



HAL
open science

Chimiothérapie ciblant les cellules cancéreuses p53 déficientes

Mohamed Jemaâ

► **To cite this version:**

Mohamed Jemaâ. Chimiothérapie ciblant les cellules cancéreuses p53 déficientes. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA11T040 . tel-01085201

HAL Id: tel-01085201

<https://theses.hal.science/tel-01085201>

Submitted on 20 Nov 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université Paris-Sud XI
Faculté de Médecine
École doctorale « Cancérologie – Biologie – Médecine – Santé » (CBMS)

Thèse

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris-Sud XI

Présentée et soutenue publiquement par

Mohamed JEMAA

le 28 Septembre 2012

Chemotherapy targeting p53 deficient tumor cells

Jury

Pr. Eric DEUTSCH	INSERM U1030, IGR, Villejuif	Président
Pr. Guido KROEMER	INSERM U848, IGR, Villejuif	Directeur de thèse
Dr. Ariane ABRIEU	CNRS UMR 5237, CRBM, Montpellier	Rapporteur
Dr. Carmen GARRIDO-FLEURY	INSERM U866, Faculté de Médecine, Dijon	Rapporteur
Dr. Maria CASTEDO-DELERIEU	INSERM 848, IGR, Villejuif	Examineur
Dr. Nicolas TAJEDDINE	Institute Of NeuroScience (IoNS), Bruxelles	Examineur

INSERM UNIT U848 "Apoptosis, Cancer & Immunity"
Pavillon de recherche 1, Institut Gustave Roussy
39 rue Camille Desmoulins, F-94805 Villejuif cedex FRANCE

Si nous ne trouvons pas de chemin, nous allons le créer

Traversée des Alpes. 218 a.v. J.-C

HANNIBAL BARCA



Cette thèse a été réalisée en partie grâce aux financements des organismes suivants :

2009-2011

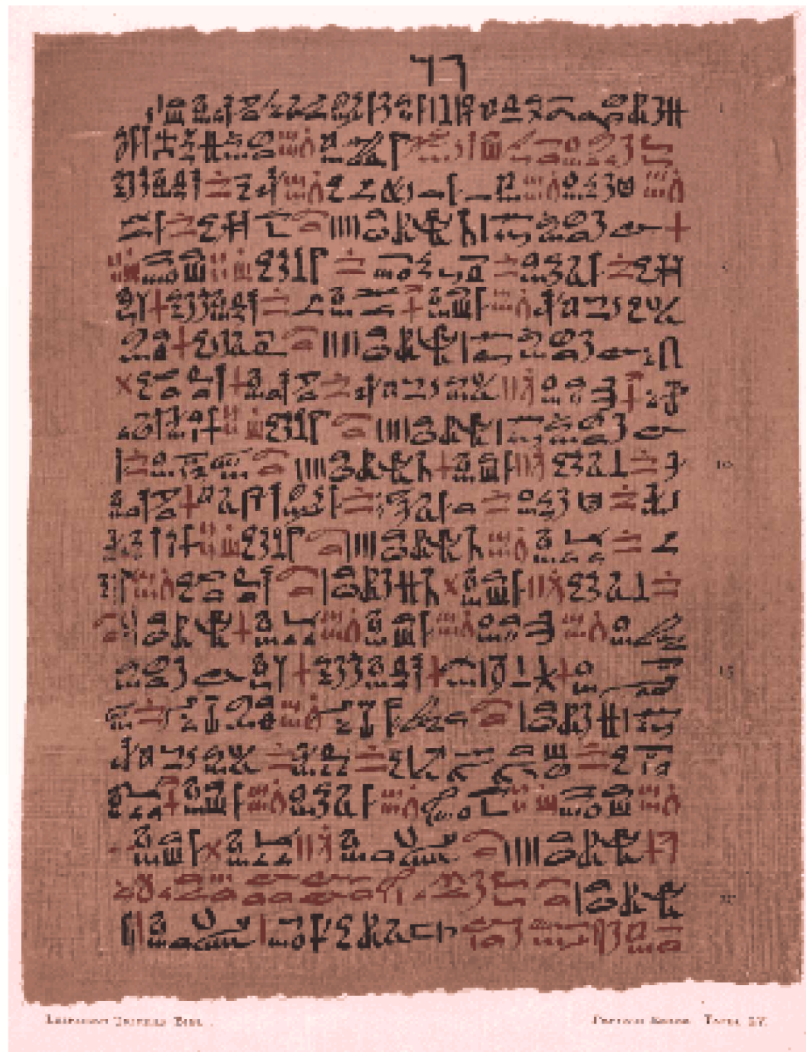
Canceropôle Île-de-France



2011-2012

Fondation de recherche médicale





Le Papyrus Ebers. Papyrus-Projekt. Bibliothèque universitaire de Leipzig. Allemagne

Le plus long traité de médecine découvert en Égypte. Il date de 1538 av. J.-C.

Il contient entre autre une description détaillée d'une combinaison de syndromes qui porte à croire qu'il s'agit d'un cancer du sein. Ce traité explicite aussi les moyens de traitement de telles maladies, essentiellement chirurgicales par excision avec des couteaux.

Michael R. Zimmerman. Villanova University. Pennsylvania. USA.

à mon papa, mon idole pour toujours
à ma maman, la plus belle femme au monde
à elias et mehdi, mes éternels petits frères
à reem, le reste c'est de la littérature

REMERCEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, **Guido KROEMER**, chef du laboratoire U848 "Cancer apoptose et immunité". Je lui suis reconnaissant pour ses encouragements et son enthousiasme. Il m'a inculqué un certain '*research lifestyle*' plein d'humour nécessaire pour pouvoir progresser. *So, what's new?*

Je tiens également à remercier le Professeur **Eric DEUTSCH** qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je remercie vivement les docteurs **Ariane ABRIEU** et **Carmen GARRIDO-FLEURY** qui ont accepté d'être mes rapporteurs, pour le temps précieux qu'elles m'ont accordé et leurs remarques très utiles qui m'ont permis d'enrichir ce manuscrit.

Je remercie le docteur **Nicolas TAJEDDINE** pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et évaluer mon travail.

Je suis reconnaissant à **Maria CASTEDO-DELERIEU**, de faire partie de mon jury de thèse, mais aussi pour son encadrement, sa bienveillance, et sa gentillesse tout au long de ces années de travail. *Bonjour patron.*

Je tiens à remercier le *Canceropôle Île-de-France* et la *Fondation pour la Recherche Médicale* en France, pour m'avoir accordé une bourse pendant toute la durée de ma thèse.

Ilio VITALE, non ti ringrazio perchè....sticazzi! e pure li mortacci di pipo...

Je voudrais aussi tirer mon chapeau au fils de Montmartre, **Didier METIVIER**, je ne pense pas que l'ambiance au labo aurait été pareille sans toi, grand jedi avec tes lasers et tes cytomètres.

Mes amis et collègues, gwen, gigi, alfio, lolo galluzzo, nonno, lauri, kepp, la parrocona, lo zingaro, mastro shoieb, guilllllermo, raza et abdul, et les autres...grazie.

Mes parents, ma famille, le malsounie, le petit mehdi, reem, je vous aime...

RESUME

L'altération génétique et/ou fonctionnelle de p53 est très répandue dans les cancers humains et est répertoriée dans plus d'un cas sur deux. Les traitements et molécules utilisés en chimiothérapie anticancéreuse induisent pour la plupart l'apoptose dépendante de p53 ce qui confère une résistance particulière aux tumeurs p53 déficientes. Nous avons développé des techniques se basant sur la vidéomicroscopie à haut débit et l'utilisation de cellules fluorescentes $TP53^{+/+}$ et $TP53^{-/-}$ pour mettre en évidence des agents chimiques qui ciblent les cellules p53 déficientes. Nous avons identifié SP600125, un inhibiteur de kinases dont MPS1, Aurora A et Aurora B, et qui tue préférentiellement les cellules tumorales $TP53^{-/-}$. Cette cytotoxicité sélective a été confirmée sur de nombreux modèles de cellules déficientes en p53 *in vitro* et *in vivo* sur des xénogreffes $TP53^{+/+}$ et $TP53^{-/-}$ injectés à des souris nudes. Nous avons utilisé une autre molécule qui a un spectre d'inhibition semblable à SP600125, la reversine, et nous avons aussi trouvé qu'elle a une cytotoxicité sélective envers les cellules p53 déficientes.

L'analyse vidéomicroscopique des cellules traitées nous révèle que la mort préférentielle des cellules P53 déficientes est intimement liée à un mécanisme de polyploïdisation. En effet, les cellules $TP53^{-/-}$ (contrairement à celles $TP53^{+/+}$) traitées effectuent des mitoses aberrantes sans karyokinèse ni cytokinèse qui ne sont pas contrôlées par un arrêt du cycle cellulaire. Ces cellules succombent par catastrophe mitotique après activation de la voie mitochondriale de l'apoptose. Cette observation concorde avec le fait que l'inhibition des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sensibilise les cellules traitées alors que l'inhibition des protéines BAX, APAF-1 et les caspases protège les cellules $TP53^{-/-}$ de l'effet cytotoxique de SP600125 et la reversine.

Ces résultats nous permettent d'envisager ces drogues (ou dérivées) dans la prévention des cas de tumeurs pré malignes et/ou dans le traitement des cas de cancers p53 déficients.

ABSTRACT

The genetic and/or functional alterations of p53 are highly prevalent in cancer and are reported for more than a half of all human cancers. Classic chemotherapy leads p53 mediated apoptosis conferring a drug resistance for p53 deficient cells. We developed in the laboratory a technique based on high-content videomicroscopy and fluorescent $TP53^{+/+}$ and $TP53^{-/-}$ cells for the screening of molecules that targets p53 deficient cells. We discovered that SP600125, a kinase inhibitor, including MPS1, Aurora A and Aurora B, kills p53-deficient cells more efficiently than their p53-proficient counterparts. This selective cytotoxicity was confirmed *in vivo* in mice carrying p53-deficient and -proficient human xenografts. Then after we used an another inhibitor with a similar broad-spectrum kinase, reversine, and we found that this molecule have a selective toxicity for $TP53^{-/-}$ cells and this result was confirmed *in vitro* for both molecule.

Videomicroscopy-based cell fate profiling revealed that the p53-deficient cell death is coupled to hyperploidy mechanism. Indeed, $TP53^{-/-}$ (but not $TP53^{+/+}$) undergo successive round of abortive mitosis and failed to arrest the cell cycle in response to treatment and cells became polyploidy and progressively succumbed to mitochondrial apoptosis. In line with this notion, the depletion of anti-apoptotic proteins of the BCL-2 family sensitized $TP53^{-/-}$ cells to the toxic effects of SP600125 and reversine. Moreover, the knockdown of BAX or APAF-1, as well as the chemical inhibition of caspases, limited the death of $TP53^{-/-}$ cells.

Hence, SP600125 or reversine (and its analogues/derivatives) might be used for cancer chemoprevention (for eliminating pre-malignant cells that have inactivated p53) or chemotherapy of p53-deficient cancers.

ABREVIATIONS

53BP 1 et 2: p53-binding proteins
A549: lung carcinoma
AIF: Apoptosis-Inducing Factor
Akt: sérine/ thréonine protéine kinase B
Apaf-1: apoptotic peptidase activating factor 1
APC/C: anaphase promoting complexe cyclosome
ARF: alternative reading frame
ASPP1/2: apoptosis-stimulating proteins of p53
ATM: Ataxia Telangiectasia mutated gene
ATR: Ataxia Telangiectasia and Rad3 related gene
AURKA: aurora A
AURKB: aurora B
BAG-1: Bcl-2 associating athanogene-1
Bak: Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax: Bcl2-associated X protein
Bcl-2: B-cell leukemia gene 2
Bcl-xl: Bcl-2 family member
BFGF: Basic Fibroblast Growth Factor
Bid: A BH3 domain-only death agonist protein
BLM: Bloom syndrome
BRCA1/2: Breast cancer early onset gene
BUB 1/ 2: Budding ininhibited by benzimidazole
Calu-1: human nonendocrine lung carcinoma
CDK: Cyclin Dependent Kinase
cDNA: complementary DNA
CENP-E et CENP-F: centromere associated protein
Chk 1/2: Checkpoint kinase 1/2
CHO: Chinese Hamster Ovary
CKII: casein kinase II
c-myc: Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog
COP1: Constitutively photomorphogenetic protein 1.
DBD: DNA bounding domain
DEC1: Differentiated embryo chondrocyte 1
DIABLO: Direct IAP binding protein with low pI
DISC: Death-inducing signalling complex
DNA: Desoxyribonucleic acid
DRAM: Damage-regulated Autophagy modulator
E: Early
E2F: Transcription factor family including E2F- and DP-like subunits
EdU: 5-ethynyl-20-deoxyuridine, a thymidine analog
EGFR: Epidermal growth factor receptor
ER: Reticulum Endoplasmic
FADD: Fas-associated death domain
FAS: TNF superfamily receptor 6
FISH: fluorescent in situ hybridization
Gadd45a: growth arrest and DNA damage gene 45a
GFP: Green fluorescent protein
GR: Glucocorticoid receptor
H1299: lung carcinoma
HCT 116: human colon carcinoma 116
HeLa: cervical carcinoma
HIPK2: Homeodomain-interacting protein kinase 2
HPV: Human Papillomavirus
HSP70: Heat shock protein70
IGF -BP3: insulin-like growth factor Binding Protein 3

JNK: Jun N-terminal kinase
kDa: Kilo Dalton
KO: knock out
MAD1/2 : mitotic arrest deficient 1 et 2
MCC: mitotic checkpoint complex
MCF-7: Breast Cancer Cell Line
McL1: Myeloid cell leukaemia-1
MDA MB-231: Breast Cancer Cell Line
MDM2: Murine double minute 2, a p53-associated oncogene
MDR1: human multidrug resistance
MIP1: Mps1 interacting protein 1
MPF: maturation promoting factor
MPM2: Mitotic Protein Monoclonal 2
MPS1: Monopolar spindle 1
mRNA: Messenger RNA
MST-1: mammalian sterile 20-like kinase 1
NCI: National Cancer Institute
NES: nuclear export signal
NFKB2: Nuclear factor κ B 2
NLS: nuclear localization sites
Noxa: Damage protein, a pro-apoptotic BH3-containing protein
OD: Oligomerisation domain
P300: A histone acetyltransferase
WT-1 : gène suppresseur de la tumeur de Wilms
P53: protein 53
PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1
PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC: protein kinase C
PLK1: Polo-like kinase1
PML: promyelocytic leukemia
Ptp^{rv}: protein tyrosine phosphatase receptor type 5
PUMA: p53 upregulated modulator of apoptosis
RB: rétinoblastome
RD: regulation domain
RFP: red fluorescent protein
RIP1: receptor interacting protein kinase 1
RKO: human colon carcinoma
SAC: Spindle Assembly Checkpoint
Saos-2: osteosarcoma
SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SKOV: ovarian cancer
Smac: Second mitochondria-derived activator of caspase
SPB: spindle pole body
SV40: Simien Virus 40
TAD: Transactivation domain
TNF-R: tumor necrosis factor receptors
TTK: tyrosine and serine/threonine kinase
U2OS: human osteosarcoma cell line
UV: Ultra violet
WT: Wild type
YY1: Yin Yang 1
Z-VAD: fmk Benzylloxycarbonyl-VAD-fluoromethylketone
 $\Delta\Psi$ m: Mitochondrial transmembrane potential

Table des illustrations et des tableaux

Figure 1: Régulation cellulaire des signaux de stress médié par p53.

Figure 2: Structure schématique de la protéine p53 avec ses 5 domaines fonctionnels actifs.

Figure 3: la sentence de p53.

Figure 4: Modèle d'apoptose médié par p53.

Figure 5: les points de contrôle du cycle cellulaire.

Figure 6: Mise en place du SAC.

Figure 7: les protéines du SAC et leurs domaines d'organisation.

Figure 8: distribution d'Aurora A et Aurora B dans les cellules mitotiques.

Figure 9: Structure générale en ruban du domaine catalytique de MPS1.

Figure 10: différents aspects de la catastrophe mitotique incluant des phénotypes d'apoptose, de nécrose et d'autophagie.

Tableau 1: sommaire des inhibiteurs publiés de MPS1.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
LE CANCER	2
LA TUMORIGENESE	2
P53	4
1/ Historique	4
2/P53 gardien de l'intégrité cellulaire	5
3/La structure de la protéine p53	6
4/La régulation de p53	7
a/Stabilisation de la protéine p53	7
b/L'activation de p53	8
c/La localisation cellulaire de p53	9
5/P53 et cancer	9
6/P53 dictateur et consul ?	10
7/Les fonctions de p53	13
a/ Induction de l'apoptose	13
Nécrose	14
b/ P53 et Autophagie	15
c/ P53 et l'induction de la sénescence	16
d/ P53, Checkpoint et arrêt du cycle	16
8/P53 et la résistance aux traitements anticancéreux	17
a/ Dérégulation du pathway en aval de p53	17
b/ Mutations du gène p53	18
Mutations dans p53 et gain de fonction	19
c/ Résistance des cancers avec un p53 WT	21
i/ Mécanismes de dégradation de p53	21
ii/ Mécanismes sous-régulant les modifications post-translotionnelles de p53	22
L'importance de la phosphorylation post-translotionnelle de p53	22
MECANISMES DE CONTRÔLES DU CYCLE CELLULAIRE	24
1/ Le Cycle de division cellulaire	24
2/ Les points de contrôle du cycle cellulaire	24
3/ Le Spindle Assembly Checkpoint (SAC)	25
a/ Les <i>MAD</i> kinase (mitotic-arrest deficient)	27
i/ <i>Mad2</i>	27
ii/ <i>Mad1</i>	27
iii/ <i>BubR1 (Mad3)</i>	27
b/ Les <i>BUB</i> kinase (budding uninhibited by benzimidazole)	28
i/ <i>Bub1</i>	28
ii/ <i>Bub3</i>	28
c/ Autres composant du Spindle Assembly Checkpoint	29
d/ Aurora B	29
i/ Autres fonctions de Aurora B	31
Fuseau mitotique	31
La correction des erreurs d'attachement lors de la bi-orientation des chromosomes	31
Cohésion des chromatides au niveau des centromères	31
Cytokinèse	31
e/ Aurora A	32
f/ MPS1	33
i/ Mps1 et le SAC	33
ii/ Autre fonctions de Mps1	34
Duplication et organisation des centrosomes	34
Mps1 et la réponse au stress génotoxique	35
Mps1 et la cytokinèse	35
Mps1 et la méiose	36

iii/ La structure de la protéine Mps1	36
iv/ Les inhibiteurs de Mps1	36
v/ Mps1 est dérégulée dans les tumeurs	38
LA CATASTROPHE MITOTIQUE	41
1/ Morphologie de la catastrophe mitotique	41
2/ Définition fonctionnelle de la catastrophe mitotique	42
3/ L'induction de la catastrophe mitotique	43
4/ L'exécution de la catastrophe mitotique	44
5/ Catastrophe mitotique et cellules tumorales	44
RESULTATS	45
SELECTIVE KILLING OF P53-DEFICIENT CANCER CELLS BY SP600125	46
PREFERENTIAL KILLING OF P53-DEFICIENT CANCER CELLS BY REVERSINE	50
DISCUSSION	52
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	58
PAPIERS	77

INTRODUCTION

LE CANCER

Le cancer est une maladie aussi vieille que l'humanité et des traces de sa description ont été reportées dans des manuscrits de l'antiquité, le plus vieux reste une description d'un cancer du sein dans un document égyptien qui date d'environ 1500 ans av J.-C., le Papyrus Ebers, et beaucoup plus récemment, l'équipe de Michael Zimmerman a identifié un cancer du rectum dans une momie égyptienne (David & Zimmerman).

