomes des cellules sénescents, entraîne, en présence de X-galactose et à un pH acide optimal (pH 6), la formation d'un précipité bleu. Il existe une autre enzyme, la β -galactosidase lysosomale, qui a été découverte la première et dont l'activité est observée à un pH plus acide (pH 4). Cependant, seul l'enzyme dont le maximum d'activité se trouve à pH 6 est spécifique de la sénescence (Dimri et al, 1995). Toutefois, une étude a notamment montré que son induction est due en partie à l'expression de la protéine β -galactosidase lysosomale, et que l'activité de la SA- β -Gal ne semble pas être requise pour l'établissement de la sénescence (Lee et al, 2006). Malgré tout, cette enzyme reste un marqueur majeur de la sénescence.

E. Focis d'hétérochromatine et focis de dommages de l'ADN

La sénescence est la conséquence d'un stress qui est lié à des dommages de l'ADN, provoqués par un dysfonctionnement des télomères ou par de forts signaux mitogéniques induits par un oncogène. La détection des cassures de l'ADN renforce un phénotype de sénescence, et se fait principalement par l'intermédiaire de la phosphorylation de l'histone H2Ax, appelée alors γ H2Ax. En effet, une augmentation de cette forme phosphorylée est observée dans les cellules sénescents (Nakamura et al, 2008). Ces stress vont conduire à l'activation des voies de réponses aux dommages de l'ADN via p53 et p16Ink4, afin d'aboutir à un arrêt du cycle persistant.

La formation de focis d'hétérochromatine reste associée à la détection de l'activité de la SA- β -Gal pour déterminer un phénotype de sénescence. Ces focis sont représentatifs d'une accumulation d'hétérochromatine, sur laquelle les histones qui sont présentes subissent des modifications. Deux protéines chaperones HIRA (histone repressor A) et ASF1a (antisilencing fonction 1a) dirigent la formation des SAFH en augmentant la densité de nucléosomes présents sur la chromatine. Ce complexe HIRA/ASF1a interfère préférentiellement avec l'histone H3 au sein des nucléosomes afin de condenser la chromatine. Ensuite, l'histone H3 subit une triméthylation sur la lysine 9 (H3K9Me3), par exemple par la méthylase SUV39, ce qui va permettre le recrutement de la protéine HP1 γ (heterochromatin protein 1) phosphorylée sur la sérine 93. L'accumulation de la protéine HP1 γ n'intervient pas dans la condensation de la chromatine mais semble plutôt requis pour un maintien à long terme des SAHF et de l'état de sénescence. En association avec le recrutement du suppresseur de tumeur Rb qui permet la répression des gènes, les SAHF conduisent à l'extinction de l'expression des gènes, participant au processus de sénescence (figure 11) (Lachner et al, 2001; Nielsen et al, 2001; Zhang et al, 2007).

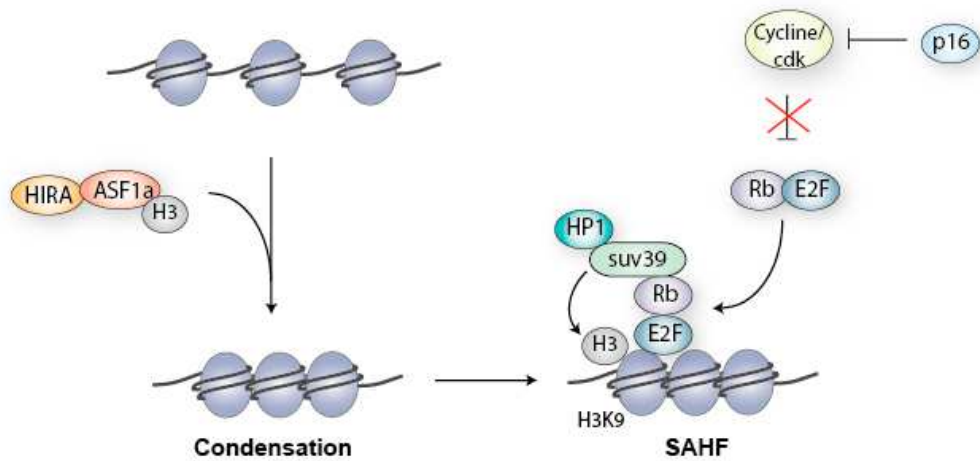


Figure 11 | Formation de foci d'hétérochromatine. Les protéines chaperones HIRA et ASF1 interagissent avec l'histone H3 afin de condenser la chromatine. L'histone H3 est méthylée sur la lysine 9 par la méthylase Suv39, entraînant le recrutement de HP1. L'activation en parallèle de Rb par p16 favorise la répression des gènes. Ces événements participent à la formation de foci d'hétérochromatine observés lors de la sénescence.

F. Phénotype sécrétoire (SASP)

Les cellules sénescentes sécrètent de nombreuses protéines qui ont été montrées comme étant impliquées dans l'induction et le maintien de la sénescence, constituant le phénotype sécrétoire associé à la sénescence ou SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype). Les composants du SASP agissent de manière autocrine et paracrine en étant capable d'induire la sénescence dans les cellules voisines. L'une des premières protéine sécrétée et identifiée pour avoir un rôle dans l'acquisition d'un phénotype de sénescence est le plasminogène 1 (PAI-1), un inhibiteur de la protéase uPA et un gène cible de p53. L'inhibition de PAI-1 conduit à l'expression de uPA, ce qui va favoriser l'induction de la voie de la PI3-K–Akt et la rétention nucléaire du gène pro-prolifératif cycline D1, et ainsi favoriser le passage en phase S et empêcher l'induction de la sénescence (Kortlever et al, 2006). Une autre étude a décrit la protéine IGFBP7 (Insulin-like growth factor (IGF) binding protein 7) comme étant essentielle pour la sénescence induite par l'oncogène B-Raf. Les cellules sénescentes présentent une importante sécrétion de ce facteur, qui semble en plus être suffisant pour induire la sénescence (Wajapeyee et al, 2008). En plus d'avoir une action autocrine, des facteurs comme l'IL6, l'IL8 et l'IL-1 peuvent induire la sénescence de manière paracrine. En réponse à l'oncogène B-Raf, les cellules sénescentes sécrètent de l'IL6. Cette production est due à la fixation de C/EBP sur le promoteur de l'IL6, et l'inhibition de l'IL6 bloque l'apparition de la sénescence (Kuilman et al, 2008). La métalloprotéinase MMP-3 a également été identifiée comme un médiateur de la sénescence depuis que son expression est amplifiée dans les fibroblastes en sénescence, intervenant principalement dans la morphologie et dans la

différentiation de la cellule épithéliale (Parrinello et al, 2005). Un autre exemple de facteurs sécrétés associés à la sénescence sont les récepteurs CXCR2 (CXC chemokine receptor 2) et PLA2R (Phospholipase A2 receptor). L'inhibition de CXCR2 atténue la sénescence et à l'inverse, l'expression de CXCR2 favorise la sécrétion d'interleukine-8 (IL-8) par les cellules sénescences – l'IL-8 étant un ligand de CXCR2 – renforçant ainsi la fonction pro-sénescence de CXCR2 (Acosta & Gil, 2009). De la même manière, l'inhibition de PLA2R prévient l'apparition de la sénescence, tandis que son expression induit la sénescence. PLA2R joue un rôle de régulateur de la sénescence via l'activation de la voie de signalisation de p53 (Augert et al, 2009).

Les interleukines 6 et 8 représentent les composants majeurs du SASP et sont les cytokines plus fortement exprimées. En comparaison, l'IL-1 est un composant mineur du SASP et est faiblement sécrété (Coppé et al, 2008). L'IL-1 a pour principale fonction d'induire l'expression de l'IL-6 et de l'IL-8 afin de réguler l'inflammation et la réponse immunitaire. Cette cytokine existe sous deux formes, α et β , qui se lient toutes deux au même récepteur IL-1R et exercent des fonctions similaires. Un troisième membre de la famille IL-1, IL-1ra (IL-1 receptor antagonist), a la particularité de se lier au récepteur IL-1R mais ne peut transmettre aucun signal, dans le seul but de prévenir la fixation de IL-1 α et IL-1 β (Fantuzzi, 2001). La surexpression de l'IL-1 α est caractéristique des cellules endothéliales en sénescence, contrairement à l'IL-1 β et l'IL-1ra dont l'expression ne varie pas. Cependant, ce mécanisme ne se généralise pas complètement puisque la sénescence des fibroblastes diploïdes est indépendante du niveau d'expression de l'IL-1 α . Dans les fibroblastes embryonnaires murins, la sénescence est au contraire corrélée à une induction de l'IL-1 β et l'IL-1ra (Maier et al, 1990; Mariotti et al, 2006).

En plus du rôle dans le maintien du phénotype de sénescence, le SASP peut favoriser l'activation de cellules immunitaires afin d'éliminer les cellules tumorales. Les fibroblastes en sénescence peuvent favoriser la sur-expression de molécules impliquées dans le recrutement et la différenciation de monocytes circulants au site tumoral. Une forte expression des molécules du SASP telles que l'IL-8 et MCP-1 entraîne la destruction tumorale. D'autres cellules du système immunitaire comme les lymphocytes B et T, les cellules NK ou les cellules dendritiques répondent aussi à certains facteurs du SASP sécrétés par les cellules sénescences (Coppé et al, 2010).

II. Oncogène Ras et sénescence

Un phénotype similaire à la sénescence répliquative a été observé suite à la sur-expression d'un oncogène. Les cellules normales forcées à exprimer un niveau d'expression élevé d'un oncogène arrêtent leur prolifération et subissent des changements morphologiques et moléculaires

comparables aux caractéristiques des cellules sénescents. Les suppresseurs de tumeur p16Ink4a et ARF sont retrouvés fortement exprimés lors d'un stress oncogénique, et sont décrits comme étant responsables de l'arrêt du cycle cellulaire dans ces cellules (Collado & Serrano, 2010). L'oncogène utilisé à l'origine pour la description de la sénescence induite par un oncogène (OIS) *in vitro* est H-RasV12. La forme autoactive de B-Raf, B-RafV600E conduit également à l'entrée en sénescence des cellules (Dankort et al, 2007). L'expression de N-RasG12D rend les cellules plus sensibles à la sénescence par l'activation de la voie Rb (Braig et al, 2005).

A. L'oncogène

Ras est une petite protéine G capable d'échange entre le GTP et le GDP, située sur la face interne de la membrane plasmique. Son activité est régulée par la liaison activatrice de GTP ou inhibitrice de GDP. Les « guanine nucleotide exchanges factors » (GEF) comme Sos catalysent le relargage de GDP alors que les « GTPase activating proteins » (GAP) catalysent l'hydrolyse du GTP (Colicelli, 2004). Lors de la liaison d'un facteur de croissance comme l'EGF sur son récepteur, ce dernier s'homodimérise et s'autophosphoryle. Le récepteur fixe alors le domaine SH2 de la protéine Grb2 qui peut par la suite recruter la protéine Sos sur son domaine SH3. Le rapprochement de Ras et Sos au niveau de la membrane induit un échange de GDP en GTP. Suite à cet échange, la protéine Ras active induit de nombreuses voies telles que la PI3K/Akt, conduisant à la fixation d'un facteur de transcription sur le promoteur des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, comme c-Fos qui permet la transcription du gène de la cycline D1, STAT3, ou encore NF- κ B (figure 12). L'activation combinée de Ras et de plusieurs facteurs de transcription va permettre la progression du cycle, la prolifération cellulaire, la synthèse protéique ou encore la survie. La famille des MAP Kinases par exemple représente un important groupe de protéines de signalisation activé par Ras et capable de réguler la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire, incluant la protéine kinase ERK, JNK et p38 MAPK. Une suractivation de cette voie de signalisation a été rapportée dans de nombreux cancers mettant ainsi en évidence son rôle dans la prolifération et la transformation cellulaire.

Il existe trois isoformes de Ras qui se retrouvent suractivées par mutation dans les tumeurs humaines : H-RAS, K-RAS et N-RAS. L'isoforme K-Ras est la plus exprimée, et les mutations activatrices les plus fréquentes dans le cancer colorectal touchent principalement les codons 12 et 13. Par exemple, RasG12V ne permet plus l'association de Ras aux GAP, entraînant une interaction constitutive avec des GTP, qui aboutit à une activation constitutive de Ras (Colicelli, 2004). De même, la mutation de H-Ras N116H induit une augmentation du taux d'échange de guanine entraînant une augmentation de son activité basale (Colicelli, 2004). La suractivation de Ras lors des

cancers n'est pas seulement due à des mutations, mais peut aussi provenir d'une augmentation de l'activité de récepteurs comme pour le cas de ERBB2 dans le cancer du sein et de EGFR1 dans les cancers colorectaux (Dempke & Heinemann, 2009; Gazdar, 2009).

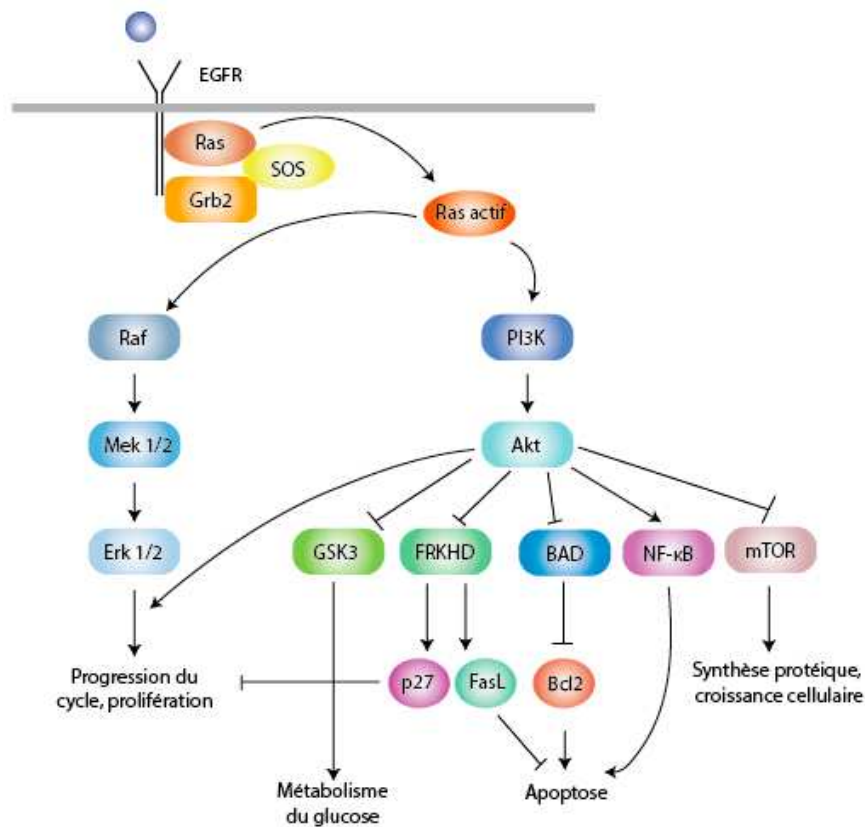


Figure 12 | Voie d'activation de la voie des MAPK et de la PI3K. À la suite d'un signal mitogénique reçu par un récepteur comme, par exemple l'EGFR, Ras lie un GTP permettant son activation. Ras interagit alors avec plusieurs effecteurs dont notamment la voie PI3K-Akt et la voie MAPK qui régulent entre autre la prolifération et l'apoptose.

B. Sénescence induite par Ras

L'oncogène Ras induit un arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en sénescence des cellules, et ceci en impliquant les protéines p53 et p16Ink4a (Serrano et al, 1997). En effet, l'expression de Ras est montrée comme pouvant induire l'activation de la voie Mek-Erk, intervenant dans la prolifération cellulaire. Cette voie conduit à une accumulation de p16 et à l'activation des kinases MKK3 et MKK6 responsables de l'activation de p38, permettant l'entrée en sénescence des cellules (Wang et al, 2002a). Par ailleurs, la signalisation de p38 a récemment été impliquée dans la sénescence médiée par le récepteur CXCR2, qui est surexprimé dans les cellules sénescents (Guo et al, 2013). Par l'activation de p16, les kinases CDK4 et CDK6 sont inhibées et Rb n'est pas hyperphosphorylée. Ras favorise alors un arrêt du cycle en phase G1 ainsi que la compaction de

l'ADN via Rb. Un second mécanisme par lequel Ras favorise l'entrée en sénescence est par l'expression de p53 via la voie de signalisation Raf/Mek/Erk à l'origine de l'expression de ARF (Palmero et al, 1998). L'expression de p19ARF permet d'inactiver HDM2 et de favoriser l'accumulation de p53. Par cette voie, Ras conduit à un arrêt du cycle par l'activation de p21 via p53. Toutefois, Ras est aussi capable d'induire l'expression de p21 indépendamment de p19ARF et p53. L'expression de H-RasV12 dans des cellules leucémiques K562 déficientes pour p16, p19ARF et p53, montre un retard de la croissance cellulaire via l'induction transcriptionnelle et protéique de l'expression de p21 (Delgado et al, 2000). De plus, l'inhibition de p21 affecte l'inhibition de la croissance induit par Ras, soulignant une voie supplémentaire d'arrêt du cycle médiée par Ras et indépendante de p16 et p19 (Delgado et al, 2000). Une étude menée au laboratoire dans un contexte où le suppresseur de tumeur p53 est muté – conduisant à son incapacité à se lier à l'ADN et ainsi à son inactivation – et où le locus de p16 est méthylé – inhibant son expression – a montré que l'oncogène Ras était capable de provoquer l'entrée en sénescence des cellules via l'expression de p21Waf1 dans des cellules colorectales (De Carne Trecesson et al, 2011). De plus, cette étude a montré que l'expression de p21 qui est indépendante de p53, est en partie régulée par la kinase de stress p38 et participe à la sénescence induite par Ras. En effet, p38 est impliquée dans la stabilisation de la protéine p21 mais n'intervient pas dans la transcription du gène. En l'absence de p53, plusieurs facteurs de transcriptions sont capables de se fixer sur le promoteur de p21 afin d'induire son expression. Parmi ces facteurs sont retrouvées les protéines SP1, SP3, AP2, C/EBP α , C/EBP β , CDX2, la famille STATs, la famille KLF (Abbas & Dutta, 2009). Par ailleurs, l'expression constitutive de H-Ras conduit à l'activation des voies de réponse aux dommages de l'ADN due à la forte pression de l'oncogène sur la prolifération cellulaire. En effet, l'oncogène force la progression du cycle cellulaire en exerçant une pression sur les fourches de réplication, ce qui cause l'apparition de dommages de l'ADN. Ainsi, l'inactivation des protéines de réparation de l'ADN telles que ATM ou Chk2 peut empêcher l'établissement de la sénescence induite par Ras (Di Micco et al, 2006).

En réponse à l'expression de Ras, il a également été montré que la cellule présentait une forte production de réactifs spécifiques de l'oxygène (ROS), reliée au phénotype de sénescence (Chen et al, 2004). Les ROS sont des espèces chimiques capables d'oxyder les protéines, l'ADN et les lipides. Leur production dans l'organisme est constante mais peut être fortement augmentée en réponse à différents stress environnementaux. La surproduction de ROS est toxique pour la cellule et peut causer des dommages importants. Ce phénomène est appelé stress oxydatif. Les ROS induits par Ras sont des produits normaux de l'activité mitochondriale, et sont également produits par les protéines NOX qui appartiennent à la famille des enzymes oxydases NADPH (Moiseeva et al, 2009) (Irani et al, 1997). De récentes études ont montré l'importance des protéines NOX1 et

NOX4 dans la voie de réponse à l'oncogène Ras (Weyemi et al, 2012; Kodama et al, 2013). Ces études montrent que suite à l'expression de Ras, NOX1 et NOX4 sont activées par la voie Raf/Mek/Erk et conduisent à une forte production de ROS. Cette génération de ROS entraîne l'activation des voies de réponse aux dommages de l'ADN responsable de l'activation de la voie de p16 et de la voie p53-p21, et l'activation de la kinase de stress p38, aboutissant à l'induction de la sénescence. La production de ROS peut donc entraîner des cassures de l'ADN et par conséquent activer la signalisation de réponse aux dommages de l'ADN via l'activation de p53. Les ROS conduisent alors à un arrêt du cycle qui peut favoriser l'entrée en sénescence des cellules ou encore être couplé à l'apoptose.

L'expression de Ras est aussi reliée à la sécrétion de chemokines qui peuvent renforcer le phénotype de sénescence. L'inhibition du récepteur CXCR2 diminue la réponse aux dommages de l'ADN en réponse à l'oncogène Ras et ainsi atténue l'induction de la sénescence, soulignant l'importance de ce récepteur. Lors de l'OIS, les facteurs de transcription tels que C/EBP β et NF- κ B sont capable d'induire l'expression de ligands qui vont amplifier l'activation de CXCR2, renforçant l'arrêt du cycle et l'établissement de la sénescence (Acosta et al, 2008).

III. Dérégulations de la sénescence et échappement

L'aboutissement de la sénescence étant un blocage de la prolifération cellulaire par un arrêt du cycle, et les stress à l'origine de l'entrée en sénescence étant reliés pour la plupart à la transformation tumorale, la sénescence apparaît naturellement comme un mécanisme de suppression tumorale qui prévient les cellules endommagées de la transformation.

A. Perte des gènes suppresseurs de tumeur

La perte de l'expression d'un gène suppresseur de tumeur peut conduire à un phénotype de sénescence. La perte de certains gènes suppresseurs de tumeur tels que PTEN, NF1 ou Rb entraînent l'activation constitutive d'oncogènes tels que la PI3-K, Ras et E2F, résultant en une prolifération excessive et à l'établissement de la sénescence. Notamment, l'inactivation de la phosphatase PTEN, un inhibiteur de la voie PI3-K/Akt, conduit à l'activation de p53 et à un arrêt du cycle via l'activation parallèle de la voie PI3-K/Akt (Kim et al, 2007). A l'inverse, d'autres suppresseurs de tumeur comme p16Ink4a, ARF ou encore p53 interviennent dans la progression tumorale par l'intermédiaire d'une altération de la sénescence (Collado & Serrano, 2010). Tandis

que p53 est sujet à des mutations qui affectent sa liaison à l'ADN et conduisent à une perte de son activité, le locus INK4/ARF/INK4b est quant à lui sujet à la méthylation des ilots CpG, aboutissant à l'inactivation du gène. Ce locus fait partie des sites les plus fréquemment inhibés dans les cancers humains, entraînant la perte d'expression d'une des trois protéines, p16Ink4a, p15Ink4b, ou ARF, ou des trois protéines simultanément (Sharpless, 2005). Par ailleurs, la simple inactivation de p53 ou de Rb est suffisante pour augmenter considérablement la sensibilité des organismes murins ou humains à développer des cancers (Ohtani et al, 2004; Rodier et al, 2007).

B. Sénescence et pathologies liées à l'âge

Le lien entre la sénescence et le vieillissement se fait principalement par le raccourcissement des télomères. En effet, les télomères sont petit à petit réduits lors de la division cellulaire, donc plus les cellules accumulent de division et plus les télomères se raccourcissent. D'autre part, les télomères sont des régions sensibles à l'oxydation, démontrant un rôle du stress oxydatif dans l'induction de la sénescence (Zglinicki, 2000). De plus, l'activité de la télomérase responsable du maintien de la longueur de ces télomères est affaiblie au fur et à mesure du vieillissement. Ces faits sont appuyés par les modèles murins pour lesquels le raccourcissement des télomères provoqué par une déficience de la télomérase, conduit à un vieillissement prématuré sur plusieurs générations de souris (Blasco, 2005). Ces événements conduisent au final à l'accumulation de dommages de l'ADN et à l'établissement de la sénescence répliquative. La sénescence a été identifiée dans de nombreux cas de pathologies liées à l'âge. L'accumulation des cellules souches sénescentes contribue à la perte de la capacité à réparer et régénérer les tissus caractéristiques des organismes qui vieillissent (Campisi, 2011). D'autre part, les facteurs sécrétés par les cellules sénescentes peuvent favoriser la prolifération des cellules pré-malignes voisines, conférant à la sénescence la capacité de faciliter le développement tumoral dans les organismes vieillissant (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). La sénescence peut donc être bénéfique en stoppant la division de cellules âgées à risque, mais peut être aussi délétère par une accumulation de cellules sénescentes qui ne se divisent pas ce qui peut diminuer le potentiel réparateur et régénérateur.

C. Sénescence et autophagie

Pour induire la sénescence, nous avons vu que l'oncogène Ras a également recours à une augmentation de la production de ROS soit par l'enzyme oxydase NADPH, soit par la mitochondrie (Irani et al, 1997; Moiseeva et al, 2009). L'autophagie intervient en réponse au stress et est notamment un moyen de réguler la production de ROS, établissant un lien entre ce processus et la sénescence. Le rôle de l'autophagie est controversé mais ce phénomène de dégradation et de

recyclage est toutefois considéré comme un mécanisme suppresseur de tumeur, qui peut être induit au cours de la sénescence pour faciliter la mise en place du phénotype (White & Lowe, 2009). Dans ce cas, l'autophagie permet un rapide renouvellement des protéines et facilite ainsi la traduction des protéines fortement nécessaires à l'établissement de la sénescence induite par l'oncogène (Young & Narita, 2010). En effet, les auteurs montrent que durant la transformation par Ras, les cellules expriment les gènes ATGs impliqués dans l'induction de l'autophagie et que cette activation de l'autophagie se produit avant l'établissement du phénotype de sénescence. Dans ces conditions, l'inhibition de gènes de l'autophagie tels que ATG5 et ATG7 retarde la production d'IL6 et d'IL8 et détourne fortement l'entrée en sénescence des cellules. L'augmentation de l'expression des gènes de l'autophagie tels que Beclin1 ou ATG5 suite à Ras est décrit dans plusieurs études, soulignant l'importance de l'autophagie dans la réponse à l'oncogène (Elgendy et al, 2011; Byun et al, 2009). En outre, l'autophagie peut aussi être inhibée par l'oncogène. L'expression de Beclin1 peut être réprimée par Ras, et cette régulation de Beclin1 est nécessaire à la transformation maligne de cellules épithéliales intestinales en favorisant la prolifération (Yoo et al, 2010). L'autophagie est principalement connectée à la sénescence grâce à ses fonctions de recyclage protéique et de survie cellulaire qui seront détaillées dans le chapitre suivant.

D. Sénescence et croissance tumorale

La croissance tumorale nécessite à la fois l'inhibition des voies de mort cellulaire et l'augmentation des voies de prolifération. L'inflammation est une réaction qui peut contrôler ces deux mécanismes et qui est capable d'alimenter les pathologies telles que les cancers. Le SASP contribue ainsi à la croissance tumorale en stimulant l'inflammation et la propagation du signal. Parmi les facteurs du SASP contribuant à la promotion tumorale est retrouvée l'amphireguline (AREG), une protéine membre de la famille de l'EGF qui est notamment régulée par l'AGR2 pour favoriser la prolifération (Dong et al, 2011). Les ligands appartenant à la famille des CXC (motif C-X-C) jouent un rôle dans la prolifération et l'inflammation via le récepteur CXCR2 (CXC receptor 2). Les interleukines 6 et 8 favorisent quant à elles la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT, epithelial-to-mesenchymal transition) ainsi que la migration et l'invasion cellulaire. Les métalloprotéases interviennent également dans les phénomènes de migration et d'invasion cellulaire en plus du remodelage tissulaire. Le VEGF (Vascular endothelial growth factor) a la capacité de conférer aux cellules sénescentes un pouvoir angiogénique (Campisi, 2011; Coppé et al, 2008).

L'EMT est notamment très importante puisqu'elle va permettre de stimuler l'invasion au travers de la membrane basale afin de coloniser un autre site. L'EMT se traduit par l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux d'une cellule à l'origine épithéliale située au sein de la tumeur, ce

qui va lui permettre d'accroître sa mobilité, de se détacher du groupe de cellules, de traverser la membrane basale et de migrer vers le réseaux sanguin. La cellule peut ensuite subir une MET (Mesenchymal-to-epithelial transition) afin de retrouver des propriétés d'adhésion cellulaire et de coloniser un autre site. L'EMT est aussi assimilée à l'acquisition de propriétés de cellules souches par les cellules cancéreuses et est synonyme de résistance (Mani et al, 2008). Le SASP est donc capable de promouvoir l'émergence de cellules souches cancéreuses au sein du micro-environnement de la tumeur (Cahu et al, 2012). Ainsi, au sein d'une même tumeur, le SASP sécrété par les cellules sénescents favorise l'apparition de cellules souches cancéreuses et facilite leur migration, contribuant à la tumorigénèse.

Par le biais de tous ces mécanismes, les cellules sénescents provoquent l'émergence de cellules cancéreuses voisines au travers du SASP. La perte d'oncogènes ou de suppresseurs de tumeur est capable d'amplifier ce phénomène. Par exemple, la perte de p53 ajoutée à la sur-expression de Ras aboutit à une amplification du SASP et permet une plus forte invasion des cellules voisines (Coppé et al, 2008). D'autre part, des facteurs du SASP comme l'IL-6 ou l'IL-1 peuvent en plus de leur rôles dans l'induction de la sénescence, être à l'origine de l'activation de facteurs de transcription impliqués dans la tumorigénèse. Notamment, en réponse à ces deux cytokines, la sous-unité p65 de NF- κ B interagit avec STAT3 pour induire la transcription de gènes communs (Hagihara et al, 2005). NF- κ B peut à son tour induire la transcription de l'IL-6 et ainsi entraîner de manière paracrine l'activation de STAT3 et son interaction avec celui-ci (Bollrath & Greten, 2009; Lee et al, 2009). Cette production d'IL-6 par NF- κ B stimule la prolifération et la survie des cellules épithéliales intestinales pré-malignes également médiées par STAT3 (Grivennikov et al, 2009). Ces données montrent un rôle important de la voie NF- κ B–IL-6–STAT3 dans la tumorigénèse.

E. Dérégulation de p21 dans l'échappement à la sénescence

La sénescence n'est pas un mécanisme infallible, et des évènements tels que la perte d'un suppresseur de tumeur comme p53, p16 et p14 conduisent à une altération de la sénescence à la progression tumorale. Par ailleurs, l'inactivation de p21 par recombinaison homologue est suffisante pour échapper à la sénescence dans des fibroblastes humains diploïdes (Brown et al, 1997). Couplée à la perte de p53, la perte de l'expression de p21, le plus souvent par régulation transcriptionnelle, est un évènement important dans la diminution du phénotype de sénescence. Une étude menée au laboratoire dans un contexte où le suppresseur de tumeur p53 est muté conduisant à son incapacité à se lier à l'ADN et ainsi à son inactivation, et où le locus de p16 est méthylé inhibant son expression, a montré que l'oncogène Ras était tout de même capable de

provoquer l'entrée en sénescence des cellules via l'expression de p21Waf1. Dans ce cas, l'expression de p21 est donc indépendante de p53 et de p16, et est en partie régulée par la kinase de stress p38 (De Carne Trecesson et al, 2011). Toutefois, cette étude démontre également que la perte de l'expression de p21 participe à l'échappement à la sénescence induite par Ras, et que la conséquence de cette inactivation était la restauration de l'expression des gènes du cycle Cdc25A et Plk1. De plus, ces cellules qui inactivent p21 sont dépendantes de l'expression de Bcl-xL et MCL1 ce qui leur permet d'échapper à l'OIS, les cellules reprennent alors une prolifération et augmentent leurs propriétés d'invasions.

En plus de p53, de nombreux autres facteurs tels que Sp1, Smads, STATs, BRCA1 ou encore E2F-1 sont connus pour activer la transcription de p21, impliquant p21 dans différents processus cellulaires : réponse aux dommages de l'ADN, différenciation, sénescence, apoptose médiée par p53 (Gartel & Radhakrishnan, 2005). Toutefois, la stabilisation post-traductionnelle de p21 a aussi son importance. La protéine Wisp39 (Waf1/Cip1 stabilizing protein 39) intervient dans la régulation de p21 en favorisant la stabilisation de la protéine. Wisp39 recrute et s'associe avec la protéine chaperone Hsp90, formant un complexe trimérique avec p21. Cette association prévient la dégradation de p21 par le protéasome et stabilise la protéine. A l'inverse, la protéine F-box Skp2 (S-phase kinase-associated protein 2) qui fait partie du complexe SCF (Skp-cullin F-box) est impliquée dans la dégradation des inhibiteurs du cycle p21 et p27. Skp2 s'associe à p21 et est responsable du recrutement de complexe SCF. p21 est alors ubiquitinylée, ce qui va cibler la protéine pour la dégradation par le protéasome (Frescas & Pagano, 2008). Skp2 reconnaît p21 lorsque celle-ci est phosphorylée. En effet, la phosphorylation de p21 intervient également dans sa régulation. Plusieurs sites de phosphorylation de p21 sont décrits, la phosphorylation sur la thréonine 145 étant la plus documentée. La kinase AKT phosphoryle p21 sur ce résidu conduisant à la perte de l'interaction de p21 avec un modulateur de son expression, PCNA, et à la stabilisation de p21 (Li et al, 2002). La phosphorylation de p21 sur la thréonine 145 intervient également dans l'interruption de l'interaction p21/PCNA et à la stabilisation de la protéine (Wang et al, 2010). La phosphorylation de p21 sur la sérine 130 par p38 ou JNK est également responsable de la stabilisation de la protéine (Kim et al, 2002). Ces phosphorylations offrent un autre moyen de contrôler la fonction de p21 qui est sujette à des dérégulations dans les tumeurs.

La sénescence constitue donc un événement majeur décisif dans la croissance cellulaire. Elle peut être anti-tumorale en entraînant un arrêt du cycle cellulaire, ou tout aussi bien pro-tumoral en favorisant l'émergence de cellules cancéreuses. L'autophagie qui est un mécanisme de dégradation cellulaire, est un pré-requis pour l'entrée des cellules en sénescence. Toutefois, le rôle de l'autophagie est également controversé. En effet, ce mécanisme peut être utilisé dans certains cas

par la cellule cancéreuse afin de promouvoir sa survie. Nous allons détailler l'autophagie et ses différentes fonctions dans le chapitre suivant.

Chapitre 3

Mécanisme de l'autophagie

Le terme d'autophagie provient du grec et signifie manger « phagos » soi-même « auto ». L'autophagie est un processus catabolique qui implique la dégradation des propres composants de la cellule via la machinerie lysosomale. L'autophagie est le principal mécanisme de la cellule pour dégrader les protéines et la seule voie connue pour dégrader les organelles (Yorimitsu & Klionsky, 2005). C'est un processus hautement régulé qui intervient notamment dans la croissance cellulaire et le développement, en aidant au maintien de la balance entre la synthèse, la dégradation et le recyclage des produits cellulaires. C'est l'un des principaux mécanismes par lequel la cellule, en absence de nutriments, redistribue des nutriments provenant de processus non nécessaires vers des processus plus importants (Wang & Levine, 2010). Deux fonctions principales sont décrites pour ce mécanisme. Premièrement, l'autophagie est une réponse au stress à court terme, dans des conditions de limitation de nutriments ou de déficience en acides aminés. La dégradation par la cellule de ses propres composants cytoplasmiques dans les lysosomes fournit les métabolites de base afin de générer de l'énergie (production d'ATP), et permet le maintien de la synthèse de protéines vitales (Rabinowitz & White, 2010). Deuxièmement, l'autophagie peut intervenir dans la mise en place de mécanismes suppresseurs de tumeur. En effet, l'autophagie joue un rôle primordial dans l'établissement de la sénescence mise en place lors d'un stress oncogénique (Young et al, 2009).

I. Plusieurs formes d'autophagie

L'autophagie se divise selon trois voies intracellulaires majeures au sein des cellules eucaryotes, la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (Chaperone-mediated autophagy, CMA). Ces trois voies ont en commun une dégradation lysosomale, cependant l'adressage du cargot au lysosome se fait de manière différente. Le recyclage se fait soit par l'intermédiaire d'une vésicule, soit par des protéines chaperonnes ou encore par le contact direct du lysosome avec le cytoplasme. La macroautophagie nécessite le passage par une vésicule appelée autophagosome, qui va fusionner avec le lysosome, délivrant son contenu et conduisant à la dégradation du cargo (Klionsky & Ohsumi, 1999). La microautophagie quant à elle, implique l'engouffrement direct du cytoplasme à la surface du lysosome par invagination de la membrane du lysosome (Klionsky, 2005). A l'inverse, la CMA transporte les protéines qui présentent une séquence spécifique normalement cachée directement à travers la membrane du lysosome (Massey et al, 2004).

Par la suite, nous nous limiterons à la description de la macroautophagie, la principale voie inductible de recyclage de composants cytoplasmiques, que nous appellerons autophagie.

II. Les différentes étapes de l'autophagie

L'autophagie débute avec une étape d'initiation au PAS (Phagophore assembly site) où les acteurs de l'autophagie tels que VMP1, mATG9, TRP53IN2 et le complexe PI3-K, sont recrutés suite à l'activation du complexe ULK. Les organelles intactes et les portions de cytosol sont ensuite ciblées puis séquestrées à l'intérieur d'une vésicule à double membrane appelée autophagosome. Pour devenir mature, l'autophagosome fusionne avec un lysosome afin de former une structure nommée autophagolysosome ou autophagosome. Cette dernière étape expose le cargo aux hydrolases provenant du lysosome pour permettre la dégradation de la membrane de l'autophagosome. Les lysosomes contiennent également des enzymes digestives pour digérer les macromolécules dont les lipases, les glycosides hydrolases, les protéases et les nucléases. Ces lysosomes sont formés à partir de l'appareil de Golgi et maintiennent un pH compris entre 3,5 et 5, nécessaire au bon fonctionnement des enzymes qu'ils contiennent. Les métabolites de base ainsi formés sont transportés vers le cytosol pour la réutilisation (figure 13).

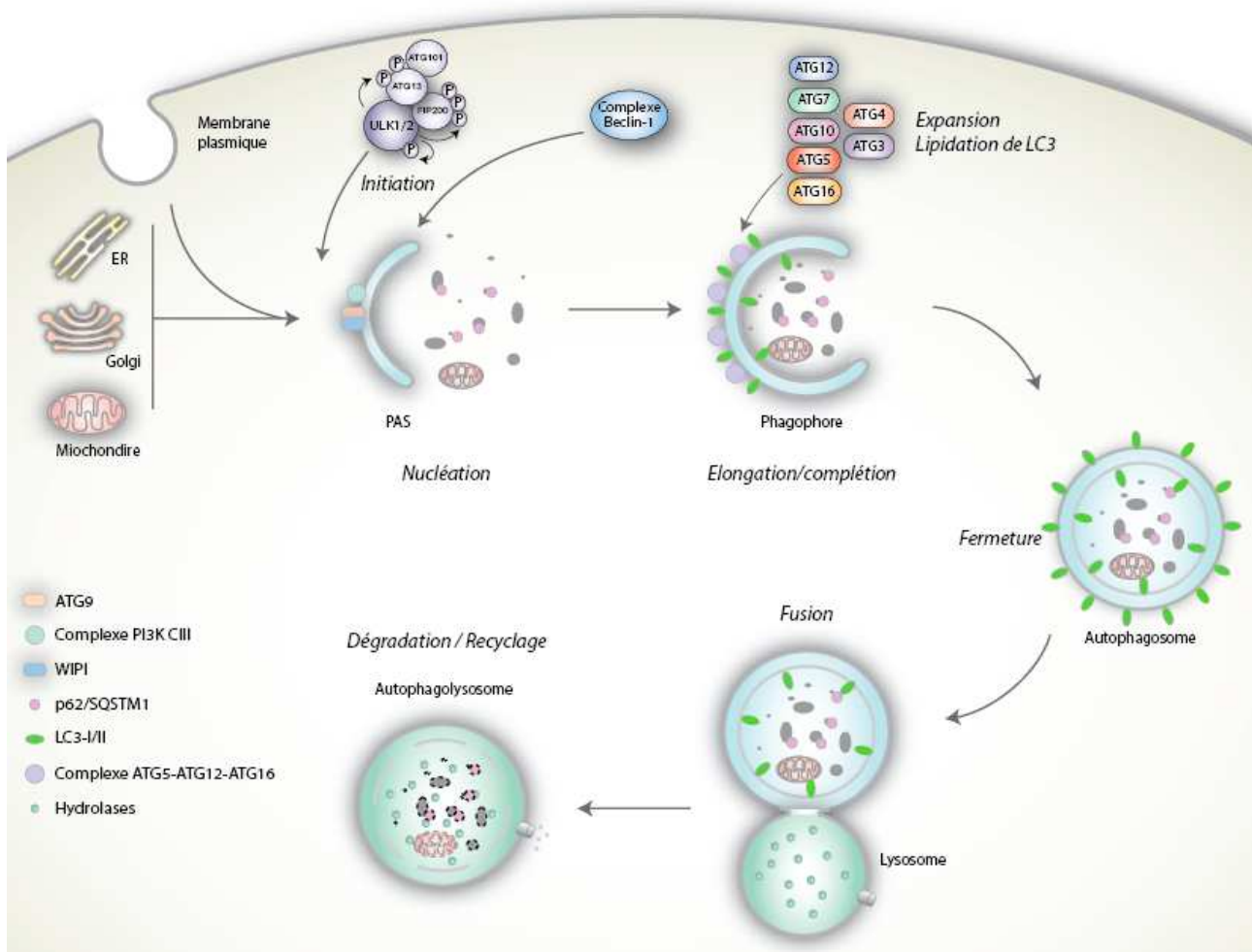


Figure 13 | Macro-autophagie. L'autophagie se divise en différentes étapes incluant l'initiation et la nucléation du PAS (Phagophore assembly site), l'élongation et l'expansion du phagophore, la fermeture de l'autophagosome, et la fusion avec le lysosome pour permettre la dégradation de la membrane de l'autophagosome et du cargo, ainsi que le recyclage des métabolites de base formés.

Alors que la morphologie de l'autophagie a été à l'origine caractérisée chez les cellules de mammifères, les composants moléculaires de l'autophagie ont été, pour la plupart, initialement décrits chez la Levure (Suzuki & Ohsumi, 2007). Les gènes qui sont requis pour l'autophagie ont été découverts à l'origine chez des mutants de levure *Saccharomyces cerevisiae*, et sont nommés ATG pour Autophagy-related genes (Klionsky et al, 2003). Il en existe une trentaine codant pour des protéines nécessaires à l'induction de l'autophagie, à la génération, et à la maturation des autophagosomes (Suzuki & Ohsumi, 2007). Ces protéines constituent trois groupes fonctionnels, dont un complexe de protéines sérine/thréonine kinases notamment régulées par la kinase TOR (ULK1/2, ATG13, ATG101), un complexe de signalisation lipide kinase qui participe à la nucléation vésiculaire, et deux voies de conjugaison de type ubiquitine qui participent à l'expansion vésiculaire (Yorimitsu & Klionsky, 2005)(table 2).

Fonction	Protéines impliquées
Initiation	ULK1, ULK2, ATG13, ATG101
Nucléation vésiculaire	Vsp15, PI3-K III, Vsp34, Beclin 1/ATG6, ATG9, UVRAG, Bif-1
Expansion et fermeture	ATG3, ATG4, ATG5, ATG7, LC3/ATG8, ATG10, ATG12, ATG9

Table 2 | Principales protéines impliquées dans le processus d'autophagie

A. Régulation de l'autophagie

1. Protéine kinase TOR

Un des composants majeurs qui régule l'autophagie est la protéine kinase TOR (« Target of rapamycin »). TOR est une protéine kinase sérine/thréonine hautement conservée qui agit en tant que capteur central des facteurs de croissance, des signaux nutritifs et du statut énergétique (Schmelzle & Hall, 2000). TOR existe en deux complexes distincts, TORC1 et TORC2 (mTORC1 et mTORC2 chez le mammifère). TORC1 a une fonction primaire dans l'induction de l'autophagie. Sous des conditions riches en nutriments, la protéine mTORC1 est associée aux complexes ULK, et phosphoryle les membres de ce complexe. Lors d'une inactivation de mTORC1 par privation de nutriments, mTORC1 se dissocie des complexes, conduisant à l'activation de toute la machinerie de l'autophagie (Alers et al, 2012).

TORC1 intègre des signaux qui inhibent l'autophagie via la voie de la protéine PI3-K kinase B de classe I (PKB, ou Akt). Sous l'association avec des facteurs de croissance, les récepteurs à

tyrosine kinases s'autophosphorylent et deviennent actifs, conduisant à l'activation de deux composants clés dans la transduction du signal : Ras et la PI3-K de classe I. La PI3-K de classe I catalyse la production de PI(3, 4, 5)P₃ à la membrane plasmique, ce qui augmente le recrutement à la membrane de Akt permettant son activation. L'activation de la voie Akt-PI3-K supprime l'autophagie dans les cellules de mammifère. L'activation de la PI3-K de classe I peut être opposée à PTEN, puisque cette dernière est une phosphatase qui diminue l'activité d'Akt en déphosphorylant le PI(3, 4, 5)P₃, favorisant l'activation de l'autophagie (Arico et al, 2001). Ras a des rôles opposés dans la régulation de l'autophagie, puisqu'il inhibe à la fois l'autophagie via mTORC1 en activant la voie PI3-K-Akt-mTORC1, et active l'autophagie via mTORC2 par la voie Raf-1- MEK1/2-ERK1/2. Par ailleurs, le complexe mTORC1 phosphoryle ULK1, et mTORC2 phosphoryle Foxo3a responsable de l'expression de Beclin 1 et de LC3-I, qui représentent des effecteurs de l'autophagie. Récemment, il a en plus été montré que Akt pouvait directement réguler l'autophagie en venant phosphoryler Beclin 1 (Wang et al, 2012).

2. Complexes ULK

La famille des kinases ULKs (unc-51-like kinases) joue un rôle clé dans l'induction de l'autophagie. Trois kinases, ULK1, 2 et 3 (ou ATG1, 2 et 3), ont été jusqu'à présent montrées comme impliquées dans la régulation de l'autophagie chez les mammifères, et présentent des rôles différents *in vivo*. ULK1 et ULK2 sont associées à un complexe impliquant ATG13, ATG101, et la protéine scaffold FIP200 (Hosokawa et al, 2009; Hara et al, 2008). Sous des conditions riches en nutriments, le complexe ULK est associé à mTORC1 et inversement, lors d'une privation nutritive mTORC1 est rapidement dissociée du complexe ULK (figure 14). Plusieurs phosphorylations sont associées à ces événements. Dans des conditions riches en nutriments, la protéine mTORC1 activée est associée au complexe ULK composé de ULK1, ULK2, ATG13, FIP200 et ATG101. Cette interaction permet à mTORC1 d'induire la phosphorylation de ULK1/2 et l'hyperphosphorylation de ATG13, conduisant à l'inhibition de l'activité de la kinase ULK1/2. Cette dernière participe tout de même à son autophosphorylation, et à la phosphorylation de ATG13 et FIP200. Ces événements conduisent au final à un blocage de l'autophagie. Lors d'une privation de nutriments, mTORC1 n'est plus active et est dissociée du complexe ULK, prévenant la phosphorylation de ULK1/2 et ATG13. Le complexe ULK1/2 n'est plus inhibé et entraîne une hyperphosphorylation de FIP200, conduisant à l'induction de l'autophagie (Chen & Klionsky, 2010). L'activation du complexe ULK est le signal de lancement de l'étape d'initiation, qui permet le recrutement des effecteurs de l'autophagie sur la double membrane nouvellement formée. La kinase ULK3 intervient quant à elle un peu plus tard lors de la réaction de conjugaison de LC3 à la membrane de

l'autophagosome.

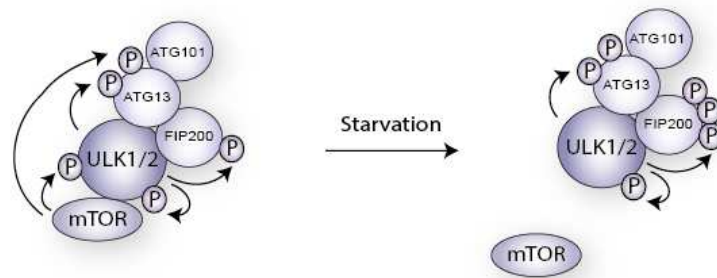


Figure 14| Activation du complexe ULK. Lors d'une privation de nutriments, le complexe mTOR se dissocie du complexe ULK1. Cet événement conduit à l'activation du complexe ULK1 et à l'initiation de l'autophagie (Chen & Klionsky, 2010).

3. Voie AMPK

La protéine kinase AMPK représente un autre capteur de l'énergie cellulaire, spécifiquement en réponse au stress énergétique. Au cours de l'épuisement de nutriments et d'énergie, AMPK est activée par une diminution du ratio ATP/AMP en amont de la sérine/thréonine kinase LKB1. L'activation de AMPK conduit à une inhibition de l'activité de mTORC1. Dans des conditions de stress, la voie LKB1-AMPK phosphoryle et stabilise p27kip1, un inhibiteur du cycle cellulaire, la stabilisation de p27kip1 induisant l'autophagie (Liang et al, 2007). L'inhibiteur des Cdks p27kip1 fait parti de la famille Cip/Kip au même titre que p21, et inhibe les complexes cycline/Cdk, provoquant un arrêt du cycle. Skp2 (S-phase kinase-associated protein 2), une protéine F-box, peut fonctionner comme un élément récepteur du complexe ubiquitine ligase SCF (skp1/Cul1/F-box), qui régule l'ubiquitinylation de p27kip1 et ainsi sa dégradation par le protéasome. Cependant, Skp2 a également d'autres fonctions et peut supprimer l'activité de p53 en inhibant le coactivateur p300. Par la régulation de p27kip1, Skp2 peut fonctionner comme un régulateur de l'autophagie (Chen et al, 2008). Cette voie est nouvelle et peu connue, cependant une étude récente a montré que NF-κB est capable d'inhiber Skp2 conduisant à la stabilisation de p27kip1 et à l'induction de l'autophagie lors de dommages de l'ADN (Barré & Perkins, 2010a).

4. Autres régulations

Les sirtuins sont une famille de déacétylases NAD-dépendantes dont la fonction a été reliée à une augmentation de la durée de vie. En particulier, l'augmentation de l'expression de la déacétylase Sirtuin 1 (Sirt1) lors d'une restriction calorique a pour effet d'atténuer l'apoptose médiée par Bax et de favoriser la survie cellulaire (Cohen et al, 2004). L'expression de Sirt1 est également augmentée en réponse à une carence, suggérant un rôle de cette déacétylase dans des

conditions de stress nutritif (Nemoto et al, 2004). Cette induction de la survie par Sirt1 se fait en partie par la régulation de l'autophagie. Sirt1 est en effet capable d'induire l'autophagie par la déacétylation des gènes ATG5, ATG7 et ATG8. La suppression de Sirt1 résulte en une acétylation importante de ces gènes d'autophagie conduisant à une inhibition de l'autophagie. Les souris Sirt1^{-/-} présentent un défaut d'autophagie notamment associé à une accumulation d'organelles endommagées (Lee et al, 2008). Finalement, suite à une privation en nutriments, Sirt1 utilise l'induction de l'autophagie pour augmenter la résistance au stress et favoriser la survie, ce qui au final conduit à une augmentation de la durée de vie (Morselli et al, 2010).

D'autres protéines comme certains facteurs de transcription influent sur le niveau d'autophagie. Le facteur de transcription FOXO3a est une cible de la voie Akt qui intervient dans l'expression de gènes ATGs tels que LC3 et Beclin1 (Mammucari et al, 2007). Il agit également sur le niveau de glutamine afin d'inhiber mTOR et de conduire à l'activation de l'autophagie (van der Vos et al, 2012). Les facteurs de transcription NF- κ B interviennent aussi dans la régulation de l'autophagie, et sont décrits à la fois comme des activateurs et des répresseurs de ce processus. L'activation de la kinase IKK est essentielle dans l'induction de l'autophagie induite par carence puisque son inhibition suffit à prévenir l'induction de l'autophagie. IKK favorise l'induction de l'autophagie par l'activation de la voie d'activation classique de NF- κ B incluant p65. Cependant, l'inhibition de p65 ne supprime pas l'autophagie. Pour induire l'autophagie, IKK n'active pas uniquement p65 mais conduit aussi à la phosphorylation de AMPK et de JNK1 (Criollo et al, 2010). Toutefois, la sous-unité p65 contribue à la stimulation de l'autophagie par la régulation de l'expression de Beclin-1 (Copetti et al, 2009). A l'inverse, les cellules qui n'ont plus d'autophagie échouent à activer NF- κ B, supportant l'idée d'un rétrocontrôle entre l'autophagie et NF- κ B (Criollo et al, 2012). D'autre part, l'activation de p65 peut contribuer à l'inhibition de l'autophagie en réponse au TNF α . En effet, l'inactivation de p65 dans des cellules de sarcomes ou des cellules du sein traitées au TNF α suffit à augmenter l'autophagie (Djavaheri-Mergny et al, 2006). Le facteur de transcription STAT3, sous une forme non-phosphorylée et cytoplasmique, est quant à lui un inhibiteur de l'autophagie. STAT3 interagit avec la kinase PKR (Protein Kinase R) et empêche celle-ci de phosphoryler eIF2 α . Lorsqu'elle est phosphorylée, la protéine eIF2 α conduit indirectement à la transcription de gènes de l'autophagie tels que ATG3, LC3 ou encore p62. Cependant cette voie par laquelle eIF2 α entraîne l'induction de l'autophagie reste encore peu connue (B'chir et al, 2013). Toutefois, l'interaction entre STAT3 et la kinase PKR a pour conséquence de titrer cette dernière et d'inhiber la phosphorylation de eIF2 α , empêchant l'activation de l'autophagie (Shen et al, 2012).

B. Initiation

1. Complexes PI3-Kinase

La macroautophagie est initiée par la formation d'une membrane d'isolation appelée structure pré-autophagosomale (PAS) ou phagophore. L'origine de cette membrane qui forme l'autophagosome reste encore inconnue. Plusieurs sources ont été suggérées pour cette membrane incluant le réticulum endoplasmique (Ylä-Anttila et al, 2009), la mitochondrie (Hailey et al, 2010) et la membrane plasmique (Ravikumar et al, 2010). Les membranes des autophagosomes sont relativement pauvres protéiquement (Fengsrud et al, 2000). A l'origine, l'hypothèse était que le PAS provenait d'une synthèse *de novo* dans le cytosol (Strømhaug et al, 1998). Cependant des marqueurs du réticulum endoplasmique et de l'appareil de golgi ont été retrouvés dans les phagophores, supportant la notion de sources organiques concernant l'origine du PAS (Orsi et al, 2010). La fonction du PAS est cependant largement établie. Cette structure pré-autophagosomale supporte le rôle de plateforme de recrutement afin de rassembler les protéines et les lipides requis pour la formation de l'autophagosome.

Chez le mammifère, le complexe phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) existe en trois classes dont deux ont un rôle dans l'autophagie : la classe I et III. La classe I inhibe l'autophagie tandis que la classe III l'active, créant une compétition entre les deux complexes. Le complexe PI3-K de classe I catalyse la production de phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate ou PI(3, 4, 5)-P₃, et conduit à l'inhibition de l'autophagie par l'activation de Akt qui induit l'activation de mTOR (Shintani & Klionsky, 2004). Le complexe PI3-K de classe III est constitué d'une sous-unité catalytique hVps34, de Beclin1 (ou ATG6), et d'une sous-unité régulatrice p150 (Itakura et al, 2008). Ce complexe produit du phosphatidylinositol (3)-phosphate ou PI(3)-P, ce qui stimule l'autophagie par le recrutement de protéines possédant les motifs FYVE ou PX au site de biogenèse de l'autophagosome. Les protéines DFCP1 (Double FYVE Domain containing protein 1) et WIPI (WD-40 repeat containing protein) reconnaissent et se fixent aux PI(3)P, participant à l'isolation de la membrane constituant le PAS à partir de la membrane plasmique de l'appareil de golgi, de la mitochondrie ou du réticulum endoplasmique (Tooze & Yoshimori, 2010). La formation des autophagosomes peut être affectée par trois inhibiteurs de la PI3-K de classe III, la wortmannin, le LY294002 et par le 3-méthyladénine (3-MA) (Seglen & Gordon, 1982). D'autre part, il a été montré que la PI3-K de classe III est nécessaire à la signalisation de mTOR induite par une carence en acides aminés (Byfield et al, 2005; Nobukuni et al, 2005).

Deux autres protéines nommées ATG14-like (ATG14L ou Barkor) et UVRAG (ultraviolet irradiation resistance-associated gene) font parties du complexe PI3-K de classe III (Itakura & Mizushima, 2009). UVRAG intervient dans la régulation de l'autophagie en entrant en compétition

avec ATG14L pour la liaison à Beclin1 (Zhong et al, 2009). UVRAG interagit également avec Bif-1 (Bax-interacting factor 1), qui est nécessaire à l'induction de l'autophagie et est co-localisée avec ATG5, LC3 et mATG9 au cours de la privation de nutriments (Takahashi et al, 2007; 2011). En plus de hVps34, ATG14L et UVRAG, Beclin1 interagit aussi avec Ambra1 (activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy), un régulateur positif de l'autophagie (He & Levine, 2010) (Figure 15). De plus, Bif-1 est une protéine associée au contrôle de la courbure de membrane qui a aussi été identifiée comme un partenaire du complexe PI3-K de classe III nécessaire à l'activation de ce complexe et à la formation de l'autophagosome (Takahashi et al, 2007), ce qui conforte un rôle de ce complexe dans la régulation des dynamiques membranaires au cours de l'autophagie.

La famille des protéines Bcl-2 joue un double rôle dans la régulation de l'autophagie. Les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-xL sont capables d'inhiber l'autophagie, tandis que les protéines à un seul domaine BH-3 pro-apoptotique comme BNIP3 peuvent induire l'autophagie. La liaison de Bcl-2 à Beclin1 empêche l'association entre Beclin1 et hVps34, diminuant l'activation de la PI3-K de classe III et aboutissant à l'inhibition de l'autophagie (Maiuri et al, 2007; He & Levine, 2010). En revanche, l'induction de BNIP3 dans des conditions de stress libère Beclin1 en titrant Bcl-2, résultant en une activation de l'autophagie (Bellot et al, 2009). En réponse à une carence, la protéine Bcl-2 se retrouve phosphorylée sur de multiples résidus, provoquant sa dissociation de Beclin-1 et l'activation de l'autophagie. En réponse au stress, la famille des kinases JNK (c-Jun N-terminal protein kinase) se retrouve notamment activée. JNK1 en particulier est capable de phosphoryler Bcl-2 et Bcl-xL, réduisant leur affinité pour Beclin-1 (Wei et al, 2008; He et al, 2013). JNK1 est également capable d'activer Sirt1 par phosphorylation, appuyant le rôle de JNK1 dans la régulation de l'autophagie (Nasrin et al, 2009).

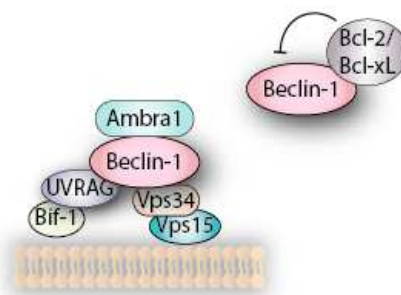


Figure 15 | Régulation de l'autophagie par Beclin-1. La liaison de Bcl-2 à Beclin1 empêche l'association entre Beclin1 et ses partenaires, diminuant l'activation de PI3-K et aboutissant à l'inhibition de l'autophagie.

2. ATG9

Chez les mammifères, mATG9 et VMP1 (vacuole membrane protein 1) sont deux protéines transmembranaires identifiées comme nécessaires à l'autophagie, et recrutées en même temps que le complexe PI3-K de classe III suite à l'activation du complexe ULK. mATG9 contribue potentiellement à la livraison de la membrane pour la formation de l'autophagosome (Webber et al, 2007). Lors d'une carence, l'expression de ATG9 est augmentée, et pour que l'autophagie soit complète, ATG9 doit interagir avec la protéine p38IP (p38-interacting protein). La kinase p38 se retrouve être un régulateur négatif de l'autophagie en interférant avec ATG9. La kinase p38 est capable d'interagir avec la protéine p38IP et de titrer celle-ci, empêchant l'interaction ATG9-p38IP et inhibant l'autophagie (Webber & Tooze, 2010). VMP1 quant à lui fonctionnerait comme lieu de recrutement de Beclin1 et d'autres composants du complexe PI3-K de classe III sur le phagophore (Ropolo et al, 2007). Ceci est supporté par la découverte d'une nouvelle protéine, TP53INP2 (tumor protein 53-induced nuclear protein2), essentielle pour la translocation de Beclin1 et de LC3 vers l'autophagosome lors de l'induction de l'autophagie, et qui interagit avec VMP1 (Nowak et al, 2009).

Le recrutement du complexe PI3-K et des protéines transmembranaires contrôle la formation du PAS et participe à l'isolation de la membrane. Il permet ensuite le recrutement d'autres effecteurs de l'autophagie nécessaires à la maturation du phagophore pour former un autophagosome.

C. Expansion et complétion

Les étapes d'expansion et de complétion conduisent à l'élongation de la double membrane nouvellement isolée, jusqu'à former une structure fermée séquestrant les éléments à dégrader. Ces deux étapes sont dépendantes de deux systèmes de conjugaison, similaires à l'ubiquitinylation des protéines dans la voie du protéasome. Des études ont identifié deux protéines ubiquitine-like, ATG12 et ATG8/LC3 ainsi que leur rôle durant l'élongation et l'expansion de la membrane du phagophore (figure 16).

1. LC3

LC3 est une protéine de type ubiquitine, dont l'arginine située en C-terminale est clivée par ATG4, rendant accessible un résidu glycine et générant la forme cytosolique, LC3-I. Ce résidu va ensuite se lier de manière covalente à la phosphatidyléthanolamine (PE) présente au sein de la

membrane du phagophore, générant une forme lipidique de LC3 appelée LC3-II. Cette forme lipidique est présente sur la face externe et interne de la membrane du phagophore, mais est finalement retirée du côté externe de la membrane de l'autophagosome pour la fusion avec le lysosome (Kabeya et al, 2000). LC3 a un rôle essentiel d'adressage du cargo vers l'autophagosome, en reconnaissant spécifiquement les protéines ubiquitinylées, grâce à sa partie N-terminale (Sugawara et al, 2004). La protéine LC3 associée à PE sert couramment de marqueur des autophagosomes dans les études de l'autophagie chez les cellules de mammifères. Il existe une sous-famille homologue à LC3, la famille GABARAP (GABA receptor-associated protein) comprenant trois membres : GABARAP, GABARAP-L1 et GABARAP-L2 (GATE-16). Tous ces membres interviennent dans le processus d'autophagie, mais probablement à différents stades de la formation de l'autophagosome (Weidberg et al, 2010).

2. Réaction de conjugaison de ATG8 et ATG12 à la membrane de l'autophagosome

La réaction de conjugaison de LC3 à la membrane de l'autophagosome implique ATG3, une enzyme d'activation de l'ubiquitine de type E2, ainsi que ATG7, une enzyme de type E1, ATG7 (figure 16). L'arginine en position 117 de LC3 est dans un premier temps clivée par la protéase ATG4, ce qui expose la glycine 116. Cette glycine va permettre la formation d'une liaison thioester avec la cystéine 507 de ATG7, puis avec une cystéine de ATG3, avant d'être conjuguée à la phosphatidyléthanolamine par une liaison amine (Geng & Klionsky, 2008).

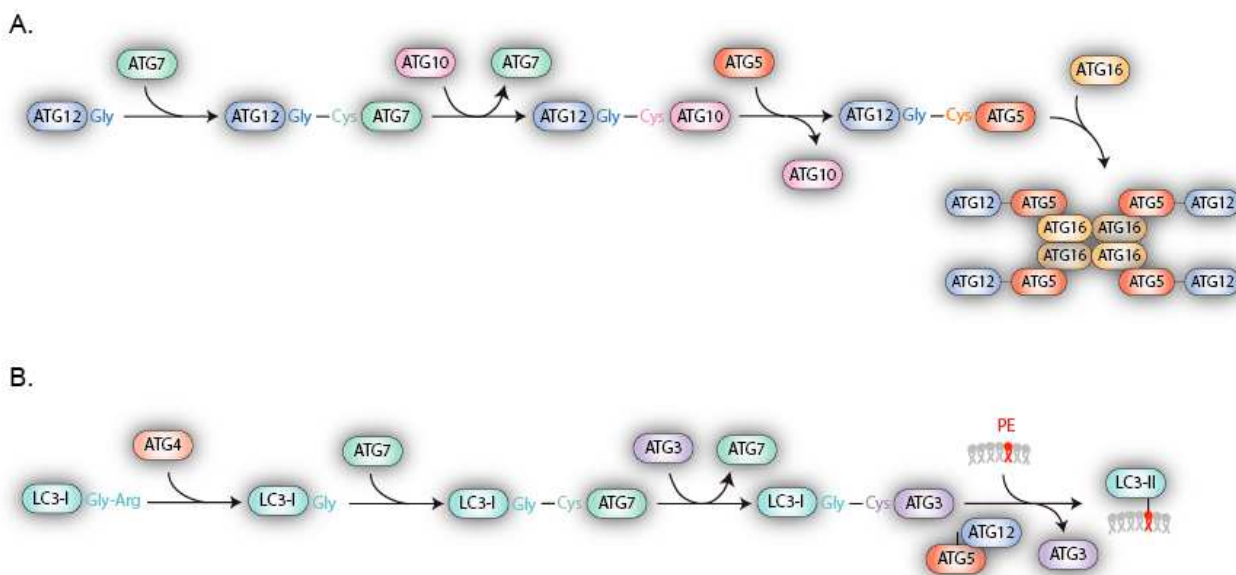


Figure 16 | Systèmes de conjugaison. **A.** Cette réaction aboutit à la formation d'un complexe tétramérique formé de ATG16, ATG5 et ATG12. Ce complexe intervient au niveau de la membrane de l'autophagosome pour permettre sa formation et son expansion. **B.** Cette deuxième réaction fait intervenir l'enzyme ATG3 et conduit à l'ancrage de LC3-II à la membrane par la liaison au phosphatidylinositol (PE) (Geng & Klionsky, 2008).

ATG7 joue également un rôle dans la seconde réaction de conjugaison : ATG12, une autre protéine de type ubiquitine, est liée de manière covalente à ATG5 dans une réaction qui requiert ATG7 et une enzyme de type E2, ATG10 (figure 16). Une troisième protéine, ATG16, se multimérise et se lie au complexe ATG5-ATG12 pour former un large complexe tétramérique, nommé ATG16L. Cet événement de conjugaison est nécessaire à la formation ou à l'expansion de la vésicule de séquestration (Geng & Klionsky, 2008).

3. Séquestosome 1 (p62)

La protéine adaptatrice p62 intervient dans le processus d'autophagie en se liant aux protéines polyubiquitinylées et aux agrégats, et en ciblant ceux-ci pour la dégradation lysosomale (Moscat & Diaz-Meco, 2009). Cette protéine est également capable de se lier à LC3 à la membrane, toujours dans le but de cibler les agrégats vers les autophagosomes pour la dégradation. Sachant que p62 se retrouve accumulée dans des souris déficientes en autophagie, cette protéine est rapidement considérée comme un important régulateur de l'autophagie (Komatsu et al, 2007). D'autre part, il a été montré un rôle important de p62 dans la signalisation de l'oncogène Ras. En effet, p62 est requise pour la transformation induite par Ras, et pour l'activation de NF- κ B à la fois *in vitro* et *in vivo* dans le cancer du poumon. Plus précisément, les cellules tumorales qui présentent un défaut d'autophagie montrent une accumulation de p62, de protéines chaperones du réticulum endoplasmique, de mitochondries endommagées et de ROS en réponse au stress. Les auteurs soulignent que le simple échec des cellules présentant un défaut de l'autophagie à éliminer p62 est suffisant pour promouvoir la tumorigenèse (Mathew et al, 2009). En outre, p62 intervient également dans le processus de mitophagie qui est une voie d'autophagie ciblant les mitochondries défectueuses pour la dégradation. Au même titre que Parkin qui est une E3 ligase impliquée dans la mitophagie, p62 va cibler la mitochondrie ubiquitinylée à l'intérieur de l'autophagosome pour la dégradation (Geisler et al, 2010).

Une fois que les éléments qui doivent être dégradés sont enfermés dans l'autophagosome, celui-ci n'est pas capable de procéder à la dégradation de lui-même. Il doit pour cela fusionner avec un lysosome afin d'exposer le cargo aux enzymes de dégradation lysosomales.

D. Fusion et dégradation vésiculaire

Les complexes ATG présents à l'extérieur de la vésicule ne permettent pas la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. Avant la fusion, ATG8-PE subit un clivage par ATG4 qui

permet son détachement de la membrane externe de l'autophagosome. ATG4 qui est déjà responsable du clivage de l'arginine c-terminale de LC3 pour sa liaison à PE, est également retrouvée lors de l'étape de fusion puisque cette protéase est aussi responsable du détachement de LC3 de la membrane de l'autophagosome (Yoshimura et al, 2006).

Seule la membrane externe de l'autophagosome fusionne avec la membrane du lysosome. La structure à une seule membrane qui se retrouve alors dans la lumière du lysosome doit être détruite. L'étape de lyse du corps autophagique dépend du pH acide du lysosome et de la protéinase B (Prb1) (Nakamura et al, 1997). Deux autres protéines sont également impliquées dans cette dernière étape, ATG15 et ATG22. ATG15 a une similarité de séquence avec la famille des lipases et semble clairement fonctionner directement dans la rupture vésiculaire. ATG22 est une protéine membranaire constitutivement localisée à la membrane délimitant la vacuole. Au contraire de ATG15, ATG22 est nécessaire seulement à la dégradation des corps autophagiques, et semble participer au recyclage des acides aminés (Yang et al, 2006).

L'autophagie a donc un rôle principal dans la détoxification cellulaire et la tolérance environnementale. Cependant, un dysfonctionnement de l'autophagie contribue ou est la cause de nombreuses maladies en pouvant conduire à une mort cellulaire, ce qui souligne des nouvelles possibilités d'utiliser la modulation de l'autophagie dans les interventions thérapeutiques. Les faits montrent qu'un défaut de l'autophagie favorise l'apparition de cancer, de maladies neurodégénératives, de maladies du foie, le vieillissement et les maladies inflammatoires comme la maladie de Crohn (Mizushima et al, 2008).

III. Rôles de l'autophagie : fonctions protectrices et pro-tumorales

L'autophagie comme décrite ci-dessus est un processus très conservé au cours de l'évolution (de la levure à l'homme) désignant la dégradation de composants cellulaires incluant les protéines, les lipides et les organelles pour détoxifier la cellule. L'autophagie permet également de prévenir l'accumulation toxique de lipide, de protéines ou d'organelles endommagées, en particulier au cours du stress. Un niveau basal d'autophagie correspond à un maintien du contrôle de la qualité des protéines et des organelles, et de ce fait aide à préserver la viabilité cellulaire. Toutefois, l'autophagie possède un rôle de promoteur de tumeur. Des conditions de stress, de carence, d'hypoxie, d'infection par des pathogènes, de radiation ou de traitement par des anti-cancéreux, augmentent le niveau d'autophagie afin d'accroître la tolérance environnementale (Degenhardt et al, 2006). Dans ce cas, l'autophagie accélère le renouvellement des composants cellulaires permettant de fournir une source interne pour la synthèse des macromolécules.

A. L'autophagie lors de différents stress

L'activation de l'autophagie est impliquée dans différents mécanismes qui conduisent à un stress comme des conditions d'hypoxie ou d'anoxie, de dommages oxydatifs importants, d'une dérégulation de p53, ou encore de mitochondries défectueuses. L'hypoxie se traduit par une concentration très faible en oxygène (<3%), et l'anoxie par l'absence quasi-totale d'oxygène (<0,1%) dans le sang. L'autophagie induite par l'hypoxie dépend du facteur de transcription HIF (Hypoxia-inducible factor), dont l'une des cibles est le gène de l'autophagie BNIP3 qui déstabilise l'interaction Beclin-1/Bcl-2 (Bellot et al, 2009). Les premières observations de l'autophagie induite dans des conditions d'hypoxie ont montré que l'hypoxie favorise la mort cellulaire par l'induction de l'autophagie et de la voie HIF/BNIP3 dans les gliomes et dans le cancer du sein (Azad et al, 2008). Toutefois, l'autophagie induite par l'hypoxie qui cible la dégradation des mitochondries dans des cellules sujettes à une hypoxie prolongée, est un mécanisme de protection qui prévient de l'augmentation des ROS et de la mort cellulaire. En plus d'être activée par l'expression de BNIP3 induite par HIF, l'autophagie induite par l'hypoxie est également dépendante dans ce cas de l'expression de Beclin-1 et de ATG5 (Zhang et al, 2008; Mazure & Pouyssegur, 2010). La protéine p62 intervient également dans la réponse à l'hypoxie, cependant son expression est indépendante de HIF. Lors de l'hypoxie, l'expression de p62 est diminuée, conséquence de sa dégradation par l'autophagie. De plus, l'élimination de p62 est associée à l'activation de la voie ERK, susceptible d'être responsable de la survie et de la prolifération des cellules tumorales (Pursiheimo et al, 2009).

Les conditions de stress entraînent une augmentation de la production de ROS par la cellule, qui sont à l'origine de l'activation de l'autophagie de diverses manières (Kroemer et al, 2010). Ce sont principalement les voies de signalisation en amont de l'autophagie qui sont concernées. Une augmentation des ROS conduit à l'inhibition de mTOR, que ce soit de manière directe ou indirecte via la voie de dommages de l'ADN. Dans cette dernière, la kinase ATM est activée et entraîne à son tour l'activation de AMPK. Un taux élevé de ROS implique également l'activation de la voie des MAP kinases incluant JNK, ainsi que l'activation de ERK. Lorsqu'il est actif, ERK peut directement activer ATG4 et ainsi accélérer la production de LC3. Les ROS peuvent aussi être à l'origine de l'activation de p53, qui peut à la fois activer ou inhiber l'autophagie. Ces deux fonctions sont pourtant distinctes. Parmi les cibles transcriptionnelles de p53 pour induire l'autophagie sont retrouvées DRAM1 (Damage-regulated autophagy modulator 1), une protéine lysosomale dont l'inhibition affecte l'activation de l'autophagie, et Sestrin qui intervient dans l'activation de AMPK (Crighton et al, 2006; Ryan, 2011). Les inducteurs de l'autophagie comme les ROS ou la privation de nutriments activent la fonction transcriptionnelle de p53. Cependant, un niveau basal de p53 supprime l'autophagie, suggérant un rôle de la protéine p53

cytoplasmique différent du rôle de la protéine nucléaire. Dans le cytoplasme, p53 favorise l'inhibition de l'autophagie par la régulation négative de AMPK et la régulation positive de mTOR, conduisant dans ce cas à une augmentation de l'apoptose (Green & Kroemer, 2009).

Lors d'un dysfonctionnement des mitochondries, l'accumulation excessive de ROS produits par celles-ci peut avoir un effet néfaste sur l'organisme. L'élimination de ces mitochondries par l'autophagie est un contrôle de qualité spécifique appelé mitophagie, qui intervient dans le recyclage et dans le maintien d'un pool de mitochondries fonctionnelles. La dégradation des mitochondries endommagées par l'autophagie prévient entre autre du vieillissement et de maladies dégénératives. Ce mécanisme est régulé principalement par la voie PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1)/ Parkin. PINK1 est une protéine sérine/thréonine kinase qui induit la liaison de la protéine Parkin à la mitochondrie lors d'une dépolarisation de la membrane mitochondriale. Parkin est une E3 ligase qui va alors ubiquitinyler les protéines mitochondriales comme VDAC1, ciblant la mitochondrie pour la dégradation. De plus, la protéine adaptatrice p62 est également recrutée à la mitochondrie et est nécessaire à sa dégradation. Les mitochondries endommagées qui n'arrivent pas à être éliminées peuvent être la cause de pathologies. Plusieurs cas de maladies de Parkinson sont associés à des mutations qui affectent la mitophagie induite par Parkin. Les mutations de Parkin ont pour effet de bloquer son activité et ainsi l'ubiquitinylation de VDAC1 et le recrutement de p62, empêchant l'induction de la mitophagie et contribuant à la maladie de Parkinson (Geisler et al, 2010). L'élimination des mitochondries est également médiée par la protéine BNIP3, qui agit comme un récepteur de l'autophagie. Lors de l'activation de la mitophagie, BNIP3 est recrutée à la membrane mitochondriale et dirige celle-ci vers l'autophagosome en reconnaissant et en se liant à LC3, ciblant la mitochondrie vers la dégradation lysosomale. Toutefois, l'inhibition de l'interaction entre BNIP3 et LC3 ne suffit pas à réduire entièrement la mitophagie, ce qui suggère une certaine indépendance entre la mitophagie médiée par Parkin et celle faisant intervenir BNIP3 (Hanna et al, 2012).

B. L'autophagie dans le développement

Au cours du développement, l'autophagie joue un rôle dans la différenciation tissu-spécifique en facilitant le remodelage cellulaire et tissulaire par la dégradation et l'élimination des matériaux cellulaires (Wang & Levine, 2010). Les organismes possédant une autophagie défectueuse présentent par ailleurs un développement et une différenciation anormale (Mizushima & Levine, 2010). Chez les mammifères, l'autophagie est importante pour le développement pré-implantatoire, la survie au cours d'une carence néonatale, et la différenciation cellulaire lors de l'érythropoïèse, de la lymphopoïèse et de l'adipogenèse. Par exemple, le premier stade pour lequel un rôle de

L'autophagie a été décrit concerne le stade précoce du développement pré-implantatoire, et a été observé à l'aide d'oocytes de souris n'exprimant plus ATG5. La délétion d'ATG5 dans ces oocytes conduit à un défaut d'autophagie, avec pour conséquence un développement anormal (Tsukamoto et al, 2008). L'autophagie est surtout active dans le premier et deuxième jour suivant la naissance, au sein des tissus néonataux à l'exception du cerveau. Ainsi la délétion de différents gènes de l'autophagie (ATG3, 5, 7, 9 et 16L1) conduit à la mort néonatale des souris (Tsukamoto et al, 2008). D'autre part, la perte de Beclin-1 chez la souris résulte en une létalité embryonnaire précoce (Yue et al, 2003). Lors de la période néonatale, la délétion de ATG5 affecte l'adipogenèse comme l'indique la baisse des tissus adipeux (Schiaffino et al, 2008). De plus, les embryons ATG5-/- n'éliminent plus les corps apoptotiques, participant à un développement anormal (Qu et al, 2007).

C. Autophagie et cancer

L'autophagie est importante pour la dégradation de protéines ubiquitinylées, mutées ou incomplètes. Le rôle suppresseur de tumeur de l'autophagie est appuyé par le fait que la perte allélique de Beclin-1 est responsable d'une autophagie défectueuse, à l'origine du développement de carcinomes (Yue et al, 2003). L'autophagie est une réponse au stress cellulaire qui représente un mécanisme suppresseur de tumeur, au même titre que la sénescence. L'autophagie peut être induite pendant la sénescence pour faciliter le processus (White & Lowe, 2009). Dans ce cas, l'autophagie favorise le rapide renouvellement des protéines et facilite la traduction des protéines hautement nécessaires à l'établissement de l'OIS (Oncogene Induced Senescence). Ainsi, l'autophagie peut être un système de régulation complémentaire pour atteindre les altérations biochimiques spécifiques observées pendant une induction aiguë de la sénescence. En effet, dans l'exemple de la sénescence induite par Ras, l'autophagie est induite juste avant l'établissement de la sénescence (Young et al, 2009).

Cependant, le rôle de l'autophagie est controversé. En opposition à son rôle de suppresseur de tumeur, l'autophagie est aussi nettement reliée à la progression tumorale. En effet, l'autophagie est observée dans les cellules tumorales afin de permettre la survie des cellules et la résistance aux thérapies. Cette autophagie permet d'accroître la tolérance environnementale face aux dommages qui ont été accumulés. Les cellules tumorales présentant un défaut de l'apoptose utilisent l'autophagie pour permettre la survie des cellules malgré les conditions de stress. Cette fonction de l'autophagie protège de la mort les cellules tumorales et permet ainsi la propagation des cellules endommagées (Mathew et al, 2007). Les cellules tumorales ont ensuite besoin de maintenir ce niveau d'autophagie pour survivre puisque sans elle, les cellules présentent une augmentation de la mort cellulaire (Degenhardt et al, 2006). L'autophagie peut même être indispensable pour la

transformation. Une étude concernant le cancer du sein a montré que la transformation par l'oncogène K-Ras implique de manière critique le processus autophagique. Le stress oncogénique induit par K-Ras est responsable de l'activation de JNK médiée par les ROS, qui aboutit à l'activation de l'autophagie via la régulation des gènes ATG5 et ATG7, et à la transformation des cellules épithéliales mammaires. Dans cette étude, l'inhibition de l'autophagie abolit complètement cette transformation induite par K-Ras, soulignant le rôle essentiel de l'autophagie lors de la transformation par K-Ras (Kim et al, 2011b).