De nos jours le cancer au sens large est un terme commun pour un ensemble de maladies qui sont caractérisées par une croissance anormale des cellules. Il existe en effet au moins 200 types différents de cancer, autant que de types différents de cellules dans le corps humain. Le cancer tue quand il diffuse dans l'organisme et empêche le fonctionnement normal des organes vitaux. Il représente un vrai problème de santé publique à l'échelle mondiale, l'organisation mondiale de la santé OMS estime à 13% la mortalité due au cancer de part le monde. www.who.int/mediacentre/index.html. Le traitement contre cette maladie est en constante progression et il est le sujet de recherches intenses ces dernières décades permettant une meilleure compréhension des mécanismes responsables de la progression tumorale et en conséquent un meilleur développement des moyens de lutte contre la maladie et de prise en charge des patients.

LA TUMORIGENESE

La progression tumorale est un processus complexe gouverné par une série d'altérations arbitraires du DNA, génétiques et épigénétiques. Les altérations génétiques incluent les mutations ponctuelles, les délétions, et les translocations et amplifications chromosomiques alors que les altérations épigénétiques comportent des méthylations du DNA ou encore un changement de l'empreinte génomique (Feinberg & Tycko, 2004). La majorité des cancers partagent six propriétés communes et qui sont essentielles pour la transformation des cellules normales en cellules malignes, à savoir l'autosuffisance des signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux d'anti-croissance, l'évasion du programme de mort programmée, un potentiel de réplication non limité, une angiogenèse soutenue et une invasion tissulaire après rupture des mécanismes de défenses anticancéreuses de l'organisme (Hanahan & Weinberg, 2000). Ces changements impliquent l'activation d'oncogènes, l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs et des gènes de réparation du DNA. Un gène clef dans ce processus est le gène suppresseur de tumeur p53. En effet, dans les conditions de stress, la protéine p53 suppresseur de tumeur joue un rôle central dans la défense de l'intégrité cellulaire. Elle peut agir en tant que facteur de transcription en stimulant l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués, entre autres, dans l'apoptose,

l'arrêt du cycle cellulaire ou la réparation de l'ADN et protéger ainsi l'organisme contre la propagation de cellules potentiellement précurseurs de tumeurs (Gatz & Wiesmuller, 2006). Ceci explique la corrélation qui existe entre cancer et inactivation de p53. En effet, le gène p53 est muté dans près de la moitié des cas de cancers humains. Or la plupart des traitements anti-tumoraux agissent *via* une voie p53 dépendante par arrêt de croissance et/ou induction d'apoptose. Par conséquent, l'absence de p53 confère une grande résistance aux cellules cancéreuses *TP53^{-/-}* et peut conduire à un échec thérapeutique (Vousden & Lane, 2007).

Cette thèse s'inscrit dans l'optique de l'identification d'agents pharmacologiques capables de tuer spécifiquement les cellules cancéreuses p53 déficientes ainsi que dans la caractérisation des mécanismes d'action antiprolifératifs ou pro-apoptotique de ces agents.

1/ Historique

Durant les années 1960 et 1970 quand les études sur les tumeurs viro-induites et les oncogènes représentaient la voie à suivre dans la recherche sur le cancer, plusieurs groupes ont reporté l'existence d'une protéine qui était surexprimée dans plusieurs tumeurs. Cette protéine, avec un poids moléculaire approximatif de 53 kDa fut baptisée p53 (protein 53) (Levine & Oren, 2009). Cette nomenclature désigne aussi le gène.

Initialement, p53 a été identifiée en complexe avec l'antigène T des cellules transfectées par le virus simian 40 (SV40) (Lane & Crawford, 1979). Cette fixation a conduit les chercheurs à démontrer la capacité de p53 à se lier à d'autres

Le poids moléculaire de p53 a été largement surestimé due à la présence d'une région riche en proline qui retarde la migration de la protéine dans les gels de SDS-polyacrylamide. La masse réelle de p53 est de 43,7 kDa. Mais, "Who would dare change a winning name ?"

oncoprotéines produites par d'autres virus causant des cancers, le papillomavirus HPV et sa protéine E6 ou encore l'adénovirus E1B et sa protéine 55K comme exemples (Werness et al, 1990) ; (Zantema et al, 1985). Parallèlement il a été démontré que p53 participe avec l'oncogène ras à la transformation des fibroblastes embryonnaires de rat (Eliyahu et al, 1984). L'ensemble de ces travaux a permis d'échafauder une hypothèse stipulant que p53 est un nouvel oncogène dont la surexpression est associée à la transformation cellulaire quand il est co-exprimé avec des oncoprotéines virales ou des mutants de ras. La découverte que p53 n'est pas un oncogène mais son frère ennemi "gène suppresseur de tumeurs" a pris un certain temps pour s'affirmer. En effet, il a été démontré que la suexpression de p53 dans les tumeurs et le résultat de l'accumulation de mutants de p53. Ces mutations faux-sens dans le gène p53 provoquent des transformations cellulaires (Jenkins et al, 1985). D'un autre coté, les cDNA de p53 extraits de première heure, tous clonés à partir de tumeurs, étaient pour la grande majorité des dominants négatifs avec d'importantes mutations altérant le fonctionnement de la protéine "sauvage" WT.

D'autres observations ont consolidé cette tendance, en effet, certains stress cellulaires comme par e.g. le DNA damage causé par les irradiations UV ou des traitements chimiques augmentent le niveau d'expression de p53 WT dans cellules murines non transformées (Maltzman & Czyzyk, 1984). Ces stress cellulaires engendrent un arrêt forcé du cycle des cellules et/ou le déclenchement du processus de la mort programmée.

2/P53 gardien de l'intégrité cellulaire

L'étiquette p53 suppresseur de tumeurs a été définitivement retenue quand des chercheurs ont démontré que des souris p53 déficientes étaient capables de développer des tumeurs spontanément (Donehower et al, 1992). Les souris p53 KO, malgré un développement normal, avaient une incidence élevée de sarcomes et de lymphomes en jeune âge. Chez l'Homme, des patients souffrant du syndrome de Li-Fraumeni présentent un risque accru de développer une variété de cancer dont des cancers des tissus mous, cancer du sein, des ostéosarcomes, des cancers du cerveau et du poumon (Malkin et al, 1990).

Il est maintenant bien établi que p53 est un gardien "loyal" qui assure l'homéostasie cellulaire. Le niveau de p53 dans les cellules normales est contrôlé par son inhibiteur majeur, MDM2, qui assure sa navette noyau-cytoplasme ainsi que sa dégradation (Momand et al, 1992).

Quand l'intégrité génomique est menacée par des désordres métaboliques ou génétiques (par e.g. l'activation d'un oncogène, le DNA damage, la privation de nutriment ou l'hypoxie), l'expression de p53 augmente et on passe d'une forme latente à une forme active qui, dépendamment de la nature du stress cellulaire et de la cellule elle-même, peut engendrer une série de réponses. Ce processus inclus l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation cellulaire, la sénescence, l'inhibition de l'angiogenèse et des métastases et probablement d'autres réponses cellulaires non encore mises en lumière (Vousden & Lu, 2002) ;(May & May, 1999). L'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose sont les deux mécanismes les plus étudiés (**Figure 1**). La

Le syndrome de Li Fraumeni est une affection génétique rare consistant en une prédisposition à diverses tumeurs lié à une mutation germinale du gène TP53.

fonction moléculaire de p53 a fait l'objet de recherches intensives durant les 30 dernières années. La première activité à être reportée fut son habilité à se lier au DNA sur des séquences spécifiques et d'une façon spécifique par son domaine centrale (Vogelstein & Kinzler, 1992). Quand p53 se lie au DNA via le polypeptide GAL4, elle assure une de ses fonctions majeures, à savoir la transcription de ses gènes cibles (Fields & Jang, 1990). En effet, plusieurs gènes cibles de p53 participent à une panoplie de réponses cellulaires qui sont directement responsable du "destin" final de la cellule stressée.

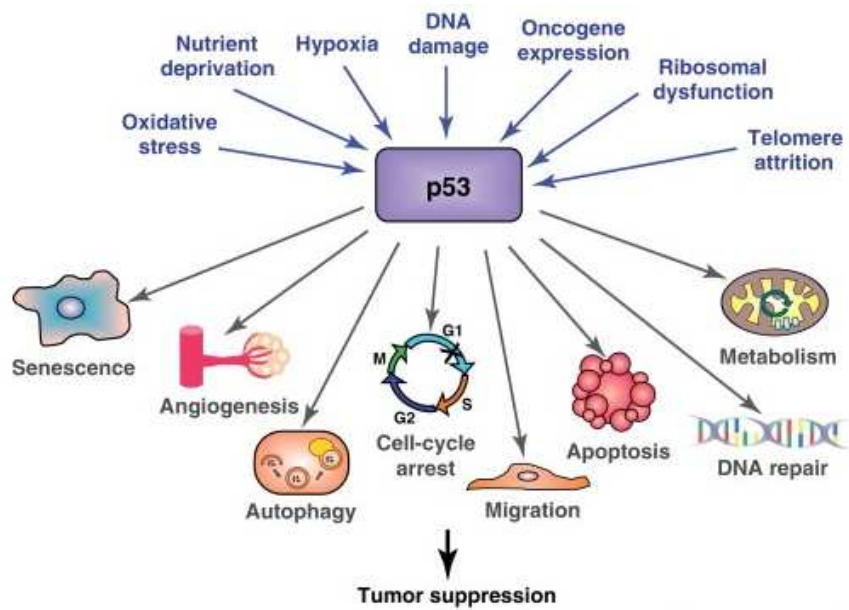


Figure 1 : Régulation cellulaire des signaux de stress médié par p53. Une panoplie de stress peut activer p53, et p53 peut répondre positivement ou négativement en régulant divers processus cellulaires qui peuvent contribuer à la suppression des tumeurs (Bieging & Attardi).

3/La structure de la protéine p53

Localisé sur le bras court du chromosome 17 (17p13) chez l'homme, le gène p53 code pour une protéine de 393 acides aminés. L'analyse de ces acides aminés a révélé l'existence de 5 régions très conservées et qui sont cruciales pour le bon fonctionnement de p53 (May & May, 1999). La protéine est composée de 4 domaines fonctionnels : un domaine N-terminal de transactivation (TAD), un domaine central de liaison au DNA (DBD), un domaine C-terminal d'oligomérisation (OD) et un domaine de régulation (RD) (**Figure 2**).

La caractérisation moléculaire des domaines fonctionnels de p53 a révélé plusieurs sites d'interactions avec d'autres protéines ou encore des sites de régulation post translationnelle. La stabilisation de p53 requiert une structure symétrique en tétramères, dimères ou de deux homodimères via l'oligomérisation domaine OD en C-terminal. La structure en tétramère est utile pour les fonctions de transactivation ou d'arrêt de croissance dépendantes de p53 (Pietenpol et al, 1994). Le TAD est important par contre pour le recrutement de la machinerie basique de

transcription (Lu & Levine, 1995) et plusieurs protéines virales ainsi que MDM2 se fixent sur cette région pour inhiber cette fonction de transactivation (Levine, 1997). Le domaine N-terminal comprend également une région riche en proline qui est sollicitée pour dans le déclenchement de l'apoptose (Sakamuro et al, 1997). La région centrale avec son domaine de liaison au DNA possède aussi la fonction d'interagir avec les protéines 53BP1 et 53BP2 ainsi que l'antigène T de SV40 (Gorina & Pavletich, 1996). Le domaine C-terminal est reporté comme impliqué dans l'apoptose, la régulation de la transcription et la reconnaissance du DNA damage (Wang & Prives, 1995). Et pour finir, il faut noter que la plupart des sites de localisation nucléaire (NLS) sont localisés en C-terminal (Dang & Lee, 1989).

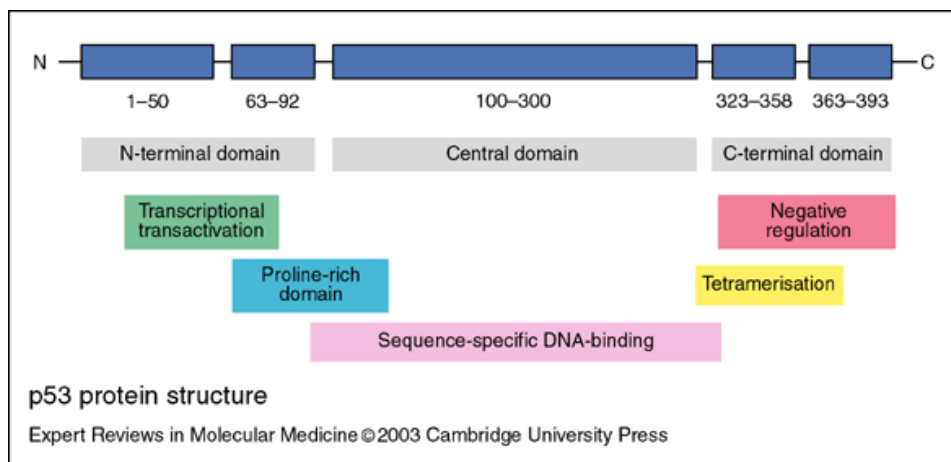


Figure 2 : Structure schématique de la protéine p53 avec ses 5 domaines fonctionnels actifs (Anzola & Burgos, 2003).

4/La régulation de p53

Quand p53 est activée, elle acquiert le droit de vie ou de mort de la cellule en induisant l'arrêt du cycle ou le déclenchement du processus apoptotique. C'est pour cela que dans les conditions normales, p53 est soumis à un contrôle strict que ce soit au niveau de l'expression (mRNA) ou même à l'échelle protéique. *A contrario*, dans des conditions de stress, p53 peut être sujette à des modifications incluant des phosphorylations, acétylations, ubiquitinations, glycosylations et autres en fonction du contexte cellulaire (Lavin & Gueven, 2006).

a/Stabilisation de la protéine p53

MDM2 possède un rôle central dans la régulation de p53. A l'origine identifiée comme surexprimée dans de nombreux sarcomes, il a été démontré *in vitro* que MDM2 interagit avec p53.

En effet, elle se fixe sur la partie N-terminale de p53, une région riche en site de phosphorylation et inhibe la transcription dépendante de p53 (Chen et al, 1993). Son mode d'action consiste après liaison à p53, à ubiquitiner la protéine et à la transporter du noyau jusqu'au cytoplasme, où elle sera dégradée par le protéosome (Gottifredi & Prives, 2001).

Par ailleurs, le promoteur de MDM2 est un site de liaison de la protéine p53 et de ce fait sa transcription dépend de p53 (Barak et al, 1993). Par conséquent, un taux élevé de MDM2 dû à une suractivité de p53 crée une boucle d'autorégulation de cette dernière. Ce rôle crucial de MDM2 dans la régulation de p53 est d'autant plus important que des embryons de souris MDM2 KO ne sont pas viables (Jones et al, 1995). Des études ont montré que le facteur de transcription YY1 joue un rôle clef dans la dégradation de p53 via MDM2 en facilitant l'interaction des deux protéines (Sui et al, 2004). D'autres kinases, des ubiquitine ligases, COP1 et Pirh-1, agissent aussi, d'une façon indépendante dans l'autorégulation de p53 et sa dégradation (Dornan et al, 2004), (Leng et al, 2003). D'un autre côté, la tyrosine kinase c-Abl régule positivement p53 en phosphorylant MDM2 et inhibant son interaction avec p53 (Goldberg et al, 2002).

b/L'activation de p53

La fonction de p53 comme DNA-ligand est aussi régulée par des interactions protéine-protéine et plus particulièrement par des modifications posttranslationnelles du type phosphorylation, acétylation et sumoylation. On peut citer par e.g. la famille des protéines ASPP, ASPP1 et ASPP2 qui interagissent avec p53 via son domaine central de liaison au DNA et l'activent pour induire l'apoptose (Samuels-Lev et al, 2001). De multiples modifications initient les réactions de liaison au DNA p53 dépendantes et la transactivation. La phosphorylation des domaines N-terminal et C-terminal de p53 par une multitude de kinases a été démontré. Après les régulateurs du DNA damage ATM et ATR, il a été aussi reporté que DNA-PK induit la phosphorylation de résidus serine sur la partie N-terminale de p53 qui sont nécessaires (mais pas suffisants) pour l'activité de liaison de p53 au DNA et la transcription des gènes cible (Woo et al, 1998). La phosphorylation de p53 sur des résidus serine en C-terminal par les CDKs, PKC ou CKII régule aussi la liaison de p53 au DNA *in vitro* (Bischoff et al, 1990), (Baudier et al, 1992), (Hall et al, 1996). Le domaine intracellulaire de Notch-1 se lie à p53 et inhibe sa phosphorylation et causant la régulation négative des cibles de p53 incluant p21, MDM2 et Bax (Kim et al, 2007).

c/La localisation cellulaire de p53

“L’export –import” nucléaire de p53 est un processus hautement contrôlé. La localisation nucléaire de p53 est nécessaire pour sa fonction transcriptionnelle. P53 contient 3 signaux de localisation nucléaire (NLS) permettant son importation nucléaire alors que son export hors du noyau dépend des signaux du même nom (Export nucléaire NES) (O’Brate & Giannakakou, 2003). L’export nucléaire de p53 vers le cytoplasme est nécessaire à sa dégradation. La perte de fonction de p53 dans quelques tumeurs (neuroblastome par exemple) est liée à un défaut d’accumulation dans le noyau. C’est dû à une hyperactivité de MDM2 ou du récepteur glucocorticoïde GR (Sengupta et al, 2000). Le complexe formé entre p53 et GR se trouve séquestré dans le cytoplasme et la dissociation de ce complexe *via* des GR antagonistes engendre l’accumulation de p53 dans le noyau, l’activation des gènes cibles de p53 et le déclenchement de l’arrêt du cycle cellulaire et l’apoptose. D’autres protéines interviennent directement ou indirectement dans l’export-import nucléaire de p53, on peut citer l’importin- α , PI3/Akt, p14ARF, pax, actin vimentin et mot2 (O’Brate & Giannakakou, 2003).

5/P53 et cancer

La fonction de p53 est dérégulée par de nombreuses mutations dans quelques 50 % de tous les cancers humains sporadiques et dans l’autre moitié la protéine est inactivée par différents antagonistes cellulaires ou viraux dont MDM2 (Soussi & Beroud, 2001), (Momand et al, 1998). En effet, les mutations de p53 sont l’événement génétique le plus fréquent dans un large spectre de cancers, leur fréquence varie selon les types de cancer (de +/- 10 % dans des tumeurs hématopoïétiques jusqu’à 50 à 70 % dans les cancers de l’ovaire ou les cancers colorectaux) (Brosh & Rotter, 2009). Des informations plus détaillées et régulièrement mises à jour sont disponibles sur le site <http://www-p53.iarc.fr/> ou <http://p53.free.fr/> .