Dans des conditions d'absence de stress, le niveau de la protéine p62 est faible dû à sa dégradation via une autophagie intacte. Lors d'un stress, l'expression de p62 augmente, la protéine s'accumule pour capter les organelles ubiquitinylées, puis est dégradée en même temps que le cargo. Cependant, un défaut d'autophagie survient lorsque la cellule n'arrive pas à éliminer p62, et cette dérégulation est associée à la tumorigenèse. L'accumulation de p62 dans les cellules lors d'un stress contribue à une augmentation du stress oxydatif et de dommages de l'ADN, conduisant à des anomalies de division et à une instabilité génomique au sein des cellules avec un défaut d'autophagie (Mathew et al, 2009). En plus de sa fonction de ciblage des protéines ubiquitinylées vers la dégradation, p62 régule l'activité de facteurs de transcription comme NF- κ B et NRF2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2). Ces mêmes cellules qui présentent un défaut d'autophagie et une accumulation de p62, montrent une dérégulation de la voie canonique de NF- κ B (Mathew et al, 2009). Par l'interaction avec TRAF6, p62 est capable de réguler l'activation de NF- κ B (Moscat et al, 2007). Dans des conditions de stress, p62 conduit à l'activation de RelA afin d'activer l'expression de gènes cibles de NF- κ B impliqués dans la protection de l'intégrité de la cellule. D'autre part, p62 active le facteur de transcription NRF2 en entrant en compétition avec l'inhibiteur KEAP1 (kelch-like ECH-associated protein 1), libérant NRF2 dans le même but de favoriser la survie cellulaire (Villeneuve et al, 2010). Ainsi lors d'un défaut de l'autophagie, p62 n'est plus dégradée, s'accumule dans la cellule, et permet l'activation constitutive de NRF2 et de NF- κ B, augmentant les signaux de survie et favorisant la tumorigenèse (White, 2012). En outre, ATG5 est une autre protéine de l'autophagie qui peut intervenir dans l'activation de NF- κ B par des mécanismes qui ne sont pas encore complètement connus (Trocoli & Djavaheri-Mergny, 2011). ATG5 est capable d'interagir avec la protéine FADD (Fas-associated protein with death domain), pour activer l'autophagie et pourrait contribuer à l'activation de NF- κ B. De plus, l'inhibition de l'activité de mTOR par la rapamycine restaure l'activation de NF- κ B (Trocoli & Djavaheri-Mergny, 2011).

Au sein de la masse tumorale, se situent des régions hypoxiques qui présentent un accès limité à l'oxygène et aux facteurs de croissances, ainsi qu'une vascularisation amoindrie. Ce sont justement ces conditions de stress au sein du micro-environnement tumoral qui conduisent à l'activation robuste de l'autophagie par les cellules cancéreuses, afin de promouvoir la survie de ces cellules tumorales (Karantza-Wadsworth et al, 2007). L'autophagie est notamment requise dans ces conditions pour prévenir l'accumulation de mitochondries endommagées et limiter la production toxique de ROS. La respiration mitochondriale et la génération de ROS sont essentielles à la prolifération et à la tumorigenèse induite par l'oncogène Ras. De ce fait, l'autophagie est un mécanisme indispensable pour maintenir ce métabolisme mitochondrial et permettre la survie cellulaire dans ces conditions de carence (Weinberg et al, 2010; Guo et al, 2011).

D'autre part, l'autophagie est requise pour le contrôle qualité, le maintien et la fonction des cellules souches. Les cellules souches ont la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier en différents types cellulaires importants pour le développement et le renouvellement tissulaire. Dans les régions hypoxiques de l'environnement tumoral, l'autophagie est reliée à une augmentation de la population des cellules souches cancéreuses (CSCs), participant à l'adaptation au stress et à la survie du micro-environnement tumoral à ce stress (Guan et al, 2013).

Or, ces régions pauvres en oxygène au sein de la tumeur sont insensibles aux thérapies, reliant l'autophagie à l'inefficacité des traitements. Inhiber l'autophagie est donc devenu un intérêt majeur pour l'amélioration des traitements. Certaines molécules comme la Chloroquine (CQ) et son analogue l'hydroxychloroquine (HCQ) sont en développement clinique. Ces deux inhibiteurs bloquent la phase de dégradation de l'autophagie en inhibant la fonction lysosomale. L'inhibition de l'autophagie permet d'augmenter l'efficacité des traitements, c'est pourquoi la plupart des études pré-cliniques utilisent l'hydroxychloroquine en combinaison avec d'autres agents anti-cancéreux (Carew et al, 2012). Une vingtaine d'essais cliniques sont en cours et développent l'utilisation des inhibiteurs CQ et HCQ en combinaison avec les thérapies conventionnelles. Cependant, l'inhibition de l'autophagie est également néfaste envers les cellules et les tissus sains avoisinant la tumeur, soulevant un problème de ciblage du traitement au sein de la zone tumorale.

HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

Chaque année, près d'un million de personnes dans le monde développent un cancer colorectal et environ 33% de ces personnes décèdent à la suite de ce cancer devenu un problème de santé majeur (Cunningham et al, 2010). Parmi les patients atteints d'un cancer colorectal, environ 37 % présentent une mutation activatrice de Ras conduisant à l'activation constitutive de la protéine, et à la mise en place de mécanismes d'arrêt du cycle. Cependant, ces mécanismes suppresseurs de tumeurs sont parfois altérés et ne conduisent plus à l'arrêt du cycle, initiant le développement de la tumeur.

Une étude récente menée au laboratoire s'est intéressée aux mécanismes de réponse à l'oncogène Ras, utilisant un modèle de surexpression de l'oncogène par la doxycycline généré dans les cellules d'adénocarcinome colorectal HT29. Dans un contexte où le suppresseur de tumeur p53 est muté et où le locus de p16 est méthylé, nous avons montré que l'oncogène Ras conduisait quand même à l'expression de p21Waf1 et à l'entrée des cellules en sénescence. Toutefois, certaines cellules qui expriment Ras échappent à cette sénescence indépendante de p53 par l'inactivation de p21Waf1 et par la dépendance aux protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl1 (De Carne Trecesson et al, 2011)(Résultats-Annexe I).

Dans la continuité de ce travail, nous avons cherché à caractériser la sénescence induite par cet oncogène. Des rôles de la famille de facteur de transcription NF- κ B sont décrits dans la régulation du processus d'autophagie, ainsi que dans l'établissement du phénotype de sénescence. Notamment, la sous-unité NF- κ B2 conduit à l'activation de l'autophagie en réponse à des dommages de l'ADN (Barré & Perkins, 2010a). Par conséquent, nous nous sommes demandés si NF- κ B2 pouvait être impliqué dans l'établissement de la sénescence en réponse aux dommages de l'ADN induits par l'oncogène Ras.

L'étude du rôle de Ras et de la réponse à cette protéine dans l'oncogénèse est essentielle depuis que la mutation de Ras est associée à la résistance des patients face aux traitements anti-tumoraux dirigés contre l'EGFR (Karapetis et al, 2008). Une meilleure compréhension de cette voie permettrait de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques et d'améliorer l'efficacité des traitements.

RÉSULTATS

~

Chapitre 1

Le complexe NF- κ B2/RelA induit l'autophagie lors de l'OIS

I. L'induction de l'autophagie participe à l'entrée en sénescence des cellules après l'expression de H-RasV12

A. Induction de la sénescence et de l'autophagie

L'acquisition d'un phénotype de sénescence se distingue par l'obtention de plusieurs caractéristiques. Nous l'avons déjà observé suite à une induction de Ras par une activité de la SA-β-Galactosidase à pH 6.0, par une accumulation de SAHF, et par une hausse de l'expression de l'inhibiteur du cycle p21. En accord avec le fait que la sénescence s'accompagne d'une activation de la signalisation des dommages de l'ADN, nous avons également observé une augmentation de la phosphorylation de H2Ax, signe de cassures de l'ADN (figure 17A). Ces expériences permettent de détecter si une cellule est sénescente ou non mais ne donnent pas d'indication sur un niveau d'induction. Selon Collado et Serrano, l'utilisation de ces marqueurs de l'OIS pour la détection des cancers dans les stades précoces pourrait être une bonne indication de la progression de la tumeur. Ils proposent ainsi un concept d'index de sénescence, où le degré d'induction de la sénescence est relatif de l'agressivité de la tumeur (Collado & Serrano, 2006). Nous avons voulu établir l'état de sénescence dans nos modèles. Pour cela, nous avons mesuré la sénescence par cytométrie de flux en utilisant la fluoresceine di-β-galactopyranoside (FDG), substrat de l'enzyme lysosomale qui nous permet de mesurer l'activité enzymatique de la SA-β-Galactosidase. Nous avons ainsi pu observer une augmentation de l'activité de la SA-β-Galactosidase suite à une induction de Ras. La quantification de cette activité nous permet de montrer une augmentation de l'index de sénescence dans les cellules exprimant Ras comparées aux cellules contrôles (figure 17B).

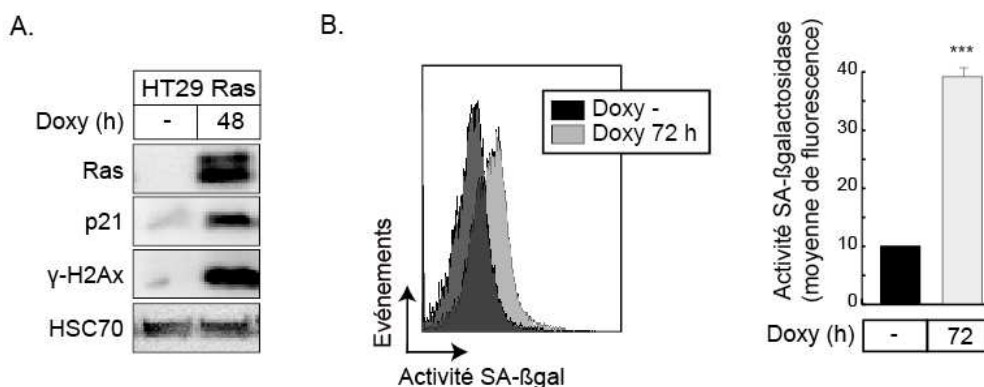


Figure 17 | Mesure de l'index de sénescence dans les cellules inductibles pour H-RasV12.
A. H-RasV12 est induit avec 50ng.mL⁻¹ de doxycycline pendant 48 heures. L'expression protéique de Ras, p21 et γ-H2Ax est analysée par western blot. HSC70 est utilisé comme contrôle de charge (n=3). **B.** H-RasV12 est induit avec 50ng.mL⁻¹ de doxycycline pendant 72 heures puis les cellules sénescents sont marquées et l'index est quantifié par cytométrie en flux. L'histogramme est représentatif de trois expériences (***)p<0,001).

Avec ses nombreuses fonctions de remodelage cellulaire, de contrôle qualité, de recyclage intracellulaire et de contrôle de l'homéostasie énergétique, l'autophagie est requise pour l'exécution correcte du programme de sénescence (Young & Narita, 2010). Nous avons voulu regarder le niveau d'autophagie lors de la sénescence induite par Ras. Pour cela, nous avons étudié l'expression du marqueur LC3 couramment utilisé pour étudier le niveau d'autophagie. Lors d'une activation de l'autophagie, la forme initiale de LC3, LC3-I, est conjuguée à la membrane de l'autophagosome donnant lieu à une seconde forme, LC3-II. En observant l'expression de ses deux formes lors d'une induction de Ras, nous avons constaté une augmentation de l'expression de LC3-I ainsi que l'augmentation de la lipidation en LC3-II (figure 18A). Nous avons également voulu observer cette expression de LC3 par immunofluorescence. LC3 étant présent à la membrane des autophagosomes, cette technique nous permet de visualiser la formation de ces vésicules. La transfection d'un transgène GFP-LC3 est largement utilisée dans la littérature. Toutefois, nous avons choisi de détecter la protéine LC3 endogène en utilisant un anticorps primaire, afin de nous affranchir des effets notoires d'une sur-expression de la protéine. La figure 18B montre ainsi une augmentation du marquage de LC3 sous la forme de dots, correspondant à une accumulation de vésicules d'autophagie. En analysant ces images à l'aide du logiciel ImageJ, cette expérience montre non seulement une augmentation du nombre de vésicules mais également une augmentation de leur taille. Ces données sont relatives du niveau d'autophagie, et nous permettent de montrer de manière explicite l'induction de ce mécanisme lors d'une induction de Ras.

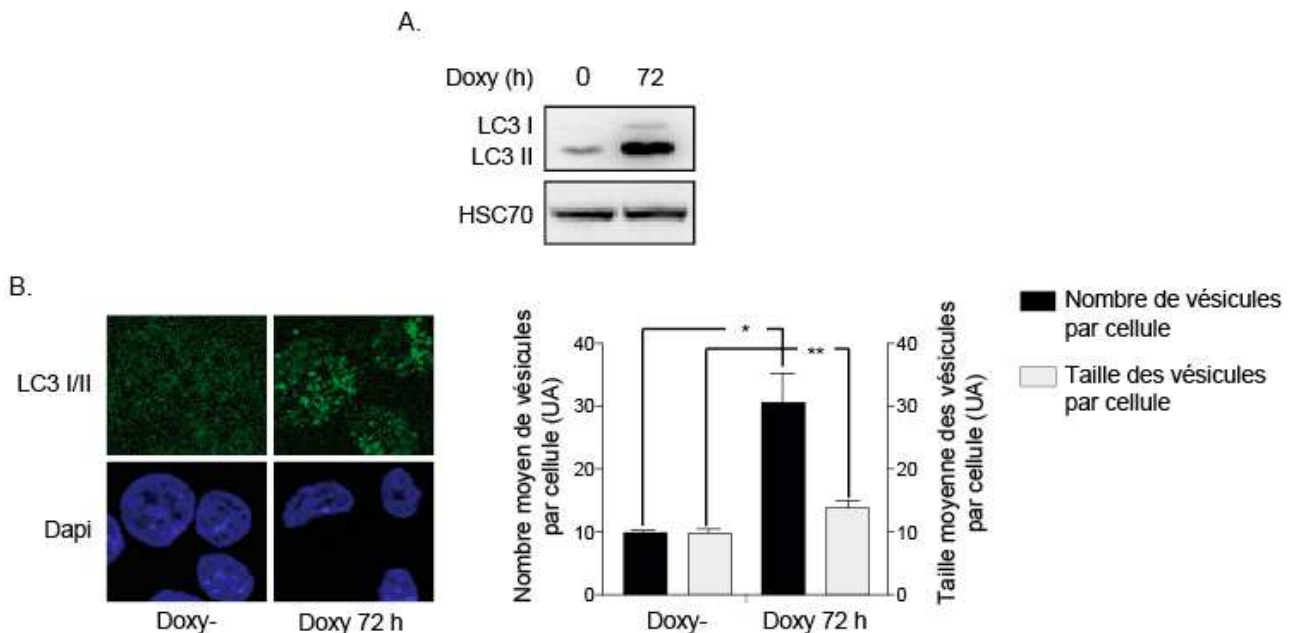


Figure 18 | Mesure de l'expression du marqueur d'autophagie LC3 après induction de Ras.

A. H-RasV12 est induit avec 50ng.mL⁻¹ de doxycycline pendant 60 heures puis les extraits totaux sont analysés en western blot (n=3). **B.** H-RasV12 est induit avec 50ng.mL⁻¹ de doxycycline pendant 60 heures. Les cellules sont ensuite marquées à l'aide d'un anticorps dirigé contre LC3 puis analysées par microscopie confocale et à l'aide du logiciel ImageJ (n=3).

Il est décrit que l'autophagie peut-être inhibée ou activée en réponse à l'oncogène Ras, par la régulation de l'expression des gènes de l'autophagie tels que *Beclin1* ou *ATG5* (Yoo et al, 2010; Elgendy et al, 2011; Byun et al, 2009). Nous nous sommes intéressés à l'expression des gènes d'autophagie intervenant tout au long du processus, de la formation du phagophore jusqu'à la fusion au lysosome, en réponse à Ras. Nous avons mesuré l'expression des gènes *ATGs* par PCR quantitative à la suite d'une induction de Ras, comparée aux cellules contrôles. La figure 19 montre une augmentation de l'expression des gènes *ATGs*, que ce soit des gènes intervenant dans la formation du phagophore (*ULK1*, *ATG2A*, *ATG2B*, *ATG13*), dans l'élongation de la double membrane (*Beclin1*, *ATG9A*, *ATG14*, *WIPI2*, *SQSTM1*, *UVRAG*), ou encore dans la conjugaison de LC3 à la membrane (*ATG4A*, *ATG4D*, *ATG5*, *ATG7*, *MAP1LC3*, *GABARAP*, *GABARAPL1*, *ATG12*). Les résultats de la PCR quantitative pour *ULK1* et *ATG2A* sont donnés en exemple.

	Facteur d'amplification	Significativité statistique
ULK1	10	**
ATG2A	10,8	***
ATG2B	4,5	***
ATG4A	5,3	**
ATG4D	2,2	***
ATG5	2,7	***
BECN1	6,5	*
ATG7	3,2	*
MAP1LC3	12	***
GABARAP	2,7	***
GABARAPL1	7,2	***
ATG9A	3,1	**
ATG12	4,2	**
ATG13	3,9	***
ATG14	3,9	***
WIPI2	2,2	**
SQSTM1	15	***
UVRAG	6,6	***

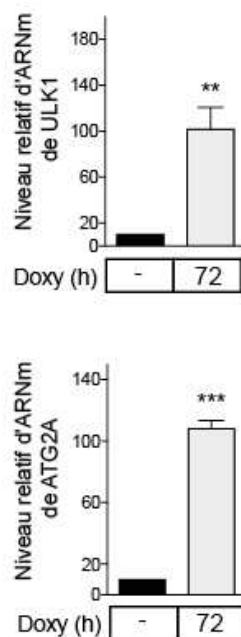


Figure 19 | Activation transcriptionnelle de l'autophagie. H-RasV12 est induit avec 50ng.mL-1 de doxycycline pendant 72 heures, puis le niveau d'expression des ARNm des gènes d'autophagie est analysé. Le résultat est exprimé par rapport à l'expression de ces mêmes gènes dans des cellules contrôles non-induites et normalisé à RPLPO (n=3)

Ces résultats nous indiquent que suite au stress oncogénique induit par l'expression de Ras, l'autophagie est activée de manière transcriptionnelle.

B. L'autophagie participe à l'établissement de la sénescence

Nous avons voulu caractériser le rôle de l'autophagie dans la réponse à l'oncogène. Plus particulièrement, nous nous sommes demandé si l'autophagie participe à l'établissement de la sénescence. Pour cela, nous avons utilisé un inhibiteur de l'autophagie, le 3-MA, qui interfère avec l'activité de la PI3-K de classe III et empêche le recrutement des complexes d'initiations au site de formation de l'autophagosome (Petiot et al, 2000). Nous avons vérifié l'efficacité de cet inhibiteur dans notre modèle. Nous avons ainsi observé que lors du stress oncogénique induit par Ras, l'expression protéique de LC3-II est augmentée comparé aux cellules non traitées. Cependant, l'expression de LC3-II diminue lors du traitement au 3-MA, ce qui traduit une baisse de la lipidation de LC3 à la membrane de l'autophagosome (figure 20).

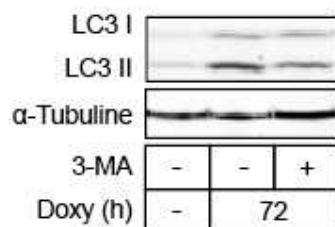


Figure 20 | Mesure de l'effet du 3-MA sur l'expression de LC3 et p21. H-RasV12 est induit avec 50ng.mL⁻¹ de doxycycline pendant 72 heures. 36 heures après l'ajout de doxycycline, les cellules sont traitées avec du 3-MA à 5mM, puis les extraits totaux sont analysés en western blot (n=3).

La détection de LC3 par immunofluorescence nous permet de valider cette inhibition de l'autophagie. En effet, le marquage de LC3 qui est augmenté lors d'une induction de Ras est diminué lors du traitement au 3-MA (figure 21). Une analyse quantitative du marquage de LC3 par immunofluorescence montre à la fois une diminution du nombre et de la taille des vésicules lors de l'utilisation du 3-MA (figure 21).

Nous avons vu que l'autophagie est induite de manière transcriptionnelle en réponse à l'expression de Ras. Ainsi en plus d'un inhibiteur chimique, nous avons voulu diminuer l'autophagie par l'utilisation d'un siRNA dirigé contre le gène d'autophagie, ATG7. Cependant, nous n'avons pas encore réussi à mettre au point la perte de l'expression de ATG7 par ARN interférence.

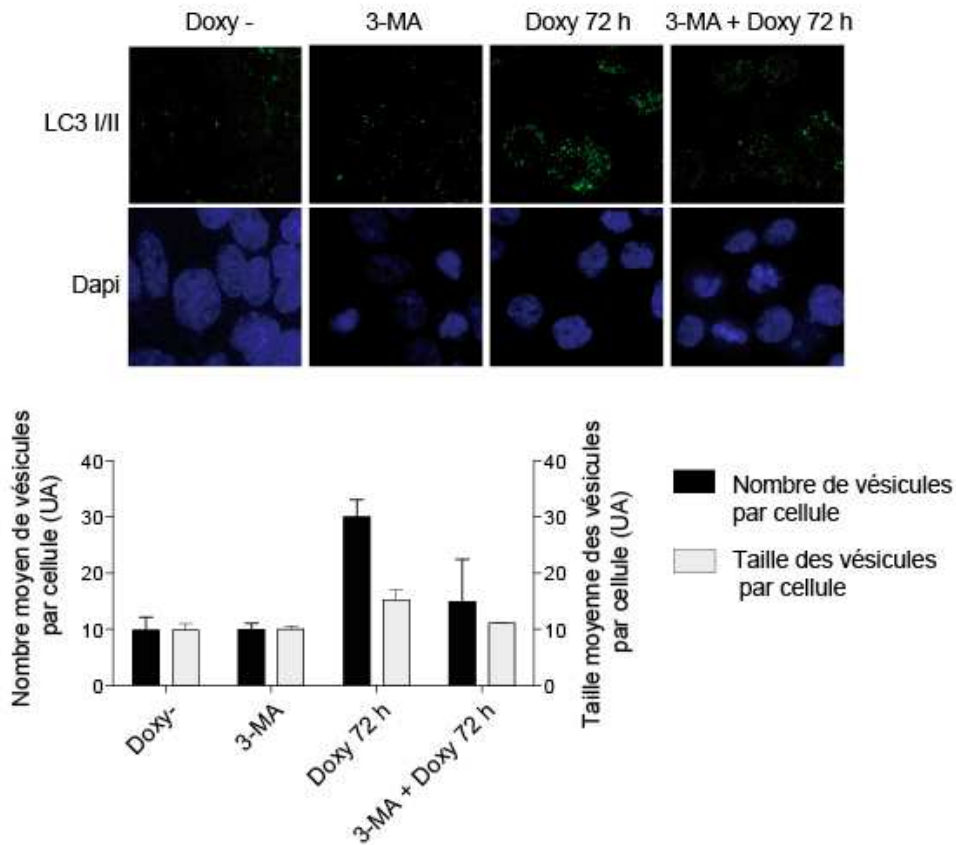


Figure 21 | Mesure de l'effet du 3-MA sur les vésicules d'autophagie. H-RasV12 est induit avec 50ng.mL^{-1} de doxycycline pendant 72 heures et 36 heures après l'ajout de doxycycline, les cellules sont traitées avec du 3-MA à 5mM. Les cellules sont ensuite marquées à l'aide d'un anticorps dirigé contre LC3 puis analysées par microscopie confocale et à l'aide du logiciel Image (n=3).

Après avoir vérifié l'efficacité du 3-MA, nous avons voulu étudier le rôle de l'autophagie en réponse à l'oncogène. Nous avons inhibé l'autophagie lors d'une induction de Ras et observé les conséquences de cette inhibition sur l'induction de la sénescence. La figure 22A montre que le niveau de sénescence est augmenté à la suite de l'induction de Ras, puis est diminué de manière significative lorsque les cellules sont traitées au 3-MA au cours de l'induction de Ras. Par ailleurs, nous avons également pu observer une diminution de l'expression de p21 dans ces conditions (figure 22B). Ainsi ces résultats suggèrent que l'autophagie induite par l'expression de Ras participe à l'établissement de la sénescence.

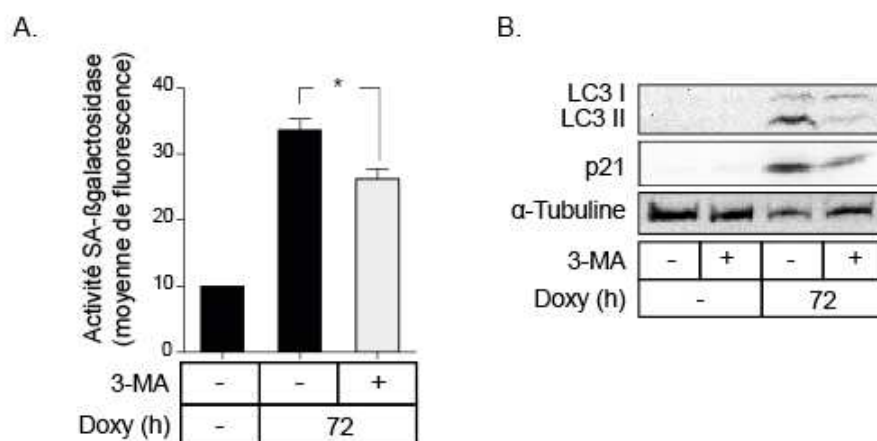


Figure 22 | Mesure de l'effet de l'inhibition de l'autophagie sur l'index de sénescence. A. H-RasV12 est induit avec 50ng.mL⁻¹ de doxycycline pendant 72 heures. 36 heures après l'ajout de doxycycline, les cellules sont traitées avec du 3-MA à 5mM, puis les cellules sénescents sont marquées et l'index est quantifié par cytométrie en flux (n=3). **B.** En parallèle, les extraits totaux sont extraits et analysés par western blot à l'aide des anticorps mentionnés (n=3).

Nous nous sommes ensuite intéressés aux conséquences de l'inhibition de l'autophagie sur la survie cellulaire. Dans un premier temps, nous avons testé l'effet du 3-MA par test de clonogénicité. Nous avons donc induit l'expression de Ras et traité les cellules avec du 3-MA pendant 8 jours, puis compté le nombre de colonies de cellules formées (figure 23A). Nous avons alors observé que l'inhibition de l'autophagie conduit à une diminution jusqu'à 40% du nombre de colonies comparé aux cellules contrôles. Suite à l'expression de Ras, le pourcentage de colonies diminue de moitié, et un traitement au 3-MA conduit à une baisse du nombre de colonies jusqu'à environ 10%. Ainsi, l'inhibition de l'autophagie semble diminuer la capacité des cellules à former des colonies. Nous avons ensuite analysé le cycle cellulaire par cytométrie en flux. Le marquage de l'ADN nous a permis d'observer une augmentation significative de la population en SubG1 suite à l'utilisation du 3-MA lors d'une induction de Ras (figure 23B). La présence de SubG1 est représentatif de cellules en mort cellulaire. Nous avons alors mesuré l'apoptose par l'expression de la caspase 3 clivée par cytométrie en flux. Nous avons pu observer une augmentation du marquage de la caspase 3 clivée suite à l'utilisation du 3-MA lors d'une induction de Ras (figure 23C). Il est important de noter que lors de l'expression de Ras sans traitement au 3-MA, les analyses du cycle cellulaire et de l'expression de la caspase 3 clivée montrent une augmentation modérée du nombre de cellules en SubG1 et en G2/M, ainsi que du nombre de cellules exprimant la forme active de la caspase 3.

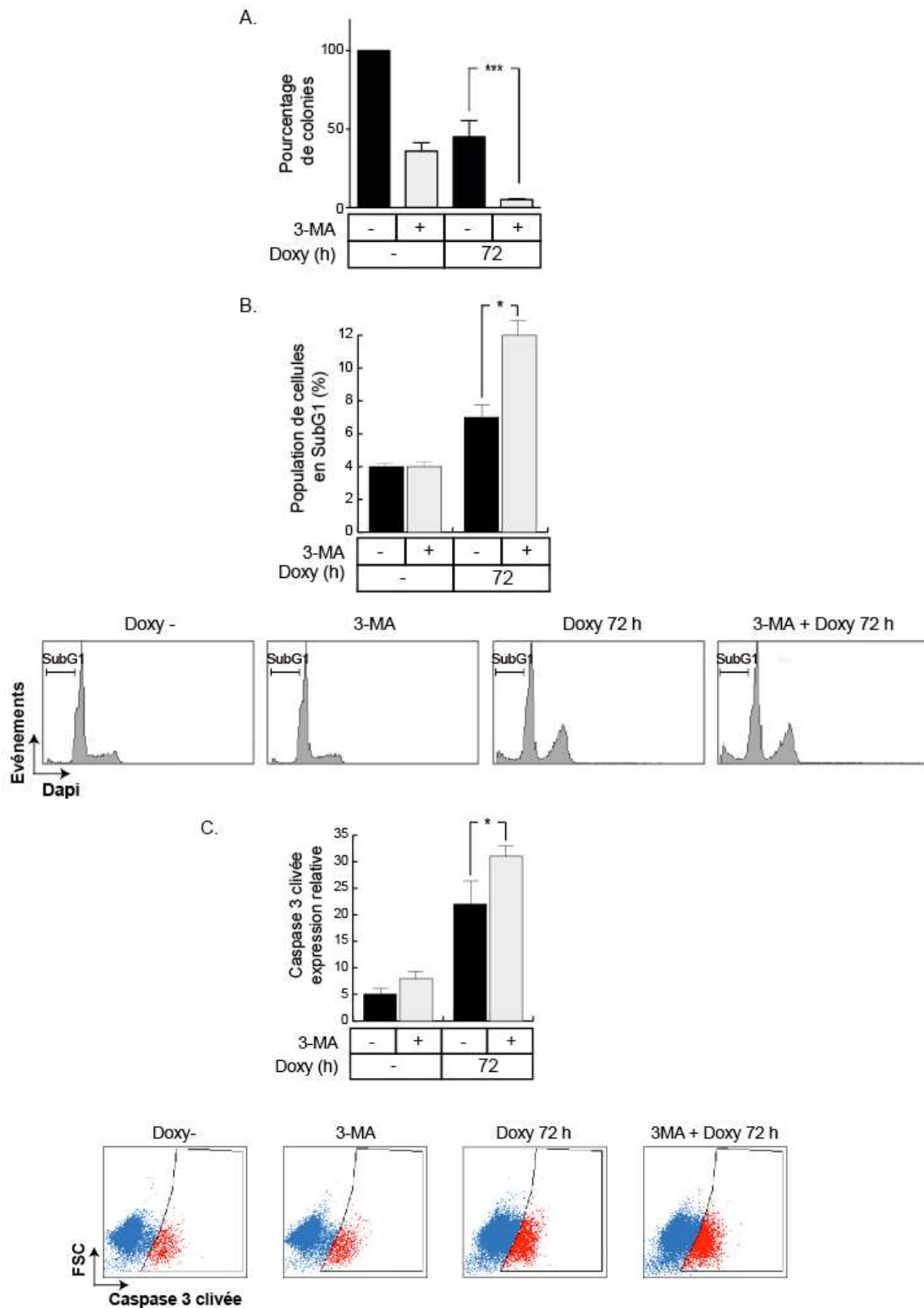


Figure 23 | Mesure de l'effet de l'inhibition de l'autophagie sur l'apoptose. A. Test de clonogénicité réalisé sur un ensemencement de 500 cellules. Les cellules sont induites pour H-RasV12 avec 50ng.mL^{-1} de doxycycline et traitées avec 3mM de 3-MA pendant 8 jours, puis les colonies formée sont colorées à l'aide de crystal violet et comptées ($n=3$). **B et C.** H-RasV12 est induit avec 50ng.mL^{-1} de doxycycline pendant 72 heures. 36 heures après l'ajout de doxycycline, les cellules sont traitées avec du 3-MA à 5mM. Les cellules sont fixées puis le cycle cellulaire est analysée à l'aide d'un marquage dapi, analysé par cytométrie en flux. Les histogrammes sont représentatif de trois expériences (**B**). En parallèle, les cellules sont également marquées à l'aide d'un anticorps dirigé contre la caspase 3 clivée, puis quantifiées par cytométrie en flux. Les histogrammes sont représentatifs de trois expériences (**C**).

Ainsi, l'inhibition de l'autophagie lors de l'expression de Ras a pour conséquence de diminuer la population de cellule sénescentes et de favoriser une augmentation de l'apoptose.

II. NF-κB2 intervient dans l'établissement du phénotype de sénescence induit par Ras

Etant donné que les facteurs de transcription NF-κB peuvent favoriser l'entrée en sénescence des cellules en réponse à des dommages de l'ADN, nous nous sommes interrogés sur le rôle de cette famille dans la réponse à l'expression de Ras. L'analyse par western blot montre que l'expression de Ras conduit à une augmentation de l'expression de NF-κB2 et RelB dans le noyau, tandis que l'expression de p50, RelA et c-Rel ne varie pas (figure 24). Toutefois, nous pouvons noter que l'induction de la forme clivée de NF-κB2, p52, n'est pas associée à une diminution de l'expression du précurseur p100 suite à l'expression de Ras. Ceci peut s'expliquer par le fait que p52 est capable d'exercer un rétrocontrôle positif sur sa propre activation, puisque le gène NF-κB2 est lui-même un gène cible des facteurs NF-κB (Liptay et al, 1994; Barré et al, 2010). Il en résulte une boucle d'amplification qui offre une première activation de NF-κB2, en parallèle de son activation par la voie alternative habituelle. D'autre part, nous avons montré une forte augmentation de l'expression transcriptionnelle de p100 dans les cellules exprimant Ras par rapport aux cellules contrôles (figure 25).

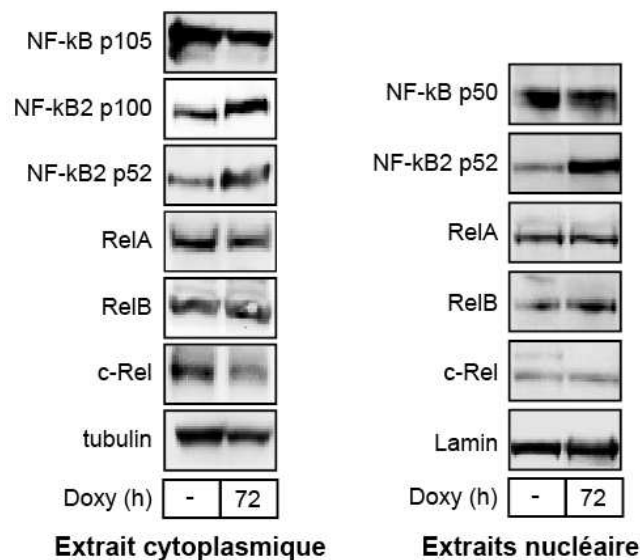


Figure 24 | Mesure de l'expression des membres NF-κB après induction de Ras. H-RasV12 est induit avec 50ng.mL⁻¹ de doxycycline pendant 72 heures, puis les extraits cytoplasmiques et nucléaires sont analysés par western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre les différentes sous-unités (n=3).

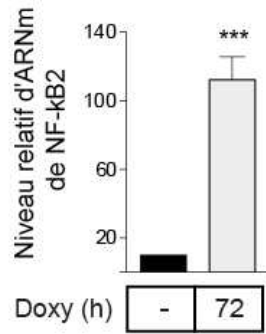


Figure 25 | Mesure de l'expression de NF-κB2 après induction de Ras. H-RasV12 est induit avec 50ng.mL⁻¹ de doxycycline pendant 72 heures, puis le niveau d'expression de l'ARNm de NF-κB2 est analysé par PCR quantitative. Le résultat est exprimé par rapport à l'expression de ces mêmes gènes dans des cellules contrôles non-induites et normalisé à RPLPO (n=3).

L'expression de NF-κB a été reliée au phénotype de sénescence en contrôlant notamment les facteurs du SASP (Yuchen Chien, 2011; White, 2012). D'autre part, l'activation de NF-κB2 a été rattachée à une augmentation du niveau d'autophagie dans un contexte de dommages de l'ADN (Barré & Perkins, 2010a). Nous avons cherché à savoir si l'activation de NF-κB2 pouvait être impliquée dans l'induction de la sénescence induite par Ras. Pour cela, nous avons inactivé NF-κB2 par siRNA et mesuré le niveau de sénescence après expression de Ras. La figure 26A montre l'extinction de NF-κB2 après siRNA. La figure 26B montre que l'index de sénescence est augmentée suite à l'induction de Ras, et de manière surprenante, que la perte de NF-κB2 conduit à une augmentation plus importante de cet index lors de l'expression de Ras. Ce résultat suggère un rôle de NF-κB2 en tant que répresseur de la sénescence induite par l'oncogène.

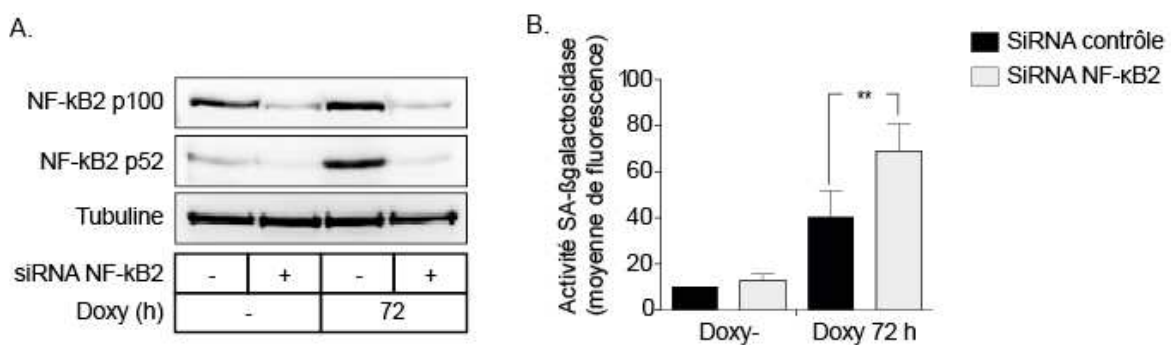


Figure 26 | Mesure de la sénescence après extinction de l'expression de NF-κB2 et induction de Ras. A. et B. Les cellules sont transfectées avec un siRNA dirigé contre NF-κB2 ou avec un siRNA contrôle pendant 24 heures. H-RasV12 est induit dans les cellules à l'aide de 50 ng.ml⁻¹ de doxycycline pendant 72 h. Les cellules sénescentes sont mesurée par cytométrie en flux (B.) et les extraits totaux sont analysés par western blot (A.) (n=3).

III. Le complexe NF-κB2/RelA régule l'autophagie et participe à l'établissement de la sénescence induite par Ras

A. Approche globale

Avec les résultats précédemment obtenus et le rôle apparent de NF-κB2 dans la régulation des mécanismes suppresseurs de tumeur, nous avons souhaité faire une étude globale du rôle de NF-κB2 dans notre modèle. En collaboration avec le Professeur Alain Nepveu, nous avons réalisé des expériences de ChIP-on-chip. Il s'agit d'un large criblage du génome humain à partir d'une immunoprécipitation d'un facteur de transcription suivie d'une ligation par PCR et d'un clonage. Il a ainsi été réalisé une expérience de ChIP dirigée contre NF-κB2 à la suite d'une induction de l'expression de Ras ou non. Les régions de l'ADN fixées par NF-κB2 ont été analysées sur puces, qui sont constituées d'amorces couvrant les sites d'initiation de la transcription (-200 +800 pb) de 18 660 gènes humains. Ceci nous a permis d'identifier 1374 gènes cibles potentiels de NF-κB2 (figure 27).

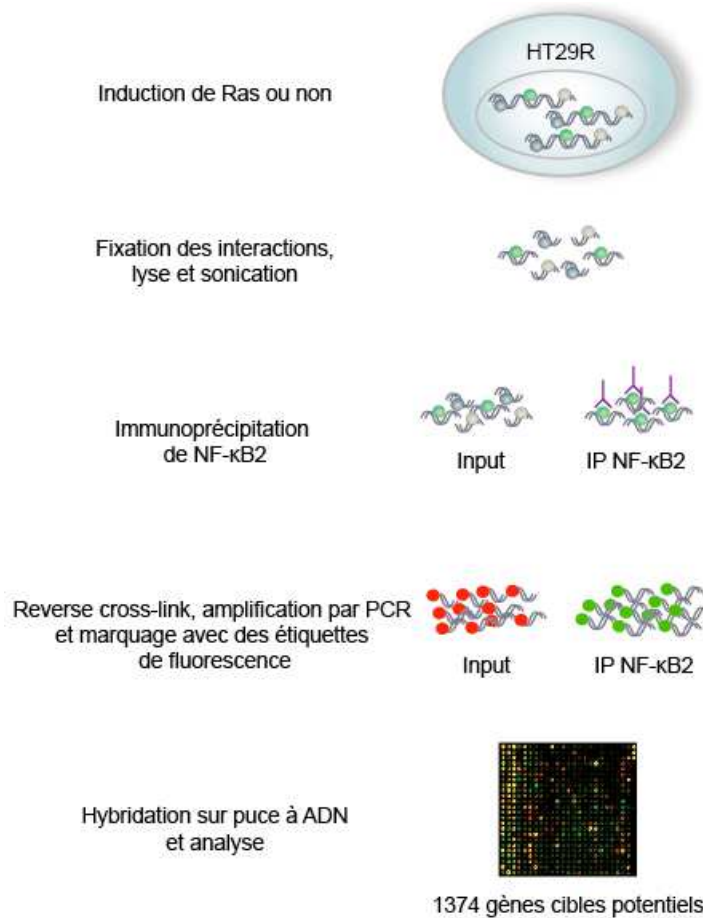


Figure 27 | Schéma de la technique du ChIP-on-chip. H-RasV12 est induit dans les cellules à l'aide de 50 ng.ml⁻¹ de doxycycline pendant 60 h. Après la fixation des interactions, NF-κB2 est immunoprécipité à partir de la chromatine. Des bouts francs d'ADN sont générés et amplifiés par PCR, puis les échantillons sont marqués avec des étiquettes de fluorescence et hybridés sur une puce à ADN.

Pour analyser ces résultats, nous avons utilisé le système de classification Panther qui trie les gènes donnés en s'appuyant sur la base de donnée de Gene Ontology. Les différents gènes cibles potentiels de *NF-κB2* sont classés selon leurs implications dans divers mécanismes biologiques : la signalisation, le développement, le cycle cellulaire, le métabolisme, le système immunitaire, la structure de la cellule, l'adhésion et la mort cellulaire. La répartition des gènes cibles potentiels de *NF-κB2* appartenant à ces différents processus cellulaires est représentée dans la figure 28.

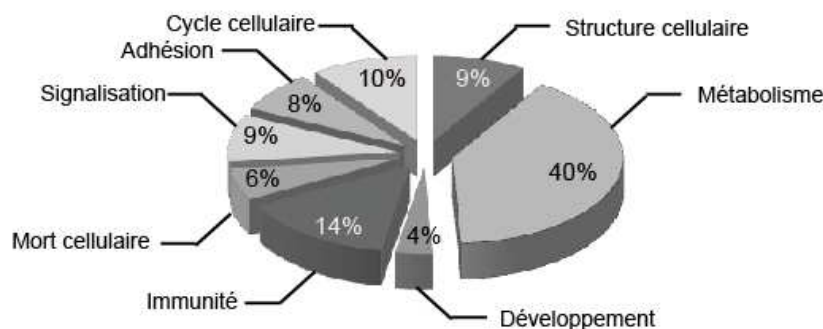


Figure 28 | Répartition des gènes cibles potentiels de *NF-κB2* lors de l'expression ou non de Ras.

Parmi les différents gènes cibles potentiels du facteur de transcription, 6% sont impliqués dans la mort cellulaire. De manière intéressante, nous retrouvons dans cette catégorie des gènes de l'autophagie, des gènes de réparation, mais également des gènes de survie représentés dans le tableau 3.

Tableau 3 | Gènes cibles potentiels de *NF-κB2* intervenant dans l'autophagie

Autophagie	Gènes cibles potentiels de <i>NF-κB2</i>
Complexe ULK1	ULK1, GBL, FOXO3A
Complexe PI3KC3-BECN1	BECN1, BCL2, BCL2L1, MCL1, UVRAG
Complexe SH3GL1B1	SH3GL1B2
Complexe ATG2-WIPI	WDR45L
Système de conjugaison ubiquitine-like	ATG3, ATG5, ATG7, ATG9A, ATG9B
Famille ATG8	GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2
Protéines partenaires de ATG8	p62/SQSTM1, FYCO1

Autophagie	Gènes cibles potentiels de NF-κB2
Protéines du trafic vésiculaire	NSF, GOSR1, UNC13D, UNC93B1, CLN3, VPS11, VPS13c, VPS16, VPS25, VPS35, VPS45A
Complexe AMPK	PRKAG1, PRKAG2

Nous avons montré dans la première partie de ce chapitre que l'autophagie était importante dans notre modèle puisque qu'elle était induite suite à l'expression de Ras, et que cette induction participe à l'établissement de la sénescence. Il est important de noter que les gènes de l'autophagie qui ont été identifiés à partir du ChIP-on-chip, sont précisément des gènes dont nous avons vu l'expression transcriptionnelle augmenté en réponse à l'expression de Ras. Au vu de ces données, nous avons voulu déterminer si ces gènes pouvaient être des cibles transcriptionnelles de NF-κB2.

B. NF-κB2 et RelA régulent de manière opposée les gènes de l'autophagie après induction de Ras

Dans un premier temps, nous avons étudié par une analyse bio-informatique (Genomatix), les sites potentiels de fixation de NF-κB2 sur les promoteurs des gènes de l'autophagie. Cette analyse nous permet d'obtenir des informations sur le nombre de séquences consensus de fixation de NF-κB2 présents sur le promoteur et si ces séquences sont proches du site d'initiation, région d'ancrage de l'ARN polymérase et de départ de la transcription. Nous avons pu observer plusieurs sites de fixation du facteur de transcription sur le promoteur des gènes d'autophagie, désignant ceux-ci comme des cibles transcriptionnelles potentielles de NF-κB2 (tableau 4).

Tableau 4 | Sites prédictifs de fixation de NF-κB2 sur les gènes d'autophagie.

Gènes	Sites de liaison de NF-κB
ULK1	-2029/-2015 ; -2967/-2953
ATG3	-988/-976 ; -3277/-3265
ATG4A	-2205/-2191 ; -2840/-2826 ; -3116/-3102 ; -3446/-3432 ;
ATG5	-2365/-2353 ; -4252/-4241 ; -4332/-4320 ; -4334/-4322 ; -5018/-5006 ; 5699/-5687

ATG7	-542/-530 ; -1762/-1750 ; -1839/-1827 ; -4255/-4243 ; -5129/-5117 ; -5499/-5487 ; -5830/-5818
Beclin1	-1468/-1454 ; -1929/-1915 ; -2191/-2177 ; -2892/-2876 ; -3229/-3215 ; -3308/-3294 ; -3841/-3827 ; -4033/-4019 ; -4320/-4306 ; -4321/-4307 ; -4670/-4656
GABARAPL1	-1176/-1162 ; -2587/-2573 ; -2851/-2837 ; -4272/-4258 ; -4373/-4359 ; -4445/-4431
Skp2	-243/-226 ; -1716/-1704 ; -2879/-2867

Dans un deuxième temps, nous avons voulu étudier le rôle de NF-κB2 sur l'autophagie dans notre modèle cellulaire. Pour cela, nous avons inactivé NF-κB2 par siRNA puis, par western blot, nous avons analysé l'expression protéique de LC3 suite à l'induction de Ras (figure 29). Sur ces images, seule la bande correspondant à LC3-II est visible et quantifiée (valeurs représentée en dessous du blot). Cette expérience nous permet d'observer une expression de LC3-II 10 fois supérieure suite à l'expression de Ras comparé au contrôle. Néanmoins, l'inhibition de NF-κB2 conduit à une expression de LC3-II 30 fois supérieure. Ce résultat nous indique, de manière inattendue, que NF-κB2 est un répresseur de l'autophagie en réponse à Ras. Or, NF-κB2 est surtout décrit comme activateur de l'autophagie en réponse aux dommages de l'ADN.

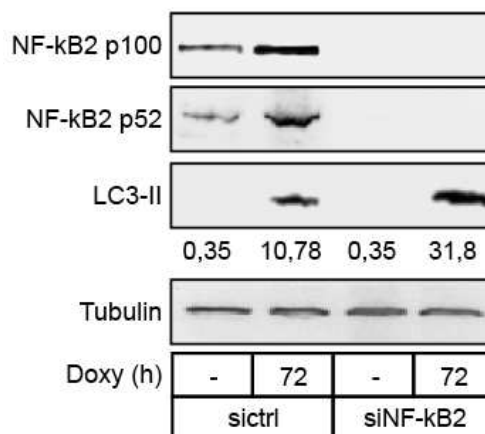


Figure 29 | Mesure de l'autophagie après extinction de l'expression de NF-κB2. Les cellules sont transfectées avec un siRNA dirigé contre NF-κB2 ou avec un siRNA contrôle pendant 24 heures. H-RasV12 est induit dans les cellules à l'aide de 50 ng.ml⁻¹ de doxycycline pendant 72 h. Les extraits totaux sont ensuite analysés par western blot (n=3).

Ceci pourrait s'expliquer par l'interaction avec différents cofacteurs. En effet, les sous-unités NF-κB sont capables de former des hétérodimères entre elles, et la composition du dimère régit sa fonction. Les modifications post-traductionnelles des facteurs de transcription NF-κB peuvent modifier la composition du dimère. La phosphorylation de NF-κB2 sur la sérine 222 est par exemple associée à la formation d'hétérodimères p52/RelA et p52/c-Rel (Barré & Perkins, 2010a). Nous nous sommes intéressés à cette modification post-traductionnelle de NF-κB2, et nous avons observé une augmentation de la phosphorylation sur la sérine 222 suite à une induction de Ras (figure 30).

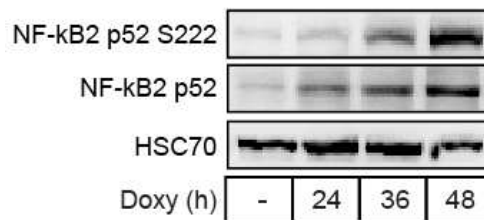


Figure 30 | Analyse de la phosphorylation de NF-κB2 sur la sérine 222 après induction de Ras. H-RasV12 est induit avec 50ng.mL⁻¹ de doxycycline pendant 24, 36 ou 48 heures, puis les extraits totaux sont analysés par western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre la forme phosphorylée et la forme totale de NF-κB2 (n=3).

Par ailleurs, RelA est décrit comme un activateur de l'autophagie puisqu'il est capable de se fixer sur le promoteur de *Beclin1* afin d'activer sa transcription (Copetti et al, 2009). Afin de déterminer si la voie d'activation classique de NF-κB régule l'autophagie en réponse à Ras, nous avons évalué le niveau d'autophagie suite à l'extinction de RelA par siRNA. Nous avons ainsi observé que suite à l'augmentation 20 fois supérieure de LC3-II après l'expression de Ras, l'inhibition de RelA conduit à une baisse de l'expression de LC3-II, correspondant à une expression 9 fois supérieure au contrôle (figure 31).

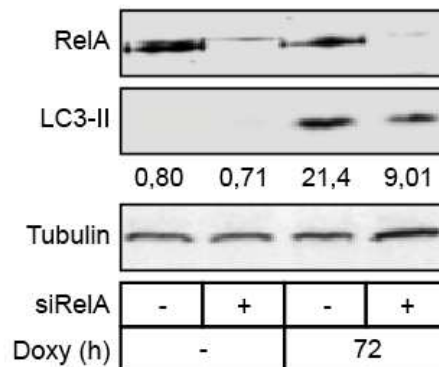


Figure 31 | Mesure de l'autophagie après extinction de l'expression de RelA. Les cellules sont transfectées avec un siRNA dirigé contre RelA ou avec un siRNA contrôle pendant 24 heures. H-RasV12 est induit dans les cellules à l'aide de 50 ng.ml⁻¹ de doxycycline pendant 72 h. Les extraits totaux sont ensuite analysés par western blot (n=3).

Contrairement à p52 et comme décrit dans la littérature, RelA a un rôle d'activateur de l'autophagie que nous avons validé dans notre modèle. L'analyse en parallèle des vésicules d'autophagie par microscopie nous permet de valider ces données. En effet, la perte de NF-κB2 lors de l'induction de Ras conduit à une augmentation du marquage LC3, tandis que la perte de RelA entraîne une diminution du marquage des vésicules comparé aux cellules transfectées avec un siRNA contrôle (figure 32). Néanmoins, la quantification du marquage montre une augmentation de la taille des vésicules lors de la perte de NF-κB2 tandis que le nombre de vésicules diminue.

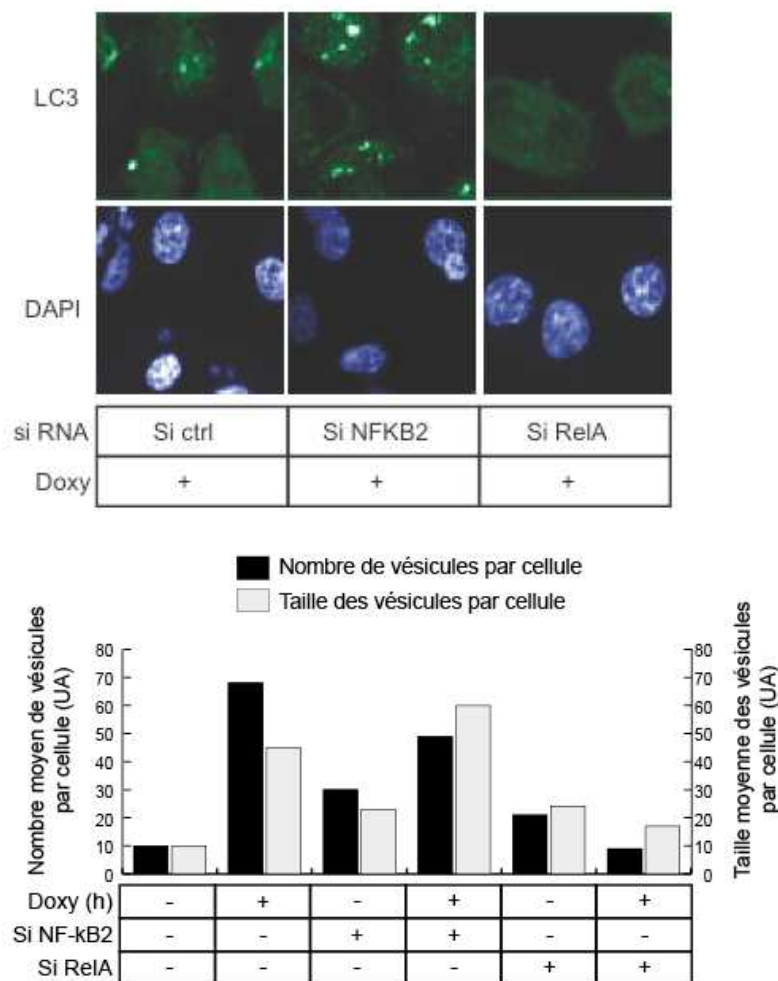


Figure 32 | Mesure de l'autophagie par microscopie après extinction de l'expression de NF-κB2 et de RelA. Les cellules sont transfectées avec un siRNA dirigé contre NF-κB2 ou RelA ou avec un siRNA contrôle pendant 24 heures. H-RasV12 est induit dans les cellules à l'aide de 50 ng.ml⁻¹ de doxycycline pendant 72 h. Les cellules sont marquées à l'aide d'un anticorps dirigé contre LC3 puis analysées par microscopie confocale et à l'aide du logiciel Image (n=1).

Nous avons vu que l'autophagie est induite de manière transcriptionnelle en réponse à Ras. Avec les données du CHIP-on-chip, nous nous sommes demandés si NF- κ B2 et RelA pouvaient être des régulateurs transcriptionnels de l'autophagie. Nous avons observé l'expression des gènes de l'autophagie suite à l'extinction de NF- κ B2 ou de RelA lors d'une induction de Ras par PCR quantitative. Comme attendu, la figure 33 montre une augmentation de la transcription des gènes *ATGs* comme *ULK1*, *ATG2A*, *BECN1* et *GABARAP* suite à la perte de NF- κ B2 lors d'une induction de Ras, tandis que ces mêmes gènes sont réprimés lors de l'inactivation de RelA.

Facteur d'amplification	sip52 dox+ / ctrl dox+	Significativité statistique	siRelA dox+ / ctrl dox+	Significativité statistique
ULK1	+80%	**	-35%	**
ATG2A	+65%	***	-40%	***
MAP1LC3	+51%	***	-15%	*
SQSTM1	+92%	*	-25%	**
BECN1	+60%	*	-37%	***
GABARAP	+114%	*	-21%	***
GABARAPL1	+100%	**	-20%	**

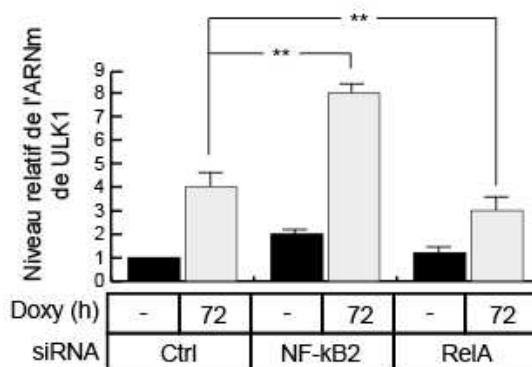


Figure 33 | Expression des gènes d'autophagie après extinction de l'expression de NF- κ B2 et de RelA. Les cellules sont transfectées avec un siRNA dirigé contre NF- κ B2 ou RelA ou avec un siRNA contrôle pendant 24 heures. H-RasV12 est induit dans les cellules à l'aide de 50 ng.ml⁻¹ de doxycycline pendant 72 h puis le niveau d'expression de l'ARNm des gènes d'autophagie est analysé. Le résultat pour ULK1 est exprimé par rapport à l'expression de ces mêmes gènes dans des cellules contrôles non-induites et normalisé à un gène de ménage. Le tableau représente le pourcentage d'activation ou de répression des gènes par rapport au siRNA contrôle (n=3).

Afin de déterminer si cette activation ou répression de l'autophagie par NF- κ B2 ou RelA se faisait de manière directe, par fixation de ces facteurs de transcription sur le promoteur des gènes, nous avons réalisé une immunoprécipitation de chromatine de NF- κ B2 ou de RelA suite à une induction de Ras. L'analyse de ce CHIP a été faite par PCR classique déposée sur gel d'agarose. Nous avons tout d'abord observé le recrutement de NF- κ B2 et de RelA sur le promoteur des gènes *ULK1*, *ATG2A*, *BECN1* et *GABARAP* et *GABARAPL1* dans les cellules qui n'expriment pas Ras,

tandis qu'aucune liaison de l'immunoprécipitation contrôle est observée et qu'aucun de ces facteurs est recruté sur le promoteur du gène contrôle (figure 34). Lors de l'induction de Ras, nous avons observé une augmentation du recrutement à la fois de NF-κB2 et de RelA sur le promoteur des gènes *ULK1*, *ATG2A*, *BECN1* et *GABARAP* et *GABARAPL1*. Ce recrutement de NF-κB2 et RelA s'accompagne également d'une augmentation du recrutement de l'ARN polymérase phosphorylée sur la sérine 5, indiquant l'activation de la transcription de ces gènes. Ces deux facteurs sont donc tous les deux recrutés sur les gènes de l'autophagie en réponse à l'expression de Ras.

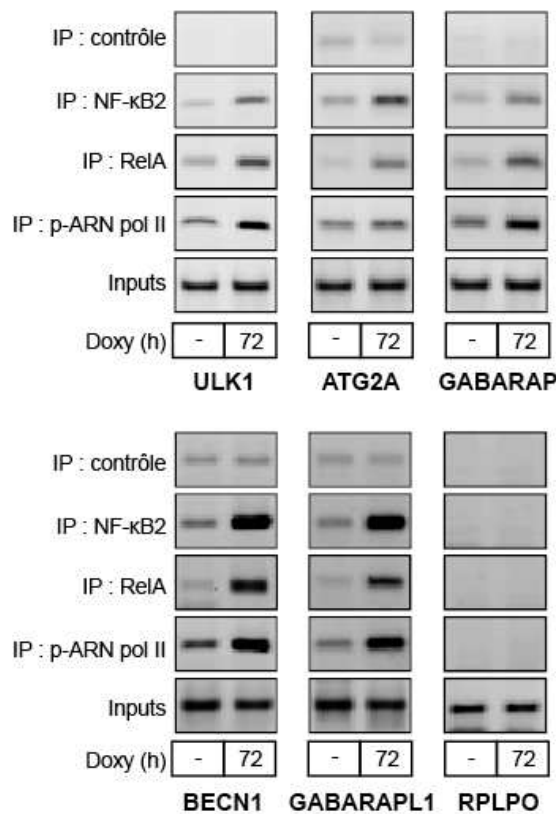


Figure 34 | NF-κB2 et RelA sont présents sur le promoteur des gènes de l'autophagie. H-RasV12 est induit dans les cellules à l'aide de 50 ng.ml⁻¹ de doxycycline pendant 72 h. La chromatine soluble est préparée puis immunoprécipitée avec un anticorps dirigé contre NF-κB2 ou RelA, ou contre une immunoglobuline contrôle. L'ADN est amplifié en utilisant une paire d'amorces qui couvre le site de liaison de NF-κB2 sur les différents promoteurs. Le ChIP est ensuite analysé par PCR déposée sur gel d'agarose. RPLPO est utilisé comme gène de contrôle (n=3).

Nous avons ensuite cherché à savoir si NF-κB2 et RelA sont présents au sein d'un seul et même complexe ou au contraire de complexes NF-κB distincts sur le promoteur de ces gènes. Nous avons observé une augmentation de l'interaction de ces deux facteurs de transcription suite à l'induction de Ras (figure 35). Il est à souligner que cette interaction entre p52 et RelA se produit sans aucune augmentation de l'expression de RelA contrairement à p52 lors d'une induction de Ras.

De plus, nous avons réalisé une immunoprécipitation de NF-κB2 afin d'identifier les partenaires par spectrométrie de masse. A l'aide de l'équipe du Dr Catherine Guette, nous avons identifié RelA avec trois peptides au lieu de deux lors d'une induction de Ras, confirmant une interaction plus importante entre NF-κB2 et RelA en réponse à Ras.

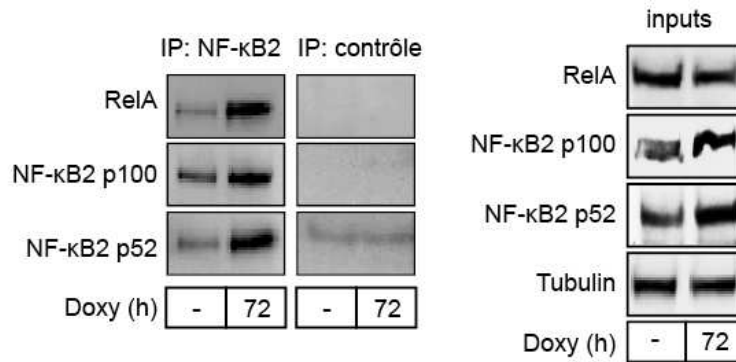


Figure 35 | Analyse de l'interaction entre NF-κB2 et RelA après induction de Ras. H-RasV12 est induit avec 50ng.mL⁻¹ de doxycycline pendant 72 heures, puis NF-κB2 est immunoprécipité à l'aide d'un anticorps spécifique en parallèle d'une immunoglobuline contrôle. Le résultat de l'immunoprécipitation est ensuite analysée par western blot (n=3).

Nous avons ensuite réalisé des expériences de Re-ChIP afin d'étudier la formation du complexe sur l'ADN. Il s'agit de réaliser une première immunoprécipitation de chromatine à l'aide d'un anticorps dirigé contre RelA, d'effectuer une élution au DTT afin de dénaturer l'anticorps primaire, avant de réaliser un second cycle d'immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps dirigé cette fois-ci contre NF-κB2. Cette expérience a également été réalisée en sens inverse en immunoprécipitant en premier NF-κB2 puis en second RelA. Tout d'abord, la figure 36A que lors de l'utilisation d'un anticorps contrôle pendant le second cycle d'immunoprécipitation, nous n'observons pas de recrutement sur le promoteur des gènes *ULK1*, *ATG2A*, *BECN1*, *GABARAP* et *GABARAPL1*, et aucun recrutement non plus sur le promoteur du gène contrôle. En revanche, nous avons observé une augmentation du recrutement des complexes RelA/p52 et de p52/RelA sur les promoteurs des gènes *ULK1*, *ATG2A*, *BECN1*, *GABARAP* et *GABARAPL1* suite à une induction de Ras, tandis qu'aucun recrutement est observé sur le gène contrôle. De plus, une expérience de Re-ChIP entre l'ARN polymérase et p52 ou RelA a permis d'observer une augmentation des complexes p52/ARNpol et RelA/ARNpol sur le promoteur de ces mêmes gènes lors d'une induction de Ras (figure 36B). Ces résultats suggèrent la formation d'un complexe p52/RelA activateur des gènes d'autophagie en réponse à l'oncogène.

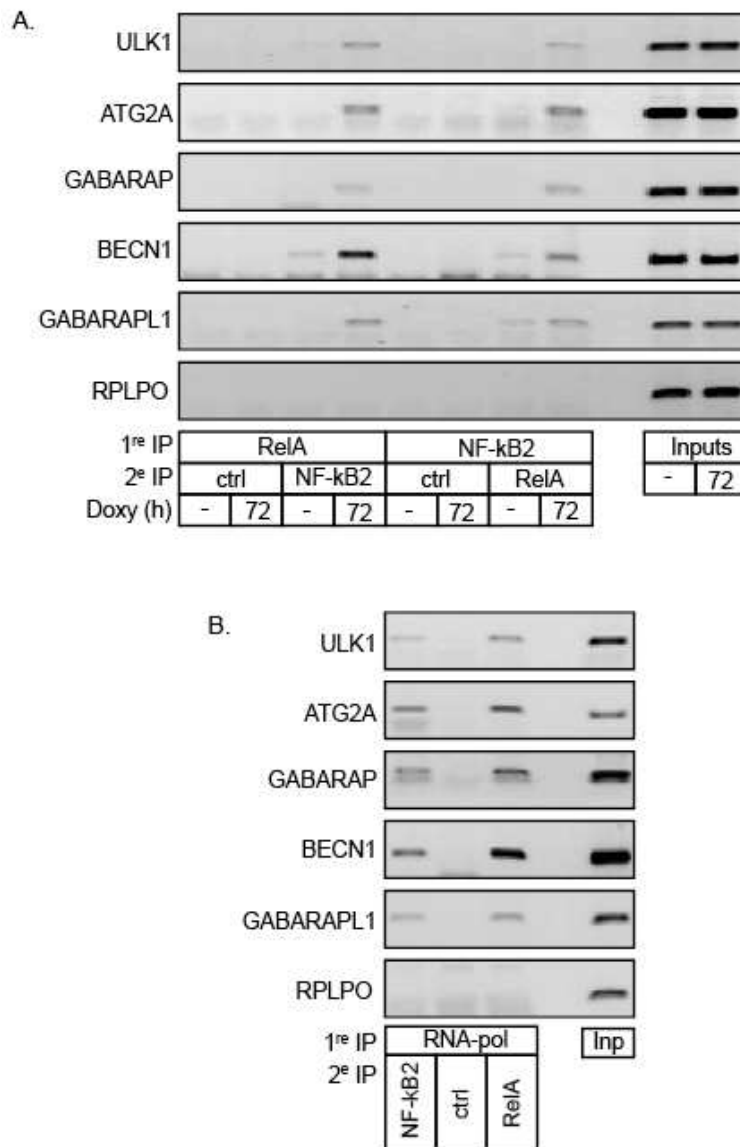


Figure 36 | Le complexe NF-κB2/RelA est présent sur le promoteur des gènes de l'autophagie. H-RasV12 est induit dans les cellules à l'aide de 50 ng.ml⁻¹ de doxycycline pendant 72 h. La chromatine soluble est préparée puis immunoprécipitée avec un anticorps dirigé comme indiqué contre NF-κB2, RelA, l'ARN polymérase, ou contre une immunoglobuline contrôle. Un deuxième cycle d'immunoprécipitation est ensuite effectué à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines indiquées. Le Re-ChIP est ensuite analysé par PCR déposée sur gel d'agarose (n=3)

En conclusion, ces données nous indiquent que l'expression de Ras conduit à l'activation de NF-κB2 qui apparaît comme un répresseur de l'autophagie. Toutefois, p52 forme un complexe avec RelA et cet hétérodimère est recruté sur les gènes d'autophagie afin d'activer leurs transcriptions. L'autophagie est ainsi induite à un niveau optimal, permettant de favoriser l'entrée en sénescence des cellules.

Chapitre 2

NF- κ B2 régule l'autophagie lors de la sénescence induite par le sn38

Nous avons vu que l'induction de Ras conduisait à l'activation de NF-κB, et nous avons montré que NF-κB intervenait dans l'établissement de la sénescence. Nous avons souhaité généraliser ce modèle d'activation de NF-κB2 en réponse à la sénescence induite par un autre stress. La génération de dommages de l'ADN est le mécanisme d'action des traitements génotoxiques. L'irinotécan ou CPT-11, est une chimiothérapie actuellement utilisée chez les patients atteints d'un cancer colorectal (Cunningham et al, 2004). Son métabolite actif, le sn38, fonctionne comme inhibiteur des topoisomérases de type I, qui sont des enzymes capables de contrôler la structure topologique de l'ADN en générant des coupures transitoires, puis en ligaturant le brin d'ADN (Pommier, 2006). Le sn38 induit des lésions de l'ADN en bloquant la ligature par les topoisomérases de type I, empêchant la progression du cycle et pouvant conduire à l'entrée en sénescence des cellules (Hynes & MacDonald, 2009). Malheureusement, certaines tumeurs échappent et ne répondent plus à ce traitement. Ce phénomène de résistance des cellules tumorales aux traitements anti-cancéreux est à comprendre afin de cibler ces traitements et d'améliorer la réponse.

I. L'autophagie participe à l'établissement de la sénescence induite par le sn38

Au laboratoire, des précédentes études ont montré l'entrée en sénescence des cellules colorectales en réponse au sn38, ainsi que le rôle de p21 dans l'arrêt du cycle (Vigneron et al, 2008; 2006). Contrairement au modèle cellulaire HT29Ras sur lequel nos travaux se sont basés, la lignée cellulaire colorectale LS174T ne possède pas de mutation de p53 et conserve une protéine totalement fonctionnel. La voie p53-p21 est une voie majeure dans l'induction de la sénescence en réponse à un stress, et son rôle primordial dans l'acquisition d'un phénotype de cellules sénescents en réponse au sn38 est décrit dans les cellules LS174T (Poele et al, 2002; Bhone, 2006). En accord avec la littérature, nous avons observé une augmentation de l'expression de p21 après traitement au sn38 (figure 37A). Nous avons souhaité déterminer le niveau de sénescence de ces cellules et établir un index de sénescence en réponse au traitement. La figure 37B confirme une augmentation de la sénescence qui se traduit par une hausse de l'index de sénescence, détectée par cytométrie en flux.

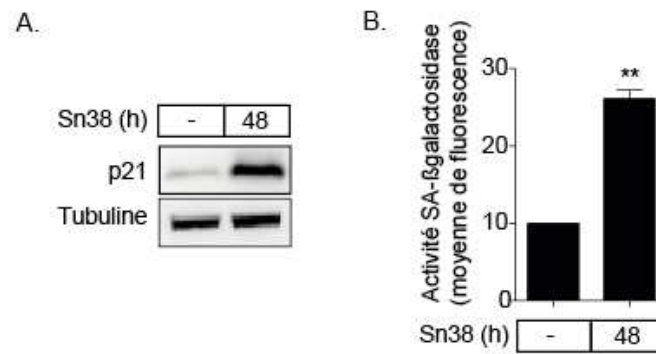


Figure 37 | Mesure de l'index de sénescence dans les cellules LS174T après traitement au sn38. **A.** Les cellules sont traitées ou non avec 5ng/mL de sn38 pendant 48 heures. L'expression protéique de p21 est analysée par western blot avec la tubuline comme contrôle de charge (n=3) **B.** Les cellules sont traitées ou non avec 5ng/mL de sn38 pendant 48 heures puis les cellules sénescents sont marquées et l'index est quantifié par cytométrie en flux. L'histogramme est représentatif de trois expériences.

Nous avons vu dans le premier chapitre des résultats, que l'autophagie participe à l'établissement de la sénescence en réponse à l'oncogène. Ces résultats nous ont amené à étudier le rôle de l'autophagie dans la sénescence induite par le sn38. En observant dans un premier temps l'expression du marqueur de l'autophagie LC3, nous avons montré une lipidation plus importante de ce marqueur en réponse au sn38 (figure 38A). En effet, la forme non lipidée LC3-I se retrouve diminuée tandis que la forme lipidée LC3-II est légèrement augmentée suite au traitement. Nous avons ensuite validé ce résultat par immunofluorescence. Comme attendu, la figure 38B montre une augmentation du marquage LC3 en réponse au sn38. La quantification de ce marquage montre que le nombre et la taille des vésicules sont augmentés, indiquant une augmentation du niveau d'autophagie suite au traitement.

De plus, nous avons vu précédemment que l'induction de l'autophagie pouvait être transcriptionnelle à travers la régulation des gènes d'autophagie. Nous nous sommes donc intéressés à la transcription des ces gènes et nous avons montré que l'expression des gènes tels que *ULK1*, *ATG2A*, *ATG9B*, *GABARAPL1* ou encore *Beclin 1* est augmentée suite au traitement sn38 (figure 39). Il est important de rappeler que ces gènes dont l'expression est augmentée sont des gènes qui interviennent au cours des différentes étapes de la formation de l'autophagosome. L'ensemble de ces résultats indiquent que l'autophagie est activée de manière transcriptionnelle suite au stress induit par le sn38.

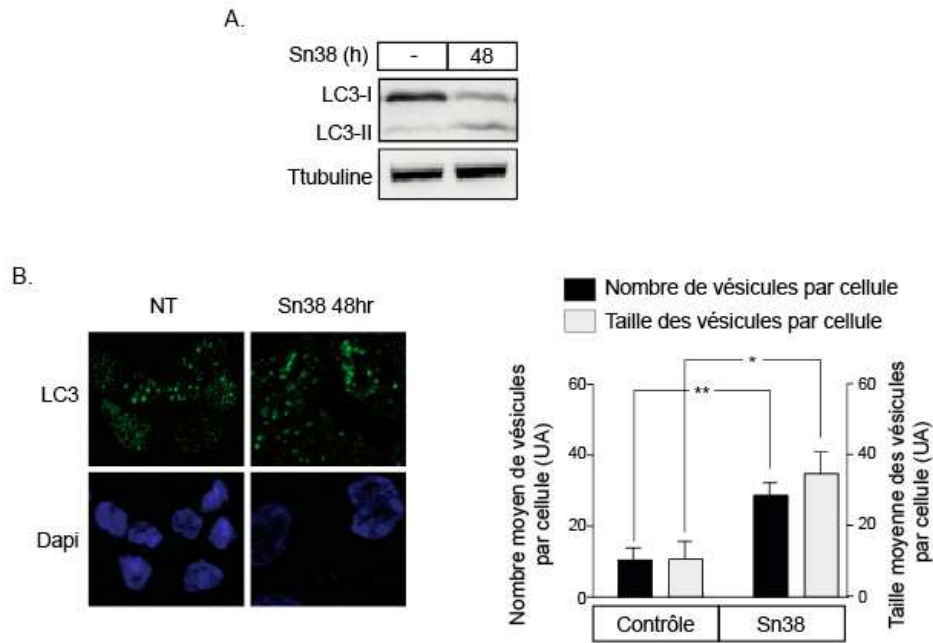


Figure 38 | Mesure de l'expression du marqueur d'autophagie LC3 après traitement au sn38. **A.** Les cellules sont traitées ou non avec 5ng/mL de sn38 pendant 48 heures puis les extraits totaux sont analysés en western blot (n=3). **B.** Les cellules sont traitées ou non avec 5ng/mL de sn38 pendant 48 heures. Les cellules sont ensuite marquées à l'aide d'un anticorps dirigé contre LC3 puis analysées par microscopie confocale et à l'aide du logiciel ImageJ (n=3).

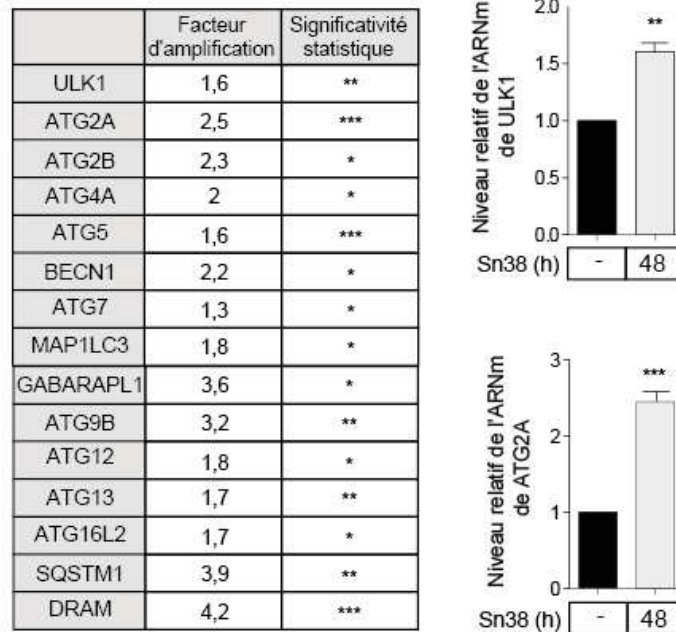


Figure 39 | Activation transcriptionnelle de l'autophagie suite au sn38. Les cellules sont traitées ou non avec 5ng/mL de sn38 pendant 48 heures, puis le niveau d'expression des ARNm des gènes d'autophagie est analysé. Le résultat est exprimé par rapport à l'expression de ces mêmes gènes dans des cellules contrôles non-induites et normalisé à RPLPO (n=3)

De la même façon qu'avec l'oncogène Ras, nous avons voulu préciser le rôle suppresseur de tumeur de l'autophagie observé après sn38. Pour cela, nous avons également utilisé le 3-MA, un inhibiteur de la PI3K de classe III. Nous avons observé que la forme LC3-I est diminuée et la forme LC3-II est faiblement augmentée suite au traitement sn38, ce qui traduit une augmentation de l'autophagie. Nous n'avons observé aucune variation de l'expression de LC3-I et LC3-II lors du traitement 3-MA seul. En revanche, l'expression de LC3-I est augmentée et corrélée à une baisse de l'expression de LC3-II en présence de cet inhibiteur et après traitement au sn38 (figure 40). Ainsi, la lipidation de LC3 est diminuée, ce qui traduit une diminution du niveau d'autophagie dans ces conditions.

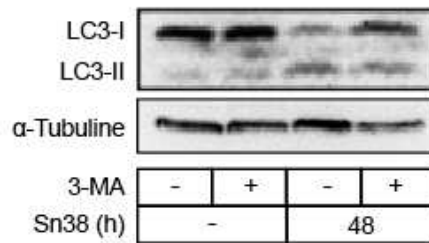


Figure 40 | Mesure de l'effet du 3-MA sur l'autophagie après sn38. Les cellules sont traitées ou non avec 5ng/mL de sn38 et 3mM de 3-MA pendant 48 heures, puis les extraits totaux sont analysés en western blot (n=3).

Nous avons également évalué l'efficacité du 3-MA par immunofluorescence dans ce modèle. Ce marquage de LC3 endogène montre que l'expression de LC3 qui est augmentée après traitement sn38 se retrouve diminuée lors de l'ajout de 3-MA (figure 41). En effet, la quantification de ces images traduit une diminution à la fois du nombre et de la taille des vésicules d'autophagie suite à l'utilisation du 3-MA lors d'un traitement sn38, permettant de valider l'inhibition de l'autophagie.

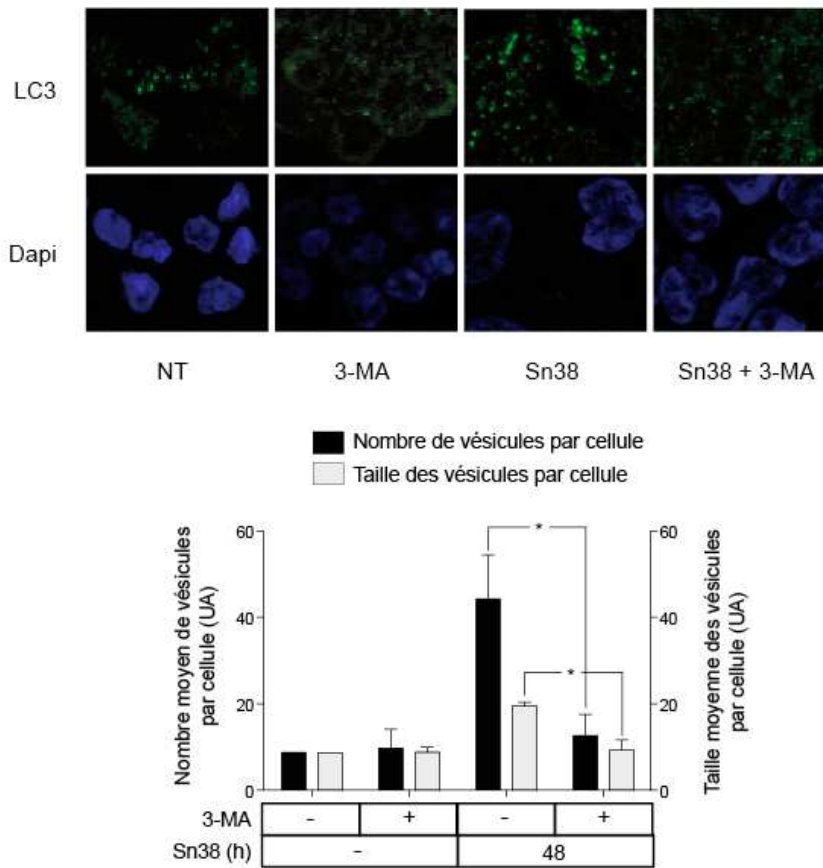


Figure 41 | Mesure de l'effet du 3-MA sur les vésicules d'autophagie après sn38. Les cellules sont traitées ou non avec 5ng/mL de sn38 et 3mM de 3-MA pendant 48 heures, puis les cellules sont fixées, marquées à l'aide d'un anticorps dirigé contre LC3, et analysées par microscopie confocale et à l'aide du logiciel ImageJ (n=3)

Afin de préciser le rôle de l'autophagie, nous avons ensuite étudié l'effet du 3-MA sur la sénescence. Par cytométrie en flux, nous avons observé que l'index de sénescence initialement induit par le sn38 est réduit par le traitement au 3-MA (figure 42).