Contrairement aux autres gènes suppresseurs de tumeurs qui sont pour la plupart inactivés par déplétion ou délétion, plus de 80 % des altérations observées sur p53 sont causées par des mutations faux sens dont le résultat est une protéine stable (Soussi & Lozano, 2005). Toutefois, la surexpression de ces formes mutées est constamment détectée dans les tumeurs humaines. Ces mutations sont distribuées sur tous les exons mais avec une prédominance dans les exons 5-8 qui codent pour le domaine centrale de liaison au DNA. Les mutations se produisent généralement sur un allèle alors que l’autre est perdu par hétérozygotie. D’autres mutations se produisent en mode d’activité dominant négatif et empêchent la bonne

oligomérisation des formes WT produites pour l'allèle non muté. D'autres observations suggèrent un processus oncogénique par gain de fonction (Oren & Rotter), 2010 (Harvey et al, 1995). Les mutants p53 peuvent activer des sous ensembles de promoteurs comme l'oncogène c-myc et MDR1. L'induction de ces gènes facilite la prolifération cellulaire et la résistance aux traitements chimiques (Frazier et al, 1998) ; (Sampath et al, 2001).

Comme mentionné plus haut, dans la moitié des tumeurs, l'inactivation de p53 n'est pas due à des mécanismes de mutation (*supra* p. 9), le pathway p53 est perturbé par l'activation des antagonistes de p53 ou via l'inactivation de ses inducteurs en amont. La surexpression de MDM2 via l'amplification du gène est une "stratégie" commune dans une grande variété de cancers. La dérégulation de MDM2 engendre une dégradation en continue de p53 et par conséquent des cellules avec un phénotype p53 KO. D'autres régulateurs sont tout aussi inhibés dans nombreuses tumeurs à savoir la protéine ATM impliquée dans la signalisation du DNA damage. Une fois dérégulée, ATM empêche la phosphorylation de P53 et MDM2 et annule l'activation de p53 induite par irradiation (Maya et al, 2001). Une autre DNA damage Checkpoint kinase, Chk2, est un effecteur essentiel de ATM, qui phosphoryle aussi p53 après irradiation γ et active l'apoptose (Hirao et al, 2000) et dont des mutations germinales ont été reportées chez des patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni sans mutations de p53 (Bell et al, 1999).

6/P53 dictateur et consul ?

Quand une cellule est confrontée à des menaces carcinogènes, elle active p53 et initie une série de processus : arrêter sa prolifération le temps de corriger les erreurs et les défauts survenus ou déclencher un suicide programmé afin d'éliminer la cellule endommagée. Se pose alors cette question cellulaire "existentielle" : *comment p53 décide la sentence entre la vie et la mort ?*

Cette balance est tributaire de la disponibilité de certains facteurs cellulaires et signaux extracellulaires. Premièrement, le type même du stress qui déclenche et active p53 et c'est la nature des dégâts dicte si oui ou non réparer ou mourir. Si les dommages sont extensifs, l'apoptose est la réponse privilégiée. *A contrario*, la présence d'un taux élevé de signaux de survie, comme les facteurs de croissances, ou d'interactions intercellulaires, confèrent aux cellules une résistance à l'apoptose. Deuxièmement, les événements moléculaires intracellulaires affectent de plusieurs façons p53 et par conséquent déterminent la nature de la réponse face au stress. Cela inclut la disponibilité et l'activité des régulateurs positifs et négatifs de p53. Les altérations génétiques qui caractérisent les cellules cancéreuses modulent aussi la réponse cellulaire

dépendante de p53, le génotype particulier des cellules tumorales gouvernent alors les événements biologiques due à l'activation de p53 (Oren, 2003).

P53 est avant tout un facteur de transcription, et les gènes qu'il cible codent pour des protéines qui contribuent à l'issue biologique de l'induction de p53. La transcription des fonctions propres à p53 complète le schéma de ces issues. Le choix entre la vie et la mort va dépendre de son habilité à "switcher" vers des sous ensembles de gènes, par exemple les inhibiteurs du cycle cellulaire, ou les gènes pro-apoptotiques.

Les premières études séparant ces deux fonctions de p53 viennent de l'analyse des mutants de p53 dérivés des tumeurs qui sont capables d'activer le promoteur de p21 et l'arrêt en G1 alors qu'elles n'activent pas celui de Bax ou de IGF-BP3 (Friedlander et al, 1996) ; (Ludwig et al, 1996). Ces mutants "non apoptotiques" ne reconnaissent pas les motifs de faible affinité des gènes pro-apoptotiques. Ce modèle de présence de sites de reconnaissances de hautes et faibles affinités sur les gènes cibles de p53 a été confirmé par plusieurs études (Szak et al, 2001) ; (Kaeser & Iggo, 2002).

Plusieurs autres mécanismes moléculaires interviennent dans la sélectivité de p53 de ses gènes cibles. Les modifications post-translationnelles de p53 affectent le choix des promoteurs. En effet, le changement conformationnel de la protéine modifie sa spécificité de se lier au DNA. Des data suggèrent que le facteur de transcription E2F1 en absence de p19ARF peut induire la phosphorylation de p53 sur de multiples sites et qui mime le signal du DNA damage. Il a été montré que ces modifications sur p53 sont cruciales dans la voie apoptotique *via* E2F1 (Rogoff et al, 2002). Un exemple d'acteurs qui favorisent la voie apoptotique sans induction de modifications covalentes de p53 est le coactivateur JMY de p300, qui dans des conditions de stress interagit avec p300 et est recruté pour activer p53, la transactivation de Bax et l'induction de l'apoptose (Shikama et al, 1999).

Bien que la majorité des études ait cherché à identifier les modulateurs pro-apoptotiques de p53, les facteurs qui modulent l'engagement de p53 vers l'arrêt de croissance, la réparation du DNA ou les gènes anti-apoptotiques ont été identifiés. Il a été démontré que le suppresseur de tumeurs WT-1 stabilise p53 et l'engage vers le processus d'arrêt du cycle et inhibe l'apoptose médiée par p53. De même, BRCA1 peut diriger p53 vers cette voie de réparation du DNA et arrêt du cycle et *a contrario*, après un DNA damage, p53 peut "switcher" vers l'apoptose en inhibant l'expression de BRCA1 (MacLachlan et al, 2000) (MacLachlan et al, 2002).

Le corépresseur mSin3a ainsi que l'histone déacetylase jouent un rôle important dans la répression de nombreuses cibles régulées par p53 et la transcription médiée par p53 et mSin3a a été reportée comme induisant l'apoptose (Murphy et al, 1999).

La présence de mSin3a dans des cellules surexprimant des protéines censées être réprimées par p53 facilite l'apoptose en favorisant l'inhibition de ces cibles par p53. De plus, la liaison de MDM2 au domaine N-terminal de p53 inhibe aussi cette répression en masquant le domaine d'interaction de p53 avec les cofacteurs de répression. Le suppresseur de tumeurs RB peut intégrer le complexe MDM2-p53 et prévenir la dégradation de p53. La formation de ce trimère contribue au regain de la fonction répressive de p53 et l'augmentation de l'apoptose (**Figure 3**) (Hsieh et al, 1999).

Le stress qui survient dans le réticulum endoplasmique (ER) causé par un "misfolding" de protéine induit un arrêt du cycle cellulaire médié par p53 et MDM2. En effet, le stress du ER stimule l'interaction entre MDM2 et des protéines ribosomales qui inhibent la dégradation de p53 par MDM2. Le rôle de p21 semble être important dans l'arrêt du cycle *via* le stress du ER (Zhang et al, 2006).

Les membres de la famille p53, p63 et p73 contribuent aussi au choix de la réponse apoptotique. P53 a besoins d'au moins un des ses homologues pour l'activation des gènes pro-apoptotique suite à un DNA damage (Flores et al, 2002).

La famille p53 comprend 3 gènes, p53, p63 et p73 présentant de fortes homologies de séquence et de structure. Ils dérivent d'un gène ancestral qui pourrait correspondre au gène p53-like, identifié chez *C.elegans* (Schumacher et al, 2001)

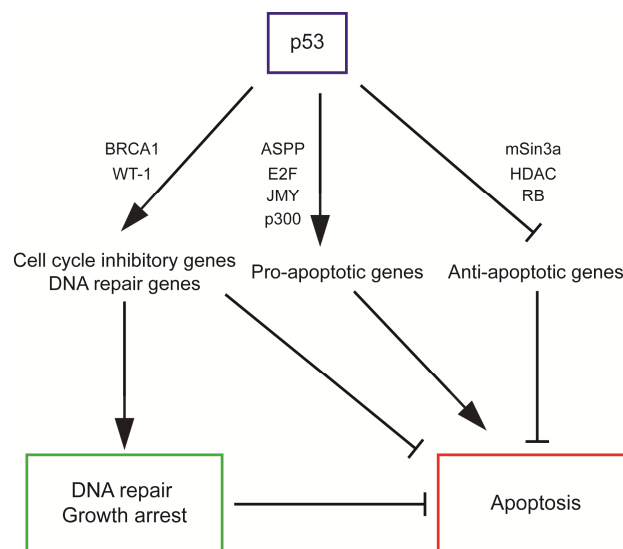


Figure 3 : la sentence de p53. Les coactivateurs, les corépresseurs ainsi que les modifications post-translacionnelles de p53 dictent le choix entre la vie est la mort.

7/ Les fonctions de p53

Les études génétiques réalisées *in vitro* (cellules en culture) ou *in vivo* (modèle murin) ont montré l'implication de p53 dans une multitude de fonctions, qui selon les circonstances, contribuent individuellement ou collectivement à l'action anti-tumorale de p53.

a/ Induction de l'apoptose

P53 peut induire l'apoptose de deux manières, *via* ou non un processus de transcription. Dans le processus transcriptionnel, deux pathways sont impliqués, l'un extrinsèque et l'autre intrinsèque. Dans le pathway extrinsèque, p53 induit la transcription des récepteurs de la famille TNF-R (Tumor Necrosis Family Recepteur), Fas, APO-1, CD95, DR5 et PERP (Schuler & Green, 2001). La liaison ligant-récepteur induit la formation des DISC (DISC : Death inducing signaling complex) ou complexe d'induction de la mort. Ce complexe est accompli par le recrutement des FADD (FADD : Fas associated death domain) ainsi que des caspases 8 et 10 après activation des caspases effectrices 3 et 7. Il en résulte la fragmentation inter-nucleosomique du DNA, signe *sine qua none* d'apoptose. Le pathway intrinsèque est activé à travers les mécanismes du DNA damage qui impliquent la voie mitochondriale, voie largement régulée par les protéines de la famille Bcl-2 (Schuler & Green, 2001). Ainsi, p53, après sa stabilisation et activation, se transloque dans le noyau et transactive les gènes pro-apoptotiques *Bax*, *Noxa*, *PUMA* et *Bid* (Haupt et al, 2003). *Bax* est le gène pro-apoptotique le plus important induit par p53, mais sa translocation mitochondriale et son fonctionnement dépend d'autres protéines pro-apoptotiques (Yu & Zhang, 2003). *Bax* peut former un complexe avec *Bak* sur la membrane mitochondriale externe et induire le relargage des cytochrome *c*, Smac/DIABLO et AIF (apoptosis-inducing factor) depuis l'espace mitochondriale inter membranaire vers le cytosol. L'apoptosome, complexe formé par le cytochrome *c*, APAF-1 (apoptotic protease factor 1) et la caspase 9 active les caspases 3, 6 et 7. Celle-ci vont induire la fragmentation du DNA (étape finale de l'apoptose) (Henry et al, 2002). Il faut noter que les deux pathways, intrinsèque et extrinsèque sont connectés via *Bid*, qui une fois clivé en t-*Bid* par la caspase 8 est transloqué dans les mitochondries et active par conséquent les protéines *Bax* et *Bak* (Haupt et al, 2003) (**Figure 4**).

Indépendamment de son rôle transcriptionnel dans l'induction de l'apoptose, p53 est elle-même transloquée dans la mitochondrie et interagit physiquement avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-x_L et Bcl-2 pour promouvoir la multimérisation (homo- ou hétéro-multimère) entre *Bax* et *Bak* (Erster & Moll, 2004) ; (Galluzzi et al, 2008). Ceci se passe rapidement et avant

que p53 ne commence son activité transcriptionnelle. De plus, p53 empêche la formation du complexe d'inhibition Bak-Mcl1 en se liant directement sur Bak (Erster & Moll, 2005). On peut résumer et dire que p53 perméabilise la membrane mitochondriale externe et permet le relargage des facteurs pro-apoptotiques dans le cytoplasme.

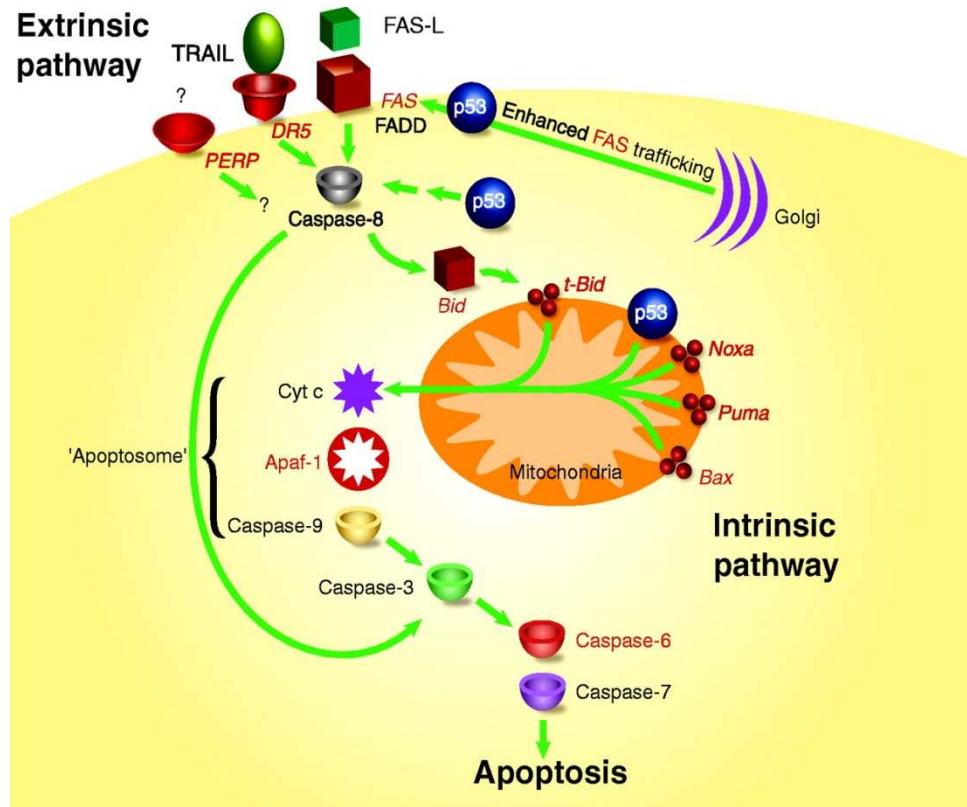


Figure 4 : Modèle d'apoptose médié par p53. Ce modèle trace le rôle de p53 dans les pathways extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. Les gènes cibles de p53 sont notés en rouge. La convergence des deux pathways à travers Bid est montrée (Haupt et al, 2003).

Nécrose

Il est important dans notre étude d'introduire le concept de la mort cellulaire nécrotique, ou nécrose, et ce dans le but de la comparer avec l'apoptose, le mécanisme principale de mort induite par p53.

La nécrose a été longtemps considérée comme une mort accidentelle des cellules due à des perturbations environnementales et associée à la décharge incontrôlée des facteurs pro-inflammatoires intracellulaires, mais de nouvelles données démontrent l'existence d'un pathway

caspase-dépendant au moment de l'exécution de la mort confortant ainsi la notion que la nécrose est plutôt une mort contrôlée et programmée (Zong & Thompson, 2006).

Morphologiquement, la nécrose se caractérise par une augmentation de la taille cellulaire (oncosis), le gonflement des organelles, la rupture de la membrane cytoplasmique et la dispersion et perte conséquente du contenu intracellulaire. D'un autre côté, lors de la mort apoptotique (*supra* p. 13), les endonucléases fragmentent le DNA dans des nucléosomes, alors que durant la nécrose c'est les exonucléases qui dégradent le DNA (Higuchi, 2003). C'est ce phénomène qui a longtemps servi à discriminer entre les deux morts. En effet, le profil de migration du DNA apoptotique sur gel d'agarose est très caractéristique et a une configuration redondante alors que celui nécrotique n'est qu'un « smear » avec une prévalence de fragments à hauts poids moléculaires.

La donne a changé et il est devenu clair que la nécrose est aussi un processus régulé, et lors de son induction et lors de son exécution (Golstein & Kroemer, 2005). Le terme « nécroptose » a aussi été utilisé pour définir une nécrose génétiquement contrôlée, et qui dépend souvent de l'activité serine/thréonine kinase du récepteur RIP1 (receptor interacting protein kinase 1) (Galluzzi & Kroemer, 2008). En effet, il a été démontré que RIP1 et RIP3 contrôlent le « switch » entre la mort apoptotique et nécrotique dans de nombreux modèles expérimentaux, *in vitro* et *in vivo* (Cho et al, 2009 ; Hitomi et al, 2008).

b/ P53 et Autophagie

L'autophagie est un processus catabolique où la cellule dégrade certaines de ses composantes via la machinerie lysosomale. Des études récentes ont démontré l'implication de p53 dans ce processus. P53 active l'autophagie par la transcription du *DRAM* (*damage-regulated autophagy modulator*) et produit donc les protéines lysosomales qui induiront l'autophagie (Crighton et al, 2006). D'un autre côté, il a aussi été démontré que p53 inhibe l'autophagie, en effet, l'inhibition de p53 dans des cellules énuclées augmente l'autophagie, et l'expression de p53 cytoplasmique réprime l'autophagie dans les cellules p53 déficientes (Tasdemir et al, 2008). Il est clair que p53 joue un double jeu dans le processus autophagique et que les mécanismes complexes qui le gèrent ne sont encore pas bien établis, d'autant plus que les travaux récents publiés suggèrent que l'induction de l'autophagie peut faciliter la progression de l'apoptose ou la sénescence (Crighton et al, 2007 ; Young et al, 2009).

c/ P53 et l'induction de la sénescence

La sénescence cellulaire est définie comme un arrêt permanent du cycle cellulaire et empêche l'immortalisation et la transformation des cellules avec un profil génétique instable (Itahana et al, 2001). La sénescence est définie comme un processus additionnel suppresseur de tumeur aux prémices ou pré-lésions cancéreuses (Stuhmer & Bargou, 2006). Les cellules sénescents restent métaboliquement actives mais acquièrent des changements morphologiques et physiologiques caractéristiques. Un grossissement de la taille, la condensation de la chromatine, des changements dans l'expression des gènes et une surproduction de β -galactosidase. Ce phénotype est le résultat de plusieurs formes de stimuli et de stress cellulaires comme par exemple le raccourcissement des télomères, des stimuli oncogéniques, des radiations ionisantes ou des agents induisant le DNA damage (Schmitt, 2007). P53 est le pivot de la régulation de la sénescence répllicative et prématurée (stress induite). Ce dernier type de sénescence est conduit par le pathway ATM/ATR-Chk2/Chk1-p53 avec l'implication de plusieurs marqueurs moléculaires en aval de p53 comme p21, PML, PAI-1 et DEC1 (Zuckerman et al, 2009).

d/ P53, Checkpoint et arrêt du cycle

La cellule possède un système élaboré de contrôle du cycle cellulaire. Ce système est sollicité après un stimulus de stress, DNA Damage par exemple, et active toute une machinerie du cycle cellulaire, des senseurs, transducteurs et effecteurs (Iliakis et al, 2003). Ce network intégré de signalisation du DNA damage engendre l'inhibition des Cdk (les cyclin-dependent kinase) et par conséquent le changement de la cinétique du cycle cellulaire. En effet, l'inhibition des différents complexes Cdk/cycline empêche ou ralentit la transition G_1/S , la progression de la phase S, la transition G_2/M ou les trois (Iliakis et al, 2003) ; (Samuel et al, 2002). Le rôle de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire a été dûment étudié et de nombreux régulateurs en amont et en aval de p53 ont été décrits (Giono & Manfredi, 2006). Des fibroblastes de souris MEF exposés à du DNA damage activent le pathway ATM/ATR qui induit l'activation de p53. P53 induit l'arrêt du cycle en G_1 en activant p21 qui à son tour va inhiber les complexes Cdk4/cyclin D et Cdk2/cyclin E. L'inhibition directe de p21 a elle seule débloquent le Checkpoint des cellules en phase G_1 mais pas aussi drastiquement qu'après l'inhibition de p53 suggérant l'implication d'autres effecteurs médiés par p53 dans le processus de l'arrêt de croissance (Brugarolas et al, 1995 ; Deng et al, 1995).

D'un autre côté, la progression cellulaire G₂/M est assurée par le facteur MPF (maturation-promoting factor) qui comprend le complexe cdc2/cycline B. P53 induit l'arrêt en G₂/M en perturbant le fonctionnement du complexe cdc2/cycline B. En effet, suite à un DNA damage, p53 réprime la phosphatase cdc25c qui a pour rôle d'induire la mitose (St Clair & Manfredi, 2006). Parallèlement, p53 transcrit activement 14-3-3σ, une protéine qui va empêcher la localisation nucléaire du complexe cdc2/cycline B. Par conséquent, une délétion de 14-3-3σ est létale après exposition à un DNA damage dans des cellules HCTT 116 (Chan et al, 1999).

D'autres cibles de p53 sont responsables de l'arrêt du cycle après un stimulus comme le DNA damage, notamment Ptpv (protein tyrosine phosphatase receptor type 5) qui induit un arrêt en G₁ et aussi Gadd45a qui contrôle et empêche la transition G₂/M (Biegging & Attardi, 2012).

8/P53 et la résistance aux traitements anticancéreux

On a déjà mentionné la prévalence des mutations de p53 dans les tumeurs humaines (*supra* p.9), il s'agit des mutations les plus fréquentes parmi les altérations génétiques décrites dans les cancers. Ceci montre à quel point p53 joue un rôle central dans les mécanismes de défenses anti-tumorales. En effet, si l'on considère que l'induction de la mort des cellules cancéreuses suit le chemin suivant (i) reconnaissance du DNA damage (ii) activation des kinases spécifiques (iii) stabilisation est activation de p53 (iv) activation des pathways en aval de p53 et finalement (v) l'exécution des programmes cytotoxiques on comprend l'importance capitale de p53 dans l'activation des mécanismes antiprolifératifs et pro-apoptotiques et l'efficacité des traitements anticancéreux.

Ce passage quasi-obligatoire par p53 est une arme à double tranchant dans le traitement des tumeurs, et par la chimiothérapie, et par radiothérapie. Plusieurs drogues et molécules ont été développées et utilisées en clinique. Elles ont un point commun qui est le passage par la voie p53. Alors lors d'une défaillance de la dite protéine ou d'un de ses subséquents pathways, des phénotypes de résistance aux traitements et de survie des cellules cancéreuses sont constatés.

a/ Dérégulation du pathway en aval de p53

La perturbation du pathway en aval de p53 peut se faire au niveau de l'activité même des produits de gènes cibles de p53 (p21, Bax et les caspases) ou dans l'expression ou la mutation des protéines interagissant avec p53. A titre d'exemple, p53, fonctionnelle, transactive p21 mais ce

dernier est inactivé par séquestration cytoplasmique via une Akt phosphorylation, et ceci conduit à une résistance des cancers de testicules et de l'ovaire à des agents anti-tumoraux comme le cisplatine (Koster et al, 2010 ; Xia et al, 2011). Dans ce cas précis, le mécanisme probable d'une telle résistance est la liaison de la forme phosphorylée de p21 sur les pro-caspase-3 et l'annulation de leur maturation en caspase-3, qui inhibe par conséquent l'apoptose (Suzuki et al, 1999). Bien que le gène p21 soit rarement muté, il peut influencer l'efficacité des thérapies engagées via d'autres mécanismes. Un rapport récent a démontré qu'un simple polymorphisme d'un seul nucléotide au niveau du codon 31 de p21 (dans 10% des patients souffrant de leucémie lymphocytaire chronique) est suffisant pour engendrer une résistance thérapeutique et une agressivité du cancer (Johnson et al, 2009). La réduction de l'expression de p21 consécutive à l'hyperméthylation du promoteur du gène dans leucémies lymphocytaires aigus diminue le taux de survie de 6 à 8% chez les patients comparativement à ceux dont le promoteur du gène p21 est hypométhylé et la protéine p21 normalement fonctionnelle (Roman-Gomez et al, 2002).

En apoptose, le but ultime des agents anti-tumoraux est d'activer les caspases et les endonuclease, qui dégradent le DNA et complètent les processus de la mort cellulaire. L'inhibition de l'activité des caspases engendre donc une résistance aux traitements. En effet, l'inactivation ou la dérégulation des caspase 3, 8 et 9 a été reportée et corrélée avec des formes de résistances aux drogues dans des neuroblastomes et des cancers de l'ovaire, du cou et de la tête ainsi que des cancers du sein (Kim et al, 2001 ; Duiker et al, 2011 ; Ding et al, 2000 ; Mueller et al, 2003 ; Kojima et al, 1998 ; Kuwahara et al, 2003).

b/ Mutations du gène p53

L'augmentation du risque de développer des tumeurs chez les patient souffrant du syndrome de Li-Fraumeni est directement lié à la perte de la fonction de suppression des tumeurs de p53 suite aux mutations germinales hétérozygotes de p53 (Smith et al, 2003 ; Lain & Lane, 2003 ; Lane & Lain, 2002 ; Petitjean et al, 2007). P53 est muté dans approximativement 50% des cancers humain, et cette perte de fonction a un impact sur l'incidence tumorale de plusieurs tissus. La perte de fonction de p53 engendre aussi une faible efficacité d'un large spectre de traitements cliniques contre les cancers par rapport aux mêmes traitements utilisés sur des tumeurs ayant un p53 WT (Mandinova & Lee, 2011 ; Goldstein et al, 2011). Ce contraste est clairement montré chez des patients en pédiatrie, souffrant de tumeurs du plexus choroïde. Ces enfants sont soumis à des cures de radiothérapie, traitement qui induit une réponse universelle et un pronostic de vie de plus de 5 ans chez les patients avec des tumeurs p53 WT alors que les

patients avec des tumeurs exprimant des formes mutées de p53 meurent dans les 6 mois (Tabori et al, 2010). Pareillement, des patients traités pour des stades avancés du cancer du sein avec le paclitaxel ou une combinaison de 5-fluorouracil (5-FU)/epirubicin/cyclophosphamide ne répondent pas au traitement quand les tumeurs sont p53 mutées alors que la réponse est de 45-64% quand la forme WT de p53 est exprimée (Schmidt et al, 2003) (Kandioler-Eckersberger et al, 2000).

La cytotoxicité basée sur le génotype de p53 a été étudiée également sur des modèles de lignées tumorales *in vitro*. L'étude la plus exhaustive est celle du NCI utilisant un panel de 39 lignées cellulaires avec un p53 muté et 18 avec un p53 WT couvrant 9 tissus différents et exposées à 123 agents et drogues anti-tumorales (O'Connor et al, 1997). Cette étude a démontré que la sensibilité moyenne des cellules p53 mutées au cisplatine, au 5-FU et à la bleomycine est 3 à 10 fois inférieure à celle des cellules avec un p53 WT. Une variation de la résistance dépendante de la drogue et de la mutation de p53 est à noter. En effet, toutes les mutations de p53 n'engendrent pas une résistance à n'importe quel agent anti-tumoral. A titre d'exemple, des cellules de cancer de poumon H1299 exprimant le mutant p53-R273H ne sont que très peu résistantes à l'etoposide mais montrent une grande résistance face au cisplatine, et les cellules exprimant le mutant p53-V143A ne sont pas résistantes au traitement avec le cisplatine, le paclitaxel ou encore le teniposide (Blandino et al, 1999 ; Bartussek et al, 1999).

Les mutations somatiques de p53 sont pour la plupart des mutations faux-sens et localisées dans la région de liaison au DNA, une seule mutation est donc capable de causer une perte de la fonction p53 (Vousden & Lu, 2002). Quatre positions dans p53 sont fréquemment mutées, ces points critiques sont localisés sur les acides aminés suivants : 175, 248, 249 et 273 et représentent plus de 25% de toutes les mutations faux-sens des cancers humains. Les mutations spécifiques de p53 sont sub-classées en mutations de contact et mutations structurales mais les deux empêchent les fonctions de transactivation pro-apoptotiques de p53 en empêchant la reconnaissance de p53 sur le promoteur de ses gènes cibles. Les mutations sur les positions 248 et 273 empêchent le contact direct de p53 sur le DNA sans pour autant affecter la conformation même de p53 alors que les mutations sur les sites 175 et 249 induisent des distorsions à l'échelle locale et/ou globale de la structure de p53 et empêchent par conséquent la liaison au DNA (Donzelli et al, 2008 ; Brosh & Rotter, 2009).

Mutation dans p53 et gain de fonction

Toutes les mutations de p53 n'engendrent pas uniquement des phénotypes de perte de fonctions mais peuvent dans certains cas induire de nouvelles fonctions, c'est ce qu'on appelle

gain de fonction. Ce type de mutations de p53 peut aussi induire des résistances thérapeutiques (Strano et al, 2007). Plus spécialement, les nouveaux effets biologiques des mutations de p53, par exemple sur les positions R175H, R175P, R248W, R249S, R273C ou R273L, induisent une activation ou répression de transcription de gènes qui ne sont pas normalement régulés par la forme WT de p53, on peut citer les gènes BFGF, EGFR, HSP70 et c-Myc (Brosh & Rotter, 2009 ; Song & Xu, 2007). Ces gènes, une fois dérégulés, sont impliqués dans la promotion de la croissance et la survie des cellules cancéreuse ainsi que le développement de résistances vis-à-vis à de nombreuses drogues et molécules thérapeutiques en inhibant l'apoptose dans une multitude de lignées cellulaire et chez les patients (Song et al, 2000 ; Jackman et al, 2010 ; Vargas-Roig et al, 1998 ; Leonetti et al, 1999).

D'un autre coté, le gain de fonction de p53 peut aussi inhiber l'interaction avec les promoteurs de quelques familles de gènes cibles de p53 et inhiber de fait la transactivation de ces gènes, on peut citer les gènes p63 et p73 (Brosh & Rotter, 2009). Ce genre de mutations inhibe les pathways antiprolifératifs et pro-apoptotiques.

Les mutations de p53 peuvent se produire sur un seul allèle, mais si le mutant p53 possède les caractéristiques d'un dominant négatif, sa seule présence dans le complexe tétramérique est suffisante pour inhiber les fonctions de p53 et induire les effets de gain de fonction. Avec ce genre de mutants, la résistance aux agents induisant le DNA damage se fait en régulant négativement les gènes antiprolifératifs et les pro-apoptotiques, par exemple FAS et MST-1, et en régulant positivement les gènes pro-prolifératifs et les anti-apoptotiques, BAG-1 et NFkB2 comme exemples (Brosh & Rotter, 2009 ; Xu, 2008). Ces nouvelles données nous montrent qu'il s'agit aussi d'une augmentation de résistance au traitement quand il s'agit de combinaisons de perte et de gain de fonction de p53 suite à des mutations que quand il s'agit seulement de perte de fonction. Des investigations ont été entrepris pour évaluer cette différence, des cellules p53 déficientes on été transfectées avec des p53 mutés, ou des cellules avec des p53 mutés on été transfectées avec des siRNA et les deux approches ont démontré que les cellules développent des résistances à un large spectre de molécules utilisées en chimiothérapie (Blandino et al, 1999 ; Brosh & Rotter, 2009 ; Strano et al, 2007 ; Pugacheva et al, 2002).

Le « knock-down » des formes muté gain-de-fonction de p53 sont proposées en clinique pour sensibiliser les tumeurs aux traitements, cela dit, cette sensibilisation reste partielle due a la persistance de la perte-de-fonction et des approches de conversion de gain-de-fonction en forme WT semble plus prometteuses. Le but ultime reste d'identifier des options thérapeutiques qui éliminent les cancers exprimant des formes mutées de p53 et cet effort est traduit entre autre par

la caractérisation de nouvelles drogues, qui sont actuellement en phase clinique I et II (Cheok et al, 2011).

c/ Résistance des cancers avec un p53 WT

Il est vrai que les mutations de p53 sont associées à l'échec des traitements anti-tumoral, mettant par conséquent les formes mutées et le Knock-out de p53 au cœur du processus de recherches de stratégie anticancéreuse. Pourtant, des tumeurs exprimant des formes WT de p53 montrent aussi des résistances aux molécules et aux drogues utilisées en chimiothérapie et des rapports cliniques stipulent que des cancers avec p53WT sont aussi résistantes que celle avec des p53 mutés (Martinez-Rivera & Siddik, 2012). Il est clair que ces résistances peuvent être le résultat de la dérégulation de n'importe quel composant du DNA Damage pathway, mais on va s'intéresser à ceux qui sont liés directement à p53, c'est-à-dire la sur-régulation du pathway responsable de la dégradation de p53 et la sous-régulation de celui responsable des modifications post-translacionnelles.

i/ Mécanismes de dégradation de p53

Les mécanismes qui augmentent la dégradation de p53 constituent une façon simple d'atténuer l'efficacité de p53 et démontrer une résistance au traitement. En effet, l'accélération de la dégradation protéosomale de p53 et l'induction de résistance vis à vis des drogues a été démontré par la sur-régulation de protéines qui se lient spécifiquement à p53, à titre d'exemple la protéine virale E6 du papillomavirus HPV 16, MDM4, et MDM2 (Toledo & Wahl, 2006). HPV 16 est trouvé dans plusieurs cancers, dont le plus commun est le cancer du col de l'utérus. Ce virus exprime la protéine E6 qui active la dégradation protéosomale de p53 et engendre un faible taux de p53 dans les cellules tumorales infectées (Talis et al, 1998) et ceci engendre une résistance à la camptothécine et au cisplatine (Padilla et al, 2002).

Nous avons déjà mentionné que la dégradation de p53 est contrôlée par MDM2 (*supra* p. 8) et sa dérégulation peut engendrer une surexpression de l'oncoprotéine et ce par trois mécanismes possibles, l'amplification du gène, l'augmentation de la transcription du gène ou la translation du mRNA (Freedman et al, 1999 ; Momand et al, 1998). La surexpression de MDM2 engendre un développement tumoral ainsi qu'une résistance aux thérapies (Turbin et al, 2006). Ce rôle de MDM2 a stimulé les recherches sur des molécules antagonistes des interactions MDM2-p53 et une des molécules les plus caractérisées est sans doute la Nutlin-3a (Barbieri et al, 2006).

Il existe également des mécanismes qui modulent le niveau d'expression de MDM2 et contribuent à l'échec des agents anti-tumoraux dans l'activation de p53 et l'induction de l'apoptose. Parmi eux, on compte la protéine MDM4, 14-3-3 σ ou encore p14^{ARF} (Martinez-Rivera & Siddik, 2012).

ii/ Mécanismes sous-régulant les modifications post-translotionnelles de p53

P53 doit être transcriptionnellement active pour faciliter la réponse anti-tumorale, cependant, dans les tumeurs résistantes aux drogues, cette fonction peut être perdue. Les deux gènes clefs qui sont non transcrits sont p21 et Bax. La non expression de Bax est corrélée à de multiples cas de résistance de tumeurs humaines, et ce indépendamment du statut de p53 (Sturm et al, 1999 ; Friess et al, 1998 ; Krajewski et al, 1995 ; Sturm et al, 2000). Egalement, des tumeurs résistantes et p53 WT exposées à des agents anti-tumoraux, ceux basés sur le platine par exemple, montrent un p21 non transactivé (Perego et al, 2003), ce qui est cohérent avec l'hypothèse de p21 suppresseur de tumeur (Gartel & Radhakrishnan, 2005). Certes, la perte de la fonction de transactivation de p53 WT peut s'expliquer par la dérégulation de l'expression de MDM2, MDM4, 14-3-3 σ ou p14^{ARF}, mais ce n'est pas toujours le cas. Dans le cancer du sein par exemple, parmi les 45% de tumeurs résistantes au traitement anti-tumoral et ayant un p53 WT, seules 7 à 14% des cancers montrent une surexpression de MDM2 ou une sous-expression de p14^{ARF} (Ho et al, 2001). Aussi, la différence de la demi-vie des cancers de l'ovaire p53 WT, résistants vs sensibles, traités avec le cisplatine n'est pas corrélée avec le niveau d'expression de MDM2 (Yazlovitskaya et al, 2001). Il est donc clair que d'autres mécanismes qui atténuent les fonctions de p53 WT sont aussi impliqués. Les défauts de modification post-translotionnelles sont les plus importantes.

L'importance de la phosphorylation post-translotionnelle de p53

On a déjà mentionné que la stabilisation et l'activation de p53 est gouvernée par des modifications post-translotionnelles (*supra* p.8). Il s'agit essentiellement de phosphorylation, ubiquitination, acétylation, méthylation, SUMOylation, neddylation, glycosylation et ribosylation (Dai & Gu, 2010 ; Horn & Vousden, 2007) et plus de 50 sites sujets à modifications après un stimulus ont été identifiés sur p53 (Meek & Anderson, 2009). Les modifications qui se produisent après un DNA Damage sont pour la plus part des phosphorylations. Il existe 23 sites possibles de phosphorylation de p53 qui sont la cible de plusieurs kinases (Toledo & Wahl, 2006). Cependant chaque agent anti-tumoral active une seule kinase pour chaque site créant ainsi une sorte de

signature/drogue dépendante suite à la quelle p53 adopte une configuration spéciale et transactive des gènes cibles en conséquence (Martinez-Rivera & Siddik, 2012). L'altération d'une de ces kinases changera la signature de p53 et peut atténuer la réponse à la chimiothérapie.

La protéine kinase ATM par exemple, phosphoryle directement p53 sur le site Ser15 et qui par conséquent, stimule la phosphorylation de la même p53 par d'autres kinases comme CHK2 sur d'autre sites. D'un autre coté, ATM phosphoryle et active la protéine kinase HIPK2 qui elle même modifie p53 sur le site Ser46 (Meek & Anderson, 2009). Les mutations de ATM engendrent alors un défaut de régulation de p53 et de réponse au stress cellulaire.