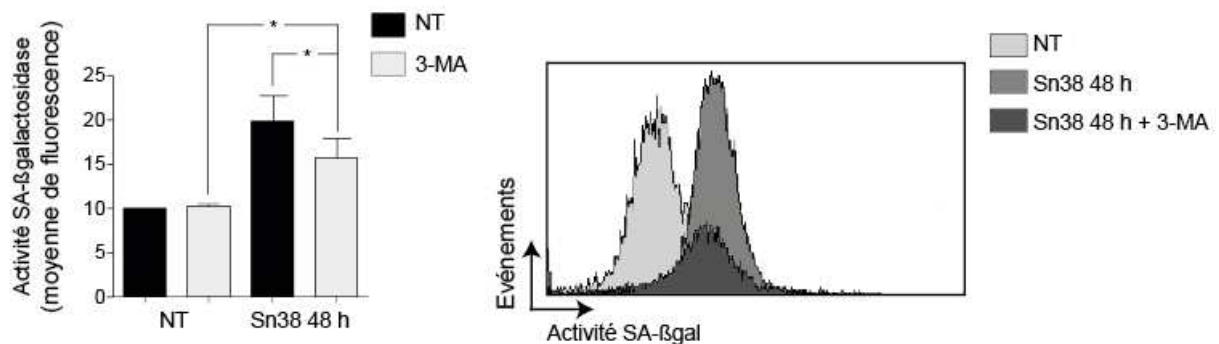


Figure 42 | Mesure de l'effet de l'inhibition de l'autophagie sur l'index de sénescence après sn38. Les cellules sont traitées ou non avec 5ng/mL de sn38 et 3mM de 3-MA pendant 48 heures, puis les cellules sénescents sont marquées et l'index est quantifié par cytométrie en flux (n=3). L'histogramme est représentatif de trois expériences.

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux conséquences de l'inhibition de l'autophagie sur la viabilité des cellules. Nous avons testé l'effet de l'utilisation du 3-MA sur la capacité des cellules à former des colonies. Le test de clonogénicité montre que l'inhibition de l'autophagie entraîne une diminution du nombre de colonies dans les cellules contrôles et les cellules traitées au sn38 (figure 43). L'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux nous a permis d'observer une augmentation de la population en subG1 suite à l'utilisation du 3-MA lors d'un traitement sn38, signifiant un nombre plus important de cellules en arrêt du cycle (figure 44). Nous avons ensuite mesuré l'expression de la caspase 3 clivée par cytométrie en flux. Nous avons observé une augmentation du marquage de la caspase 3 clivée suite au traitement 3-MA comparé aux cellules contrôles (figure 45). Cette figure montre également qu'un traitement sn38 ne semble pas affecter l'expression de la caspase 3 clivée. En revanche, nous avons observé une augmentation du marquage de la caspase 3 clivée suite au traitement conjugué au 3-MA et au sn38. Ainsi, l'inhibition de l'autophagie semble affecter l'activation de la caspase 3 clivée que ce soit avec ou sans traitement sn38.

En conclusion, ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'autophagie lors d'un traitement sn38 a pour conséquence de diminuer la population de cellule sénescents. Néanmoins, il est important de noter que le traitement 3-MA seul conduit à une diminution du nombre de clones de cellules.

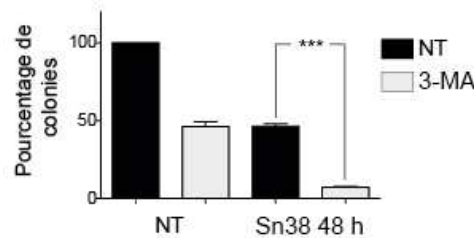


Figure 43 | Test de clonogénicité suite à l'inhibition de l'autophagie après sn38. Test de clonogénicité réalisé sur un ensemencement de 1500 cellules. Les cellules sont traitées avec 5ng.mL⁻¹ de sn38 et 3mM de 3-MA pendant 8 jours, puis les colonies formées sont colorées à l'aide de crystal violet et comptées (n=3).

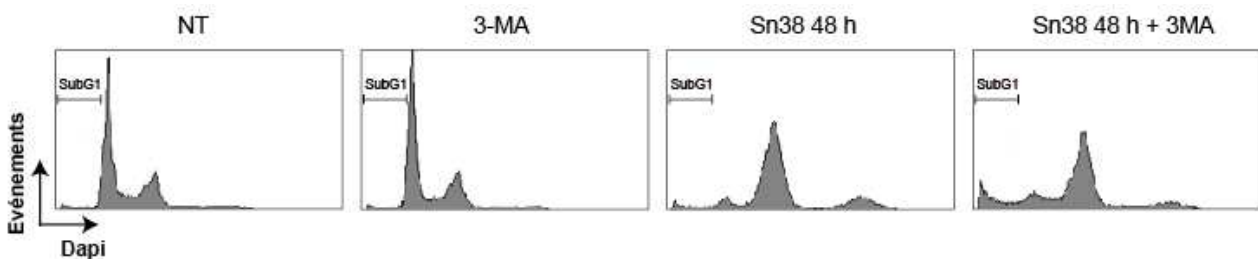


Figure 44 | Mesure de l'effet de l'inhibition de l'autophagie sur le cycle cellulaire après sn38. Les cellules sont traitées ou non avec 5ng/mL de sn38 et 3mM de 3-MA pendant 48 heures, puis les cellules sont fixées et le cycle cellulaire est analysé à l'aide d'un marquage dapi par cytométrie en flux. Les histogrammes sont représentatifs de trois expériences

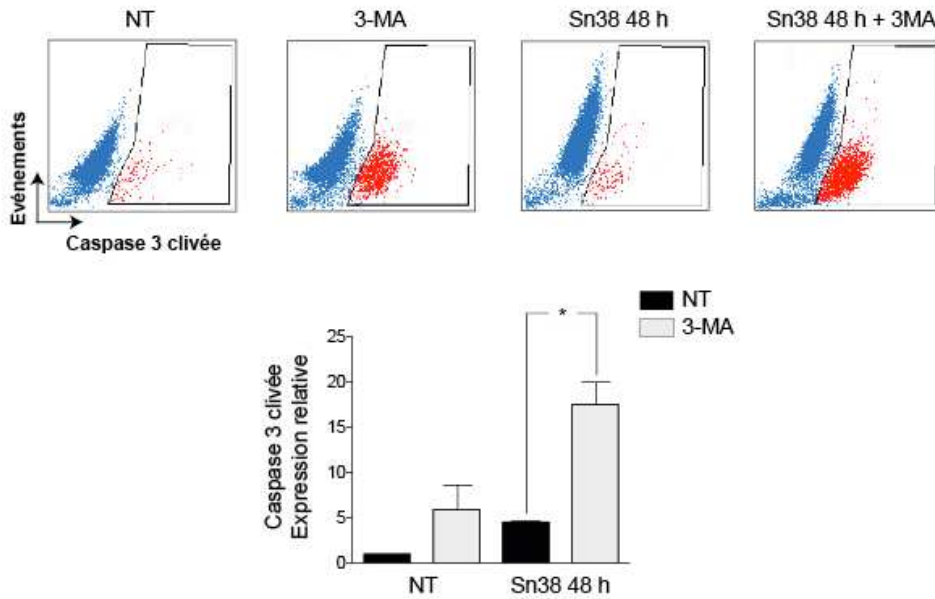


Figure 45 | Mesure de l'effet de l'inhibition de l'autophagie sur l'apoptose après *sn38*. Les cellules sont traitées ou non avec 5ng/mL de *sn38* et 3mM de 3-MA pendant 48 heures, puis les cellules sont fixées et marquées à l'aide d'un anticorps dirigé contre la caspase 3 clivée, et quantifiées par cytométrie en flux (n=3). L'histogramme est représentatif de trois expériences.

II. *NF-κB2* régule la sénescence lors d'un stress génotoxique

Nous avons montré l'activation de la sous-unité *NF-κB2* lors de l'expression de *Ras*, probablement à la suite des dommages de l'ADN induits par l'oncogène. Nous nous sommes demandés si *NF-κB2* pouvait être activé en réponse aux dommages de l'ADN générés par le *sn38*. Nous avons mesuré l'expression de *NF-κB2* par western blot et observé une augmentation de l'expression de p100, et une augmentation modérée du clivage de ce précurseur en sa forme active p52 (figure 46).

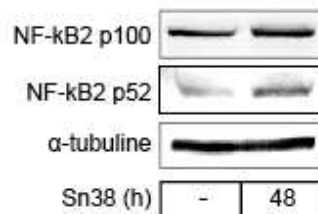


Figure 46 | Mesure de l'expression de *NF-κB2* après *sn38*. Les cellules sont traitées ou non avec 5ng/mL de *sn38* pendant 48 heures, puis les extraits totaux sont analysés en western blot (n=3).

Nous avons ensuite déterminé le rôle de NF-κB2 dans la régulation de l'autophagie. Pour cela, nous avons mesuré le niveau d'autophagie suite à l'inactivation de NF-κB2 par siRNA. La figure 47A montre une augmentation de la forme LC3-II suite à l'inhibition de NF-κB2 lors d'un traitement au *sn38*. Nous avons confirmé ces observations par le marquage de LC3 par immunofluorescence. La figure 47B montre une augmentation du marquage LC3 suite à l'inhibition de NF-κB2 et traitement au *sn38*, qui se traduit essentiellement par une augmentation du nombre de vésicules. Cette expérience nécessite d'être répétée plus de trois fois au vu des écarts types, afin de préciser la variation de ce paramètre. Néanmoins, ces résultats suggèrent que NF-κB2 est également un répresseur de l'autophagie en réponse au *sn38*.

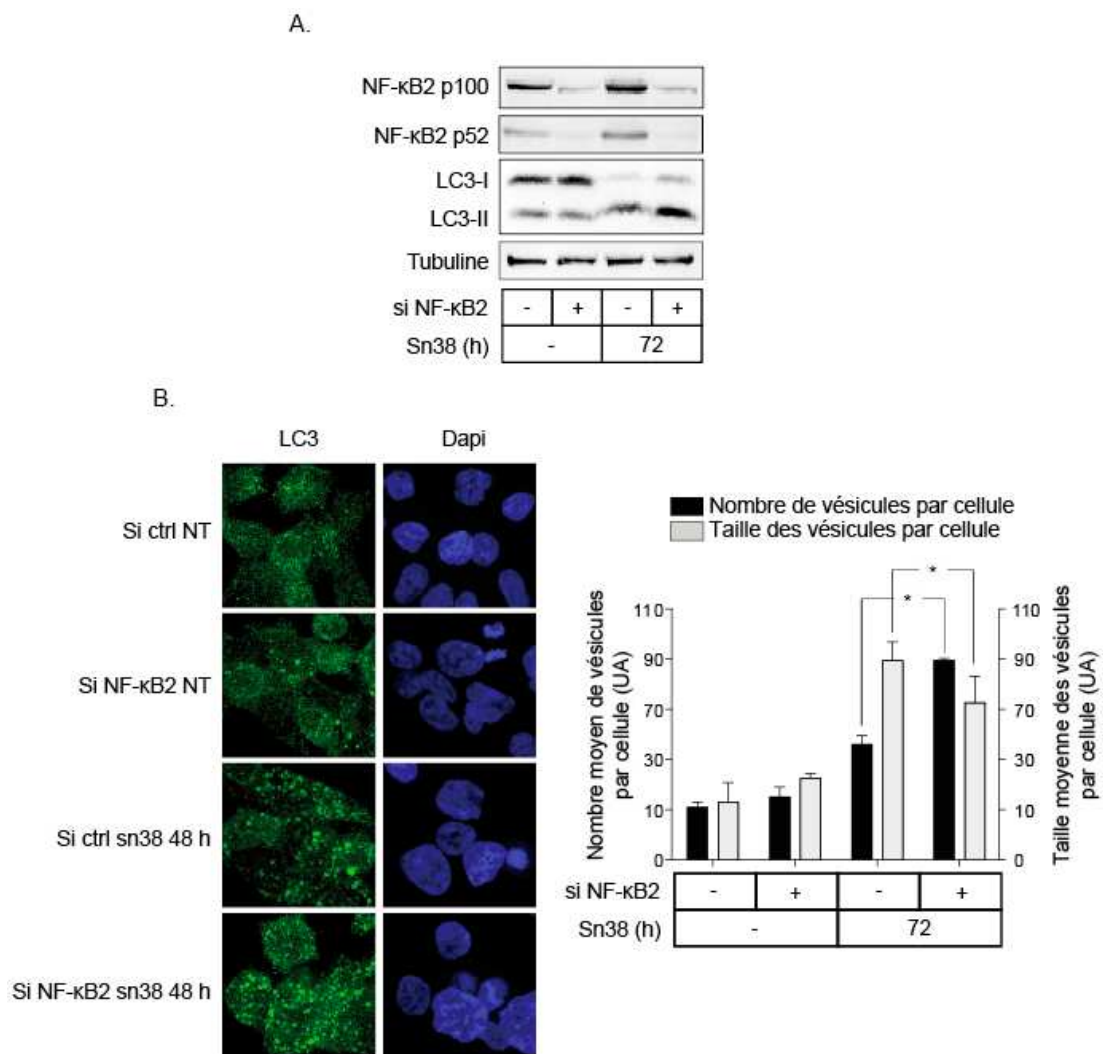


Figure 47 | Mesure de l'expression du marqueur de l'autophagie LC3 après extinction de NF-κB2 et traitement *sn38*. **A** et **B** Les cellules sont transfectées avec un siRNA dirigé contre NF-κB2 ou avec un siRNA contrôlé. 24 heures après, les cellules sont traitées avec 5ng/mL de *sn38* pendant 48 heures. Les extraits totaux sont analysés par western blot (n=3) (**A**). En parallèle, les cellules sont fixées et marquées à l'aide d'un anticorps dirigé contre LC3, et analysées par microscopie confocale et à l'aide du logiciel ImageJ (n=3) (**B**).

Nous avons vu dans le premier chapitre que le niveau d'autophagie est régulé de manière transcriptionnelle par NF-κB2 via l'expression des gènes *ATGs*. Nous nous sommes intéressés à la transcription de ces gènes d'autophagie lors de l'inhibition de NF-κB2 suite au traitement sn38. Comme attendu au vu des résultats précédents, la perte de NF-κB2 après sn38 conduit à une hausse de l'expression des gènes *ATGs* comme *ULK1*, *ATG2A* et *LC3* comparé aux cellules transfectées avec un siRNA contrôle (figure 48).

Facteur d'amplification	ctrl sn38 /sip52 sn38	Statistical significance
ULK1	+31%	**
ATG2A	+44%	***
BECN1	+21%	***
ATG7	+21%	**
MAP1LC3	+14%	***
ATG13	+39%	**
ATG14	+35%	***
SQSTM1	+51%	***
UVRAG	+45%	**

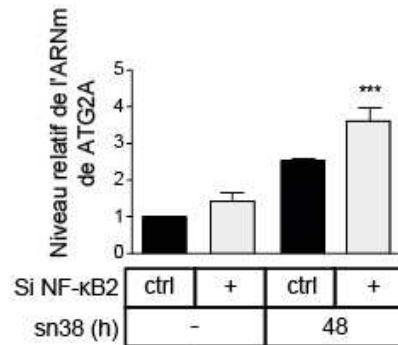


Figure 48 | Mesure de l'expression des gènes de l'autophagie après extinction de NF-κB2 et traitement sn38. Les cellules sont transfectées avec un siRNA dirigé contre NF-κB2 ou avec un siRNA contrôle. 24 heures après, les cellules sont traitées avec 5ng/mL de sn38 pendant 48 heures puis le niveau d'expression des ARNm des gènes d'autophagie est analysé. Le résultat pour ATG2A est exprimé par rapport à l'expression de ces mêmes gènes dans des cellules contrôles non-induites et normalisé à RPLPO. Le tableau représente le pourcentage d'activation ou de répression des gènes par rapport au siRNA contrôle (n=3).

Afin de savoir si cette répression transcriptionnelle de l'autophagie par NF-κB2 se fait par fixation directe du facteur de transcription sur les promoteurs de ces gènes, nous avons effectué des expériences de ChIP. La figure 49 montre une augmentation du recrutement de NF-κB2 sur le promoteur des gènes *ULK1*, *ATG2A*, *ATG7*, *BECN1* et *GABARAPL1*. D'autre part, l'augmentation du recrutement de l'ARN polymérase de type II sur ces promoteurs indique l'activation de la transcription de ces gènes suite au traitement sn38. Ces résultats suggèrent que

lors de l'activation de l'autophagie en réponse au *sn38*, *NF-κB2* est présent sur les promoteurs des gènes de l'autophagie dont la transcription est activée.

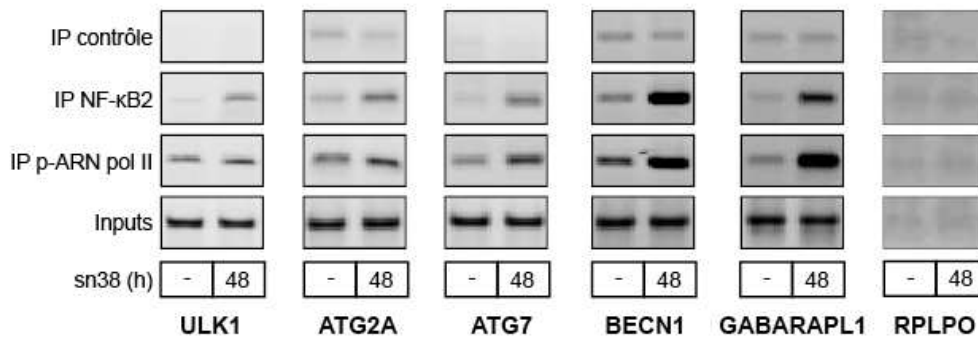


Figure 49 | *NF-κB2* est recruté sur le promoteur des gènes de l'autophagie après *sn38*. Les cellules sont traitées avec 5ng/mL de *sn38* pendant 48h. La chromatine soluble est ensuite préparée puis immunoprécipitée avec un anticorps dirigé contre *NF-κB2*, la polymérase II ou contre une immunoglobuline contrôle. L'ADN est amplifié en utilisant une paire d'amorces qui couvre le site de liaison indiqué de *NF-κB2* sur les différents promoteurs. Le ChIP est ensuite analysé par PCR déposée sur gel d'agarose (n=3).

Nous avons ensuite mesuré la capacité des cellules à former des colonies après l'extinction de *NF-κB2* et un traitement au *sn38*. Les tests de clonogénicité montrent une diminution plus importante du nombre de colonies lorsque *NF-κB2* est inhibé, comparé aux cellules transfectées avec un siRNA contrôle (figure 50). Il est important de noter que la perte de *NF-κB2* affecte fortement la capacité des cellules à former des colonies dans les cellules non traitées, alors que nous n'avons pas vu de variation du niveau d'autophagie dans cette condition.

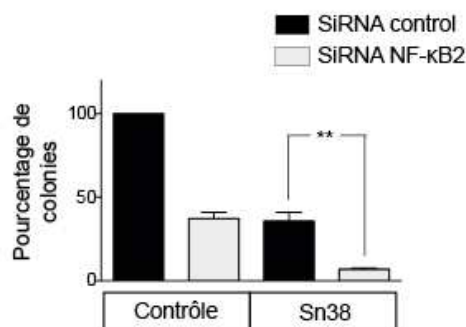


Figure 50 | Test de clonogénicité après extinction de l'expression de *NF-κB2*. Les cellules sont transfectées avec un siRNA dirigé contre *NF-κB2* ou avec un siRNA contrôle. 24 heures après, 500 cellules sont traitées avec 5ng/mL de *sn38* pendant 8 jours, puis les colonies formées sont colorés à l'aide de cristal violet et comptées (n=3)

Nous nous sommes alors intéressés à l'expression de la caspase 3 clivée après l'extinction de NF-κB2. Cependant, nous n'avons pas observé de variation significative lorsque NF-κB2 est inhibé, que ce soit après sn38 ou non, comparé aux cellules transfectées avec un siRNA contrôle (figure 51). Toutefois, cette expérience montre légère une augmentation du niveau d'apoptose lors d'un traitement sn38. Ainsi, le stress induit par un traitement sn38 pourrait conduire à un phénotype mixte, avec une majorité de cellules sénescentes et une minorité de cellules apoptotiques.

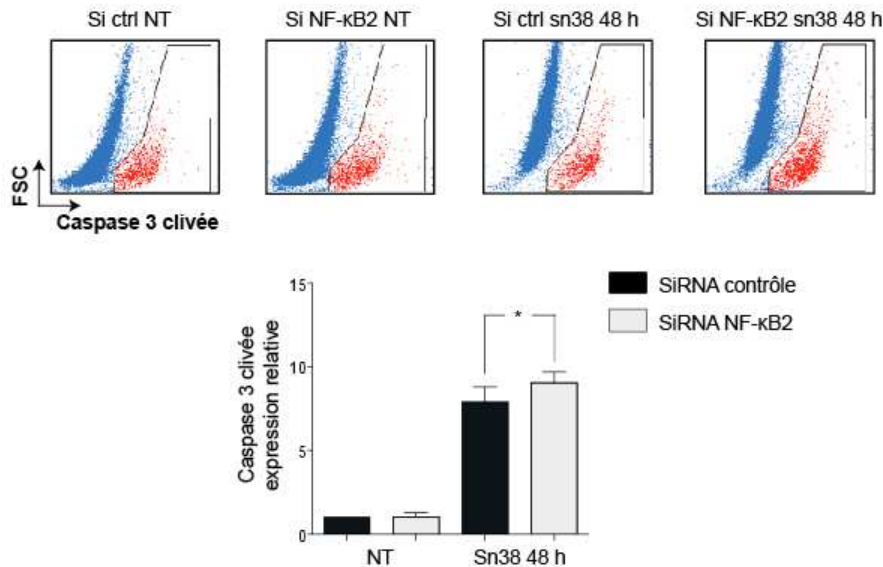


Figure 51 | Mesure du clivage de la caspase 3 lors de l'inhibition de NF-κB2. Les cellules sont transfectées avec un siRNA dirigé contre NF-κB2 ou avec un siRNA contrôle. 24 heures après la transfection les cellules sont traitées avec 5ng/ml de sn38 pendant 48h, puis les cellules sont trypsinées, fixées puis marquées à l'aide d'un anticorps dirigé contre la caspase 3 clivée. L'analyse se fait par cytométrie en flux (n=3).

Ces données indiquent que le traitement au sn38 conduit à l'activation et à la transcription des gènes d'autophagie. NF-κB2 est également activé en réponse au sn38 et est recruté sur le promoteur des gènes d'autophagie. Les expériences d'inactivation de NF-κB2 par siRNA suggèrent un rôle de répresseur de l'autophagie. Nous n'avons pas montré à ce stade de rôle de RelA ou d'un complexe p52/RelA dans l'activation de l'autophagie suite au traitement au sn38. Néanmoins, le rôle de NF-κB2 semble être identique. Il est important de noter que *ULK1*, *ATG2A*, *BECN1* et *GABARAPL1* qui sont régulés par NF-κB2 après traitement au sn38, sont des gènes également régulés par le complexe p52/RelA en réponse à l'expression de Ras.

Chapitre 3

La reprogrammation de NF- κ B réduit le niveau d'autophagie et participe à l'échappement à la sénescence induite par Ras

I. Les cellules ayant échappé au stress oncogénique présentent un faible niveau d'autophagie

Au sein du laboratoire, nous avons observé qu'après 4 à 5 semaines d'induction de Ras, la majorité des cellules sont sénescences. Cependant, certaines cellules continuent de proliférer en présence de doxycycline. Nous avons ainsi engendré plusieurs générations de clones échappés appelées RasL, dont l'expression de Ras est maintenue. Afin de comprendre comment ces populations de cellules échappées prolifèrent malgré le stress oncogénique induit par Ras, nous avons mesuré le niveau de sénescence sur une période de 6 semaines, jusqu'à la génération de clones échappés (figure 52A). Nous pouvons voir que dans les 4 premiers jours, les cellules subissent une hausse rapide de la prolifération en réponse à l'oncogène, et que la quasi totalité des cellules sont sénescences au bout de 8 jours. Cette sénescence est maintenue jusqu'au 33ème jour. Toutefois, nous pouvons observer une chute rapide allant jusqu'à 80% des cellules sénescences, tandis que nous observons une augmentation croissante du nombre des cellules à partir du 36ème jour.

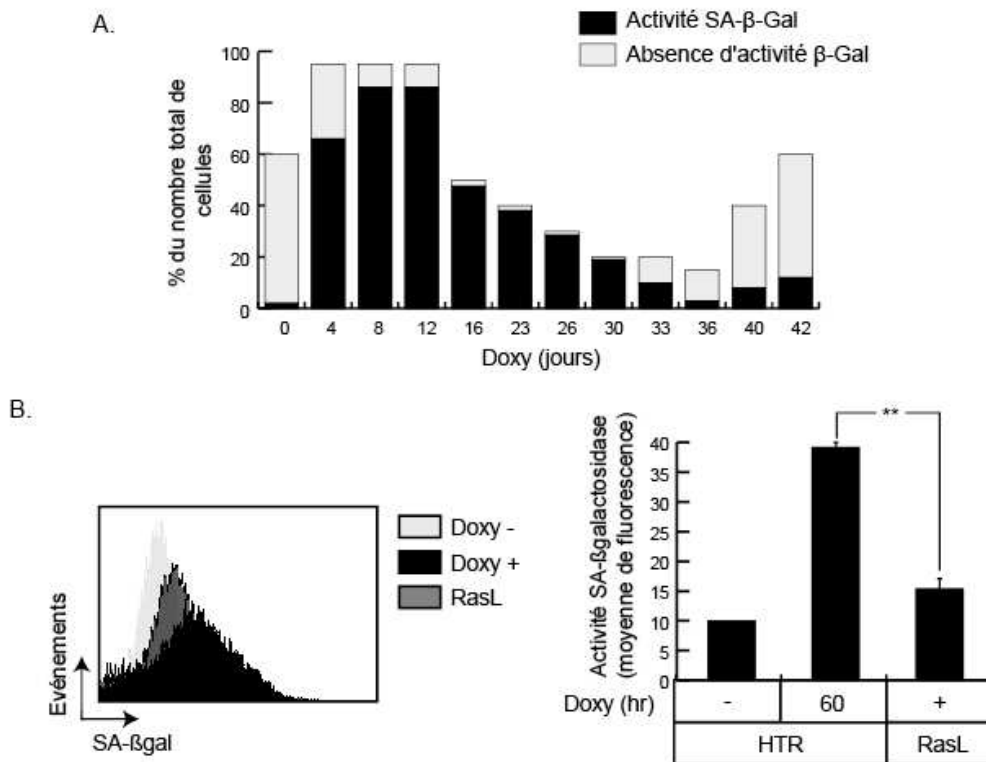


Figure 52 | Mesure de l'index de sénescence après échappement à la sénescence induite par Ras. **A.** H-RasV12 est induit avec 50ng.mL⁻¹ de doxycycline jusqu'à 42 jours. Les cellules sénescences sont marquées puis visualisées au microscope optique (n=1). **B.** H-RasV12 est induit avec 50ng.mL⁻¹ de doxycycline pendant 72 heures dans les cellules HTR ou de manière continue dans les cellules RasL, puis les cellules sénescences sont marquées et l'index est quantifié par cytométrie en flux (n=6)

De manière surprenante, nous pouvons noter que le pourcentage de cellules sénescents à partir du 40^{ème} jour n'est pas complètement réduit. Nous avons souhaité quantifier ce niveau de sénescence, et donc mesurer un index de sénescence dans ces populations échappées par cytométrie en flux. La figure 52B montre que l'index de sénescence des cellules RasL est diminué en comparaison aux cellules avec une induction de Ras à court terme. Cependant, cet index reste plus élevé que celui des cellules contrôles, suggérant que les clones échappés ont un programme de sénescence incomplet et qui est probablement à l'origine de cet échappement. Ces résultats nous permettent de valider le modèle d'index de sénescence relatif à une agressivité tumorale proposé par Collado et Serrano, puisque les cellules échappées qui présentent un index moindre sont susceptibles d'être plus agressives (Collado & Serrano, 2006). En effet, les cellules RasL sont dépendantes de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1 et possèdent des propriétés d'invasion (De Carne Trecesson et al, 2011) (Résultats-Annexe I).

Nous nous sommes ensuite intéressés au niveau d'autophagie dans ces cellules qui ont subi l'échappement. Nous avons montré dans un premier temps que les clones échappés perdent l'expression de p21, et présentent d'importants dommages de l'ADN que nous pouvons observer par l'augmentation de la phosphorylation de l'histone H2Ax. Les cellules qui échappent à la sénescence induite par Ras prolifèrent malgré de forts dommages de l'ADN, probablement grâce à l'inactivation de p21 (De Carne Trecesson et al, 2011) (Résultats-Annexe I). L'analyse de l'expression protéique de LC3 par western blot montre que LC3 diminue, aussi bien au niveau de l'expression de LC3-I mais aussi au niveau de sa lipidation en LC3-II, dans les cellules qui ont échappé à la sénescence comparé aux cellules avec une induction courte de Ras (figure 53A). De plus, cet expérience montre également que ce niveau d'expression de LC3 dans les cellules RasL reste plus élevé que dans les cellules contrôles non induites. Nous avons également validé cette variation du niveau d'autophagie par microscopie. L'analyse de l'expression de LC3 par immunofluorescence montre également une diminution partielle de ce marqueur dans les clones échappés (figure 53B). La quantification de ce marquage montre par ailleurs que le nombre et la taille des vésicules d'autophagie observées dans les clones échappés vont dans le sens d'un niveau d'autophagie plus faible lors de l'échappement, comparable au niveau des cellules parentales.

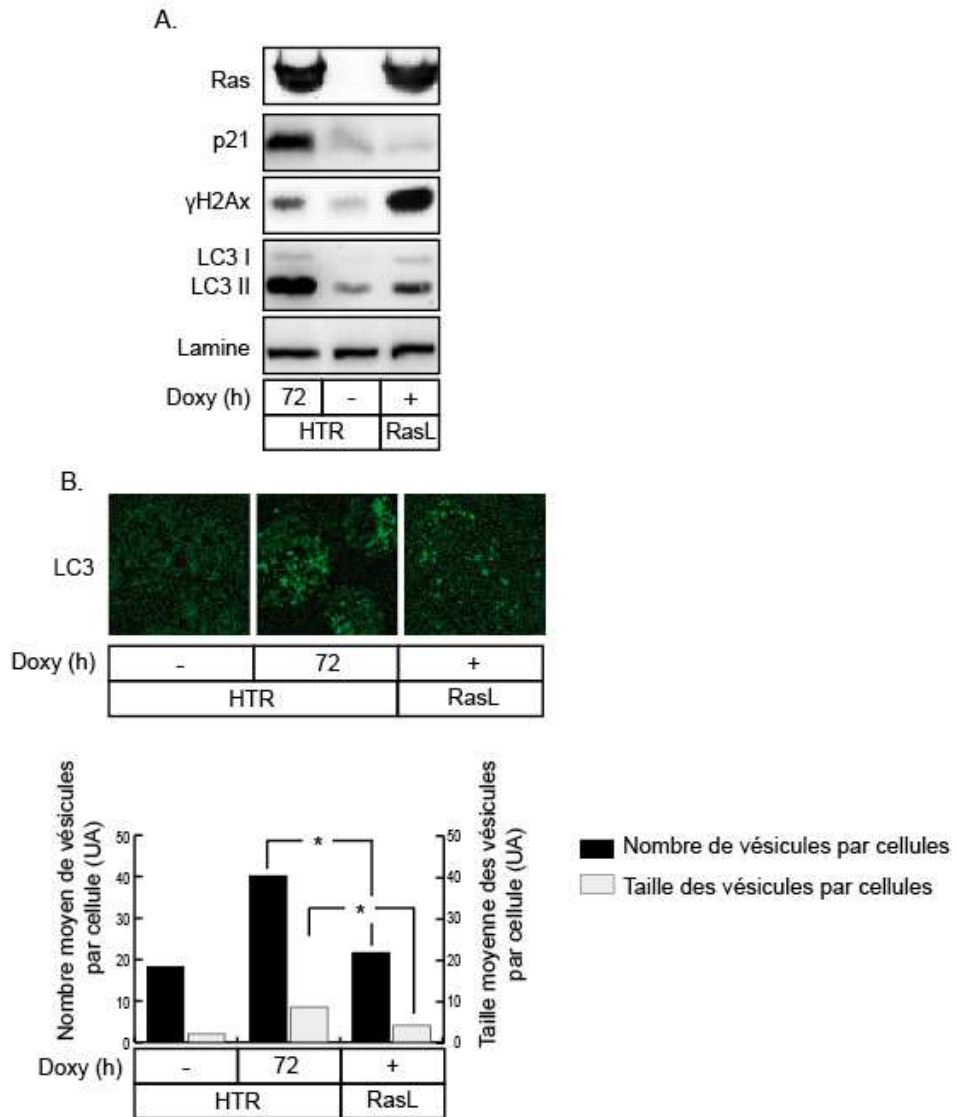


Figure 53 | Mesure de l'expression du niveau d'autophagie après échappement à la sénescence induite par Ras. H-RasV12 est induit avec 50ng.mL^{-1} de doxycycline pendant 60 heures ou de manière continue, puis les extraits totaux sont analysés en western blot ($n=3$). **B.** H-RasV12 est induit avec 50ng.mL^{-1} de doxycycline pendant 60 heures ou de manière continue. Les cellules sont ensuite marquées à l'aide d'un anticorps dirigé contre LC3 puis analysées par microscopie confocale et quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ ($n=4$).

Nous avons vu que l'autophagie est induite de manière transcriptionnelle suite à l'expression de Ras, nous avons donc étudié l'expression des gènes de l'autophagie lors de l'échappement. La figure 54 montre que l'expression des gènes d'autophagie diminue dans les clones échappés comparé aux cellules qui expriment Ras à court terme, et reste toujours plus élevée lorsque l'on compare aux cellules non induites. Une fois de plus, il s'agit de gènes intervenant tout au long de la formation de la vésicule d'autophagie qui se retrouvent dérégulés lors de l'échappement.

Facteur d'amplification	Doxy + / Doxy -	RasL / Doxy -	Significativité statistique
ULK1	10,2	3,8	***
ATG2A	10,8	4,1	***
ATG2B	4,5	4	***
ATG3	2,5	2,2	***
ATG4A	5,3	1,7	***
ATG5	2,7	2,1	***
BECN1	6,5	3,8	***
ATG7	3,2	1,1	**
MAP1LC3	5,1	3,1	***
GABARAP	2,7	1,7	***
GABARAPL1	7,2	2,3	**
ATG9A	3,1	1,7	***
ATG12	4,2	2,4	***
ATG13	3,9	3,1	***
ATG14	3,9	3,5	***
UVRAG	6,6	1,8	**
WIPI2	2,2	1,9	***

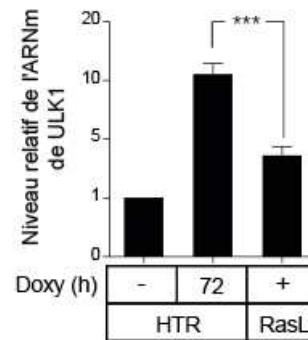


Figure 54 | Mesure de l'expression des gènes de l'autophagie dans les cellules ayant échappée à la sénescence. H-RasV12 est induit avec 50ng.mL⁻¹ de doxycycline pendant 60 heures dans les cellules parentales ou de manière continue dans les cellules RasL, puis les ARN sont extraits. L'expression de l'ARNm des gènes de l'autophagie est mesuré par qPCR. Les résultats sont exprimés par le rapport des conditions Doxy+ ou RasL divisé par la condition contrôle (n=3).

Nous avons ensuite analysé le rôle de l'autophagie dans les cellules RasL en utilisant l'inhibition de l'autophagie par un traitement au 3-MA. L'analyse de l'expression de la caspase 3 clivée montre une augmentation de l'apoptose suite à l'inhibition de l'autophagie dans les clones échappés, qui est corrélée à une augmentation de la présence de ROS (figure 55). Si ils sont confirmés, ces résultats suggèrent que l'autophagie participe à l'élimination des ROS et favorise la survie des cellules.

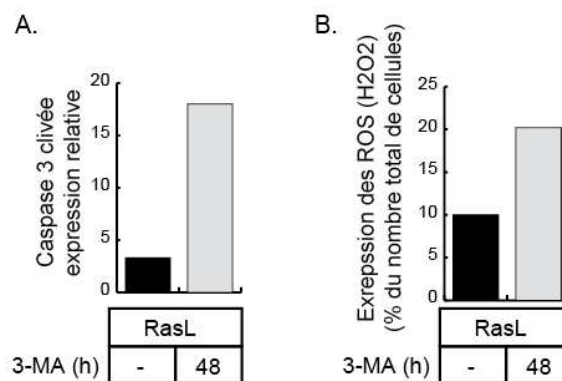


Figure 55 | Mesure de l'effet de l'inhibition de l'autophagie lors de l'échappement. H-RasV12 est induit avec 50ng.mL⁻¹ de doxycycline de manière continue dans les cellules RasL. Les cellules sont traitées avec du 3-MA à 5mM pendant 48H, puis fixées et marquées à l'aide d'un anticorps dirigé contre la caspase 3 clivées. Le marquage est quantifié par cytométrie en flux. En parallèles, les cellules vivantes sont marqués à l'aide de sondes dirigées contre les ROS, détectées et quantifiées par cytométrie en flux (n=1).

II. NF-κB2 réduit le niveau d'autophagie dans les cellules ayant échappées à l'OIS

Nos résultats suggèrent que le complexe p52/RelA est un activateur transcriptionnel de l'autophagie, et que l'autophagie une fois active contribue à l'établissement de la sénescence. Nous avons montré que les gènes d'autophagie sont diminués dans les clones échappés, et nous pouvons noter que certains de ces gènes comme *ULK1*, *ATG2A*, *BECN1*, *GABARAP* et *GABARAPL1* sont des cibles du complexe p52/RelA. Etant donné le niveau réduit de l'autophagie observé lors de l'échappement, nous avons regardé l'expression de NF-κB2 et de RelA dans les clones échappés. De manière surprenante, l'expression de NF-κB2 est toujours augmentée dans les clones échappés comparé aux cellules contrôles (figure 56). De même, les expressions de RelA tout comme celle de p50 ne varient pas entre les différentes conditions.

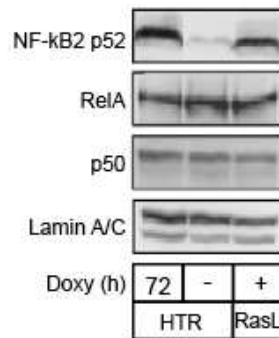


Figure 56 | Mesure de l'expression de NF-κB2 après échappement à la sénescence induite par Ras. H-RasV12 est induit avec 50ng.mL⁻¹ de doxycycline pendant 60 heures ou de manière continue, puis les extraits totaux sont analysés en western blot (n=3).

Nous avons ensuite inactivé NF-κB2 par siRNA dans les clones échappés. De manière étonnante, la figure 57 montre une baisse du marquage LC3 lors de la perte de NF-κB2 dans les cellules RasL. Lorsque nous quantifions ce marquage, nous observons une diminution du nombre et de la taille des vésicules d'autophagie. Ainsi, NF-κB2 qui est un répresseur de l'autophagie lors d'une induction courte de Ras, semble être à l'inverse un activateur de l'autophagie dans les clones échappés.

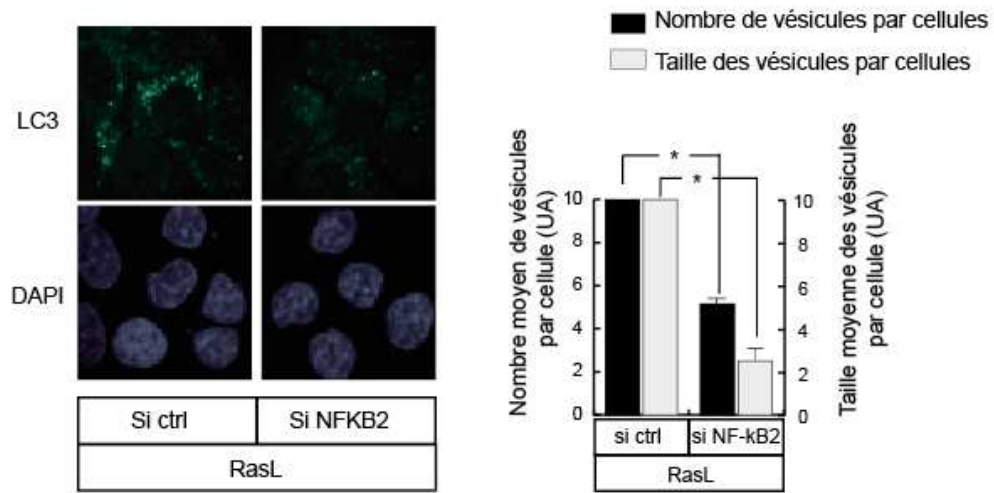


Figure 57 | Mesure du clivage de LC3 suite à l'extinction de NF-κB2 et après échappement à la sénescence induite par Ras. Les cellules RasL sont transfectées avec un siRNA dirigé contre NF-κB2 ou avec un siRNA contrôle pendant 24 heures. H-RasV12 est induit dans les cellules à l'aide de 50 ng.ml⁻¹ de doxycycline pendant 48h. Les cellules sont ensuite marquées à l'aide d'un anticorps dirigé contre LC3 puis analysées par microscopie confocale et à l'aide du logiciel ImageJ (n=3).

Nous avons ensuite observé l'expression des gènes de l'autophagie suite à l'extinction de NF-κB2 par PCR semi-quantitative. La figure 58 montre une diminution de la transcription des gènes *ATGs* comme *ULK1*, *ATG2A*, *BECN1* et *GABARAPL1* suite à la perte de NF-κB2 dans les clones échappés.

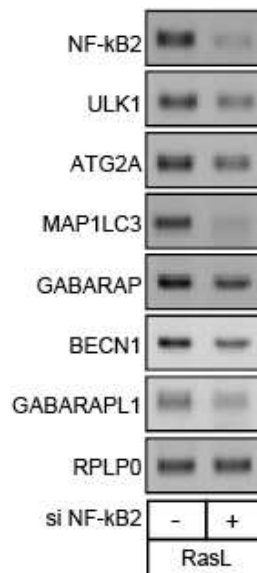


Figure 58 | Expression des gènes d'autophagie après extinction de l'expression de NF-κB2 lors de l'échappement. Les cellules sont transfectées avec un siRNA dirigé contre NF-κB2 ou avec un siRNA contrôle pendant 24 heures. H-RasV12 est induit dans les cellules à l'aide de 50 ng.ml⁻¹ de doxycycline pendant 72 h puis le niveau d'expression de ARNm des gènes d'autophagie est analysé par PCR semi-quantitative déposée sur agarose. (n=3)

Afin de déterminer si cette activation de l'autophagie par *NF-κB2* se fait de manière directe, par fixation du facteur de transcription sur le promoteur des gènes, nous avons réalisé une immunoprécipitation de chromatine de *NF-κB2* dans les cellules RasL. L'analyse de ce ChIP a été faite par PCR classique déposée sur gel d'agarose. Nous avons observé comme précédemment le recrutement de *NF-κB2*, de *RelA* et de l'ARN polymérase II phosphorylée sur la sérine 5 sur le promoteur des gènes *ULK1*, *ATG2A*, *BECN1*, *GABARAP* et *GABARAPL1* suite à une induction courte de Ras (figure 59). Dans les cellules ayant échappées à la sénescence induite par Ras, nous avons observé que *NF-κB2* est toujours recruté sur le promoteur de ces gènes. En revanche, le recrutement de *RelA* est fortement diminué ou perdu dans les cellules échappées. De manière intéressante, nous observons également la diminution du recrutement de l'ARN polymérase II phosphorylée qui reste plus élevé que dans les cellules contrôles, suggérant une baisse partielle de la transcription des gènes d'autophagie *ULK1*, *ATG2A*, *BECN1*, *GABARAP* et *GABARAPL1* dans les cellules ayant échappées à la sénescence.

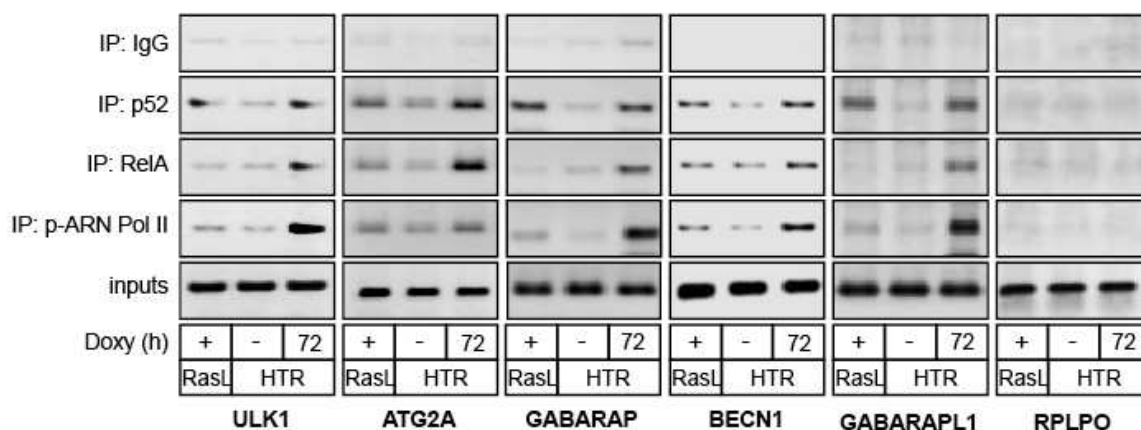


Figure 59 | *NF-κB2* est recruté sur les gènes de l'autophagie dans les cellules ayant échappées à la sénescence. H-RasV12 est induit dans les cellules à l'aide de 50 ng.ml⁻¹ de doxycycline pendant 60 h ou de manière continue. La chromatine soluble est préparée puis immunoprécipitée avec un anticorps dirigé contre *NF-κB2*, *RelA*, la polymérase II phosphorylée ou contre une immunoglobuline contrôle. L'ADN est amplifié en utilisant une paire d'amorces qui couvre le site de liaison de *NF-κB2* sur les différents promoteurs. Le ChIP est ensuite analysé par PCR déposée sur gel d'agarose (n=3).

L'ensemble de ces résultats met en évidence une expression maintenue de *NF-κB2* lors de l'échappement. *NF-κB2* est toujours recruté sur le promoteur des gènes de l'autophagie, cependant *RelA* n'est plus présent. *NF-κB2* et *RelA* ne semblent donc plus former de complexe lors de l'échappement, entraînant une diminution partielle du niveau d'autophagie, définie par une baisse de l'expression des gènes comme *ULK1*, *ATG21*, *BECN1*, *GABARAP* et *GABARAPL1*.

III. La phosphorylation sur la sérine 222 de *NF-κB2* est perdue dans les cellules ayant échappées à l'OIS.

Nous avons précédemment montré que *NF-κB2* est phosphorylé sur la sérine 222 et que *NF-κB2* et RelA forment un hétérodimère activateur de l'autophagie suite à l'expression de Ras. Or, la phosphorylation de *NF-κB2* sur la sérine 222 est décrite pour favoriser la formation de complexe p52/RelA et p52/c-Rel (Barré & Perkins, 2010a). Nous avons alors mesuré par western blot l'expression de la phosphorylation de p52 sur la sérine 222 dans les clones échappés. Comme précédemment observé, la figure 60 montre une augmentation de l'expression de *NF-κB2* et de sa phosphorylation sur la sérine 222 lors d'une induction courte de Ras. L'expression de *NF-κB2* est toujours augmentée dans les cellules échappées, cependant, la phosphorylation sur la sérine 222 est très fortement diminuée. En s'appuyant sur la littérature, ces résultats suggèrent la formation de dimères contenant *NF-κB2* qui vont être différents suivant l'état de phosphorylation de *NF-κB2* sur la sérine 222, lors de la sénescence ou de l'échappement.

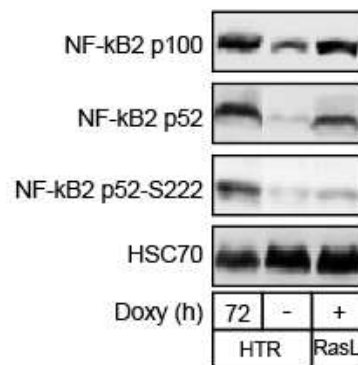


Figure 60 | Analyse de la phosphorylation de *NF-κB2* avant et après échappement à la sénescence induite par Ras. H-RasV12 est induit avec 50ng.mL⁻¹ de doxycycline pendant 60 heures dans les cellules parentales, puis les extraits totaux de ces cellules et des cellules RasL sont analysés en western blot (n=3)

Ces données suggèrent que la perte de la phosphorylation de p52 sur la sérine 222 pourrait peut-être être à l'origine du changement de fonction de *NF-κB2* lors de l'échappement. Il est décrit que lorsque *NF-κB2* est phosphorylé sur la sérine 222, les hétérodimères p52/c-rel et p52/RelA vont venir spécifiquement réprimer l'expression de Skp2, et empêcher la dégradation de p21 et de p27. Dans ce cas précis, *NF-κB2* phosphorylé sur la sérine 222 a un rôle d'inducteur de l'autophagie médiée par p27/Skp2 (Barré & Perkins, 2010a).

Nous nous sommes donc intéressés à l'expression du gène anti-autophagie *Skp2*. La figure 61 montre que lors d'une induction courte de Ras, *NF-κB2* est phosphorylé sur la sérine 222 et l'expression de *Skp2* est perdue comparé aux cellules non induites. A l'inverse, la perte de la phosphorylation de *NF-κB2* sur la sérine 222 observée dans les clones échappés correspond à la restauration de l'expression de *Skp2*. Ces résultats suggèrent, comme dans la publication précédemment décrite, une corrélation possible entre l'expression de la phosphorylation de la sérine 222 et l'expression de *Skp2*.

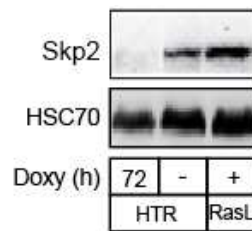


Figure 61 | Analyse de la phosphorylation de *NF-κB2* et de l'expression de *Skp2* avant et après échappement à la sénescence induite par Ras. H-RasV12 est induit avec 50ng.mL⁻¹ de doxycycline pendant 60 heures dans les cellules parentales, puis les extraits totaux de ces cellules et des cellules RasL sont analysés en western blot (n=3)

Nous avons alors réalisé une immunoprécipitation de chromatine de *NF-κB2* ainsi que de *RelA* sur le promoteur de *SKP2*. La figure 62 montre que lors d'une induction courte de Ras, *NF-κB2* et *RelA* sont tout les deux recrutés sur le promoteur de *SKP2* comparé aux cellules non induites. En revanche, l'ARN polymérase II phosphorylée n'est plus recrutée sur le promoteur, ce qui corrèle avec la perte de l'expression de *Skp2* que nous avons observé lors d'une induction courte de Ras. Lors de l'échappement, *NF-κB2* est toujours recruté sur le promoteur, mais *RelA* n'est plus présent, et l'ARN polymérase II phosphorylée est de nouveau associée au promoteur du gène *SKP2*.

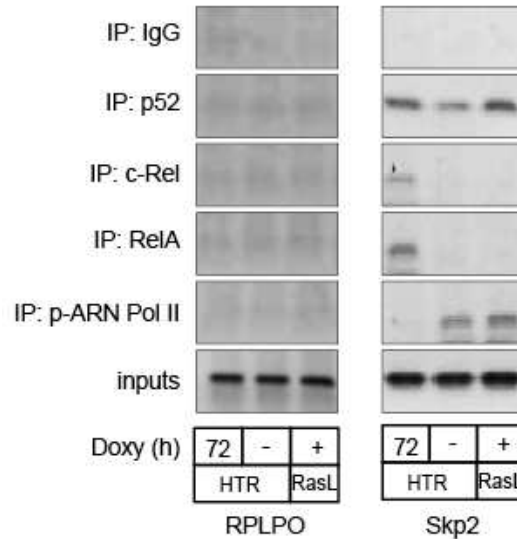


Figure 62 | Analyse du recrutement de NF-κB2 et RelA sur le gène Skp2 avant et après échappement à la sénescence induite par Ras. H-RasV12 est induit avec 50ng.mL⁻¹ de doxycycline pendant 60 heures dans les cellules parentales. La chromatine soluble de ces cellules et des cellules RasL est préparée puis immunoprécipitée avec un anticorps dirigé contre NF-κB2, RelA, ARN polymérase II ou contre une immunoglobuline contrôlée. L'ADN est amplifié en utilisant une paire d'amorces qui couvre le site de liaison de NF-κB2 sur le promoteur de Skp2. Le ChIP est ensuite analysé par PCR déposée sur gel d'agarose.

Nous nous sommes intéressés à la fonction de Skp2 dans notre modèle et notamment à sa fonction de dégradation des inhibiteurs du cycle. Au vu de l'importance de p21 dans notre modèle, nous avons inactivé Skp2 par siRNA puis observé son expression dans les clones échappés. Nous avons ainsi observé que la perte de Skp2 dans les clones échappés conduit à une augmentation de l'expression de p21 (figure 63). Ces résultats suggèrent que la restauration de l'expression de Skp2 que nous observons lors de l'échappement est liée à la répression de p21, et favorise probablement l'échappement à la sénescence.

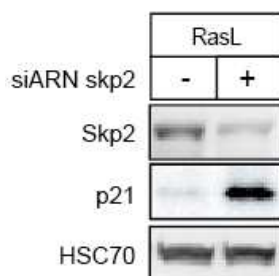


Figure 63 | Mesure de l'effet de l'inhibition de Skp2 lors de l'échappement à la sénescence induite par Ras. Les cellules sont transfectées avec un siRNA dirigé contre *skp2* ou avec un siRNA contrôlé pendant 24 heures. H-RasV12 est induit dans les cellules RasL à l'aide de 50 ng.mL⁻¹ de doxycycline pendant 72 h, puis les extraits totaux sont analysés par western blot (n=3).

Nous avons ensuite cherché à savoir comment p52 est phosphorylé sur la sérine 222 suite à l'expression de Ras et pourquoi celle-ci disparaît lors de l'échappement. Nous avons tout d'abord utilisé un outil bio-informatique, GPS2.1, afin de prédire les kinases potentielles de *NF-κB2*. Ce logiciel compare la séquence consensus des sites de phosphorylations des kinases avec la séquence de la protéine et attribue un score correspondant à l'homologie entre les deux séquences. En prenant en compte le taux de faux positifs, le logiciel attribue également un cut-off pour chaque kinase qui définit un seuil minimal à dépasser. Ainsi, plus le score est éloigné du cut-off, plus la probabilité que la kinase puisse phosphoryler le résidu est forte (Xue et al, 2008; 2011). La figure 64 représente toutes les kinases potentielles de *NF-κB2* sur la sérine 222 obtenues par le logiciel. Parmi ces kinases, nous retrouvons la kinase GSK-3β déjà montrée comme phosphorylant *NF-κB2* sur la sérine 222 lors de dommages de l'ADN (Barré & Perkins, 2010a). Néanmoins, le score correspondant n'est pas le plus élevé. Les kinases qui présentent les meilleures probabilités sont les kinases JNK1 (MAPK8) et JNK3 (MAPK10), CDK5, ainsi que p38α (MAPK11). La kinase p38β (MAPK12) possède un score élevé mais qui est proche du cutoff, la probabilité qu'elle puisse phosphoryler *NF-κB2* est donc plus faible.

Nos recherches se sont portées sur la kinase de stress p38, qui est connue pour son apparition lors d'un arrêt du cycle cellulaire ou lors de l'apoptose (Hui et al, 2007). Au laboratoire, nous avons montré que suite à l'expression de l'oncogène Ras, p38 est activé et favorise la stabilisation protéique de p21 pour permettre l'induction de la sénescence (De Carne Trecesson et al, 2011) (Résultats-Annexe I). Nous nous sommes demandés si p38 pouvait stabiliser p21 par l'intermédiaire de la phosphorylation de *NF-κB2* sur la sérine 222 et la répression de Skp2.

Afin de valider cette hypothèse, nous avons inactivé p38 par siRNA et observé l'expression de la phosphorylation de *NF-κB2*. La figure 65A montre une augmentation de la phosphorylation de *NF-κB2* sur la sérine 222 dans les cellules exprimant Ras, qui est perdue lorsque p38 est inhibé. Ce résultat reste à confirmer car les blots de la phosphorylation de la sérine 222 sont difficiles à obtenir. Toutefois, la perte de la phosphorylation sur la sérine 222 semble être corrélée à une restauration de l'expression de Skp2. Nous avons réalisé un kinase assay de p38 sur la protéine recombinante GST-p52. Cette expérience montre une augmentation de la phosphorylation de *NF-κB2* dans les cellules avec une induction de Ras lors d'une immunoprécipitation de p38 et en présence d'ATP (figure 65B). Nous ne savons pas si la phosphorylation se fait de manière directe par p38, cependant ces résultats montrent que p38 participe à la phosphorylation de *NF-κB2* sur la sérine 222 lors d'une induction courte de Ras.

Position	Code	Kinase	Peptide	Score	Cutoff
222	S	CMGC	QPIHDSKSPGASNLK	6,894	2,781
222	S	CMGC/CDK	QPIHDSKSPGASNLK	3,763	1,342
222	S	CMGC/DYRK	QPIHDSKSPGASNLK	3,75	3,583
222	S	CMGC/GSK	QPIHDSKSPGASNLK	4,716	2,679
222	S	CMGC/MAPK	QPIHDSKSPGASNLK	3,413	2,037
222	S	TKL/MLK	QPIHDSKSPGASNLK	1,688	1,312
222	S	CAMK/CAMKL/AMPK	QPIHDSKSPGASNLK	2,351	2,324
222	S	CMGC/CDK/CDC2	QPIHDSKSPGASNLK	3,309	1,261
222	S	CMGC/CDK/CDK4	QPIHDSKSPGASNLK	4	3,308
222	S	CMGC/CDK/CDK5	QPIHDSKSPGASNLK	8,684	3,895
222	S	CMGC/GSK/GSK3B	QPIHDSKSPGASNLK	5	3
222	S	CMGC/MAPK/ERK	QPIHDSKSPGASNLK	5,335	3,485
222	S	CMGC/MAPK/JNK	QPIHDSKSPGASNLK	5,021	1,979
222	S	CMGC/MAPK/p38	QPIHDSKSPGASNLK	5,931	2,862
222	S	Atypical/PIKK/FRAP	QPIHDSKSPGASNLK	7,067	3
222	S	Other/IKK/IKKb	QPIHDSKSPGASNLK	1,375	1,125
222	S	Other/Other-Unique/KIS	QPIHDSKSPGASNLK	7	3,2
222	S	CMGC/CDK/CDC2/CDC2	QPIHDSKSPGASNLK	4,065	1,871
222	S	CMGC/CDK/CDC2/CDK2	QPIHDSKSPGASNLK	3,473	1,5
222	S	CMGC/CDK/CDK4/CDK4	QPIHDSKSPGASNLK	4	3,308
222	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK1	QPIHDSKSPGASNLK	6,383	3,904
222	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK3	QPIHDSKSPGASNLK	8,08	4,483
222	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK7	QPIHDSKSPGASNLK	2,571	2,286
222	S	CMGC/MAPK/JNK/MAPK8	QPIHDSKSPGASNLK	16,25	3,444
222	S	CMGC/MAPK/JNK/MAPK9	QPIHDSKSPGASNLK	4	2,737
222	S	CMGC/MAPK/JNK/MAPK10	QPIHDSKSPGASNLK	10,857	4,857
222	S	CMGC/MAPK/p38/MAPK11	QPIHDSKSPGASNLK	9,333	4,667
222	S	CMGC/MAPK/p38/MAPK12	QPIHDSKSPGASNLK	10,667	6
222	S	CMGC/MAPK/p38/MAPK13	QPIHDSKSPGASNLK	6,667	5,667
222	S	CMGC/MAPK/p38/MAPK14	QPIHDSKSPGASNLK	6,16	3,32

Figure 64 | Analyse bio-informatique des kinases potentielles de *NF-κB2* sur la sérine 222 à l'aide du logiciel GPS2.1

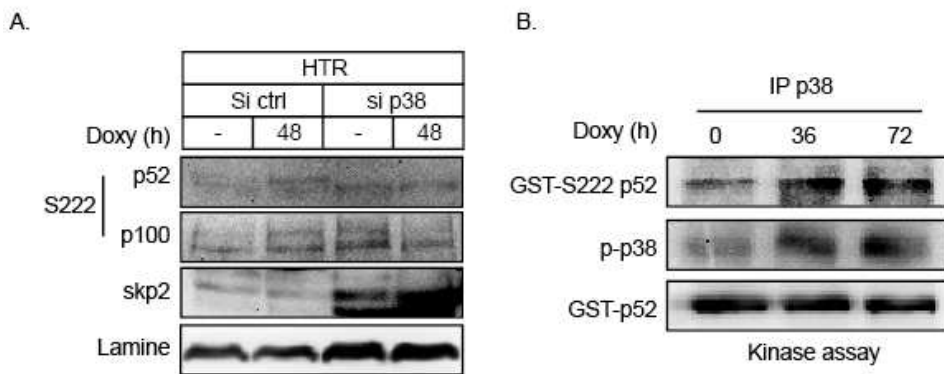


Figure 65 | Analyse de la phosphorylation de *NF-κB2* sur la sérine 222 par la kinase p38. **A.** Les cellules sont transfectées avec un siRNA dirigé contre p38 ou avec un siRNA contrôle pendant 24 heures. H-RasV12 est induit dans les cellules à l'aide de 50 ng.ml⁻¹ de doxycycline pendant 72 h puis les extraits totaux sont analysés par western blot. **B.** Un extrait total traité induit pour Ras pendant 48h est incubé avec un anticorps dirigé contre la kinase p38, puis incubé avec du GST-p52 pendant 10 min au bain marie à 37°C en présence d'ATP. La phosphorylation de *NF-κB2* sur le résidu sérine 222 est analysée par Western blot en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine.

D'autre part, les résultats publiés par Sophie De Carné et collègues montrent que la phosphorylation de p38 est perdue dans les clones échappés. Ceci pourrait expliquer pourquoi nous n'observons plus de phosphorylation de *NF-κB2* sur la sérine 222 dans ces conditions. Ces données appuient le fait que p38 soit impliqué dans la phosphorylation de *NF-κB2* en réponse à Ras.

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont fait l'objet d'un article soumis à *Oncogene* (Annexe II). Dans cet article nous avons montré que l'autophagie participe à l'induction de l'OIS médiée par Ras dans la lignée colorectale HT29. A la suite de l'expression de Ras, nous avons montré que le facteur de transcription *NF-κB2* est recruté sur le promoteur des gènes ATGs afin de réguler leur expression. De plus, nous avons observé que la composition de dimère *NF-κB2*, probablement régit par la phosphorylation sur la sérine 222, détermine le niveau d'autophagie et intervient dans l'établissement correcte et optimal de l'OIS. Nous avons ainsi montré que les cellules ayant échappé à l'OIS perdent cette phosphorylation sur la sérine 222, et présentent une autre fonction à *NF-κB2*. Nous avons fait l'hypothèse qu'une diminution du niveau d'autophagie participe à l'échappement à l'OIS, et que la perte de la phosphorylation de *NF-κB2* sur la sérine 222 est nécessaire à la baisse du niveau d'autophagie.

Chapitre 4

L'olfactomedin 4, un nouveau marqueur des tumeurs colorectales non-métastatiques régulé par la voie Ras-NF- κ B2

I. Introduction

Devant l'hétérogénéité des patients et afin d'améliorer la précision du diagnostique, le Dr Catherine Guette développe au laboratoire une approche globale de protéomique quantitative dans le but de définir une signature pour chaque stades du cancer. Cette équipe vise à identifier des biomarqueurs spécifiques permettant de caractériser la progression tumorale, et de prédire la réponse à la chimiothérapie ou encore le risque de récidive.

Cette étude menée par Damien Besson, étudiant en thèse, a confronté le protéome de 28 tumeurs colorectales congelées, de l'adénome et adénocarcinome des stades précoces (stades I et II) aux stades métastatiques (III et IV). Cette approche globale a permis de détecter des protéines dont l'expression varie de manière significative entre les différents stades. Parmi ces protéines, l'olfactomedine 4 (OLFM4) a été identifiée comme un marqueur spécifique des stade précoces, et dont l'expression est corrélée à la mutation de K-Ras dans les tumeurs (Besson et al, 2011) (Résultats-Annexe III).

L'Olfactomedine 4 (aussi connue sous le nom de hGC-1, hOlfD ou GW112) appartient à la famille des olfactomedines comptant cinq membres : hOlfA, hOlfB, hOlfC, hOlfD (OLFM4) et TIGR/Myocilin. Tous sont des glycoprotéines ayant en commun un domaine olfactomedine en C-terminal. Ils présentent cependant des distributions tissulaires différentes. L'olfactomedine 4 est essentiellement exprimée au niveau de l'intestin grêle, du colon, de la prostate et de la moelle osseuse (Liu et al, 2007). L'olfactomedine 4 a en effet été initialement clonée à partir de cellules myéloïdes humaines (Zhang et al, 2002). L'étude de l'expression de l'olfactomedine 4 au niveau de l'épithélium intestinale a mis en évidence une expression intense de cette protéine dans les cellules situées au fond des cryptes de colon. En outre, l'expression de l'olfactomedine 4 est fortement corrélée à l'expression du marqueur des cellules souches Lgr5, un récepteur intervenant dans la voie de la β -caténine et de wnt, et est alors également considérée comme un marqueur des cellules souches intestinales (van der Flier et al, 2009; Barker & Clevers, 2010).

L'olfactomedine 4 est décrite comme une protéine anti-apoptotique capable de favoriser la croissance tumorale. En effet, l'olfactomedine 4 s'associe à GRIM-19 (Gene associated with retinoid-IFN-induced mortality 19), une protéine connue pour réguler l'apoptose et identifiée comme un suppresseur de tumeur. En s'associant à GRIM-19, l'olfactomedine 4 atténue sa fonction apoptotique en réponse à l'interferon beta et à l'acide rétinoïque (Zhang et al, 2004). De ce fait, une sur-expression de l'olfactomedine 4 accélère la formation de la tumeur dans des cellules tumorales de la prostate chez la souris. Toutefois, l'effet inhibiteur entre les deux protéines semble mutuel puisqu'à l'inverse, une sur-expression de GRIM-19 dans des cellules de carcinomes

gastrique conduit à une forte diminution de l'expression de l'olfactomedine 4 (Huang et al, 2010). D'autre part, les auteurs observent également que la sur-expression de GRIM-19 entraîne une baisse de la fixation de NF- κ B sur le promoteur de l'olfactomedine 4. La présence de sites κ B sur le promoteur de l'olfactomedine 4 a permis à plusieurs études de montrer un rôle de NF- κ B en tant qu'activateur de l'expression de l'olfactomedine 4, intervenant dans la différenciation des cellules myéloïdes et dans la tumorigenèse par une fonction anti-apoptotique (Chin et al, 2008; Kim et al, 2010). Finalement, Huang et ses collègues montrent que l'inhibition de la fixation de NF- κ B sur le promoteur de l'olfactomedine 4 associée à la sur-expression de GRIM-19, supprime les propriétés d'adhésion, de migration et d'invasion des cellules tumorales gastriques. Un rôle de l'olfactomedine 4 dans les propriétés d'adhésion cellulaire avait auparavant été décrit (Liu et al, 2006). Cette étude montre que l'olfactomedine 4 est capable d'interagir avec les lectines et les cadhérines à la surface cellulaire, favorisant l'adhésion.

Au cours de cette étude, j'ai participé à l'étude de l'expression de l'OLFM4 en réponse à la voie Ras/NF- κ B2. Cette dernière partie résume les résultats obtenus lors de ce travail, qui visent à moyen terme à caractériser l'implication de NF- κ B2 dans les différents stades du cancer colorectal.

II. La voie Ras/NF- κ B2 régule l'expression de l'olfactomedine 4

Afin d'étudier la régulation de l'OLFM4, nous avons analysé le promoteur proximal de l'OLFM4 par outil bio-informatique. Nous avons pu observer la présence de sites potentiels de liaison de NF- κ B2 sur le promoteur de l'OLFM4, indiquant la possibilité que ce facteur de transcription puisse réguler l'expression de l'OLFM4. Dans le but de déterminer si NF- κ B2 est capable de se lier sur le promoteur de l'OLFM4 pour y réguler son expression, nous avons réalisé une expérience de ChIP dans les cellules HT29, en utilisant un couple de primer encadrant le site de liaison de NF- κ B2 sur le promoteur proximal de l'OLFM4 (figure 66). Nous avons ainsi montré que NF- κ B2 ainsi que son co-facteur Bcl3 sont recrutés sur le promoteur de l'OLFM4. De plus, l'ARN polymérase II est également recrutée sur cette région, traduisant la transcription du gène. Ainsi, NF- κ B2 pourrait être un activateur de l'expression de l'OLFM4. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé l'expression de l'OLFM4 suite à l'extinction de NF- κ B2 par siRNA. Nous avons ainsi montré que l'expression de l'OLFM4 est diminuée suite à la perte de NF- κ B2, que ce soit au niveau protéique ou au niveau transcriptionnelle. Ces résultats suggèrent que l'OLFM4 pourrait être une cible transcriptionnelle de NF- κ B2 (figure 67).

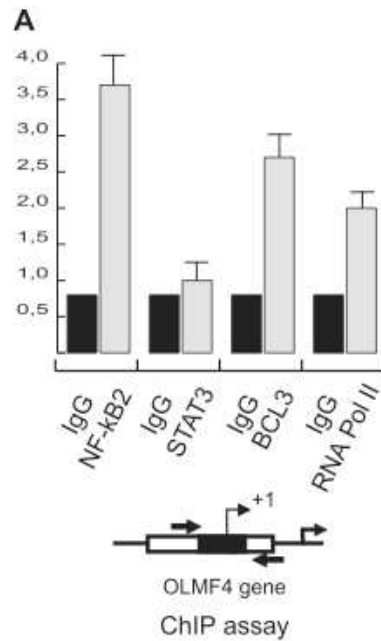


Figure 66 | NF-κB2 est recruté sur le promoteur de l'olfactomedine 4. La chromatine solubles des cellules HT29 est préparée puis immunoprécipitée avec des anticorps dirigés contre une immunoglobuline contrôle, NF-κB, STAT3, BCL3 ou encore contre l'ARN polymérase de type II. L'ADN est amplifié en utilisant des amorces couvrant le site de liaison de NF-κB2 sur le promoteur de l'OLFM4. L'analyse du ChIP est effectuée par PCR quantitative en temps réel en comparant par rapport à une immunoglobuline contrôle et une région contrôle.

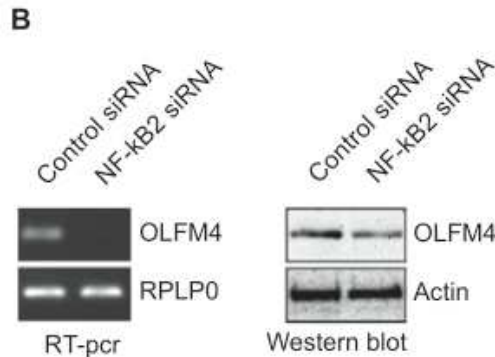


Figure 67 | Analyse de l'expression de l'OLFM4 suite à l'extinction de NF-κB2. Les cellules HT29 sont transfectées avec un siRNA dirigé contre NF-κB2 ou avec un siRNA contrôle pendant 48h, puis le niveau d'expression de l'ARNm de l'OLFM4 est analysé par PCR classique (panel de gauche) et les extraits protéiques totaux sont analysés par western blot (panel de droite).

L'étude immunohistochimique de l'expression de l'OLFM4 a montré que l'OLFM4 est fortement exprimée dans les tumeurs présentant une mutation du gène K-Ras, suggérant un lien entre l'oncogène et l'expression de l'OLFM4. Nous avons vu que le facteur de transcription NF-κB2 est activé suite à l'induction de Ras dans les cellules HTR (figure 68C). Nous avons alors voulu savoir si cette expression de l'OLFM4 en réponse à l'oncogène pouvait être régulée par NF-κB2. Pour cela, nous avons étudié l'expression de l'OLFM4 dans les cellules HTR, exprimant l'oncogène

Ras sous le contrôle d'un promoteur inductible par la doxycycline. Nous avons alors observé une augmentation de l'expression de l'OLFM4 suite à une induction de Ras, au niveau protéique et au niveau transcriptionnel (figure 68D-E). L'ensemble de ces résultats mettent en évidence une régulation de l'OLFM4 suite à l'oncogène Ras, et probablement par la voie Ras-NF- κ B2.

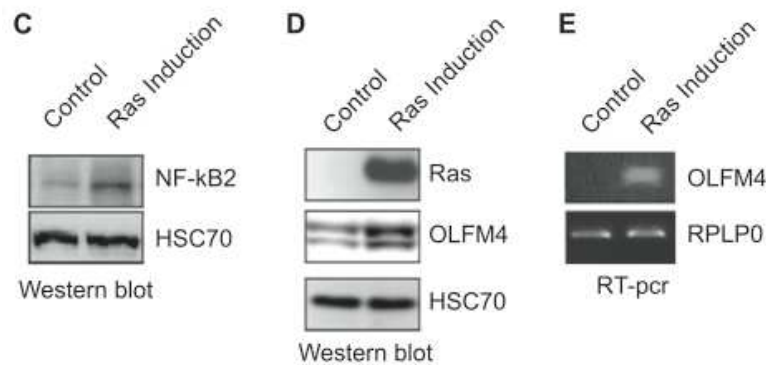


Figure 68 | L'expression de OLFM4 est induite suite à l'expression de l'oncogène Ras. C et D. H-RasV12 est induit dans les cellules HTR à l'aide de 50ng.mL^{-1} de doxycycline pendant 48 heures, puis les extraits totaux sont préparés et analysés à l'aide d'anticorps dirigés contre Ras, NF- κ B2 ou l'OLFM4. L'expression de HSC70 est utilisée comme contrôle de charge. E. En parallèle, le niveau d'expression de l'ARNm de l'OLFM4 est analysé par PCR quantitative en temps réel.

Cette approche de protéomique quantitative a identifié l'OLFM4 comme une protéine glycosylée qui est sécrétée et qui constitue un marqueur des stades précoces des tumeurs colorectales. La sur-expression de l'OLFM4 est un événement précoce qui se produit en réponse à l'OIS dans les cellules exprimant Ras, mettant en évidence l'existence d'une voie Ras-NF- κ B2-OLFM4.

Annexe I : L'échappement à l'OIS médiée par p21 conduit à la dédifférenciation cellulaire et à la dépendance aux protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl1

Escape from p21-mediated Oncogene-induced Senescence Leads to Cell Dedifferentiation and Dependence on Anti-apoptotic Bcl-xL and MCL1 Proteins*

Received for publication, September 17, 2010, and in revised form, February 1, 2011. Published, JBC Papers in Press, February 3, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.186437

Sophie de Carné Trécesson[†], Yannis Guillemin[§], Audrey Bélanger[†], Anne-Charlotte Bernard[†], Laurence Preisser[†], Elisa Ravon[†], Erick Gamelin[†], Philippe Juin[§], Benjamin Barré[†], and Olivier Coqueret^{§1}

From the [†]Cancer Center Paul Papin, INSERM U892, 49033 Angers, France and the [§]Cancer Research Department, INSERM U892, 44000 Nantes, France

Oncogene-induced senescence (OIS) is a tumor suppressor response that induces permanent cell cycle arrest in response to oncogenic signaling. Through the combined activation of the p53-p21 and p16-Rb suppressor pathways, OIS leads to the transcriptional repression of proliferative genes. Although this protective mechanism has been essentially described in primary cells, we surprisingly observed in this study that the OIS program is conserved in established colorectal cell lines. In response to the RAS oncogene and despite the inactivation of p53 and p16^{INK4}, HT29 cells enter senescence, up-regulate p21^{WAF1}, and induce senescence-associated heterochromatin foci formation. The same effect was observed in response to B-RAF^{G60E} in LS174T cells. We also observed that p21^{WAF1} prevents the expression of the *CDC25A* and *PLK1* genes to induce cell cycle arrest. Using ChIP and luciferase experiments, we have observed that p21^{WAF1} binds to the *PLK1* promoter to induce its down-regulation during OIS induction. Following 4–5 weeks, several clones were able to resume proliferation and escape this tumor suppressor pathway. Tumor progression was associated with p21^{WAF1} down-regulation and *CDC25A* and *PLK1* reexpression. In addition, OIS and p21^{WAF1} escape was associated with an increase in DNA damage, an induction of the epithelial-mesenchymal transition program, and an increase in the proportion of cells expressing the CD24^{low}/CD44^{high} phenotype. Results also indicate that malignant cells having escaped OIS rely on survival pathways induced by Bcl-xL/MCL1 signaling. In light of these observations, it appears that the transcriptional functions of p21^{WAF1} are active during OIS and that the inactivation of this protein is associated with cell dedifferentiation and enhanced survival.

Oncogene-induced senescence (OIS)² is a powerful antitumor mechanism that induces permanent cell cycle arrest in response to abnormal proliferative signals (1). Originally described in cell culture, OIS has been recently shown to occur

also *in vivo* as an early protection against carcinogenesis. Its induction involves the combined activities of p53 and p21^{WAF1} to inhibit cell cycle progression and of p16^{INK4} and Rb to induce the transcriptional repression of proliferative genes through heterochromatin formation (2). Senescent cells are characterized by an enlarged morphology, by an increased activity of β -galactosidase, and by the presence of senescence-associated heterochromatic foci (SAHF). Proliferative genes are compacted within these foci to prevent cell cycle progression, generally as a consequence of Rb-mediated silencing. Therefore, through their combined inhibitory effects on cyclin-cdk complexes, the p16^{INK4} and p21^{WAF1} inhibitors play an essential role in OIS induction and in the consequent tumor suppression.

The p21^{WAF1} protein was originally identified as a transcriptional target of the p53 tumor suppressor gene and as an inhibitor of cyclin-cdk complexes and DNA replication (3–6). Gene inactivation studies have also demonstrated essential roles of p21^{WAF1} during DNA damage and chemotherapy responses (7, 8). Besides its classical role as a cyclin-cdk inhibitor, p21^{WAF1} is also recruited to the promoters of cell cycle genes to prevent proliferation. We and others have shown that this protein regulates various transcription factors involved in the G₀/G₁ transition such as NF- κ B, Myc, E2F, and STAT3 (9–13). To regulate gene transcription, it is believed that p21^{WAF1} modifies the activity of the CBP histone acetylase and of the cyclin-cdk complexes associated with the initiation complex (14–18).

In light of these observations, we and others have proposed that p21^{WAF1} simultaneously targets growth-promoting genes and cdk activity to induce cell cycle arrest (9, 10, 19). However, although transcriptional functions of p21^{WAF1} have been described following overexpression or in response to chemotherapy treatment, it remains to be determined whether this also occurs during OIS and which promoters are targeted by p21^{WAF1} to restrain an abnormal oncogenic activity. This activity has already been demonstrated for the p14^{ARF} tumor suppressor because this protein can interact with the MYC oncogene to prevent the activation of proliferative genes. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments have shown that p14^{ARF} is recruited to the promoter of MYC target genes in association with the MYC-MAX complex (20).

In this study, we have further characterized OIS induction and the corresponding transcriptional functions of p21^{WAF1} in colorectal cells. Using HT29 cells as a model of an established cell line that has inactivated both p53 and p16^{INK4}, we surpris-

* This work was supported by a fellowship from Inserm-Pays de Loire (to S. d. C. T.) and by an Equipe Labelisée grant from the Ligue Contre le Cancer (comité du Maine et Loire) and from the Institut du Cancer (to O. C.).

¹ To whom correspondence should be addressed: Cancer Center Paul Papin, INSERM U892, 2 rue Moll, 49033 Angers, France. Tel.: 33 2 41 35 29 14; E-mail: olivier.coqueret@univ-angers.fr.

² The abbreviations used are: OIS, oncogene-induced senescence; EMT, epithelial-mesenchymal transition; Rb, retinoblastoma; SAHF, senescence-associated heterochromatic foci; TBS, Tris-buffered saline.

p21^{WAF1}, EMT, and Survival Dysregulation during OIS Escape

ingly observed that OIS is still functional in these cells, even though this suppressor response is essentially considered to be active in primary cells. The same effect was also noticed in LS174T cells. During OIS, we also found that p21^{WAF1} prevents *CDC25A* and *PLK1* expression and binds to the promoter of the *PLK1* gene. As an essential mechanism of tumor suppression, the OIS pathway has to be inactivated during tumor progression. We effectively observed that several clones escaped this protective pathway and that this was associated with the inhibition of p21^{WAF1} transcription and with the reexpression of *CDC25A* and *PLK1*. In addition, senescence escape was also associated with increased DNA damage and with signs of EMT. Interestingly, these malignant cells show enhanced dependence on Bcl-xL/MCL1 signaling, suggesting that proapoptotic pathways are generated during OIS escape and EMT induction.