Pareillement, CHK2 est une kinase importante dans la réponse cellulaire au DNA Damage. Il existe une corrélation entre sa sous-expression et la résistance au cisplatine dans les lignées cancéreuse de poumon (Zhang et al, 2004). Le pourcentage des cancers de l'ovaire p53 WT et résistant au cisplatine (environ 23%) est comparable à celui des mêmes cancers déficients en CHK2 (Williams et al, 2006 ; Jallepalli et al, 2003).

Un autre membre de la famille des calcium calmodulin kinase, CHK1, intervient dans le checkpoint activé par le cisplatine et cible des sites sur p53 similaires à ceux de CHK2 (Shieh et al, 2000).

MECANISMES DE CONTRÔLES DU CYCLE CELLULAIRE

1/ Le Cycle de division cellulaire

Le cycle de division cellulaire décrit les étapes et les contrôles qui assurent la division cellulaire. Il est traditionnellement divisé en plusieurs phases distinctes dont la plus importante est la mitose conduisant à la division cellulaire.

La mitose et la fission cellulaire n'occupe qu'une petite partie du cycle, l'autre partie, plus longue s'appelle l'interphase, phase durant la quelle la cellule s'apprête à effectuer une division dans sa course vers "l'immortalité". Elle se compose de trois étapes clefs, une phase dite « métabolique » nommé G_1 , une phase de synthèse et de réplication du DNA dite phase S et « Gap » ou G_2 avant l'entre en mitose (la cellule conserve toujours un seul noyau mais avec une double quantité de matériel génétique). La mitose ou phase M est divisée en prophase (condensation du DNA), prométaphase (ancrage du DNA en condensation sur le fuseau mitotique), métaphase (les chromatides sœurs s'alignent sur la plaque équatoriale), anaphase (séparation des chromatides sœurs et cheminement vers les pôles opposées) et enfin la télophase (fin de progression des chromatides sœurs, décondation et formation de l'enveloppe nucléaire). La Cytokinèse achève la division par division cytoplasmique des deux cellules sœurs.

2/ Les points de contrôle du cycle cellulaire

Des mécanismes existent et permette de surveiller les évènements essentielles du cycle cellulaire et décider son arrêt en cas d'anomalie importante. Ces système de surveillance s'activent quand sont observées des lésions du DNA (DNA damage Checkpoint), des erreurs de réplication du DNA (Replication Checkpoint) ou encore si il se produit une mauvaise répartition des chromatides sœurs entre les cellules filles (Mitotic Checkpoint) (**Figure 5**).

Il existe aussi deux autres niveaux d'arrêt du cycle qui sont sujet à débat, il s'agit de l'antéphase Checkpoint (prévient l'entrée en mitose en cas de stress cellulaire) (Chin & Yeong, 2010) et du G1 tetraploïd Checkpoint (si le Spindle Assembly Checkpoint est désactivé et que la cellule réussi a entré en mitose avec une double quantité de DNA ayant des anomalies de réplication) (Rieder & Maiato, 2004).

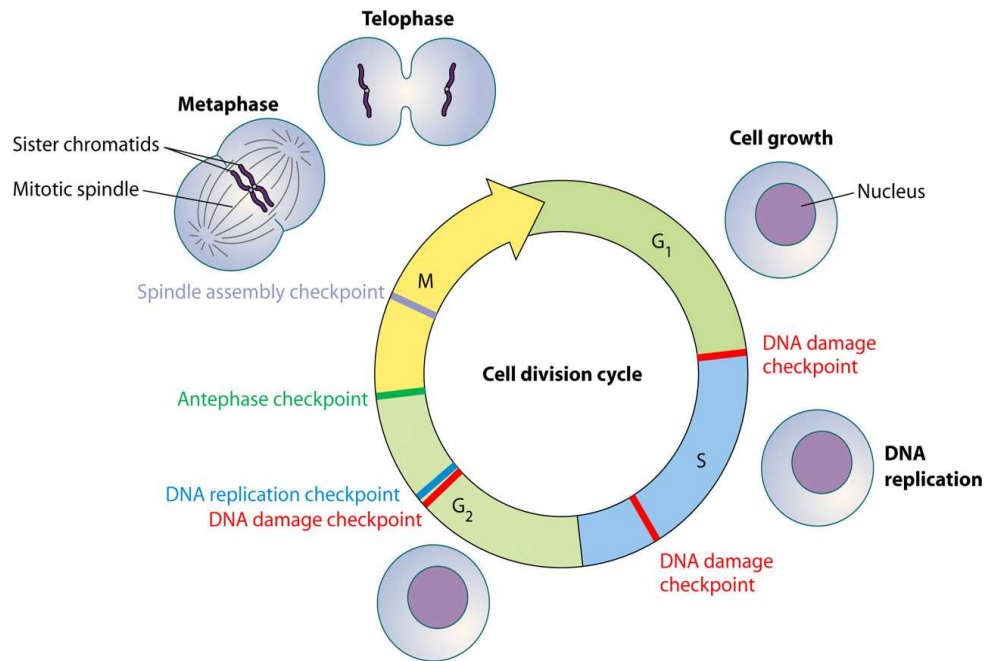


Figure 5 : les points de contrôle du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est contrôlé par une multitude de checkpoints, dont la réplication du DNA (en bleu), le DNA Damage (en rouge) ainsi que le Spindle Assembly Checkpoint SAC (en gris). En plus, l'antéphase Checkpoint (en vert) qui joue un important rôle dans la prévention d'entrée en mitose en présence de conditions de stresses (Chin & Yeong, 2010).

3/ Le Spindle Assembly Checkpoint (SAC).

Le “spindle assembly checkpoint” est un système de contrôle qui supervise l'état d'attachement des kinetochores/microtubules durant la mitose et stoppe la progression du cycle cellulaire jusqu'à ce que tous les chromosomes soient bien alignés sur le fuseau mitotique (Nezi & Musacchio, 2009).

Ce contrôle mitotique est essentiel pour le maintien de la stabilité génétique, car en son absence, les cellules quittent prématurément la mitose avec des chromosomes mal attachés voire même non attachés sur le fuseau avec des conséquences plus au moins dramatiques qui vont de ploïdie instable à la mort par apoptose (Musacchio, 2011 ; Rieder & Maiato, 2004) (Figure 6).

L'Anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) est un domaine multi protéique avec une activité ubiquitin-ligase responsable de l'ubiquitination de plusieurs régulateurs clés du cycle cellulaire, dont la cycline B et la securine. Il est également appelé Cyclosome

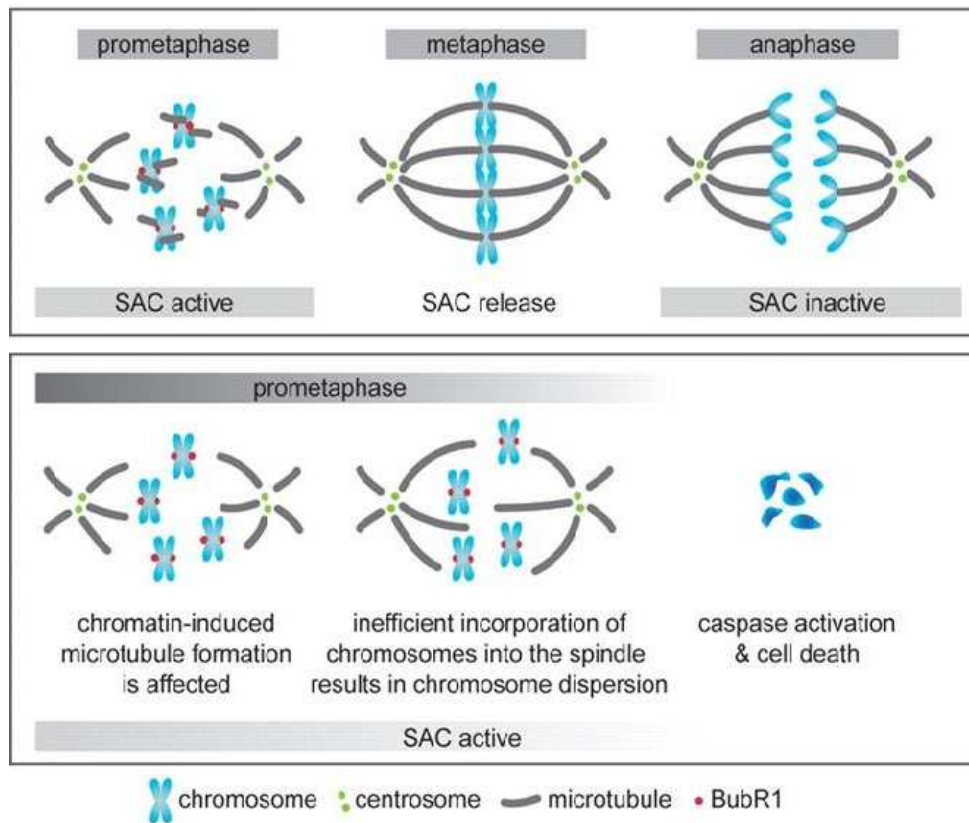


Figure 6 : Mise en place du SAC. Interprétation schématique de la formation du fuseau mitotique et la ségrégation des chromosomes contrôlée par l'activation et la désactivation du système Spindle Assembly Checkpoint (Vanden Bosch et al, 2010).

La cible principale de ce "checkpoint" est Cdc20, un substrat spécifique de l'Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) qui catalyse la polyubiquitination des protéines mitotiques clés, Cyclin B et Securin, afin de prévenir leur éventuelle dégradation par le 26S proteasome (Lee et al, 2012).

Des approches de screening génétique ont identifié au moins 7 gènes essentiels pour le SAC chez les levures. Plusieurs études durant les deux dernières décennies ont montré que le SAC est hautement conservé et des orthologues ont été identifiés chez les mammifères (Rao et al, 2009). Il s'agit essentiellement de Serine/Threonine kinases.

26S proteasome est un complexe de protéines doté d'une activité lytique. Il est responsable de la protéolyse et la dégradation de nombreux substrats tagués par les chaînes polyubiquitin, dont ceux créés par l'APC/C.

a/ Les *MAD* kinase (mitotic-arrest deficient)

i/ *Mad2*

Le gène humain *Mad2* a été le premier gène mammifère du spindle checkpoint pathway à être cloné et caractérisé. Il est structurellement et fonctionnellement hautement conservé (Hardwick, 2005). La protéine MAD2 est localisée sur les kinetochores après la condensation des chromosomes mais avant l'entrée en anaphase et elle a un rôle clef dans la médiation de l'activité du SAC (Lopez-Girona et al, 1999). La surexpression de MAD2 est décrite dans une variété de cancers (Storch, 1976 ; Chen et al, 2002 ; Garber et al, 2001) et confirmée par l'utilisation de la Database ONCOMINE (Cancer Microarray Database and integrated Data-Mining Platform) (Rhodes et al, 2004). La surexpression transitoire de MAD2 est suffisante pour la formation de tumeur mais elle n'est pas vitale pour la survie pour cette même tumeur contrairement aux oncogènes classiques (Sotillo et al, 2007).

Le Kinetochore est un large assemblage de protéines qui régule l'attachement des chromosomes sur le fuseau microtubulaire. Il s'assemble spécialement durant la mitose sur des régions spécifiques des chromosomes : les centrosomes. Il se démonte à la fin de la mitose.

ii/ *Mad1*

MAD1 est généralement décrit comme le "récepteur de MAD2" sur les kinetochores et son rôle ralentisseur dans l'anaphase est certain. En effet, l'interaction entre MAD2 et MAD1 est essentielle pour le changement conformationnel de MAD2. Le complexe MAD1-MAD2 formé s'attache au kinetochores et catalyse la formation du complexe MAD2-Cdc20 (Emre et al, 2011).

iii/ *BubR1 (Mad3)*

Le bon fonctionnement de la protéine BubR1 est primordial pour le spindle assembly checkpoint. La protéine BubR1 hyper phosphorylée s'associe aux les kinetochores mal ou non accrochés et stabilise l'attachement des microtubule/kinetochore en se fixant sur la protéine centromérique Cenp-E. Elle assure aussi le bon alignement des chromosomes sur le fuseau mitotique (Meraldi & Sorger, 2005). BubR1 est aussi une composante importante du Mitotic Checkpoint Complex (MCC) et inhibe l'activité de l'ubiquitin ligase E3 de APC/C via la cyclin

B1 et la securin. En effet l'ubiquitylation de Cdc20 (et par conséquent le l'Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) inhibe le SAC (Reddy et al, 2007). D'un autre coté, BubR1 s'accumule dans les chromatides acentriques suite à une mauvaise réparation de cassures d'ADN double brin (Royou et al)2010. BubR1 joue un rôle dans la méiose puisqu'elle régule l'arrêt de la prophase 1 (Homer et al, 2009).

Le Mitotic checkpoint complex (MCC) est un complexe qui contient CDC20, l'activateur d'APC/C, ainsi que les protéines du SAC MAD2, BUBR1/Mad3 et BUB3. Le MCC est considéré comme l'effecteur du Spindle Assembly Checkpoint

Des études génétiques on montré que la diminution de l'expression ou de l'activité de BubR1 est responsable de la séparation prématurée des chromatides (Matsuura et al, 2006). *A contrario*, la surexpression de BubR1 est reportée dans nombre de cancers gastriques (Ando et al, 2010). Le dosage de l'expression de cette protéine kinase sert de marqueur dans le pronostic de survie dans certains types de cancers (Gladhaug et al, 2010).

b/ Les *BUB* kinase (budding uninhibited by benzimidazole)

i/ *Bub1*

Malgré leur ressemblance, les protéines Bub1 et BubR1 sont des kinases paralogues, elles ont un rôle différent dans le SAC. En effet, Bub1 est responsable de la congrégation des chromosomes, la localisation de MAD2 et de BubR1 sur les kinetochores ainsi que l'association des protéines centromériques CENP-E et CENP-F dans les cellules n'ayant pas activé le Mitotic Checkpoint. Bub1 est essentielle aussi dans l'établissement et le maintient des chromosomes sur le fuseau bipolaire (Johnson et al, 2004 ; Meraldi & Sorger, 2005 ; McGuinness et al, 2009).

ii/ *Bub3*

Bub3 est une protéine similaire à Bub1, elle se localise au niveau des kinetochores avant l'alignement des chromosomes. Son rôle est aussi de faciliter la localisation aux kinetochores de Bub1 (Ciciarello et al, 2001). Bub3 est aussi partie intégrante du MCC (Sudakin et al, 2001). D'un autre côté, la mutation biallelique du gène *Bub3* est létale pour des embryons de souris suggérant son rôle vitale pour le développement embryonnaire précoce (Kalitsis et al, 2000).

c/ Autres composant du Spindle Assembly Checkpoint

En plus des MAD et BUB kinase, le SAC se compose aussi d'autres protéines kinases qui ont plusieurs rôles dont l'amplification du 'signal SAC' et la vitesse de formation du MCC (Musacchio & Salmon, 2007). On peut énumérer les constituants du complexe ROD (rough deal)-ZW10 (zeste white-10)-ZWILCH (RZZ) (Tang et al, 2004), NEK2 ou encore la polo-like kinase-1 (PLK1) (Musacchio & Salmon, 2007) mais le plus important reste les protéines kinase Aurora B et la multipolar spindle-1 (MPS1) (**Figure 7**).

d/ Aurora B

Les kinases Aurora appartiennent à la famille des Ser/Thr kinases. Ce sont des régulateurs de premier ordre de la mitose. Leur éventail d'action couvre aussi bien les fonctions des centrosomes, la ségrégation des chromosomes ainsi que la Cytokinèse. Le dysfonctionnement de ces protéines peut engendrer de l'aneuploïdie et/ou polyploïdie, et est lié au développement des tumeurs (Vader & Lens, 2008). Aurora B kinase est une kinase clef dans ce processus et surtout dans le Spindle Assembly Checkpoint.

Ipl1, l'homologue de Aurora B chez la levure, est nécessaire pour remédier aux défauts de tension dans l'attachement des chromosomes aux microtubules. Chez les vertébrés, en utilisant des molécules ou des anticorps qui ciblent Aurora B engendrent des phénomènes de perte de tension en réponse à des poisons de Spindle comme le taxol mais pas dans des situations où les microtubules sont complètement détachés comme c'est le cas en réponse au nocodazole par ex. (Hauf et al, 2003).

D'une façon intéressante, et en réponse à une faible dose de taxol, l'inactivation du SAC est plus importante en absence de Aurora B que vis-à-vis des doses plus importantes de ce poison microtubulaire. Ceci suggère que Aurora B a un rôle d'amplification du SAC défaillant, dans des cas occasionnels de relâchement des kinetochores des microtubules au moment de la bi-orientation due à des défauts de tension (Carmena et al, 2009).

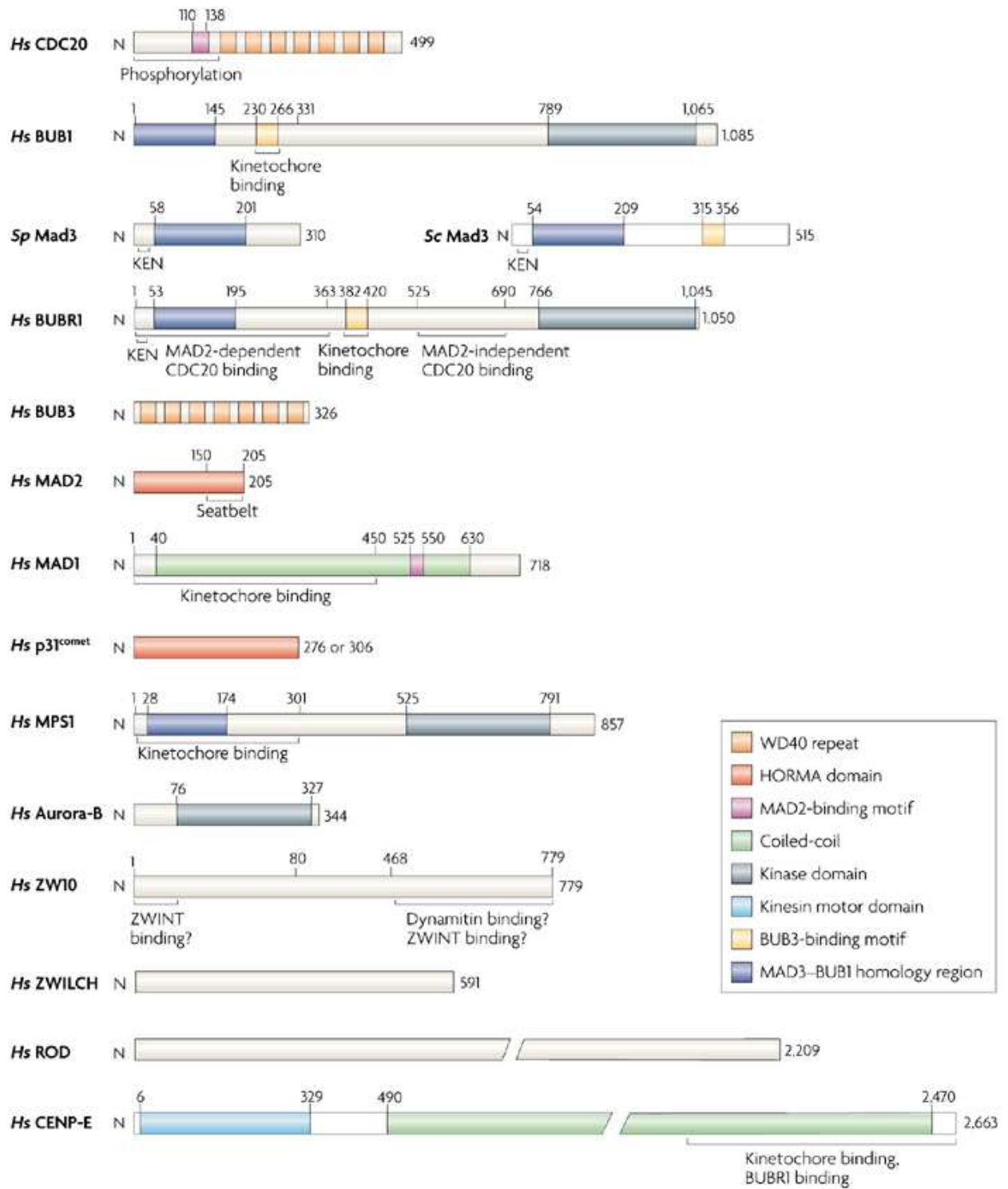


Figure 7: les protéines du SAC et leurs domaines d'organisation

(Musacchio & Salmon, 2007)

i/ Autres fonctions de Aurora B

Fuseau mitotique

Aurora B participe à la formation et à la stabilité du fuseau mitotique en phosphorylant deux protéines qui « téléguident » le fuseau à savoir la microtubule-destabilising protein Stathmin/Op18 la kinesin-13 microtubule depolymerase MCAK (Gadea & Ruderman, 2006 ; Ohi et al, 2004).