Therefore, our results indicate that OIS can be conserved in established cell lines and that p21^{WAF1} functions as a transcriptional inhibitor during this protective pathway. This function is inactivated during tumor escape, and this is associated with genomic instability, cell dedifferentiation, and as a consequence up-regulation of survival signals. These results also suggest that some established cell lines can still be used as an experimental model of OIS response and tumor progression.

MATERIALS AND METHODS

Cell Lines—The human colon adenocarcinoma cell line HT29 and LS174T (American Type Culture Collection, ATCC) were maintained in antibiotic-free RPMI 1640 medium (Lonza). Cultures were supplemented with 10% fetal bovine serum. Cell lines were maintained at 37 °C in 5% carbon dioxide and were tested to rule out mycoplasma contamination.

Cell Transfection and Stable Screening—For transfection experiment, cells were seeded into 60-mm culture dishes and grown until 80% confluence. The empty plasmid pcDNA4/TR and the pcDNA4/H-Ras^{V12} (or B-RAF) were stably co-transfected with the pcDNA6/TR using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction. Cells were selected with 100 µg/ml blasticidin (Sigma-Aldrich) and 500 µg/ml zeocin (Invitrogen) for 2 weeks and maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum containing 100 µg/ml zeocin and 2.5 µg/ml blasticidin. Oncogene expression was induced by 50 ng/ml doxycycline for 48 h. RasL cell lines were obtained after 5 weeks of H-Ras^{V12} induction. After selection, RasL cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum containing 100 µg/ml zeocin, 2.5 µg/ml blasticidin, and 50 ng/ml doxycycline.

Clonogenic Assay—Cells were seeded at 800 cells into 6-well cell culture plates and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were then treated with 50 ng/ml doxycycline (Sigma-Aldrich) for 8 days, washed twice with PBS, and stained with 0.1% crystal violet. The colonies were then washed twice with water, and colonies exceeding 50 cells were visualized with a Bio-Rad Chemi Doc XRS Imaging device and counted using Quantity One imaging software (Bio-Rad). The survival fraction was determined as the ratio of the number of colonies observed with doxycycline to the number of cells without doxycycline, adjusted to the plating efficiency.

Western Blotting—Following cells lysis at 4 °C (50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 1% SDS, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF), lysates were sonicated and then boiled for 3 min. Proteins were separated on a SDS-polyacrylamide-containing gel and transferred to a PVDF membrane. Following a 1-h incubation in 3% BSA, Tris-buffered saline (TBS), and 0.1% Tween 20, membranes were incubated overnight at 4 °C with mouse monoclonal anti-H-RAS (1:1000; Santa Cruz sc-29), mouse monoclonal anti-ERK (Tyr²⁰⁴) (1:1000; Santa Cruz sc-7383), goat polyclonal anti-p14^{ARF} (1:600; Santa Cruz sc-8613), rabbit monoclonal anti-p21 antibody (1:1000; Cell Signaling 2947), mouse monoclonal anti-γH2Ax (1:1000; Upstate 05-636), mouse monoclonal anti-α-tubulin (1:1000; Santa Cruz sc5286) HSC70 (1:1000, Santa Cruz sc7298), E-cadherin (1:1000; Abcam 1416). Membranes were then washed twice with TBS with 0.1% Tween 20 and incubated for 1 h with peroxidase-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz). Revelation was performed by chemiluminescence with a Bio-Rad Chemi Doc XRS imaging device (Bio-Rad).

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

Chromatin Immunoprecipitation Assays—ChIP experiments were performed as described previously (21–23). Briefly, HT29 cells were fixed with 1% formaldehyde. After 10 min, cells were washed with ice-cold PBS and lysed with 500 µl of CHIP buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 1% SDS, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF). Chromatin was sheared by sonication to an average size of 500 bp. The chromatin solution was diluted with 1 volume of dilution buffer (2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 1% Triton X-100, 0.1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF) and incubated for 1 h at 4 °C on a rotating platform with of protein A-agarose and protein G-Sepharose which was pretreated with sheared DNA salmon sperm. Chromatin was then incubated overnight at 4 °C on a rotating platform with 1 µg of the anti-p21, anti-E2F1, or anti-GAL4 antibody. Following precipitation with protein A-agarose and protein G-Sepharose (pretreated with sheared DNA salmon sperm), chromatin was eluted with elution buffer (1% SDS, 100 mM NaHCO₃) for 5 h at 65 °C. DNA was extracted with phenol-chloroform, precipitated with ethanol, allowed to air dry, and then dissolved in 100 µl of sterile H₂O. Four microliters of the DNA samples were then subjected to PCR amplification.

Flow Cytometry—Cells were fixed with 1% formaldehyde at room temperature for 10 min, washed twice with PBS, and incubated with 70% ethanol at –20 °C for 20 min. Cells were then incubated with 1 µg of anti-γH2Ax (1:50; BD Biosciences 560445), anti-CD24 (1:50; BD Biosciences 555427), or anti-

p21^{WAF1}, EMT, and Survival Dysregulation during OIS Escape

CD44 (1:50; BD Biosciences 555479). Cells were incubated for 1 h at room temperature, and samples were analyzed by FACS (LSR II; BD Biosciences).

siRNA—To down-regulate gene expression, HT29 cells were transfected with 2.5 nM CDKN1A ON-TARGETplus SMARTpool, TP53 ON-TARGETplus SMARTpool, MAPK14 ON-TARGETplus SMARTpool, or ON-TARGETplus Non-Targeting Pool (all from Dharmacon) using DharmaFect-4 (Dharmacon) according to the manufacturer's instructions. H-RAS^{V12} induction was done 24 h after.

Spheroids—10- μ l drops containing 1000 cells were suspended on the lids of agar-coated 96-well plates containing 200 μ l of culture medium. After a 96-h time period required for cell aggregation, the spheroids were transferred to RPMI 1640 culture medium and maintained for 8 days.

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

RESULTS

OIS Is Still Functional in HT29 Cells Despite the Inactivation of p53 and p16^{INK4}—Several studies have shown that oncogenes induce growth arrest and senescence, but it is generally believed that this protective pathway occurs essentially in primary cells to restrain the initial events of cell transformation (24, 25). To extend this observation, we wanted to determine whether OIS is conserved in established colorectal cell lines, in the absence of intact p53 and p16^{INK4} signaling. To this end, we generated HT29 cell lines expressing the H-RAS^{V12} oncogene under the control of a doxycycline-inducible promoter. p53 is mutated in this cell line, but p16^{INK4} is not expressed, probably as a consequence of promoter methylation. As expected, Western blot experiments indicated that RAS was up-regulated in response to doxycycline and that the ERK1/2 kinase was activated (Fig. 1A). Consequently, we observed under this condition that p14^{ARF} was also up-regulated in response to the RAS oncogene (Fig. 1B). Interestingly, MTT and clonogenic assays showed that RAS up-regulation led to long term cell cycle arrest (Fig. 1C). In addition, cells exhibited a flat and enlarged morphology illustrative of cells entering the senescence process (data not shown). The induction of the senescence program was also detected by β -galactosidase staining (Fig. 1D), a specific marker of cells that do not divide or form colonies. Together, these results indicate that HT29 cells have conserved an intact OIS program in response to aberrant RAS signaling, even though these cells are not primary cells and p53 and p16^{INK4} are inactivated.

p21^{WAF1} Is Up-regulated in Colorectal Cell Lines following Oncogenic Induction—We then determined whether the p21^{WAF1} cell cycle inhibitor was still expressed during OIS in HT29 cells. Interestingly, Western blot experiments showed a

significant induction of p21^{WAF1} in response to the oncogene (Fig. 2A). We and others have previously described that p21^{WAF1} up-regulation leads to the induction of senescence (26, 27). To determine whether p21^{WAF1} was also involved in OIS activation in colorectal cell lines, cells were transfected with a pool of four different siRNAs directed against the cell cycle inhibitor or control sequences. As expected, p21^{WAF1} expression was down-regulated following H-RAS^{V12} induction (Fig. 2B, lanes 1–4). Using β -galactosidase staining, we noticed that the inhibition of the cell cycle inhibitor significantly prevented OIS induction (Fig. 2B, lanes 5–8). As stated above, besides β -galactosidase, OIS is also characterized by the formation of the SAHF heterochromatin foci (see Fig. 6 and Ref. 2). Interestingly, we noticed that the down-regulation of p21^{WAF1} also led to a reduction in the number of these SAHF (Fig. 2B, lanes 9–12).

We then determined whether p21^{WAF1} was regulated at the transcriptional level during OIS induction. Quantitative RT-PCR experiments showed that H-RAS^{V12} induced a significant up-regulation of the p21^{WAF1} mRNA compared with noninduced cells (Fig. 2C). To determine whether this effect occurred at the transcriptional level, we monitored the expression of p21^{WAF1} promoter luciferase constructs following RAS up-regulation. As shown Fig. 2D, we found that the p21^{WAF1} promoter-driven luciferase activity was significantly up-regulated during OIS and that the –163/+70 region was sufficient to mediate the response to the RAS oncogene. Because p53 mutants have been recently reported to have unexpected functions (28), we have verified by RNA interference that the p21^{WAF1} promoter is not regulated by the mutated form of p53 under our experimental conditions (data not shown). We then examined the recruitment of the RNA polymerase to the proximal region of the promoter using ChIP. Because serine 2 phosphorylation of the C-terminal domain of the RNA polymerase is a hallmark of transcriptional elongation, ChIP experiments were also performed with polyclonal antibodies directed against the phosphorylated form of the polymerase. GAL4 antibodies were used as controls, and ChIP results were quantified by real-time quantitative PCR (Fig. 2E). As expected, the RNA polymerase II and its elongating form were recruited to the p21^{WAF1} proximal promoter following H-RAS^{V12} expression. As a control, PCR analysis did not detect any occupancy of the –2760/–2486 region of the p21^{WAF1} gene (data not shown).

These results indicated that p21^{WAF1} can still be up-regulated in the established HT29 cell line in response to the H-RAS^{V12} oncogene and during OIS induction. To extend this observation, we then asked whether this effect was only related to the HT29 cell line or whether it could also be observed in a different condition. To this end, we generated LS174T cells stably expressing the B-RAF^{V600E} oncogene under the control of a doxycycline-inducible promoter. As expected, Western blot experiments indicated that B-RAF was up-regulated in response to doxycycline and that the ERK1/2 kinase was phosphorylated (Fig. 3A, lanes 1 and 2). Interestingly, we also noticed that the p21^{WAF1} protein was also significantly up-regulated in this condition (Fig. 3A, lanes 1 and 2, middle panel). Quantitative RT-PCR experiments showed that B-RAF^{V600E} induced the up-regulation of the p21^{WAF1} mRNA compared

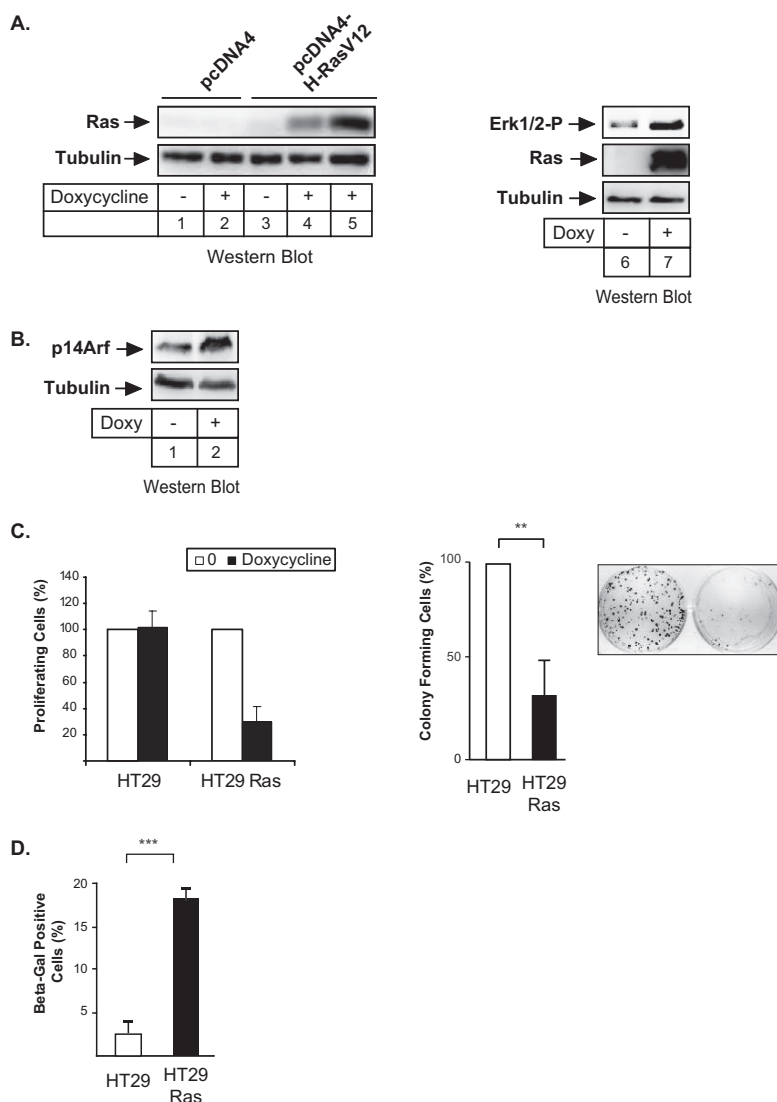
p21^{WAF1}, EMT, and Survival Dysregulation during OIS Escape

FIGURE 1. Oncogene-induced senescence is still functional in the established HT29 colorectal cell line. *A*, to induce H-RAS^{V12} expression, cells were stimulated with 50 ng/ml doxycycline for 24 (lane 4) or 48 h (lanes 2 and 5), and whole cell extracts were prepared and analyzed with mouse monoclonal anti-H-RAS and mouse monoclonal anti-ERK Tyr²⁰⁴ antibodies as indicated. Tubulin expression was examined as a loading control ($n = 3$). *B*, HT29 cells were stimulated or not with 50 ng/ml doxycycline for 48 h, and whole cell extracts were prepared and analyzed with mouse monoclonal anti-p14^{ARF} antibodies. Tubulin expression was examined as a loading control ($n = 3$). *C*, HT29 cells were plated into 96-well plates, and RAS was induced with 50 ng/ml doxycycline and allowed to grow for 72 h. Cell proliferation was investigated by the MTT assay ($n = 3 \pm$ S.D. (error bars), left). In parallel, clonogenic assays were performed, cells were incubated with 50 ng/ml doxycycline for 10 days and were stained with crystal violet to count colonies ($n = 5 \pm$ S.D., right). *D*, following doxycycline treatment for 7 days, the percentage of SA- β -galactosidase-positive cells was evaluated and is shown as the mean \pm S.D. of at least three independent experiments from a total of at least 300 cells.

with noninduced cells (Fig. 3A, lanes 3 and 4). Note, however, that this induction was lower than the one observed in HT29 cells in response to H-RAS^{V12}. Compared with HT29 cells, LS174T cells do not express p16^{INK4} but have a functional p53 protein. To determine whether this tumor suppressor was involved in the up-regulation of p21^{WAF1}, its expression was

down-regulated by RNA interference before B-RAF^{V600E} induction. Although reduced, the activation of p21^{WAF1} was still detected (Fig. 3B, lanes 1–4), indicating that the cell cycle inhibitor can be induced in the absence of p53. Interestingly, using clonogenic assays, we also noticed that B-RAF^{V600E} up-regulation led to long term cell cycle arrest in LS174T cells (Fig. 3C). Together, these

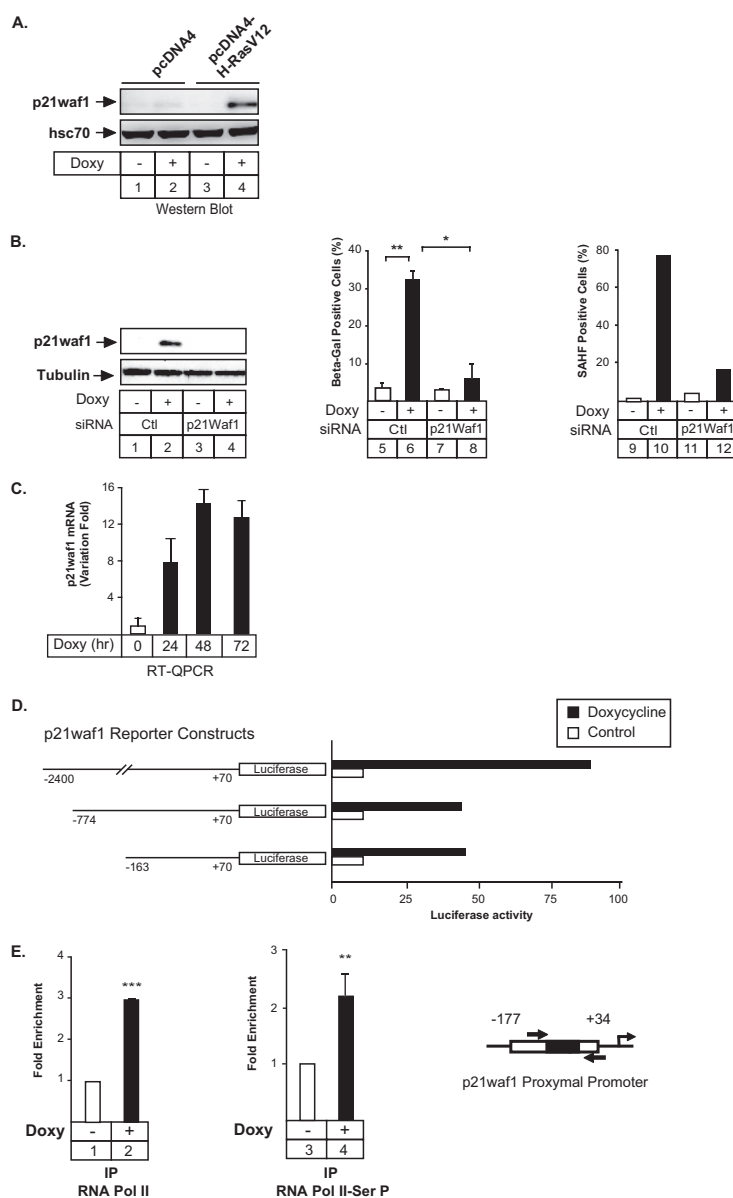
p21^{WAF1}, EMT, and Survival Dysregulation during OIS Escape

FIGURE 2. Expression of p21^{WAF1} is induced in response to the RAS oncogene. *A*, RAS was induced for 48 h, and the expression of p21^{WAF1} was then evaluated by Western blot analysis using total cell extracts ($n = 4$). Hsc70 expression was used as a loading control. *B*, HT29 cells were transfected either with p21-specific siRNA oligonucleotides or control oligonucleotides, and p21^{WAF1} inactivation was then evaluated by Western blot analysis (lanes 1–4). Following doxycycline treatment for 7 days, the percentage of SA- β -galactosidase-positive cells was evaluated and is shown as the mean \pm S.D. (error bars) of at three independent experiments (lanes 5–8). In parallel, SAHf formation and chromatin compaction were analyzed following RAS induction in the presence or absence of p21^{WAF1} by immunofluorescence using DAPI staining (lanes 9–12, one experiment representative of three). *C*, cells were stimulated as described above for the indicated times, and the amount of the p21^{WAF1} mRNA was determined by quantitative (Q) RT-PCR. Data are expressed as compared with noninduced control value and normalized to RPLPO ($n = 3$, mean \pm S.D.). *D*, HT29 cells were transfected with the indicated p21^{WAF1} reporter gene and treated or not with doxycycline. Whole extracts were then prepared to measure luciferase activity ($n = 3$). *E*, HT29 cells were treated as described above, and soluble chromatin was prepared from the indicated cells and immunoprecipitated with antibodies directed against the RNA polymerase, its Ser² phosphorylated form, or control anti-GAL4 antibodies. DNA was amplified using one pair of primers that covers the p21^{WAF1} proximal promoter. ChIP assays were quantified by real-time PCR compared with GAL4 signal and control region ($n = 3 \pm$ S.D.).

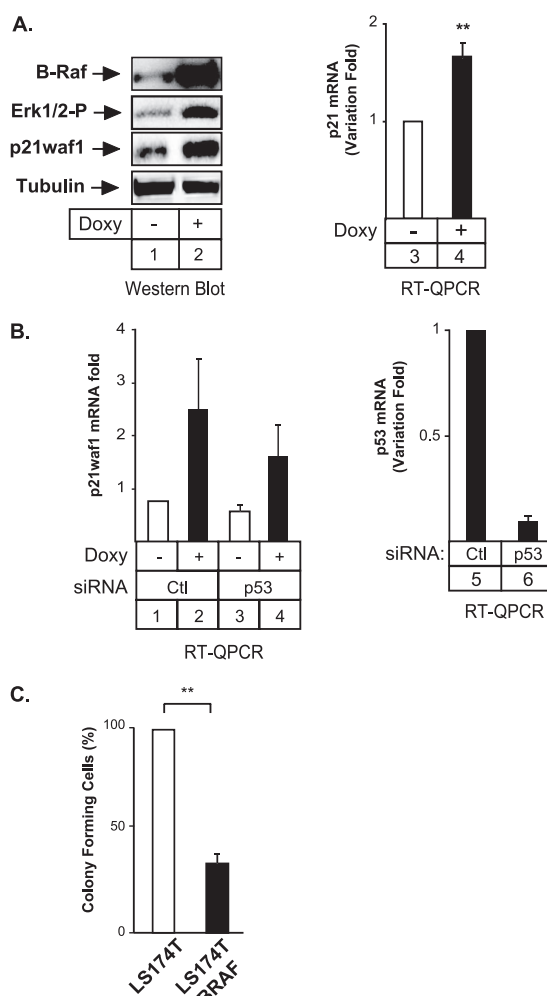
p21^{WAF1}, EMT, and Survival Dysregulation during OIS Escape

FIGURE 3. p21^{WAF1} and cell cycle arrest are also induced in response to the RAF oncogene in LS174T cells. *A*, to induce B-RAF^{V600E} expression, LS174T cells were stimulated with 50 ng/ml doxycycline for 48 h, and whole cell extracts were prepared and analyzed with mouse monoclonal anti-B-RAF and mouse monoclonal anti-ERK (Tyr²⁰⁴) antibodies as indicated (*lanes 1* and *2*). Tubulin expression was examined as a loading control (*n* = 3). In parallel, p21^{WAF1} expression was evaluated by Western blot analysis (*lanes 1* and *2*) or quantitative (Q) RT-PCR (*lanes 3* and *4*). *B*, LS174T cells were either transfected with p53-specific siRNA oligonucleotides or control oligonucleotides, B-RAF was induced for 48 h with 50 ng/ml doxycycline, and p21^{WAF1} expression was then evaluated by RT-PCR (*lanes 1–4*). The inactivation of the p53 mRNA is presented in *lanes 5* and *6* (*n* = 2 ± S.D. (error bars)). *C*, LS174T cells were plated into 96-well plates, and B-RAF was induced with 50 ng/ml doxycycline. Clonogenic assays were performed for 7 days, and cells were stained with crystal violet to count colonies (*n* = 3 ± S.D.).

results indicate that HT29 and LST174T colorectal cells have conserved the ability to up-regulate p21^{WAF1} and induce an OIS program in response to aberrant RAS or RAF signaling.

Expression of the p21^{WAF1} Protein Is Regulated by p38 Kinase—Results presented Fig. 1*B* indicated that the p14^{ARF} tumor suppressor was activated in HT29 cells in response to H-RAS^{V12}.

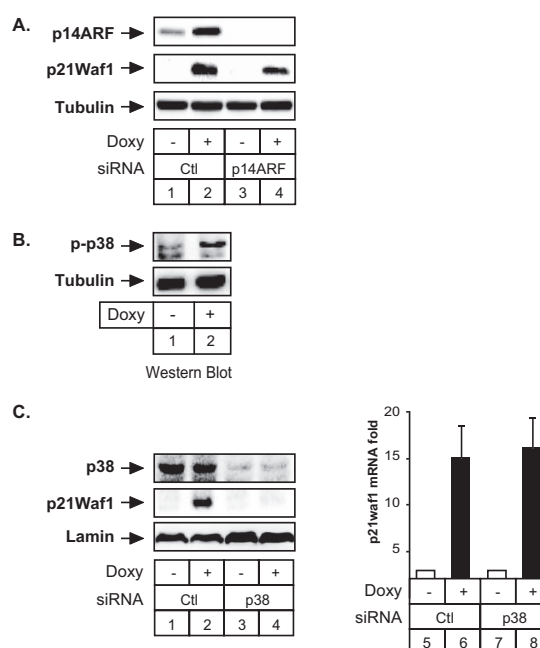


FIGURE 4. Expression of the p21^{WAF1} protein is regulated by p38 in response to the RAS oncogene. *A*, HT29 cells were either transfected with p14^{ARF}-specific siRNA oligonucleotides or control oligonucleotides, RAS was induced for 48 h with 50 ng/ml doxycycline, and p14^{ARF} and p21^{WAF1} expressions were then evaluated by Western blot analysis as indicated (*n* = 3). *B*, RAS was induced for 48 h, and the phosphorylation of the p38 kinase was then evaluated by Western blot analysis using total cell extracts (*n* = 3). Tubulin expression was used as a loading control. *C*, HT29 cells were either transfected with p38-specific siRNA oligonucleotides or control oligonucleotides, RAS was induced for 48 h with 50 ng/ml doxycycline, and p38 and p21^{WAF1} expressions were then evaluated by Western blotting or quantitative (Q) RT-PCR analysis as indicated (*n* = 3 ± S.D. (error bars)).

Because this protein is well known to play an important role during senescence (29), we inactivated its expression by RNA interference to determine its effect on p21^{WAF1} regulation. Western blot experiments confirmed as expected that p14^{ARF} was down-regulated following siRNAs transfection (Fig. 4*A*, *lanes 1–4*, *top panel*). However, we did not observe any effect on the expression of p21^{WAF1}, suggesting that p14^{ARF} was not implicated in the up-regulation of the cell cycle inhibitor (Fig. 4*A*, *lanes 1–4*, *middle panel*).

Elegant results have recently shown that the p38 kinase is involved in the regulation of p21^{WAF1} expression and in senescence induction in response to abnormal oncogenic expression (30, 31). We therefore determined the role of this kinase in p21^{WAF1} regulation in our experimental conditions. Results presented in Fig. 4*B*, *lanes 1* and *2*, confirmed that p38 was phosphorylated following RAS induction (note that the antibodies used in these experiments are directed against the three isoforms of p38). To determine whether this kinase was involved in p21^{WAF1} up-regulation, cells were transfected with a pool of four specific siRNAs directed against p38 or with control sequences. As expected, p38 expression was down-regulated (Fig. 4*C*, *lanes 1–4*, *top panel*). Interestingly, the induction

p21^{WAF1}, EMT, and Survival Dysregulation during OIS Escape

of p21^{WAF1} was not observed in the absence of the kinase (Fig. 4C, compare lanes 1–2 and 3–4, middle panel). By contrast, we did not observe any effect on the mRNA expression of the cell cycle inhibitor, suggesting that p38 regulates the synthesis or stability of p21^{WAF1} as reported previously (30, 31) but not the expression of the gene (Fig. 4B, lanes 5–8). Together, we concluded from these results that the p21^{WAF1} protein is regulated both at the transcriptional and post-transcriptional levels following RAS induction and OIS activation.

p21^{WAF1} Functions as a Transcriptional Regulator of the PLK1 Gene during OIS—We then determined the effect of OIS on cell cycle progression. Flow cytometry analysis indicated that the percentage of cells in the G₁ phase was not significantly modified whereas an increased number of cells in the G₂ phase was detected after RAS induction, probably due to a reduction of cells in S phase. This distribution did not vary significantly during the 4 days that followed RAS induction (Fig. 5A). The expression of the Myc, CDC25A and PLK1 mRNAs was then evaluated because these genes are involved in G₁ and G₂ progression. Results presented Fig. 5B, lanes 3–6, indicate that OIS induced a down-regulation of the CDC25A and PLK1 mRNAs. Because these two genes are well known to be necessary at the G₁/S and G₂/M transitions, this result is consistent with the flow cytometry results. By contrast, we did not observe any modification of Myc mRNA expression (Fig. 5B, lanes 1 and 2).

Following chemotherapy treatment, we have already shown that the cell cycle inhibitor binds to cell cycle genes to prevent their expression (13). These observations suggested to us that during OIS, p21^{WAF1} might induce the transcriptional down-regulation of the *CDC25A* and *PLK1* genes through promoter binding. To verify this hypothesis, cells were first transfected with a reporter construct containing the *PLK1* and *CDC25A* promoters (32), in the presence or absence of a p21^{WAF1} expressing vector. Interestingly, a significant down-regulation of reporter gene activity was noticed in the presence of p21^{WAF1} (Fig. 5C). Note that it has already been proposed that p21^{WAF1} affects *PLK1* transcription in a different experimental system (27). To confirm this observation, cells were transfected with a pool of four siRNAs directed against p21^{WAF1} or the corresponding control siRNAs, and the expression of *PLK1* and *CDC25A* was then investigated by quantitative RT-PCR analysis. As expected, p21^{WAF1} expression was down-regulated (Fig. 5D, right panel). Interestingly, the RAS-mediated inhibition of *CDC25A* and *PLK1* was significantly reduced in the absence of the cell cycle inhibitor whereas control siRNA had no significant effects (Fig. 5D, compare lanes 1–2 and 3–4, lanes 5–6 and 7–8). To extend these observations, ChIP experiments were then performed to determine whether p21^{WAF1} binds to the *CDC25A* and *PLK1* promoters in response to abnormal oncogenic signaling. Although we were not able to detect the cell cycle inhibitor on the *CDC25A* proximal promoter, ChIP experiments indicated that p21^{WAF1} was recruited to the *PLK1* promoter following RAS induction (Fig. 5E, lanes 1 and 2). As a control, PCR analysis did not detect any occupancy of a 5' control region of the *PLK1* promoter. Although p21^{WAF1} was not found associated with the proximal promoter, the E2F1 transcription factor was detected, and its DNA binding was reduced in response to RAS induction (Fig. 5E, lanes 5 and 6). Interest-

ingly, E2F proteins have already been described as regulators of the *PLK1* gene (33), and in addition, p21^{WAF1} can associate with E2F1 to prevent its activity (34). Together, these results indicate that p21^{WAF1} binds to the *PLK1* gene during OIS to prevent its expression.

p21^{WAF1} Pathway Is Inactivated following OIS Escape to Allow PLK1 Reexpression—During the course of these experiments, we have noticed that a few emergent clones bypass the OIS pathway (see the experimental protocol in Fig. 6A; emergent clones are noted RasL. Note that escape occurred for both HT29 and LST174T cells but that we are presenting results only for HT29 cells). After approximately 4–5 weeks, several clones resumed proliferation while still expressing active forms of RAS and ERK (Fig. 6B). This result suggested to us that these cells have inactivated the p21^{WAF1} protective cascade. To verify this hypothesis, Western blotting experiments were performed in several emergent clones to characterize the expression of p21^{WAF1}. As expected, p21^{WAF1} was expressed following RAS induction in parental cells. Interestingly, this up-regulation was lost following OIS inactivation (Fig. 6C, lanes 1–5). In addition, we also noticed that the expression of the p21^{WAF1} mRNA was down-regulated in the emergent clones (Fig. 6C, lanes 6–9). Interestingly, p21^{WAF1} inhibition was correlated with a re-expression of the *CDC25A* and *PLK1* mRNAs in the cells that have escaped the OIS arrest (Fig. 6D). Therefore, OIS bypass is associated with a down-regulation of p21^{WAF1} and with a re-expression of the *CDC25A* and *PLK1* mRNAs.

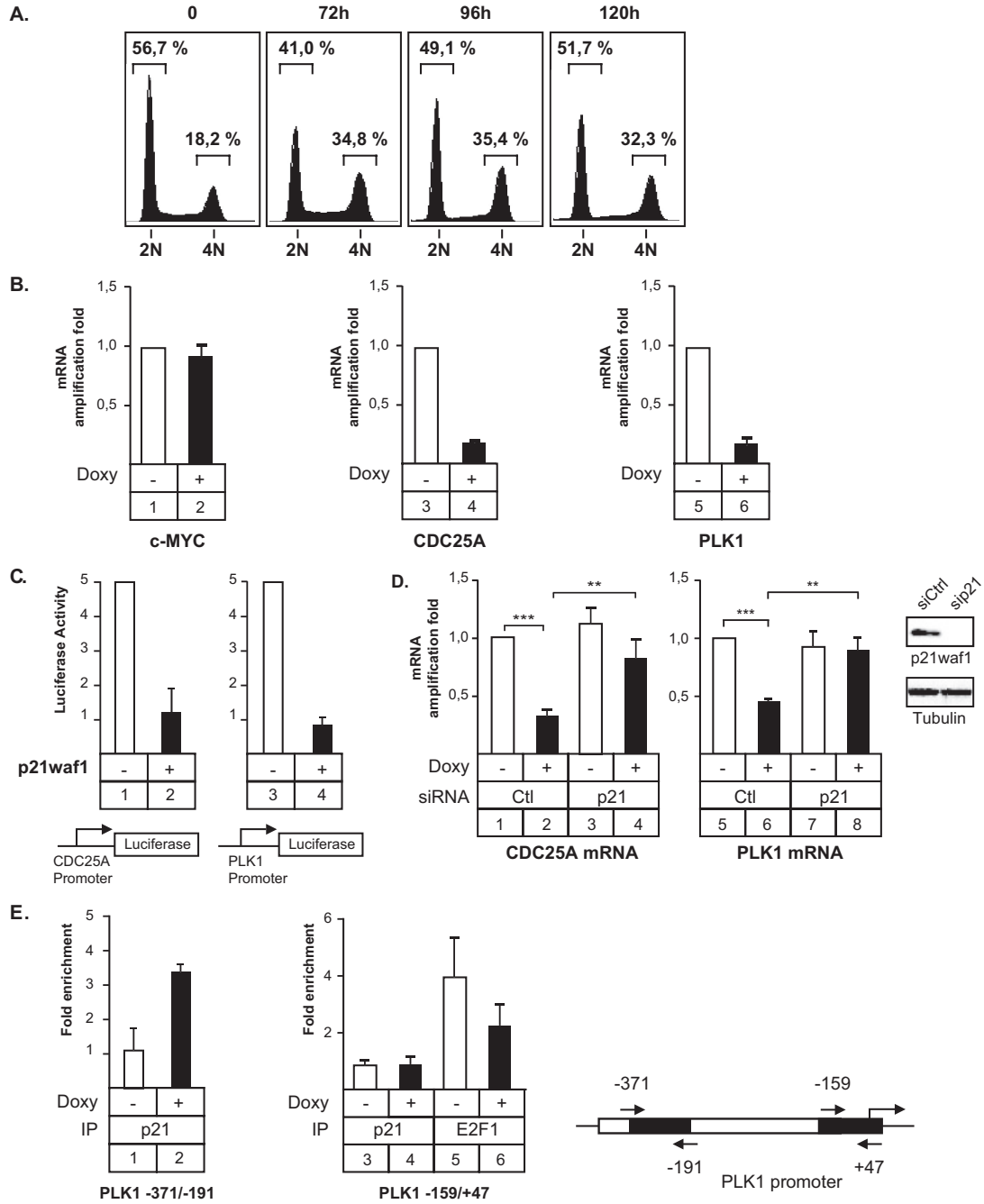
p21^{WAF1} Down-regulation and OIS Escape Are Associated with Enhanced Genomic Instability and SAHF Inactivation—DNA damage due to abnormal replication has been recently proposed to function as an anticancer barrier (35, 36). Because p21^{WAF1} plays an important role in response to genomic instability, we then determined whether this response could be observed in our experimental conditions. To this end, HT29 cells were stained with antibodies recognizing the phosphorylated form of histone H2Ax, a marker of DNA double strand breaks. As expected, Western blotting results showed that the induction of the H-RAS^{V12} oncogene led to DNA damage (Fig. 7A, lanes 1 and 2), probably as a consequence of replicative stress. We then determined whether DNA damage was maintained following OIS escape and p21^{WAF1} inactivation. Interestingly, a significant phosphorylation of histone H2Ax was still detected in the emergent clones (Fig. 7A, lanes 3–7), indicating that these clones continue to proliferate despite a significant amount of DNA damage. The same effect was noticed when DNA damage was analyzed by FACS (Fig. 7B).

As stated above, OIS is also characterized by the formation of SAHF (2). DAPI staining effectively showed an increase in the presence of punctuate heterochromatin foci in the nucleus of cells following RAS induction. Interestingly, this was not observed any more in cells that had escaped the OIS protective mechanism (Fig. 7C). Together, these results indicate that OIS bypass and p21^{WAF1} down-regulation are associated in HT29 cells with enhanced genomic instability and SAHF inactivation.

EMT Is Induced in HT29 Cells during p21/OIS Escape—Using breast cancer lines, it has been proposed recently that during senescence inactivation, the down-regulation of p21^{WAF1} is associated with an induction of the EMT and that this leads to

p21^{WAF1}, EMT, and Survival Dysregulation during OIS Escape

dedifferentiation (37). We then determined whether this was also occurring in the HT29 established cell line. Using a tumor spheroid model, we first observed that parental HT29 cells formed well differentiated round spheroids with strong cell-cell contacts (Fig. 8A). As expected, spheroids did not grow following H-RAS^{V12} induction as a consequence of cell cycle arrest.



Downloaded from www.jbc.org at INSEERM, on April 15, 2011

p21^{WAF1}, EMT, and Survival Dysregulation during OIS Escape

Interestingly, cells that have inactivated p21^{WAF1} and escaped OIS-generated irregular spheroids. Cells frequently left the spheroid structures, and migration of chains of cells was observed in the surrounding matrix (Fig. 8A). The same observation was made using a classical wound-healing test, showing enhanced migration and reduced adhesion of cells that have escaped the p21/OIS pathway (Fig. 8B). We also tested the invasive capacity of the cell line through ECM barriers. We found that cells that have escaped the OIS pathway showed a dramatic increase in invasion compared with parental cells, toward both Matrigel and collagen I matrices (Fig. 8C). In addition, we also noticed that the steady-state level of villin, a marker of epithelial cell adhesion, was down-regulated in the emergent clones (Fig. 8D). Note, however, that this effect was already observed following RAS induction, suggesting that this effect on migration is an early characteristic of the RAS oncogene. These data suggested that emergent clones have acquired an enhanced ability to migrate, but because this also occurs during p21^{WAF1} up-regulation and senescence, this effect is probably not sufficient to allow tumor escape. This suggested to us that p21^{WAF1} and OIS inactivation might have also induced EMT in RasL cells. Using Western blotting and quantitative PCR analysis, we effectively observed that the expression of the E-cadherin was reduced in the emergent clones (Fig. 8E, lanes 1–4) whereas the vimentin mRNA was up-regulated (Fig. 8F, lanes 1–4). Interestingly, using FACS analysis, we also noticed an enhanced proportion of cells expressing the CD24^{low}/CD44^{high} phenotype during senescence escape (Fig. 8G). This confirms recent results obtained with mammary cells, showing that senescence escape and EMT induction generate cells with stem cells properties associated with the CD24^{low}/CD44^{high} phenotype (38). Note that a high expression of CD44 has been associated with an increased ability of HT29 cells to induce tumors in xenograft (39). Altogether, we concluded that OIS escape and p21^{WAF1} down-regulation are associated with cell dedifferentiation in HT29 cells.

Escape to the p21/OIS Pathway and EMT Induction Are Associated with Enhanced Survival and Bcl-xL/MCL1 Dependence—In response to p21^{WAF1} inactivation and the consequent genomic instability, cancer cells are expected to prevent cell death by the induction of compensatory antiapoptotic signals. We speculate that these survival signals are probably also necessary to allow the EMT transition. We thus analyzed whether acute or sustained RAS activation impact on survival signaling and focused our analysis on the Bcl-2 family of proteins (40). In parental cells, the up-regulation of RAS induced an increase in the expression of Bad and of the proapoptotic form of MCL1, namely MCL1-S (Fig. 9A). A decrease of Bim level was also noticed. In contrast, the expression of the Bcl-xL and MCL1

antiapoptotic proteins was not affected. Interestingly, these features were different in cells that have down-regulated the p21^{WAF1}/OIS suppressor pathway. In these cells, the expression level of MCL1-S was drastically decreased, and Bad was also down-regulated. In addition, the expression of the antiapoptotic protein Bcl-xL was higher compared with parental cells. As these expression profiles suggested an enhanced activity of Bcl-xL and MCL1, we investigated the role played by these two survival proteins during p21/OIS escape. To this end, Bcl-xL and/or MCL1 was depleted by siRNA, and apoptosis was evaluated by flow cytometry, using the anti-APO2.7 antibody (also known as 7A6) because its expression is restricted to dying, apoptotic cells. Importantly, results indicate that the codepletion of Bcl-xL and of MCL1, but not the depletion of either protein alone, led to significant apoptotic cell death rates in cells that have escaped the p21^{WAF1} suppressor pathway (Fig. 9B). In sharp contrast, parental HT29 cells and HT29 cells in which RAS had been activated for 48 h, remained essentially viable after Bcl-xL and MCL1 codepletion. These results indicate that cells that have escaped to the p21^{WAF1}-OIS protective pathway showed dependence on Bcl-xL/MCL1, probably as a response to one or more death signals specifically found in highly malignant cells expressing active RAS, having escaped OIS, resumed proliferation, and enhanced their invasion properties.

DISCUSSION

In this study, we have shown that the OIS program is conserved in the established HT29 colorectal cell line, in the absence of intact p53 and p16^{INK4} signaling. Following up-regulation of the RAS oncogene, p21^{WAF1} is up-regulated, and cell proliferation is arrested. This effect is not specific to HT29 cells or to H-RAS^{V12} because the same response has been detected in LS174T cells in response to B-RAF^{G60E}. Our results suggest that p14ARF and p53 are not involved in p21^{WAF1} up-regulation in HT29 cells and that, at least at the protein level, this effect relies on the p38 kinase as reported previously (30, 31). The cell cycle inhibitor prevents the expression of the *CDC25A* and *PLK1* genes, and we have observed that p21^{WAF1} binds to the *PLK1* promoter to prevent its expression. Interestingly, we also noticed that some cells escaped this OIS pathway and that this progression is associated with a down-regulation of p21^{WAF1} expression. Senescence escape is associated with an increase in DNA damage, an induction of the EMT program, and an increase in the proportion of cells expressing the CD24^{low}/CD44^{high} phenotype. In response to this oncogenic stress, cells having escaped OIS rely on the survival pathway induced by Bcl-xL/MCL1 signaling.

FIGURE 5. p21^{WAF1} binds to the PLK1 promoter to prevent its expression during OIS. A, after incubation with 50 ng/ml doxycycline for 48 h, cells were stained with DAPI, and DNA cell content was analyzed by flow cytometry ($n = 3$). B, RNA was isolated following RAS induction, and the expression of the *MYC*, *CDC25A*, and *PLK1* mRNAs was determined by quantitative real-time PCR. Data are quantified compared with the noninduced control and normalized to *RPLPO* expression ($n = 3 \pm$ S.D. (error bars)). C, cells were transfected with reporter gene as indicated together with control or p21^{WAF1}-expressing plasmids. After 2 days, cytoplasmic extracts were then prepared and processed to measure luciferase activity which was normalized compared with *Renilla* luciferase activity ($n = 3 \pm$ S.D.). D, HT29 cells were either transfected with p21-specific siRNA oligonucleotides or control oligonucleotides as indicated. The expression of the *CDC25A* and *PLK1* mRNAs was analyzed by real-time PCR. The down-regulation of the cell cycle inhibitor was verified by Western blotting ($n = 3 \pm$ S.D.). E, soluble chromatin was prepared from cells and immunoprecipitated with antibodies directed against p21^{WAF1}, E2F1, or control anti-GAL4 antibodies. DNA was amplified using pairs of primers that cover the *PLK1* proximal promoter. CHIP assays were quantified by real-time PCR compared with the GAL4 signal and control region ($n = 3 \pm$ S.D.).

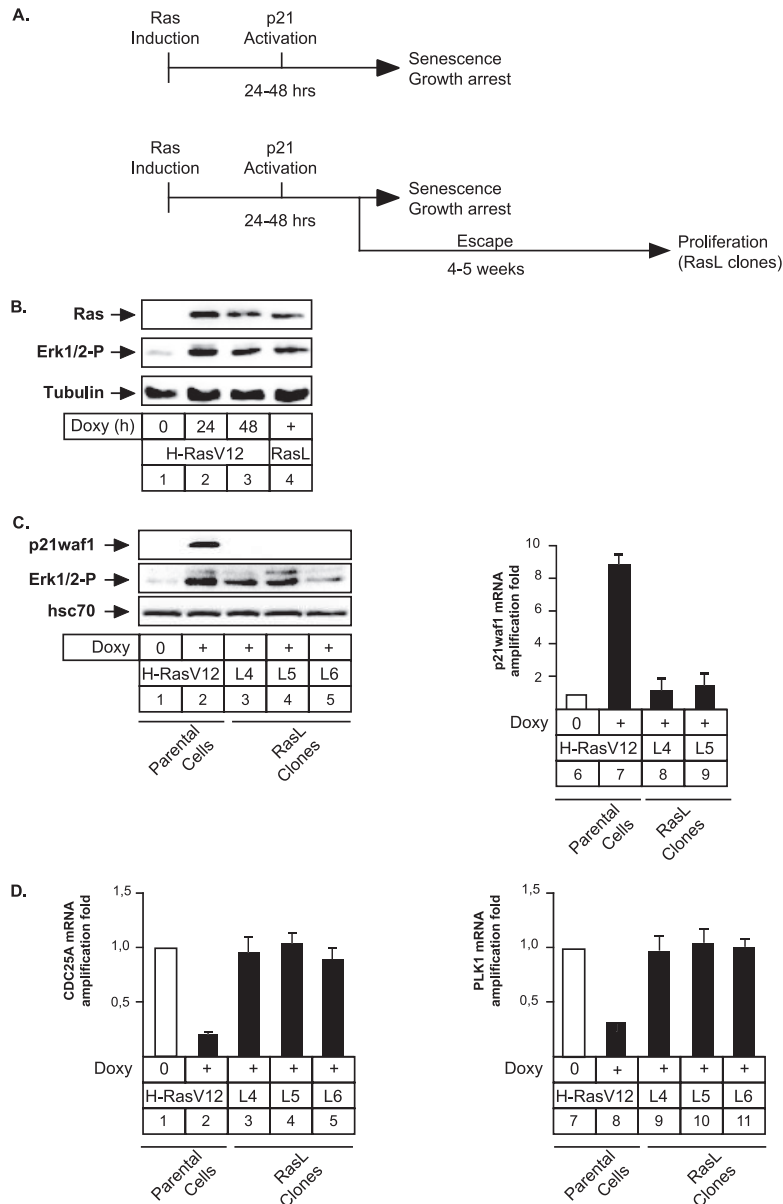
p21^{WAF1}, EMT, and Survival Dysregulation during OIS Escape

FIGURE 6. OIS escape is associated with p21^{WAF1} down-regulation and CDC25A/PLK1 reexpression. *A*, experimental procedure used to allow the growth of cells and the escape to RAS-mediated senescence (cells that escaped senescence were called RasL cells). *B*, Western blot analysis showing RAS and ERK1/2 expression in parental or RasL cells ($n = 3$). *C*, p21^{WAF1} expression analyzed in parental H29 cells or in different representative RasL clones by Western blot analysis (lanes 1–5, $n = 3$). In parallel, total RNA was isolated following RAS induction or in representative RasL cells, and the expression of the p21^{WAF1} mRNA was determined by quantitative real-time PCR (lanes 6–9, $n = 5 \pm$ S.D. (error bars)). *D*, expression of the CDC25A (lanes 1–5) and PLK1 (lanes 7–11) mRNAs following RAS induction or in RasL cells ($n = 3 \pm$ S.D.).

In response to abnormal oncogenic signaling, primary cells activate tumor suppressor pathways that rely on the initial activation of the ARF-p53 and p16^{INK4} proteins. In parallel, replication stress results in the early activation of DNA damage pathways that also function as tumor suppressors. In light of

these observations, it was initially expected that cancer cells have to inactivate these tumor suppressor pathways to allow tumor progression. As expected, many established cell lines have inactivated p53 and INK4 signaling and, for this reason, it can be expected that OIS is essentially active in primary cells. At

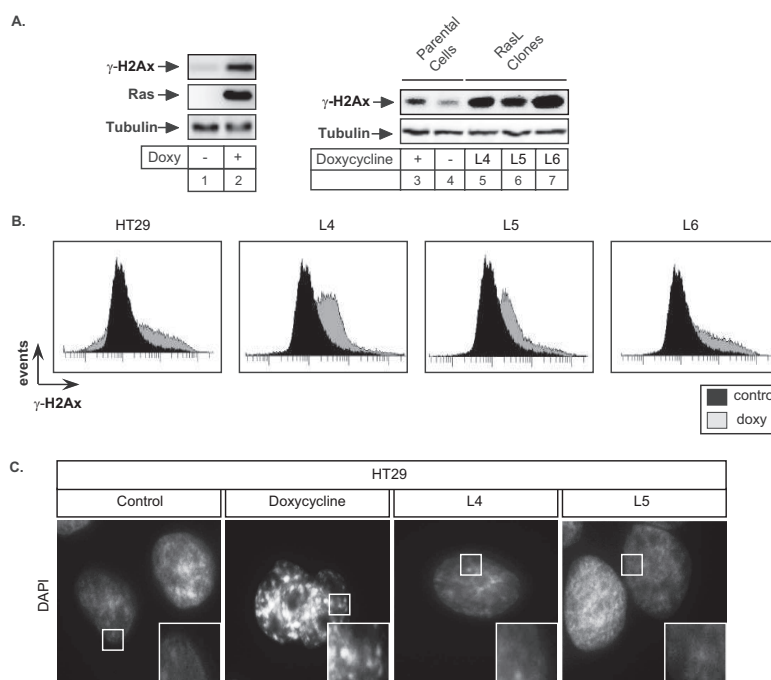
p21^{WAF1}, EMT, and Survival Dysregulation during OIS Escape

FIGURE 7. DNA damage and SAHF down-regulation during p21^{WAF1}/OIS inactivation. *A* and *B*, DNA double strand breaks were analyzed by Western blotting using polyclonal antibodies directed against the Ser¹³⁹ phosphorylated form of histone H2Ax, following RAS induction in parental clones (48 h, lanes 1–2 and 3–4) or in representative RasL cells (lanes 5–7, $n = 3$) (*A*). The generation of DNA double strand breaks was also quantified by FACS analysis (*B*). *C*, SAHF formation and chromatin compaction were analyzed following RAS induction or in representative RasL cells by immunofluorescence using DAPI staining (one experiment representative of three is shown).

least in the cells used in this study, our results indicate that OIS is not only induced in primary cells but that this protective mechanism can still be active in some established colorectal cell lines despite the presence of acquired genetic abnormalities such as p53, and INK4 dysregulations. Recent results have already proposed this hypothesis, showing that the senescence program is conserved in established tumors and that oncogene inactivation is sufficient to reinstate cell cycle arrest (41). In addition, it has been shown recently that OIS can still be induced in established mammary cells (42). Our results indicate that p14^{ARF} and p53 are not involved in the response to the H-RAS^{V12} oncogene in HT29 cells, which is an important difference compared with primary cells. Although we were not able to detect the expression of p16^{INK4A}, the role of p15^{INK4B} remains to be established because recent results have reported the role of this protein during OIS induction (43).

Together, these results suggest that a complete inactivation of the OIS program is not necessary for initial cell transformation. It is well known that mutation in the APC tumor suppressor gene is one of the initial event of colon carcinogenesis, leading to constitutive β -catenin activation. However, other abnormalities are necessary to allow a complete cell transformation. For instance, RAS mutation is an important step in the activation of the β -catenin pathway and during carcinoma progression (44). In light of our results and others, we speculate that OIS is probably not completely inactivated following the

initial β -catenin activation and that this suppressor pathway remains partially functional to restrain cell proliferation in response to secondary mutations. In addition, following senescence escape, our results also imply that apoptosis constitute a secondary fail-safe mechanism. In colorectal cells, we speculate that this suppressor pathway might become active when senescence is bypassed during the successive steps of cell transformation. Indeed, cells that have escaped the p21/OIS pathway harbor specific death signals that kill them once Bcl-xL and MCL1 are down-regulated by RNA interference. These proapoptotic signals and their relationship with RAS remain to be identified. Bcl-xL and MCL1 promote cell survival in great part by preventing some BH3-only proteins such as Bim or Puma to directly activate multidomain proteins and promote their cytotoxic activity. The loss of RAS-induced repression of Bim we found in escaped cells might thus contribute to these signals. Because p21^{WAF1} exerts antiapoptotic activities, it is also possible that its loss, which appears necessary to escape from senescence in our paradigm, contributes to enhance death signals in cells that have escape the OIS protective pathway.

We and others have previously described that p21^{WAF1} can function as a transcriptional inhibitor to prevent the expression of cell cycle genes (9–12, 14–18). This protein associates with several transcription factors such as NF- κ B, STAT3, or E2F1 to bind to the promoters of genes involved in the activation of cell cycle progression such as *MYC*, *CDC25A*, or *WNT4*. We have

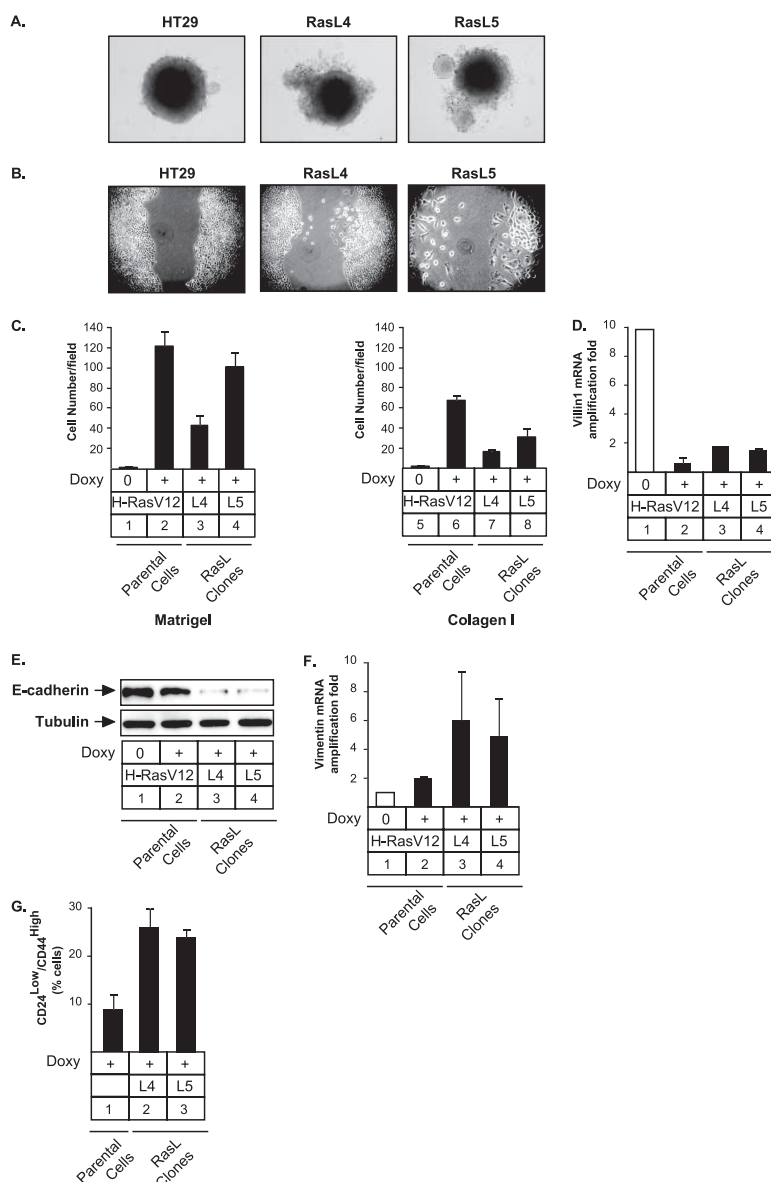
p21^{WAF1}, EMT, and Survival Dysregulation during OIS Escape

FIGURE 8. *p21^{WAF1}/OIS inactivation is associated with EMT induction.* *A*, using either parental or representative RasL cells, spheroids were allowed to grow for 8 days and visualized by microscopy ($\times 200$, $n = 3$). *B*, cell monolayers were wounded by removing cells with a standard 1-ml pipette tip. Following washing, cells were allowed to grow for 2 days ($n = 3$). *C*, transwell assay shows cell migration across Matrigel or collagen-coated wells as indicated. Following loading, cells were incubated for 12 h at 37 °C, and cells that had migrated through the filter were counted and averaged from five randomly chosen microscopic fields using a $\times 20$ objective. *D*, RNA was isolated following RAS induction or in representative RasL cells, and the expression of the villin mRNA was determined by quantitative real-time PCR and quantified compared with ribosomal protein large PO (RPLPO) expression ($n = 3 \pm$ S.D. (error bars)). *E* and *F*, following RAS induction or in representative RasL cells, E-cadherin expression was analyzed by Western blot analysis, using whole cell extracts. Tubulin expression was examined as a loading control (*E*, $n = 2$). In parallel, the expression of the vimentin (lanes 5–8) mRNAs was determined by quantitative real-time PCR. Data are quantified compared with RPLPO expression (*F*, $n = 3 \pm$ S.D.). *G*, percentage of cells expressing the CD24^{low}/CD44^{high} phenotype was determined by FACS analysis following RAS induction (lane 1) or in established RasL clones.

recently shown that *p21^{WAF1}* binds to these promoters in response to chemotherapy treatment to allow cell cycle arrest (13). However, to our knowledge, it has not been demonstrated

previously that these transcriptional functions are also activated in response to an abnormal oncogenic activity in colorectal cancer cells. In addition, the association of *p21^{WAF1}* with

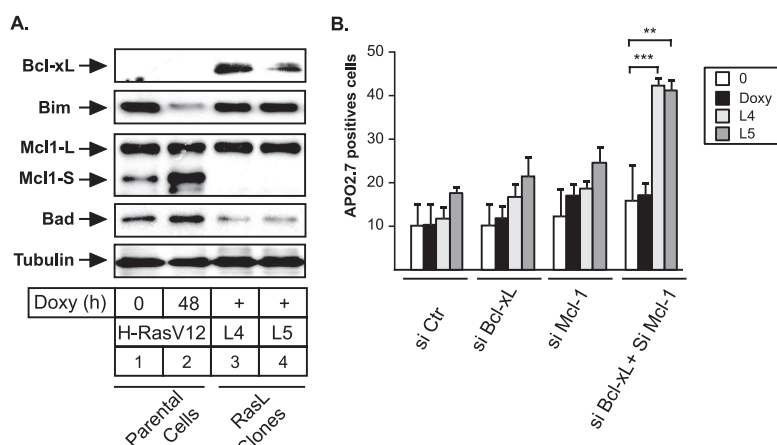
p21^{WAF1}, EMT, and Survival Dysregulation during OIS Escape

FIGURE 9. Increased dependence on Bcl-xL/MCL1 following p21^{WAF1} inactivation and OIS escape. *A*, Western blot analysis of apoptotic and nonapoptotic regulators following RAS induction or in representative RasL clones ($n = 3$). *B*, HT29 cells transfected with either control or Bcl-xL and MCL1-specific siRNA oligonucleotides as indicated. Transfections were performed in parental cells treated or not with doxycycline or in two representative RasL clones. Apoptosis was evaluated by flow cytometry using APO2.7 staining ($n = 4 \pm$ S.D. (error bars)).

DNA has been characterized most of the time on genes activated at the G₀/G₁ transition of the cell cycle. Interestingly, using an isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside-inducible vector (27), it has already been suggested that the overexpression of p21^{WAF1} leads to the down-regulation of G₂-specific genes to prevent progression toward mitosis. In this study, we further confirmed this observation, showing that p21^{WAF1} binds to the *PLK1* promoter to prevent its expression in response to the RAS oncogene. As reported previously, we speculate that this effect is due to the inactivation of transcriptional regulators such as CBP and to histone deacetylation. As stated above, OIS is associated with chromatin reorganization into senescence-associated heterochromatin foci. Silencing depends on the Rb pathway and is associated with enhanced histone H3 trimethylation and recruitment of the HP1 protein on proliferative genes. Therefore, it will be interesting to determine whether the binding of p21^{WAF1} to the *PLK1* promoter is associated with the recruitment of transcriptional repressors such as Rb or H3K9me3 methyltransferases. As expected, *PLK1* expression was reactivated following p21^{WAF1} down-regulation and OIS escape. Interestingly, we have also noticed that cells that escape this suppressor mechanism proliferate despite significant DNA damage. Theoretically, in the absence of intact p53-p21 signaling, inactivation of *CDC25C* or spindle checkpoint activation is expected to prevent the propagation of damaged DNA (45, 46). In addition, we and other have proposed that the Aurora-A-*PLK1* pathway plays an important role to prevent G₂ progression during DNA damage (23, 47, 48). Therefore, we speculate that these G₂/M checkpoints are also dysregulated during OIS escape. Because cells expressing the RAS oncogene have been recently reported to be addicted to the *PLK1* kinase (49), it will be interesting to determine whether the Aurora-A-*PLK1* pathway is involved in OIS escape in our experimental conditions.

Besides regulating cell cycle genes, it has also been shown recently in breast cancer cell lines that p21^{WAF1} inhibits the

epithelial mesenchymal transition in response to the RAS oncogene (50). The cell cycle inhibitor can prevent the repression of the E-cadherin gene by the Twist transcription factor. In addition, these results also indicate that p21^{WAF1} reduces the proportion of cells expressing the CD24^{low}/CD44^{high} phenotype in response to oncogenic transformation. Finally, some of the genes that are overexpressed in embryonic stem cells are also repressed by the cell cycle inhibitor. In light of these results, we speculate that p21^{WAF1} also prevents EMT in colorectal cancer and that this effect might be due to a direct binding of the cell cycle inhibitor to the corresponding promoters. The inactivation of this protein during OIS escape would restore the expression of these genes and allow EMT. Importantly, dedifferentiation of transformed epithelial cells and loss of E-cadherin are associated with chemotherapy resistance (51). It is striking to note that both p21^{WAF1} inactivation and Bcl-xL/MCL1 up-regulation occur at the same time in our experimental conditions. The dysregulation of these two pathways is a key event that can also lead to chemotherapy resistance. Unraveling the mechanisms that lead to the combined loss of p21^{WAF1}, of MCL1-S, and the enhanced Bcl-xL expression during OIS escape is thus of particular relevance, as these events probably play a critical role in maintaining the survival of transformed epithelial cells with a highly malignant phenotype.

Acknowledgments—We thank Dr. T. Uchiyama and Dr. A. Schulze for providing *PLK* reporter and *Raf* constructs.

REFERENCES

- Roninson, I. B. (2003) *Cancer Res.* **63**, 2705–2715
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., and Lowe, S. W. (2003) *Cell* **113**, 703–716
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993) *Cell* **75**, 817–825
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S. J.

p21^{WAF1}, EMT, and Survival Dysregulation during OIS Escape

- (1993) *Cell* **75**, 805–816
5. Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., and Stillman, B. (1994) *Nature* **369**, 574–578
 6. Chuang, L. S., Ian, H. I., Koh, T. W., Ng, H. H., Xu, G., and Li, B. F. (1997) *Science* **277**, 1996–2000
 7. Waldman, T., Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1996) *Nature* **381**, 713–716
 8. Andreassen, P. R., Lacroix, F. B., Lohez, O. D., and Margolis, R. L. (2001) *Cancer Res.* **61**, 7660–7668
 9. Coqueret, O. (2003) *Trends Cell Biol.* **13**, 65–70
 10. Perkins, N. D. (2002) *Cell Cycle* **1**, 39–41
 11. Fritah, A., Saucier, C., Mester, J., Redeuilh, G., and Sabbah, M. (2005) *Mol. Cell. Biol.* **25**, 2419–2430
 12. Devgan, V., Mammucari, C., Millar, S. E., Brisken, C., and Dotto, G. P. (2005) *Genes Dev.* **19**, 1485–1495
 13. Vigneron, A., Cherier, J., Barré, B., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 34742–34750
 14. Bienvenu, F., Barré, B., Giraud, S., Avril, S., and Coqueret, O. (2005) *Mol. Biol. Cell* **16**, 1850–1858
 15. Giraud, S., Hurlstone, A., Avril, S., and Coqueret, O. (2004) *Oncogene* **23**, 7391–7398
 16. Ahn, S. H., Kim, M., and Buratowski, S. (2004) *Mol. Cell* **13**, 67–76
 17. Ho, C. K., and Shuman, S. (1999) *Mol. Cell* **3**, 405–411
 18. Snowden, A. W., Anderson, L. A., Webster, G. A., and Perkins, N. D. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2676–2686
 19. Wood, A., and Shilatifard, A. (2006) *Genes Dev.* **20**, 643–647
 20. Qi, Y., Gregory, M. A., Li, Z., Brousal, J. P., West, K., and Hann, S. R. (2004) *Nature* **431**, 712–717
 21. Courapied, S., Sellier, H., de Carné Trécesson, S., Vigneron, A., Bernard, A. C., Gamelin, E., Barré, B., and Coqueret, O. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 26765–26778
 22. Vigneron, A., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2008) *Cancer Res.* **68**, 815–825
 23. Courapied, S., Cherier, J., Vigneron, A., Troadec, M. B., Giraud, S., Valo, I., Prigent, C., Gamelin, E., Coqueret, O., and Barré, B. (2010) *Mol. Cancer* **9**, 205
 24. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., and Lowe, S. W. (1997) *Cell* **88**, 593–602
 25. Collado, M., and Serrano, M. (2010) *Nat. Rev. Cancer* **10**, 51–57
 26. Vigneron, A., Roninson, I. B., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2005) *Cancer Res.* **65**, 8927–8935
 27. Chang, B. D., Watanabe, K., Broude, E. V., Fang, J., Poole, J. C., Kalinichenko, T. V., and Roninson, I. B. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 4291–4296
 28. Muller, P. A., Caswell, P. T., Doyle, B., Iwanicki, M. P., Tan, E. H., Karim, S., Lukashchuk, N., Gillespie, D. A., Ludwig, R. L., Gosselin, P., Cromer, A., Brugge, J. S., Sansom, O. J., Norman, J. C., and Vousden, K. H. (2009) *Cell* **139**, 1327–1341
 29. Luo, J., Solimini, N. L., and Elledge, S. J. (2009) *Cell* **136**, 823–837
 30. Dolado, I., Swat, A., Ajenjo, N., De Vita, G., Cuadrado, A., and Nebreda, A. R. (2007) *Cancer Cell* **11**, 191–205
 31. Lafarga, V., Cuadrado, A., Lopez de Silanes, I., Bengochea, R., Fernandez-Capetillo, O., and Nebreda, A. R. (2009) *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4341–4351
 32. Uchiumi, T., Longo, D. L., and Ferris, D. K. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 9166–9174
 33. Tategu, M., Nakagawa, H., Sasaki, K., Yamauchi, R., Sekimachi, S., Suita, Y., Watanabe, N., and Yoshid, K. (2008) *J. Genet. Genomics* **35**, 215–224
 34. Delavaine, L., and La Thangue, N. B. (1999) *Oncogene* **18**, 5381–5392
 35. Bartkova, J., Horejsí, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldborg, P., Sehested, M., Nesland, J. M., Lukas, C., Ørntoft, T., Lukas, J., and Bartek, J. (2005) *Nature* **434**, 864–870
 36. Gorgoulis, V. G., Vassiliou, L. V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Dittullo, R. A., Jr., Kastrinakis, N. G., Levy, B., Kletsas, D., Yoneta, A., Herlyn, M., Kittas, C., and Halazonetis, T. D. (2005) *Nature* **434**, 907–913
 37. Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A. P., Bouchet, B. P., Thomas, C., Fauvet, F., Puisieux, I., Doglioni, C., Piccinin, S., Maestro, R., Voeltzel, T., Selmi, A., Valsesia-Wittmann, S., Caron de Fromentel, C., and Puisieux, A. (2008) *Cancer Cell* **14**, 79–89
 38. Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J., and Weinberg, R. A. (2008) *Cell* **133**, 704–715
 39. Yeung, T. M., Gandhi, S. C., Wilding, J. L., Muschel, R., and Bodmer, W. F. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 3722–3727
 40. Youle, R. J., and Strasser, A. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 47–59
 41. Soucek, L., Whitfield, J., Martins, C. P., Finch, A. J., Murphy, D. J., Sodik, N. M., Karnezis, A. N., Swigart, L. B., Nasi, S., and Evan, G. I. (2008) *Nature* **455**, 679–683
 42. Bihani, T., Chicas, A., Lo, C. P., and Lin, A. W. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 2666–2675
 43. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., and Peeper, D. S. (2010) *Genes Dev.* **24**, 2463–2479
 44. Phelps, R. A., Chidester, S., Dehghanizadeh, S., Phelps, J., Sandoval, I. T., Rai, K., Broadbent, T., Sarkar, S., Burt, R. W., and Jones, D. A. (2009) *Cell* **137**, 623–634
 45. Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnicka-Worms, H., and Elledge, S. J. (1997) *Science* **277**, 1497–1501
 46. Weaver, B. A., and Cleveland, D. W. (2005) *Cancer Cell* **8**, 7–12
 47. Macürek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M. A., Klompmaker, R., Freire, R., Clouin, C., Taylor, S. S., Yaffe, M. B., and Medema, R. H. (2008) *Nature* **455**, 119–123
 48. Krystyniak, A., Garcia-Echeverria, C., Prigent, C., and Ferrari, S. (2006) *Oncogene* **25**, 338–348
 49. Luo, J., Emanuele, M. J., Li, D., Creighton, C. J., Schlabach, M. R., Westbrook, T. F., Wong, K. K., and Elledge, S. J. (2009) *Cell* **137**, 835–848
 50. Liu, M., Casimiro, M. C., Wang, C., Shirley, L. A., Jiao, X., Katiyar, S., Ju, X., Li, Z., Yu, Z., Zhou, J., Johnson, M., Fortina, P., Hyslop, T., Windle, J. J., and Pestell, R. G. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 19035–19039
 51. Gupta, P. B., Onder, T. T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R. A., and Lander, E. S. (2009) *Cell* **138**, 645–659

Annexe II : Travaux soumis pour publication

**THE REPROGRAMMING OF NF- κ B2 POST-TRANSLATIONAL MODIFICATION PATTERNS
PROMOTES RAS-MEDIATED SENESENCE BYPASS**

**Audrey Bélanger¹, David Lam¹, Julien Gouju¹, Charles Vadnais², Anne-Charlotte Bernard¹,
Alain Nepveu², Catherine Guette¹, Olivier Coqueret¹ and Benjamin Barré^{1*}**

¹: Paul Papin ICO Cancer Center, INSERM U892, CNRS 6299, Université d'Angers, Angers, France

²: Goodman Cancer Centre, McGill University, 1160 Pine Avenue West, Montreal, Quebec H3A 1A3,
Canada.

Running title:

Lack of S222 phosphorylation of NF- κ B2 promotes Ras-mediated senescence bypass

*Corresponding author

Paul Papin ICO Cancer Center
INSERM U892, CNRS UMR6299, Université d'Angers
2 Rue Moll, 49033 ANGERS, France
Tel: +33 (0)241 352919
Email: benjamin.barre@univ-angers.fr

ABSTRACT

In colorectal cancer, KRAS mutations are present in more than 35% of tumor samples, in which this oncogene allows tumor progression through its well-documented effects on cell cycle and cell survival. Unfortunately, KRAS mutations induce resistance to targeted therapies against the epidermal growth factor receptor, a common treatment in colorectal cancer. Senescence is the suppressive mechanism preventing tumor growth in response to oncogenic RAS induction. However, despite the efficiency of this suppression, cancer cells can emerge to induce clinical relapse. Autophagy is a critical mediator of oncogenic RAS-mediated senescence. Therefore, we sought to investigate the role of NF- κ B-mediated autophagy during OIS establishment. In this study, we demonstrate that the transcription factor NF- κ B2 is recruited on ATG gene promoters to regulate their expression level in response to oncogenic H-RasV12 induction in colorectal cells. Moreover, we show that the composition of NF- κ B2 dimers, which is mediated by S222 phosphorylation, determines autophagic activity and dictates the establishment of optimal oncogene-induced senescence phenotypes. However, it appears that OIS bypassed clones lost in the S222-phosphorylation of NF- κ B2 and reprograms their function. Instead of promoting autophagy-mediated OIS, NF- κ B2 is involved in autophagy default that is sufficient to counteract RAS-mediated ROS overproduction but insufficient to allow a functional OIS phenotype. Consistent with the notion that autophagy level controls the cellular response to oncogenic RAS, understanding the pathways that regulate this switch in activity will be critical to gaining a wider appreciation of the role of NF- κ B in tumorigenesis. Therefore, targeting autophagy and mitochondrial metabolism are valuable new approaches to treating aggressive cancers presenting a reprogrammed NF- κ B2.

Keywords: oncogene, senescence, autophagy, NF- κ B, transcription, colorectal cancer.

Abbreviations: HTR cells, oncogene-inducible H-RasV12-expressing HT29 cell lines, RasL cells, established clones expressing constitutively H-RasV12 oncogene, OIS, oncogene-induced senescence.

INTRODUCTION

Aberrant activation of RAS, one of the first oncogenes identified, by mutations occurs in around 20% of human tumors and more than 35% in colon cancers (1). Oncogenic RAS can transform cells and promote tumorigenesis, although it can also induce senescence in primary fibroblasts (2). Senescence is an anti-proliferative program that blocks the propagation of damaged cells and the risk of neoplastic transformation. Originally described as the process limiting the replicative lifespan of culture cells with critically short telomeres (3), senescence can also be triggered acutely by oncogene activation leading to oncogene-induced senescence (OIS). In contrast to replicative senescence, OIS is a rapid and dynamic process that may halt the progression of premalignant lesions. Furthermore, various forms of DNA damage, including cytotoxic chemotherapeutic agents, can activate senescence. Senescent cells are blocked and incapable of responding to mitogens, although they are viable and metabolically active. Senescence is characterized by dramatic cellular remodeling, which is energetically demanding. Autophagy (also known as macroautophagy) is a stress response involved in energy homeostasis (4,5). This process of self-cannibalization captures cytoplasm, protein aggregates and damaged or superfluous organelles in two-membrane vesicles called autophagosomes and delivers them in lysosomes. The degradation products of these intracellular components are inputs to cellular metabolism, through which they are recycled to generate energy and to build new proteins and membranes. It has been shown that autophagy is a critical mediator of oncogenic RAS-mediated senescence, suggesting a negative role of autophagy in tumorigenesis. However, several recent studies have demonstrated that oncogenic RAS- and BRAF-transformed cells require autophagy to maintain mitochondrial function, stress survival and cellular proliferation in tumorigenesis (4,6). These conflicting observations highlight two functions of autophagy in cancer. It can be tumor suppressing through the elimination of oncogenic protein substrates, toxic unfolded proteins and damaged organelles. Alternatively, it can be tumor promoting in established cancers through autophagy-mediated intracellular recycling that provides energy homeostasis. Therefore, defining the specific role of autophagy in tumorigenesis and the mechanisms involved may be important to the design of autophagy-based targeted therapies.

Although oncogenic RAS has been described as inhibiting autophagy by activating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway (7) directly or by reducing ATG gene expression such as BECN1 in intestinal epithelial cells (8), several reports have shown that RAS induces autophagy by increasing the expression of key components of autophagy machinery, like ATG5 or BECN1 (9,10). Therefore, these reports suggest that RAS signaling might dictate the specific autophagy role by finely regulating its intracellular level. Concerning the transcriptional regulation of autophagy, recent reports have indicated that different transcription factors can regulate the expression of ATG genes depending on cell and stimulus context. FoxO3 has been shown to regulate the expression of GABARAPL1, LC3B, and ATG12L directly in myotubes (11). Other findings have determined that HIF-1 α can either indirectly regulate both BECN1 and ATG5 or directly bind to the BNIP3 promoter (12,13). Interestingly, a more recent work has shown that E2F1 binds to the ULK1, MAPLC3 and DRAM1 promoters, increasing their expressions and regulating autophagy (14). Besides E2F1, p53 has been shown to have a dual role in the regulation of autophagy in response to genotoxic stress (15–18). Although nuclear p53 directly induces DRAM1 and autophagy, cytoplasmic p53 negatively regulates autophagosome formation. There is increasing evidence of both positive and negative

crosstalk between the NF- κ B and p53 pathways, although the critical decision-making pathways that determine how they can cooperatively influence cell fate have only begun to be determined. NF- κ B has emerged as a negative regulator of autophagy as induced by tumor necrosis factor alpha (TNF- α), reactive oxygen species and starvation in some cell lines. On the other hand, a body of evidence suggests an activating role for NF- κ B in autophagy, such as the ability of p65/RelA to bind to the BECN1 promoter, inducing its expression and positively modulating autophagy activity (19). Interestingly, we have recently demonstrated that the p52/NF- κ B2 subunit promotes p27-mediated autophagy by downregulating Skp2 expression following DNA damage treatment (20,21). Moreover, we have demonstrated that the Serine 222 (S222) phosphorylation of p52/NF- κ B2 promotes NF- κ B2/Rel heterodimer formation and recruitment on the Skp2 gene to inhibit its expression and release the p27-mediated autophagy, instead of NF- κ B2 homodimers which induce Skp2 expression and reduce autophagy level (22,23). Although post-translational modifications of NF- κ B subunits are an established mechanism regulating their activity and function, they remain surprisingly under investigated. Recent phospho-proteomic analysis, together with our study, gives some insight into the complexity and functional importance of phosphorylation of the p52/NF- κ B2 subunit (24–27). However, compared with its role as a regulator of immune and inflammatory signaling, little is known about the mechanisms that regulate p52/p100 function in response to oncogene activation inducing senescence phenotype establishment.

The five mammalian NF- κ B/Rel proteins generate over twelve dimers recognizing nine to eleven nucleotides κ B sites. Each dimer selectively regulates a few target promoters; however, several genes are redundantly induced by more than one dimer. In this report, we provide a detailed analysis of autophagy regulation by the transcription factors p52/NF- κ B2 and the other NF- κ B subunits during RAS-induced senescence phenotype establishment. This study reveals that there is coordinated recruitment of NF- κ B subunits to ULK1, ATG2A, MAP1LC3, GABARAP, GABARAPL1 and BECN1 promoters in colorectal cells, with distinct transcriptional activities, upon RAS-mediated oncogenic stress inducing senescence. Moreover, we demonstrate that the optimal autophagic activity to allow a sufficient RAS-induced senescence phenotype requires the recruitment of NF- κ B2/RelA complexes on ULK1, ATG2A, MAP1LC3, SQSTM1/p62, GABARAP, GABARAPL1 and BECN1 promoters via the increase in S222 phosphorylation of NF- κ B2. As a consequence, a lack of S222 phosphorylation of NF- κ B2 occurs in Ras-transformed cells to promote senescence bypass by recycling the substrates for metabolism and maintains energy homeostasis. Finally, we provide evidence suggesting that S222-phosphorylated NF- κ B2 upregulates ATG gene expression, which could be important for autophagy-induced senescence, while a lack of S222 phosphorylation of NF- κ B2 could contribute to an autophagy default involving in the senescence bypass.

RESULTS

Oncogenic Ras induces upregulation of autophagy genes during senescence.

We have previously demonstrated that HT29 established colorectal cell lines in which p53 and p16INK4 are inactivated, maintain an intact OIS program in response to aberrant RAS signaling as in melanocytes (28) or esophageal keratinocytes (29). However, in this Ras-inducible colorectal model (HTR), p21^{WAF1} induction is still indispensable for Ras-induced senescence. We have evaluated the efficiency of senescence phenotype establishment by monitoring the cellular activity of β -galactosidase by flow cytometry using dodecanoylaminofluorescein di- β -galactopyranoside (C12FDG) (30). As expected, following Ras induction over 90% of colorectal cells block their proliferation and acquire a senescence phenotype: enlarged and flat morphology, β -galactosidase staining, SAHF formation and p21^{WAF1} expression (Fig 1A and C). Interestingly, by using C12FDG, we have highlighted the fact that all the cells increase their β -galactosidase activity fourfold and respond homogeneously to Ras oncogenic stress to promote senescence with the same efficiency (Fig 1B). Senescence is a dynamic process involving multiple effector mechanisms whose combination determines the phenotypic efficiency and quality. Young et al showed that autophagy is activated during senescence and its inhibition delays senescence (31,32), and yet Ras activation inhibits autophagy by activating PI3K/AKT/mTOR pathways or reducing BECN1 expression in intestinal cells (7,8). To examine the involvement of autophagy in Ras-induced senescence, we monitored LC3 conjugation to phosphatidylethanolamine and endogenous LC3 associated with autophagosomes and autolysosomes (33). As shown in Figures 1C and D, H-RasV12 induction promotes LC3 lipidation and the formation of endogenous LC3-containing puncta. Quantitative RT-PCR experiments show that oncogenic RAS induces the general upregulation of autophagy genes such as ULK1 and ATG2A, which are important mediators of autophagy (Fig 1E). Together, the results suggest that colorectal cells increase autophagy activities by upregulating autophagy gene expressions during Ras-mediated senescence phenotype establishment.

Ras-mediated autophagy promotes senescence establishment instead of cell death.