La correction des erreurs d'attachement lors de la bi-orientation des chromosomes

C'est sans doute la fonction la plus décrite de Aurora B. Des études chez la levure on montré que Aurora B est essentielle dans la stabilité du processus de détachement du kinetochore des microtubules (Tanaka et al, 2002). En effet, la formation d'attachements incorrects des chromosomes sur le fuseau est relativement fréquente dans les premiers instants de la mitose et la cellule emploie des moyens redondants pour la correction de ces erreurs. Aurora B phosphoryle Hec1/Ndc80 et augmente son affinité aux microtubules (Cheeseman et al, 2006). Aurora B régule aussi l'activité de MCAK ou encore Kif2b, deux protéines du kinetochore (Carmena et al, 2009).

Cohésion des chromatides au niveau des centromères

Une fois la bi-orientation des chromosomes finie et le SAC ne signalant pas de problème, les cellules commencent à désintégrer les cyclines et autres composants de l'APC/C et à progresser en anaphase avec une perte de la cohésion des chromatides. Plusieurs études montrent le rôle que joue Aurora B dans le contrôle de la cohésion entre chromatides. En effet, elle régule l'activité de la séparase (Yuan et al, 2009).

Cytokinèse

Durant l'anaphase, Aurora B se concentre sur la partie médiane du fuseau et la partie équatoriale du cortex, cette localisation est essentielle pour la phase terminale de la mitose. Aurora B est primordiale pour la cytokinèse. En effet, un marquage en « time-lapse » montre une concentration de la kinase sur le sillon de séparation de deux futures cellules filles (Fuller et al, 2008) (**Figure 8**). Le rôle d'Aurora B dans la tumorigenèse reste encore mal élucidé. La surexpression de Aurora B n'est reportée que dans quelques types de cancers (Katayama et al, 2003). Cependant il est clair que l'expression de la kinase est liée à la prolifération cellulaire. En

effet, l'expression forcée de Aurora B dans les cellules CHO engendre de l'aneuploïdie et accélère la croissance des xénogreffes tumorales (Ota et al, 2002).

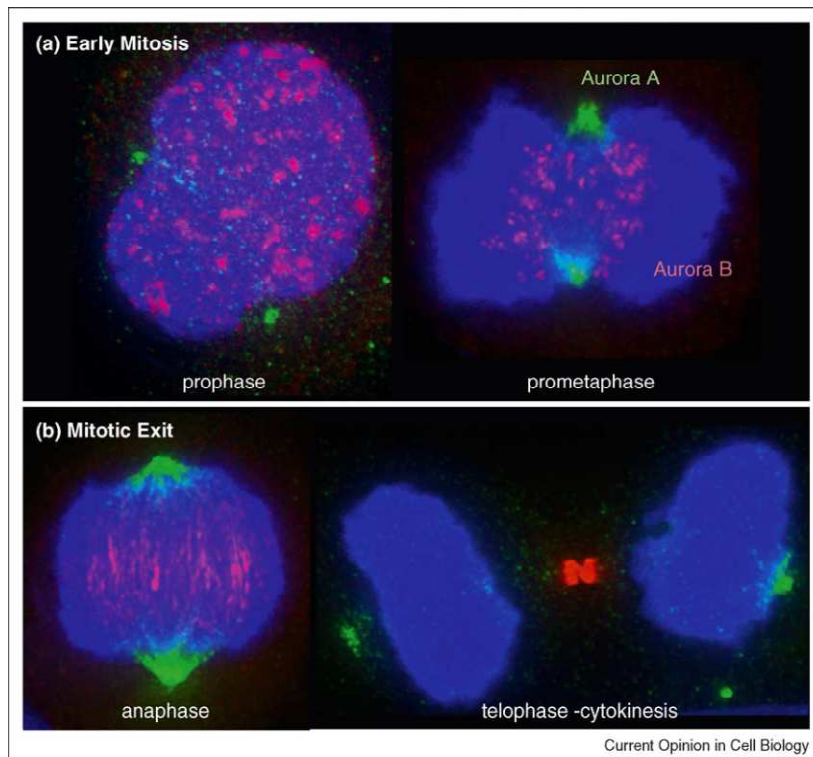


FIGURE 8 : distribution d'Aurora A et Aurora B dans les cellules mitotiques (Carmena et al, 2009).

e/ Aurora A

Aurora A et Aurora B sont deux kinases très similaires, avec un domaine kinase à 70% identique. Cependant, et malgré cette similarité, elles ont une localisation cellulaire et des fonctions différentes durant la mitose. En effet, Aurora A s'associe aux pôles du fuseau mitotique et participe à l'entrée en mitose, la maturation et la séparation des pôles bipolaires (Barr & Gergely, 2007) (**Figure 8**). La surexpression de Aurora A est reportée dans de nombreux cancers, en effet, elle stimule la formation de colonies, la multiplication des centrosomes ainsi que la croissance des tumeurs xénogreffes chez la souris (Bischoff et al, 1998 ; Meraldi et al, 2002; Zhou et al, 1998 ; Anand et al, 2003).

Il est intéressant de noter la corrélation qui existe entre des phénotypes de tumeurs humaines comme la multiplication des centrosomes et la polyploïdie et la surexpression de Aurora A. P53 et Aurora A sont directement liés durant le cycle cellulaire, et la dérégulation de

p53 ou son absence est corrélé à la tétraploïdisation des cellules surexprimant Aurora A (Meraldi et al, 2002).

f/ MPS1

Le gène Mps1 (Monopolar Spindle 1) a été identifié initialement chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Une mutation de ce gène était responsable d'un défaut de duplication des spindle pole body (SPB) c'est-à-dire l'équivalent des centrosomes dans les cellules eucaryotes. L'orthologue de Mps1 a été cloné et caractérisé chez l'humain (Mills et al, 1992). Mps1 phosphoryle les serines/thréonines ainsi que les tyrosines suggérant que c'est une protéine kinase à double spécificité d'où son nom de PYT/TTK (phospho-tyrosine-picked threonine and tyrosine kinase). Le nom Mps1 reste le plus utilisé étant le premier nom publié (Liu & Winey, 2012).

i/ Mps1 et le SAC

XIMps1 (*Xenopus* Mps1) a été le premier orthologue chez les vertébrés identifié comme impliqué dans le Spindle Checkpoint et localisé aux kinetochores. En effet, les oocytes de *Xenopus* ont besoin de XIMps1 pour l'arrêt mitotique et pour le recrutement de Mad2 et d'autres protéines du SAC aux kinetochores. Pareillement, chez l'humain, hMPS1 est trouvée aux kinetochores et a un rôle essentiel dans l'activation et le maintien du SAC. Ces résultats ont été reportés dans de nombreuses études incluant de nombreux tests comme la déplétion du gène hMps1 ou l'inhibition de la kinase (Lan & Cleveland, 2010).

La localisation des protéines du SAC aux kinetochores est essentielle pour leur bon fonctionnement, en effet, la localisation de CENP-E est dépendante de XIMps1 (Abrieu et al, 2001). CENP-E a été également décrit comme substrat de Mps1 *in vitro* (Espeut et al, 2008). D'autres études par contre montrent que la surexpression de Mps1 induit l'arrêt du cycle cellulaire chez les levures dépendant des protéines du SAC suggérant que Mps1 est à l'origine du SAC signal pathway. Etant donné la complexité des travaux publiés et le fait que Mps1 possède des domaines kinases différents et plusieurs substrats dont Cenp-E, Mad2 et Mps1 elle-même, il semble que le Mps1 pathway ne peut être un modèle linéaire mais plutôt multivoies (Liu & Winey, 2012).

D'un autre côté, Mps1 agit comme checkpoint sans pour autant être dans le kinetochore. Une forme mutée de hMps1 qui garde l'activité kinase sans être localisé sur le kinetochore réussie

toujours à activer le Checkpoint avec inhibition de Cdc20 au court de la mitose (Chan & Yen, 2003).

Mps1 contribue également à former un complexe qui inhibe APC (anaphase promoting complex) durant l'anaphase, ce complexe comprend aussi d'autres protéines du SAC à savoir BubR1 et Mad2. Ces protéines inhibent le Cdc20 *in vitro* en absence de Mps1 mais leur association *in vitro* est dépendante de Mps1 (Maciejowski et al, 2010). Ainsi, l'activité de Mps1 est cruciale pour l'achèvement d'une mitose normale, en effet les cellules Mps1 déficientes montrent un transit mitotique plus rapide que les cellules Mps1 efficientes (Lan & Cleveland, 2010).

Par ailleurs, avant l'installation du SAC, Mps1, avec Aurora B, intervient dans l'attachement des chromosomes au fuseau bipolaire, elle participe au détachement des deux chromatides sœurs et leur recrutement dans vers les pôles opposés (Santaguida et al, 2010).

La relation entre Mps1 et Aurora B est sujette à contentieux puisque plusieurs études montrent la chose et son contraire. En effet des études postulent que la diminution de l'activité de Mps1 réduit l'activité d'Aurora B notamment via la phosphorylation de la Borealin (Jelluma et al, 2008 ; Bourhis et al, 2009). D'autres études par contre, via l'utilisation d'inhibiteurs de Mps1 ou d'allèles mutés inhibables démontrent que l'activité de Aurora B ne varie pas avec la diminution de l'activité de Mps1 (Bourhis et al, 2009 ; Hewitt et al, 2010).

Aurora B et les composants du kinetochore Hec1/hNdc80 sont nécessaires pour le recrutement de Mps1 au kinetochore, et ce recrutement en soit est la condition *sine qua none* d'une bonne entrée en mitose. Ceci place Aurora B en amont de hMps1 dans le Checkpoint pathway comme il a été vu chez la levure (Biggins & Murray, 2001).

La fonction de Mps1 est vitale pour la plus part des organismes étudiés (à l'exception de *S. pombe*) et l'inhibition de la kinase tue les cellules après une polypléidisation sévère (Lan & Cleveland, 2010).

ii/Autre fonctions de Mps1

Duplication et organisation des centrosomes

Comme on l'a déjà noté, Mps1 a été identifié suite à une mutation qui était responsable du défaut de duplication du SPB chez la levure. Une collection d'allèles mutés a permis de démontrer que Mps1 intervient sur plusieurs niveaux dans le pathway de la duplication du spindle pole body et y phosphoryle plusieurs composants dont la centrine (Cdc31) ou encore Spc98 (un composant du complexe γ -tubulin) (Liu & Winey, 2012).

Chez la levure, Mps1 est localisée sur les SPBs et elle est localisée pareillement sur les centrosomes chez les cellules mammifères.

La surexpression de la kinase engendre une sur-duplication des centrosomes, *a contrario*, une surexpression de forme inactive de Mps1 bloque la duplication des centrosomes (Pike & Fisk, 2011). Cependant, des études ont montré que la délétion de Mps1, l'inhibition de l'expression par des siRNA ou encore des études chez *C. elegans* (pas d'orthologue de Mps1 chez cet organisme) postulent pour une duplication normale des centrosomes (Lan & Cleveland, 2010).

Mps1 et la réponse au stress génotoxique

Le stress génotoxique (DNA damage par ex.) engendre un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M ou G1, ou induit la mort apoptotique dépendamment du statut de p53. Mps1 influence ces réponses via de multiples mécanismes.

Les cellules HeLa exposées à des radiations X ou UV sont bloquées en phase G2/M tributaire de l'activité de Mps1 qui interagit avec CHK2 (Wei et al, 2005). CHK2 phosphoryle également Mps1 et augmente sa stabilité créant ainsi un feedback positif (Yeh et al, 2009). La dérégulation de ce feedback diminue le DNA Damage Checkpoint en phase G2/M et permet aux cellules d'entamer une mitose aberrante (Wei et al, 2005).

D'autres protéines intervenant dans les réponses au stress génotoxique ont été identifiées comme cible de Mps1. La protéine BLM (The Bloom syndrome protein) et c-Abl en ont sont des exemples (Leng et al, 2006 ; Nihira et al, 2008).

La fonction de Mps1 dans la réponse au stress génotoxique est dépendante du statut de p53. En effet, des cellules p53 déficientes, avec une surexpression de Mps1 sont susceptibles à la mort apoptotique induite par DNA damage (Bhonde et al, 2006).

D'un autre côté, les deux protéines interagissent directement. Après exposition au poison des microtubules, p53 est stabilisée par phosphorylation sur son site Thr18 par Mps1. Cette phosphorylation contribue au Checkpoint post mitotique (arrêt des cellules en phase G1 et prévention de polyploïdie) (Huang et al, 2009).

Mps1 et la cytokinèse

L'inhibition de Mps1 dans des cellules humaine par des siRNA spécifiques engendre une des cellules multinuclées suggérant l'implication de Mps1 dans la Cytokinèse et /ou la sortie de mitose (Fisk et al, 2003). D'un autre côté, Mps1 forme un complexe avec la protéine MIP1 (Mps1 interacting protein 1) qui est un composant du cytosquelette. L'inhibition de MIP1 est en

conséquent le complexe MIP1-Mps1 engendre une accumulation de cellules multinuclées (Mattison et al, 2011).

Mps1 et la méiose

La méiose, qui permet la production des cellules germinales haploïdes, comporte deux divisions asymétriques. La première sépare les chromosomes homologues et la deuxième les chromatides sœurs.

La dérégulation de la fonction de mps1 dans les cellules méiotiques (la phase I de la méiose chez les oocytes de souris par ex.) engendre un sévère défaut de ségrégation des chromosomes et la polyploïdie (Hached et al, 2011). Ces anomalies sont dues essentiellement à l'incapacité de maintenir le SAC ou/et une mauvaise connection des chromosomes au fuseau méiotique. Ceci suggère que la fonction méiotique de Mps1 est similaire à celle observée en mitose. Pour beaucoup d'études qui caractérisent le rôle de Mps1 dans la méiose, des allèles hypomorphiques ont été utilisés. Durant la méiose I, des allèles de *Ald* (le gène drosophilien de Mps1) détruisent la pause en métaphase.

Indépendamment de son rôle lié au « Spindle », Mps1 est aussi impliquée dans d'autres fonctions. En effet, elle contribue aux deux rounds de réplication des SPB chez les levures, ou encore à la formation des spores post méiotique (Straight et al, 2000).

iii/ La structure de la protéine Mps1

Plusieurs groupes ont travaillé sur la structure du domaine kinase de Mps1 et on montré que Mps1 adopte une architecture typique en bi-lobe (C- et N-terminal). Par ailleurs, le lobe N-terminal est constitué de deux petits lobes ($\beta 0$ et $\beta 1$) (Liu & Winey, 2012) (**Figure 9**).

Mps1 s'auto-phosphoryle *in vitro* sur plusieurs sites. Les plus prédominants étant les sites Ser/Thr, même si les sites Tyr sont aussi observés ce qui explique la diversité de ses substrats (Liu & Winey, 2012).

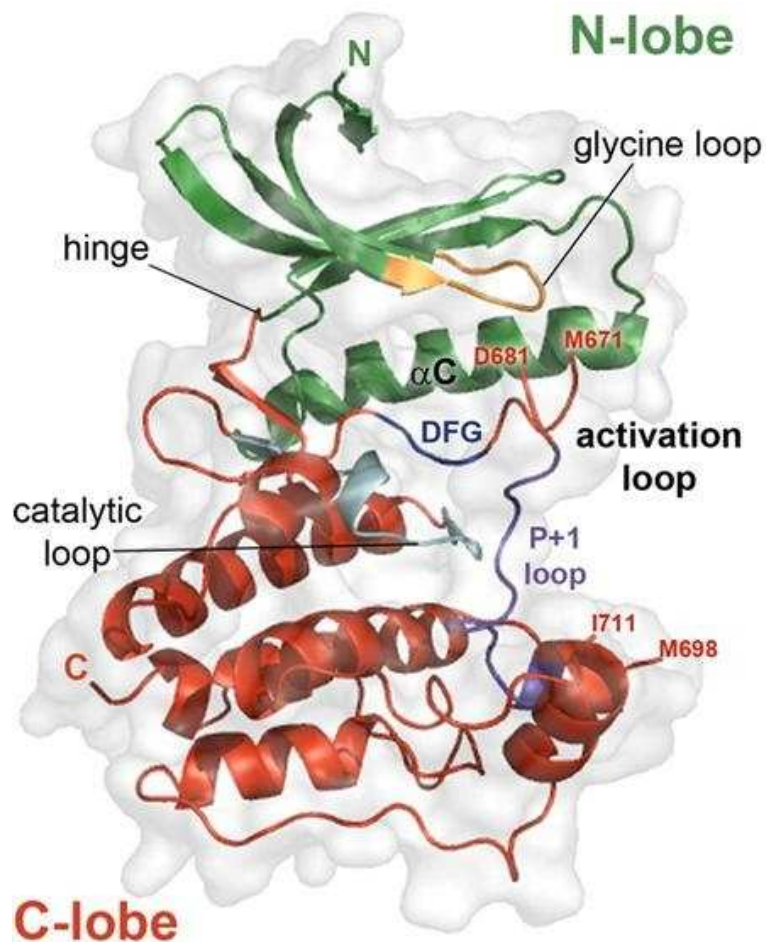


Figure 9 : Structure générale en ruban du domaine catalytique de MPS1 (Chu et al, 2008).

iv/ Les inhibiteurs de Mps1

Ces dernières années, Mps1 a émergé comme nouvelle cible pour les traitements anti cancéreux et plusieurs molécules ont été rapportées et/ou développées comme inhibitrice de Mps1 kinase (**Tableau 1**). Plusieurs domaines kinases, grâce notamment à l'étude des cristallisations en complexe avec des inhibiteurs, ont été identifiés récemment ce qui contribue beaucoup à l'évolution du développement de nouvelle molécules inhibitrice de Mps1 (Chu et al, 2008 ; Kwiatkowski et al, 2010 ; Colombo et al, 2010 ; Chu et al, 2010).

v/ Mps1 est dérégulée dans les tumeurs

Comme pour beaucoup de régulateurs du cycle cellulaire, la transcription de Mps1 est dérégulée dans nombre de tumeurs humaines. Un taux élevé de Mps1 mRNA a été trouvé dans plusieurs cancers, notamment les cancers de la thyroïde, du sein, les cancers gastriques ou encore les cancers bronchiques et du poumon (Mills et al, 1992 ; Salvatore et al, 2007 ; Yuan et al, 2006 ; Kilpinen et al, 2010 ; Daniel et al, 2011 ; Landi et al, 2008). *A contrario*, un niveau très bas de mRNA de Mps1 a été trouvé dans des cellules ou tissu avec un index réduit de prolifération (Hogg et al, 1994). Ceci nous pousse à croire qu'il existe une corrélation entre le niveau d'expression de Mps1 et l'agressivité des tumeurs.