Although H-RasV12-induced autophagy in human ovarian surface epithelial cell lines induces a caspase-independent cell death and limits clonogenic survival, we sought to understand the role this autophagy plays in OIS in colorectal cells (10). Using 3-Methyladenine (3MA), a class III phosphatidylinositol 3-kinases inhibitor (Fig 2A) (34), we found that autophagy inhibition reduces uniformly cellular β -galactosidase activity by 25% following RAS induction in all colorectal cells (Fig 2B). Interestingly, inhibition of autophagy level strongly increases cell death upon RAS induction in HTR cells (Fig 2C). When various malignant cell lines were reported to exert cell death by apoptosis in response to bafilomycin A1 treatment (35), we investigated the cell death type induced under these conditions. Flow cytometry analysis demonstrated that autophagy inhibition promotes a significant increase in caspase-3 cleavage, suggesting that aberrant RAS signaling induces apoptotic cell death instead of permanent cell cycle arrest when the autophagy level is reduced (Fig 2D). As autophagy is the only catabolic process that can eliminate damaged or reactive oxygen species (ROS)-overproducing mitochondria from oncogenic stresses (36) and so limit general oxidative damage, we then examined the level of ROS using molecular probes designed against

hydrogen peroxide and superoxide radical. While H-RasV12 expression induces ROS accumulation (Fig 2E), we observed that autophagy protects colorectal cells against cell death during oxidative stress (Fig 2F). Together, these results indicate that Ras-mediated autophagy is required to establish the optimal OIS phenotype by limiting ROS production, which is an important mediator of apoptotic cell death.

NF- κ B2 and RelA determine the optimal autophagy level required for OIS.

It has previously been shown that oncogenic forms of RAS activate NF- κ B transcription factors (37). Moreover, the involvement of NF- κ B signaling on autophagy activation has been demonstrated in several cell lines (38). Schneider et al demonstrated that RelA binds directly to BECN1 promoter to activate its expression and induce autophagy (19). Previously we have shown that the NF- κ B2 signaling pathway promotes p27-mediated autophagy by inhibiting Skp2 expression in response to DNA damage (22). These data suggest that NF- κ B might be an autophagic mediator upon oncogenic RAS induction. To investigate this hypothesis, NF- κ B activation was analyzed following RAS induction in HTR cells. Significantly, western blot analysis showed that aberrant RAS promoted p52- and RelB-nuclear translocation, while the nuclear quantities of p50, RelA and c-Rel were stable (Fig 3A). Surprisingly, we noticed that RAS-mediated p52 activation did not correlate with a decrease in p100 expression (Fig 3A). It has previously been shown that the NF- κ B2 gene is itself an NF- κ B target allowing positive feedback (39–41). Therefore, we analyzed p100 mRNA expression levels by RT-PCR (Fig 3B) and demonstrated that RAS induction activates NF- κ B2 not only by promoting p100-processing but also by increasing p100 expression. To determine if NF- κ B regulates autophagy levels, we performed autophagy monitoring following NF- κ B inhibition by siRNA in OIS (Fig 3C–D). Although Criollo and collaborators have demonstrated that IKK complexes stimulate autophagy in a RelA-independent manner in MEF cells (38), we observed that RelA knockdown inhibits endogenous LC3 lipidation in colorectal cells upon RAS induction (Fig 3C). Surprisingly, NF- κ B2 depletion with validated siRNA amplifies Ras-mediated LC3 lipidation. These observations have been confirmed by the quantitative and qualitative analysis of endogenous LC3 puncta (Fig 3D and E), suggesting that NF- κ B members differentially determine the amplitude of autophagy induction upon RAS-mediated oncogenic stress in colorectal cells. We have demonstrated above that autophagy inhibition induces ROS-mediated cell death in a Caspase-3-dependent manner, and so we sought to explore the incidence of autophagy amplification in OIS. Surprisingly, we observed that NF- κ B2-mediated autophagy over-activation promotes Caspase-3-dependent cell death (Fig 3F). These results reveal that both NF- κ B2 and p65/RelA autophagic activities determine the optimal autophagy activity and suggest that Ras-induced senescence is tightly regulated by specific and optimal NF- κ B-mediated autophagy level.

p52/RelA complexes directly regulate autophagy gene expressions during OIS.

We and others have described how NF- κ B subunits regulate autophagy levels by mediating gene expression. To determine whether the transcriptional activities of p52 and RelA are involved in autophagy genes expression during Ras-initiated senescence in colorectal cells, the expression of these transcription factors have been individually inhibited by siRNA and ATG mRNA levels have been measured (Fig 4A). As expected, RelA downregulation reduces autophagy genes induction,

while an inhibition of NF- κ B2 expression amplifies their expressions following RAS induction. Although p52 has been shown to bind to several anti-autophagy genes such as BCL2L1 or Skp2, ATGs have not been described as this factor's target genes (41,42). The data collection from UCSC genome browser website (<http://genome.ucsc.edu>) has suggested that NF- κ B can potentially bind to ATG promoters in HeLa cells. Moreover, we have observed by ChIP-on-chip assay that NF- κ B2 can be recruited to several ATG genes such as ULK1, ATG2A, MAP1LC3, SQSTM1, GABARAP, GABARAPL1 or BECN1 (Sup 1A and B) in colorectal cells. Transcription factor recognition site analysis of ATG promoters reveals the presence of potential κ B sites (Sup 1C). Therefore, to determine if p52 and RelA bind to ATG promoters, their recruitments were analyzed by ChIP assay in HTR cell line following RAS induction. The results presented in Fig 4B show that both NF- κ B2 and RelA are effectively recruited to ULK1, ATG2A, MAP1LC3, GABARAP, GABARAPL1 and BECN1 promoters upon oncogenic RAS expression, and this is correlated with Ser2/5-phosphorylated RNA polymerase recruitment, which is indicative of gene transcription. RelA and p52 can either form a single and unique complex or distinct and exclusive NF- κ B homo- and heterodimers (43). We have previously demonstrated that S222 phosphorylation of NF- κ B2 promotes its heterodimerization with RelA or c-Rel (27). Using western blotting, we observed that p52 was phosphorylated on S222 upon RAS induction (Fig 4C) and correlated with an increase in p52/RelA heterodimer abundance (Fig 4D), suggesting that oncogenic RAS expression promotes p52/RelA dimer formation. To determine if these p52 complexes were associated with DNA, serial ChIP experiments (Re-ChIP) were then performed. For this, soluble chromatin was immunoprecipitated with first NF- κ B subunit antibody, the immune complexes were released with DTT and the chromatin was further divided into two aliquots and re-immunoprecipitated with IgG or second NF- κ B subunit antibody. Under these conditions, subsequent re-IP p52/RelA was able to immunoprecipitate ATG promoters, which was not the case with the control antibody (Fig 4D). Moreover, by using the Re-ChIP assay, we observed that both p52 and RelA are associated with phosphorylated RNA polymerase II on ULK1, ATG2A, MAP1LC3, GABARAP, GABARAPL1 and BECN1 genes following RAS induction (Fig 4D). These results indicate that oncogenic Ras induction promotes p52/RelA heterodimer formation and recruitment on ATG genes to activate their optimal expression allowing OIS establishment. Although RelA is a strong activator and NF- κ B2 a weak inducer of ATG expressions, the figures 3 and 4 suggest that the composition of NF- κ B dimers regulates the transcriptional rate of these genes following H-RasV12 induction.

OIS bypass in colorectal cells requires autophagy default.

During the course of these experiments, we noticed that few clones bypassed the OIS pathway (Fig 5A; emergent clones = RasL). After approximately thirty days, several clones resumed proliferation while still expressing active forms of RAS and ERK (Sup 1D). As expected, senescence markers such as β -galactosidase activity and p21 expression were reduced in these clones presenting with strong genomic instability (Fig 5B–C). This result suggested that these cells have inactivated the establishment of senescence phenotype. Importantly, recent works show that defective autophagy is a mechanism for the p62 upregulation commonly observed in human tumors and contributing directly to tumorigenesis (44). To verify autophagy levels in emergent clones, LC3 lipidation and endogenous LC3 puncta have been analyzed (Fig 5C–D). Interestingly, the results show that RasL cells present a

reduced autophagy level compared to senescent HT29 cells, while this level is higher than those in normal growing HT29 cells (Fig 5D). To determine whether this autophagy default is mediated by inhibition of the ATG genes expression, we have analyzed the mRNA level of these genes by RT-PCR (Fig 5F). Interestingly, we observed that all the pro-autophagy NF- κ B target genes described above are significantly lower, while their levels are still higher than the ones in normal growing HT29 cells. Several studies describe autophagy as a double-edged sword with both pro- and anti-tumor effects and we have confirmed above that Ras-mediated autophagy promotes senescence. To determine the function of this autophagy default in emergent clones, we analyzed β -galactosidase and Caspase-3 activities besides the surviving cells following autophagy inhibition with 3-MA inhibitor (Fig 5G-I). Under these conditions, β -galactosidase activity did not show significant variation while caspase-3 activity and mortality rate increased. As described by Eileen White and others, autophagy can be tumor promoting by recycling the substrates for metabolism and maintaining a functional pool of mitochondria (45). To verify this hypothesis we measured ROS overproduction in emergent clones following 3-MA treatment (Fig 5J). The results show that ROS production increases following 3-MA-mediated autophagy inhibition, suggesting that contrary to the Ras-mediated autophagy promoting senescence in HTT cells, the autophagy level of RasL cells is involved in cell survival. Together, these results highlight the role of autophagy in senescence bypass and suggest that autophagy default inhibits OIS but is still sufficient to promote intercellular recycling, mitochondrial integrity and cell survey.

NF- κ B2 reprogramming reduces autophagy levels in OIS escaped clones to promote cell survival.

We have demonstrated above that Ras-mediated autophagy is induced by the NF- κ B/RelA complex during OIS in colorectal cells. To determine if inhibition of NF- κ B activation is responsible for the autophagy default that initiates OIS escape, we analyzed NF- κ B activation in emergent clones by western blotting (Fig 6A). Surprisingly, we did not observe any inhibition in p52 generation or variation of nuclear NF- κ B family members' expression in the RasL cells. To examine if NF- κ B2 complexes are still involved in autophagy regulation and more precisely in ATG genes expression, we measured the mRNA and protein levels of these genes following NF- κ B2 downregulation (Fig 6B-C). Under these conditions, we observed that NF- κ B2 knockdown impairs the expression of ULK1, ATG2A, MAP1LC3, GABARAP, GABARAPL1 and BECN1. Moreover, by monitoring endogenous LC3 puncta, we observed that NF- κ B2 downregulation inhibits autophagy by reducing both the number and size of autophagosomes (Fig 6D). Although p100 is still processed into p52 by proteolysis as in senescent cells, p52 is no longer phosphorylated on S222 in RasL clones. To determine if the lack of S222 phosphorylation of p52 is responsible for the autophagy dysregulation in the escaped clones, we analyzed the recruited p52 complexes on the ATG genes by CHIP assay. As shown in Figure 6E, we observed that p52 homodimers are recruited on ULK1, ATG2A, MAP1LC3, GABARAP, GABARAPL1 and BECN1 promoters instead of the p52/RelA complexes in RasL clones. As following RelA downregulation, NF- κ B2 homodimer is a weak transcriptional activator of the autophagy genes described previously. To validate the OIS escaped clones' dependency for p52-mediated autophagy, we analyzed β -galactosidase activity and ROS production besides the surviving cells following NF- κ B2 knockdown (Fig 6G-I). Under these conditions, β -

galactosidase activity did not show significant variation, while cell death increased alongside the intracellular ROS concentration. Moreover, clonogenic assay demonstrated that the RasL cells survey is dependent on the NF- κ B2 pathway. In light of these results, we concluded that a lack of S222 phosphorylation might enhance the recruitment of NF- κ B2 homodimer instead of a p52/RelA heterodimer, allowing a reduction in ATG expressions. Moreover, this autophagy default dependent on NF- κ B2 reprogramming promotes cell survival in the OIS escaped clones.

DISCUSSION

We and others have previously described that NF- κ B transcription factor can function as a transcriptional regulator of pro- and anti-autophagic genes. This factor gives rise to a broad and sometimes contradictory spectrum of biological responses, depending on cell and stimulus context. In particular, NF- κ B2 transcription dimers have been shown either to promote or inhibit autophagy. Indeed, this NF- κ B family member has been shown to cooperate with p53 to induce p27-mediated autophagy by downregulating Skp2 expression following DNA damage treatments (22,46). However, p52 counteracts autophagy by inducing the expression of anti-autophagic gene such as Bcl2 or Bcl-XL, which inhibit BECN1 complexes (47). Here, we have demonstrated that oncogenic RAS induction promotes p52/RelA heterodimer formation and recruitment to ATG promoters: ULK1, ATG2A, MAP1LC3, GABARAP, GABARAPL1 and BECN1. By modulating p52 and RelA abundance, we have demonstrated that the composition of NF- κ B complexes dictates the transcription rate of ATG genes and so the cellular autophagy level. Although RelA appears to be a strong inducer of ATG expressions and p52 a weak inducer, p52/RelA dimer presents an intermediary transcriptional activity which allows the appropriate autophagy level to promote OIS in response to aberrant RAS signaling. The exchange of dimers is a versatile regulatory mechanism reflecting the ability of different NF- κ B dimers to bind to several κ B sites redundantly and to generate various transcriptional effects. Interestingly, we have noticed that NF- κ B2 is phosphorylated on S222 during OIS. This post-translational modification, mediated by GSK3 β following DNA damage, has been demonstrated to promote p52 heterodimer formation with NF- κ B subunits: RelA and c-Rel (22). Our results indicate that S222 phosphorylation of NF- κ B2 might promote p52/RelA heterodimer recruitment to ULK1, ATG2A, MAP1LC3, GABARAP, GABARAPL1 and BECN1 genes and dictate the appropriate autophagy level allowing optimal OIS establishment in response to oncogenic RAS induction (Fig 7). During senescence, concomitant to upregulation of ATG genes, the mTOR signaling axis, an inhibitor of autophagy and an RAS/PI3K effector, was switched off. However, oncogenic RAS has been described to activate directly the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway implicated in GSK3 β inhibition (7). Therefore, it would be interesting to determine if GSK3 β is indeed required for RAS-mediated S222 phosphorylation of p52 during OIS establishment or if other kinases are able to phosphorylate this site.

Although the OIS program is maintained in HT29 established colorectal cell lines, the mechanism is not infallible and some cells escape. We have previously demonstrated that OIS bypass is associated with p21 downregulation and induction of the Bcl-XL/MCL1 survival pathway (48). Recent results have shown that ATG5 and ATG7 knockdown impact in Ras-initiated senescence bypass (31), while BH3 family members have been described as inhibitors of autophagy by titrating BECN1 (49–51). Based on these results, we have observed that emergent clones show autophagy default compared to senescent cells. Although Bcl2 family members inhibit the autophagy level, we have determined that this default is also due to a transcriptional repression of ATG genes. The analysis of promoter occupancy reveals that recruited p52 dimers on ATG genes are not complexed to RelA. Moreover, S222 phosphorylation of p52 does not occur in RasL cells. We speculate that the loss of S222 phosphorylation on NF- κ B2 promotes p52 homodimer formation, which leads to a reduced transcriptional activity on ATG genes compared to p52/RelA heterodimer. This NF- κ B2

reprogramming might promote an autophagy default, which has been described as a tumor suppressor mechanism. In contrast, recent studies show that ATG7 depletion in K-RASG12D- or BRAF-V600E-induced lung cancer in mouse models resulted in an accumulation of defective mitochondria, proliferative defects, reduced tumor burden and increased mouse lifespan. This suggests that autophagy is essential to sustain the metabolism, growth and fate of transformed cells (6,52–55). Here OIS-escaped clones show an autophagy default compared to senescent cells but have enough autophagy activity to remain superior to the basal level present in normal growing parental colorectal cells. This sufficient NF- κ B-mediated autophagy level may be required to reduce the ROS overproduction mediated by the RAS oncogene. Therefore, we speculate that the reprogramming of NF- κ B activation is responsible for the autophagy default allowing OIS bypass as well as maintaining a sufficient autophagy level to sustain Ras-transformed cell growth and metabolism (Fig 7). Importantly, autophagy default during OIS promotes p62/SQSTM1 accumulation, which contributes to NF- κ B activation and tumorigenesis, while p62 inhibition blocks colon cancer development (44,56,57). It is striking to note that NF- κ B-mediated autophagy default might entertain a positive feedback loop promoting cell transformation. Therefore, it would be interesting to investigate the involvement of p62 on maintaining NF- κ B activation in OIS-escaped colorectal clones.

We have recently used a quantitative proteomic approach to compare different stages of 28 colorectal cancers (58). We confirmed olfactomedin-4 (OLFM4) as a candidate biomarker of adenomas and early stages in colorectal cancer in 126 paraffin-embedded tissues. In this study, OLFM4 expression has been shown to be regulated by the RAS/p52 pathway and more precisely by the p52 homodimer on the OLFM4 promoter. Firstly, these results suggest that NF- κ B reprogramming occurs in the early stages of tumorigenesis. Secondly, they suggest it might be possible to target cancer cells in which p52 has been reprogrammed to promote the autophagy-mediated survey by analyzing OLFM4 expression. Altogether these data suggest that the NF- κ B/autophagy pathway might be used for targeted therapies in OLFM4-overexpressing colorectal cancer. To conclude, we propose that p52 and other NF- κ B subunits can contribute to tumor suppressor functions in some circumstances. However, it is also clear that at other times NF- κ B can function as a tumor promoter. It is likely that a key component of this switch will result from different post-translational modifications of p52, such as S222 phosphorylation. Understanding the pathways that regulate this switch will be critical to gaining a wider appreciation of NF- κ B's role in tumorigenesis.

MATERIALS AND METHODS

Flow cytometry

For β -Galactosidase staining, cells were freshly incubated with PBS-BSA 1% and Fluorescein Di- β -Galactopyranoside (molecular probes) according to the manufacturer's instructions. For caspase-3 assay, cells were fixed with 1% formaldehyde at RT for ten minutes, washed twice with PBS and incubated with 70% ethanol at -20°C for twenty minutes. The cells were then incubated with anti-active caspase-3 (BD Biosciences) at room temperature for one hour and samples were analyzed by flow cytometry.

Other assays

Cell growth conditions, transient transfections, siRNA knockdown, RNA extraction, semiquantitative reverse-transcription polymerase chain reaction, protein extracts, western blots, ChIP and microscopy were performed as described previously (48,59–62). For more information and the oligonucleotide sequences, please see Extended Experimental Procedures.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by Ligue Contre le Cancer (comité 49), Canceropole Grand Ouest, Région Pays de la Loire and the French National Research Agency (ANR). We thank Stéphane Ansieau, Hélène Plun-Favreau and Neil Perkins for stimulating discussions and providing materials.

REFERENCES

1. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jan;3(1):11–22.
2. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 1997 Mar 7;88(5):593–602.
3. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 2005 Feb 25;120(4):513–22.
4. Jin S, White E. Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. *Autophagy*. 2007 Jan–Feb;3(1):28–31.
5. Jin S, White E. Tumor suppression by autophagy through the management of metabolic stress. *Autophagy*. 2008 Jul 1;4(5):563–6.
6. Guo JY, Karsli-Uzunbas G, Mathew R, Aisner SC, Kamphorst JJ, Strohecker AM, et al. Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytomas and maintains lipid homeostasis. *Genes Dev*. 2013 Jul 1;27(13):1447–61.
7. Furuta S, Hidaka E, Ogata A, Yokota S, Kamata T. Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase. *Oncogene*. 2004 May 13;23(22):3898–904.
8. Yoo BH, Wu X, Li Y, Haniff M, Sasazuki T, Shirasawa S, et al. Oncogenic ras-induced down-regulation of autophagy mediator Beclin-1 is required for malignant transformation of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 2010 Feb 19;285(8):5438–49.
9. Byun JY, Yoon CH, An S, Park IC, Kang CM, Kim MJ, et al. The Rac1/MKK7/JNK pathway signals upregulation of Atg5 and subsequent autophagic cell death in response to oncogenic Ras. *Carcinogenesis*. 2009 Nov;30(11):1880–8.
10. Elgendy M, Sheridan C, Brumatti G, Martin SJ. Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Mol Cell*. 2011 Apr 8;42(1):23–35.
11. Castets P, Lin S, Rion N, Di Fulvio S, Romanino K, Guridi M, et al. Sustained activation of mTORC1 in skeletal muscle inhibits constitutive and starvation-induced autophagy and causes a severe, late-onset myopathy. *Cell Metab*. 2013 May 7;17(5):731–44.
12. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, et al. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem*. 2008 Apr 18;283(16):10892–903.
13. Papandreou I, Lim AL, Laderoute K, Denko NC. Hypoxia signals autophagy in tumor cells via AMPK activity, independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L. *Cell Death Differ*. 2008 Oct;15(10):1572–81.
14. Polager S, Ofir M, Ginsberg D. E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene*. 2008 Aug 14;27(35):4860–4.
15. Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, et al. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell*. 2006 Jul 14;126(1):121–34.
16. Crighton D, Wilkinson S, Ryan KM. DRAM links autophagy to p53 and programmed cell death. *Autophagy*. 2007 Jan–Feb;3(1):72–4.
17. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008 Jan 11;132(1):27–42.
18. Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, et al. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol*. 2008 Jun;10(6):676–87.
19. Copetti T, Bertoli C, Dalla E, Demarchi F, Schneider C. p65/RelA modulates BECN1 transcription and autophagy. *Mol Cell Biol*. 2009 May;29(10):2594–608.
20. Liang J, Shao SH, Xu ZX, Hennessy B, Ding Z, Larrea M, et al. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2007 Feb;9(2):218–24.
21. Chen Q, Xie W, Kuhn DJ, Voorhees PM, Lopez-Girona A, Mendy D, et al. Targeting the p27 E3 ligase SCF(Skp2) results in p27- and Skp2-mediated cell-cycle arrest and activation of autophagy. *Blood*. 2008 May 1;111(9):4690–9.
22. Barre B, Perkins ND. The Skp2 promoter integrates signaling through the NF-kappaB, p53, and Akt/GSK3beta pathways to regulate autophagy and apoptosis. *Mol Cell*. 2010 May 28;38(4):524–38.
23. Barre B, Perkins ND. A cell cycle regulatory network controlling NF-kappaB subunit activity and function. *EMBO J*. 2007 Nov 28;26(23):4841–55.
24. Dephoure N, Zhou C, Villen J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, Elledge SJ, et al. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 5;105(31):10762–7.

25. Olsen JV, Vermeulen M, Santamaria A, Kumar C, Miller ML, Jensen LJ, et al. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal*. 2010;3(104):ra3.
26. Weintz G, Olsen JV, Fruhauf K, Niedzielska M, Amit I, Jantsch J, et al. The phosphoproteome of toll-like receptor-activated macrophages. *Mol Syst Biol*. 2010 Jun 8;6:371.
27. Barre B, Perkins ND. Phosphorylation of the p52 NF-kappaB subunit. *Cell Cycle*. 2010 Dec 15;9(24):4774–5.
28. Haferkamp S, Tran SL, Becker TM, Scurr LL, Kefford RF, Rizos H. The relative contributions of the p53 and pRb pathways in oncogene-induced melanocyte senescence. *Aging (Albany NY)*. 2009 Jun;1(6):542–56.
29. Demidenko ZN, Korotchikina LG, Gudkov AV, Blagosklonny MV. Paradoxical suppression of cellular senescence by p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 May 25;107(21):9660–4.
30. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*. 2009;4(12):1798–806.
31. Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev*. 2009 Apr 1;23(7):798–803.
32. Narita M, Young AR. Autophagy facilitates oncogene-induced senescence. *Autophagy*. 2009 Oct;5(7):1046–7.
33. Wang L, Chen M, Yang J, Zhang Z. LC3 fluorescent puncta in autophagosomes or in protein aggregates can be distinguished by FRAP analysis in living cells. *Autophagy*. 2013 May;9(5):756–69.
34. Seglen PO, Gordon PB. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Mar;79(6):1889–92.
35. Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, Kondo S, Germano I. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res*. 2003 May 1;63(9):2103–8.
36. Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio JM, Criollo A, Maiuri MC, et al. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Sep;1793(9):1524–32.
37. Finco TS, Westwick JK, Norris JL, Beg AA, Der CJ, Baldwin AS, Jr. Oncogenic Ha-Ras-induced signaling activates NF-kappaB transcriptional activity, which is required for cellular transformation. *J Biol Chem*. 1997 Sep 26;272(39):24113–6.
38. Criollo A, Senovilla L, Authier H, Maiuri MC, Morselli E, Vitale I, et al. The IKK complex contributes to the induction of autophagy. *EMBO J*. 2010 Feb 3;29(3):619–31.
39. Liptay S, Schmid RM, Nabel EG, Nabel GJ. Transcriptional regulation of NF-kappa B2: evidence for kappa B-mediated positive and negative autoregulation. *Mol Cell Biol*. 1994 Dec;14(12):7695–703.
40. Basak S, Kim H, Kearns JD, Tergaonkar V, O'Dea E, Werner SL, et al. A fourth IkappaB protein within the NF-kappaB signaling module. *Cell*. 2007 Jan 26;128(2):369–81.
41. Barre B, Coqueret O, Perkins ND. Regulation of activity and function of the p52 NF-kappaB subunit following DNA damage. *Cell Cycle*. 2010 Dec 15;9(24).
42. Schneider G, Saur D, Siveke JT, Fritsch R, Greten FR, Schmid RM. IKKalpha controls p52/RelB at the *skp2* gene promoter to regulate G1- to S-phase progression. *EMBO J*. 2006 Aug 23;25(16):3801–12.
43. Schmid RM, Perkins ND, Duckett CS, Andrews PC, Nabel GJ. Cloning of an NF-kappa B subunit which stimulates HIV transcription in synergy with p65. *Nature*. 1991 Aug 22;352(6337):733–6.
44. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell*. 2009 Jun 12;137(6):1062–75.
45. White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012 Jun;12(6):401–10.
46. Schumm K, Rocha S, Caamano J, Perkins ND. Regulation of p53 tumour suppressor target gene expression by the p52 NF-kappaB subunit. *EMBO J*. 2006 Oct 18;25(20):4820–32.
47. Marinari B, Costanzo A, Marzano V, Piccolella E, Tuosto L. CD28 delivers a unique signal leading to the selective recruitment of RelA and p52 NF-kappaB subunits on IL-8 and Bcl-xL gene promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 20;101(16):6098–103.
48. de Carne Trecesson S, Guillemin Y, Belanger A, Bernard AC, Preisser L, Ravon E, et al. Escape from p21-mediated Oncogene-induced Senescence Leads to Cell Dedifferentiation and Dependence on Anti-apoptotic Bcl-xL and MCL1 Proteins. *J Biol Chem*. 2011 Apr 15;286(15):12825–38.
49. Maiuri MC, Criollo A, Tasdemir E, Vicencio JM, Tajeddine N, Hickman JA, et al. BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy*. 2007 Jul–Aug;3(4):374–6.

50. Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, et al. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J*. 2007 May 16;26(10):2527–39.
51. Oberstein A, Jeffrey PD, Shi Y. Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein. *J Biol Chem*. 2007 Apr 27;282(17):13123–32.
52. Watson AL, Rahrmann EP, Moriarity BS, Choi K, Conboy CB, Greeley AD, et al. Canonical Wnt/beta-catenin signaling drives human schwann cell transformation, progression, and tumor maintenance. *Cancer Discov*. 2013 Jun;3(6):674–89.
53. Nam HY, Han MW, Chang HW, Kim SY, Kim SW. Prolonged autophagy by MTOR inhibitor leads radioresistant cancer cells into senescence. *Autophagy*. 2013 Aug 13;9(10).
54. Guo JY, White E. Autophagy is required for mitochondrial function, lipid metabolism, growth and fate of KRAS (G12D) -driven lung tumors. *Autophagy*. 2013 Aug 15;9(10).
55. Kenific CM, Thorburn A, Debnath J. Autophagy and metastasis: another double-edged sword. *Curr Opin Cell Biol*. 2010 Apr;22(2):241–5.
56. Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, Diaz-Meco MT, et al. The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2008 Apr;13(4):343–54.
57. Guo X, Dong Y, Yin S, Zhao C, Huo Y, Fan L, et al. Patulin induces pro-survival functions via autophagy inhibition and p62 accumulation. *Cell Death Dis*. 2013;4:e822.
58. Besson D, Pavageau AH, Valo I, Bourreau A, Belanger A, Eymerit-Morin C, et al. A quantitative proteomic approach of the different stages of colorectal cancer establishes OLFM4 as a new nonmetastatic tumor marker. *Mol Cell Proteomics*. 2011 Oct 10.
59. Courapied S, Cherier J, Vigneron A, Troadec MB, Giraud S, Valo I, et al. Regulation of the Aurora-A gene following topoisomerase I inhibition: implication of the Myc transcription factor. *Mol Cancer*. 2010;9:205.
60. Courapied S, Sellier H, de Carne Trecesson S, Vigneron A, Bernard AC, Gamelin E, et al. The cdk5 kinase regulates the STAT3 transcription factor to prevent DNA damage upon topoisomerase I inhibition. *J Biol Chem*. 2010 Aug 27;285(35):26765–78.
61. Lundquist A, Barre B, Bienvenu F, Hermann J, Avril S, Coqueret O. Kaposi sarcoma-associated viral cyclin K overrides cell growth inhibition mediated by oncostatin M through STAT3 inhibition. *Blood*. 2003 May 15;101(10):4070–7.
62. Bertin-Ciftci J, Barre B, Le Pen J, Maillet L, Couriaud C, Juin P, et al. pRb/E2F-1-mediated caspase-dependent induction of Noxa amplifies the apoptotic effects of the Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-737. *Cell Death Differ*. 2013 May;20(5):755–64.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Oncogenic Ras induces upregulation of autophagic genes during senescence establishment.

- A. The percentage of SA- β -galactosidase-positive cells was evaluated in HTR cells on H-RASV12 induction with 50 ng/ml doxycycline for 4 or 8 days (lanes 1–3).
- B. Following doxycycline treatment for 72 hours, the SA- β -galactosidase activity per cell was measured by flow cytometry using C12FDG staining (FACS profile left panel; graph right panel).
- C. Ras was induced with 50 ng/ml doxycycline in HTR cells for 72 hours, and whole cell extracts were prepared and analyzed by western blot with anti-Ras, anti-LC3 and anti-p21 antibodies. HSC70 expression was examined as a loading control.
- D. Endogenous LC3 dots were counted and characterized following Ras induction with 50 ng/ml doxycycline by immunofluorescence microscopy using polyclonal antibody directed against LC3 and DAPI staining as indicated (lanes 1–2). Representative graphs of the number and size of the LC3 dots have been produced using ImageJ software (lanes 3–6).
- E. The expression of ATG genes was monitored by quantitative RT-PCR after treatment with doxycycline for 72 hours. The variations in expression, the significance of the variations compared to growing cells and the reference demonstrating the involvement of the gene in autophagy have been reported in a table. ULK1 and ATG2A are shown as examples (lanes 1–4).

Figure 2: Ras-mediated autophagy promotes senescence establishment instead of cell death.

- A. HTR cells were treated with 50 ng/ml doxycycline for 72 hours and with 5 mM 3-MA for 24 hours. Endogenous LC3 expression was analyzed by immunofluorescence microscopy using polyclonal antibodies directed against LC3 and quantified using ImageJ software.
- B. HT29 cells were treated with 50 ng/ml doxycycline for 72 hours and with 5 mM 3-MA for 24 hours and SA- β -galactosidase activity per cell was measured by flow cytometry following C12FDG staining.
- C. HTR cells were treated with 50 ng/ml doxycycline for 72 hours and with 5 mM 3-MA for 24 hours and cell death was then evaluated by Sub-G1 analysis with DAPI staining.
- D. HTR cells were treated with 50 ng/ml doxycycline for 72 hours and with 5 mM 3-MA for 24 hours and apoptosis was then quantified by FACS analysis using polyclonal antibodies directed against cleaved caspase-3.
- E. ROS production was monitored by flow cytometry using DCFDA staining after doxycycline treatment for 72 hours in HTR cells.
- F. HTR cells were treated with 1 mM H₂O₂ for 48 hours and with 5 mM 3-MA for 24 hours and cell death was then evaluated by Sub-G1 analysis with DAPI staining.

Figure 3: Opposing roles of NF- κ B2 and RelA in autophagy level regulation on Ras oncogenic induction.

- A. HTR cells were stimulated with 50 ng/ml doxycycline for 72 hours, and nuclear (lanes 1–2) and cytoplasmic (lanes 3–4) extracts were prepared and analyzed by western blot with antibodies

- directed against NF- κ B members. Lamin-A/C and α -tubulin expression were examined as a control of loading and cellular fractionation.
- B. Total RNA extraction was performed on HTR cells stimulated with 50 ng/ml doxycycline for 72 hours and NF- κ B2 expression was then monitored by quantitative RT-PCR (lanes 1–2).
 - C. HTR cells were transfected with either NF- κ B2- or RelA-specific siRNA oligonucleotides or control oligonucleotides, and treated with 50 ng/ml doxycycline for 72 hours. RelA, NF- κ B2 and LC3 expression were then evaluated by western blotting as indicated (lanes 1–8). The quantification of LC3-II protein expression by Quantity-One software has been represented on a graph (lanes 9–11).
 - D. HTR cells were transfected as above with NF- κ B2- or RelA-specific siRNA oligonucleotides or scramble and treated with 50 ng/ml doxycycline for 72 hours. Endogenous LC3 dots were then analyzed by immunofluorescence microscopy using polyclonal antibody directed against LC3 and DAPI staining as indicated.
 - E. The number and size of the endogenous LC3 puncta from the experiments above were analyzed using ImageJ software and represented on a graph.
 - F. ROS production was analyzed by FACS analysis using DCFDA staining in HTR cells treated with 50 ng/ml doxycycline (lanes 2 and 4) for 72 hours or untreated (lanes 1 and 3).

Figure 4: NF- κ B2/RelA complexes regulate the optimal autophagy level required for OIS establishment.

- A. Total RNA extraction was performed on HTR cells transfected either with NF- κ B2- or RelA-specific siRNA oligonucleotides or with scramble, and treated with 50 ng/ml doxycycline for 72 hours. The expression of ATG genes was monitored by quantitative RT-PCR. The variations in expression and the significance of the variations compared to growing cells were represented on a table. ULK1 and ATG2A are shown as examples (lanes 1–6).
- B. Analysis of NF- κ B subunits and phosphorylated RNA polymerase II recruitment to the promoters of ATG genes in HTR cells. ChIP analysis was performed using antibodies to proteins on the indicated genes following 50 ng/ml doxycycline treatment for 72 hours.
- C. Whole cell extractions from HTR cells treated with 50 ng/ml doxycycline or untreated for 24, 36 or 48 hours were prepared and analyzed by western blot with antibodies directed against S222-phosphorylated or total p52/NF- κ B2. HSC70 expression was examined as a loading control.
- D. Whole cell extractions from HTR cells treated with 50 ng/ml doxycycline for 72 hours or untreated were prepared and NF- κ B2 was immunoprecipitated. The immunoprecipitation (lanes 1–2) and whole cell extracts (lanes 3–4) were analyzed by western blot against the indicated antibodies. HSC70 expression was evaluated as a loading control.
- E. Distinct NF- κ B subunit complexes bind to ATG promoters. ReChIP analysis of these promoters was performed using the indicated antibodies against NF- κ B subunits in HTR cells treated with 50 ng/ml doxycycline for 72 hours (lanes 2, 4, 6 and 8) or untreated (lanes 1, 3, 5 and 7). Inputs were used as positive and loading controls.
- F. NF- κ B subunit complexes as transcriptional activators. ReChIP analysis of these promoters was performed using the indicated antibodies in HTR cells treated with 50 ng/ml doxycycline for 72

hours (lanes 2, 4, 6 and 8) or untreated (lanes 1, 3, 5 and 7). Inputs were used as positive and loading controls.

Figure 5: OIS bypass requires autophagy default in colorectal cells.

- A. HTR cells were treated with 50 ng/ml doxycycline for the indicated time. The number of cells was evaluated and the percentage of senescent cells was measured by SA- β -galactosidase activity staining using flow cytometry.
- B. The SA- β -galactosidase activity per cell was measured by flow cytometry following C12FDG staining in HTR cells treated with 50 ng/ml doxycycline for 72 hours (lane 2) or untreated (lane 1) and OIS escaped clones (RasL; lane 3) (FACS profile left panel; graph right panel).
- C. Whole cell extractions from HTR cells treated with 50 ng/ml doxycycline for 72 hours or untreated and RasL cells were prepared and then analyzed by western blot against the indicated antibodies. Lamin-A/C expression was evaluated as a loading control.
- D. Autophagic level was evaluated by counting and characterizing endogenous LC3 dots in HTR cells treated (lane 1) with 50 ng/ml doxycycline for 72 hours or untreated (lane 2) and RasL cells (lane 3) using immunofluorescence microscopy. Representative graphs of the number and size of the LC3 dots have been produced using ImageJ software.
- E. The expression of ATG genes was monitored by quantitative RT-PCR in HTR cells treated with doxycycline for 72 hours and in RasL cells. The variations in expression and the significance of the variations compared to growing cells have been reported in a table.
- F. RasL cells were treated with 3 mM 3-MA for 48 hours (lane 2) or untreated (lane 1) and the SA- β -galactosidase activity per cell was then measured by flow cytometry following C12FDG staining.
- G. RasL cells were treated with 3 mM 3-MA for 48 hours (lane 2) or untreated (lane 1) and cell death was then evaluated by Sub-G1 analysis with DAPI staining.
- H. RasL cells were treated with 3 mM 3-MA for 48 hours (lane 2) or untreated (lane 1) and apoptosis was then quantified by FACS analysis using polyclonal antibodies directed against cleaved caspase-3.
- I. RasL cells were treated with 3 mM 3-MA for 48 hours (lane 2) or untreated (lane 1) and ROS production was then analyzed by FACS analysis using DCFDA staining.

Figure 6: NF- κ B2 reprogramming reduces the autophagy level in OIS escape clones to promote cell survival.

- A. Whole cell extractions from HTR cells treated with 50 ng/ml doxycycline for 72 hours or untreated and RasL cells were prepared and then analyzed by western blot against the indicated antibodies. HSC70 expression was evaluated as a loading control.
- B. Total RNA extraction was performed on RasL cells transfected with NF- κ B2 (lane 2) or scramble siRNA (lane 1). The expression of ATG genes was monitored by RT-PCR and visualized in agarose gel.
- C. Whole cell extractions from RasL cells transfected with NF- κ B2 (lane 2) or scramble siRNA (lane 1) were prepared and then analyzed by western blot against the indicated antibodies. α -tubulin expression was evaluated as a loading control.

- D. Autophagic level was evaluated by counting and characterizing endogenous LC3 dots in RasL cells transfected with NF- κ B2 (lane 2) or scramble siRNA (lane 1) using immunofluorescence microscopy. Representative graphs of the number and size of the LC3 dots have been produced using ImageJ software.
- E. Analysis of NF- κ B subunits and phosphorylated RNA polymerase II recruitment to the promoters of ATG genes in HTR cells treated with 50 ng/ml doxycycline for 72 hours or untreated and RasL cells. ChiP analysis was performed using antibodies to proteins on the indicated genes.
- F. RasL cells were transfected with NF- κ B2 or scramble siRNA oligonucleotides for 48 hours and the SA- β -galactosidase activity per cell was then measured by flow cytometry following C12FDG staining.
- G. RasL cells were transfected with NF- κ B2 or scramble siRNA oligonucleotides for 48 hours and cell death was then evaluated by Sub-G1 analysis with DAPI staining.
- H. RasL cells were transfected with NF- κ B2 or scramble siRNA oligonucleotides for 48 hours and ROS production was then analyzed by FACS analysis using DCFDA staining.
- I. RasL cells were transfected with NF- κ B2 (lane 2) or scramble siRNA (lane 1) for 24 hours and clonogenicity assay was then performed on incubated cells for ten days. The colony was stained with crystal violet, counted and represented on a graph.

Figure 7: Representative diagram of NF- κ B2 reprogramming involving OIS bypass.

Model depicting the autophagic function of NF- κ B2 during OIS phenotype establishment and the reprogramming of NF- κ B2 in emergent clones.

Extended Experimental Procedures

Cell culture

The human colon adenocarcinoma cell line HT29 (American Type Culture Collection, ATCC) was transfected and RasL cell lines were obtained as previously described (48). The cell lines were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum containing 100 µg/ml zeocin (Invitrogen) and 2.5 µg/ml blasticidin (Sigma Aldrich). For RasL cells, the culture was supplemented with 50 ng/ml doxycycline. All cell lines were maintained at 37°C in 5% carbon dioxide and were tested to rule out mycoplasma contamination. H-RASV12 expression was induced by 50 ng/ml doxycycline on adherent HT29Ras cells for the indicated times, in antibiotic-free medium supplemented with 10% FBS. For the autophagy inhibition experiment, HT29Ras cells were treated with 50 ng/ml doxycycline at T0, and 5 mM 3-MA was added at T48 hours, and finally cells were harvested at T72 hours. For RasL cells, 3-MA and doxycycline were added to adherent cells for 24 hours.

Flow cytometry

For SA-β-Galactosidase staining, cells were freshly incubated with PBS-BSA 1% and Fluorescein Di-β-Galactopyranoside (molecular probes) according to the manufacturer's instructions. For caspase-3 assay, cells were fixed with 1% formaldehyde at RT for ten minutes, washed twice with PBS and incubated with 70% ethanol at -20°C for twenty minutes. The cells were then incubated with anti-active caspase-3 (BD Biosciences 550821) at room temperature for one hour and samples were analyzed by FACS (BD Biosciences).

Clonogenic assay

HT29Ras and RasL cells were seeded at 500 cells into six well cell culture plates and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Adherent cells were then treated with 50 ng/ml doxycycline and 2.5 mM 3-MA (IC₅₀) for eight days, washed twice with PBS and stained with 0.1% crystal violet. The colonies were then washed twice with water and colonies exceeding fifty cells were visualized with a Bio-Rad ChemiDoc XRS Imaging device and counted using Quantity One imaging software (Bio-Rad). The survival fraction was determined as the ratio of the number of colonies observed with treatment to the number of untreated cells, adjusted to the plating efficiency.

Fluorescence microscopy

Cells were grown on cover slides for the indicated time and then fixed with 2% formaldehyde at RT for twelve minutes, washed twice with PBS and incubated with 70% ethanol at -20°C for twenty minutes. The cells were washed again twice with PBS before being incubated with PBS 2% BSA at RT for ten minutes, and then incubated with anti-LC3 (cell signaling, 2775) at RT in a humid atmosphere for three hours. Bound antibody was visualized using Alexa Fluor488 anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen, A11008). The cells were observed using Prolong Gold Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen, P36935) under confocal microscopy (Nikon Eclipse E600 with AxioCam MRm camera). The number and size of autophagy puncta were determined using ImageJ software.

Western blotting

Following cell lysis at 4°C (50 mM Tris-HCl pH 8.1; 1% SDS; 10 mM EDTA; 1 mM PMSF; 10 µg/ml aprotinin; 10 µg/ml leupeptin; 10 µg/ml pepstatin; 1 mM Na₃V04; 50 mM NaF), lysates were sonicated and then boiled for ten minutes. Proteins were separated on a polyacrylamide sodium dodecyl sulfate-containing gel and transferred to a PVDF membrane. Following one-hour incubation in 5% BSA TBS 0.1% Tween 20, the membranes were incubated overnight at 4°C with mouse polyclonal anti-LC3 (Cell Signaling, 2775), mouse monoclonal anti-α Tubuline (B7) (sc-5286), mouse monoclonal anti-NF-κB2 (upstate, 05-361), mouse monoclonal anti-HRAS (sc-29), rabbit monoclonal anti-p21 (Cell Signaling, 2947), rabbit polyclonal anti-RelA (sc-372), rabbit polyclonal anti-RelB (sc-226), rabbit polyclonal anti-cRel (sc-70), rabbit polyclonal anti-NF-κB1 (Upstate, 06-886), mouse monoclonal anti-HCS70 (sc7298), mouse monoclonal anti-lamin (sc7293) and mouse monoclonal anti-tubulin (sc-5286). The membranes were then washed twice with TBS 0.1% Tween 20 and incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies for one hour. Developing was performed by chemiluminescence with ChemiDoc XRS Imaging device (Bio-Rad).

Nuclear and cytoplasmic extraction

Cells were lysed at 4°C with three pellet volumes of Buffer A (10 mM Herpes pH 7.9; 10 mM KCL; 1.5 mM MgCl₂; 1 mM PMSF; 10 µg/ml aprotinin; 10 µg/ml leupeptin; 10 µg/ml pepstatin; 1 mM Na₃V04; 50 mM NaF) and incubated on a rotating platform at 4°C for fifteen minutes. Freezing by liquid nitrogen and thawing at 37°C was alternated three times. The preparation was spun using a microcentrifuge at 2000 rpms for five minutes and the supernatant (membrane/cytoplasmic fraction) was transferred to a clean tube. The nuclear pellet was washed twice with Buffer A. The nuclei were spun at 2000 rpms for five minutes and supernatant was discarded. The nuclear pellet was resuspended with Buffer C (20 mM Herpes pH 7.9; 0.4 mM KCL; 1.5 mM MgCl₂; 0.2 mM EDTA, 25% glycerol; 1% Igepal; 1 mM PMSF; 10 µg/ml aprotinin; 10 µg/ml leupeptin; 10 µg/ml pepstatin; 1 mM Na₃V04; 50 mM NaF) and incubated on a rotating platform at 4°C for thirty minutes. The pellet was then sonicated, spun at 12000 rpms at 4°C for ten minutes and the nuclear supernatant was transferred to a new tube.

Quantitative PCR

RNA was extracted using the TRIzol method (Invitrogen) and complementary DNA was synthesized from 2 µg RNA by random hexamer priming using MLV-reverse transcriptase (Invitrogen). For cDNA quantification, PCR was performed with 4.5 µl 20X diluted cDNA and 0.5 µl 10 µM primers. Accumulation of fluorescent products was monitored on the ABI PRISM 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems). The relative quantification of gene expression was performed using the comparative CT method, with normalization of the target gene to the endogenous housekeeping gene RPLPO. The following primers were used: ULK1 (5'-GGTCGCCGTC AAGTGCATTA-3' and 5'-CGTACAGGGCCACGATGTTT-3'), ATG2A (5'-TGCTCACCGACCACTGCA-3' and 5'-GAGGCCAGCTCTGTGAGTC-3'), ATG2B (5'-CATACAGGCAGCTGCAGAGA-3' and 5'-GTCTACTGGCTGGTGGGCTA-3'), ATG4A (5'-TGAGCTGGTATGGATCTTAGGG-3' and 5'-ATCATCTGTCCACAGCGTAGC-3'), ATG4D (5'-ATGAAGGCACACCACTGAAAT-3' and 5'-TGAGCTTCAATTGCATCCTTAGA-3'), ATG5 (5'-AAGGAGGAGCCATAGCTTGGAGTA-3' and 5'-

AATTCGTCCAAACCACACATCTC-3'), ATG7 (5'-TGCAATGTAGCTAGGACGTTGAT-3' and 5'-GCATTCACACCGGGGAATAT-3'), BECN1 (5'-CCAGGAACCTCACAGCTCCAT-3' and 5'-CCTGGCGAGGAGTTTCAATA-3'), ATG9A (5'-GGCTGGAGAGGAGCACATAC-3' and 5'-CCCTGGGGGTGAATCACTA-3'), ATG9B (5'-AGGGTTTCAGGTGACCACAG-3' and 5'-CACTTGACCCTGCACTCTGA-3'), ATG12 (5'-AGTGGGCAGTAGAGCGAACA-3' and 5'-CGCCTGAGACTTGCAAGTAATGTA-3'), ATG13 (5'-CGATCCAATGGTGAATCCTC-3' and 5'-ATCATGGGTATTGCCACTGC-3'), ATG14 (5'-AAAGACGGGTGTGAGAGACC-3' and 5'-ACCCATCGTCCTGAGAGGTA-3'), ATG16L2 (5'-GCCGGCCTATAACCATCTCT-3' and 5'-TGGGACTTGGTCTGAGTCAA-3'), SQSTM1 (5'-ACGGGGACTTGGTTGCCCTT-3' and 5'-CGCCGGCACTCTTTTTTC-3'), DRAM (5'-TCAACCCCTTCTCCCGTATAT-3' and 5'-CACCAATCCAAGCACTAAAGACAC-3'), GABARAPL1 (5'-GGTCCCCGTGATTGTAGAGA-3' and 5'-GGAGGGATGGTGTGTTGAC-3'), LC3 (5'-AGAGCAGCATCCAACCAAAATCCCG-3' and 5'-TGCTGTGTCCGTTACCAACAGG-3'), WIPI2 (5'-GAAAGAAAACCCCCAGAGG-3' and 5'-CTCTGCCCTGGTTGAACATT-3'), UVRAG (5'-TGCCCGAACATTGTTAATAGAAA-3' and 5'-ACGTGGGATTCAAGGAATTGTAA-3'), and PRKAG1 (5'-GAAGCAGAGGTTCCACCGACT-3' and 5'-AGGGCTTCTTCTCTCCACT-3').

siRNA transfection

To downregulate NF- κ B subunit expressions, HT29Ras and RasL cells were transfected with 5 nM NF- κ B or scramble pool using DharmaFect-4 (Dharmacon) according to the manufacturer's instructions. The cells were washed 24 hours after transfection with PBS, and H-RASV12 induction was performed in RPMI 1640 medium supplemented with 3% fetal bovine serum.

Single and serial Chromatin Immunoprecipitation Assays (ChIP, ReChIP and ChIP-and-chip)

Attached cells were washed twice with cold PBS, cross-linked with 1% formaldehyde at room temperature for ten minutes, and then washed twice with 10 ml cold PBS. Cells were lysed with 500 μ l ChIP buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.1; 1% SDS; 10 mM EDTA; 1 mM PMSF; 10 μ g/ml aprotinin; 10 μ g/ml leupeptin; 10 μ g/ml pepstatin; 1 mM Na₃V0₄; 50 mM NaF). Chromatin was sheared by sonication to an average size of 500 bp. The chromatin solution was diluted with one volume of dilution buffer (2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl pH 8.1; 1% Triton X100; 0.1% NP40; 150 mM NaCl; 1 mM PMSF; 10 μ g/ml aprotinin; 10 μ g/ml leupeptin; 10 μ g/ml pepstatin; 1 mM Na₃V0₄; 50 mM NaF) and incubated at 4°C for one hour on a rotating platform with protein A-agarose and protein G-sepharose which was pretreated with sheared DNA salmon sperm. Chromatin was then incubated overnight at 4°C on a rotating platform with indicated antibodies. Following precipitation with A-agarose and protein G-sepharose (pretreated with sheared DNA salmon sperm), the beads were washed for ten minutes in TSE1 (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, and 150 mmol/NaCl), TSE2 (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, and 500 mmol/NaCl), and TSE3 (0.25 M LiCl, 1% Nonidet P-40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, and 10 mM Tris-HCl, pH 8.1). The beads were then washed once with TE buffer (10 mM Tris, pH 8, 100 mM EDTA) and eluted with 500 μ l elution buffer (1% SDS and 0.1 M NaHCO₃) for one hour.

For reChIP experiments, 25 μ l reChIP buffer (Dilution Buffer, 10 mM DTT) was added to the beads following washes and incubated at 37°C for fifty minutes. The sample was then diluted forty times in dilution buffer and immunoprecipitations, washes and elution were performed as before.

To reverse the crosslinks, samples, including 'Input', were incubated at 65°C overnight. DNA was extracted with phenol-chloroform, precipitated with ethanol, allowed to air dry and then dissolved in 100 μ l sterile H₂O (59,60). 4 μ l DNA samples were then used for thirty cycles of amplifications. Primer sequences are available on request. For ChIP-ChIP analysis, a total of three to six $\times 10^8$ cells were used for each purification. Total chromatin was obtained and sonicated as described above and immunoprecipitated DNA fragments and input samples were blunt ended using T4 DNA polymerase and then ligated to a linker (JW102: 5'-GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC, JW103: 5'-GAATTCAGATC) using T4 DNA ligase. The linker was then used as a primer binding site for amplification by PCR (25 cycles, using JW102 as a primer). The amplified DNA was then Cy5 (Immunoprecipitated sample) or Cy3 (Corresponding input) labeled using the Dual-Color DNA Labeling Kit from Roche NimbleGen according to the manufacturer's instructions. Labeled DNA was then hybridized to the NimbleGen 385k human promoter array set. Scanning used an Agilent 5 μ m resolution scanner and the images obtained were processed and analyzed for the identification of binding sites using NimbleScan software from NimbleGen.

Statistical analyzes

Student's t-test and ANOVA were performed using GraphPad Prism software and expressed as *P>0.05, **P>0.01, ***P>0.001 or ns: not significant.

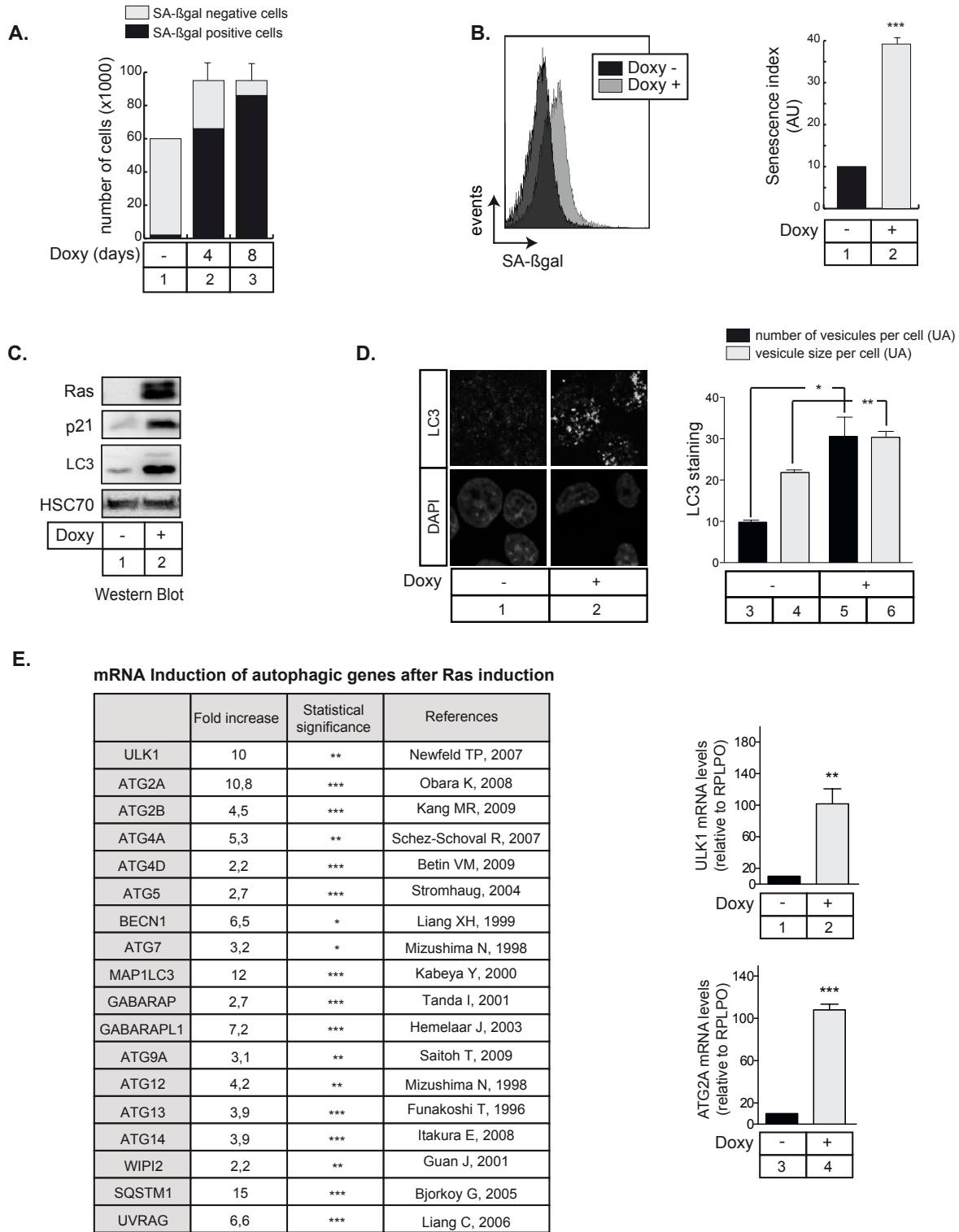


Figure 1

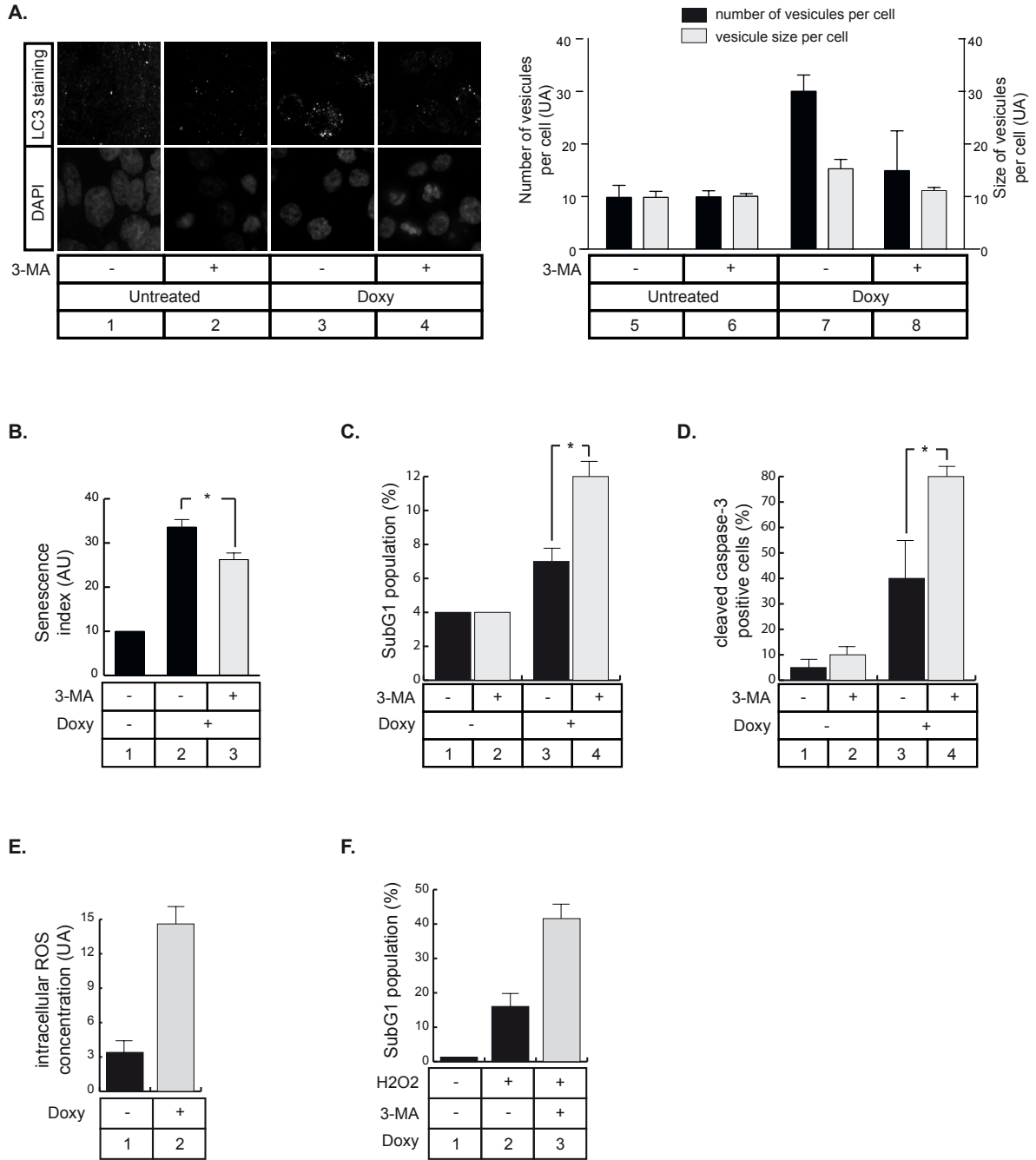


Figure 2

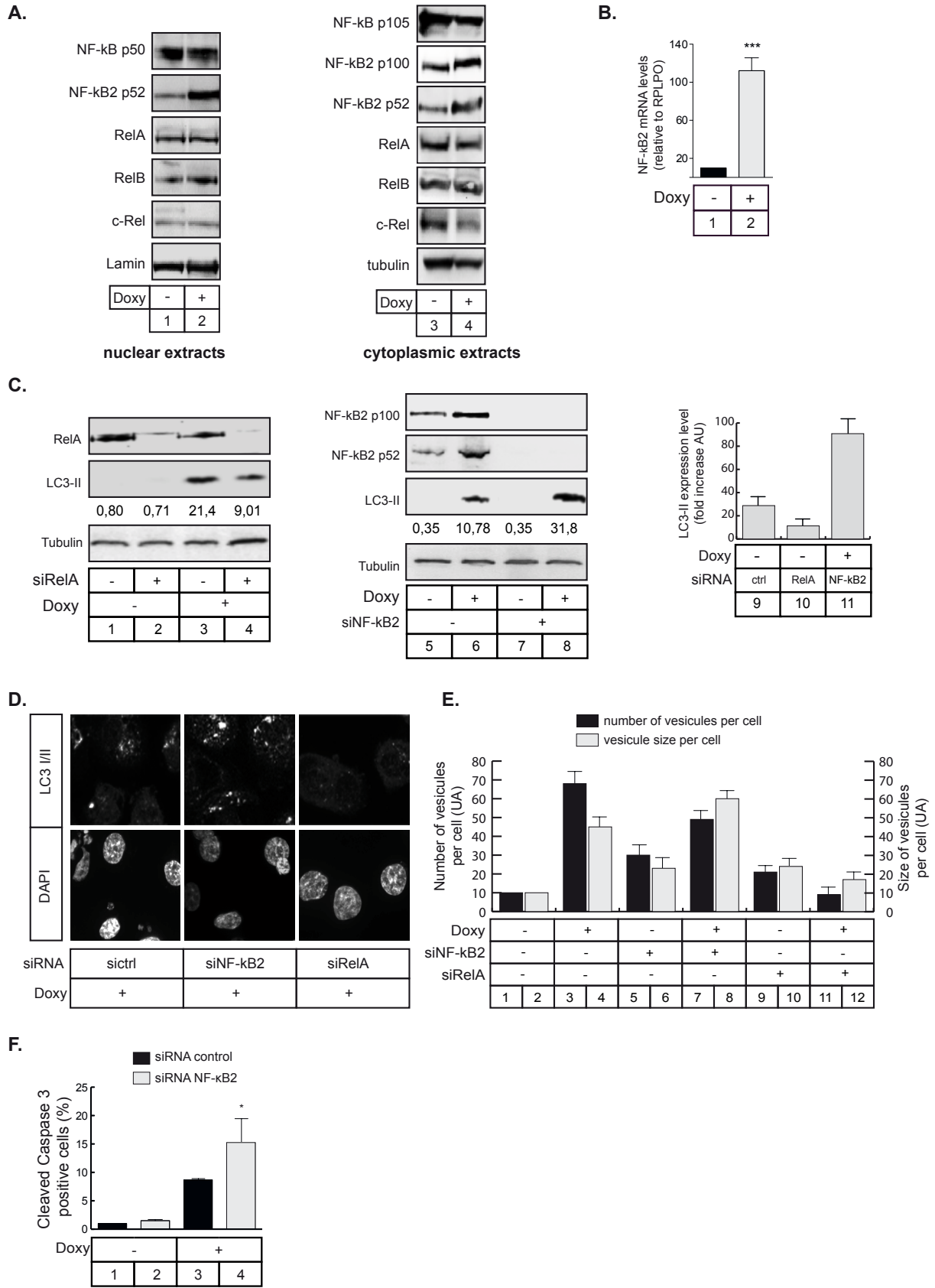
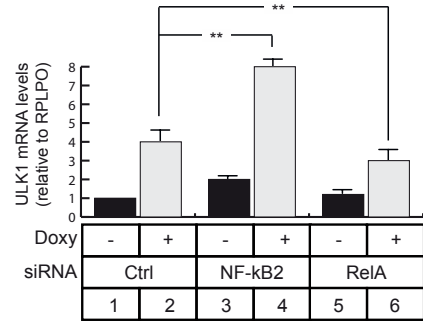


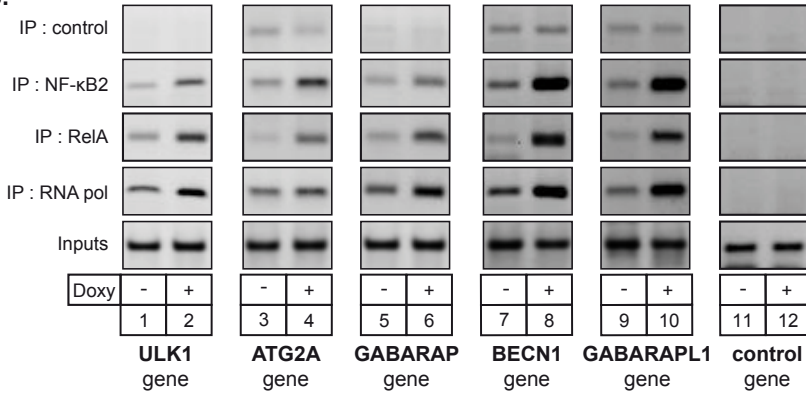
Figure 3

A.

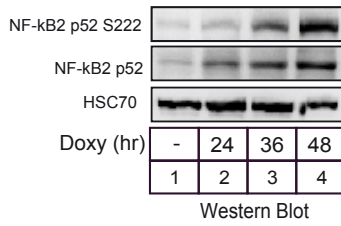
Fold increase (%)	si52 dox+ /sict1 dox+	Statistical significance	siRelAdox+ /sict1 dox+	Statistical significance
ULK1	+80%	**	-35%	**
ATG2A	+65%	***	-40%	***
MAP1LC3	+51%	***	-15%	*
SQSTM1	+92%	*	-25%	**
BECN1	+60%	*	-37%	***
GABARAP	+114%	*	-21%	***
GABARAPL1	+100%	**	-20%	**



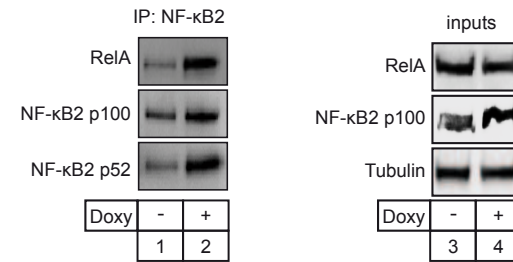
B.



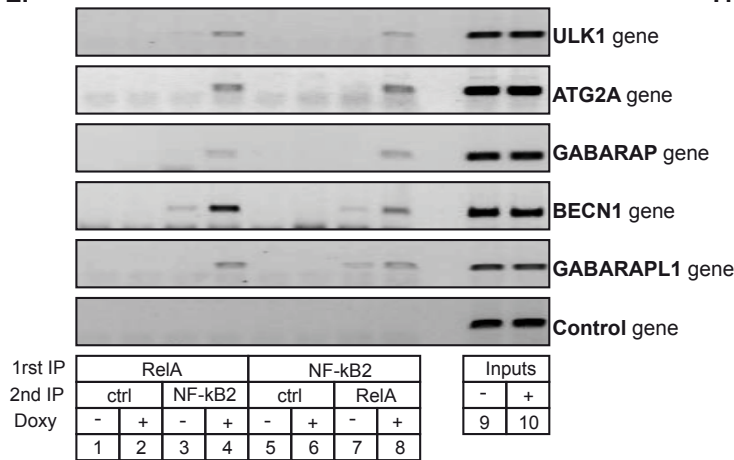
C.



D.



E.



F.

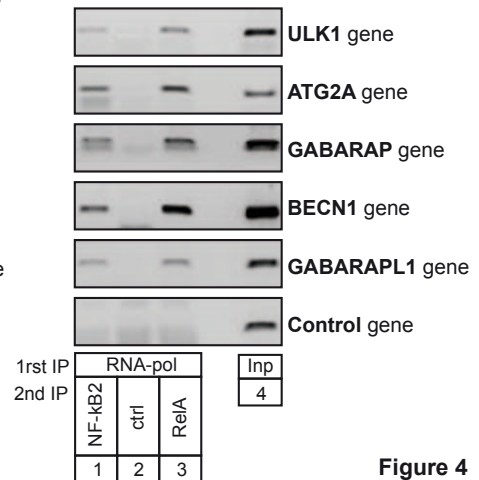


Figure 4

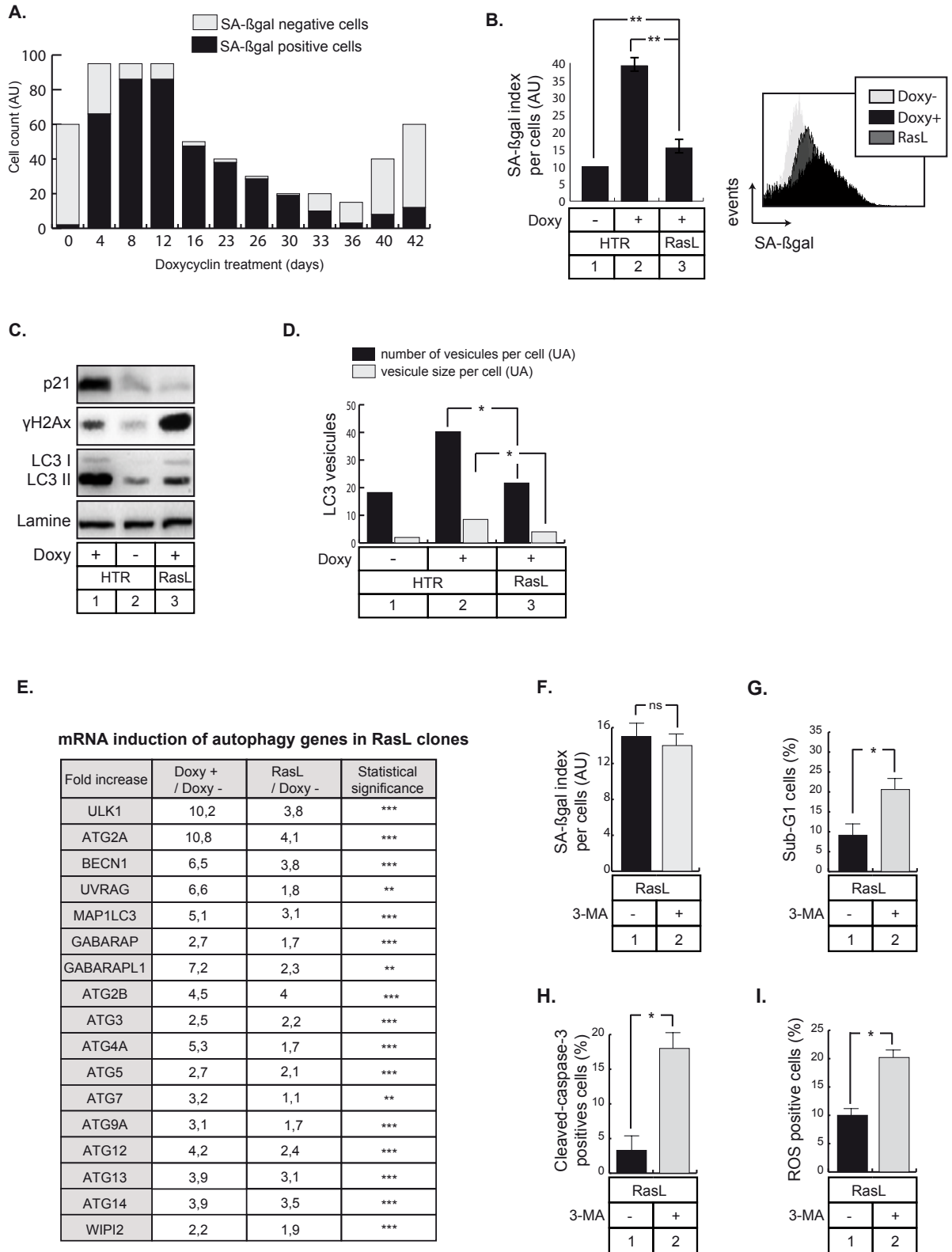


Figure 5

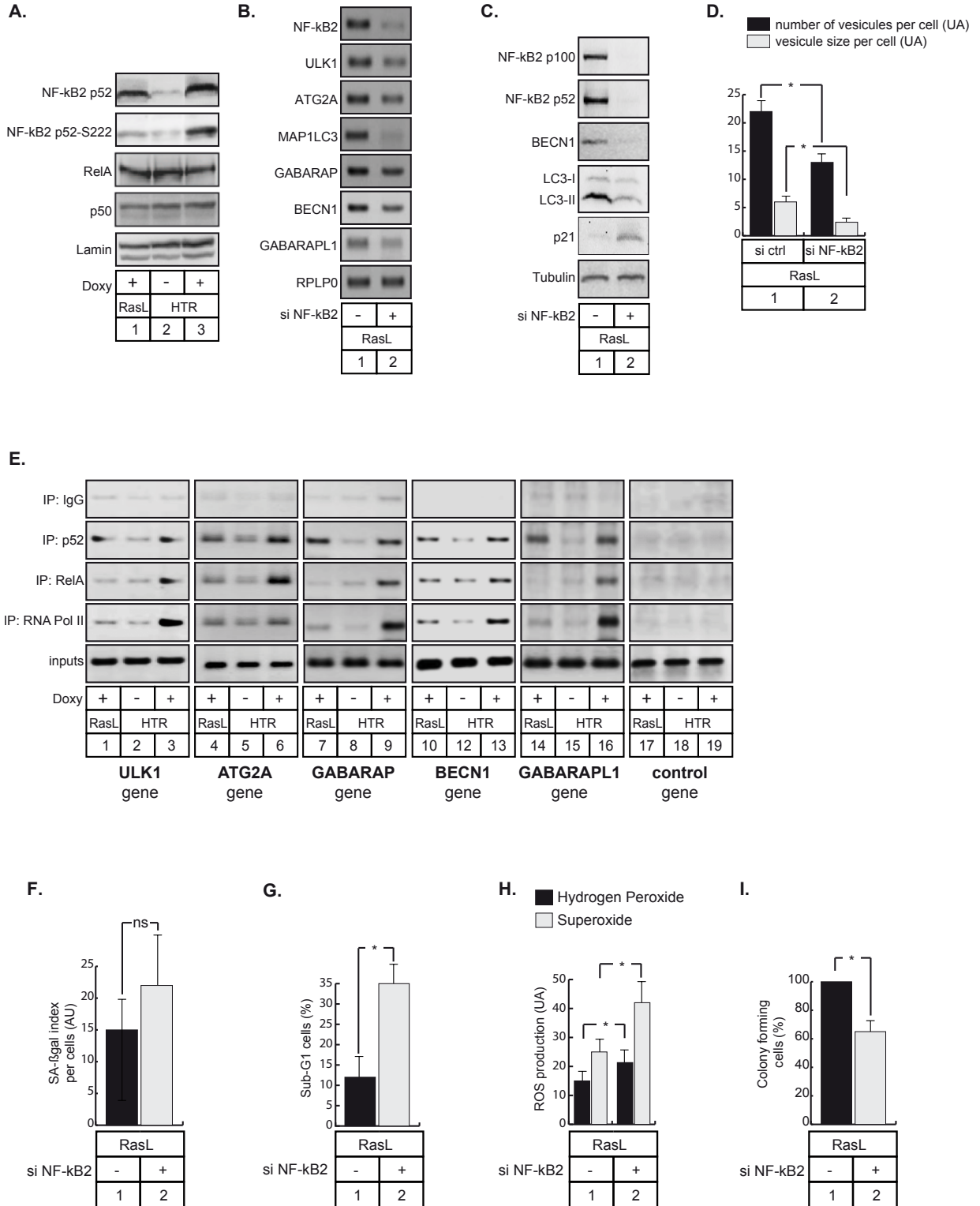


Figure 6

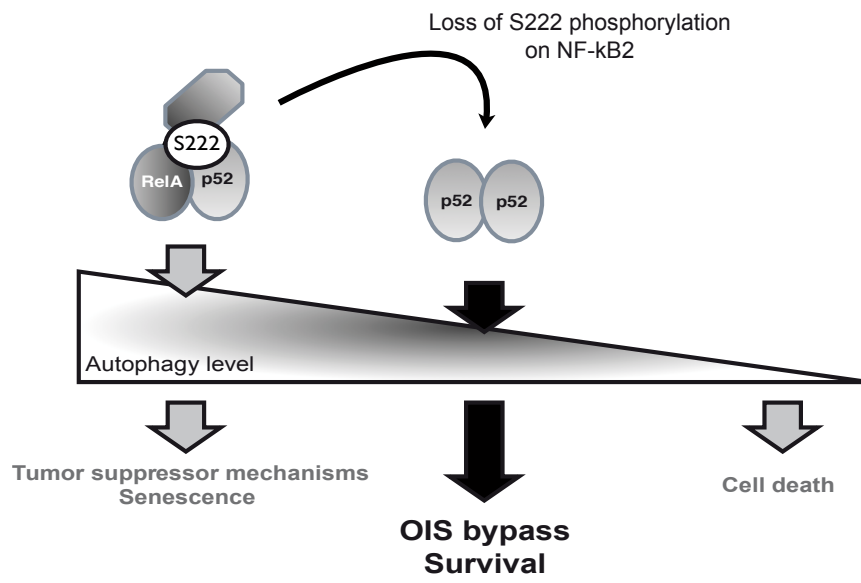
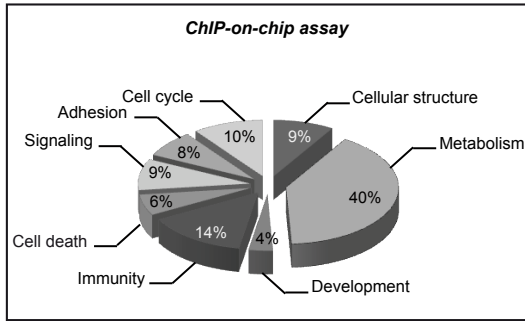


Figure 7

A.



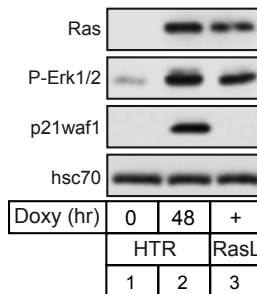
B.

Genes	Potential kB sites	Localization of potential kB sites
ULK1	-1972 ; -1040 ; -186 ; +403 ; +438 ; +466 ; +591 ; +658 ; +765 ; +1006 ; +1263 ; +1342 ; +1973	
GBL	-1467 ; -848 ; -760 ; -617 ; -585 ; +180 ; +214 ; +604 ; +1078 ; +1582 ; +1783 ; +1861 ; +1885	
FOXO3A	-3972 ; -3911 ; -3896 ; -3663 ; -2289 ; -471 ; +268 ; +302 ; +705 ; +1004 ; +1038 ; +1295 ; +1375 ; +1705	
BECN1	-3615 ; -2539 ; -2078 ; -1816 ; -1115 ; -778 ; -299 ; -166 ; +26 ; +313 ; +344 ; +663	
BCL2	-4177 ; -3984 ; -3980 ; -3426 ; -2376 ; -2311 ; -2233 ; -2207 ; -1895 ; -677 ; -237 ; -162 ; -134	
BCL2L1	-3708 ; -2482 ; -761 ; -728 ; -560 ; -404 ; -268 ; -221 ; +148 ; +276 ; +292 ; +877 ; +1529 ; +1538 ; +1918	
MCL1	-3767 ; -3107 ; -2880 ; -96 ; +42 ; +168 ; +472 ; +545 ; +1165	
UVRAG	-2427 ; -2301 ; -1955 ; -1905 ; -582 ; -225 ; +645 ; +670 ; +719 ; +779 ; +920 ; +1623 ; +1862	
SH3GLB2	-3338 ; -1170 ; -1130 ; +323 ; +935 ; +1053 ; +1344 ; +1475 ; +1713	
WDR45L	-3637 ; -3421 ; -2377 ; -1923 ; -1793 ; -922 ; -215 ; -201 ; -78 ; +93 ; +301 ; +662 ; +896 ; +1180 ; +1594 ; +1735	
ATG3	-2894 ; -404	
ATG5	-2600 ; -2119 ; -1642 ; +246 ; +327 ; +1013 ; +1692	
ATG7	-3463 ; -2245 ; -2166 ; -179 ; +53 ; +250 ; +1122 ; +1494 ; +1796 ; +1825	
ATG9A	-3906 ; -3698 ; +109 ; +349 ; +564 ; +600 ; +1533	
ATG9B	-3812 ; -3331 ; -2914 ; -1938 ; -1931 ; -1884 ; -1754 ; -1726 ; -1408 ; -799 ; -744 ; -605 ; +338 ; +421 ; +852 ; +890 ; +1396 ; +1521	
GABARAP	-3544 ; -3495 ; -2944 ; -2060 ; -1523 ; -1287 ; -949 ; -899 ; -58 ; +455 ; +1303	
GABARAPL1	-3777 ; -1366 ; -1102 ; +319 ; +390 ; +420 ; +492	
GABARAPL2	-2503 ; -2073 ; -1909 ; -1374 ; -1369 ; -1275 ; -1050 ; -55 ; -27 ; +13 ; +269 ; +799 ; +1272 ; +1979	
p62/SQSTM1	-3648 ; -3441 ; -2989 ; -2660 ; -2365 ; -1698 ; -967 ; -638 ; -343 ; -213 ; -246 ; +969 ; +985 ; +1635 ; +1762 ; +1979	
FYCO1	-2759 ; -1640 ; -1307 ; +523 ; +750 ; +780	
NSF	-3080 ; -1517 ; +278 ; +449	
GOSR1	-2038 ; -1285 ; -281 ; -28 ; +196 ; +215 ; +486 ; +595	
UNC13D	-3312 ; -3271 ; -3199 ; -3122 ; -2808 ; -2126 ; -1753 ; -1707 ; -1310 ; -1213 ; -1083 ; -873 ; -466 ; -412 ; -298 ; -217 ; -175 ; -111 ; -74 ; +640 ; +801 ; +1164 ; +1749 ; +1899	
UNC93B1	-3965 ; -2751 ; -2712 ; -2539 ; -2429 ; 2358 ; -1589 ; -409 ; -342 ; +1 ; +209 ; +809 ; +1021	
CLN3	-3058 ; -2755 ; -2499 ; -1874 ; -1842 ; +402 ; +490 ; +618 ; +1318	
VPS11	-2052 ; -1393 ; -970 ; -838 ; +1311 ; +1566	
VPS13C	-3397 ; -2694 ; +54 ; +296 ; +1049 ; +1750	
VPS16	-3560 ; -2843 ; -2486 ; -2115 ; -2087 ; -596 ; -19 ; +11 ; +23 ; +88 ; +114 ; +122 ; +162 ; +274 ; +428 ; +549 ; +648 ; +1134	
VPS25	-3276 ; +967 ; +1068 ; +1098 ; +1194 ; +1310 ; +1711	
VPS35	-3145 ; -1375 ; -315 ; -166 ; +65 ; +95 ; +510 ; +666 ; +1283 ; +1495	
VPS45A	-1338 ; -1038 ; -473 ; -178 ; -151	
PRKAG1	-3214 ; -3171 ; -2905 ; -2882 ; -2744 ; -2629 ; -1870 ; -1524 ; -1393 ; -816 ; +68	
PRKAG2	-3747 ; -3165 ; -2971 ; -2791 ; -2673 ; -2534 ; -2310 ; -1760 ; -1395 ; -1346 ; -1266 ; -1245 ; -1218 ; -824 ; +486 ; +615 ; +723 ; +1309 ; +1468	

C.

Autophagy pathways	Potential NF-κB target genes
ULK1 Kinase network	ULK1, GBL, FOXO3A
PIK3C3-BECN1 network	BECN1, BCL2, BCL2L1, MCL1, UVRAG
SH3GL1B1 network	SH3GL1B2
ATG2-WIPI network	WDR45L
UBL conjugation system	ATG3, ATG5, ATG7, ATG9A, ATG9B
Human ATG8s	GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2
ATG8s interacting proteins	p62/SQSTM1, FYCO1
Vesicle trafficking components	NSF, GOSR1, UNC13D, UNC93B1, CLN3, VPS11, VPS13c, VPS16, VPS25, VPS35, VPS45A
AMP kinase network	PRKAG1, PRKAG2

D.



▲ : High score kb site ▲ : Low score kb site

Sup Fig1

Annexe III : Une approche protéomique quantitative des différents stades du cancer colorectal établie l'OLFM4 comme un nouveau marqueur des tumeurs non-métastatiques

A Quantitative Proteomic Approach of the Different Stages of Colorectal Cancer Establishes OLFM4 as a New Nonmetastatic Tumor Marker[§]

Damien Besson[‡], Aude-Hélène Pavageau[‡], Isabelle Valo[§], Anthony Bourreau[‡], Audrey Bélanger[‡], Caroline Eymerit-Morin[‡], Alice Moulière[‡], Agnès Chassevent[§], Michelle Boisdron-Celle[‡], Alain Morel[‡], Jérôme Solasso[¶], Mario Campone^{||}, Erick Gamelin[‡], Benjamin Barré[‡], Olivier Coqueret[‡], and Catherine Guette^{‡*}

Expression profiles represent new molecular tools that are useful to characterize the successive steps of tumor progression and the prediction of recurrence or chemotherapy response. In this study, we have used quantitative proteomic analysis to compare different stages of colorectal cancer. A combination of laser microdissection, OFFGEL separation, iTRAQ labeling, and MALDI-TOF/TOF MS was used to explore the proteome of 28 colorectal cancer tissues. Two software packages were used for identification and quantification of differentially expressed proteins: Protein Pilot and iQuantitor. Based on ~1,190,702 MS/MS spectra, a total of 3138 proteins were identified, which represents the largest database of colorectal cancer realized to date and demonstrates the value of our quantitative proteomic approach. In this way, individual protein expression and variation have been identified for each patient and for each colorectal dysplasia and cancer stage (stages I–IV). A total of 555 proteins presenting a significant fold change were quantified in the different stages, and this differential expression correlated with immunohistochemistry results reported in the Human Protein Atlas database. To identify a candidate biomarker of the early stages of colorectal cancer, we focused our study on secreted proteins. In this way, we identified olfactomedin-4, which was overexpressed in adenomas and in early stages of colorectal tumors. This early stage overexpression was confirmed by immunohistochemistry in 126 paraffin-embedded tissues. Our results also indicate that OLFM4 is regulated by the Ras-NF- κ B2 pathway, one of the main oncogenic pathways deregulated

in colorectal tumors. *Molecular & Cellular Proteomics* 10: 10.1074/mcp.M111.009712, 1–14, 2011.

Every year, more than one million individuals around the world are diagnosed with colorectal cancer (CRC),¹ and with a death rate ~33% (1), this disease is an important cause of mortality. CRC diagnosis and prognosis rely on the tumor-node-metastasis and clinical staging systems, which illustrate local lymph node and distal organ invasion. These clinical stages are important prognostic factors because survival rates of 5 years or more are observed for more than 90% of patients diagnosed with Stage I CCR, whereas survival rates drop to only ~10% for CRC that have metastasized to distant organs (stage IV) (2). As a consequence, early stage detection has the most impact on cancer incidence and mortality in this disease (3, 4). As initially described by Vogelstein *et al.* (5), colorectal transformation is explained by the sequential accumulation of genetic alterations that generate malignant cells (6). Mutations of the adenomatous polyposis coli gene and the subsequent activation of β -catenin is probably the most common initiating event of CRC, leading to the transformation of normal colonic epithelium into adenomas (7–10). This stage represents an intermediate lesion where cells exhibit autonomous growth and probably genetic instability but are incapable of invasive growth and metastasis. It is estimated that only a small proportion of ~5% of adenomas will progress to the next CRC stages, implying that the transition from normal cells to adenoma differs from the progression from adenomas to adenocarcinomas. Following the loss of adenomatous pol-

From the [‡]Institut de Cancérologie de l'Ouest, Paul Papin Cancer Center; INSERM U892, Angers, France, the [§]Institut de Cancérologie de l'Ouest, Paul Papin Cancer Center Paul Papin; Angers, France, the [¶]Department of Cellular Biology, CHU Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France, and the ^{||}Institut de Cancérologie de l'Ouest, René Gauducheau Cancer Center, Nantes, France

Received March 24, 2011, and in revised form, September 29, 2011
Published, MCP Papers in Press, October 10, 2011, DOI 10.1074/mcp.M111.009712

¹ The abbreviations used are: CRC, colorectal cancer; IHC, immunohistochemistry; HPA, Human Protein Atlas; LCM, laser capture microdissection; FDR, false discovery rate; GO, gene ontology; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid; ChIP, chromatin immunoprecipitation; STAT, signal transducers and activators of transcription; OIS, oncogene-induced senescence.

Quantitative Proteomic Analysis of Colorectal Tumors

yposis coli, it has been proposed recently that KRAS mutations are essential to allow the nuclear accumulation of β -catenin and the subsequent progression to the adenocarcinoma step (11). Although Ras mutations have probably no prognosis value, this modification is associated with resistance to anti-epidermal growth factor receptor-targeted therapies (12), indicating that this transformation pathway is associated with an intrinsic drug resistance program.

Despite their utility, tumor-node-metastasis and clinical staging remain relatively imprecise and are not well characterized at the molecular level. For this reason, the development of new prognostic tools would be useful to characterize the successive steps of the disease and predict the risk or recurrence of chemotherapy escape. Elegant results have recently identified gene expression profiles that associate with specific oncogenic pathways and can eventually predict chemotherapy sensitivity (13, 14). This approach has also been successfully used in CRC to identify a 50-gene signature that distinguished patients with low or high risks or recurrence at the early stage of the disease (15). These results also led to the identification of a therapeutic approach that would be specific of a particular stage of CRC. Besides these genomic data, proteomics analysis is also a powerful tool for the global evaluation of protein expression and the identification of prognosis or predictive signatures. However, although recent in-depth proteomics analyses have generated large protein data sets, only a few proteins such as carcinoembryonic antigen, CA19.9, and CA125 have been described as potential prognosis or prognostic biomarkers, and none of them are recommended for clinical screening (16–20). These analyses essentially used two-dimensional gel strategies combined with image analysis, thereby limiting the analyses to the more abundant CRC proteins. A few recent studies have combined more targeted approaches with two-dimensional electrophoresis, including studies focusing on membrane proteins (21), basic proteins (22), heparin-affinity isolated proteins (23), or proteasome (24). Some of these studies have identified novel candidate CRC serum biomarkers with comparable or better sensitivity than carcinoembryonic antigen, such as nicotinamide *N*-methyltransferase (25), proteasome activator complex subunit, PSME3 (26), S100A9, S100A8 (27), and Desmin (28). However, these results are often largely limited to abundant proteins that are commonly overexpressed in cancers (structural proteins, glycolytic enzymes, annexins, cathepsins, and heat shock protein). Because these proteins are probably not specific to CRC, the benefits in clinical staging or in predicting the success of targeted therapies remain to be determined. Tumor analysis is challenging, given the heterogeneity of the colorectal cancer tissue and the limited number of tumor cells generally available. To increase the specificity of the analysis, tumor cells should be ideally isolated from heterogeneous samples by laser capture microdissection (LCM) (29). Although this approach is widely used in the genomic field, proteomic analyses of tumor tissue are limited,

TABLE I
Clinical features of human tissue samples

Clinical features	iTRAQ	IHC
Gender (male/female)	16/12	70/56
Mean age (years)	68.7 \pm 8.9	69.39 \pm 10.56
Age range (years)	48–87	41–94
Union Internationale contre le Cancer stage		
Adenoma	4 (14.3%)	30 (23.8%)
Intramucosal carcinoma	0	12 (9.5%)
Adenocarcinoma		
Stage I	6 (21.5%)	26 (20.6%)
Stage II	5 (17.8%)	14 (11.1%)
Stage III	9 (32.1%)	25 (19.8%)
Stage IV	4 (14.3%)	19 (15.2%)
Location		
Colon	17 (58.6%)	92 (73.0)
Rectum	1 (3.4%)	10 (7.9%)
Rectosigmoid hinge	6 (20.7%)	9 (7.2%)
Sigmoid	3 (10.4%)	10 (7.9%)
Caecum	2 (6.9%)	5 (4.0%)

and to our knowledge only one study has been performed in CRC, using adenoma tissue (29).

In this study, we have performed comparative proteomic profiling of laser capture microdissected adenoma, stage I–IV adenocarcinoma tissues, and normal colorectal tissues from 28 different human specimens. Using only the limited amount of material collected by LCM, a proteomic profile for each sample has been separately acquired by iTRAQ labeling using our previously developed method (30, 31). 555 proteins were quantified in the different stages. Among these proteins, we focused on OLFM4 (olfactomedin-4), because this protein has recently been shown to be expressed in colorectal stem cells in association with Lgr5 (32, 33). We found that OLFM4 is a secreted protein that is regulated by Ras-NF- κ B2, one of the main oncogenic pathway in colorectal cells. These results highlight the power of quantitative proteomic approaches to allow the identification of stage-specific markers in colorectal cancer. To our knowledge, this is the most comprehensive global study that compares proteomic results of phenotypically normal, adenoma, early stage tumor, and metastatic adenocarcinoma in multiple individual samples.

MATERIALS AND METHODS

Sample Collection—The study protocol and patient consent forms were approved by the Angers Hospital and CRLCC Paul Papin Ethic Committee. Twenty-eight colorectal frozen tissue samples, collected between 1999 and 2004, were obtained from the Cancer Center tumor bank. All of the tissue specimens were obtained from surgical resection. Normal colonic tissue was obtained from the distal edge of the resection at least 10 cm from the tumor. After hematoxylin and eosin staining, the paraffin-embedded tissue sections from all of the specimens were evaluated by two experienced pathologists independently according to Union Internationale contre le Cancer staging. Clinical features of tissue candidates are summarized in Table I.

Quantitative Proteomic Analysis of Colorectal Tumors

Laser Capture Microdissection—Frozen sections (12 μm thick) of either colon cancer or normal colonic mucosa were cut on a cryostat (Bright Instrument Co. Ltd., Huntingdon, UK). Specific sections were stained with toluidine blue for visual reference. Tissue sections were incubated in 70% ethanol for 1 min, 95% ethanol for 2 min, 95% ethanol for 2 min, and finally twice in 100% xylene for 5 min. Xylene was evaporated, and sections were microdissected using a PixCell II laser capture microdissection system (Arcturus Engineering, Mountain View, CA) equipped with the PixCell II image archiving software (Arcturus Engineering). Laser settings were as follows: $\lambda = 810$ nm, spot diameter set at 7.5 μm , pulse duration = 70 ms, and power = 70 mW. After microdissection, the plastic film containing the microdissected cells was removed, the film containing the tumor cells was placed in a microcentrifuge tube, and the protein lysis solution was added. Approximately 30,000 cells were captured from either a single or consecutive tissue sections using up to five CapSure LCM caps (Molecular Devices Corporation).

Protein Extraction and Digestion—Protein extraction was carried out using the Liquid Tissue MS protein preparation kit according to manufacturer's protocol (Expression Pathology Inc., Gaithersburg, MD). Briefly, the films from the underside of the caps for all samples were removed, transferred to low binding reaction tubes, incubated with 20 μl of Liquid Tissue extraction, and heated at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 90 min. After cooling for 2 min on ice, 5 μl of trypsin reagent was added and incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h with vigorous shaking for 30 s at 20 min intervals. The samples were further incubated overnight at 37 $^{\circ}\text{C}$ followed by heating at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min. The samples were then harvested via centrifugation at 10,000 $\times g$, dried completely using a SpeedVac, resuspended in 100 μl of 0.5% TFA in 5% acetonitrile, desalted via PepClean C-18 spin columns (Pierce), and dried for iTRAQTM processing.

Peptide Labeling with iTRAQ Reagents—Peptides samples were resuspended with 30 μl of iTRAQ dissolution buffer (AB Sciex). They were reduced with 5 mM tris-(2-carboxyethyl)phosphine at 60 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h, and the cysteine-groups were blocked using a 10 mM methyl methanethiosulfonate solution at room temperature for 10 min. Each peptide solution was labeled at room temperature for 2 h with one iTRAQ reagent vial previously reconstituted with 70 μl of ethanol for 4-plex iTRAQ reagent and reconstituted with 50 μl of isopropanol for 8-plex iTRAQ reagent. A mixture containing small aliquots from each labeled sample was analyzed by MS/MS to determine a proper mixing ratio to correct for unevenness in peptide yield from Liquid Tissues procedures. Labeled peptides were then mixed in a 1:1:1:1 (or 1:1:1:1:1:1:1:1) ratio. The peptide mixture was then dried completely using a SpeedVac.

Peptide OFFGEL Fractionation—For pl-based peptide separation, we used the 3100 OFFGEL Fractionator (Agilent Technologies, Böblingen, Germany) with a 24-well set-up. Prior to electrofocusing, the samples were desalted onto a Sep-Pak C18 cartridge (Waters). For a 24-well set-up, peptide samples were diluted to a final volume of respectively 3.6 ml using OFFGEL peptide sample solution. To start, the 24-cm-long IPG gel strip (GE Healthcare) with a 3–10 linear pH range was rehydrated with the peptide IPG strip rehydration solution according to the protocol of the manufacturer for 15 min. Then 150 μl of sample was loaded in each well. Electrofocusing of the peptides was performed at 20 $^{\circ}\text{C}$ and 50 μA until the 50-kVh level was reached. After focusing, the 24 peptide fractions were withdrawn, and the wells were washed with 200 μl of a solution of water/methanol/formic acid (49:50:1). After 15 min, the washing solutions were pooled with their corresponding peptide fraction. All of the fractions were evaporated by centrifugation under vacuum and maintained at -20 $^{\circ}\text{C}$. Just prior nano-LC, the fractions were resuspended in 20 μl of H_2O with 0.1% (v/v) TFA.

Capillary LC Separation—The samples were separated on an Ultimate 3,000 nano-LC system (Dionex, Sunnyvale, CA) using a C18

column (PepMap100, 3 μm , 100 A, 75 μm inner diameter \times 15 cm; Dionex) at 300 nL/min a flow rate. Buffer A was 2% ACN in water with 0.05% TFA, and buffer B was 80% ACN in water with 0.04% TFA. The peptides were desalted for 3 min using only buffer A on the precolumn, followed by a separation for 105 min using the following gradient: 0 to 20% B in 10 min, 20% to 45% B in 85 min, and 45% to 100% B in 10 min. Chromatograms were recorded at the wavelength of 214 nm. Peptide fractions were collected using a Probot microfraction collector (Dionex). We used CHCA (LaserBioLabs, Sophia-Antipolis, France) as MALDI matrix. The matrix (concentration of 2 mg/ml in 70% ACN in water with 0.1% TFA) was continuously added to the column effluent via a micro T mixing piece at 1.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ flow rate. After 12-min run, a start signal was sent to the Probot to initiate fractionation. Fractions were collected for 10 s and spotted on a MALDI sample plate (1,664 spots/plate; Applied Biosystems, Foster City, CA).

MALDI-MS/MS—MS and MS/MS analyses of off-line spotted peptide samples were performed using the 4800 or 5800 MALDI-TOF/TOF Analyzers (Applied Biosystems/ABSciex) and 4000 Series Explorer software, version 3.5 (with MALDI 4800) and version 4.0 with MALDI 5800). The instrument was operated in a positive ion mode and externally calibrated using a mass calibration standard kit (ABSciex). The laser power was set between 2800 and 3400 for MS and between 3600 and 4200 for MS/MS acquisition. After screening all LC-MALDI sample positions in MS-positive reflector mode using 1500 laser shots, the fragmentation of automatically selected precursors was performed at a collision energy of 1 kV using air as collision gas (pressure of $\sim 2 \times 10^{-6}$ Torr) with an accumulation of 2000 shots for each spectrum. MS spectra were acquired between m/z 800 and 4000. For internal calibration, we used the parent ion of Glu-1 fibrinopeptide at m/z 1570.677 diluted in the matrix (30 fmol/spot). Up to 12 of the most intense ion signals per spot position having a S/N of >12 were selected as precursors for MS/MS acquisition. Peptide and protein identification were performed by the ProteinPilotTM software version 3.0 (AB Sciex) using the Paragon algorithm as the search engine (34). Each MS/MS spectrum was searched for *Homo sapiens* species against the Uniprot/Swissprot database (UniProtKB/Sprot 20090414 release 15.0, with 525,997 sequence entries). The searches were run using with the fixed modification of methylmethanethiosulfate-labeled cysteine parameter enabled. Other parameters such as tryptic cleavage specificity, precursor ion mass accuracy and fragment ion mass accuracy are MALDI 4800 or 5800 built-in functions of ProteinPilot software. The detected protein threshold (unused protecore confidence) in the software was set to 2 to achieve 99% confidence, and identified proteins were grouped by the ProGroup algorithm (ABSciex) to minimize redundancy. The bias correction option was executed.

A decoy database (based on a reverse sequence database concatenated with the forward sequence database) search strategy was also used to estimate the false discovery rate (FDR = number of validated decoy hits/(number of validated target hits + number of validated decoy hits) \times 100). The FDR was calculated by searching the spectral against the Uniprot *H. sapiens* decoy database. The FDR for each iTRAQ experiment is indicated in Table II.

Quantification of Relative Protein Expression—We employed a customized software package, iQuantitator (35, 36), to infer the magnitude of change in protein expression. The software infers treatment-dependent changes in expression using Bayesian statistical and Markov Chain Monte Carlo methods. Basically, this approach was used to generate means, medians, and 95% confidence intervals (upper and lower) for each treatment-dependent change in protein expression by using peptide level data for each component peptide and integrating data across the two experiments. For proteins whose iTRAQ ratios were down-regulated in tissues, the extent of down-

Quantitative Proteomic Analysis of Colorectal Tumors

regulation was considered further if the higher limit of the confidence interval had a value lower than 1. Conversely, for proteins whose iTRAQ ratios were up-regulated in tumors, the extent of up-regulation was considered further if the lower limit of the confidence interval had a value greater than 1. The width of these credible intervals depends on the data available for a given protein. Because the number of peptides observed and the number of spectra used to quantify the change in expression for a given protein are taken into consideration, it is possible to detect small but significant changes in up- or down-regulation when many peptides are available. For each protein and each peptide associated with a given protein, the mean, median, and 95% credible intervals were computed for each of the protein and peptide level treatment effects.

The peptide selection criteria for relative quantification were performed as follows. Only peptides unique for a given protein were considered for relative quantification, excluding those common to other isoforms or proteins of the same family. Proteins were identified on the basis of having at least two peptides with an ion score above 95% confidence. The protein sequence coverage (95%) was estimated for specific proteins by the percentage of matching amino acids from the identified peptides having confidence greater than or equal to 95% divided by the total number of amino acids in the sequence.

Functional Annotation and Network Analysis—Gene ontology (GO) terms for identified proteins were extracted, and overrepresented functional categories for differentially abundant proteins were determined by the high throughput GOMiner tool (National Cancer Institute, <http://discover.nci.nih.gov.gate2.inist.fr/gominer/>) (37). All proteins that were subjected to iQuantifier analysis served as the background list, and GO terms with at least five proteins were used for statistical calculations. A *p* value for each term was calculated via the one-sided Fisher's exact test, and FDR was estimated by permutation analysis using 1000 randomly selected sets of proteins sampled from the background list. Statistically significant (FDR < 25%) GO terms were clustered based on the correlation of associated proteins to minimize potential redundancy in significant GO terms.

Network analyses of protein candidates and the ratios of their expression in tumor and nontumor tissues (obtained from eight independent experiments) were performed using the MetaCore™ analytical suite version 4.7 (GeneGo, Inc., St. Joseph, MI) and compared using *p* values of <0.01 as statistical metrics. For enrichment analysis, gene identifiers of the uploaded files were matched with gene identifiers in functional ontologies in MetaCore™ (38), which included canonical pathway maps (GeneGo maps), GeneGo cellular processes, GO cellular process, and diseases categories.

Western Blot Analysis of Proteins in Normal Tissues and CRC—Whole cell lysates were prepared from normal tissues and tumoral tissues. Frozen tissue samples were homogenized and lysed in a buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, and 4% (w/v) CHAPS at 4 °C for 1 h using a rotary shaker. Lysis was achieved by sonication on ice (three 5-s pulses), and the lysates were clarified by centrifugation at 14,000 × *g* at 4 °C for 15 min. Protein concentrations were determined using the FluoroProfile protein quantification kit (Sigma-Aldrich), with BSA as the standard, and equal amounts of proteins (80 μg/lane) from the samples tissues were resolved on a 10% SDS-polyacrylamide gel. The proteins were then electrotransferred onto PVDF membranes. After blocking with 3% BSA in TBS (0.1 M, pH 7.4), blots were incubated with the respective primary antibodies (1:200 dilution) at 4 °C overnight. The protein abundance of β-tubulin was used as a control for protein loading and was determined with rabbit polyclonal anti-β-tubulin: (H-235) antibody (sc-9104; Santa Cruz Biotechnology Inc.). The membranes were incubated with the respective secondary antibody, horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-IgG (goat anti-rabbit IgG, 1:5000; Santa Cruz Biotechnology Inc.), and diluted

with 1% bovine serum albumin for 1 h at room temperature. After each step, blots were washed three times with 0.05% Tween, TBS. The membrane was probed with the indicated antibodies and developed with the ECL.

Immunohistochemistry—One hundred twenty-six patients with adenoma or colorectal adenocarcinoma were studied by immunohistochemistry. All of the tumors were obtained from the Departments of Pathology at the Paul Papin Cancer Center and at the University Hospital of Angers and from the Center of Pathology of Angers between 2000 and 2005. Some samples were excluded: young patients (under 40 years old) and tumors having received chemotherapy, metastatic tumors. The location was almost colic or from high rectum. There were 30 adenomas with 15 low grade adenomas and 15 high grade adenomas; the dysplasia was classified according to the established criteria of architectural features and cytological atypia. There were 72 colorectal adenocarcinomas. According to the seventh tumor-node-metastasis staging system (39) of the American Joint Committee on Cancer, the depth of tumor invasion in each of the carcinomas was classified into five groups, as follows: Tis, carcinoma *in situ* or limited to mucosa; T1, invading the submucosa; T2, invading the muscularis propria; T3, invading either the subserosa; and T4, invading through the serosa or invading contiguous organs. The status of lymph node metastasis was therefore stratified as follows: N0, absence of regional lymph node metastasis; N1, one to three regional lymph node metastasis; N2, four or more regional lymph node metastasis. The presence of distant metastasis was noted as follows: M0, absence of distant metastasis; M1, presence of distant metastasis. The clinicopathological parameters are summarized in Table I. One representative slide with a transversal section of the tumor and with safe mucosa for each sample was selected. The immunohistochemistry was carried out on 4-μm-thick paraffin-embedded sections of formalin-fixed tumor samples using an antibody directed against olfactomedin-4 (catalog number ab78496; Abcam, Cambridge, MA; 1:25). The immunolabeling technique was performed by a Benchmark automated tissue staining system (Ventana).

The immunohistochemistry was evaluated semi-quantitatively by the percentage of cytoplasmic staining cells, the intensity, and the presence or lack of secretory granules. To exclude subjectivity, all of the slides were evaluated by two pathologists who had no knowledge of the patients' identities or clinical status. In discrepant cases, the two pathologists reviewed the slides together and reached a consensus.

The percentage of immunopositive stained cells (A) was divided into five grades as: <10% (score 0); 10–30% (score 1); 30–50% (score 2); 50–70% (score 3); and >70% (score 4). Second, the intensity of staining was scored by evaluating the average staining intensity (B) of the positive cells (0, none; 1, weak; 2, intermediate; and 3, strong). The score for each section was measured as A × B, and the result was defined as negative (–, 0), weakly positive (+, 1–3), positive (++, 4–7), and strongly positive (+++, 8–12). The immunohistochemical data were subjected to statistical analysis. All of the quantitative data were recorded as the means ± S.D. Comparison between multiple groups were performed by one-way analysis of variance and Wilcoxon rank tests (*p* < 0.05).

Specificity of the OLFM4 Antibody—The specificity of the OLFM4 antibody was determined by Western blot analyses using protein extracts from four different cell lines (supplemental Fig. 1, A and B). RNA interference data were obtained from colorectal cell lines transfected with OLFM4 specific or control siRNA oligonucleotides (supplemental Fig. 1, C and D). The validation of the OLFM4 antibody was also determined by Western blot analysis using cell extract from COS7 cells overexpressing OLFM4 (supplemental Fig. 1E). Finally, *in situ* hybridization for OLFM4 in the human colon realized in Clevers's group (9) and our immunohistochemistry (IHC) images were compared (supplemental Fig. 1F).

Quantitative Proteomic Analysis of Colorectal Tumors

Cell Lines and Transfection—Human cell lines (American Type Culture Collection) were maintained in antibiotic-free RPMI 1640 medium (Lonza). The cultures were supplemented with 10% fetal bovine serum. The cell lines were maintained at 37 °C in 5% carbon dioxide and were tested to rule out mycoplasma contamination. For transfection experiments, the cells were seeded into 60-mm culture dishes and grown until 80% confluence. The empty plasmid pcDN4/T0 and the pcDNA4/OLFM4 plasmids were stably cotransfected with the pcDNA6/TR using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The cells were selected with 100 µg/ml blasticidin (Sigma-Aldrich) and 500 µg/ml zeocin (Invitrogen) for 2 weeks and maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum containing 100 µg/ml zeocin and 2.5 µg/ml blasticidin.

Chromatin Immunoprecipitation Assays—ChIP experiments were performed as previously described (40–43). Briefly, HT29 cells were fixed with 1% formaldehyde. After 10 min, the cells were washed with ice-cold Tris-buffered saline and lysed with 500 µl of ChIP buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 1% SDS, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF). Chromatin was sheared by sonication to an average size of 500 bp. The chromatin solution was diluted with 1 volume of dilution buffer (2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 1% Triton X-100, 0.1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF) and incubated 1 h at 4 °C on a rotating platform with protein A-agarose and protein G-Sepharose that was pretreated with sheared DNA salmon sperm. Chromatin was then incubated overnight at 4 °C on a rotating platform with 1 µg of the indicated antibodies or anti-GAL4 antibodies. Following precipitation with protein A-agarose and protein G-Sepharose (pretreated with sheared DNA salmon sperm), chromatin was eluted with elution buffer (1% SDS, 100 mM NaHCO₃) for 5 h at 65 °C. DNA was extracted with phenol chloroform, precipitated with ethanol, allowed to air dry, and then dissolved in 100 µl of sterile H₂O. Four µl of the DNA samples were then subjected to PCR amplification.

RESULTS

iTRAQ Analysis of Colorectal Tumors—Given the cellular heterogeneity of colorectal cancer, LCM was first applied on tissue to obtain a highly purified population of tumor cells. Representative images of pre- and postmicrodissected tissue images as well as purified cells are presented Fig. 1A. Note that UV laser capture induced cell damage and reduced protein yield during microdissection so that all experiments were performed using infrared laser capture. Approximately 100,000 cells were collected from multiple consecutive tissue sections, and quantitative expression profiles were obtained using iTRAQ labeling coupled with OFFGEL fractionation and off-line nanoLC/MS/MS as we previously described (30). To obtain proteomic maps of the successive steps of colorectal cancer, four adenomas and 24 adenocarcinomas representing the four clinical stages of the disease were subjected to eight different iTRAQ experiments (six 4-plex and two 8-plex; see Fig. 1B). To compare the different results, a pool of three different normal tissues was included in each experiment, labeled with a 114 tag. Finally, among these eight experiments, five were performed using 100 µg of tissue, and three were conducted with less than 70 µg, for each sample.

Proteomic Analyses of Colorectal Cancer—We used the ProteinPilot algorithm (34) to characterize the number of identified proteins (see the identification criteria under “Materials and Methods”). In a first three 4-plex analyses (iTRAQ-1, -2, and -7; supplemental Tables 1–3), 1672 unique proteins were identified (more than 1100 unique proteins by experiment; Table II). Among these, 734 (43.9%) were detected in each of the three iTRAQ experiments, whereas 366 (21.9%) were common to at least two analysis (Fig. 2A). This indicates that approximately two-thirds of the identified proteins can be detected in at least two of the three iTRAQ experiments. To extend these results, we then compared iTRAQ results, using either a 4800 (Fig. 2B) or 5800 (Fig. 2C) MALDI TOF/TOF. Using the 4800 approach, we were able to identify 1457 unique proteins with two 4-plex and one 8-plex experiments. 598 (41.0%) common proteins were detected in all three experiments, and 371 (25.4%) were shared by at least two experiments, indicating again that two-third of the identified proteins can be detected in at least two of the three iTRAQ experiments (Fig. 2B). Using the 5800 MALDI TOF/TOF and one 4-plex and one 8-plex experiments, we were able to identify 1443 unique proteins; among which 821 (56.9%) were common to the two experiments (Fig. 2C).

To define a colorectal cancer proteome, we then determined the total number of unique proteins that can be identified from the 28 tumor samples. As a first attempt, according to the criteria, two peptides/protein with score >95% for each iTRAQ experiment, 2141 unique proteins were identified (Table II and supplemental Table 4). We then repeated this identification but combined the eight iTRAQ experiments into a single group. In this case, 3138 unique proteins were identified with at least two peptides (confidence score > 99%) (supplemental Table 5). We then classified this colorectal cancer proteome using GOMiner software. 17 GO cellular components terms were defined among the 3138 proteins (supplemental Fig. 2A), and the majority (37%) was attributed to membrane proteins from cytoplasm, nucleus, mitochondrion, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. This demonstrated the effectiveness of the reported approach for the identification of hydrophobic species. Proteins were also grouped based on their biological functions (supplemental Fig. 2B): 68% were involved in metabolism, 39% were involved in the regulation of biological process, and 23% were transport proteins. In addition, 21 and 19% were involved in development and cell communication, respectively. GO molecular functions annotation terms indicated that 64% were associated with protein binding, 47% had a catalytic activity, 23% were involved in nucleotide, and 27% were involved in nucleic acid binding (supplemental Fig. 2C).

Technical and Experimental Reproducibility of iTRAQ Experiments—To estimate the analytical reproducibility of our results, two experimental replicates (identical sample in two different iTRAQ sets) of a technical duplicate (two identical

Quantitative Proteomic Analysis of Colorectal Tumors

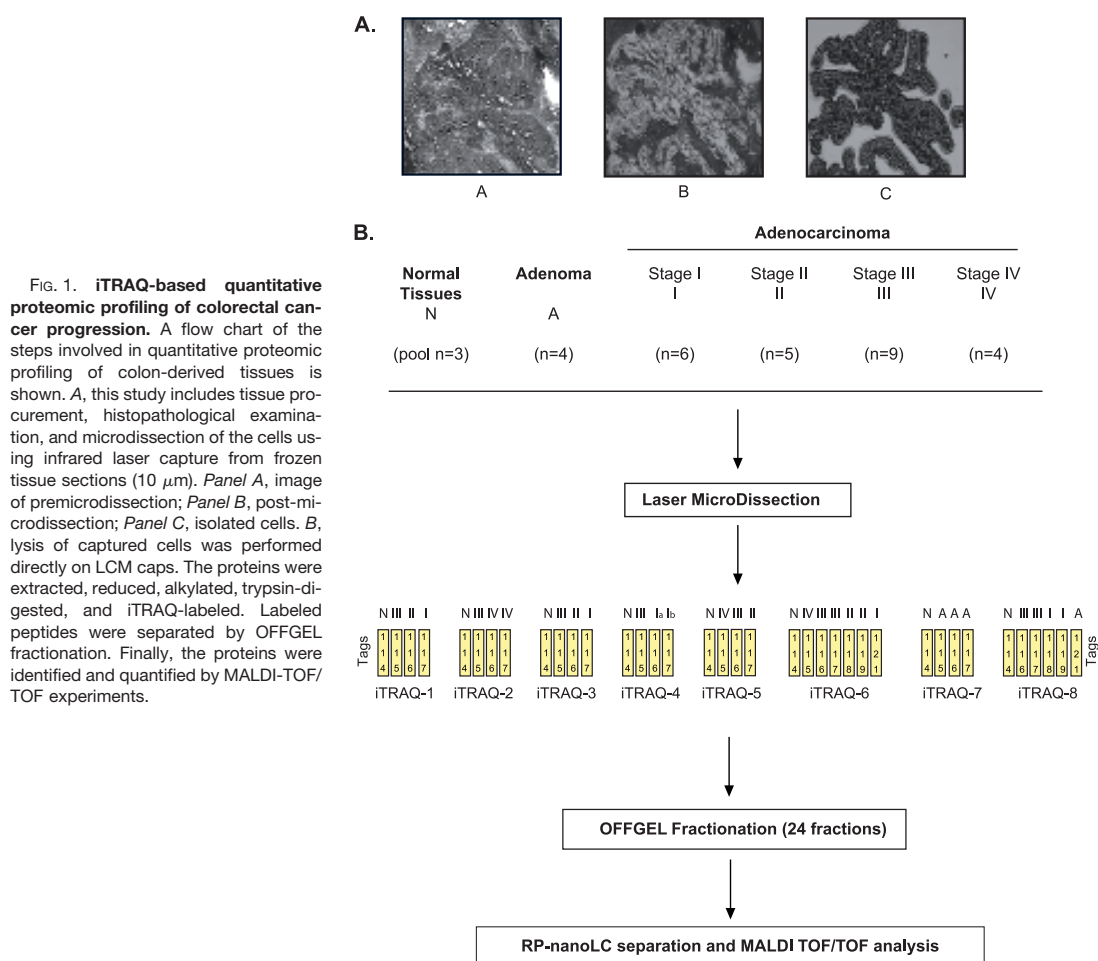


FIG. 1. **iTRAQ-based quantitative proteomic profiling of colorectal cancer progression.** A flow chart of the steps involved in quantitative proteomic profiling of colon-derived tissues is shown. *A*, this study includes tissue procurement, histopathological examination, and microdissection of the cells using infrared laser capture from frozen tissue sections (10 μ m). *Panel A*, image of pre-microdissection; *Panel B*, post-microdissection; *Panel C*, isolated cells. *B*, lysis of captured cells was performed directly on LCM caps. The proteins were extracted, reduced, alkylated, trypsin-digested, and iTRAQ-labeled. Labeled peptides were separated by OFFGEL fractionation. Finally, the proteins were identified and quantified by MALDI-TOF/TOF experiments.

TABLE II
Spectra, peptides, and proteins identified and quantified of eight independent iTRAQ experiments

Experiment	iTRAQ	Mass spectrometer	Quantity	Total spectra	Identified peptides (confidence = 95%)	Identified peptides (confidence = 95%, contribution = 2)	Identified proteins (after grouping)		Quantified proteins (unused >4)
							Unused >2	Unused >4	
			μ g						
iTRAQ-1	4-plex	4800	100	146,063	51,399	17,287	2175	1210	1180
iTRAQ-2	4-plex	4800	100	105,013	52,462	6638	2017	1127	1102
iTRAQ-7	4-plex	5800	100	229,545	88,106	8215	2251	1253	1224
iTRAQ-8	8-plex	5800	100	338,262	67,606	6573	1937	1041	1012
iTRAQ-6	8-plex	4800	100	131,143	42,005	12,997	1406	742	740
iTRAQ-3	4-plex	4800	70	86,380	23,768	8299	1214	604	603
iTRAQ-4	4-plex	4800	70	97,110	46,234	6844	1075	557	557
iTRAQ-5	4-plex	4800	70	57,186	26,247	3945	1242	431	431

samples in an iTRAQ set) were run (supplemental Fig. 3A). In total, 1282 proteins were identified (with at least two peptides) across both iTRAQ experiment replicates using Protein Pilot

(1222 in replicate A1 and 1175 in replicate A2) (supplemental Table 6). The Venn diagram provided in supplemental Fig. 3B shows that 1115 (87%) of these proteins were

Quantitative Proteomic Analysis of Colorectal Tumors

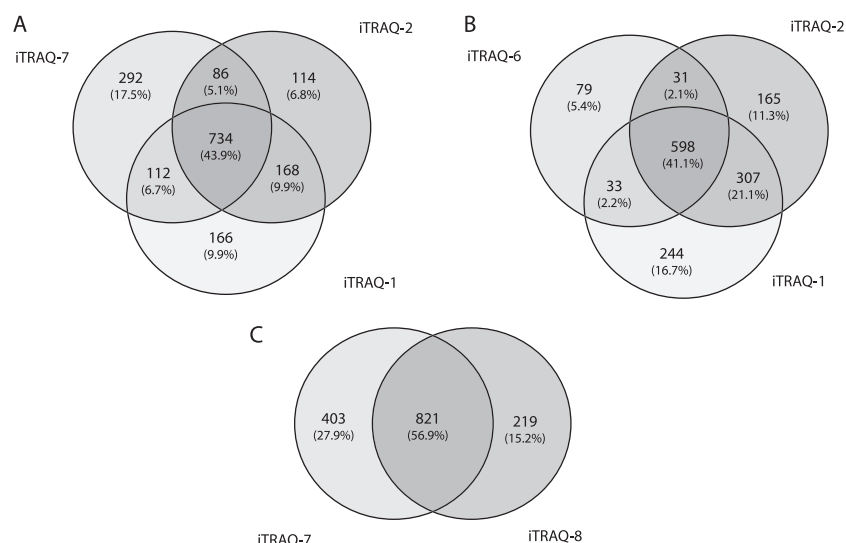


Fig. 2. Venn diagrams for the distribution of proteins between the different iTRAQ experiments. A, comparison between 4-plex experiments (two MALDI 4800 and one MALDI 5800 experiments). B, comparison between MALDI 4800 experiments (two 4-plex and one 8-plex experiments). C, comparison between MALDI 5800 experiments (one 4-plex and one 8-plex experiments).

common to both sets. Linear regression analyses were performed on ratios obtained from the duplicate analyses. Pearson correlation coefficients between both technical samples were 0.94 and 0.95, and those between the technical duplicate were 0.91 and 0.92 ($p < 0.0001$) (supplemental Fig. 3C). Thus, the duplicate ratios were significantly positively correlated, indicating a good technical sample preparation and a good analytical reproducibility of the OFFGEL-LC/MS/MS approach.

Proteomic Analysis of the Different Stages of Colorectal Cancer—We then used the iQuantator software to quantify protein expression between the different stages of colorectal cancer. This approach generates variation means and 95% credible intervals for each expression change. For proteins whose iTRAQ ratios were down-regulated, down-regulation was considered to be significant if the upper limit of the credible interval was below 1. Conversely, for proteins whose iTRAQ ratios were up-regulated, up-regulation was considered to be significant if the lower limit of the credible interval had a value greater than 1. By taking into consideration both the peptide and spectra numbers, this approach allowed us to detect small but significant expression changes, provided that several peptides are detected. Using this analysis, we were able to obtain a list of quantified proteins from the eight iTRAQ experiments (supplemental Table 7). This allowed us to determine the individual protein expression of each patient (supplemental Table 8) and consequently to define the variation of protein expression between the different stages of colorectal cancer (adenoma, stages I–IV). 555 proteins were

identified that vary significantly between these different steps of the disease (supplemental Table 9). At the adenoma stage, 164 proteins were expressed differently as compared with normal tissue, and significant variations were also observed for the other stages (stage 1, 183 proteins; stage 2, 304 proteins; stage 3, 194 proteins; and stage 4, 69 proteins; in each case the variation is expressed as compared with normal tissue). Note that in each condition, both up- or down-regulated proteins can be detected, indicating that this approach is suitable to identify proteins that are inactivated during the transformation process and not only oncogenes that are overexpressed (supplemental Table 9). Using the Metacore data mining tool (<http://www.genego.com/metacore.php>), we then analyzed the signaling pathways represented at the different stages. The cell adhesion-cell matrix pathway was identified as the most significant network associated with adenoma and stage I ($p = 4,20348E-10$ and $1,81119E-12$, respectively), the cytoskeleton-actin filament pathway was significantly associated with stage II ($p = 1,5857E-19$), the integrin-mediated cell adhesion and migration pathway was correlated with stage III ($p = 1,41513E-07$), and the cytoskeleton-intermediate filament pathway was significantly associated with stage IV ($p = 1,642E-09$). Using this analysis, we also found as expected that the adenoma signature was associated with intestinal diseases ($p = 3,4659E-21$); stage 1 was associated with gastrointestinal neoplasms ($p = 2,0057E-16$); stage II was associated with digestive system neoplasms ($p = 7,7799E-24$); stage III was associated with pathologic processes ($p = 2,0623E-28$); and stage IV was

Quantitative Proteomic Analysis of Colorectal Tumors

associated with intestinal diseases ($p = 7,1607E-19$) (supplemental Tables 10–14).

Validation of the Proteomic Analysis Using the Human Atlas Protein—The verification of proteomic results involves IHC analysis on tumor tissue where only a few proteins are generally examined. Rather than performing IHC analysis on a limited number of proteins, we took advantage of IHC data available in the Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org>, 8832 antibodies and 7,334,244 images). As an unbiased approach, we selected all of proteins for which expression differed significantly as compared with normal tissue and assessed HPA IHC data. Because all of these proteins were not represented in the HPA, most of the time as a consequence of missing data, we further selected within this list 83 proteins that met the following criteria: 1) IHC expression reported in more than one normal colorectal tissue; 2) IHC expression reported in more than eight colorectal cancer samples; and 3) the HPA antibody verification score was moderate or high (see <http://www.proteinatlas.org>). HPA images were then manually inspected to confirm that the protein of interest was overexpressed, unchanged, or underexpressed in tumor cells as compared with normal tissue. Of the 83 selected proteins, 44 (53%) presented consistent expression ratios between iTRAQ and IHC results (supplemental Table 15). Twenty-seven proteins (33%) were determined to be unchanged by IHC, whereas they were down- or up-regulated in tumor samples, and 12 proteins (14%) in IHC did not fit with the expression in our study. Examination of the literature allowed the confirmation of our iTRAQ results for 21 of 39 proteins (unchanged or no fit by IHC); no information was found for the 16 remaining proteins. Only the tenascin result does not seem to match the information in the literature and the IHC results. Note that the different colon cancer stages are not specified in the HPA database. This prevents the detection of variation that would be stage-specific and might explain these discrepancies.

OLFM4 Is Expressed at the Early Stages of Colorectal Cancer—We then asked whether we could identify some proteins that are specific to the early stages of colorectal cancer. To this end, proteins were classified with the following criteria: 1) significant up-regulation in adenoma and stages I/II according to iQuantitator analysis and 2) not significantly expressed or underexpressed in stages III/IV. With this approach, only four proteins were identified (supplemental Table 9), the aldehyde dehydrogenase (ALDH1A1), the heat shock protein 1 (HSPE1), the sorbitol dehydrogenase (SORD), and OLFM4. Interestingly, OLFM4 encodes a protein that has been recently described as a specific marker of colorectal stem cells in association with Lgr5 (32, 33). In our experimental conditions, OLFM4 was detected with the highest statistical confidence, and given its importance in colorectal cancer, we focused on this protein for the following part of the study. To confirm its dysregulation in adenoma and in the early stage of CCR, its expression was first analyzed by immunohistochem-

istry using paraffin-embedded tissues isolated from 126 patients. Representative pictures of OLFM4 staining in adenomas, early or metastatic CRC cases are shown Fig. 3A. Whereas normal intestinal crypts showed moderate nuclear staining, results showed that the cytoplasmic and nuclear staining increased significantly in dysplasia tissue and in noninvasive tumors. OLFM4 was found to be significantly up-regulated in low grade adenoma, high grade adenoma, *in situ* adenoma, and stages I and II as compared with normal crypts (one-way analysis of variance test, $p < 0.05$). By contrast, OLFM4 expression was not significantly different between invasive tissues (stage III/IV) and normal tissues (Fig. 3B).

OLFM4 Expression Is Activated by the Ras-NF- κ B2 Pathway—These observations suggested to us that OLFM4 is expressed at the early stages of colorectal cancer, probably in response to oncogenes that are involved in the initial step of cell transformation. Although it is well known that the adenomatous polyposis coli/ β -catenin pathway plays an important role in the initial transformation of intestinal crypts, we and others have also shown that the STAT3 and NF- κ B transcription factor plays an essential role in this disease (43–45). Because STAT3 and NF- κ B subunits are known to interact in tumor cells, we investigated the role of these two transcription factors in the regulation of OLFM4 expression. Transcription factor recognition site analysis of the OLFM4 promoter revealed the presence of several potential binding sites for these proteins. To determine whether STAT3 and NF- κ B2 can be found associated with the OLFM4 gene, ChIP experiments were performed in growing HT29 cells using pair of primers corresponding to the proximal promoter. Although we were not able to detect any association of STAT3 with this region, ChIP results showed that NF- κ B2 and its cofactor BCL3 are associated with the OLFM4 proximal promoter and that this was correlated with the binding of the RNA polymerase II (Fig. 4A). Note that this effect was noticed on endogenous proteins and not following overexpression. In addition, using RNA interference, we also noticed that the down-regulation of NF- κ B2 inhibits OLFM4 expression at the protein and mRNA levels (Fig. 4B).

It has been shown recently that the Ras oncogene plays an important role in the initial stages of colorectal cancer and that this signaling pathway can deregulate the NF- κ B transcription factor to allow abnormal cell cycle progression and survival (44, 46, 47). To determine whether Ras regulates OLFM4, we used stable HT29 cells expressing the RasV12 oncogene under the control of a doxycycline-inducible promoter (48). As expected, Ras was up-regulated in response to doxycycline, and a significant activation of the NF- κ B2 transcription factor was detected (Fig. 4C). Interestingly, the induction of Ras was correlated with an up-regulation of OLFM4 at the protein level (Fig. 4D). In addition, semi-quantitative PCR experiments showed that this effect was regulated at the transcriptional level (Fig. 4D).

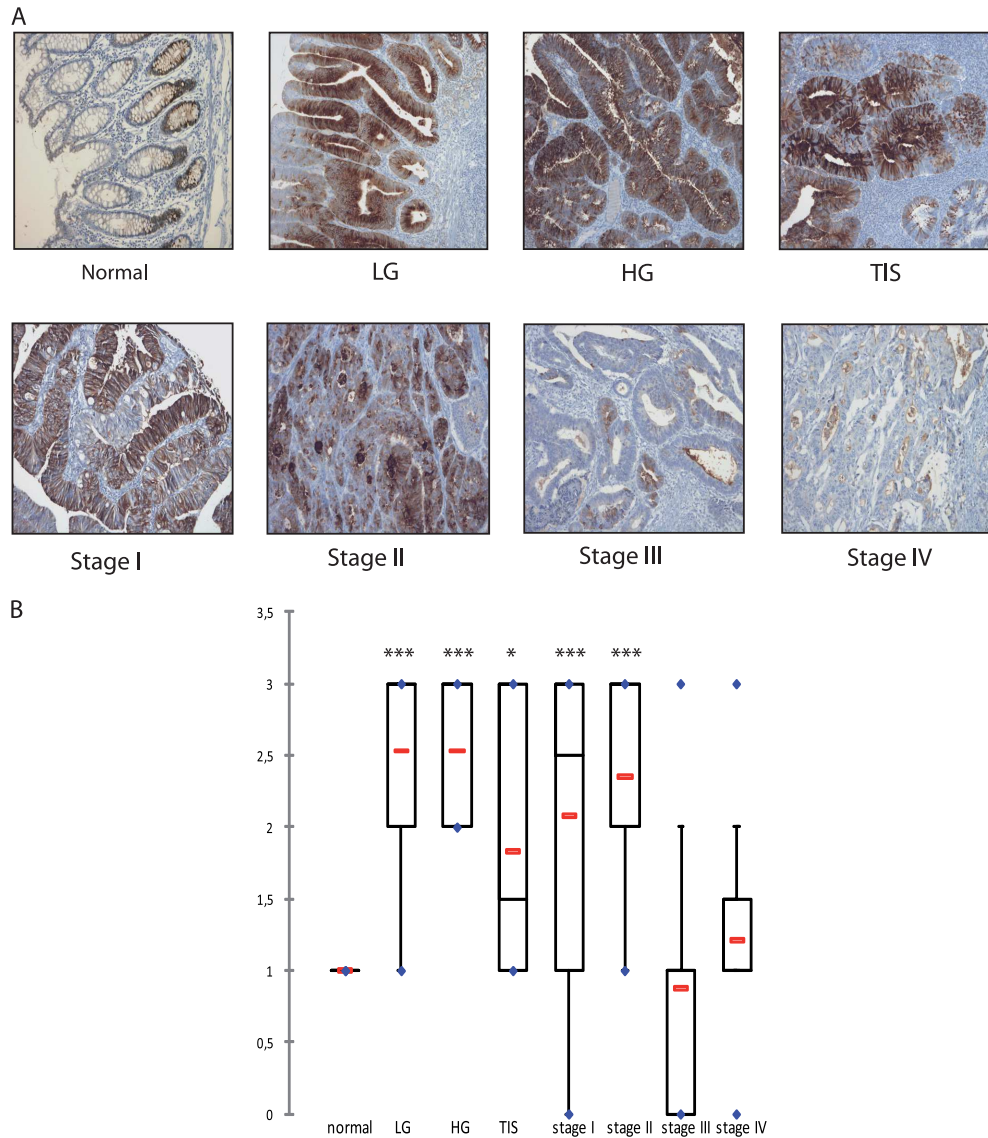


Fig. 3. The validation of OLFM4 in human CRC tissue. *A*, the immunohistochemistry staining of the different colorectal tumor stages (100 \times). LG, low grade adenoma; HG, high grade adenoma; TIS, carcinoma *in situ*. Stages I and II, early stage carcinomas; stages III and IV, metastatic carcinomas. *B*, different distribution of OLFM4 IHC scores (staining intensity \times staining percentage) between normal crypts, adenomas, carcinomas *in situ*, and different colorectal tumor stages ($p < 0.05$, significant for normal versus low grade adenoma, high grade adenoma, carcinoma *in situ*, stage I, and stage II, not significant for normal versus stages III and IV). The red lines represent the mean, and the blue points represent the minimum and maximum values. Dunnett's multiple comparison tests were performed; $q = 3.20$ (*) for normal versus carcinoma *in situ*; $q = 6.35$ (***) for normal versus low and high grade adenoma; $q = 5.21$ and 5.49 for normal versus stages I and II, respectively.

OLFM4 Is Overexpressed in Ras-mutated Tumors—These observations suggested to us that the expression of OLFM4 might be enhanced in tumor samples expressing the Ras-NF-

κ B2 pathway. Because NF- κ B2 is generated as a cleavage product of its p100 precursor, the detection of the active form of this transcription factor is difficult in tumor samples. How-

Quantitative Proteomic Analysis of Colorectal Tumors

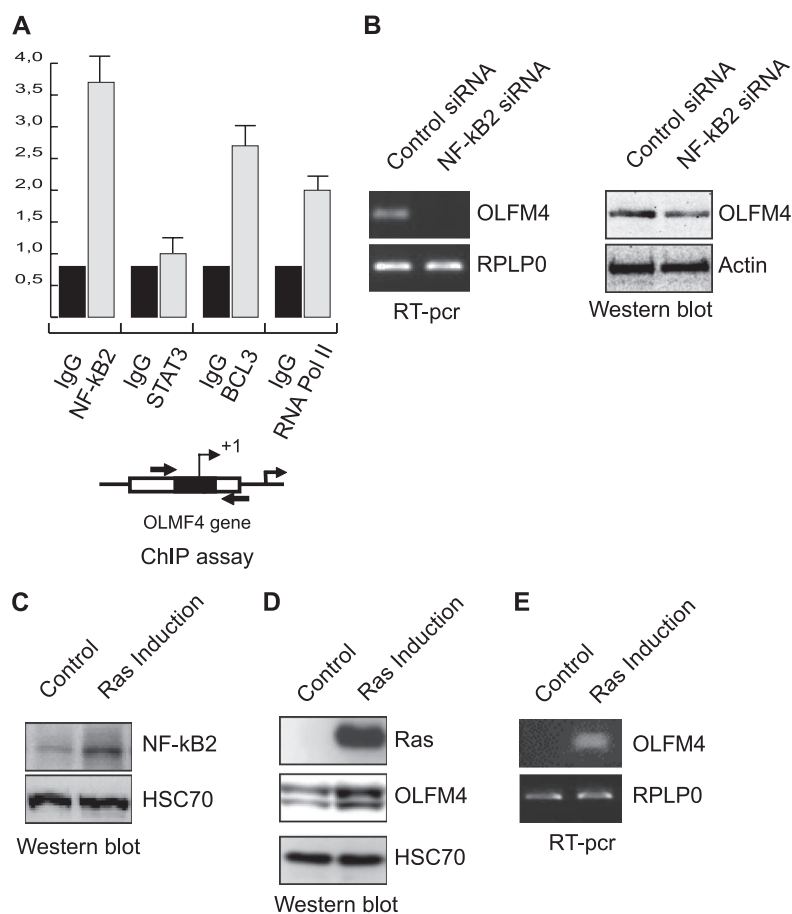


FIG. 4. **NF-κB2 regulates OLFM4 expression following Ras induction.** A, soluble chromatin from growing HCT116 cells was prepared and immunoprecipitated with antibodies targeted against NF-κB2, Bcl3, and the RNA polymerase II. DNA was amplified using pair of primers that cover the NF-κB proximal binding site of the OLFM4 promoter. ChIP assays were then quantified by real time RT-PCR as compared with the signal obtained on a control sequence with a control IgG. The schematic representation of the potential NF-κB binding sites of the OLFM4 promoter is presented. The reading frame of the binding site is indicated by + for 5'-3' and - for 3'-5'. B, HCT116 colorectal cell lines were either transfected with NF-κB2 specific or control siRNA oligonucleotides as indicated. The mRNA extracts (*left panels*) and whole cell extracts (*right panels*) were processed, and OLFM4 expression was analyzed 48 h after siRNA transfection. C, HT29 colorectal cell lines expressing an incible vector of the RasV12 oncogene were treated or not with doxycyclin for 48 h, and whole cell extracts were prepared and analyzed using antibodies directed against NF-κB2 and HSC70 as a loading control. D and E, cells were treated as above, and the expression of OLFM4 or Ras was evaluated by Western blot analysis (D) or RT-PCR (E).

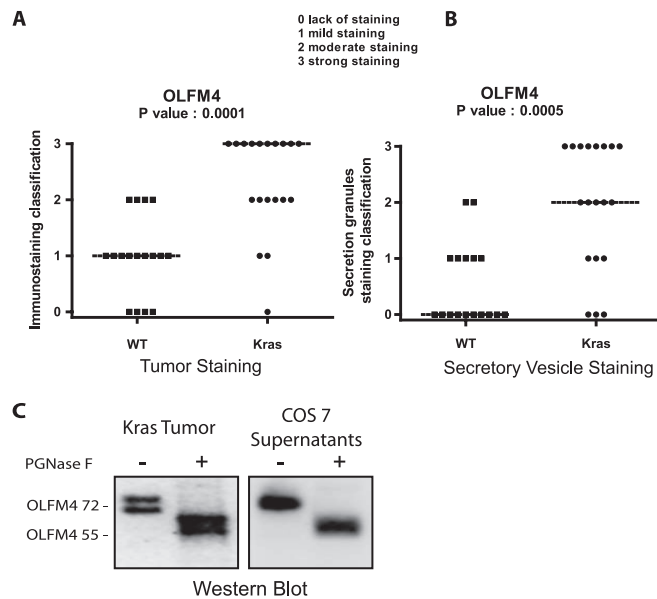
ever, the presence of the RasV12 oncogene can be determined by DNA sequencing. For this reason, we then analyzed OLFM4 expression in tumors expressing or not a mutated form of this oncogene. Interestingly, results presented Fig. 5A indicate that OLFM4 expression was significantly enhanced in Ras-mutated tumors ($p < 0.0001$) as compared with wild type tumor samples.

OLFM4 Is Present in the Cytoplasm and as a Secreted Protein—During the course of the IHC experiments, we no-

ticed that OLFM4 was expressed in the cytoplasm, and there was significant expression in the secretory vesicles (Fig. 5B). This result suggested to us that this protein might be secreted, and OLFM4 was effectively detected in the cell supernatants (data not shown and see Fig. 5C). In addition, we also noticed that two bands can be detected by Western blot, one at the expected molecular mass of 55 kDa and another band ~72 kDa. This observation suggested to us that OLFM4 was modified by glycosylation. To verify this hypothesis, extracts

Quantitative Proteomic Analysis of Colorectal Tumors

Fig. 5. **OLFM4 is glycosylated and secreted in KRAS tumors.** A and B, OLFM4 IHC scores (staining intensity \times staining percentage) between WT and KRAS tissue in tumor tissue (A) and in secretory vesicles (B). C, deglycosylation analysis of OLFM4. OLFM4 was significantly secreted from the COS-7 cells; the secreted form at 72 kDa was treated with (+) or (-) peptide:*N*-glycosidase F (PGNase F). The size of deglycosylated OLFM4 is consistent with the molecular mass of calculated OLFM4 gene product. Treatment of the 72-kDa band in KRAS tumor leads to the same band at 55 kDa.



obtained from tumor samples were incubated with the peptide:*N*-glycosidase F deglycosylating enzyme. Following incubation, a shift in the molecular mass from 72 to 55 kDa was observed, indicating that the protein is effectively modified by *N*-glycosylation (Fig. 5C). To confirm this observation, COS cells were transfected with a vector allowing OLFM4 expression, and its potential secretion was analyzed by Western blot. Interestingly, results showed that only the 72-kDa band was detected in the supernatant, suggesting that OLFM4 is secreted as a glycosylated protein. Following peptide:*N*-glycosidase F treatment, the same migration shift was observed, and OLFM4 migrated as a 55-kDa protein (Fig. 5C, right panel). Importantly, in Ras-mutated tumors, OLFM4 was essentially detected at 72 kDa, suggesting that this protein is effectively secreted *in vivo*.

DISCUSSION

Following the initial description of the genetic modifications occurring during colorectal cancer transformation, several studies have clearly shown that CRC results from multiple mutations that induce the deregulation of cell cycle and cell death pathways. This led to the important conclusion that CRC is a heterogeneous disease, which certainly explains why patients suffering from the same apparent disease have distinct outcome and different responses to the same anti-cancer treatment. Molecular clustering has therefore become an essential goal of cancer treatment, not only to establish tumor prognosis but also to identify the specific additive oncogenic pathways that should be targeted (49–51). Recent results have shown the interest of using genomic signatures

to identify these deregulated pathways and characterize prognosis markers. These gene signatures can also be used to characterize predictive markers that reflect the response to a particular treatment, but in this case, the predicting value of this approach remains to be fully validated (13, 52). In addition to these genomic experiments, quantitative proteomics also appears as a powerful tool to define cancer signatures that would identify disease subtypes, predict tumor escape, or characterize new molecular targets.

In this study, we provide what is to our knowledge the most extensive proteome database established so far for colorectal cancer and illustrate the value of using the combination of OFFGEL-iTRAQ labeling and MALDI-TOF/TOF approaches to explore the deep proteome of frozen tissues. It should be noted that the use of LCM favored the identification of many low concentrated proteins by removing abundant stromal proteins. This approach enables the identification and quantification of ~1100 proteins by patient, allowing the identification of a proteomic map for each tumor, which could be used in the future for individual clinical monitoring.

From a technical point of view, this study allowed us to compare the two MALDI-TOF/TOF 4800 and 5800 from AB sciex. With the iTRAQ technology, the 5800 MALDI seems to be slightly more sensitive than the 4800 MALDI (increase in identification of ~6% of proteins). However, in quite a surprising way, with the iTRAQ 8-plex, we can identify 35% more proteins with the MALDI 5800 than with the MALDI 4800. Although it is well known that the number of identified proteins and peptides is larger when using iTRAQ 4-plex than with iTRAQ 8-plex (53), it seems that the use of the MALDI

Quantitative Proteomic Analysis of Colorectal Tumors

5800 lessens this difference. The difference in proteins identified changes from 35% in favor of the 4-plex when using the MALDI 4800 as compared with 18% with the 5800, thereby reviving interest in this reactive agent that can compare eight samples instead of four.

Starting from a cohort of 28 frozen tumors, we compared the protein profiles of adenomas or adenocarcinomas at the early stages (I and II) or metastatic stages (III and IV). The results indicate that the expression of a total of 555 proteins was significantly over- or underexpressed in colorectal cancer as compared with normal tissue, representing 16% of the total identified proteome. This approach allowed us to characterize the proteins that expression varied significantly between the different stages (adenoma, stages I-IV) and to establish what is to our knowledge the first proteomic analysis of these different steps. As compared with normal tissue, it is interesting to note that the most important variation was observed between stages II and III, which corresponds to the transition between a nonmetastatic and metastatic tumor. In this case, 304 proteins were found to vary significantly, whereas 180 were differently regulated in adenomas and stages I and III, and only 68 were modified in stage IV. Although this remains to be demonstrated, it is tempting to speculate that some proteins expressed in the stage II are necessary for invasive migration. In line with this hypothesis, we observed using gene ontology analysis that the expression of extracellular matrix proteins varies significantly. Among these proteins, we have focused on secreted proteins present at the early stage of the disease because they can be easily detected by ELISA, and they can be useful to distinguish these aggressive cancers from early stage cases. It is important to consider that patients with stage I/II cancer are believed to be cured after surgery but that ~20% of them will relapse. The distinction between these two cases is actually difficult, and for this reason, the identification of specific biomarkers of stage II colorectal tumors is an important goal that would allow the prediction of recurrence events. A 50-gene signature has been recently described that can separate early tumors depending on their relapse probability (15). Therefore, it will be interesting to determine whether the protein list identified in this study can be used to improve this early stage stratification to predict tumor relapse.

Among these proteins, we focused on OLFM4 because its expression was significantly up-regulated in adenomas, further increased in stage I, and maximum in stage II before dropping considerably in stages III and IV. Importantly, OLFM4 has recently been shown to be expressed in colorectal stem cells in association with Lgr5 (32, 33), further confirming its expression at the early stages of the disease. This protein plays probably an important role in cancer because it has been recently shown in myeloid cells that its promoter is probably methylated. Its re-expression induced cell cycle arrest and cell death in myeloid cells (54). Interestingly, the same effect has also been observed in prostate cancer cells

where OLFM4 levels are down-regulated during cancer progression, most significantly in tumors with high Gleason scores (55). Importantly, restoring the OLFM4 level through overexpression led to reduced proliferation and invasiveness. Because this protein is known to interact with lectins as well as cadherin (56), this effect might be explained by a better adhesion to the extracellular matrix or to the surrounding cells. However, this study also proposed that this effect is related to an inhibition of cathepsin D expression and an enhanced autophagic activity of prostate cancer cells. Because autophagy plays an important role in tumor suppression (57), it will be interesting to determine whether this effect of OLFM4 can be extended to other experimental models. Moreover, it should be noted that OLFM4 is a member of the olfactomedin domain-containing protein. This family includes Noelin (OLFM1), which prolongs neural crest production. The involvement of nervous system proteins, such as neurotrophins, in carcinogenesis has been reported for prostate (58) and breast (59) cancers, and it will be interesting to test whether OLFM4 behaves in the same way.

In our experimental conditions, it is striking to note that OLFM4 level was very significantly down-regulated in stages III and IV compared with stages I/II tumors and that a reduced expression of this protein has been recently correlated with poor prognosis. In light of these observations, it is tempting to speculate that the inactivation of OLFM4 is a necessary event to prevent cell death and allow tumor progression and metastasis in colorectal cancer. In line with this hypothesis, it has been recently reported that OLFM4 expression is reduced in poorly differentiated colon cancers, as well as at the late tumor-node-metastasis stage (60). If feasible, the detection of OLFM4 variations in the serum of the patients might therefore be an interesting tool to follow the evolution of stage II tumors. Interestingly, we also noticed that OLFM4 was regulated by the Ras-NF- κ B2 pathway and that the expression of this protein was significantly enhanced in Ras-mutated tumors. We have recently shown that senescence is induced in response to the Ras oncogene in colorectal cell lines (48). Oncogene-induced senescence (OIS) is a powerful antitumor mechanism that induces permanent cell cycle arrest in response to abnormal proliferative signals (61). Originally described in cell culture, OIS has been recently shown to occur also *in vivo* as an early protection against carcinogenesis. In light of these observations, one can speculate that OLFM4 overexpression is an early event occurring in response to OIS in Ras-expressing cells. Further experiments are therefore necessary to characterize the effect of OLFM4 on cell cycle and cell death pathways in colorectal cell lines and to determine whether this effect is deregulated by the Ras oncogene to allow OIS escape and tumor progression.

Through the characterization of the molecular aberrations present in cancer cells, it is now widely accepted that the identification of new biomarkers will improve the outcome prognosis or the prediction of therapy response. In addition, it

Quantitative Proteomic Analysis of Colorectal Tumors

is also expected that molecular clustering will help to separate apparently similar tumors to provide rationale treatments. Besides genomic approaches, our results indicate that proteomic analysis can be used on tumor samples to provide not only a better understanding of cell transformation in colorectal cancer but also to identify new biomarkers of the different tumor stages such as OLFM4.

Acknowledgments—We thank John Schwacke for help with iQuantifier software.

* This work was supported by grants from the Ligue Contre le Cancer (Comité du Maine et Loire), the Institut du Cancer, the Region Pays de Loire, and Amgen France. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ This article contains [supplemental Tables 1–15 and Figs. 1–3](#).

** To whom correspondence should be addressed: Paul Papin Cancer Center, INSERM U892 2 rue Moll, 49033 Angers, France. Tel.: 33-2-41-35-29-14; E-mail: catherine.guette@ico.unicancer.fr.

REFERENCES

- Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H. J., Lynch, H. T., Minsky, B., Nordlinger, B., and Stirling, N. (2010) Colorectal cancer. *Lancet* **375**, 1030–1047
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., and Ward, E. (2010) Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J. Clin.* **60**, 277–300
- Huang, C. S., Lal, S. K., and Farrary, F. A. (2005) Colorectal cancer screening in average risk individuals. *Cancer Causes Control* **16**, 171–188
- van Rossum, L. G., van Rijn, A. F., Laheij, R. J., van Oijen, M. G., Fockens, P., van Krieken, H. H., Verbeek, A. L., Jansen, J. B., and Dekker, E. (2008) Random comparison of guaiac and immunochemical fecal occult blood tests for colorectal cancer in a screening population. *Gastroenterology* **135**, 82–90
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M., and Bos, J. L. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* **319**, 525–532
- Pino, M. S., and Chung, D. C. (2010) The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* **138**, 2059–2072
- Clevers, H. (2006) Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**, 469–480
- Reya, T., and Clevers, H. (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**, 843–850
- Barker, N., Ridgway, R. A., van Es, J. H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A. R., Sansom, O. J., and Clevers, H. (2009) Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* **457**, 608–611
- van der Flier, L. G., and Clevers, H. (2009) Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* **71**, 241–260
- Phelps, R. A., Chidester, S., Dehghanizadeh, S., Phelps, J., Sandoval, I. T., Rai, K., Broadbent, T., Sarkar, S., Burt, R. W., and Jones, D. A. (2009) A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell* **137**, 623–634
- Lièvre, A., Bachet, J. B., Boige, V., Cayre, A., Le Corre, D., Buc, E., Ychou, M., Bouché, O., Landi, B., Louvet, C., André, T., Bibeau, F., Diebold, M. D., Rougier, P., Ducreux, M., Tomic, G., Emile, J. F., Penault-Llorca, F., and Laurent-Puig, P. (2008) KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **26**, 374–379
- Bild, A. H., Yao, G., Chang, J. T., Wang, Q., Potti, A., Chasse, D., Joshi, M. B., Harpole, D., Lancaster, J. M., Berchuck, A., Olson, J. A., Jr., Marks, J. R., Dressman, H. K., West, M., and Nevins, J. R. (2006) Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature* **439**, 353–357
- Chang, J. T., Carvalho, C., Mori, S., Bild, A. H., Gatz, M. L., Wang, Q., Lucas, J. E., Potti, A., Febbo, P. G., West, M., and Nevins, J. R. (2009) A genomic strategy to elucidate modules of oncogenic pathway signaling networks. *Mol. Cell* **34**, 104–114
- Garman, K. S., Acharya, C. R., Edelman, E., Grade, M., Gaedcke, J., Sud, S., Barry, W., Diehl, A. M., Provenzale, D., Ginsburg, G. S., Ghadimi, B. M., Ried, T., Nevins, J. R., Mukherjee, S., Hsu, D., and Potti, A. (2008) A genomic approach to colon cancer risk stratification yields biologic insights into therapeutic opportunities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 19432–19437
- Crawford, N. P., Colliver, D. W., and Galandiuk, S. (2003) Tumor markers and colorectal cancer: Utility in management. *J. Surg. Oncol.* **84**, 239–248
- Sidrasky, D. (2002) Emerging molecular markers of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 210–219
- Duffy, M. J., van Dalen, A., Haglund, C., Hansson, L., Holinski-Feder, E., Klapdor, R., Lamerz, R., Peltomaki, P., Sturgeon, C., and Topolcan, O. (2007) Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *Eur. J. Cancer* **43**, 1348–1360
- Locker, G. Y., Hamilton, S., Harris, J., Jessup, J. M., Kemeny, N., Macdonald, J. S., Somerfield, M. R., Hayes, D. F., and Bast, R. C., Jr. (2006) ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J. Clin. Oncol.* **24**, 5313–5327
- Jimenez, C. R., Knol, J. C., Meijer, G. A., and Fijneman, R. J. (2010) Proteomics of colorectal cancer: Overview of discovery studies and identification of commonly identified cancer-associated proteins and candidate CRC serum markers. *J. Proteomics* **73**, 1873–1895
- Alfonso, P., Cañamero, M., Fernández-Carboni, F., Núñez, A., and Casal, J. I. (2008) Proteome analysis of membrane fractions in colorectal carcinomas by using 2D-DIGE saturation labeling. *J. Proteome Res.* **7**, 4247–4255
- Bi, X., Lin, Q., Foo, T. W., Joshi, S., You, T., Shen, H. M., Ong, C. N., Cheah, P. Y., Eu, K. W., and Hew, C. L. (2006) Proteomic analysis of colorectal cancer reveals alterations in metabolic pathways: Mechanism of tumorigenesis. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 1119–1130
- Rho, J. H., Qin, S., Wang, J. Y., and Roehrl, M. H. (2008) Proteomic expression analysis of surgical human colorectal cancer tissues: Up-regulation of PSB7, PRDX1, and SRP9 and hypoxic adaptation in cancer. *J. Proteome Res.* **7**, 2959–2972
- Ducoux-Petit, M., Uttenweiler-Joseph, S., Brichory, F., Bousquet-Dubouch, M. P., Burlet-Schiltz, O., Haeuw, J. F., and Monsarrat, B. (2008) Scaled-down purification protocol to access proteomic analysis of 20S proteasome from human tissue samples: Comparison of normal and tumor colorectal cells. *J. Proteome Res.* **7**, 2852–2859
- Roessler, M., Rollinger, W., Palme, S., Hagmann, M. L., Berndt, P., Engel, A. M., Schneidinger, B., Pfeffer, M., Andres, H., Karl, J., Bodenmüller, H., Rüschoff, J., Henkel, T., Rohr, G., Rossol, S., Rösch, W., Langen, H., Zolg, W., and Tacke, M. (2005) Identification of nicotinamide *N*-methyltransferase as a novel serum tumor marker for colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**, 6550–6557
- Roessler, M., Rollinger, W., Mantovani-Endl, L., Hagmann, M. L., Palme, S., Berndt, P., Engel, A. M., Pfeffer, M., Karl, J., Bodenmüller, H., Rüschoff, J., Henkel, T., Rohr, G., Rossol, S., Rösch, W., Langen, H., Zolg, W., and Tacke, M. (2006) Identification of PSME3 as a novel serum tumor marker for colorectal cancer by combining two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with a strictly mass spectrometry-based approach for data analysis. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 2092–2101
- Kim, H. J., Kang, H. J., Lee, H., Lee, S. T., Yu, M. H., Kim, H., and Lee, C. (2009) Identification of S100A8 and S100A9 as serological markers for colorectal cancer. *J. Proteome Res.* **8**, 1368–1379
- Ma, Y., Peng, J., Liu, W., Zhang, P., Huang, L., Gao, B., Shen, T., Zhou, Y., Chen, H., Chu, Z., Zhang, M., and Qin, H. (2009) Proteomics identification of desmin as a potential oncofetal diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 1878–1890
- Xu, B. J., Li, J., Beauchamp, R. D., Shyr, Y., Li, M., Washington, M. K., Yeatman, T. J., Whitehead, R. H., Coffey, R. J., and Caprioli, R. M. (2009) Identification of early intestinal neoplasia protein biomarkers using laser capture microdissection and MALDI MS. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 936–945
- Ernault, E., Gamelin, E., and Guette, C. (2008) Improved proteome coverage by using iTRAQ labelling and peptide OFFGEL fractionation. *Proteome Sci.* **6**, 27

Quantitative Proteomic Analysis of Colorectal Tumors

31. Ernout, E., Bourreau, A., Gamelin, E., and Guette, C. (2010) A proteomic approach for plasma biomarker discovery with iTRAQ labelling and OFF-GEL fractionation. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 927917
32. Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegbarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J., and Clevers, H. (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**, 1003–1007
33. van der Flier, L. G., Haegbarth, A., Stange, D. E., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2009) OLFM4 is a robust marker for stem cells in human intestine and marks a subset of colorectal cancer cells. *Gastroenterology* **137**, 15–17
34. Shilov, I. V., Seymour, S. L., Patel, A. A., Loboda, A., Tang, W. H., Keating, S. P., Hunter, C. L., Nuwaysir, L. M., and Schaeffer, D. A. (2007) The Paragon Algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1638–1655
35. Schwacke, J. H., Hill, E. G., Comte-Walters, S., and Schey, K. L. (2009) iQuantitor: A tool for protein expression inference using iTRAQ. *BMC Bioinformatics* **10**, 342
36. Grant, J. E., Bradshaw, A. D., Schwacke, J. H., Baicu, C. F., Zile, M. R., and Schey, K. L. (2009) Quantification of protein expression changes in the aging left ventricle of *Rattus norvegicus*. *J. Proteome Res.* **8**, 4252–4263
37. Zeeberg, B. R., Qin, H., Narasimhan, S., Sunshine, M., Cao, H., Kane, D. W., Reimers, M., Stephens, R. M., Bryant, D., Burt, S. K., Elnekave, E., Hari, D. M., Wynn, T. A., Cunningham-Rundles, C., Stewart, D. M., Nelson, D., and Weinstein, J. N. (2005) High-Throughput GoMiner, an “industrial-strength” integrative gene ontology tool for interpretation of multiple-microarray experiments, with application to studies of Common Variable Immune Deficiency (CVID). *BMC Bioinformatics* **6**, 168
38. Ekins, S., Nikolsky, Y., Bugrim, A., Kirillov, E., and Nikolskaya, T. (2007) Pathway mapping tools for analysis of high content data. *Methods Mol. Biol.* **356**, 319–350
39. Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., and C. W. (eds.) (2009) *TNM Classification of Malignant Tumours*, 7th Ed., Wiley-Blackwell, Chichester, UK
40. Bienvu, F., Barré, B., Giraud, S., Avril, S., and Coqueret, O. (2005) Transcriptional regulation by a DNA-associated form of cyclin D1. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1850–1858
41. Courapied, S., Sellier, H., de Carné Trécesson, S., Vigneron, A., Bernard, A. C., Gamelin, E., Barré, B., and Coqueret, O. (2010) The cdk5 kinase regulates the STAT3 transcription factor to prevent DNA damage upon topoisomerase I inhibition. *J. Biol. Chem.* **285**, 26765–26778
42. Courapied, S., Cherier, J., Vigneron, A., Troadec, M. B., Giraud, S., Valo, I., Prigent, C., Gamelin, E., Coqueret, O., and Barré, B. (2010) Regulation of the Aurora-A gene following topoisomerase I inhibition: Implication of the Myc transcription factor. *Mol. Cancer* **9**, 205
43. Vigneron, A., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2008) The EGFR-STAT3 oncogenic pathway up-regulates the Eme1 endonuclease to reduce DNA damage after topoisomerase I inhibition. *Cancer Res.* **68**, 815–825
44. Greten, F. R., Eckmann, L., Greten, T. F., Park, J. M., Li, Z. W., Egan, L. J., Kagnoff, M. F., and Karin, M. (2004) IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* **118**, 285–296
45. Bollrath, J., Pheesse, T. J., von Burstin, V. A., Putoczki, T., Bennecke, M., Bateman, T., Nebelsiek, T., Lundgren-May, T., Canli, O., Schwitala, S., Matthews, V., Schmid, R. M., Kirchner, T., Arkan, M. C., Ernst, M., and Greten, F. R. (2009) gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* **15**, 91–102
46. Mathew, R., Karp, C. M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H. Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinas, C., Dipaola, R. S., Karantza-Wadsworth, V., and White, E. (2009) Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* **137**, 1062–1075
47. Barré, B., and Perkins, N. D. (2010) The Skp2 promoter integrates signaling through the NF-kappaB, p53, and Akt/GSK3beta pathways to regulate autophagy and apoptosis. *Mol. Cell* **38**, 524–538
48. de Carné Trécesson, S., Guillemin, Y., Bélanger, A., Bernard, A. C., Preisser, L., Ravon, E., Gamelin, E., Juin, P., Barré, B., and Coqueret, O. (2011) Escape from p21-mediated oncogene-induced senescence leads to cell dedifferentiation and dependency on anti-apoptotic Bcl-xL and Mcl1 proteins. *J. Biol. Chem.* **286**, 12825–12838
49. Bernards, R. (2010) It's diagnostics, stupid. *Cell* **141**, 13–17
50. Chin, L., and Gray, J. W. (2008) Translating insights from the cancer genome into clinical practice. *Nature* **452**, 553–563
51. van't Veer, L. J., and Bernards, R. (2008) Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature* **452**, 564–570
52. Sawyers, C. L. (2008) The cancer biomarker problem. *Nature* **452**, 548–552
53. Pichler, P., Köcher, T., Holzmann, J., Mazanek, M., Taus, T., Ammerer, G., and Mechtler, K. (2010) Peptide labeling with isobaric tags yields higher identification rates using iTRAQ 4-plex compared to TMT 6-plex and iTRAQ 8-plex on LTQ Orbitrap. *Anal. Chem.* **82**, 6549–6558
54. Liu, W., Lee, H. W., Liu, Y., Wang, R., and Rodgers, G. P. (2010) Olfactomedin 4 is a novel target gene of retinoic acids and 5-aza-2'-deoxycytidine involved in human myeloid leukemia cell growth, differentiation, and apoptosis. *Blood* **116**, 4938–4947
55. Chen, L., Li, H., Liu, W., Zhu, J., Zhao, X., Wright, E., Cao, L., Ding, I., and Rodgers, G. P. (2011) Olfactomedin 4 suppresses prostate cancer cell growth and metastasis via negative interaction with cathepsin D and SDF-1. *Carcinogenesis* **32**, 986–994
56. Grover, P. K., Hardingham, J. E., and Cummins, A. G. (2010) Stem cell marker olfactomedin 4: Critical appraisal of its characteristics and role in tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 761–775
57. White, E., and Lowe, S. W. (2009) Eating to exit: Autophagy-enabled senescence revealed. *Genes Dev.* **23**, 784–787
58. Thiele, C. J., Li, Z., and McKee, A. E. (2009) On Trk: The TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin. Cancer Res.* **15**, 5962–5967
59. Vanhecke, E., Adriaenssens, E., Verbeke, S., Meignan, S., Germain, E., Berteaux, N., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., and Hondermarck, H. (2011) Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 are expressed in breast cancer and can be targeted to inhibit tumor cell survival. *Clin. Cancer Res.* **17**, 1741–1752
60. Liu, W., Liu, Y., Zhu, J., Wright, E., Ding, I., and Rodgers, G. P. (2008) Reduced hGC-1 protein expression is associated with malignant progression of colon carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **14**, 1041–1049
61. Roninson, I. B. (2003) Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res.* **63**, 2705–2715

Travaux supplémentaires : Régulation alternative de l'autophagie par STAT3

Nous avons vu que le l'autophagie repose sur l'activation des gènes ATGs et de protéines intracellulaires comme LC3 et p62, toute deux capables de reconnaître et de cibler les agrégats à l'intérieur de l'autophagosome pour la dégradation. L'autophagie est un mécanisme hautement régulé dont le rôle dans le cancer reste complexe. Nous avons vu que la principale régulation de l'autophagie réside dans les événements de phosphorylation du complexe ULK1, contrôlés par la voie de mTOR. En effet, la protéine mTOR est inactivée lors d'une privation de nutriments ou lors d'un stress oncogénique induit par Ras, ce qui conduit à une déphosphorylation partielle et à l'activation du complexe ULK1, aboutissant à l'activation de l'autophagie (Kim et al, 2011a). La voie de mTOR représente le niveau de régulation majeur de l'autophagie. En revanche d'autres protéines comme la protéine kinase AMPK ou les facteurs de transcriptions NF- κ B et Foxo3 constituent d'autres niveau de régulation de l'autophagie. L'activation de la protéine kinase AMPK conduit à la fois à une inhibition de mTOR, et participe à l'activation de l'autophagie médiée par p27 (Liang et al, 2007). Le facteur de transcription foxo3a est quant à lui une cible de la voie Akt qui intervient dans l'expression de gènes ATGs tels que LC3 et Beclin1 (Mammucari et al, 2007). Récemment, foxo3 a été décrit en tant que modulateur du niveau de glutamine permettant d'inhiber mTOR et de conduire à l'activation de l'autophagie (van der Vos et al, 2012).