Les cellules cancéreuses surexpriment les kinases du SAC, observation contradictoire à la doctrine conventionnelle postulant que dans les tumeurs, le niveau du checkpoint est affaibli ce qui engendre une mauvaise ségrégation des chromosomes et de l'aneuploïdie. Cependant les mutations dans des protéines clefs du SAC restent rares dans les tumeurs humaines et la corrélation stipulant le lien de causalité entre l'effondrement du SAC et le développement de tumeurs a été discrédité. En effet, plusieurs mutations de Mps1 ont été rapportées dans des cas de cancer humain, mais leur influence sur la tumorigénicité n'est pas validée (Liu & Winey, 2012).

La prévalence de la surexpression des protéines du SAC dans les tumeurs humaines met en avant le rôle important de ces protéines dans les cancers. En effet, la surexpression de ces protéines comme Mps1, BubR1 ou encore Mad2 peut déclencher un processus de cancérogenèse ou promouvoir la survie de cellules cancéreuses aneuploïdes. D'un autre côté, la réduction du niveau d'expression de ces protéines réduit la viabilité des cellules cancéreuses (Liu & Winey, 2012). La suppression de Mps1 dans les cellules de cancer du sein Hs578T réduit leur capacité à se développer *in vivo* dans des modèles de xénogreffe.

L'apoptose des cellules cancéreuses est du en partie à une mauvaise ségrégation des chromosomes en présence d'un SAC désactivé. Et d'une façon intéressante, les cellules qui échappent à la mort et survivent montrent un niveau bas d'expression de Mp1 et moins d'aneuploïdie suggérant que le niveau d'expression faible de Mps1 n'est pas compatible avec l'aneuploïdie. Parallèlement, des études ont observé que l'inhibition des protéines du SAC rend les cellules cancéreuses plus sensibles à de faibles doses de poisons du Spindle (comme le taxol) que les cellules non transformées.

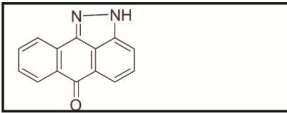
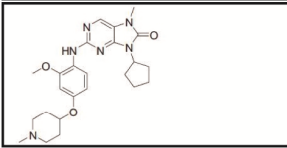
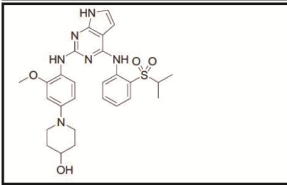
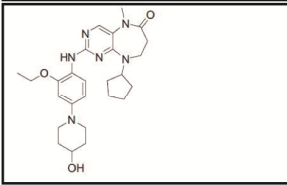
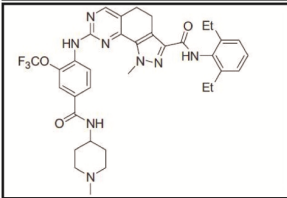
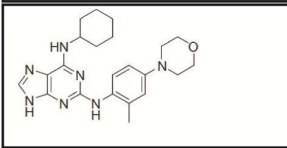
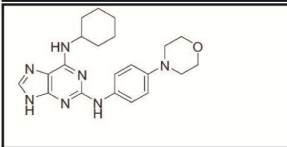
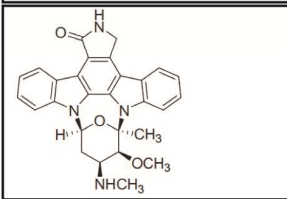
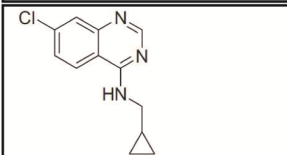
Inhibitor	Structure	IC ₅₀ (nM)	References/patent number
SP600125		692	Gilliland et al, 2009 Chu et al, 2010 Schmidt et al, 2005
AZ3146		35	Hewitt et al, 2010 WO2009024824
Mps1-IN-1		370	Kwiatkowski et al, 2010 WO2009032694
Mps1-IN-2		145	Kwiatkowski et al, 2010 WO2010080712
NMS-P715		8	Colombo et al, 2010 WO2009156315
MPI-0479605		3.5	Tardif et al, 2011 Zhang et al, 2011
Reversine		3/6	Santaguida et al, 2010
Staurosporine		102	Chu et al, 2010
Cpd4		38 000	Chu et al, 2010

Tableau 1 : sommaire des inhibiteurs publiés de MPS1 (Liu & Winey, 2012).

Cette différence de sensibilité est la clef de voute des nouvelles thérapies anticancéreuses qui ciblent Mps1 comme étant un élément essentiel du SAC, ceci permettant de faire une discrimination positive entre les cellules normales et cancéreuses. La dernière en date de ces molécules est la NMS-P715 (Colombo et al, 2010).

LA CATASTROPHE MITOTIQUE

Les cellules somatiques peuvent acquérir un statut aneuploïde par perte ou gain d'un ou plusieurs chromosomes (Williams et al, 2008). Ce statut est potentiellement tumorigène et peut constituer un matériel de départ pour de nombreuses tumeurs humaines notamment les cancers colorectaux (Vitale et al, 2011).

Les mécanismes précis par lesquels l'aneuploïdie favorise l'oncogenèse n'ont pas encore été complètement éclaircis. Cependant, un certain nombre d'évidences expérimentales semble indiquer que, pendant le processus de transformation maligne, des cellules polyploïdes (essentiellement tétraploïdes) constituent des intermédiaires métastables entre la diploïdie et l'aneuploïdie caractéristique des cancers dans la séquence connue comme diploïdie-polyploïdie-aneuploïdie ou polyploïdisation-dépolyploïdisation.

La polyploïdie impose d'importantes contraintes dans les machineries cellulaires utilisées pour la duplication, la réparation et la ségrégation des chromosomes, ce qui rend intrinsèquement complexe le maintien d'un génome tétraploïde. En particulier, la présence simultanée dans les cellules polyploïdes de centrosomes surnuméraires et d'un contenu double ou plus de chromosomes favorise les malségrégations chromosomiques et la formation de cellules aneuploïdes. Ainsi, la présence de ces centrosomes surnuméraires peut aboutir à des divisions multipolaires qui génèrent plus de deux cellules filles ayant une distribution anormale des chromosomes (Vitale et al, 2011). Dans la majorité de cas, ces cellules ne sont pas viables car la nullisomie (l'absence totale d'un chromosome) et la polysomie (la présence de copies surnuméraires d'un chromosome) sont généralement létales.

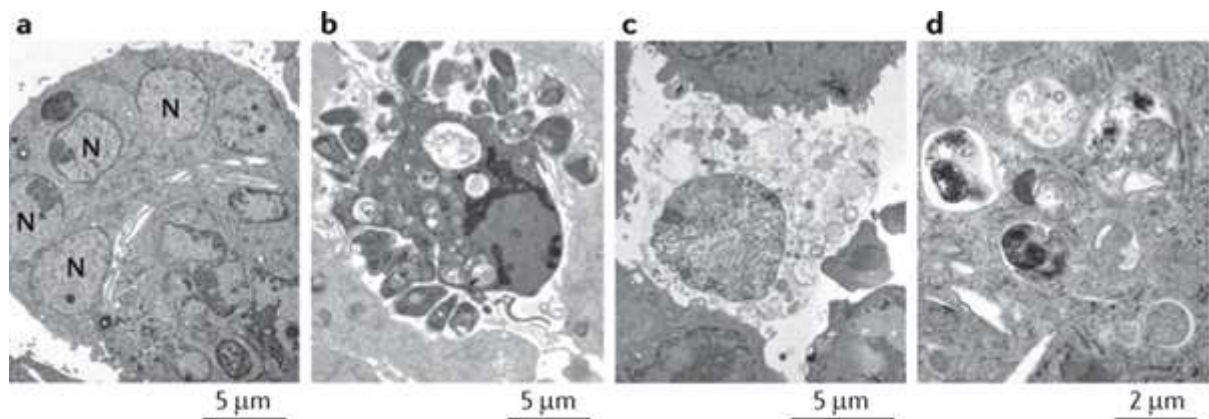
Il excite un mécanisme de mort cellulaire lié aux défauts de mitose baptisé catastrophe mitotique. Ce terme a été largement utilisé durant les dernières années pour décrire une forme de mort cellulaire qui survient après une mitose anormale ou prématurée avec condensation des chromosomes et formation de larges cellules avec des micronoyaux (Ianzini & Mackey, 1997).

1/ Morphologie de la catastrophe mitotique

Les mitoses anormales sont souvent associées à des cassures de chromosomes et des défauts de karyokinèse. Cela conduit à la formation de micronoyaux et des multi-noyaux, le phénotype majeur de la catastrophe mitotique (**Figure 10**). Ceci dit, des caractéristiques de nécrose et d'apoptose sont aussi observés chez des cellules succombant par catastrophe mitotiques (Castedo et al, 2006b ; Vakifahmetoglu et al, 2008) stipulant que la catastrophe

mitotique constitue un prélude de nécrose ou d'apoptose plutôt qu'un mécanisme de mort en soit (Castedo et al, 2004).

L'inhibition de BAX, réduit l'incidence de mort cellulaire résultante de défaut de mitose et favorise la polyploïdisation, confirmant l'étiquette apoptotique de la catastrophe mitotique. Il a été montré également que les marqueurs morphologiques de la catastrophe mitotique peuvent précéder ou se former en parallèle à la sénescence cellulaire, appuyant ainsi la définition de catastrophe mitotique comme une étape précoce de mort cellulaire plutôt qu'un mécanisme de mort cellulaire au sens strict du terme (Ianzini & Mackey, 1997). Il est donc imprudent de se baser uniquement sur les caractéristiques morphologiques des cellules mourantes pour identifier et définir la catastrophe mitotique.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 10 : différents aspects de la catastrophe mitotique incluant des phénotypes d'apoptose, de nécrose et d'autophagie. Images capturées par microscopie électronique de (a) multi-noyaux, (b) rétrécissement cytoplasmique et condensation de la chromatine, (c) dilatation membranaire, condensation circonscrite de la chromatine et augmentation du volume cellulaire et (d) des vacuoles autophagiques (Vitale et al, 2011).

2/ Définition fonctionnelle de la catastrophe mitotique

La catastrophe mitotique est largement utilisée pour décrire la mort qui survient après des mitoses aberrantes (Kroemer et al, 2009). Il s'agit là d'un mécanisme oncosuppresseur, senseur d'anomalies mitotiques, qui élimine les cellules ayant subi des dégâts irréversibles pouvant former des tumeurs. La catastrophe mitotique agit en précédant la sénescence, l'apoptose ou la nécrose, mécanismes terminaux de mort *sensu stricto*. Des événements précoces de la catastrophe mitotique

peuvent être mis en évidence grâce à des techniques récentes telles que la vidéomicroscopie à fluorescence.

Il existe au moins trois différents programmes décrits de catastrophe mitotique. Le premier qui se produit durant la mitose même. La mort mitotique, résultat de l'activation de la machinerie de mort cellulaire en présence d'un taux élevé de cycline B1 témoigne que les cellules n'ont pas fini la mitose (Weaver & Cleveland, 2005). Le second programme se déroule en interphase du cycle qui suit la mitose aberrante. Dans ce cas, la mort se produit rapidement, quelques heures après la sortie de mitose, ou d'une façon retardée comme dans le cas de la mort induite par radiothérapie dans les tissus humains (Suzuki et al, 2003). Enfin, le troisième programme, assez rare, qui engage les cellules issues d'une mitose aberrante en sénescence et un arrêt irréversible du cycle cellulaire (Eom et al, 2005).

3/ L'induction de la catastrophe mitotique

Il existe une multitude de stimuli qui peuvent provoquer la catastrophe mitotique, on peut les résumer en quelques groupes. Certains inducteurs directs de catastrophe mitotique affectent l'intégrité génomique même (par exemple des agents induisant le DNA damage), alors que d'autres agents interfèrent avec la machinerie complexe qui assure une ségrégation correcte des chromosomes (par exemple des poisons des microtubules) et finalement certains agents qui induirait la catastrophe mitotique via une voie de signalisation non encore caractérisé (Ianzini & Mackey, 1997).

Nous avons vu qu'il existe une corrélation entre la surexpression des kinases du SAC, notamment Aurora A et B et Mps1, et la tumorigenèse (*supra* p.27, 29, 32 et 38). Si l'on prend en compte le rôle primordial que possèdent ces kinases dans le bon déroulement de la mitose, on peut considérer que les inhibiteurs de Aurora A, Aurora B et Mps1 forment d'excellent inducteurs de catastrophe mitotique et de véritables voie à promouvoir dans la thérapie anti-tumorale.

En effet, l'inhibition de Aurora A ou Mps1 induit un arrêt en phase G₂/M, une formation d'un fuseau mitotique anormal et une tétraploïdisation des cellules. La catastrophe mitotique se produit durant la mitose aberrante pour certaines cellules et lors de la phase de division des cellules tétraploïdes produites. Concernant l'inhibition de Aurora B, elle engendre une désactivation du checkpoint mitotique et une hyperploïdie des cellules à défaut de cytokinèse. A terme, les cellules meurent également par catastrophe mitotique.

Plusieurs molécules qui inhibent les Aurora kinases notamment et Mps1 sont en phase d'essai clinique (Kitzen et al, 2010 ; Liu & Winey, 2012).

4/ L'exécution de la catastrophe mitotique

La caractérisation précise du pathway qui exécute la catastrophe mitotique fait encore le sujet d'intenses recherches dans les laboratoires dans le monde entier. Ceci dit, il existe un bon nombre de mécanismes élucidés et décrits. Il s'agit essentiellement des mécanismes de la voie apoptotique mitochondriale (Vitale et al, 2011).

5/ Catastrophe mitotique et cellules tumorales

Les cellules cancéreuses présentent souvent des phénotypes d'instabilités génomiques qui constituent leur tendon d'Achille, elles activent les checkpoints mitotiques et induisent la catastrophe mitotique et la mort cellulaire qui s'en suit. Cela dit, il arrive que des cellules échappent aux points de contrôles, ou que ces mêmes points de contrôles soient désactivés et ces cellules progressent en cellules polyploïdes et éventuellement aneuploïdes. Ces cellules sont généralement résistantes aux traitements anti-tumoraux qui agissent via une voie classique d'induction d'apoptose (Castedo et al, 2006a ; Castedo et al, 2006b).

C'est l'induction forcée de la catastrophe mitotique qui constitue une alternative thérapeutique concrète. L'utilisation des inhibiteurs de kinases du SAC augmente la vulnérabilité de ces cellules par accumulation des aberrations mitotiques. En effet, l'utilisation de certains agents anti-tumoraux qui sont généralement administrés à concentrations élevées induit une apoptose massive de cellules et sans discrimination alors que ces mêmes agents utilisés à faible dose induisent la catastrophe mitotique des cellules cancéreuses, puisque c'est uniquement elles qui sont génomiquement instables (Eom et al, 2005).

RESULTATS

SELECTIVE KILLING OF P53-DEFICIENT CANCER CELLS BY SP600125

EMBO Molecular Medicine 6: 500-514 (2012)

Investigation de molécules ciblant les cellules tumorales p53 déficientes

Dans notre travail d'investigation d'agents pharmacologiques qui tuent spécifiquement les cellules cancéreuses p53-déficientes et la caractérisation de leurs mécanismes d'action, nous avons entrepris une démarche de criblage de substances chimiques (Screening) ayant une cytotoxicité préférentielle pour ces cellules.

Nous avons développé une technique de 'Live Cell Screening' qui couple l'utilisation de la vidéo microscopie à haut débit (BDpathway 855, BectonDickinson), une série de lignées et qui expriment de façon stable les protéines de fusion histone H₂B-GFP et H₂B-RFP ainsi qu'un robot qui fait la liaison incubateur/microscope. Nous avons criblé la banque ICCB qui se compose de 480 composés ayant la capacité d'activer ou d'inhiber les différentes voies de signalisation dans la cellule.

Concrètement, On a « co-cultivées » deux lignées de carcinome de colon humain HCT116, WT (*p53*^{+/+}) et la lignée isogénique *p53*^{-/-} se distinguant par leur fluorescence nucléaire (RFP+ ou GFP+) en plaque de 96 puits et on a pu suivre de façon séquentielle la fréquence de cellules RFP+ et GFP+ viables en présence ou en absence des agents pharmacologiques cytotoxiques.

Nous avons pu observer à haut débit, les fluctuations morphologiques de la cellule et nous focaliser sur des marqueurs de l'apoptose comme la perméabilisation membranaire et la condensation du noyau cellulaire.

De plus, nous avons optimisé cette technique pour suivre les cellules vivantes (Live Cell Screening). En effet, au laboratoire, nous avons développé des lignées qui expriment de façon stable les protéines de fusion histone H₂B-GFP et H₂B-RFP. Pour les besoins de cette technique, nous avons utilisé les deux lignées de carcinome de colon humain HCT116, WT (*p53*^{+/+}) et la lignée isogénique *p53*^{-/-} (déficiente pour p53 après recombinaison homologue) se distinguant par leur fluorescence nucléaire (RFP+ ou GFP+). On les a « co-cultivées » en plaque de 96 puits et on a pu suivre de façon séquentielle la fréquence de cellules RFP+ et GFP+ viables en présence ou en absence d'agents pharmacologiques cytotoxiques.

Nous avons réussi à identifier trois composés qui ont une toxicité sélective pour les cellules *p53*^{-/-}. Nous avons investigué dans un premier temps la molécule ayant l'effet le plus important à savoir SP600125.

Confirmation de la sélectivité de SP600125 pour les cellules $p53^{-/-}$.

Le traitement par SP600125 induit la mort des cellules dès 48h de manière dose-dépendante, mais l'effet cytotoxique est plus marqué chez les cellules $p53^{-/-}$. En effet, à partir de 30 μ M les cellules $p53^{-/-}$ sont significativement plus sensibles que les cellules WT. Cette détection de la mort cellulaire a été effectuée par cytométrie en flux (FACS), après marquage des cellules à l'iodure de propidium (agent intercalant qui s'incorpore uniquement à l'ADN des cellules ayant perdu l'intégrité de la membrane plasmique) et le DiOC₆(3) (sonde utilisée pour mesurer la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial).