Un autre facteur de transcription est décrit comme régulateur de l'autophagie. Les protéines STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription) sont des facteurs de transcription cytoplasmiques qui sont transloqués dans le noyau afin d'induire la transcription des gènes. Il est acquis que ces protéines jouent un rôle important dans la tumorigenèse par l'activation anormale de la progression du cycle cellulaire, et par la dérégulation des voies de survie et de sénescence (Yu et al, 2009). En réponse à la fixation de facteurs de croissances et de cytokines sur leurs récepteurs, les kinases intracellulaires vont phosphoryler STAT3 sur son résidu tyrosine 705 (Y705), provoquant l'homo ou l'hétérodimérisation de STAT3. Ces dimères sont ensuite transloqués dans le noyau et activent les gènes de réponse. Toutefois, il est admis que la forme phosphorylée sur la tyrosine 705 n'est pas la seule forme active, et que STAT3 joue un rôle important dans l'expression des gènes en l'absence de phosphorylations, en interagissant notamment avec RelA (Yang et al, 2007). C'est par le biais de cette voie non conventionnelle de l'activation de STAT3 que l'équipe de Guido Kroemer décrit ce facteur de transcription comme un nouveau régulateur de l'autophagie (Shen et al, 2012). Cette étude montre qu'une forme cytoplasmique et non phosphorylée de STAT3 interagit avec la kinase PKR (Protein Kinase R) et inactive la voie PKR-eIF2 α . Dans des conditions de stress, la kinase PKR phosphoryle eIF2 α (eukaryotic Initiation Factor 2 α) et facilite l'activation de l'autophagie. Lorsqu'elle est phosphorylée, la protéine eIF2 α conduit indirectement à la

transcription de gènes de l'autophagie tels que ATG3, LC3 ou encore p62, cependant cette voie par laquelle eIF2 α entraîne l'induction de l'autophagie reste encore peu connu (B'chir et al, 2013). L'interaction entre STAT3 et PKR a pour conséquence de titrer ce dernier et d'inhiber la phosphorylation de eIF2 α , empêchant l'activation de l'autophagie.

Nous avons rédigé un commentaire sur cette étude qui a fait l'objet d'une publication dans la revue JAK-STAT, et dans laquelle nous suggérons que cette nouvelle fonction de STAT3 en tant que régulateur de l'autophagie pourrait notamment jouer un rôle dans la survie des cellules cancéreuses, ainsi que dans la réponse aux chimiothérapies.

STAT3 as a new autophagy regulator

Barbara Jonchère, Audrey Bélanger, Catherine Guette, Benjamin Barré, and Olivier Coqueret*
Paul Papin ICO Cancer Center; Inserm U892; CNRS 6299 and Angers University; Angers, France

Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) proteins are cytoplasmic transcription factors that translocate into the nucleus to induce transcription following growth factor or cytokine stimulation. Besides their normal functions, these proteins play an important role in cancer cells through the abnormal activation of cell cycle progression and the deregulation of survival and senescence pathways. New data obtained from the laboratory of Guido Kroemer identifies STAT3 as a new autophagy regulator. In the cytoplasm, in the absence of conventional phosphorylation on the tyrosine 705 residue, STAT3 interacts with the PKR kinase to inhibit eIF2A phosphorylation and so reduce autophagic pathways. This new and nonconventional function of STAT3 has an important role in normal cells but we suggest that it might also affect cancer cells and the response to chemotherapy treatment.

Whereas ubiquitination is well known to induce the degradation of soluble proteins, macroautophagy (also called autophagy) has recently emerged as an evolutionarily conserved process that degrades misfolded protein aggregates, damaged organelles, and abnormal mitochondria. This process relies on the activation of ATG genes and the upregulation of intracellular proteins that specifically recognize aggregates, target them to specific vesicles known as autophagosomes and allow lysosomal fusion.¹ Protein degradation can be followed by catabolic recycling and therefore autophagy can be seen as a powerful mechanism that allows cell survival in a stressful environment such as the one cancer cells encounter.

The role of autophagy in cancer is complex. It has been demonstrated that the inactivation of Beclin-1 (the human ortholog of Atg6, which induces the formation of autophagosomes) is correlated with tumor development using mouse genetic models or human tumor samples. These observations described Beclin-1 as a haploinsufficient tumor suppressor gene, suggesting that autophagy functions as a suppressive pathway.^{2,3} These results were further confirmed by Atg5 and Atg7 deletions in mice, which also led to increased tumor initiation.⁴ This is probably related to the accumulation of the p62/SQSTM1 sequestosome protein, which is normally degraded during autophagy. The failure of autophagy-deficient cells to eliminate p62 leads to DNA damage and the abnormal activation of the Nrf2 and NFκB proteins.⁵⁻⁷ The upregulation of the NFκB transcription factor probably explains why autophagy default also leads to inflammation, as a consequence of the abnormal production of cytokines and chemokines mediated by NFκB. Interestingly, p62/SQSTM1 plays an important role in ras-mediated transformation and this is also correlated with the production of cytokines that are induced during oncogenic stress and senescence escape.^{8,9} This implies that some ras-expressing tumors might depend on p62/SQSTM1, whose expression can be viewed as a consequence of the autophagy downregulation and reduced tumor suppression that occur during the initial stage of cell transformation.

Important results have also demonstrated that autophagy is necessary for oncogene-induced senescence (OIS). OIS is a tumor-suppressor mechanism that induces permanent cell cycle arrest in response to oncogenic signals.^{10,11} It relies

Keywords: STAT3, autophagy, cell death, oncogene, senescence

Submitted: 02/08/13

Revised: 03/18/13

Accepted: 03/18/13

Citation: Jonchère B, Bélanger A, Guette C, Barré B, Coqueret O. STAT3 as a new autophagy regulator. *JAK-STAT* 2013; 2:e24353; <http://dx.doi.org/10.4161/jaks.24353>

*Correspondence to: Olivier Coqueret;
Email: olivier.coqueret@univ-angers.fr

Commentary to: Shen S, Niso-Santano M, Adjemian S, Takehara T, Malik SA, Minoux H, et al. Cytoplasmic STAT3 represses autophagy by inhibiting PKR activity. *Mol Cell* 2012; 48:667-80; PMID:23084476; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.013>

on the combined activation of the p53-p21waf1 and p16-Rb pathways to induce cell cycle arrest and the transcriptional repression of proliferative genes through heterochromatin formation. Young et al. have demonstrated that OIS induction is preceded by autophagy and the activation of ATG genes.^{12,13} In response to the ras oncogene, the inactivation of these genes by RNA interference reduced senescence as a consequence of autophagy inhibition. During the successive steps that lead to protective growth arrest in response to the ras oncogene, the Akt-mTOR pathway is inactivated and this inhibits phosphorylation of the Foxo3a transcription factor and the ATG proteins, ULK1, Atg13, and Beclin-1.^{14,15} The lack of Akt/mTOR-mediated phosphorylation of Foxo3 allows its nuclear translocation and the transcriptional activation of the ATG genes such as ULK1. In parallel, the lack of Akt/mTOR-mediated phosphorylation of ULK1, Atg13, and Beclin-1 promotes Ambra/Beclin/PI3KC3 association, which is essential for autophagosome formation. These results have been confirmed by a different study showing that ras leads to the upregulation of Beclin-1 and the consequent formation of autophagosomes.¹⁶ In these different experimental conditions, growth arrest was also inhibited following Beclin-1, Atg5, and Atg7 inactivation. Altogether, these observations illustrate the role of autophagy in the context of tumor suppression if we agree that senescence is always a suppressive pathway.¹⁷

As stated above, the role of autophagy in cancer is complex and important studies have demonstrated that its upregulation is necessary for tumor cell survival. Autophagy is expected to play an important role in the condition of hypoxic growth or nutrient privation. In this context, catabolic recycling may be a powerful mechanism that allows cell growth in a difficult cancer microenvironment. In line with this hypothesis, when performed in growing cell lines expressing the ras oncogene, the inactivation of ATG genes is associated with a significant decrease in cell survival.¹⁸ These observations do not necessarily contradict the role of autophagy as a tumor suppressor in the initial stages of cell transformation. Suppressive

functions are generally characterized during acute ras signaling, in the early stage of oncogenic signaling. This is a different situation compared with established cell lines, which are growing with established ras mutations. These cells have by definition inactivated the suppressive mechanisms induced by the oncogene^{19,20} and are addicted to various survival, metabolic, and dedifferentiation pathways as we recently demonstrated in colorectal cancer cells.²¹ In these two different contexts, we can speculate that autophagy has different functions, suppressive in the early stages of cancer initiation and oncogenic in cells that have bypassed senescence and cell death protections.

In addition to many studies on ras signaling, the role of autophagy has also been characterized in other intracellular signaling pathways. Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) proteins are latent cytoplasmic transcription factors that translocate into the nucleus to induce gene transcription.²² Binding growth factors to their receptors activates intracellular kinases such as Janus or Src, which then phosphorylate STAT3 on its 705 tyrosine residue (Y705). Although it was initially believed that dimerization and Y705 phosphorylation lead to the only active form of STAT3, it is now recognized that STAT3 can exert numerous nuclear or cytoplasmic functions in the absence of this phosphorylation.^{23,24} STAT3 plays an important role in tumorigenesis and its constitutive activation has been reported in several primary cancers and many oncogene-transformed cells.^{22,25-27} Importantly, we and others have also shown that this oncogene plays an important role in the response to chemotherapy treatment.^{28,29} Many studies have described the effect of STAT3 on cell transformation, apoptosis deregulation, and angiogenesis, using *in vitro* approaches, growth in two dimensions, in spheroid³⁰ or *in vivo* mice models.³¹ As an oncogene, STAT3 is expected to deregulate suppressive pathways³² but the transcription factor's effect on autophagy largely remains to be characterized. A study by Kroemer and colleagues has recently shown that the cytoplasmic form of STAT3 plays a key role in regulating this catabolic mechanism.³³ Using

a chemical library, they have observed that many drugs known to block the conventional activation of the transcription factor induce a significant activation of autophagy. Drugs such as Stattic, JSI-124, and WP1066 induce this mechanism and the effect was confirmed using either RNA interference or knockout cells. STAT3 inhibition leads to LC3⁺ dots, p62/SQSTM1 degradation, LC3 conversion, and autophagosome formation, which are all hallmarks of the autophagic program. In contrast, STAT3 overexpression induces a downregulation of this pathway and, most importantly, this was also observed when the authors used an Y705 mutated form of the transcription factor. Further suggesting a cytoplasmic role, no effect was noticed when the transcription factor was fused to a specific sequence that induces its constitutive nuclear localization. Interestingly, the authors identified several potential autophagy regulators such as HSP90, mTOR, and PKR kinase (EIF2AK2) within the STAT3 interactome. Through co-immunoprecipitation, mutagenesis, and molecular modeling, they show that STAT3 interacts with PKR in the cytoplasm and that this interaction is mediated by specific residues within its SH2 domain. In fact, it appears that this SH2 sequence is similar to a specific domain within the eIF2A translational regulator, one of the main targets of the PKR kinase. Consequently, the authors demonstrate that the PKR-eIF2A pathway is an important inducer of autophagy and that STAT3 inactivates this pathway through its binding to PKR and the inactivation of eIF2A phosphorylation. Interestingly, other inducers of autophagy such as palm oil are also regulated by the cytoplasmic form of the transcription factor and their effect on autophagy induction correlates with the dissociation of the STAT3-PKR complex. Other reports have proposed that STAT3 can regulate this pathway and as stated above we can speculate that this transcription factor regulates the transcription of ATG genes, perhaps in association with NFκB.²³ The study by Kroemer and colleagues describes the protein's nonconventional cytoplasmic role in the regulation of autophagy, further illustrating that STAT3 has functions in

the absence of Y705 phosphorylation and does not always act as a classic transcription factor.

This new study concerns the normal functions of STAT3 and does not address the oncogene's role in autophagy regulation. This is an important issue since this protein allows cell survival through the upregulation of proteins such as Bcl-Xl, mcl1, and survivin. In addition, it has recently been suggested that the cytoplasmic form of STAT3, not phosphorylated on its Y705 residue, plays an important role in cells expressing the ras oncogene.³⁴ Considering the links between autophagy and cancer, it will be very interesting to determine the effect of the oncogenic form of STAT3 on autophagy. If we are convinced that its oncogenic form is phosphorylated on its 705 residue and dimeric, and that its main role is to activate cancer genes, then the nuclear form of STAT3 is not expected to interact with PKR. Consequently, tumor cells expressing this dimeric form should express an active PKR and show enhanced phosphorylation of eIF2- α . This would probably be the same if STAT3 interacts with NF κ B to exert its oncogenic activity. In this case, the formation of the complex is also expected to prevent the interaction with PKR since its main function would be to regulate the transcription of genes involved in cancer progression. Interestingly, it has recently been demonstrated that NF κ B plays an important role in the process of p27-mediated autophagy through the regulation of the skp2 protein.^{35,36} Whether this is related to its interaction with STAT3 and the consequent activation of PKR remains to be clarified. By allowing the cytoplasmic activation of the PKR kinase, these two oncogenic forms of STAT3 are expected to induce a normal activation of autophagy and therefore reduce the expression of p62/SQSTM1. Although this remains to be demonstrated, it can be suspected that some ATG genes are also targeted by the STAT3-NF κ B complex. If this hypothesis is correct, it will be interesting to determine if autophagy is a protective or tumor-suppressor mechanism when tumor cells express a conventional tyrosine-phosphorylated form of STAT3.

However, if we believe that the oncogenic form of STAT3 is cytoplasmic and

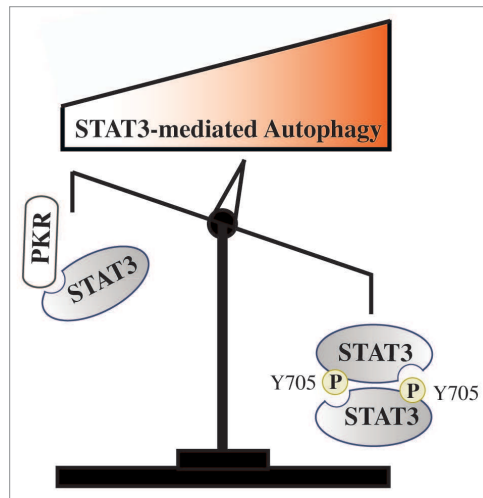


Figure 1. Schematic representation of autophagy regulation by STAT3 and proposed hypothesis. In normal conditions, latent cytoplasmic STAT3 binds to PKR, inhibits its activity, and reduces autophagy levels through eIF2A inhibition. Conventional STAT3 oncogenic activation relies on its Y705 phosphorylation, dimerization, and consequent nuclear translocation. Further experiments are therefore needed to determine if the STAT3 dimer releases the PKR kinase, which would then become available to phosphorylate eIF2A and induce macroautophagy.

not phosphorylated on its Y705 residue, as recently shown in the case of ras-expressing cells, then we can speculate that STAT3 could in this case interact with PKR to block the induction of autophagy. In ras-expressing cells, it is striking to note that the cytoplasmic form of STAT3 has been described as a regulator of mitochondrial functions.³⁴ Given the very close links between autophagy, mitochondrial functions, and apoptosis, these observations could lead to the hypothesis that the STAT3-mediated inhibition of PKR during autophagy might somehow be connected to its mitochondrial activity in ras-transformed cells. In addition, if a monomeric form of STAT3 that interacts with PKR is effectively oncogenic, we expect that the resulting reduced autophagy would lead to an enhanced expression of p62/SQSTM1. As stated above, this protein activates the NF κ B pathway and a permanent autocrine loop induced by NF κ B maintains STAT3 activation in tumor cells.³⁷ In this context, the STAT3-mediated activation of p62/SQSTM1 would provide an additional means of reactivating NF κ B and maintaining a secreted survival loop.

Given the very complex role of autophagy in cancer cells, we believe that it will be important to distinguish two cases in these further studies. During cancer initiation and senescence induction, the role of autophagy is probably not the same as in the functions in transformed cells that inactivate tumor suppressive pathways. Consequently, we also expect STAT3 phosphorylation, localization, and functions to vary during the successive stages of tumor progression. Therefore, further experiments are required to determine if STAT3 regulates autophagy to the same extent in primary cells, during senescence and in established cells that have escaped suppressive pathways (see Fig. 1 for a proposed hypothesis). The characterization of STAT3 in the different cell compartments based on its post-translational modifications and partners might be the key to understanding different STAT3 functions during the successive stages of cancer progression.

Finally, this new function of the STAT3 oncogene in autophagy might also play an important role in chemotherapy response. As stated above, we and others have shown that STAT transcription factors play an

important role in the response to treatment, either through their expected role on survival or through nonconventional functions on DNA repair or DNA damage signaling.^{29,38-40} Since autophagy can also be considered an adaptation mechanism allowing chemotherapy escape, it will be interesting to determine if autophagy inhibitors can potentiate the effects of the various drugs developed to inactivate the STAT3 pathway.⁴¹ These drugs might also be useful to prevent the survival effect of this oncogene in response to conventional genotoxic treatments. These are important issues to address, given the problem of tumor resistance in the field of oncology.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

Work in our laboratory is supported by grants from the Ligue Contre le Cancer (comité du Maine et Loire), the Rotary Club, the Cancropole Grand Ouest, the Pays de la Loire region, and the French National Research Agency (ANR).

References

- White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:401-10; PMID:22534666; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3262>
- Qu X, Yu J, Bhagar G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 2003; 112:1809-20; PMID:14638851
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:15077-82; PMID:14657337; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2436255100>
- Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* 2011; 25:795-800; PMID:21498569; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.2016211>
- Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell* 2009; 137:1001-4; PMID:19524504; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.023>
- Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, Diaz-Meco MT, et al. The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell* 2008; 13:343-54; PMID:18394557; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2008.02.001>
- Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009; 137:1062-75; PMID:19524509; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.048>
- Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 2008; 133:1019-31; PMID:18555778; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.039>
- Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Krtolica A, Beauséjour CM, Parrinello S, et al. A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS One* 2010; 5:e1888; PMID:20169192; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009188>
- Collado M, Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* 2010; 10:51-7; PMID:20029423; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2772>
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997; 88:593-602; PMID:9054499; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81902-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81902-9)
- White E, Lowe SW. Eating to exit: autophagy-enabled senescence revealed. *Genes Dev* 2009; 23:784-7; PMID:19329684; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1795309>
- Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* 2009; 23:798-803; PMID:19279323; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.519709>
- Wang RC, Wei Y, An Z, Zou Z, Xiao G, Bhagar G, et al. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science* 2012; 338:956-9; PMID:23112296; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1225967>
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011; 13:132-41; PMID:21258367; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2152>
- Elgendy M, Sheridan C, Brumatti G, Martin SJ. Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Mol Cell* 2011; 42:23-35; PMID:21353614; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.009>
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev* 2010; 24:2463-79; PMID:21078816; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1971610>
- Guo JY, Chen HY, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev* 2011; 25:460-70; PMID:2137241; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.2016311>
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646-74; PMID:21376230; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 2009; 136:823-37; PMID:19269363; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.024>
- de Carné Trécesson S, Guillemin Y, Bélanger A, Bernard AC, Preisser L, Ravon E, et al. Escape from p21-mediated oncogene-induced senescence leads to cell dedifferentiation and dependence on anti-apoptotic Bcl-xL and MCL1 proteins. *J Biol Chem* 2011; 286:12825-38; PMID:21292770; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.186437>
- Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 2002; 109:1139-42; PMID:11994401
- Yang J, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE, Stark GR. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NF-kappaB. *Genes Dev* 2007; 21:1396-408; PMID:17510282; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1553707>
- Yang J, Chatterjee-Kishore M, Staugaitis SM, Nguyen H, Schlessinger K, Levy DE, et al. Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Res* 2005; 65:939-47; PMID:15705894
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, et al. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999; 98:295-303; PMID:10458605; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81959-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81959-5)
- Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:798-809; PMID:19851315; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2734>
- Yu H, Jove R. The STATs of cancer—new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:97-105; PMID:14964307; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1275>
- Courapied S, Sellier H, de Carné Trécesson S, Vigneron A, Bernard AC, Gamelin E, et al. The cdk5 kinase regulates the STAT3 transcription factor to prevent DNA damage upon topoisomerase I inhibition. *J Biol Chem* 2010; 285:26765-78; PMID:20516069; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.092304>
- Vigneron A, Gamelin E, Coqueret O. The EGFR-STAT3 oncogenic pathway up-regulates the Emel endonuclease to reduce DNA damage after topoisomerase I inhibition. *Cancer Res* 2008; 68:815-25; PMID:18245483; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5115>
- Leslie K, Gao SP, Berishaj M, Podspanina K, Ho H, Ivashkiv L, et al. Differential interleukin-6/Stat3 signaling as a function of cellular context mediates Ras-induced transformation. *Breast Cancer Res* 2010; 12:R80; PMID:20929542; <http://dx.doi.org/10.1186/bcr2725>
- Bollrath J, Phesse TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T, et al. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* 2009; 15:91-102; PMID:19185844; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.002>
- Barré B, Vigneron A, Perkins N, Roninson IB, Gamelin E, Coqueret O. The STAT3 oncogene as a predictive marker of drug resistance. *Trends Mol Med* 2007; 13:4-11; PMID:17118707; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2006.11.001>
- Shen S, Niso-Santano M, Adjemian S, Takehara T, Malik SA, Minoux H, et al. Cytoplasmic STAT3 represses autophagy by inhibiting PKR activity. *Mol Cell* 2012; 48:667-80; PMID:23084476; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.013>
- Gough DJ, Corlett A, Schlessinger K, Wegryzn J, Larner AC, Levy DE. Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation. *Science* 2009; 324:1713-6; PMID:19556508; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1171721>
- Barré B, Coqueret O, Perkins ND. Regulation of activity and function of the p52 NF-B subunit following DNA damage. *Cell Cycle* 2010; 9:4795-804; PMID:21131783; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.9.24.14245>
- Barré B, Perkins ND. The Skp2 promoter integrates signaling through the NF-kappaB, p53, and Akt/GSK3beta pathways to regulate autophagy and apoptosis. *Mol Cell* 2010; 38:524-38; PMID:20513428; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.03.018>

37. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell* 2009; 139:693-706; PMID:19878981; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.014>
38. Courapied S, Cherier J, Vigneron A, Troadec MB, Giraud S, Valo I, et al. Regulation of the Aurora-A gene following topoisomerase I inhibition: implication of the Myc transcription factor. *Mol Cancer* 2010; 9:205; PMID:20682043; <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-9-205>
39. Barry SP, Townsend PA, Knight RA, Scarabelli TM, Latchman DS, Stephanou A. STAT3 modulates the DNA damage response pathway. *Int J Exp Pathol* 2010; 91:506-14; PMID:20804538; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2613.2010.00734.x>
40. Townsend PA, Cragg MS, Davidson SM, McCormick J, Barry S, Lawrence KM, et al. STAT-1 facilitates the ATM activated checkpoint pathway following DNA damage. *J Cell Sci* 2005; 118:1629-39; PMID:15784679; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.01728>
41. Sansone P, Bromberg J. Targeting the interleukin-6/Jak/stat pathway in human malignancies. *J Clin Oncol* 2012; 30:1005-14; PMID:22355058; <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2010.31.8907>

DISCUSSION

~

Chapitre 1

Le suppresseur de tumeur NF- κ B2 régule l'autophagie lors de la sénescence induite par l'oncogène et la chimiothérapie

I. L'autophagie est requise pour l'entrée en sénescence lors de l'OIS

Durant l'oncogenèse, certains mécanismes sont mis en place par la cellule afin de lever les phénomènes de protection et de favoriser l'activation de la prolifération. Nous l'avons vu, l'activation de l'oncogène Ras est impliquée dans l'initiation de la tumorigenèse et dans la mise en place de mécanismes de résistance aux traitements anti-tumoraux. Il a été montré que l'OIS se produit durant les stades précoces du développement de la tumeur. Les marqueurs de la sénescence tels que l'expression de la SA- β -galactosidase, p16Ink4a et les SAHFs sont fortement détectés dans les tumeurs pré-malignes (adénomes) mais pas dans les tumeurs malignes (adénocarcinomes) (Collado et al, 2005). Cette association de la sénescence avec les stades précoces de la tumorigenèse ouvre la possibilité d'utiliser les marqueurs de la sénescence à des fins pronostiques pour la réponse aux traitements.

Dans ce contexte, nous avons mis en place le concept d'index de sénescence proposé par Collado et Serrano (Collado & Serrano, 2006). Nous avons montré qu'en réponse à l'oncogène Ras, les cellules HT29 conservent un programme de sénescence avec une augmentation de l'index, indépendamment de p53 dont le domaine de liaison à l'ADN est muté et de p16Ink4a dont le locus est méthylé. En appliquant ce concept d'index à l'autophagie, nous avons vu que ce processus était également activé en réponse à l'oncogène, avec une augmentation de la transcription des gènes pro-autophagie tels que ULK1, ATG2A, Beclin 1, GABARAP et GABARAPL1. Cette induction de l'autophagie est nécessaire à l'établissement de la sénescence, puisque l'inhibition de ce processus par le 3-MA entraîne une diminution de l'expression de p21 et favorise la mort des cellules par apoptose. Il est acquis que le stress oncogénique induit par Ras induit une hausse rapide de prolifération à l'origine de l'apparition rapide de dommages de l'ADN (Benanti & Galloway, 2004). Au laboratoire, il a été montré que l'oncogène Ras induit l'apparition de dommages de l'ADN, et que la réponse aux cassures de l'ADN faisant intervenir la protéine ATR est nécessaire à l'expression de p21. L'autophagie activée en réponse à Ras va permettre d'évaluer cette quantité de dommages, et induite à un fort niveau, elle va diriger la cellule trop endommagée vers la sénescence. Toutefois, l'inhibition de l'autophagie n'entraîne pas de forte diminution du nombre de cellules sénescents, malgré la diminution significative de l'expression de p21. L'utilisation du 3-MA affecte également la prolifération des cellules puisque nous avons vu une diminution du nombre de

colonies en présence de l'inhibiteur. Il est possible que les cellules qui sont traitées au 3-MA deviennent plus sensibles et résistent moins bien au marquage de sénescence par cytométrie en flux. La limite de cette technique réside dans le fait que ce marquage s'opère sur cellules vivantes et peut affecter la viabilité des cellules. Il nous avait semblé judicieux d'utiliser un siRNA dirigé contre un gène ATG afin de conforter ces expériences. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à mettre au point l'extinction du gène. Toutefois, les données bibliographiques établissant un lien entre l'autophagie et la sénescence appuient nos résultats.

II. L'hétérodimère p52/RelA est un régulateur de l'autophagie lors de l'OIS

Lors d'une induction de Ras, nous avons constaté que l'expression de NF- κ B2 est augmentée et que ce facteur de transcription participait à l'acquisition du phénotype de sénescence. En collaboration avec le laboratoire du Pr Alain Nepveu, nous avons réalisé des expériences de CHIP-on-chip du facteur NF- κ B2. Ces résultats ont permis d'élargir le rôle de NF- κ B2 et d'identifier de nouveaux gènes cibles de ce facteur de transcription lors de la mise en place de l'OIS. Nous nous sommes dans un premier temps intéressé à une classe de gènes impliqués dans l'autophagie cellulaire, et nous avons ainsi vu que NF- κ B2 régule la transcription de gènes de l'autophagie intervenant à chaque étape du processus, de l'initiation sur la membrane à la fusion avec le lysosome. Nous avons vu que l'hétérodimère p52/RelA est recruté sur le promoteur des gènes ULK1, ATG2A, Beclin1, GABARAP et GABARAPL1 afin d'induire leur transcription et d'activer l'autophagie en réponse à Ras. De manière surprenante, nous avons observé que l'extinction de p52 par siRNA renforce l'induction de l'autophagie, tandis que la perte de RelA inhibe ce processus. Ces observations semblent indiquer que RelA est un fort activateur de l'expression des gènes ATGs tandis que p52 serait un plus faible activateur, et que la formation de l'hétérodimère permet d'ajuster l'expression de ces gènes à un niveau intermédiaire. Ainsi l'inhibition de RelA conduit à une baisse de l'autophagie par le faible pouvoir activateur que possède p52 seul par rapport à l'hétérodimère, et à l'inverse la perte de p52 résulte en une augmentation de l'autophagie par le fort pouvoir activateur de RelA. L'autophagie est un mécanisme qui est graduelle et la formation de l'hétérodimère p52/RelA permettrait donc l'induction d'un niveau optimal favorisant la mise en place de la sénescence.

La composition des dimères et les changements de complexes régissent les gènes cibles et les fonctions des facteurs NF- κ B. Nous avons observé que le facteur de transcription NF- κ B2 est phosphorylé sur la sérine 222 en réponse à Ras. Cette phosphorylation de NF- κ B2 sur la sérine 222

est associée à la formation d'hétérodimères p52/RelA et p52/c-Rel lors de dommages de l'ADN (Barré & Perkins, 2010b). Nous supposons que la phosphorylation de p52 sur la sérine 222 favorise préférentiellement la formation d'un dimère p52/RelA afin de moduler le niveau d'autophagie et d'induire la sénescence. L'utilisation d'un mutant négatif de la sérine 222 permettrait d'identifier l'implication de cette phosphorylation dans l'interaction entre p52 et RelA. D'autre part nous n'excluons pas la formation de dimère de NF- κ B autre que l'hétérodimère p52/RelA. Nous nous sommes aussi intéressé à la sous-unité c-Rel en s'appuyant sur la publication décrivant la phosphorylation. Des expériences de CHIP ont montré le recrutement de c-Rel sur le promoteur de ULK1, GABARAPL1, ATG2A et Beclin1 suite à l'expression de Ras. En revanche, nous n'avons pas déterminé si p52 et c-Rel peuvent être recrutées en même temps sur ces promoteurs.

III. L'autophagie et la sénescence sont régulées par NF- κ B2 en réponse à une chimiothérapie

Nous avons vu que le sn38, le métabolite actif de l'irinotécan utilisé dans les chimiothérapies, est montré comme ayant pour effet de bloquer la progression du cycle et d'induire la sénescence via la génération de dommages de l'ADN (Hynes & MacDonald, 2009). Nous avons observé une augmentation de l'index de sénescence suite à un traitement sn38 dans une lignée où K-Ras est muté sur le codon G12D mais où p53 est intacte. Cet index de sénescence s'accompagne d'une induction de p21 et de l'autophagie. L'absence d'autophagie dans ce modèle affecte la sénescence induite par le sn38, en favorisant la mort cellulaire par apoptose. Nous avons vu que lors des dommages de l'ADN provoqués par le sn38, NF- κ B2 est activé et intervient comme régulateur de l'expression des gènes de l'autophagie. En modulant l'activation de l'autophagie, NF- κ B2 joue un rôle dans la mise en place de la sénescence induite par le traitement génotoxique. Ce facteur de transcription apparaît alors comme un effecteur important dans la réponse des cellules tumorales à la chimiothérapie en provoquant un arrêt de la prolifération.

Les expériences d'extinction de NF- κ B2 nous ont permis d'identifier ce facteur comme un répresseur de l'expression des gènes pro-autophagie ULK1, ATG2A, ATG7, Beclin 1, GABARAP et GABARAPL1 en réponse à la chimiothérapie. Nous n'avons pas encore étudié le recrutement des autres membres NF- κ B et la composition des dimères contenant p52, cependant les résultats obtenus jusqu'à présent semblent aller dans la même direction que lors de la réponse à l'oncogène Ras. Lors de l'induction de l'oncogène Ras ainsi que lors du traitement génotoxique au sn38, NF- κ B2 participe à la réponse à l'oncogène et au traitement génotoxique en favorisant l'établissement

de la sénescence. La validation dans un premier temps de la phosphorylation de NF- κ B2 sur la sérine 222, puis de la formation d'un complexe p52/RelA permettrait de généraliser le rôle NF- κ B2 dans la régulation de l'autophagie et de montrer l'importance de ce facteur de transcription dans la mise en place d'un mécanisme suppresseur de tumeur. La validation du rôle de NF- κ B2 dans la réponse au sn38 permettrait d'associer une même fonction à différents contextes de dommages de l'ADN.

Certaines tumeurs répondent mal ou peu au traitement au sn38 et des phénomènes de résistance apparaissent. Il serait intéressant d'étudier le rôle de NF- κ B2 dans ces résistances. Nous avons vu que dans les cellules qui échappent à la sénescence induite par Ras, NF- κ B2 est reprogrammé et est impliqué dans la reprise de la prolifération par une diminution de l'index de sénescence de ces cellules. Il est alors possible que NF- κ B2 puisse subir une reprogrammation au sein des cellules qui échappent à la sénescence induite par le sn38. Par sa fonction de modulateur de l'autophagie, NF- κ B2 pourrait être responsable de la chute du niveau de sénescence de ces cellules. L'autophagie favoriserait dans ce cas une reprise de la prolifération malgré les dommages accumulés par la cellule en réponse au traitement génotoxique. Les cellules seraient alors capables de poursuivre le développement tumoral malgré la chimiothérapie. L'expression de NF- κ B2 pourrait alors être associée aux phénomènes de résistances au traitement et constituer un sujet d'étude important dans l'amélioration de l'efficacité des traitements.

Chapitre 2

La reprogrammation de NF- κ B2 favorise l'échappement à l'OIS

I. NF- κ B2 induit un défaut d'autophagie lors de l'échappement

La sénescence est un mécanisme protecteur de l'intégrité génétique qui n'est pas infaillible et nous avons pu constater que certains clones échappent à la sénescence induite par l'oncogène Ras. Nous avons déjà montré que ces clones qui expriment toujours l'oncogène perdent l'induction de p21, conduisant à la restauration de l'expression de CDC254 et de PLK1, et aboutissant à une reprise de la prolifération et à l'échappement à l'OIS (De Carne Trecesson et al, 2011). En étudiant plus précisément ces clones, nous avons vu que l'index de sénescence était plus faible comparé à une induction courte de Ras, et corrélé à une diminution de l'index d'autophagie. L'autophagie est un mécanisme graduel et réversible, qui à un faible niveau confère une tolérance environnementale à la cellule en lui permettant de survivre malgré quelques dommages, tandis qu'un fort niveau d'autophagie aboutit à la mise en place de mécanismes suppresseurs de tumeur. Ainsi, le fait que ces clones arrivent à échapper à la sénescence induite par Ras, malgré la présence de forts dommages de l'ADN observés par la phosphorylation importante de l'histone H2ax, pourrait s'expliquer par ce défaut du niveau d'autophagie. L'autophagie est induite de manière assez importante de façon à accroître la tolérance environnementale et à prévenir un arrêt du cycle. L'autophagie peut favoriser la croissance tumorale en recyclant les substrats pour le métabolisme et en favorisant un maintien d'un pool de mitochondries fonctionnelles (White, 2012). En intervenant dans le contrôle du niveau de ROS produits par les mitochondries, nous suggérons que l'autophagie favorise la survie des clones ayant échappés à l'OIS. De manière surprenante, NF- κ B2 est toujours activé dans ces clones et semble nécessaire à un maintien d'un faible index de sénescence. Nous avons vu que NF- κ B2 régule également la transcription des gènes de l'autophagie ULK1, ATG2A, Beclin1, GABARAP et GABARAPL1 dans les clones échappés. Toutefois, le membre RelA n'est plus recruté sur le promoteur de ces gènes, suggérant un changement de complexe et donc un changement de fonction pour NF- κ B2. Des résultats que nous avons obtenu récemment suggèrent que la perte de NF- κ B2 dans ces clones favorise l'augmentation de la mort par apoptose avec une augmentation de l'expression de la caspase 3 clivée. NF- κ B2 intervient donc dans l'induction d'un niveau d'autophagie tel que les fonctions de recyclage intracellulaire, d'intégrité mitochondriale et de survie sont renforcées, permettant la prolifération des clones malgré la persistance de dommages de l'ADN.

II. La perte de la phosphorylation sur la sérine 222 intervient-elle dans l'échappement ?

Ce modèle d'échappement nous a permis de mettre en évidence une reprogrammation de NF- κ B2 durant le stress oncogénique à l'origine de l'échappement. Lors de l'expression de Ras, NF- κ B2 est phosphorylé sur la sérine 222 et le complexe p52/RelA régule l'expression des gènes d'autophagie. Lors de l'échappement, nous avons vu que cette phosphorylation est perdue concordant avec la perte de la formation de l'hétérodimère p52/RelA et de l'hétérodimère p52/cRel. Ces résultats supposent que la perte de la phosphorylation de NF- κ B2 sur la sérine 222 pourrait être responsable d'un changement de complexe. Nous suggérons que cette absence de phosphorylation sur la sérine 222 favorise la formation d'un homodimère p52, dont le pouvoir transcriptionnel serait plus faible que l'hétérodimère p52/RelA et potentiellement l'hétérodimère p52/c-Rel. Ainsi la reprogrammation de NF- κ B2 provoquerait un défaut d'autophagie de manière à favoriser l'échappement à l'OIS. Nous avons établi une série de gènes cibles de NF- κ B2 lors du stress oncogénique, constituant de potentiels marqueurs de la dérégulation de la sénescence. Nous voudrions maintenant identifier parmi ces gènes ceux qui sont spécifiques du facteur NF- κ B2 phosphorylé sur la sérine 222 afin de préciser le rôle de cette modification. Nous pouvons supposer que la transfection d'un mutant S222A déficient lors du stress oncogénique puisse favoriser l'apparition précoce d'un défaut d'autophagie, permettant un échappement à l'OIS beaucoup plus rapide. A l'inverse, la transfection d'un mutant S222D mimant la phosphorylation pourrait permettre aux cellules échappées de restaurer un fort index d'autophagie et de sénescence, et de contrer l'échappement en induisant la mort cellulaire.

Il est décrit que lorsque NF- κ B2 est phosphorylé sur la sérine 222, les hétérodimères p52/c-rel et p52/RelA vont venir spécifiquement réprimer l'expression de Skp2, et empêcher la dégradation de p21 et de p27. Dans ce cas précis, NF- κ B2 phosphorylé sur la sérine 222 a un rôle d'inducteur de l'autophagie médiée par p27/Skp2 (Barré & Perkins, 2010a). Nous avons vu que la participation de NF- κ B2 à la mise en place de l'OIS se fait par l'inhibition de Skp2. Par des expériences de CHIP, nous avons montré que suite à l'expression de Ras, NF- κ B2, RelA et C-Rel semblent inhiber la transcription de Skp2. En revanche dans les clones échappés, NF- κ B2 seul semble favoriser l'expression de Skp2. Ces données renforcent l'hypothèse de l'implication de la perte de la phosphorylation de NF- κ B2 sur la sérine 222 dans l'échappement à l'OIS. En absence de régulation de p21 par p53, cette inhibition de Skp2 va empêcher la dégradation de p21 qui va conduire à la mise en place du phénotype de sénescence. p21 n'est pas connu pour affecter le

processus d'autophagie mais en revanche, un second inhibiteur du cycle et cible de Skp2 est connu pour avoir un impact sur l'autophagie : p27. Nous n'avons pas été capable de détecter techniquement l'expression de p27 dans notre modèle, cependant au vu de la perte de l'expression de Skp2 que nous avons observé, nous pouvons supposer que la dégradation de p27 par Skp2 soit bloquée et que cela permette l'induction de l'autophagie. Ces données permettrait d'identifier deux voies par lesquelles NF- κ B2 régule l'autophagie, à la fois par la régulation transcriptionnelle des gènes pro-autophagie et par la régulation de la voie médiée par p27-Skp2.

Une étude a montré que les souris n'exprimant pas Skp2 sont viables, et ce malgré la conséquente augmentation du niveau d'expression de p21 et de p27 (Lin et al, 2010). La régulation négative de Skp2 dans les cellules cancéreuses sur-exprimant Ras augmente la sensibilité des cellules à la sénescence. En accord avec ces données, nous avons vu que l'inhibition de Skp2 dans les clones échappés favorise l'augmentation de l'expression de p21 et p27. De la même façon, la restauration de l'expression de Skp2 lors de l'établissement de la sénescence pourrait permettre un échappement à l'OIS plus rapide des cellules. Nous suggérons que la restauration de l'expression de Skp2 par NF- κ B2 favorise l'apparition d'un défaut d'autophagie nécessaire à l'échappement tumoral. Il serait intéressant de définir l'index de sénescence dans les clones échappés n'exprimant plus Skp2, afin de déterminer si l'inhibition de Skp2 suffit à restaurer un fort index d'autophagie et de sénescence et ainsi de favoriser la mort des cellules tumorales.

Dans notre modèle, nous avons observé que l'hétérodimère p52/RelA et potentiellement p52/c-Rel sont présents sur le promoteur de ULK1, GABARAPL1, ATG2A, Beclin1, GABARAP et de Skp2 lors de la sénescence mais ne sont pas retrouvés sur le promoteur de ces mêmes gènes lors de l'échappement. Ces résultats suggèrent la formation d'un hétérodimère p52/c-Rel et p52/RelA, tout deux activateurs de l'autophagie via la régulation des gènes pro-autophagie, et répresseurs de la transcription du gène anti-autophagie Skp2. Lors de l'échappement, la perte de la phosphorylation de NF- κ B2 sur la sérine 222 pourrait être à l'origine d'un changement de complexe, avec la formation d'un homodimère p52, cette fois-ci répresseur de la transcription du gène pro-autophagie ULK1 et activateur de la transcription du gène anti-autophagie Skp2. Pour valider ces hypothèses, il serait intéressant de réaliser des expériences de CHIP avec l'utilisation des mutants de NF- κ B2 afin d'identifier les partenaires de NF- κ B2 phosphorylé, en n'excluant pas les autres membres de la famille NF- κ B. Des expériences de re-CHIP seront également utiles afin de déterminer les complexes spécifiques responsables de la régulation de l'autophagie.

III. Existe-t-il d'autres kinases capables de phosphoryler NF- κ B2 sur son résidu 222 en réponse aux dommages de l'ADN ?

Nous avons montré que NF- κ B2 est reprogrammé probablement par la perte de la phosphorylation sur la sérine 222, mais nous ne savons pas l'origine de l'activation de NF- κ B2 lors du stress oncogénique et lors de l'échappement. Nous avons vu que la kinase p38 était capable de phosphoryler NF- κ B2 sur la sérine 222 lors de l'expression de Ras. Cependant, p38 n'est probablement pas la seule kinase pouvant phosphoryler NF- κ B2 dans notre modèle. Cdk5 et GSK3 β sont notamment d'autres kinases potentielles que nous proposons d'étudier. Il est possible que la perte de la phosphorylation soit associée à l'inactivation des kinases lors de l'échappement. Par exemple, il est possible que WIP1 qui est décrit comme étant un régulateur négatif de p38 et de RelA, soit exprimé lors de l'échappement pour déphosphoryler p38 et permettre la reprogrammation de NF- κ B2 via la perte de la phosphorylation sur la sérine 222 (Mutsuhiro Takekawa, 2000; Chew et al, 2009). L'hypothèse de compétition entre différentes voies de signalisation est envisageable. La phosphorylation sur la sérine 222 est décrite comme une conséquence de l'activation de la kinase GSK3 β lorsque Akt est inactive dans un contexte de dommages de l'ADN (Barré & Perkins, 2010a). La voie Akt/IKK pourrait dans ce cas être responsable de l'activation de NF- κ B2 lors de l'échappement tumoral. Nous avons en effet observé une augmentation de la phosphorylation d'Akt sur la thréonine 308 dans les clones échappés. En considérant l'inactivation de p38, l'inhibition de GSK3 β par Akt pourrait être nécessaire à la reprogrammation de NF- κ B2 et à l'échappement.

Lors de ces travaux, nous avons analysé en collaboration avec le Dr Catherine Guette le protéome des cellules HT29Ras sur-exprimant ou non Ras par spectrométrie de masse. De cette manière, nous avons pu identifier les protéines dont l'expression varie en réponse à Ras. Parmi les protéines identifiées, nous nous sommes intéressés à DNA-PK pour son rôle dans la réparation de l'ADN. Des rôles opposés de DNA-PK dans la régulation de NF- κ B ont été décrits. Il est montré que DNA-PK est capable de phosphoryler les inhibiteurs de NF- κ B I κ B α et I κ B β , permettant l'activation des sous-unités de NF- κ B suite à des rayonnements ionisants (Basu et al, 1998). Cependant, DNA-PK est aussi capable de réguler négativement I κ B α . La phosphorylation de I κ B α sur la sérine 36 et la thréonine 273 renforcent la fonction d'inhibiteur de I κ B α . Ces phosphorylations favorisent son accumulation via un blocage de la phosphorylation de I κ B α par IKK α et IKK β , et augmentent ainsi l'association entre I κ B α et NF- κ B (Liu et al, 1998). Toutefois, une étude plus récente décrit un autre niveau de régulation de NF- κ B par DNA-PK, où cette fois-ci

la kinase interagit directement avec NF- κ B. DNA-PK est capable de phosphoryler p50 sur la sérine 20, ce qui a pour conséquence d'augmenter l'affinité de p50 sur les sites κ B et de favoriser la formation d'homodimères p50/p50 et d'hétérodimères p50/p65 (Ju et al, 2010). Aucune étude n'a montré de lien directe en DNA-PK et NF- κ B2. Par une étude bio-informatique (GPS 2.1), nous avons vu que DNA-PK serait capable de phosphoryler NF- κ B2 sur la sérine 222. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse en réponse à l'expression de Ras.

IV. D'autres sites de phosphorylation de NF- κ B2 pourraient-ils intervenir lors de l'échappement à l'OIS?

Nous avons focalisé notre étude sur la phosphorylation sur le résidu sérine 222 mais il est cependant probable que ce ne soit pas l'unique site qui puisse être phosphorylé lors de l'OIS. La phosphorylation sur la sérine 222 pourrait être perdue lors de l'échappement en faveur d'une autre phosphorylation. L'identification d'autres phosphorylations de NF- κ B2 par spectrométrie de masse pourrait permettre de mieux caractériser le rôle de NF- κ B2 lors de l'échappement. Une analyse globale des protéomes et des phosphoprotéomes par spectrométrie a mis en évidence plusieurs sites de phosphorylations de NF- κ B2 incluant la sérine 222 (Olsen et al, 2010; Noah Dephore, 2008). Mis à part les phosphorylations qui se produisent sur p100, la sérine 222 est la seule phosphorylation décrite sur p52. La détection de différentes phosphorylations de NF- κ B2 pourrait constituer des données importantes dans la compréhension des autres fonctions de NF- κ B2 dans la tumorigenèse.

V. Autres gènes cibles potentiels de NF- κ B2

L'autophagie joue un rôle important dans l'OIS mais il serait intéressant d'étudier d'autres processus cellulaires qui peuvent être impliqués dans la tumorigenèse. Les gènes cibles identifiés par le ChIP-on-chip peuvent être classés en différentes catégories suivant leur implication dans les processus métaboliques (EMT), la réponse immune, le cycle cellulaire (cycline D, Myc), la structure cellulaire, la mort cellulaire et la survie (Mus81, ERCC1, Bcl2, BclxL). De manière intéressante, un résultat préliminaire nous a permis d'observer la présence de NF- κ B2 sur le promoteur de Bcl2 suite à l'expression de Ras. Nous avons également détecté son expression uniquement lors de l'échappement. La famille Bcl2 joue un double rôle dans la régulation de l'autophagie. Les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl2 et BclXL sont capable d'inhiber l'autophagie, tandis que les

protéines pro-apoptotiques Bad et BNIP3 sont des inducteurs de l'autophagie. Notamment, la liaison de Bcl2 à Beclin1 prévient l'association entre Beclin1 et hVps34, diminuant l'activation de la PI3K de classe III et résultant en l'inhibition de l'autophagie (He & Levine, 2010). Ainsi, nous pouvons supposer que l'expression de Bcl-2 est restaurée dans les cellules échappées de manière à participer au défaut d'autophagie. L'utilisation d'inhibiteurs de Bcl2 comme l'ABT737 pourrait être utile pour démontrer le rôle de Bcl2 dans la régulation de l'autophagie lors de la sénescence dans notre modèle.

Il est décrit que les cellules tumorales présentant un défaut d'autophagie montrent également une accumulation de p62 lors d'un stress. Cette accumulation de p62 est la conséquence de l'incapacité des cellules à dégrader cette protéine, ce qui est suffisant pour initier la tumorigenèse (Mathew et al, 2009). Nos résultats préliminaires montrent une augmentation de l'expression de p62 dans les cellules échappées, suggérant la stabilisation de la protéine et l'incapacité à éliminer celle-ci lors de l'échappement tumoral. Une étude a montré le rôle de l'interaction entre p62 et TRAF6 dans l'activation de NF- κ B (Sanz et al, 2000). De manière intéressante, les cellules qui ne sont pas capable d'éliminer p62 présentent une activation de NF- κ B via la signalisation de TRAF6, favorisant la survie des cellules (White, 2012). A l'inverse, l'activation de NF- κ B est également à l'origine de l'expression de p62 comme cela a été observé après une stimulation à l'IL-1 α chez des souris portant la mutation G12D de Kras (Ling et al, 2012). Ces études suggèrent l'existence d'une boucle de régulation dans laquelle NF- κ B induit l'expression de p62, qui en retour entraîne l'activation de NF- κ B. Dans notre modèle, nous pouvons envisager que NF- κ B2 puisse interagir avec p62 dans les clones échappés, suggérant un rôle d'un complexe NF- κ B2-p62 lors de l'échappement. Il est possible que les clones échappés n'arrivent pas à éliminer p62 ce qui favoriserait son interaction avec NF- κ B2 pour induire un défaut d'autophagie. Il est également envisageable que le fait que NF- κ B2 interagisse avec p62 soit à l'origine de l'incapacité des cellules à éliminer p62. Nous pouvons imaginer que lors de l'échappement p62 induit l'activation de NF- κ B2, et que leur interaction favorise l'accumulation de p62 et entraîne ainsi un défaut d'autophagie et l'échappement à la sénescence.

Chapitre 3

Le marqueur des tumeurs colorectales non-métastatique, l'OLFM4, est régulé par la voie Ras–NF- κ B2

Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus diagnostiqué chaque année chez l'homme et le deuxième chez la femme, avec plus d'un million de nouveaux cas par an. Le diagnostic et le pronostic de ce cancer basés sur la classification TNM (Tumor-Node-Metastasis) et l'analyse clinique révèlent que le taux de survie à 5 ans ou plus est observé chez plus de 90% des patients diagnostiqués pour un stade précoce (stade I), tandis que ce taux chute à 10% pour un stade avancé (métastases à distances correspondant au stade IV). Ces données parlent d'elles-mêmes et soulignent l'importance de diagnostiquer de manière précoce le cancer afin d'augmenter les chances de complètes rémissions.

Au cours de cette étude en collaboration avec l'équipe du Dr Catherine Guette, nous avons identifié l'OLFM4 comme un marqueur sur-exprimé spécifiquement dans les tumeurs de stade I et II, tandis qu'aucune différence n'est observée entre les tissus normaux et les tissus invasifs des tumeurs de stade III et IV. Nous avons expliqué cette activation dans les stades précoces par l'expression de l'oncogène Ras. L'OLFM4 se retrouve fortement exprimée lorsque cet oncogène est muté, la mutation de Ras faisant partie des premières altérations intervenant dans la carcinogénèse après la perte du gène APC (Vogelstein et al, 1989). Nous avons montré que le facteur de transcription NF- κ B2 régule l'expression de l'OLFM4 dans ce contexte où Ras est muté.

I. L'olfactomedin 4 comme marqueur des cellules souches cancéreuses ?

Nous avons vu que le marquage nucléaire de l'OLFM4 était modéré dans les cryptes intestinales normales, alors qu'on observe un marquage à la fois nucléaire et cytoplasmique plus intense dans les cryptes des tumeurs de stades I et II.

L'épithélium intestinal se compose de cellules dotées d'une prolifération rapide et perpétuelle de manière à être constamment renouvelées. Ainsi, les cellules souches localisées dans le fond des cryptes se renouvellent et donnent naissance à une population de cellules qui migre vers la lumière intestinale le long de la crypte. Ces cellules sont en constante prolifération et une fois le sommet de la crypte atteint, elles se différencient en cellules épithéliales de la paroi intestinale (Radtke & Clevers, 2005). Les cellules du fond des cryptes sont maintenues à l'état de cellules souches par la voie Wnt. Cette voie intervient dans la stabilisation et dans la translocation de la β -

caténine afin d'activer la transcription. Le suppresseur de tumeur APC est un régulateur négatif de la voie Wnt et conduit à la dégradation de la β -caténine via le protéasome. La perte de APC conduit à la stabilisation de la β -caténine dans le noyau et à l'activation des gènes cibles de la voie Wnt notamment impliqués dans la prolifération et la survie comme c-Myc et la cycline D, et également dans la migration et l'adhésion comme Oct4, Snail et l'E-cadhérine, aboutissant à la formation d'une tumeur (Moon et al, 2004). Une autre cible connue de la voie de Wnt est le récepteur Lgr5. Ce récepteur est uniquement exprimé dans les cellules situées au fond des cryptes et est ainsi reconnu comme marqueur des cellules souches du colon (Barker et al, 2007).

L'OLFM4 a justement été montrée comme étant exprimée en association avec Lgr5 au sein des cellules souches colorectales (van der Flier et al, 2009). Dans cette étude, l'OLFM4 est également plus fortement exprimée dans les cellules tumorales comparé aux cellules des cryptes normales. Ces données cumulées avec le fait que nous avons vu une augmentation de l'expression de l'OLFM4 au fond des cryptes des stades I et II, confirment que l'OLFM4 est exprimée dans les stades précoces de la maladie et soulèvent un important rôle de cette protéine dans la tumorigenèse.

II. L'OLFM4 est sur-exprimée en réponse à la voie Ras-NF- κ B2

Nous avons montré que l'expression de l'OLFM4 est fortement augmentée dans les tumeurs Ras mutées et que son expression est régulée par la voie Ras-NF- κ B2. Etant donné le fait que la mutation de Ras soit une altération précoce de la carcinogenèse, il est possible que la voie Ras-NF- κ B2 favorise l'expression précoce de l'OLFM4 afin d'initier la prolifération excessive des cellules du fond des cryptes, à l'origine de la formation tumorale. La détection de l'expression de l'OLFM4 dans des tumeurs à la fois Ras mutées et NF- κ B2 positives pourrait être intéressant. Nous n'avons toutefois pas effectué d'immunomarquage de NF- κ B2. L'activation de NF- κ B2 se traduisant par le clivage de la forme p100 en la forme p52, il nous faudrait détecter uniquement la forme clivée pour un marquage plus lisible. Toutefois, la forme p100 étant majoritairement cytoplasmique et la forme p52 majoritairement nucléaire, la distinction entre les deux formes reste possible.

Une récente étude a mis en évidence une régulation de la prolifération des cellules souches intestinales exprimant l'OLFM4 par NF- κ B lors de la perte de APC (Myant et al, 2013). En effet, la GTPase RAC1 favorise la prolifération des cellules qui expriment l'OLFM4 et Lgr5 lorsque APC est perdu. RAC1 est notamment associée à la tumorigenèse de l'épiderme médiée par Ras chez la

souris (Samuel et al, 2011). Plus précisément, son activation par la perte de APC conduit à la production de ROS et à l'activation de la signalisation de NF- κ B, qui sont tous deux nécessaires à la prolifération des cellules exprimant l'OLFM4 et Lgr5. Ainsi, la voie Ras-NF- κ B2 pourrait emprunter ce mécanisme pour réguler l'expression de l'OLFM4. La prolifération des cellules souches intestinales médiée par la voie de Wnt serait alors favorisée et conduirait à l'initiation du développement du cancer colorectal.

III. L'inactivation de l'OLFM4, point de départ des métastases ?

Nous avons vu que l'expression de l'OLFM4 était significativement diminuée dans les tumeurs de stade III et IV. Nous pouvons ainsi supposer que l'inactivation de l'OLFM4 est nécessaire à la progression tumorale et à la formation de métastases caractéristiques des stades tardifs de la carcinogenèse. De nombreux rôles pourraient alors lui être affectés comme la régulation de la prolifération et de la mort cellulaire. Dans ce cas, l'inactivation de l'OLFM4 préviendrait les cellules des stades invasifs de l'apoptose et permettrait leur prolifération malgré l'instabilité génomique accumulée. D'autre part, la formation des métastases vient du fait qu'une cellule acquiert des propriétés d'invasion qui lui permettent de coloniser un autre foyer. Les phénomènes d'EMT et de MET permettent d'expliquer ces faits. L'EMT permet à une cellule épithéliale de se détacher d'un groupe de cellules par la perte des jonctions communicantes et des molécules adhérentes. La cellule ainsi mésenchymateuse acquiert la capacité de survivre seule, et peut migrer vers d'autres organes via le flux sanguin. C'est alors que la cellule peut subir une MET afin de retrouver des propriétés d'adhésion et un phénotype de cellules épithéliales, lui permettant d'envahir ce nouveau site. Nous pouvons envisager que l'OLFM4 ait un rôle de régulateur de l'EMT. Il n'est pas décrit de rôles spécifiques de l'OLFM4 dans le processus d'EMT, en revanche ce n'est pas le cas pour un autre membre de la famille, l'OLFM1. Ce dernier est impliqué dans le processus d'EMT en régulant les propriétés d'invasion des cellules et en augmentant le pool de cellules mésenchymateuses (Lencinas et al, 2013). L'expression de l'OLFM4 pourrait alors affecter la mise en place du processus d'EMT lors de la mutation de Ras, et la perte de l'OLFM4 serait un événement déclencheur qui favoriserait l'apparition de cellules mésenchymateuses et l'acquisition de propriétés invasives. L'inactivation de l'OLFM4 serait alors un marqueur de mauvais pronostic.

IV. Détection de l'OLFM4 à des fins thérapeutiques

Nous pouvons alors imaginer que la détection de la voie Ras–NF- κ B2–OLFM4 pourrait être spécifique des tumeurs non-métastatiques et constituerait un facteur de bon pronostic.

L'activation de cette voie au fond des cryptes permettrait la prolifération et l'expansion de cellules souches exprimant l'OLFM4 jusqu'à la lumière intestinale, initiant la tumorigenèse. D'autre part, nous avons montré que l'OLFM4 est une protéine glycosylée qui est sécrétée. Ainsi, cette sécrétion de l'OLFM4 pourrait tout à fait être responsable de la propagation du signal en agissant de manière paracrine avec les cellules voisines. L'OLFM4 serait alors capable d'induire une signalisation intracellulaire via sa fixation sur un récepteur membranaire, et favoriser l'émergence d'un phénotype de cellules souches.

D'autre part, le fait que l'OLFM4 soit une protéine sécrétée permettrait de facilement détecter son expression directement chez les patients. En effet, l'expression de l'OLFM4 constitue un marqueur des tumeurs de stade I et II. La détection de son expression pourrait donc être associée à une activation de la voie Ras–NF- κ B2–OLFM4 et à un développement de tumeurs de stade précoce. La voie Ras–NF- κ B2–OLFM4 serait alors un signe de résistance aux traitements thérapeutiques. La détection de l'activation de cette voie permettrait une adaptation du traitement pour une meilleure efficacité. Dans le but d'identifier l'agressivité de la tumeur, la détection de l'OLFM4 pourrait se faire chez les patients par un dosage ELISA de l'OLFM4 directement dans le plasma. L'analyse des plasmas de patients se fait en routine et permet une réponse plus rapide et moins contraignante pour le patient qu'un marquage immunohistochimique de la tumeur. Ainsi, la détection de l'OLFM4 chez les patients permettrait de suivre l'évolution des tumeurs de stade précoce et d'adopter une intensification thérapeutique. En effet, les patients ayant une mutation de Ras présentent des signes de résistance aux traitements. La détection de l'expression de l'OLFM4 couplée à la détection de la mutation de Ras, permettrait alors de déterminer de manière rapide le degré de réponse aux thérapies conventionnelles, afin de réagir le plus rapidement possible et d'adapter au mieux le traitement à chaque patient.

CONCLUSION GÉNÉRALE

~

L'ensemble de ces travaux soulignent l'importance de la voie Ras/NF- κ B2 dans la tumorigenèse et dans la résistance aux traitements.

Nous avons montré que le facteur de transcription NF- κ B2 est déterminant dans la réponse à Ras, et qu'il est également impliqué dans la voie de réponse à une chimiothérapie. De plus, NF- κ B2 se trouve être un régulateur de l'expression de l'OLFM4 dans les tumeurs précoces, et ce phénomène est dépendant de la mutation de Ras.

Il serait intéressant par la suite de pouvoir généraliser un rôle de NF- κ B2 et de la phosphorylation sur la sérine 222 dans la régulation de l'autophagie. Une meilleure compréhension de la régulation de cette voie et de l'expression de l'OLFM4 pourrait être un outil important dans la détection toujours plus précoce des tumeurs, et permettrait d'adapter les traitements en fonction du terrain génétique de chaque patient. La détection de la phosphorylation de NF- κ B2 ou de l'expression de l'OLFM4 pourrait définir la prédisposition des patients mutés sur Ras à ne pas répondre ou à développer une toxicité face aux chimiothérapies (figure 69).

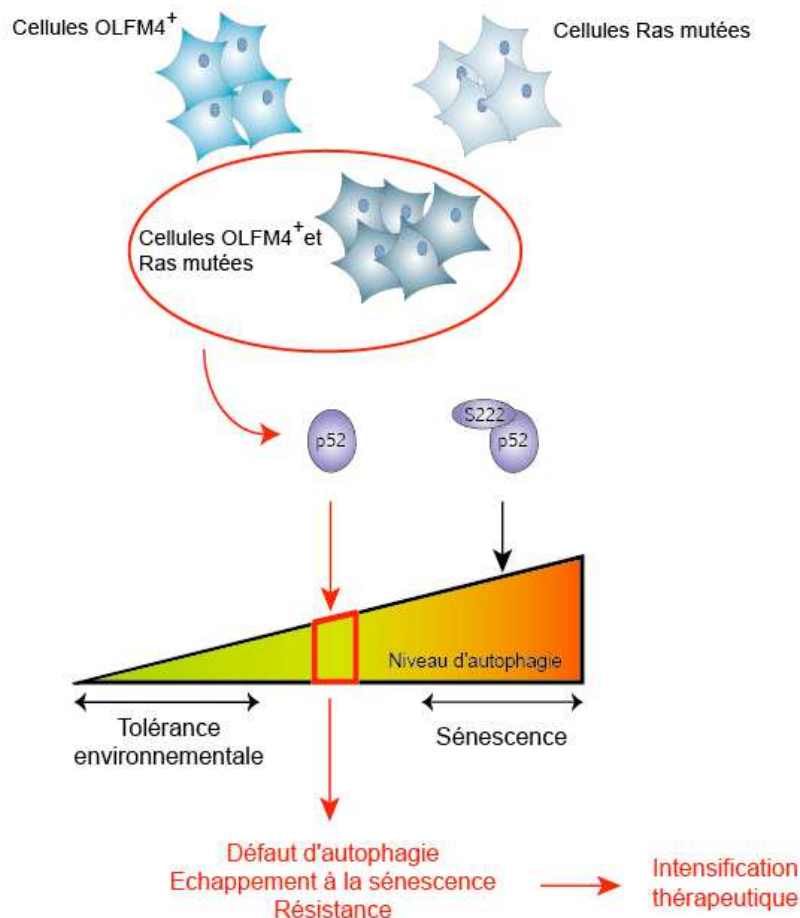


Figure 69 | La reprogrammation de NF- κ B2 comme motif d'agressivité tumoral

BIBLIOGRAPHIE

~

- Abbas T & Dutta A (2009) p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Publishing Group* **9**: 400–414
- Acosta JC & Gil J (2009) A role for CXCR2 in senescence, but what about in cancer? *Cancer Research* **69**: 2167–2170
- Acosta JC, O'Loughlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, Fumagalli M, Da Costa M, Brown C, Popov N, Takatsu Y, Melamed J, d'Adda di Fagagna F, Bernard D, Hernando E & Gil J (2008) Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* **133**: 1006–1018
- Alers S, Löffler AS, Wesselborg S & Stork B (2012) Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Molecular and Cellular Biology* **32**: 2–11
- Amir RE, Haecker H, Karin M & Ciechanover A (2004) Mechanism of processing of the NF-kappa B2 p100 precursor: identification of the specific polyubiquitin chain-anchoring lysine residue and analysis of the role of NEDD8-modification on the SCF(beta-TrCP) ubiquitin ligase. *Oncogene* **23**: 2540–2547
- Anrather J, Racchumi G & Iadecola C (2005) cis-acting, element-specific transcriptional activity of differentially phosphorylated nuclear factor-kappa B. *J. Biol. Chem.* **280**: 244–252
- Aranha MM, Borralho PM, Ravasco P, Moreira da Silva IB, Correia L, Fernandes A, Camilo ME & Rodrigues CMP (2007) NF-kappaB and apoptosis in colorectal tumorigenesis. *Eur. J. Clin. Invest.* **37**: 416–424
- Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, Thomas D, Hay RT, Virelizier JL & Dargemont C (1997) Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *Journal of Cell Science* **110 (Pt 3)**: 369–378
- Arico S, Petiot A, Bauvy C, Dubbelhuis PF, Meijer AJ, Codogno P & Ogier-Denis E (2001) The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J. Biol. Chem.* **276**: 35243–35246
- Arsura M & Cavin LG (2005) Nuclear factor-kappaB and liver carcinogenesis. *Cancer Letters* **229**: 157–169
- Atkinson PGP, Coope HJ, Rowe M & Ley SC (2003) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus stimulates processing of NF-kappa B2 p100 to p52. *J. Biol. Chem.* **278**: 51134–51142
- Attar RM, Caamano J, Carrasco D, Iotsova V, Ishikawa H, Ryseck RP, Weih F & Bravo R (1997) Genetic approaches to study Rel/NF-kappa B/I kappa B function in mice. *Semin. Cancer Biol.* **8**: 93–101
- Augert A, Payré C, de Launoit Y, Gil J, Lambeau G & Bernard D (2009) The M-type receptor PLA2R regulates senescence through the p53 pathway. *EMBO Rep* **10**: 271–277
- Azad MB, Chen Y, Henson ES, Cizeau J, McMillan-Ward E, Israels SJ & Gibson SB (2008) Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3. *autophagy* **4**: 195–204
- B'chir W, Maurin A-C, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fafournoux P & Bruhat A (2013) The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Research* **41**: 7683–7699
- Baeuerle PA & Baltimore D (1989) A 65-kappaD subunit of active NF-kappaB is required for inhibition of NF-kappaB by I kappaB. *Genes & Development* **3**: 1689–1698
- Barker N & Clevers H (2010) Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells. *Gastroenterology* **138**: 1681–1696
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ & Clevers H (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**: 1003–1007

- Barré B & Perkins ND (2007) A cell cycle regulatory network controlling NF-kappaB subunit activity and function. *EMBO J* **26**: 4841–4855
- Barré B & Perkins ND (2010a) The Skp2 promoter integrates signaling through the NF-kappaB, p53, and Akt/GSK3beta pathways to regulate autophagy and apoptosis. *Molecular Cell* **38**: 524–538
- Barré B & Perkins ND (2010b) Phosphorylation of the p52 NF- κ B subunit. *Cell Cycle* **9**: 4774–4775
- Barré B, Coqueret O & Perkins ND (2010) Regulation of activity and function of the p52 NF- κ B subunit following DNA damage. *Cell Cycle* **9**: 4795–4804
- Barré B, Vigneron A & Coqueret O (2005) The STAT3 transcription factor is a target for the Myc and riboblastoma proteins on the Cdc25A promoter. *J. Biol. Chem.* **280**: 15673–15681
- Bartek J & Lukas J (2003) Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* **3**: 421–429
- Basak S, Shih VF-S & Hoffmann A (2008) Generation and activation of multiple dimeric transcription factors within the NF-kappaB signaling system. *Molecular and Cellular Biology* **28**: 3139–3150
- Basu S, Rosenzweig KR, Youmell M & Price BD (1998) The DNA-dependent protein kinase participates in the activation of NF kappa B following DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**: 79–83
- Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S & Baltimore D (1995) Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. *Nature* **376**: 167–170
- Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouysségur J & Mazure NM (2009) Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Molecular and Cellular Biology* **29**: 2570–2581
- Benanti JA & Galloway DA (2004) The normal response to RAS: senescence or transformation? *Cell Cycle* **3**: 715–717
- Besson D, Pavageau AH, Valo I, Bourreau A, Belanger A, Eymerit-Morin C, Mouliere A, Chassevent A, Boisdrón-Celle M, Morel A, Solassol J, Campone M, Gamelin E, Barre B, Coqueret O & Guette C (2011) A Quantitative Proteomic Approach of the Different Stages of Colorectal Cancer Establishes OLFM4 as a New Nonmetastatic Tumor Marker. *Molecular & Cellular Proteomics* **10**: M111.009712–M111.009712
- Bhonde MR (2006) DNA Damage-induced Expression of p53 Suppresses Mitotic Checkpoint Kinase hMps1: THE LACK OF THIS SUPPRESSION IN p53MUT CELLS CONTRIBUTES TO APOPTOSIS. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 8675–8685
- Bian X, Opipari AW, Ratanaproeksa AB, Boitano AE, Lucas PC & Castle VP (2002) Constitutively active NFkappa B is required for the survival of S-type neuroblastoma. *J. Biol. Chem.* **277**: 42144–42150
- Blasco MA (2005) Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* **6**: 611–622
- Bollrath J & Greten FR (2009) IKK/NF-kappaB and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO Rep* **10**: 1314–1319
- Bonizzi G & Karin M (2004) The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology* **25**: 280–288
- Bours V, Burd PR, Brown K, Villalobos J, Park S, Ryseck RP, Bravo R, Kelly K & Siebenlist U (1992) A novel mitogen-inducible gene product related to p50/p105-NF-kappa B participates in transactivation through a kappa B site. *Molecular and Cellular Biology* **12**: 685–695
- Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AHFM, Schlegelberger B, Stein H, Dörken B, Jenuwein T & Schmitt CA (2005) Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature Cell Biology* **436**: 660–665

- Brown JP, Wei W & Sedivy JM (1997) Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* **277**: 831–834
- Brown RE, Tan D, Taylor JS, Miller M, Prichard JW & Kott MM (2007) Morphoproteomic confirmation of constitutively activated mTOR, ERK, and NF-kappaB pathways in high risk neuro-blastoma, with cell cycle and protein analyte correlates. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **37**: 141–147
- Bundy DL & McKeithan TW (1997) Diverse effects of BCL3 phosphorylation on its modulation of NF-kappaB p52 homodimer binding to DNA. *J. Biol. Chem.* **272**: 33132–33139
- Busino L, Millman SE, Scotto L, Kyratsous CA, Basrur V, O'Connor O, Hoffmann A, Elenitoba-Johnson KS & Pagano M (2012) Fbxw7 α - and GSK3-mediated degradation of p100 is a pro-survival mechanism in multiple myeloma. *Nature Cell Biology* **14**: 375–385
- Buss H, Dörrie A, Schmitz ML, Frank R, Livingstone M, Resch K & Kracht M (2004) Phosphorylation of serine 468 by GSK-3 β negatively regulates basal p65 NF-kappaB activity. *J. Biol. Chem.* **279**: 49571–49574
- Byfield MP, Murray JT & Backer JM (2005) hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J. Biol. Chem.* **280**: 33076–33082
- Byun J-Y, Yoon C-H, An S, Park I-C, Kang C-M, Kim M-J & Lee S-J (2009) The Rac1/MKK7/JNK pathway signals upregulation of Atg5 and subsequent autophagic cell death in response to oncogenic Ras. *Carcinogenesis* **30**: 1880–1888
- Caamaño JH, Rizzo CA, Durham SK, Barton DS, Raventós-Suárez C, Snapper CM & Bravo R (1998) Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses. *J. Exp. Med.* **187**: 185–196
- Cahir-McFarland ED, Davidson DM, Schauer SL, Duong J & Kieff E (2000) NF-kappa B inhibition causes spontaneous apoptosis in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 6055–6060
- Cahu J, Bustany S & Sola B (2012) Senescence-associated secretory phenotype favors the emergence of cancer stem-like cells. *Cell Death Dis* **3**: e446
- Campbell IK, van Nieuwenhuijze A, Segura E, O'Donnell K, Coghill E, Hommel M, Gerondakis S, Villadangos JA & Wicks IP (2011) Differentiation of inflammatory dendritic cells is mediated by NF- κ B1-dependent GM-CSF production in CD4 T cells. *J. Immunol.* **186**: 5468–5477
- Campisi J (2011) Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. *Current Opinion in Genetics & Development* **21**: 107–112
- Campisi J & d'Adda di Fagagna F (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Publishing Group* **8**: 729–740
- Cao Y, Bonizzi G, Seagroves TN, Gretchen FR, Johnson R, Schmidt EV & Karin M (2001) IKK α provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell* **107**: 763–775
- Carew JS, Kelly KR & Nawrocki ST (2012) Autophagy as a target for cancer therapy: new developments. *Cancer Manag Res* **4**: 357–365
- Cervantes CF, Markwick PRL, Sue S-C, McCammon JA, Dyson HJ & Komives EA (2009) Functional dynamics of the folded ankyrin repeats of I kappa B alpha revealed by nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* **48**: 8023–8031
- Chen J-H, Stoeber K, Kingsbury S, Ozanne SE, Williams GH & Hales CN (2004) Loss of proliferative capacity and induction of senescence in oxidatively stressed human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **279**: 49439–49446

- Chen LF (2002) Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *The EMBO Journal* **21**: 6539–6548
- Chen Q, Xie W, Kuhn DJ, Voorhees PM, Lopez-Girona A, Mendy D, Corral LG, Krenitsky VP, Xu W, Moutouh-de Parseval L, Webb DR, Mercurio F, Nakayama KI, Nakayama K & Orłowski RZ (2008) Targeting the p27 E3 ligase SCF(Skp2) results in p27- and Skp2-mediated cell-cycle arrest and activation of autophagy. *Blood* **111**: 4690–4699
- Chen Y & Klionsky DJ (2010) The regulation of autophagy - unanswered questions. *Journal of Cell Science* **124**: 161–170
- Chew J, Biswas S, Shreeram S, Humaidi M, Wong ET, Dhillon MK, Teo H, Hazra A, Fang CC, López-Collazo E, Bulavin DV & Tergaonkar V (2009) WIP1 phosphatase is a negative regulator of NF- κ B signalling. *Nature Cell Biology* **11**: 659–666
- Chin KL, Aerbajinai W, Zhu J, Drew L, Chen L, Liu W & Rodgers GP (2008) The regulation of OLFM4 expression in myeloid precursor cells relies on NF- κ B transcription factor. *British Journal of Haematology* **143**: 421–432
- Ciana P, Neri A, Cappellini C, Cavallo F, Pomati M, Chang CC, Maiolo AT & Lombardi L (1997) Constitutive expression of lymphoma-associated NFkB-2/Lyt-10 proteins is tumorigenic in murine fibroblasts. *Oncogene* **14**: 1805–1810
- Cogswell, P. C., Guttridge DC, Funkhouser WK & Baldwin AS (2000) Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene* **19**: 1123–1131
- Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R & Sinclair DA (2004) Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* **305**: 390–392
- Colicelli J (2004) Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci. STKE* **2004**: RE13
- Collado M & Serrano M (2006) The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nature Publishing Group* **6**: 472–476
- Collado M & Serrano M (2010) Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature Publishing Group* **10**: 51–57
- Collado M, Blasco MA & Serrano M (2007) Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* **130**: 223–233
- Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguría A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, Beach D & Serrano M (2005) Tumour biology: Senescence in premalignant tumours. *Nature Cell Biology* **436**: 642–642
- Copetti T, Bertoli C, Dalla E, Demarchi F & Schneider C (2009) p65/RelA modulates BECN1 transcription and autophagy. *Molecular and Cellular Biology* **29**: 2594–2608
- Coppé J-P, Desprez P-Y, Krtolica A & Campisi J (2010) The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* **5**: 99–118
- Coppé J-P, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez P-Y & Campisi J (2008) Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *Plos Biol* **6**: 2853–2868
- Crichton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T & Ryan KM (2006) DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* **126**: 121–134
- Criollo A, Chereau F, Malik SA, Niso-Santano M, Mariño G, Galluzzi L, Maiuri MC, Baud V & Kroemer G (2012) Autophagy is required for the activation of NF κ B. *Cell Cycle* **11**: 194–199

- Criollo A, Senovilla L, Authier H, Maiuri MC, Morselli E, Vitale I, Kepp O, Tasmemir E, Galluzzi L, Shen S, Tailler M, Delahaye N, Tesniere A, De Stefano D, Younes AB, Harper F, Pierron G, Lavandro S, Zitvogel L, Israel A, et al (2010) The IKK complex contributes to the induction of autophagy. *EMBO J* **29**: 619–631
- Cunningham D, Atkin W, Lenz H-J, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B & Starling N (2010) Colorectal cancer. *Lancet* **375**: 1030–1047
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I & Van Cutsem E (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**: 337–345
- Dai RM (1998) Involvement of Valosin-containing Protein, an ATPase Co-purified with Ikappa Balpha and 26 S Proteasome, in Ubiquitin-Proteasome-mediated Degradation of Ikappa Balpha. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 3562–3573
- Dankort D, Filenova E, Collado M, Serrano M, Jones K & McMahon M (2007) A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes & Development* **21**: 379–384
- De Carne Trecesson S, Guillemin Y, Belanger A, Bernard AC, Preisser L, Ravon E, Gamelin E, Juin P, Barre B & Coqueret O (2011) Escape from p21-mediated Oncogene-induced Senescence Leads to Cell Dedifferentiation and Dependence on Anti-apoptotic Bcl-xL and MCL1 Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 12825–12838
- Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gelinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S & White E (2006) Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* **10**: 51–64
- Dejardin E, Deregowski V, Chapelier M, Jacobs N, Gielen J, Merville MP & Bours V (1999) Regulation of NF-kappaB activity by I kappaB-related proteins in adenocarcinoma cells. *Oncogene* **18**: 2567–2577
- Delgado MD, Vaque JP, Arozarena I, López-Ilasaca MA, Martínez C, Crespo P & León J (2000) H-, K- and N-Ras inhibit myeloid leukemia cell proliferation by a p21WAF1-dependent mechanism. *Oncogene* **19**: 783–790
- Demarchi F, Bertoli C, Sandy P & Schneider C (2003) Glycogen synthase kinase-3 beta regulates NF-kappa B1/p105 stability. *J. Biol. Chem.* **278**: 39583–39590
- Demicco EG, Kavanagh KT, Romieu-Mourez R, Wang X, Shin SR, Landesman-Bollag E, Seldin DC & Sonenshein GE (2005) RelB/p52 NF-kappaB complexes rescue an early delay in mammary gland development in transgenic mice with targeted superrepressor IkappaB-alpha expression and promote carcinogenesis of the mammary gland. *Molecular and Cellular Biology* **25**: 10136–10147
- Dempke WC & Heinemann V (2009) Resistance to EGF-R (erbB-1) and VEGF-R modulating agents. *Eur. J. Cancer* **45**: 1117–1128
- Deng J, Miller SA, Wang H-Y, Xia W, Wen Y, Zhou BP, Li Y, Lin S-Y & Hung M-C (2002) beta-catenin interacts with and inhibits NF-kappa B in human colon and breast cancer. *Cancer Cell* **2**: 323–334
- Deng W-G, Tang S-T, Tseng H-P & Wu KK (2006) Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding. *Blood* **108**: 518–524
- Derudder E, Dejardin E, Pritchard LL, Green DR, Korner M & Baud V (2003) RelB/p50 dimers are differentially regulated by tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-beta receptor activation: critical roles for p100. *J. Biol. Chem.* **278**: 23278–23284
- Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, Schurra C, Garre M, Giovanni Nuciforo P, Bensimon A, Maestro R, Giuseppe Pelicci P & d'Adda di Fagagna F (2006) Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**: 638–642

- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I & Pereira-Smith O (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 9363–9367
- Dissanayake D, Hall H, Berg-Brown N, Elford AR, Hamilton SR, Murakami K, Deluca LS, Gommerman JL & Ohashi PS (2011) Nuclear factor- κ B1 controls the functional maturation of dendritic cells and prevents the activation of autoreactive T cells. *Nat. Med.* **17**: 1663–1667
- Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, Besançon F, Bauvy C, Souquere S, Pierron G & Codogno P (2006) NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *J. Biol. Chem.* **281**: 30373–30382
- Dobrzanski P, Ryseck RP & Bravo R (1993) Both N- and C-terminal domains of RelB are required for full transactivation: role of the N-terminal leucine zipper-like motif. *Molecular and Cellular Biology* **13**: 1572–1582
- Dobrzanski P, Ryseck RP & Bravo R (1994) Differential interactions of Rel-NF-kappa B complexes with I kappa B alpha determine pools of constitutive and inducible NF-kappa B activity. *EMBO J* **13**: 4608–4616
- Dong A, Gupta A, Pai RK, Tun M & Lowe AW (2011) The human adenocarcinoma-associated gene, AGR2, induces expression of amphiregulin through Hippo pathway co-activator YAP1 activation. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 18301–18310
- Duckett CS, Perkins ND, Kowalik TF, Schmid RM, Huang ES, Baldwin AS & Nabel GJ (1993) Dimerization of NF-KB2 with RelA(p65) regulates DNA binding, transcriptional activation, and inhibition by an I kappa B-alpha (MAD-3). *Molecular and Cellular Biology* **13**: 1315–1322
- Duran A, Diaz-Meco MT & Moscat J (2003) Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by zetaPKC in NF-kappaB transcriptional activation. *EMBO J* **22**: 3910–3918
- d'Adda di Fagagna F (2008) Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature Publishing Group* **8**: 512–522
- Elgendy M, Sheridan C, Brumatti G & Martin SJ (2011) Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Molecular Cell* **42**: 23–35
- Eliopoulos AG, Caamano JH, Flavell J, Reynolds GM, Murray PG, Poyet J-L & Young LS (2003) Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 regulates the processing of p100 NF-kappaB2 to p52 via an IKKgamma/NEMO-independent signalling pathway. *Oncogene* **22**: 7557–7569
- Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D & Oren M (1984) Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* **312**: 646–649
- Fantuzzi G (2001) Lessons from interleukin-deficient mice: the interleukin-1 system. *Acta Physiol. Scand.* **173**: 5–9
- Fengsrud M, Erichsen ES, Berg TO, Raiborg C & Seglen PO (2000) Ultrastructural characterization of the delimiting membranes of isolated autophagosomes and amphisomes by freeze-fracture electron microscopy. *Eur. J. Cell Biol.* **79**: 871–882
- Finco TS, Westwick JK, Norris JL, Beg AA, Der CJ & Baldwin ASJ (1997) Oncogenic Ha-Ras-induced signaling activates NF-kappaB transcriptional activity, which is required for cellular transformation. *J. Biol. Chem.* **272**: 24113–24116
- Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M & Levine AJ (1988) Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Molecular and Cellular Biology* **8**: 531–539
- Finn PW, He H, Ma C, Mueller T, Stone JR, Liou H-C, Boothby MR & Perkins DL (2002) Molecular profiling of the role of the NF-kappaB family of transcription factors during alloimmunity. *J. Leukoc. Biol.* **72**: 1054–1062

- Franzoso G, Bours V, Park S, Tomfta-Yamaguchi M, Kelly K & Siebenlist U (1992) The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF- κ B-mediated inhibition. *Nature* **359**: 339–342
- Franzoso G, Carlson L, Poljak L, Shores EW, Epstein S, Leonardi A, Grinberg A, Tran T, Scharon-Kersten T, Anver M, Love P, Brown K & Siebenlist U (1998) Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture. *J. Exp. Med.* **187**: 147–159
- Frescas D & Pagano M (2008) Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer. *Nature Publishing Group* **8**: 438–449
- Fritz RD & Radziwill G (2010) CNK1 promotes invasion of cancer cells through NF-kappaB-dependent signaling. *Molecular Cancer Research* **8**: 395–406
- Fujita T, Nolan GP, Liou HC, Scott ML & Baltimore D (1993) The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes & Development* **7**: 1354–1363
- Furia B, Deng L, Wu K, Baylor S, Kehn K, Li H, Donnelly R, Coleman T & Kashanchi F (2002) Enhancement of nuclear factor-kappa B acetylation by coactivator p300 and HIV-1 Tat proteins. *J. Biol. Chem.* **277**: 4973–4980
- Garkavtsev I, Kozin SV, Chernova O, Xu L, Winkler F, Brown E, Barnett GH & Jain RK (2004) The candidate tumour suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis. *Nature* **428**: 328–332
- Gartel AL & Radhakrishnan SK (2005) Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res.* **65**: 3980–3985
- Gazdar AF (2009) Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* **28 Suppl 1**: S24–31
- Geisler F, Algül H, Paxian S & Schmid RM (2007) Genetic inactivation of RelA/p65 sensitizes adult mouse hepatocytes to TNF-induced apoptosis in vivo and in vitro. *YGA&ST* **132**: 2489–2503
- Geisler S, Holmström KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ & Springer W (2010) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature Cell Biology* **12**: 119–131
- Geng J & Klionsky DJ (2008) The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. “Protein modifications: beyond the usual suspects” review series. *EMBO Rep* **9**: 859–864
- Ghosh S, May MJ & Kopp EB (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**: 225–260
- Giardino Torchia ML, Conze DB, Jankovic D & Ashwell JD (2013) Balance between NF- κ B p100 and p52 regulates T cell costimulation dependence. *J. Immunol.* **190**: 549–555
- Gilmore TD (1999) Multiple mutations contribute to the oncogenicity of the retroviral oncoprotein v-Rel. *Oncogene* **18**: 6925–6937
- Giraud S (2001) Functional Interaction of STAT3 Transcription Factor with the Coactivator NcoA/SRC1a. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 8004–8011
- Green DR & Kroemer G (2009) Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* **458**: 1127–1130
- Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu G-Y, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L & Karin M (2009) IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* **15**: 103–113
- Guan H, Hou S & Ricciardi RP (2005) DNA binding of repressor nuclear factor-kappaB p50/p50 depends on phosphorylation of Ser337 by the protein kinase A catalytic subunit. *J. Biol. Chem.* **280**: 9957–9962

- Guan J-L, Simon AK, Prescott M, Menendez JA, Liu F, Wang F, Wang C, Wolvetang E, Vazquez-Martin A & Zhang J (2013) Autophagy in stem cells. *autophagy* **9**: 830–849
- Gugasyan R, Horat E, Kinkel SA, Ross F, Grigoriadis G, Gray D, O'Keeffe M, Berzins SP, Belz GT, Grumont RJ, Banerjee A, Strasser A, Godfrey DI, Tsichlis PN & Gerondakis S (2012) The NF- κ B1 transcription factor prevents the intrathymic development of CD8 T cells with memory properties. *EMBO J* **31**: 692–706
- Guney I, Wu S & Sedivy JM (2006) Reduced c-Myc signaling triggers telomere-independent senescence by regulating Bmi-1 and p16(INK4a). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 3645–3650
- Guo F, Tänzler S, Busslinger M & Weih F (2008) Lack of nuclear factor-kappa B2/p100 causes a RelB-dependent block in early B lymphopoiesis. *Blood* **112**: 551–559
- Guo H, Liu Z, Xu B, Hu H, Wei Z, Liu Q, Zhang X, Ding X, Wang Y, Zhao M, Gong Y & Shao C (2013) Chemokine receptor CXCR2 is transactivated by p53 and induces p38-mediated cellular senescence in response to DNA damage. *Aging Cell* **12**: 1110–1121
- Guo JY, Chen H-Y, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, Kamphorst JJ, Chen G, Lemons JMS, Karantza V, Collier HA, DiPaola RS, Gelinas C, Rabinowitz JD & White E (2011) Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev.* **25**: 460–470
- Gustin JA, Korgaonkar CK, Pincheira R, Li Q & Donner DB (2006) Akt regulates basal and induced processing of NF-kappaB2 (p100) to p52. *J. Biol. Chem.* **281**: 16473–16481
- Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, Grimes B, Howard DS, Rizzieri DA, Luger SM & Jordan CT (2001) Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* **98**: 2301–2307
- Hagihara K, Nishikawa T, Sugamata Y, Song J, Isobe T, Taga T & Yoshizaki K (2005) Essential role of STAT3 in cytokine-driven NF-kappaB-mediated serum amyloid A gene expression. *Genes Cells* **10**: 1051–1063
- Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK & Lippincott-Schwartz J (2010) Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* **141**: 656–667
- Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57–70
- Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**: 646–674
- Hanna RA, Quinsay MN, Orogo AM, Giang K, Rikka S & Gustafsson AB (2012) Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. *Journal of Biological Chemistry* **287**: 19094–19104
- Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S-I, Natsume T, Guan J-L & Mizushima N (2008) FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology* **181**: 497–510
- Hayden MS & Ghosh S (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes & Development* **18**: 2195–2224
- Hayflick L (1965) The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* **37**: 614–636
- He C & Levine B (2010) The Beclin 1 interactome. *Current Opinion in Cell Biology* **22**: 140–149
- He T (1998) Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway. *Science* **281**: 1509–1512
- He W, Wang Q, Srinivasan B, Xu J, Padilla MT, Li Z, Wang X, Liu Y, Gou X, Shen H-M, Xing C & Lin Y (2013) A JNK-mediated autophagy pathway that triggers c-IAP degradation and necroptosis for anticancer chemotherapy. *Oncogene*

- Heissmeyer V, Krappmann D, Hatada EN & Scheidereit C (2001) Shared pathways of IkappaB kinase-induced SCF(betaTrCP)-mediated ubiquitination and degradation for the NF-kappaB precursor p105 and IkappaBalpha. *Molecular and Cellular Biology* **21**: 1024–1035
- Heissmeyer V, Krappmann D, Wulczyn FG & Scheidereit C (1999) NF-kappaB p105 is a target of IkappaB kinases and controls signal induction of Bcl-3-p50 complexes. *EMBO J* **18**: 4766–4778
- Honda R, Tanaka H & Yasuda H (1997) Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* **420**: 25–27
- Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S-I, Natsume T, Hara T & Mizushima N (2009) Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *autophagy* **5**: 973–979
- Hou S, Guan H & Ricciardi RP (2003) Phosphorylation of serine 337 of NF-kappaB p50 is critical for DNA binding. *J. Biol. Chem.* **278**: 45994–45998
- Huang D-B, Vu D & Ghosh G (2005) NF-kappaB RelB forms an intertwined homodimer. *Structure* **13**: 1365–1373
- Huang S, Pettaway CA, Uehara H, Bucana CD & Fidler IJ (2001) Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene* **20**: 4188–4197
- Huang Y, Yang M, Yang H & Zeng Z (2010) Upregulation of the GRIM-19 gene suppresses invasion and metastasis of human gastric cancer SGC-7901 cell line. *Experimental Cell Research* **316**: 2061–2070
- Hui L, Bakiri L, Stepniak E & Wagner EF (2007) p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis. *Cell Cycle* **6**: 2429–2433
- Hynes NE & MacDonald G (2009) ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**: 177–184
- Inoue J-I, Kerr LD, Kakizuka A & Verma IM (1992) I κ B γ , a 70 kd protein identical to the C-terminal half of p110 NF- κ B: A new member of the I κ B family. *Cell* **68**: 1109–1120
- Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T & Goldschmidt-Clermont PJ (1997) Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* **275**: 1649–1652
- Ishikawa H, Carrasco D, Claudio E, Ryseck RP & Bravo R (1997) Gastric hyperplasia and increased proliferative responses of lymphocytes in mice lacking the COOH-terminal ankyrin domain of NF-kappaB2. *J. Exp. Med.* **186**: 999–1014
- Itakura E & Mizushima N (2009) Atg14 and UVRAG: mutually exclusive subunits of mammalian Beclin 1-PI3K complexes. *autophagy* **5**: 534–536
- Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y & Suda T (2006) Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* **12**: 446–451
- Iwasa H, Han J & Ishikawa F (2003) Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes Cells* **8**: 131–144
- Jacobs JJ, Scheijen B, Voncken JW, Kieboom K, Berns A & van Lohuizen M (1999) Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes & Development* **13**: 2678–2690
- Jeong S-J, Pise-Masison CA, Radonovich MF, Park HU & Brady JN (2005) A novel NF-kappaB pathway involving IKKbeta and p65/RelA Ser-536 phosphorylation results in p53 inhibition in the absence of NF-kappaB transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* **280**: 10326–10332

- Jeong S-J, Radonovich M, Brady JN & Pise-Masison CA (2004) HTLV-I Tax induces a novel interaction between p65/RelA and p53 that results in inhibition of p53 transcriptional activity. *Blood* **104**: 1490–1497
- Ju J, Naura AS, Errami Y, Zerfaoui M, Kim H, Kim JG, Abd Elmageed ZY, Abdel-Mageed AB, Giardina C, Beg AA, Smulson ME & Boulares AH (2010) Phosphorylation of p50 NF-kappaB at a single serine residue by DNA-dependent protein kinase is critical for VCAM-1 expression upon TNF treatment. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 41152–41160
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y & Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* **19**: 5720–5728
- Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S & White E (2007) Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes & Development* **21**: 1621–1635
- Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au H-J, Langer C, Moore MJ & Zalberg JR (2008) K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **359**: 1757–1765
- Karin M & Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.* **18**: 621–663
- Karin M, Cao Y, Greten FR & Li Z-W (2002) NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature Publishing Group* **2**: 301–310
- Kieran M, Blank V, Logeat F, Vandekerckhove J, Lottspeich F, Le Bail O, Urban MB, Kourilsky P, Baeuerle PA & Israël A (1990) The DNA binding subunit of NF-kappa B is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product. *Cell* **62**: 1007–1018
- Kim G-Y, Mercer SE, Ewton DZ, Yan Z, Jin K & Friedman E (2002) The stress-activated protein kinases p38 alpha and JNK1 stabilize p21(Cip1) by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **277**: 29792–29802
- Kim J, Kundu M, Viollet B & Guan K-L (2011a) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology* **13**: 132–141
- Kim J-S, Lee C, Bonifant CL, Ransom H & Waldman T (2007) Activation of p53-dependent growth suppression in human cells by mutations in PTEN or PIK3CA. *Molecular and Cellular Biology* **27**: 662–677
- Kim KK, Park KS, Song SB & Kim KE (2010) Up regulation of GW112 Gene by NF kappaB promotes an antiapoptotic property in gastric cancer cells. *Mol. Carcinog.* **49**: 259–270
- Kim M-J, Woo S-J, Yoon C-H, Lee J-S, An S, Choi Y-H, Hwang S-G, Yoon G & Lee S-J (2011b) Involvement of autophagy in oncogenic K-Ras-induced malignant cell transformation. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 12924–12932
- Kim WY & Sharpless NE (2006) The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* **127**: 265–275
- Klionsky DJ (2005) The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *Journal of Cell Science* **118**: 7–18
- Klionsky DJ & Ohsumi Y (1999) Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**: 1–32
- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M & Ohsumi Y (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental Cell* **5**: 539–545
- Kodama R, Kato M, Furuta S, Ueno S, Zhang Y, Matsuno K, Yabe-Nishimura C, Tanaka E & Kamata T (2013) ROS-generating oxidases Nox1 and Nox4 contribute to oncogenic Ras-induced premature senescence. *Genes Cells* **18**: 32–41

- Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou Y-S, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J-I, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S-I, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, et al (2007) Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* **131**: 1149–1163
- Kortlever RM, Higgins PJ & Bernards R (2006) Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol* **8**: 877–884
- Kroemer G, Mariño G & Levine B (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Molecular Cell* **40**: 280–293
- Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y & Gelinas C (2003) To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* **22**: 8961–8982
- Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LCW, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ & Peeper DS (2008) Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell* **133**: 1019–1031
- Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K & Jenuwein T (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**: 116–120
- Lane DP & Crawford LV (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**: 261–263
- Lang V, Janzen J, Fischer GZ, Soneji Y, Beinke S, Salmeron A, Allen H, Hay RT, Ben-Neriah Y & Ley SC (2003) betaTrCP-mediated proteolysis of NF-kappaB1 p105 requires phosphorylation of p105 serines 927 and 932. *Molecular and Cellular Biology* **23**: 402–413
- Lee BL, Lee HS, Jung J, Cho SJ, Chung H-Y, Kim WH, Jin Y-W, Kim CS & Nam SY (2005) Nuclear factor-kappaB activation correlates with better prognosis and Akt activation in human gastric cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**: 2518–2525
- Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D & Hwang ES (2006) Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* **5**: 187–195
- Lee CH, Jeon YT, Kim SH & Song YS (2007) NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* **29**: 19–35
- Lee H, Herrmann A, Deng J-H, Kujawski M, Niu G, Li Z, Forman S, Jove R, Pardoll DM & Yu H (2009) Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer Cell* **15**: 283–293
- Lee IH, Cao L, Mostoslavsky R, Lombard DB, Liu J, Bruns NE, Tsokos M, Alt FW & Finkel T (2008) A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 3374–3379
- Lee SH & Hannink M (2002) Characterization of the nuclear import and export functions of Ikappa B(epsilon). *J. Biol. Chem.* **277**: 23358–23366
- Lencinas A, Chhun DC, Dan KP, Ross KD, Hoover EA, Antin PB & Runyan RB (2013) Olfactomedin-1 activity identifies a cell invasion checkpoint during epithelial-mesenchymal transition in the chick embryonic heart. *Dis Model Mech* **6**: 632–642
- Lernbecher T, Kistler B & Wirth T (1994) Two distinct mechanisms contribute to the constitutive activation of RelB in lymphoid cells. *EMBO J* **13**: 4060–4069
- Levidou G, Korkolopoulou P, Nikiteas N, Tzanakis N, Thymara I, Saetta AA, Tsigris C, Rallis G, Vlasis K & Patsouris E (2007) Expression of nuclear factor kappaB in human gastric carcinoma: relationship with IkappaB alpha and prognostic significance. *Virchows Arch.* **450**: 519–527

- Levidou G, Saetta AA, Korkolopoulou P, Papanastasiou P, Gioti K, Pavlopoulos P, Diamantopoulou K, Thomas-Tsagli E, Xiromeritis K & Patsouris E (2008) Clinical significance of nuclear factor (NF)-kappaB levels in urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Virchows Arch.* **452**: 295–304
- Levy D, Kuo AJ, Chang Y, Schaefer U, Kitson C, Cheung P, Espejo A, Zee BM, Liu CL, Tangsombatvisit S, Tennen RI, Kuo AY, Tanjing S, Cheung R, Chua KF, Utz PJ, Shi X, Prinjha RK, Lee K, Garcia BA, et al (2010) Lysine methylation of the NF- κ B subunit RelA by SETD6 couples activity of the histone methyltransferase GLP at chromatin to tonic repression of NF- κ B signaling. *Nat Immunol* **12**: 29–36
- Li Y, Dowbenko D & Lasky LA (2002) AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes cell survival. *J. Biol. Chem.* **277**: 11352–11361
- Li ZW, Chu W, Hu Y, Delhase M, Deerinck T, Ellisman M, Johnson R & Karin M (1999) The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J. Exp. Med.* **189**: 1839–1845
- Liang J, Shao SH, Xu Z-X, Hennessy B, Ding Z, Larrea M, Kondo S, Dumont DJ, Gutterman JU, Walker CL, Slingerland JM & Mills GB (2007) The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nature Cell Biology* **9**: 218–224
- Lin HK, Chen Z, Wang G, Nardella C, Lee SW, Chan CH, Yang WL, Wang J, Egia A, Nakayama KI, Cordon-Cardo C, Teruya-Feldstein J & Pandolfi PP (2010) Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. *Nature* **464**: 374–379
- Lin L, DeMartino GN & Greene WC (1998a) Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome. *Cell* **92**: 819–828
- Lin X, Mu Y, Cunningham ET, Marcu KB, Gelezianas R & Greene WC (1998b) Molecular determinants of NF-kappaB-inducing kinase action. *Molecular and Cellular Biology* **18**: 5899–5907
- Ling J, Kang Y, Zhao R, Xia Q, Lee D-F, Chang Z, Li J, Peng B, Fleming JB, Wang H, Liu J, Lemischka IR, Hung M-C & Chiao PJ (2012) KrasG12D-Induced IKK2/ β /NF- κ B Activation by IL-1 α and p62 Feedforward Loops Is Required for Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **21**: 105–120
- Liou H-C & Hsia CY (2003) Distinctions between c-Rel and other NF-kappaB proteins in immunity and disease. *Bioessays* **25**: 767–780
- Liou HC, Nolan GP, Ghosh S, Fujita T & Baltimore D (1992) The NF-kappa B p50 precursor, p105, contains an internal I kappa B-like inhibitor that preferentially inhibits p50. *EMBO J* **11**: 3003–3009
- Liptay S, Schmid RM, Nabel EG & Nabel GJ (1994) Transcriptional regulation of NF-kappa B2: evidence for kappa B-mediated positive and negative autoregulation. *Molecular and Cellular Biology* **14**: 7695–7703
- Liu L, Kwak YT, Bex F, García-Martínez LF, Li XH, Meek K, Lane WS & Gaynor RB (1998) DNA-dependent protein kinase phosphorylation of IkappaB alpha and IkappaB beta regulates NF-kappaB DNA binding properties. *Molecular and Cellular Biology* **18**: 4221–4234
- Liu S & Chen ZJ (2010) Expanding role of ubiquitination in NF- κ B signaling. *Nature Publishing Group* **21**: 6–21
- Liu W, Chen L, Zhu J & Rodgers GP (2006) The glycoprotein hGC-1 binds to cadherin and lectins. *Experimental Cell Research* **312**: 1785–1797
- Liu W, Zhu J, Cao L & Rodgers GP (2007) Expression of hGC-1 is correlated with differentiation of gastric carcinoma. *Histopathology* **51**: 157–165
- Liu Y, Bridges R, Wortham A & Kulesz-Martin M (2012) NF- κ B repression by PIAS3 mediated RelA SUMOylation. *PLoS ONE* **7**: e37636
- Lukas J, Parry D, Aagaard L, Mann DJ, Bartkova J, Strauss M, Peters G & Bartek J (1995) Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* **375**: 503–506

- Mabb AM, Wuerzberger-Davis SM & Miyamoto S (2006) PIASy mediates NEMO sumoylation and NF-kappaB activation in response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol* **8**: 986–993
- Maier HJ, Marienfeld R, Wirth T & Baumann B (2003) Critical role of RelB serine 368 for dimerization and p100 stabilization. *J. Biol. Chem.* **278**: 39242–39250
- Maier JA, Voulalas P, Roeder D & Maciag T (1990) Extension of the life-span of human endothelial cells by an interleukin-1 alpha antisense oligomer. *Science* **249**: 1570–1574
- Maiuri MC, Criollo A, Tasdemir E, Vicencio JM, Tajeddine N, Hickman JA, Geneste O & Kroemer G (2007) BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *autophagy* **3**: 374–376
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S & Sandri M (2007) FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab.* **6**: 458–471
- Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J & Weinberg RA (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**: 704–715
- Marienfeld R, Berberich-Siebelt F, Berberich I, Denk A, Serfling E & Neumann M (2001) Signal-specific and phosphorylation-dependent RelB degradation: a potential mechanism of NF-kappaB control. *Oncogene* **20**: 8142–8147
- Marienfeld R, May MJ, Berberich I, Serfling E, Ghosh S & Neumann M (2003) RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65. *J. Biol. Chem.* **278**: 19852–19860
- Mariotti M, Castiglioni S, Bernardini D & Maier JAM (2006) Interleukin 1 alpha is a marker of endothelial cellular senescent. *Immun Ageing* **3**: 4
- Martin AG & Fresno M (2000) Tumor necrosis factor-alpha activation of NF-kappa B requires the phosphorylation of Ser-471 in the transactivation domain of c-Rel. *J. Biol. Chem.* **275**: 24383–24391
- Martín A, Odajima J, Hunt SL, Dubus P, Ortega S, Malumbres M & Barbacid M (2005) Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27(Kip1) and p21(Cip1). *Cancer Cell* **7**: 591–598
- Massey A, Kiffin R & Cuervo AM (2004) Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**: 2420–2434
- Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen H-Y, Bray K, Reddy A, Bhanot G, Gelinas C, DiPaola RS, Karantza-Wadsworth V & White E (2009) Autophagy Suppresses Tumorigenesis through Elimination of p62. *Cell* **137**: 1062–1075
- Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, Chen G, Jin S & White E (2007) Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes & Development* **21**: 1367–1381
- Mazure NM & Pouyssegur J (2010) Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**: 177–180
- Mercer WE, Nelson D, DeLeo AB, Old LJ & Baserga R (1982) Microinjection of monoclonal antibody to protein p53 inhibits serum-induced DNA synthesis in 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**: 6309–6312
- Mercurio F, Didonato JA, Rosette C & Karin M (1993) p105 and p98 precursor proteins play an active role in NF-kappa B-mediated signal transduction. *Genes & Development* **7**: 705–718
- Meteoglu I, Erdogdu IH, Meydan N, Erkus M & Barutca S (2008) NF-KappaB expression correlates with apoptosis and angiogenesis in clear cell renal cell carcinoma tissues. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **27**: 53

- Migliazza A, Lombardi L, Rocchi M, Trecca D, Chang CC, Antonacci R, Fracchiolla NS, Ciana P, Maiolo AT & Neri A (1994) Heterogeneous chromosomal aberrations generate 3' truncations of the NFKB2/lyt-10 gene in lymphoid malignancies. *Blood* **84**: 3850–3860
- Miyamoto S (2011) Nuclear initiated NF- κ B signaling: NEMO and ATM take center stage. *Nature Publishing Group* **21**: 116–130
- Mizushima N & Levine B (2010) Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature Cell Biology* **12**: 823–830
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM & Klionsky DJ (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**: 1069–1075
- Moiseeva O, Bourdeau V, Roux A, Deschenes-Simard X & Ferbeyre G (2009) Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. *Molecular and Cellular Biology* **29**: 4495–4507
- Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV & Kaykas A (2004) WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* **5**: 691–701
- Moorthy AK, Savinova OV, Ho JQ, Wang VY-F, Vu D & Ghosh G (2006) The 20S proteasome processes NF-kappaB1 p105 into p50 in a translation-independent manner. *EMBO J* **25**: 1945–1956
- Morselli E, Maiuri MC, Markaki M, Megalou E, Pasparaki A, Palikaras K, Criollo A, Galluzzi L, Malik SA, Vitale I, Michaud M, Madeo F, Tavernarakis N & Kroemer G (2010) Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell Death Dis* **1**: e10
- Moscat J & Diaz-Meco MT (2009) p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell* **137**: 1001–1004
- Moscat J, DIAZMECO M & WOOTEN M (2007) Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein. *Trends in Biochemical Sciences* **32**: 95–100
- Mosialos G (1997) The role of Rel/NF-kappa B proteins in viral oncogenesis and the regulation of viral transcription. *Semin. Cancer Biol.* **8**: 121–129
- Mosialos G, Hamer P, Capobianco AJ, Laursen RA & Gilmore TD (1991) A protein kinase-A recognition sequence is structurally linked to transformation by p53v-rel and cytoplasmic retention of p68c-rel. *Molecular and Cellular Biology* **11**: 5867–5877
- Motadi LR, Misso NL, Dlamini Z & Bhoola KD (2007) Molecular genetics and mechanisms of apoptosis in carcinomas of the lung and pleura: therapeutic targets. *Int. Immunopharmacol.* **7**: 1934–1947
- Mutsuhiro Takekawa MAANINFIHTYTKI (2000) p53-inducible Wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *The EMBO Journal* **19**: 6517
- Müller CW, Rey FA, Sodeoka M, Verdine GL & Harrison SC (1995) Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA. *Nature* **373**: 311–317
- Myant KB, Cammareri P, McGhee EJ, Ridgway RA, Huels DJ, Cordero JB, Schwitalla S, Kalna G, Ogg E-L, Athineos D, Timpson P, Vidal M, Murray GI, Greten FR, Anderson KI & Sansom OJ (2013) ROS Production and NF- κ B Activation Triggered by RAC1 Facilitate WNT-Driven Intestinal Stem Cell Proliferation and Colorectal Cancer Initiation. *Cell Stem Cell* **12**: 761–773
- Nadiminty N, Lou W, Lee SO, Lin X, Trump DL & Gao AC (2006) Stat3 activation of NF- κ B p100 processing involves CBP/p300-mediated acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 7264–7269
- Nadiminty N, Lou W, Sun M, Chen J, Yue J, Kung H-J, Evans CP, Zhou Q & Gao AC (2010) Aberrant activation of the androgen receptor by NF-kappaB2/p52 in prostate cancer cells. *Cancer Research* **70**: 3309–3319

- Nair A, Venkatraman M, Maliekal TT, Nair B & Karunakaran D (2003) NF-kappaB is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix. *Oncogene* **22**: 50–58
- Nakamura AJ, Chiang YJ, Hathcock KS, Horikawa I, Sedelnikova OA, Hodes RJ & Bonner WM (2008) Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence. *Epigenetics Chromatin* **1**: 6
- Nakamura N, Matsuura A, Wada Y & Ohsumi Y (1997) Acidification of vacuoles is required for autophagic degradation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* **121**: 338–344
- Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJJ & Sledge GWJ (1997) Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Molecular and Cellular Biology* **17**: 3629–3639
- Nasrin N, Kaushik VK, Fortier E, Wall D, Pearson KJ, de Cabo R & Bordone L (2009) JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity. *PLoS ONE* **4**: e8414
- Nemoto S, Fergusson MM & Finkel T (2004) Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science* **306**: 2105–2108
- Neri A, Chang CC, Lombardi L, Salina M, Corradini P, Maiolo AT, Chaganti RS & Dalla-Favera R (1991) B cell lymphoma-associated chromosomal translocation involves candidate oncogene *lyt-10*, homologous to NF-kappa B p50. *Cell* **67**: 1075–1087
- Neumann M, Klar S, Wilisch-Neumann A, Hollenbach E, Kavuri S, Leverkus M, Kandolf R, Brunner-Weinzierl MC & Klingel K (2011) Glycogen synthase kinase-3 β is a crucial mediator of signal-induced RelB degradation. *Oncogene* **30**: 2485–2492
- Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D, Firestein R, Cleary M, Jenuwein T, Herrera RE & Kouzarides T (2001) Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* **412**: 561–565
- Noah Dephore CZJVSABCEBSJESPG (2008) A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 10762
- Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Dann SG, Kim SY, Gulati P, Byfield MP, Backer JM, Natt F, Bos JL, Zwartkruis FJT & Thomas G (2005) Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 14238–14243
- Nolan GP, Fujita T, Bhatia K, Huppi C, Liou HC, Scott ML & Baltimore D (1993) The *bcl-3* proto-oncogene encodes a nuclear I kappa B-like molecule that preferentially interacts with NF-kappa B p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner. *Molecular and Cellular Biology* **13**: 3557–3566
- Nowak J, Archange C, Tardivel-Lacombe J, Pontarotti P, Pébusque M-J, Vaccaro MI, Velasco G, Dagorn J-C & Iovanna JL (2009) The TP53INP2 protein is required for autophagy in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **20**: 870–881
- O'shea JM & Perkins ND (2008) Regulation of the RelA (p65) transactivation domain. *Biochem. Soc. Trans* **36**: 603
- Obaya AJ & Sedivy JM (2002) Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 126–142
- Oeckinghaus A & Ghosh S (2009) The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **1**: a000034
- Oeckinghaus A, Hayden MS & Ghosh S (2011) Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol* **12**: 695–708

- Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A & Hara E (2004) The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J. Med. Invest.* **51**: 146–153
- Ohtani N, Zebedee Z, Huot TJ, Stinson JA, Sugimoto M, Ohashi Y, Sharrocks AD, Peters G & Hara E (2001) Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* **409**: 1067–1070
- Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler KW & Vogelstein B (1993) Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* **362**: 857–860
- Olsen JV, Vermeulen M, Santamaria A, Kumar C, Miller ML, Jensen LJ, Gnad F, Cox J, Jensen TS, Nigg EA, Brunak S & Mann M (2010) Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Science Signaling* **3**: ra3
- Orsi A, Polson HE & Tooze SA (2010) Membrane trafficking events that partake in autophagy. *Current Opinion in Cell Biology* **22**: 150–156
- Oya M, Ohtsubo M, Takayanagi A, Tachibana M, Shimizu N & Murai M (2001) Constitutive activation of nuclear factor-kappaB prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells. *Oncogene* **20**: 3888–3896
- Oya M, Takayanagi A, Horiguchi A, Mizuno R, Ohtsubo M, Marumo K, Shimizu N & Murai M (2003) Increased nuclear factor-kappa B activation is related to the tumor development of renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* **24**: 377–384
- Pacifico F, Mauro C, Barone C, Crescenzi E, Mellone S, Monaco M, Chiappetta G, Terrazzano G, Liguoro D, Vito P, Consiglio E, Formisano S & Leonardi A (2004) Oncogenic and anti-apoptotic activity of NF-kappa B in human thyroid carcinomas. *J. Biol. Chem.* **279**: 54610–54619
- Palmero I, Pantoja C & Serrano M (1998) p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* **395**: 125–126
- Parada LF, Land H, Weinberg RA, Wolf D & Rotter V (1984) Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* **312**: 649–651
- Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, Seigneurin-Berny D, Pance A, Chantôme A, Plenchette S, Khochbin S, Solary E & Garrido C (2003) HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Molecular and Cellular Biology* **23**: 5790–5802
- Park I-K, Morrison SJ & Clarke MF (2004) Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *Journal of Clinical Investigation* **113**: 175–179
- Parrinello S, Coppé J-P, Krtolica A & Campisi J (2005) Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *Journal of Cell Science* **118**: 485–496
- Pasparakis M (2009) Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* **9**: 778–788
- Perkins ND (2004) NF-kappaB: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol.* **14**: 64–69
- Perkins ND (2006) Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* **25**: 6717–6730
- Perkins ND (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nature Publishing Group* **8**: 49–62
- Perkins ND (2012) The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer. *Nature Publishing Group* **12**: 121–132
- Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, Meijer AJ & Codogno P (2000) Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* **275**: 992–998

- Pianetti S, Arsura M, Romieu-Mourez R, Coffey RJ & Sonenshein GE (2001) Her-2/neu overexpression induces NF-kappaB via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of IkappaB-alpha that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN. *Oncogene* **20**: 1287–1299
- Poele te RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J & Joel SP (2002) DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **62**: 1876–1883
- Pommier Y (2006) Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature Publishing Group* **6**: 789–802
- Potter DA, Larson CJ, Eckes P, Schmid RM, Nabel GJ, Verdine GL & Sharp PA (1993) Purification of the major histocompatibility complex class I transcription factor H2TF1. The full-length product of the nfkb2 gene. *J. Biol. Chem.* **268**: 18882–18890
- Pursiheimo J-P, Rantanen K, Heikkinen PT, Johansen T & Jaakkola PM (2009) Hypoxia-activated autophagy accelerates degradation of SQSTM1/p62. *Oncogene* **28**: 334–344
- Puvvada SD, Funkhouser WK, Greene K, Deal A, Chu H, Baldwin AS, Tepper JE & O'Neil BH (2010) NF-kB and Bcl-3 Activation Are Prognostic in Metastatic Colorectal Cancer. *Oncology* **78**: 181–188
- Qiao L, Zhang H, Yu J, Francisco R, Dent P, Ebert MPA, Röcken C & Farrell G (2006) Constitutive activation of NF-kappaB in human hepatocellular carcinoma: evidence of a cytoprotective role. *Hum. Gene Ther.* **17**: 280–290
- Qing G, Qu Z & Xiao G (2005) Regulation of NF-kappa B2 p100 processing by its cis-acting domain. *J. Biol. Chem.* **280**: 18–27
- Qu X, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan RN, Gilpin C & Levine B (2007) Autophagy Gene-Dependent Clearance of Apoptotic Cells during Embryonic Development. *Cell* **128**: 931–946
- Queen C & Baltimore D (1983) Immunoglobulin gene transcription is activated by downstream sequence elements. *Cell* **33**: 741–748
- Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA & Sherr CJ (1995) Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* **83**: 993–1000
- Rabinowitz JD & White E (2010) Autophagy and Metabolism. *Science* **330**: 1344–1348
- Radtke F & Clevers H (2005) Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* **307**: 1904–1909
- Rajagopalan S, Moyle MW, Joosten I & Long EO (2010) DNA-PKcs controls an endosomal signaling pathway for a proinflammatory response by natural killer cells. *Science Signaling* **3**: ra14
- Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C & Rubinsztein DC (2010) Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nature Cell Biology* **12**: 747–757
- Raychaudhuri B, Han Y, Lu T & Vogelbaum MA (2007) Aberrant constitutive activation of nuclear factor kappaB in glioblastoma multiforme drives invasive phenotype. *J. Neurooncol.* **85**: 39–47
- Rocha S, Campbell KJ & Perkins ND (2003a) p53- and Mdm2-independent repression of NF-kappa B transactivation by the ARF tumor suppressor. *Molecular Cell* **12**: 15–25
- Rocha S, Garrett MD, Campbell KJ, Schumm K & Perkins ND (2005) Regulation of NF-kappaB and p53 through activation of ATR and Chk1 by the ARF tumour suppressor. *The EMBO Journal* **24**: 1157–1169
- Rocha S, Martin AM, Meek DW & Perkins ND (2003b) p53 represses cyclin D1 transcription through down regulation of Bcl-3 and inducing increased association of the p52 NF-kappaB subunit with histone deacetylase 1. *Molecular and Cellular Biology* **23**: 4713–4727
- Rodier F, Campisi J & Bhaumik D (2007) Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Research* **35**: 7475–7484

- Ropolo A, Grasso D, Pardo R, Sacchetti ML, Archange C, Re Lo A, Seux M, Nowak J, Gonzalez CD, Iovanna JL & Vaccaro MI (2007) The pancreatitis-induced vacuole membrane protein 1 triggers autophagy in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **282**: 37124–37133
- Rotter V (1983) p53, a transformation-related cellular-encoded protein, can be used as a biochemical marker for the detection of primary mouse tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**: 2613–2617
- Ruan Q, Kameswaran V, Zhang Y, Zheng S, Sun J, Wang J, DeVirgiliis J, Liou H-C, Beg AA & Chen YH (2011) The Th17 immune response is controlled by the Rel-ROR γ -ROR γ T transcriptional axis. *J. Exp. Med.* **208**: 2321–2333
- Ryan KM (2011) p53 and autophagy in cancer: Guardian of the genome meets guardian of the proteome. *Eur. J. Cancer* **47**: 44–50
- Ryseck RP, Bull P, Takamiya M, Bours V, Siebenlist U, Dobrzanski P & Bravo R (1992) RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF-kappa B. *Molecular and Cellular Biology* **12**: 674–684
- Sachdev S, Hoffmann A & Hannink M (1998) Nuclear localization of IkappaB alpha is mediated by the second ankyrin repeat: the IkappaB alpha ankyrin repeats define a novel class of cis-acting nuclear import sequences. *Molecular and Cellular Biology* **18**: 2524–2534
- Samuel MS, Lourenço FC & Olson MF (2011) K-Ras mediated murine epidermal tumorigenesis is dependent upon and associated with elevated Rac1 activity. *PLoS ONE* **6**: e17143
- Sanz L, Diaz-Meco MT, Nakano H & Moscat J (2000) The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway. *EMBO J* **19**: 1576–1586
- Sasaki N, Morisaki T, Hashizume K, Yao T, Tsuneyoshi M, Noshiro H, Nakamura K, Yamanaka T, Uchiyama A, Tanaka M & Katano M (2001) Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue. *Clin. Cancer Res.* **7**: 4136–4142
- Sánchez-Valdepeñas C, Martín AG, Ramakrishnan P, Wallach D & Fresno M (2006) NF-kappaB-inducing kinase is involved in the activation of the CD28 responsive element through phosphorylation of c-Rel and regulation of its transactivating activity. *J. Immunol.* **176**: 4666–4674
- Scheidereit C (2006) IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* **25**: 6685–6705
- Schiaffino S, Mammucari C & Sandri M (2008) The role of autophagy in neonatal tissues: just a response to amino acid starvation? *autophagy* **4**: 727–730
- Schmelzle T & Hall MN (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **103**: 253–262
- Schmid RM, Perkins ND, Duckett CS, Andrews PC & Nabel GJ (1991) Cloning of an NF-kappa B subunit which stimulates HIV transcription in synergy with p65. *Nature* **352**: 733–736
- Schmitt AM, Crawley CD, Kang S, Raleigh DR, Yu X, Wahlstrom JS, Voce DJ, Darga TE, Weichselbaum RR & Yamini B (2011) p50 (NF- κ B1) is an effector protein in the cytotoxic response to DNA methylation damage. *Molecular Cell* **44**: 785–796
- Schumm K, Rocha S, Caamano J & Perkins ND (2006) Regulation of p53 tumour suppressor target gene expression by the p52 NF-kappaB subunit. *The EMBO Journal* **25**: 4820–4832
- Seglen PO & Gordon PB (1982) 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**: 1889–1892
- Sen R & Baltimore D (1986a) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**: 705–716

- Sen R & Baltimore D (1986b) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**: 921–928
- Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krähn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC & Karin M (2001) Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* **293**: 1495–1499
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D & Lowe SW (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**: 593–602
- Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI & Baltimore D (1995) Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* **80**: 321–330
- Sharpless NE (2005) INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat. Res.* **576**: 22–38
- Shehata MF (2005) Rel/Nuclear factor-kappa B apoptosis pathways in human cervical cancer cells. *Cancer Cell Int.* **5**: 10
- Shen S, Niso-Santano M, Adjemian S, Takehara T, Malik SA, Minoux H, Souquere S, Mariño G, Lachkar S, Senovilla L, Galluzzi L, Kepp O, Pierron G, Maiuri MC, Hikita H, Kroemer R & Kroemer G (2012) Cytoplasmic STAT3 Represses Autophagy by Inhibiting PKR Activity. *Molecular Cell* 1–14
- Shintani T & Klionsky DJ (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**: 990–995
- Singh H, Sen R, Baltimore D & Sharp PA (1986) A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature* **319**: 154–158
- Soussi T & Bérout C (2003) Significance of TP53 mutations in human cancer: a critical analysis of mutations at CpG dinucleotides. *Hum. Mutat.* **21**: 192–200
- Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, Zanieski GJ, Rogers AE, Traish AM & Sonenshein GE (1997) Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *Journal of Clinical Investigation* **100**: 2952–2960
- Starczynowski DT, Reynolds JG & Gilmore TD (2005) Mutations of tumor necrosis factor alpha-responsive serine residues within the C-terminal transactivation domain of human transcription factor REL enhance its in vitro transforming ability. *Oncogene* **24**: 7355–7368
- Starczynowski DT, Trautmann H, Pott C, Harder L, Arnold N, Africa JA, Leeman JR, Siebert R & Gilmore TD (2007) Mutation of an IKK phosphorylation site within the transactivation domain of REL in two patients with B-cell lymphoma enhances REL's in vitro transforming activity. *Oncogene* **26**: 2685–2694
- Stein GH, Beeson M & Gordon L (1990) Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts. *Science* **249**: 666–669
- Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH & Peters G (1998) The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* **17**: 5001–5014
- Strømhaug PE, Berg TO, Fengsrud M & Seglen PO (1998) Purification and characterization of autophagosomes from rat hepatocytes. *Biochem. J.* **335 (Pt 2)**: 217–224
- Sugawara K, Suzuki NN, Fujioka Y, Mizushima N, Ohsumi Y & Inagaki F (2004) The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8. *Genes Cells* **9**: 611–618
- Suzuki K & Ohsumi Y (2007) Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **581**: 2156–2161

- Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cualing HD, Sun M, Sato Y, Liang C, Jung JU, Cheng JQ, Mulé JJ, Pledger WJ & Wang H-G (2007) Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* **9**: 1142–1151
- Takahashi Y, Meyerkord CL, Hori T, Runkle K, Fox TE, Kester M, Loughran TP & Wang H-G (2011) Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. *autophagy* **7**: 61–73
- Tang X, Liu D, Shishodia S, Ozburn N, Behrens C, Lee JJ, Hong WK, Aggarwal BB & Wistuba II (2006) Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) is frequently expressed in lung cancer and preneoplastic lesions. *Cancer* **107**: 2637–2646
- Tetsu O & McCormick F (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**: 422–426
- Thompson JE, Phillips RJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P & Ghosh S (1995) I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell* **80**: 573–582
- Tooze SA & Yoshimori T (2010) The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol* **12**: 831–835
- Trocoli A & Djavaheri-Mergny M (2011) The complex interplay between autophagy and NF- κ B signaling pathways in cancer cells. *American Journal of Cancer Research* **1**: 629–649
- Tront JS, Hoffman B & Liebermann DA (2006) Gadd45a suppresses Ras-driven mammary tumorigenesis by activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 stress signaling resulting in apoptosis and senescence. *Cancer Research* **66**: 8448–8454
- Tsukamoto S, Kuma A, Murakami M, Kishi C, Yamamoto A & Mizushima N (2008) Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* **321**: 117–120
- Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, Lundberg E, Jonasson K, Forsberg M, Zwahlen M, Kampf C, Wester K, Hober S, Wernerus H, Björling L & Ponten F (2010) Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nature Publishing Group* **28**: 1248–1250
- Uhlik M, Good L, Xiao G, Harhaj EW, Zandi E, Karin M & Sun SC (1998) NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase participate in human T-cell leukemia virus I Tax-mediated NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* **273**: 21132–21136
- van der Flier LG, Haegbarth A, Stange DE, van de Wetering M & Clevers H (2009) OLFM4 is a robust marker for stem cells in human intestine and marks a subset of colorectal cancer cells. *Gastroenterology* **137**: 15–17
- van der Vos KE, Eliasson P, Proikas-Cezanne T, Vervoort SJ, van Boxtel R, Putker M, van Zutphen IJ, Mauthe M, Zellmer S, Pals C, Verhagen LP, Groot Koerkamp MJA, Braat AK, Dansen TB, Holstege FC, Gebhardt R, Burgering BM & Coffey PJ (2012) Modulation of glutamine metabolism by the PI(3)K-PKB-FOXO network regulates autophagy. *Nature Cell Biology* **14**: 829–837
- Vatsyayan J, Qing G, Xiao G & Hu J (2008) SUMO1 modification of NF-kappaB2/p100 is essential for stimuli-induced p100 phosphorylation and processing. *EMBO Rep* **9**: 885–890
- Vermeulen L (2003) Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *The EMBO Journal* **22**: 1313–1324
- Viatour P, Bentires-Alj M, Chariot A, Deregowski V, de Leval L, Merville MP & Bours V (2003) NF- kappa B2/p100 induces Bcl-2 expression. *Leukemia* **17**: 1349–1356
- Vigneron A, Cherier J, Barré B, Gamelin E & Coqueret O (2006) The cell cycle inhibitor p21waf1 binds to the myc and cdc25A promoters upon DNA damage and induces transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* **281**: 34742–34750

- Vigneron A, Gamelin E & Coqueret O (2008) The EGFR-STAT3 Oncogenic Pathway Up-regulates the Eme1 Endonuclease to Reduce DNA Damage after Topoisomerase I Inhibition. *Cancer Research* **68**: 815–825
- Vilimas T, Mascarenhas J, Palomero T, Mandal M, Buonamici S, Meng F, Thompson B, Spaulding C, Macaroun S, Alegre M-L, Kee BL, Ferrando A, Miele L & Aifantis I (2007) Targeting the NF-kappaB signaling pathway in Notch1-induced T-cell leukemia. *Nat. Med.* **13**: 70–77
- Villeneuve NF, Lau A & Zhang DD (2010) Regulation of the Nrf2-Keap1 antioxidant response by the ubiquitin proteasome system: an insight into cullin-ring ubiquitin ligases. *Antioxid. Redox Signal.* **13**: 1699–1712
- Visconti R, Cerutti J, Battista S, Fedele M, Trapasso F, Zeki K, Miano MP, de Nigris F, Casalino L, Curcio F, Santoro M & Fusco A (1997) Expression of the neoplastic phenotype by human thyroid carcinoma cell lines requires NFkappaB p65 protein expression. *Oncogene* **15**: 1987–1994
- Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y & White R (1989) Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* **244**: 207–211
- Vousden KH & Lu X (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Publishing Group* **2**: 594–604
- Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M & Green MR (2008) Oncogenic BRAF Induces Senescence and Apoptosis through Pathways Mediated by the Secreted Protein IGFBP7. *Cell* **132**: 363–374
- Wang D & Baldwin AS (1998) Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. *J. Biol. Chem.* **273**: 29411–29416
- Wang D, Westerheide SD, Hanson JL & Baldwin AS (2000) Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J. Biol. Chem.* **275**: 32592–32597
- Wang RC & Levine B (2010) Autophagy in cellular growth control. *FEBS Lett.* **584**: 1417–1426
- Wang RC, Wei Y, An Z, Zou Z, Xiao G, Bhagat G, White M, Reichelt J & Levine B (2012) Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science* **338**: 956–959
- Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR & Chiao PJ (1999) The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* **5**: 119–127
- Wang W, Chen JX, Liao R, Deng Q, Zhou JJ, Huang S & Sun P (2002a) Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Molecular and Cellular Biology* **22**: 3389–3403
- Wang Y, Cui H, Schroering A, Ding JL, Lane WS, McGill G, Fisher DE & Ding H-F (2002b) NF- κ B2 p100 is a pro-apoptotic protein with anti-oncogenic function. *Nat Cell Biol* **4**: 888–893
- Wang Z, Zhang Y, Gu JJ, Davitt C, Reeves R & Magnuson NS (2010) Pim-2 phosphorylation of p21(Cip1/WAF1) enhances its stability and inhibits cell proliferation in HCT116 cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **42**: 1030–1038
- Webber JL & Tooze SA (2010) Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. *The EMBO Journal* **29**: 27–40
- Webber JL, Young ARJ & Tooze SA (2007) Atg9 trafficking in Mammalian cells. *autophagy* **3**: 54–56
- Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M & Levine B (2008) JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Molecular Cell* **30**: 678–688
- Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V & Elazar Z (2010) LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J* **29**: 1792–1802

- Weih F & Caamano J (2003) Regulation of secondary lymphoid organ development by the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway. *Immunol. Rev.* **195**: 91–105
- Weih F, Carrasco D, Durham SK, Barton DS, Rizzo CA, Ryseck RP, Lira SA & Bravo R (1995) Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. *Cell* **80**: 331–340
- Weih H, König M & Gruss P (1983) Multiple point mutations affecting the simian virus 40 enhancer. *Science* **219**: 626–631
- Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, Lopez M, Kalyanaraman B, Mutlu GM, Budinger GRS & Chandel NS (2010) Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 8788–8793
- Weyemi U, Lagente-Chevallier O, Boufraquech M, Prenois F, Courtin F, Caillou B, Talbot M, Dardalhon M, Ghuzlan Al A, Bidart J-M, Schlumberger M & Dupuy C (2012) ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence. *Oncogene* **31**: 1117–1129
- White E (2012) Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nature Publishing Group* **12**: 401–410
- White E & Lowe SW (2009) Eating to exit: autophagy-enabled senescence revealed. *Genes Dev.* **23**: 784–787
- Wilhelmsen KC & Temin HM (1984) Structure and dimorphism of c-rel (turkey), the cellular homolog to the oncogene of reticuloendotheliosis virus strain T. *Journal of Virology* **49**: 521–529
- Wilhelmsen KC, Eggleton K & Temin HM (1984) Nucleic acid sequences of the oncogene v-rel in reticuloendotheliosis virus strain T and its cellular homolog, the proto-oncogene c-rel. *Journal of Virology* **52**: 172–182
- Wu Z-H & Miyamoto S (2007) Many faces of NF-kappaB signaling induced by genotoxic stress. *J Mol Med* **85**: 1187–1202
- Wu Z-H, Wong ET, Shi Y, Niu J, Chen Z, Miyamoto S & Tergaonkar V (2010) ATM- and NEMO-Dependent ELKS Ubiquitination Coordinates TAK1-Mediated IKK Activation in Response to Genotoxic Stress. *Molecular Cell* **40**: 75–86
- Xiao G, Fong A & Sun S-C (2004) Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **279**: 30099–30105
- Xiao G, Harhaj EW & Sun S-C (2001) NF- κ B-Inducing Kinase Regulates the Processing of NF- κ B2 p100. *Molecular Cell* **7**: 401–409
- Xu Y, Josson S, Fang F, Oberley TD, St Clair DK, Wan XS, Sun Y, Bakthavatchalu V, Muthuswamy A & St Clair WH (2009) RelB enhances prostate cancer growth: implications for the role of the nuclear factor-kappaB alternative pathway in tumorigenicity. *Cancer Research* **69**: 3267–3271
- Xue Y, Liu Z, Cao J, Ma Q, Gao X, Wang Q, Jin C, Zhou Y, Wen L & Ren J (2011) GPS 2.1: enhanced prediction of kinase-specific phosphorylation sites with an algorithm of motif length selection. *Protein Eng. Des. Sel.* **24**: 255–260
- Xue Y, Ren J, Gao X, Jin C, Wen L & Yao X (2008) GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Molecular & Cellular Proteomics* **7**: 1598–1608
- Yamamoto M, Yamazaki S, Uematsu S, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Kuwata H, Takeuchi O, Takeshige K, Saitoh T, Yamaoka S, Yamamoto N, Yamamoto S, Muta T, Takeda K & Akira S (2004) Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature* **430**: 218–222

- Yamazaki S, Muta T, Matsuo S & Takeshige K (2005) Stimulus-specific induction of a novel nuclear factor-kappaB regulator, IkappaB-zeta, via Toll/Interleukin-1 receptor is mediated by mRNA stabilization. *J. Biol. Chem.* **280**: 1678–1687
- Yang J, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE & Stark GR (2007) Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. *Genes & Development* **21**: 1396–1408
- Yang Z, Huang J, Geng J, Nair U & Klionsky DJ (2006) Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Mol. Biol. Cell* **17**: 5094–5104
- Yee KS & Vousden KH (2005) Complicating the complexity of p53. *Carcinogenesis* **26**: 1317–1322
- Yilmaz ZB, Weih DS, Sivakumar V & Weih F (2003) RelB is required for Peyer's patch development: differential regulation of p52-RelB by lymphotoxin and TNF. *EMBO J* **22**: 121–130
- Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E & Eskelinen E-L (2009) 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *autophagy* **5**: 1180–1185
- Yoo BH, Wu X, Li Y, Haniff M, Sasazuki T, Shirasawa S, Eskelinen E-L & Rosen KV (2010) Oncogenic ras-induced down-regulation of autophagy mediator Beclin-1 is required for malignant transformation of intestinal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 5438–5449
- Yorimitsu T & Klionsky DJ (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1542–1552
- Yoshimura K, Shibata M, Koike M, Gotoh K, Fukaya M, Watanabe M & Uchiyama Y (2006) Effects of RNA interference of Atg4B on the limited proteolysis of LC3 in PC12 cells and expression of Atg4B in various rat tissues. *autophagy* **2**: 200–208
- Young AR & Narita M (2010) Connecting autophagy to senescence in pathophysiology. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**: 234–240
- Young ARJ, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JFJ, Tavaré S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM & Narita M (2009) Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev.* **23**: 798–803
- Yu H, Pardoll D & Jove R (2009) STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature Publishing Group* **9**: 798–809
- Yu S-H, Chiang W-C, Shih H-M & Wu K-J (2004) Stimulation of c-Rel transcriptional activity by PKA catalytic subunit beta. *J Mol Med* **82**: 621–628
- Yuchen Chien CSXWXFBBJEBPPWLACCSLSCKSWL (2011) Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes & Development* **25**: 2125
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ & Heintz N (2003) Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 15077–15082
- Zglinicki von T (2000) Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Annals of the New York Academy of Sciences* **908**: 99–110
- Zhang B, Wang Z, Ding J, Peterson P, Gunning WT & Ding H-F (2006) NF-kappaB2 is required for the control of autoimmunity by regulating the development of medullary thymic epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **281**: 38617–38624
- Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ & Semenza GL (2008) Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* **283**: 10892–10903

- Zhang J & Peng B (2007) In vitro angiogenesis and expression of nuclear factor kappaB and VEGF in high and low metastasis cell lines of salivary gland Adenoid Cystic Carcinoma. *BMC Cancer* **7**: 95
- Zhang J, Liu WL, Tang DC, Chen L, Wang M, Pack SD, Zhuang Z & Rodgers GP (2002) Identification and characterization of a novel member of olfactomedin-related protein family, hGC-1, expressed during myeloid lineage development. *Gene* **283**: 83–93
- Zhang Q, Didonato JA, Karin M & McKeithan TW (1994) BCL3 encodes a nuclear protein which can alter the subcellular location of NF-kappa B proteins. *Molecular and Cellular Biology* **14**: 3915–3926
- Zhang R, Chen W & Adams PD (2007) Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Molecular and Cellular Biology* **27**: 2343–2358
- Zhang X, Huang Q, Yang Z, Li Y & Li C-Y (2004) GW112, a novel antiapoptotic protein that promotes tumor growth. *Cancer Res.* **64**: 2474–2481
- Zhong H, May MJ, Jimi E & Ghosh S (2002) The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Molecular Cell* **9**: 625–636
- Zhong H, Voll RE & Ghosh S (1998) Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Molecular Cell* **1**: 661–671
- Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, Heintz N & Yue Z (2009) Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nature Cell Biology* **11**: 468–476

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Lignées cellulaires et traitements

Les cellules HT29, issue d'un adénocarcinome colorectal humain (American Type Culture Collection, ATCC), ont été transfectées comme décrit dans l'annexe I. Le modèle inducible pour Ras par la doxycycline ainsi obtenu est maintenu en culture en milieu RPMI 1640 (Lonza) complété de 10 % de sérum du veau fœtal et en présence de 100 µg/ml zeocin (Invitrogen) and 2,5 µg/ml blasticidin (Sigma Aldrich). Les cellules RasL sont maintenues en culture en milieu RPMI 1640 (Lonza) complété de 10 % de sérum du veau fœtal contenant 100 µg/ml zeocin (Invitrogen) and 2,5 µg/ml blasticidin (Sigma Aldrich), et en présence de 50ng/mL de doxycycline. La lignée de cellules LS174T, issue d'un adénocarcinome colorectal humain (American Type Culture Collection, ATCC), a été maintenue en culture en milieu RPMI 1640 (Lonza) complété de 10 % de sérum du veau fœtal et en l'absence d'antibiotique. Toutes les lignées cellulaires sont maintenues à 37 °C dans 5 % de dioxyde de carbone et ont été testées régulièrement pour écarter les risques de contamination par des mycoplasmes.

La solution mère de sn38 (Aventis Pharma) a été préparée dans du DMSO puis diluée dans du PBS pour être utilisée aux concentrations voulues. La solution mère de doxycycline (Invitrogen) a été préparée à 50 mg.ml⁻¹ dans de l'eau ultra-pure puis diluée à 50 µg.ml⁻¹ dans du PBS avant d'être utilisée à 50 ng.ml⁻¹ dans le milieu de culture des cellules. La solution mère de 3-MA (sigma) est fraîchement préparée dans du milieu de culture chauffé à 90°C pour être utilisée aux concentrations données.

A. Transfection de siRNA

Pour inhiber l'expression de NF- κ B, les cellules sont transfectées avec 2,5 nM de siRNA spécifique ON-TARGETplus (Dharmacon) ou de ON-TARGETplus Non-Targeting Pool (Dharmacon) avec le DharmaFect-4 (Dharmacon) selon les instructions du fabricant. Les cellules sont induites pour Ras ou traitées au sn38 24 h après la transfection jusqu'au temps indiqués.

II. Marquages par cytométrie en flux

A. Test de sénescence

Après traitements, les cellules sont trypsinées et lavées au PBS. 500 000 cellules sont fraîchement incubées dans du PBS-BSA 1% avec le réactif FDG (Fluorescein Di- β -Galactopyranoside, molecular probes) repris selon les instructions du fabricant. Après incubations

à 37°C pendant 15 min, les cellules sont reprises dans du PBS-BSA 1% froid puis marquées au dapi pendant 15 min. Les cellules sont ensuite rapidement passées au FACS (LSR II, BD Biosciences).

B. Marquage caspase 3 clivée

Pour ce marquage les cellules sont fixées avec 2% de formaldéhyde à température ambiante pendant 10 min, lavées au PBS puis incubées avec de l'éthanol froid à 70% pendant 20 min à -20°C. 500 000 cellules sont ensuite incubées avec un anticorps couplé dirigé contre la caspase 3 clivée (1:20, BD Biosciences 550821) pendant 1 hr à température ambiante et à l'obscurité. Un marquage dapi est effectué à la suite pendant de nouveau 1 hr à température ambiante et à l'obscurité, puis les échantillons sont analysés par FACS (LSR II, BD Biosciences).

C. Marquage ROS

Après traitement, les cellules sont trypsinées et lavées au PBS. 500 000 cellules sont fraîchement incubées avec le réactif DCFDA (Molecular probes, C6827) comme indiqués par le fournisseur. Après 10 minutes d'incubations à 37°C, les cellules sont lavées avec du PBS froid avant d'être analysées par FACS (LSR II, BD Biosciences).

III. Test de clonogenicité

Les cellules HT29Ras et RasL sontensemencées à 250 cellules/mL en plaque 6 puits et incubées à 37°C dans 5 % de dioxyde de carbone. Les cellules adhérentes sont traitées pendant 8 jours avec 50ng/mL de doxycycline et 2,5mM de 3-MA (IC50), lavées au PBS et marquées avec 0,1% de cristal violet. Les colonies sont ensuite lavées 3 fois avec de l'eau et les colonies excédents 50 cellules sont visualisées à l'aide de l'imajeur Bio-Rad Chemi Doc XRS, et comptées à l'aide du logiciel Quantity One (Bio-Rad). Le pourcentage de survie est déterminé par le ratio du nombre de colonies observées avec le traitement avec le nombre de colonies de la condition non-traitée. De la même manière, les cellules LS174T sontensemencées à 750 cellules/mL en plaque 6 puits et incubées à 37°C dans 5 % de dioxyde de carbone. Les cellules adhérentes sont traitées pendant 8 jours avec 5ng/mL de sn38 et 1,5mM de 3-MA (IC50), lavées au PBS Ces cellules nécessite une fixation avec 2% de formaldéhyde pendant 10 min avant d'être marquées avec le cristal violet pendant 10 autres minutes. Les colonies sont lavées à l'eau puis révélées comme décrit ci-dessus.

IV. Microscopie

Les cellules sont mises en cultures sur des lamelles de microscopies puis traitées selon les temps indiqués. Les cellules qui ont proliférées sur la lamelle sont fixées avec 2% de formaldéhyde pendant 12 min, lavées 3 fois au PBS, puis incubées avec de l'éthanol 70% à -20°C pendant 20 min. Les cellules sont de nouveau lavées 3 fois au PBS avant d'être incubées avec une solution de PBS-BSA 2% pendant 10 min à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées avec un anticorps dirigé contre LC3 (1:100, cell signaling, 2775) pendant 3h à température ambiante, sous atmosphère humide et à l'obscurité. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS, incubées 10 min dans du PBS-BSA 2% puis incubées avec un anticorps secondaire alexa 488 anti-rabbit (1:200, invitrogen, A11008) pendant 1h à température ambiante, sous atmosphère humide et à l'obscurité. Les cellules sont alors lavées 3 fois au PBS puis montées sur lame à l'aide d'un milieu de montage contenant du dapi (Prolong Gold Antifade Reagent with DAPI, Invitrogen, P36935). La fluorescence des cellules est observée sous un microscope confocale (Nikon Eclipse E600 with camera AxioCam MRm). Le nombre et la taille des vésicules sont évaluées par l'utilisation du logiciel libre ImageJ).

V. Western blot

Après le traitement, les cellules sont lysées en tampon SDS (50 mM Tris-HCl pH 8,1 ; 1% SDS ; 10 mM EDTA ; 1 mM PMSF ; 10 µg.ml⁻¹ aprotinine ; 10 µg.ml⁻¹ leupeptine ; 10 µg.ml⁻¹ pepstatine ; 1 mM Na₃V04 ; 50 mM NaF) à 4 °C, puis les extraits sont soniqués. Les protéines sont dosées par dosage BCA, es concentrations protéiques des échantillons sont ajustées et un tampon de charge est ajouté puis les échantillons sont migrés sur gel SDS page. Après la migration, les protéines sont transférées sur des membranes en polyvinylidène fluorure (Millipore Corporation) par transfert demi-sec (Trans-blot® SD, Bio-rad). La membrane est saturée dans du TBS 0,05 % tween avec 5 % de BSA pendant 30 min à RT puis rincée dans du TBS-tween et incubée pendant la nuit à 4°C avec 200 ng.ml⁻¹ d'anticorps primaire anti-LC3 (Cell Signaling, 2775), anti- α Tubuline (B7) (Santa Cruz, sc-5286), anti-NF- κ B2 (upstate, 05-361), anti-HRAS (Santa Cruz, sc-29), anti-p21 (Cell Signaling, 2947), anti-RelA (Santa Cruz, sc-372), anti-RelB (Santa Cruz, sc-226), anti-cRel (Santa Cruz, sc-70), anti-NF- κ B1 (Upstate, 06-886), anti-HCS70 (Santa Cruz, sc7298), anti-lamine (Santa Cruz, sc7293), anti-tubulin (Santa Cruz, sc-5286). Après rinçage, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire (40 ng.ml⁻¹) couplé à la peroxydase pendant 45 min à température ambiante puis les protéines sont visualisées à l'aide d'un réactif de détection (Amersham Pharmacia Biotech). La visualisation des protéines marquées se fait par réaction d'ECL à l'aide du ChemiDoc XRS (Bio-rad, Hercules, CA).

VI. Extraction nucléaire et cytoplasmique

Après traitement, les cellules sont lysées à 4°C en tampon A (10 mM Herpes pH 7,9 ; 10 mM KCL ; 1,5 mM MgCl₂ ; 1 mM PMSF ; 10 µg/ml aprotinine ; 10 µg/ml leupeptine ; 10 µg/ml pepstatine ; 1 mM Na₃V04 ; 50 mM NaF) et incubées sur roue à 4°C pendant 15 min. Trois cycles de congélation à l'azote et décongélation à 37°C sont effectués, et après centrifugation à 2000 rpms pendant 5 min le surnageant correspondant à la fraction cytoplasmique est récupéré. Le culot nucléaire est lavé 2 fois avec du tampon A en éliminant le maximum de surnageant, avant d'être repris dans un tampon C (20 mM Herpes pH 7,9 ; 0,4mM KCL ; 1,5 mM MgCl₂ ; 0,2 mM EDTA, 25% glycerol ; 1% Igepal ; 1 mM PMSF ; 10 µg/ml aprotinine ; 10 µg/ml leupeptine ; 10 µg/ml pepstatine ; 1 mM Na₃V04 ; 50 mM NaF) et incubé sur roue pendant 30 min à 40C. Le lysat est sonicé puis centrifugé pendant 10 min à 12 000 rpms à 40C, et le surnageant correspondant à la fraction nucléaire est récupéré. Les fractions sont dosées et préparées pour être analysées par western blot.

VII. Analyse de l'expression des gènes par PCR quantitative en temps réel

A. Transcription inverse

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

B. PCR quantitative en temps réel

Les amplifications d'ADNc des gènes étudiés sont réalisées par PCR en présence de SYBR Green avec le ABI PRISM 7300 real time PCR system (Applied Biosystems). La PCR est réalisée dans un volume réactionnel de 10 µl final, comprenant 4,5 µl d'ADNc dilués au vingtième, 500 mM de chaque amorce (Eurofins Biotech,), 4 mM de MgCl₂, et le tampon LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostic) qui contient le SYBR green, les dNTPs et une

HotStart Taq polymérase). Les amorces utilisées sont les suivantes : ULK1 (5'-GGTCGCCGTCAAGTGCATTA-3' et 5'-CGTACAGGGCCACGATGTTT-3'), ATG2A (5'-TGCTCACCGACCACTGCA-3' et 5'-GAGGCCCAGCTCTGTGAGTC-3'), ATG2B (5'-CATACAGGCAGCTGCAGAGA-3' et 5'-GTCTACTGGCTGGTGGGCTA-3'), ATG4A (5'-TGAGCTGGTATGGATCTTAGGG-3' et 5'-ATCATCTGTCCACAGCGTAGC-3'), ATG4D (5'-ATGAAGGCACACCACTGAAAT-3' et 5'-TGAGCTTCAATTGCATCCTTAGA-3'), ATG5 (5'-AAGGAGGAGCCATAGCTTGGAGTA-3' et 5'-AATTCGTCCAAACCACACATCTC-3'), ATG7 (5'-TGCAATGTAGCTAGGACGTTGAT-3' et 5'-GCATTCACACCGGGGAATAT-3'), BECN1 (5'-CCAGGAACTCACAGCTCCAT-3' et 5'-CCTGGCGAGGAGTTTCAATA-3'), ATG9A (5'-GGCTGGAGAGGAGCACATAC-3' et 5'-CCCTGGGGGTGAATCACTA-3'), ATG9B (5'-AGGGTTTCAGGTGACCACAG-3' et 5'-CACTTGACCCTGCACTCTGA-3'), ATG12 (5'-AGTGGGCAGTAGAGCGAACA-3' et 5'-CGCCTGAGACTTGCAGTAATGTA-3'), ATG13 (5'-CGATCCAATGGTGAATCCTC-3' et 5'-ATCATGGGTATTGCCACTGC-3'), ATG14 (5'-AAAGACGGGTGTGAGAGACC-3' et 5'-ACCCATCGTCCTGAGAGGTA-3'), ATG16L2 (5'-GCCGGCCTATAACCATCTCT-3' et 5'-TGGGACTTGGTCTGAGTCAA-3'), SQSTM1 (5'-ACGGGGACTTGGTTGCCTTT-3' et 5'-CGCCGGCACTCTTTTTC-3'), DRAM (5'-TCAACCCCTTCCTCCCGTATAT-3' et 5'-CACCAATCCAAGCACTAAAGACAC-3'), G A B A R A P L 1 (5'-GGTCCCCGTGATTGTAGAGA-3' et 5'-GGAGGGATGGTGTGTGTGAC-3'), LC3 (5'-AGAGCAGCATCCAACCAAAATCCCG-3' et 5'-TGCTGTGTCCGTTACCAACAGG-3'), WIPI2 (5'-GAAAGAAAAACCCCGAGAGG-3' et 5'-CTCTGCCCTGGTTGAACATT-3'), UVRAG (5'-TGCCCGGAACATTGTTAATAGAAA-3' et 5'-ACGTGGGATTC AAGGAATTGTTAA-3'), P R K A G 1 (5'-GAAGCAGAGGTTACCCGACT-3' et 5'-AGGGCTTCTTCTCTCCACCT-3'). Le programme de PCR comporte 3 étapes : Une dénaturation initiale de 10 min à 95 °C, un programme d'amplification de 40 cycles (15 s à 95 °C, 11 s à 55 °C, 22 s à 72 °C), avec une lecture unique de la fluorescence du SYBR green en fin de chaque élongation, et un programme de courbe de fusion (dénaturation à 95 °C, renaturation des brins d'ADN par abaissement de la température à 65 °C pendant 30 s, puis dénaturation lente par élévation de la température de 65 °C à 95 °C à 0,1 °C/s, avec une lecture de la fluorescence en continu). La courbe de fusion à la fin du programme permet de vérifier la spécificité de chaque amplification. La quantification relative de l'expression génique est réalisée par la méthode de comparaison des CT (cycle seuil). Le niveau d'expression des gènes est normalisé avec le gène de ménage endogène RPLPO et le facteur d'amplification est calculé en considérant que l'efficacité de PCR est proche de 100 %.

VIII. ImmunoPrécipitation de Chromatine (ChIP) et ReChIP

Les cellules sont cultivées en boîtes 15 cm, deux boîtes 15 cm permettent d'effectuer 3 immunoprécipitations. Les cellules sont fixées directement dans le milieu de culture avec 1 % de formaldéhyde final. Après 10 minutes, les cellules sont lavées avec une solution de PBS froid puis lysées dans 500 μ l de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 8,1 ; 1 % SDS ; 10 mM EDTA ; 1 mM PMSF ; 10 μ g.ml⁻¹ aprotinine ; 10 μ g.ml⁻¹ leupeptine ; 10 μ g.ml⁻¹ pepstatine ; 1mM Na₃V04 ; 50mM NaF). La chromatine est sectionnée en fragments d'environ 500 pb puis les échantillons de chromatine sont dilués avec un volume de tampon de dilution (2 mM EDTA ; 20 mM Tris-HCl pH 8,1 ; 1 % Triton X100 ; 0,1 % NP40 ; 150 mM NaCl ; 1 mM PMSF ; 10 μ g.ml⁻¹ aprotinine ; 10 μ g.ml⁻¹ leupeptine ; 10 μ g.ml⁻¹ pepstatine ; 1 mM Na₃V04 ; 50 mM NaF) et les risques d'aspécificité sont réduits par l'incubation pendant 2 heures à 4 °C sur une plate forme rotative avec un mélange de billes de protéine A-agarose et de protéine G-sepharose prétraitées avec de l'ADN de sperme de saumon. La chromatine est ensuite incubée avec 1 μ g d'anticorps pendant une nuit à 4 °C. La précipitation se fait avec le mélange de billes de protéine A-agarose et de protéine G-sepharose prétraitées avec de l'ADN de sperme de saumon, puis, les billes sont lavées et éluées dans un tampon d'éluion (1 % SDS ; 100 mM NaHCO₃). Pour les expériences de ReChIP, 25 μ l de tampon de ReChIP (Tampon de dilution, 10mM de DTT) est ajouté aux billes et incubé à 37°C pendant 50 minutes. L'échantillon est dilué 40 fois dans du tampon de dilution puis les étapes d'immunoprécipitation, de lavage et d'éluion sont une nouvelle fois réalisées comme précédemment. La chromatine est ensuite incubée pendant 5 h à 65 °C pour rompre les liaisons du complexe ADN-protéine-anticorps. L'ADN est avec un volume de phénol-chloroforme, précipité à l'éthanol, le culot d'ADN est ensuite séché à l'air libre puis dissout dans 100 μ l d'H₂O ultra-pure. Finalement, 4 μ l des échantillons d'ADN sont utilisés pour être amplifiés par RT-qPCR. Les séquences des primers peuvent être renseignées sur demande.

TITRE

NF- κ B2, régulateur de l'autophagie dans le cancer colorectal : Implication dans la sénescence induite par Ras et la chimiothérapie

RÉSUMÉ

La sénescence induite par l'oncogène (OIS) est un mécanisme suppresseur de tumeur conduisant à un arrêt de la prolifération en réponse au stress oncogénique. Cependant ce processus peut être inhibé lors de la tumorigenèse afin de pallier à l'arrêt du cycle et de favoriser une reprise de la prolifération. En réponse à l'expression de l'oncogène Ras, nous avons observé que le facteur de transcription NF- κ B2 est activé et régule de manière transcriptionnelle l'autophagie, un processus de dégradation et de recyclage des organelles défectueuses, nécessaire à l'établissement de la sénescence. De plus, nous avons également observé cette régulation de l'autophagie par NF- κ B2 en réponse à la sénescence induite par le sn38, une chimiothérapie utilisée dans le traitement du cancer du colon.

De manière surprenante, nous avons remarqué que les cellules qui échappent à la sénescence induite par Ras présentent toujours une activation de NF- κ B2. Lors de l'échappement, NF- κ B2 est soumis à une modification post-traductionnelle, la perte de la phosphorylation sur le résidu sérine 222, qui pourrait alors être responsable d'un défaut de l'autophagie permettant une diminution de la sénescence au profit d'une reprise de la prolifération.

Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus diagnostiqué chaque année chez l'homme et le deuxième chez la femme, avec plus d'un million de nouveaux cas par an. Il est important de diagnostiquer de manière précoce le cancer afin d'augmenter les chances de guérison. Grâce à une étude protéomique, nous avons identifié l'OLFM4 comme un marqueur des stades précoces des tumeurs colorectales. Nous avons également montré que l'expression de l'OLFM4 est corrélée à la mutation de l'oncogène Ras dans les tumeurs, et que son expression est régulée par la voie Ras et le facteur de transcription NF- κ B2.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère un rôle majeur de NF- κ B2 dans le cancer colorectal. L'activation de NF- κ B2 pourrait constituer un marqueur d'agressivité tumoral à travers la régulation de l'expression de l'OLFM4 et du phénotype de sénescence dépendant de l'autophagie.

MOTS CLÉS

NF- κ B2, autophagie, sénescence, échappement, OLFM4, cancer colorectal.

SPÉCIALITÉ

Biologie Cellulaire

Audrey Bélanger
INSERM U892 / CNRS 6299
Institut de Cancérologie de l'Ouest, Paul Papin
2, Rue Moll
49 933 ANGERS Cedex 09

TITLE

NF- κ B2, autophagy regulator in colorectal cancer : Implication in Ras and chemotherapy induced senescence.

ABSTRACT

Oncogene-induced senescence (OIS) is a tumor suppressor mechanism leading to cell cycle arrest. In response to oncogene Ras expression, we have observed that NF- κ B2 is activated and regulates transcriptionally the autophagy, a degradation pathway responsible for the recycling of damaged organelles and necessary for senescence establishment. Moreover, the regulation of autophagy by NF- κ B2 occurs also during sn38-induced senescence, a chemotherapy for colorectal cancer treatment. Interestingly, we have demonstrated that cells that escape from OIS still present an activation of NF- κ B2. During the OIS escape, the phosphorylation of NF- κ B2 on serine 222 is lost and could be responsible for an autophagy defect allowing a decrease of senescence in favor of proliferation recovery.

Colorectal cancer is the third leading cause of cancer death in France. It is important to diagnose cancer at early stages in order to increase the probabilities of recovery. Through a proteomic study, we have identified OLFM4 as new marker of the early stages of colorectal tumor. We have showed that the expression of OLFM4 is correlated with Ras mutation in tumors, and is regulated by the Ras-NF- κ B2 pathway.

All together, these results suggest a major role of NF- κ B2 in colorectal cancer. The activation of NF- κ B2 could represent a marker of tumoral aggressiveness through the regulation of the senescence-dependent autophagy phenotype and OLFM4 expression.

NF- κ B2, RÉGULATEUR DE L'AUTOPHAGIE DANS LE CANCER COLORECTAL : IMPLICATION DANS LA SÉNESCENCE INDUITE PAR RAS ET LA CHIMIOTHÉRAPIE

RÉSUMÉ

La sénescence induite par l'oncogène (OIS) est un mécanisme suppresseur de tumeur conduisant à un arrêt de la prolifération. En réponse à l'expression de l'oncogène Ras, nous avons observé que NF- κ B2 est activé et régule de manière transcriptionnelle l'autophagie, un processus de dégradation et de recyclage des organelles défectueuses nécessaire à l'établissement de la sénescence. De plus, la régulation de l'autophagie par NF- κ B2 a également lieu au cours de la sénescence induite par le sn38, une chimiothérapie utilisée dans le traitement du cancer du colon. De manière surprenante, nous avons remarqué que les cellules qui échappent à l'OIS présentent toujours une activation de NF- κ B2. Lors de l'échappement, la phosphorylation de NF- κ B2 sur la sérine 222 est perdue et pourrait être responsable d'un défaut d'autophagie permettant une diminution de la sénescence et une reprise de la prolifération.

Le cancer colorectal est la troisième cause de décès par cancer en France. Il est important de diagnostiquer de manière précoce le cancer afin d'augmenter la probabilité de guérison. Grâce à une étude protéomique, nous avons identifié l'OLFM4 comme un nouveau marqueur des stades précoces des tumeurs colorectales. Nous avons montré d'une part que l'expression de l'OLFM4 est corrélée à la mutation de Ras dans les tumeurs, et d'autre part que l'OLFM4 est régulée par la voie Ras-NF- κ B2.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère un rôle majeur de NF- κ B2 dans le cancer colorectal. L'activation de NF- κ B2 pourrait constituer un marqueur d'agressivité tumorale à travers la régulation du phénotype de sénescence dépendant de l'autophagie et de l'expression de l'OLFM4.

MOTS CLÉS

NF- κ B2, autophagie, sénescence, échappement, OLFM4, cancer colorectal.

NF- κ B2, AUTOPHAGY REGULATOR IN COLORECTAL CANCER: IMPLICATION IN RAS AND CHEMOTHERAPY INDUCED SENESCENCE

ABSTRACT

Oncogene-induced senescence (OIS) is a tumor suppressor mechanism leading to cell cycle arrest. In response to oncogene Ras expression, we have observed that NF- κ B2 is activated and regulates transcriptionally the autophagy, a degradation pathway responsible for the recycling of damaged organelles and necessary for senescence establishment. Moreover, the regulation of autophagy by NF- κ B2 occurs also during sn38-induced senescence, a chemotherapy for colorectal cancer treatment. Interestingly, we have demonstrated that cells that escape from OIS still present an activation of NF- κ B2. During the OIS escape, the phosphorylation of NF- κ B2 on serine 222 is lost and could be responsible for an autophagy defect allowing a decrease of senescence in favor of proliferation recovery.

Colorectal cancer is the third leading cause of cancer death in France. It is important to diagnose cancer at early stages in order to increase the probabilities of recovery. Through a proteomic study, we have identified OLFM4 as new marker of the early stages of colorectal tumor. We have showed that the expression of OLFM4 is correlated with Ras mutation in tumors, and is regulated by the Ras-NF- κ B2 pathway.

All together, these results suggest a major role of NF- κ B2 in colorectal cancer. The activation of NF- κ B2 could represent a marker of tumoral aggressiveness through the regulation of the senescence-dependent autophagy phenotype and OLFM4 expression.

KEY WORDS

NF- κ B2, autophagy, senescence, escape, OLFM4, colorectal cancer.