Cette induction de la mort apoptotique par SP600125 sur les cellules $p53^{-/-}$ est confirmée aussi par différentes techniques :

Le système d'impédance xCELLigence, technique basée sur une mesure d'impédance de cellules non marquées permet de suivre en temps réel et en continu sur plusieurs jours le comportement de cellules adhérentes après traitement.

D'autre part, les tests de clonogénicité montrent une diminution préférentielle de la formation de colonies cellulaires $p53^{-/-}$ après 15 jours de culture comparativement aux cellules WT.

De façon intéressante, nous avons confirmé l'effet pro-apoptotique préférentiel de SP600125 (par FACS) sur les cellules $p53^{-/-}$ en utilisant d'autres types cellulaires humains ou de souris de différentes origines tissulaires (e.g. les cellules humaines RKO de carcinome de colon, SKOV de carcinome ovarien, Saos-2 d'ostéosarcome, H1299 de cancer de poumon non à petites cellules, et des cellules MEF (fibroblastes embryonnaires de souris)).

Nous avons également prouvé l'effet de SP600125 en traitant des cellules HCT116 et RKO dont on a préalablement inhibé l'expression de p53 par des transfections transitoires de siRNA anti p53 ou par la transfection de plasmide exprimant une forme dominant négative de p53. Enfin, nous avons utilisé des cellules qui expriment le mutant p53 dominant négatif inductible par la doxycycline et nous avons montré que les cellules qui exprimaient une déficience en p53 étaient plus sensibles au traitement avec SP600125.

Pour confirmer la mort cellulaire sélective des cellules tumorales $p53^{-/-}$, nous avons suivi le devenir des cellules par vidéomicroscopie à fluorescence en temps réel. Nous avons utilisé des cellules HCT116 exprimant stablement l'histone H2B-GFP. Nous avons ainsi pu observer et quantifier une augmentation de la mort cellulaire, spécifiquement pour les cellules $p53^{-/-}$.

Pour évaluer l'effet anti-tumoral de SP600125 *in vivo*, et vérifier son éventuelle utilité clinique, nous avons réalisé des expériences chez la souris. Nous avons suivi la croissance de

xénogreffes de cellules de carcinome de colon HCT116 $p53^{-/-}$ et $p53^{+/+}$ dans des souris traitées ou non par SP600125 (injections intrapéritonéales 3 fois par semaine) et nous avons pu démontrer une régression sélective des tumeurs $p53^{-/-}$.

Caractérisation de la voie de signalisation impliquée dans le signal de mort.

Nous avons pu montrer que l'apoptose induite par SP600125 est due partiellement à l'activation de la voie mitochondriale. En effet, le traitement des cellules par SP600125 s'accompagne du relargage du cytochrome *c* des mitochondries vers le cytosol et l'activation de la caspases-3. Par ailleurs, l'inhibition des caspases par le Z-VAD diminue significativement l'effet cytotoxique de SP600125 sur les cellules $p53^{-/-}$. De plus, l'inhibition des protéines pro-apoptotiques comme PUMA et BAX réduit la mort engendrée par SP600125 et *a contrario* l'inhibition des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L, MCL-1) l'augmente.

SP600125 engendre la polyploïdisation préférentielle des cellules p53 déficientes.

Les premières analyses par cytométrie en flux ont montré deux différents profils de cycle cellulaire. Les cellules WT sont bloquées avec un contenu en ADN 4n, alors que les cellules p53 déficientes progressent dans le cycle cellulaire, sans se diviser, et atteignent un stade 16n après 72h de traitement et puis finissent par mourir par apoptose.

Des analyses plus fines du comportement de quelques acteurs/régulateurs du cycle cellulaire ont été réalisées comme par e.g. le suivi de l'incorporation d'un analogue de la thymidine (EdU) dans l'ADN, l'expression des Cyclines E et B, de l'histone H3 phosphorylée ou encore de phosphoépitoïpes MPM2 montre que les cellules WT sont bloquées après un premier round de multiplication de l'ADN alors que les cellules p53 déficientes continuent de cycloiser et de dédoubler leur matériel génétique au-delà du stade tétraploïde (4n) voire même octaploïde (8n).

L'analyse vidéomicroscopique nous montre qu'il s'agit d'un phénomène de « mitose abortive » durant lequel les cellules avec une quantité double d'ADN ne parviennent pas à accomplir une mitose complète s'achevant par une division nucléaire et cytoplasmique (karyokinesis and cytokinesis). Ceci se produit une seule fois dans les cellules WT avec un arrêt du cycle en phase G1 tétraploïde alors que le phénomène de mitose abortive se répète plusieurs fois de suite pour les cellules p53 déficientes. Ceci s'est confirmé par une analyse de l'interphase par FISH. En effet, après traitement par SP600125, la duplication de l'ADN n'est pas suivie par le doublement strict du nombre des chromosomes suggérant une mauvaise ségrégation de la

chromatide. Ces résultats démontrent que la mort préférentielle des cellules p53 déficientes après traitement avec la SP600125 est due à défaut d'arrêt du cycle cellulaire conduisant à la polyploïdie et l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose.

L'effet de SP600125 est modulé par l'inhibition de la kinase MPS1

Bien que SP600125 soit décrite et traditionnellement utilisé comme inhibitrice de JNK, l'inhibition des JNK1 et/ou JNK2 par siRNA n'a pas le même effet sur la mortalité et la polyploïdisation des cellules *p53^{-/-}*.

SP600125 inhibe aussi la kinase MPS1 à doses plus importantes, nous sommes alors intéressés à cette protéine kinase pour comprendre son implication dans les mécanismes d'action de SP600125. Nous avons montré que l'inhibition de MPS1 engendre préférentiellement la polyploïdisation des cellules *p53^{-/-}*. Ceci a été confirmé par différents marquages dont l'incorporation de l'EdU lors de la duplication de l'ADN ou encore la présence H₃ phosphorylée caractéristique de la mitose. D'un autre côté, nous avons surexprimé deux formes de MPS1 de façon transitoire dans les cellules, une forme WT et une forme mutée (MPS1-M602Q) non inhibable par SP600125 et nous avons démontré que la surexpression de MPS1 et plus particulièrement la forme mutée annule l'effet polyploïdisant de la drogue. On sait donc que la polyploïdisation passe par la voie MPS1.

Pour conclure cette étude, on peut dire que la mort des cellules p53 déficientes induite par SP600125 est associée à la mitose abortive indiquant que SP600125 constitue un nouvel inducteur de la catastrophe mitotique permettant d'éliminer ces cellules cancéreuses redoutées pour leur chimiorésistance.

PREFERENTIAL KILLING OF P53-DEFICIENT CANCER CELLS BY REVERSINE

Cell Cycle. 11: 2149-2158 (2012)

Nous avons vu dans le précédent travail que la polypléidie préférentielle des cellules p53 déficientes traitées par SP600125 était la voie de la mort préférentielle de ces cellules *p53*^{-/-}. Nous avons également démontré que l'effet polypléidisant était modulé par la protéine kinase MPS1. Nous avons donc décidé de travailler avec une autre molécule qui inhibe cette kinase à savoir la reversine.

Sélectivité de la Reversine pour les cellules *p53*^{-/-}

Le traitement par reversine induit la mort des cellules dès 48h de manière dose-dépendante. D'abord à faible dose (0,2-1 μ M) le traitement est plus toxique pour les cellules de carcinome de colon HCT 116 WT par rapport aux mêmes cellules mais déficientes pour p53. Au-delà de la dose 2 μ M (notamment à 5 μ M) l'effet cytotoxique devient plus marqué chez les cellules *p53*^{-/-}.

Nous avons continué l'étude avec cette dose, 5 μ M, qui a présenté une cytotoxicité préférentielle pour les cellules p53 déficientes.

Le système d'impédance xCELLigence confirme la sélectivité de la reversine pour les cellules HCT 116 *p53*^{-/-}. Parallèlement, notre test de référence pour l'évaluation de l'effet de la drogue à long terme, c'est-à-dire la capacité des cellules à former des colonies après traitement et wash-out pour 15 jours (clonogenic assay), montre également que seules les cellules WT sont capables de pousser après traitement. L'inhibition transitoire de p53 par des siRNA sensibilise aussi les cellules à la reversine.

Caractérisation de la voie de signalisation impliquée dans le signal de mort.

L'apoptose induite par la reversine est due partiellement à l'activation de la voie mitochondriale. En effet, l'inhibition des protéines pro-apoptotiques comme PUMA et BAX réduit la mort engendrée par la reversine et *a contrario* l'inhibition des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L, MCL-1) l'augmente. Par ailleurs, l'inhibition des caspases par le Z-VAD diminue significativement l'effet cytotoxique de la drogue sur les cellules *p53*^{-/-}.

La Reversine perturbe le cycle cellulaire et provoque la polyploïdisation préférentielle des cellules p53 déficientes.

La reversine est décrite comme une drogue qui inhibe MPS1, mais aussi les Aurora kinase A et B. Nous inhibé d'une façon individuelle et en combiné ces kinase et montré que la toxicité préférentielle des cellules p53 déficientes traitées par la reversine n'est pas uniquement causé par ces kinases. Par ailleurs, ces kinases, notamment MPS1 et Aurora B, ont un rôle clef dans le Spindle Assembly Checkpoint. Nous nous somme alors focalisé sur l'état du SAC après traitement et constaté qu'il est désactivé. Ceci nous donne des éléments de réponse sur l'échappement des cellules p53 déficientes aux Checkpoint mitotiques et probablement leurs progressions dans le cycle.

Nous avons étudié de plus près le cycle des cellules WT et *p53*^{-/-} et constaté que les cellules p53 déficientes au bout de 72h de traitement était massivement polyploïdes (16*n* et au-delà) alors que les cellules WT présentaient moins de polyploïdie à savoir 4*n* et 8*n*.

L'analyse de quelques acteurs/régulateurs du cycle cellulaire démontrait que les cellules p53 déficientes continuaient à cycler et à répliquer leurs matériel génétique (incorporation du thymidine analogue EdU, et la production de la cycline B) et à présenter des cellules en mitose (phosphorylation de l'histone 3) plus que les cellules WT.

L'analyse vidéomicroscopique nous montre qu'il s'agit d'un phénomène de « mitose abortive » durant lequel les cellules avec une quantité double d'ADN ne parviennent pas à accomplir une mitose complète s'achevant par une division nucléaire et cytoplasmique (karyokinesis and cytokinesis). Ceci se produit une seule fois dans les cellules WT avec un arrêt du cycle en phase G1 tétraploïde ou octaploïde alors que le phénomène de mitose abortive se répète plusieurs fois de suite pour les cellules p53 déficientes.

Ces résultats démontrent que la mort préférentielle des cellules p53 déficientes après traitement avec la reversine est due à défaut d'arrêt du cycle cellulaire conduisant à la polyploïdie et l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose

DISCUSSION

Durant cette thèse, nous avons essayé d'identifier des agents pharmacologiques capables de tuer efficacement des cellules cancéreuses p53 déficientes et de caractériser leurs modes d'action. Ceci a pour but de proposer de nouvelles pistes dans le développement des traitements utilisés en chimiothérapie et palier le problème de résistance qui caractérise ce genre de tumeurs.

Nous avons successivement identifié deux molécules et confirmé leur effet cytotoxique préférentiel sur les cellules cancéreuses p53 déficiente *in vitro* et *in vivo*. D'abord SP600125 qui est un inhibiteur de serine/thréonine kinases (Colombo et al, 2010) et qui inhibe préférentiellement la voie JNK mais aussi d'autres kinases dont MPS1. Et puis la reversine, un autre inhibiteur de kinases, essentiellement Aurora A, Aurora B et MPS1.

Il a été rapporté que SP600125 peut induire la polyploïdie des cellules MEFs NIH 3T3 (Schmidt et al, 2005) et chez une panoplie de cellules cancéreuses humaines dont les cellules de carcinome de poumon A549 (Miyamoto-Yamasaki et al, 2007) et Calu-1, les cellules du cancer du col de l'utérus HeLa (MacCorkle & Tan, 2004), les cellules du cancer du sein MCF-7, MDA MB-231 et 21PT (Mingo-Sion et al, 2004) ainsi que les ostéosarcomes U2OS (Kim et al, 2010). De son côté, la reversine, qui a été initialement décrite comme une molécule capable de dédifférencier des lignées cellulaires (Chen et al, 2004), engendre aussi l'arrêt de croissance, l'hyperpolarisation et l'apoptose de plusieurs types de cellules cancéreuses, dont des cellules de leucémie aigue, de cancer de thyroïde, de la tête et du cou, du colon, de la prostate ainsi que col de l'utérus (Santaguida et al, 2010 ; Lee et al, 2012 ; D'Alise et al, 2008 ; McMillin et al)2010 ; Hsieh et al, 2007 ; Hua et al, 2012). Ceci indique que ces deux agents possèdent une activité anticancéreuse. Mais aucune étude n'a été publiée pour tester l'efficacité de ces agents à induire la mort préférentielle sur les cellules tumorales *TP53*^{-/-}.

En mourant, nous avons vue que les cellules présentent les marqueurs morphologiques de l'apoptose, soit, la condensation de la chromatine, la fragmentation et le bourgeonnement nucléaire (Galluzzi et al, 2012). En plus, les cellules p53 déficientes en réponse au traitement exhibent une chute du potentiel mitochondrial, un signe biochimique reconnu du pathway intrinsèque apoptotique (Galluzzi et al, 2012). D'un autre côté, la mort induite par les traitements est augmentée par la déplétion des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et inhibé par le knockdown des protéines pro-apoptotique de la famille Bcl-2 ou APAF-1 ainsi que par l'inhibition pharmacologique des inhibiteurs de caspases. On peut dire que la mort induite par SP60025 ou la reversine est une mort apoptotique.

Nous avons aussi démontré que les deux molécules induisent la polyploïdisation préférentielle des cellules p53 déficientes par rapport aux cellules p53 efficaces. Cette double sélectivité cependant (polyploïdie et apoptose), ne peut être résumée par l'inhibition, individuelle et /ou en combinaison, d'une série des plus importantes kinases que ciblent nos deux molécules, dont les kinases JNK1, JNK2 et MPS1 pour SP600125 ou encore AURKA, AURKB et MPS1 pour la reversine. Nous avons montré dans ce travail que, à faible dose, soit 0,5 μM qui est une concentration qui inhibe d'une façon sélective la kinase MPS1, la reversine ne tue pas préférentiellement les cellules du carcinome de colon HCT 116 p53 déficientes. *A contrario*, à dose plus importante, soit 5 μM , une concentration qui en plus de MPS1 inhibe aussi d'autres protéines kinases dont Aurora A et Aurora B, la reversine polyploïdise et tue les cellules $TP53^{-/-}$ plus que les cellules $TP53^{+/+}$. Il en va de même pour SP600125, Nos résultats montrent qu'elle agit *via* l'inhibition d'une multitude de serine/thréonine kinases et que la polyploïdie préférentielle qu'elle induit sur les cellules p53 déficientes est médié en partie par l'inhibition de MPS1. En effet, la surexpression dans les cellules de MPS1 (et plus particulièrement une forme mutée non inhibable par SP600125) limite la polyploïdisation des cellules p53 déficientes traitées avec la drogue. On peut dire donc qu'une des cibles clef des deux agents, SP600125 et reversine, responsable de l'effet préférentiel sur les cellules $TP53^{-/-}$ est la kinase MPS1. Des inhibiteurs spécifiques de MPS1 sont actuellement en développement préclinique et clinique (Colombo et al, 2010 ; Hewitt et al, 2010 ; Kwiatkowski et al, 2010 ; Santaguida et al, 2010 ; Sliedrecht et al, 2010). Nous sommes également en préparation d'un manuscrit sur des inhibiteurs spécifiques de MPS1 *in vitro* et *in vivo*. Mais toutes ces datas ne suggèrent pas que l'inhibition seule de MPS1 par l'un de ces inhibiteurs tue préférentiellement des cellules p53 déficientes.

Il faut prendre en considération que l'inhibition simultanée de plusieurs kinases peut avoir un effet pro-apoptotique synergétique (Olaussen et al, 2009), et ceci a pour conséquence que des inhibiteurs de kinases non spécifiques peuvent avoir une activité anticancéreuse contrairement aux inhibiteurs plus spécifiques comme il a été démontré dans plusieurs études cliniques (Knight et al, 2010). Ainsi, la non spécificité relative de nos deux agents peut constituer un avantage thérapeutique.

Dans la littérature, deux mécanismes différents ont été proposés pour expliquer la polyploïdie induite pas SP600125. L'endoréplication à partir de la phase G_2 due à l'absence de CDK1, mais cette explication a été rapportée pour des cellules p53 WT, et attribuée à l'inhibition indirecte de CDK1 due à l'inhibition de Aurora A et PLK1 (Kim et al, 2010). L'autre explication

est l'enchaînement de cycles successifs de mitoses en absence de karyokinèse et cytokinèse dû à des défauts dans la régulation des Checkpoints du cycle, dont la kinase MPS1 est un effecteur clef. On a baptisé ce phénotype par mitose abortive. C'est le mécanisme qu'on a observé et retenu également pour la reversine.

Il n'y a pas eu d'études publiées qui comparent l'efficacité de l'une ou de l'autre des deux molécules à induire la polyploïdie préférentielle entre des cellules p53 déficientes et efficaces sauf celle de Kuntzen et collaborateurs en 2005 avec SP600125 (Kuntzen et al, 2005). Dans cette étude, après administration pour une courte durée de SP600125 (16h), les auteurs n'observent pas de différence dans la distribution du cycle cellulaire ainsi que dans l'apoptose induite et ce en présence ou absence de p53. Nos résultats par contre montrent que l'absence de p53 joue un rôle majeur dans l'efficacité et les mécanismes de la polyploïdisation induite par SP600125, mais également par la reversine. En effet, les cellules *TP53^{-/-}* traitées montrent un niveau élevé de polyploïdie comparativement aux cellules *TP53^{+/+}*. Elles dupliquent leurs chromosomes de façon abortive en pro-métaphase avec échec de formation de la plaque métaphasique probablement due à la congrégation des centrosomes surnuméraires en un seul amas ou leurs incapacité à orchestrer un fuseau mitotique correcte. Puis, les chromosomes des cellules p53 déficientes se décondensent sans pour autant se séparer comme on l'a démontré par FISH et le marquage en temps réel des chromosomes. Les cellules p53 déficientes sont capables de re-entrer en mitose abortive jusqu'à 3 fois de suite en présence de SP600125 et jusqu'à 4 fois en présence de reversine. L'intervalle qui sépare deux mitoses normales (de 10 à 12h) augmente dans les cellules traitées (de 12 à 14h) et plus encore dans les cellules WT (dans le cas des cellules traitées avec la reversine et qui peuvent enchaîner une deuxième mitose abortive).

La cytotoxicité préférentielle des cellules p53 déficientes engendrée par SP600125 et la reversine à haute dose est directement liée aux aberrations du cycle cellulaire et à la mitose abortive qui en résulte. Après chaque round de mitose abortive, le pathway mitochondrial de l'apoptose est activé, généralement 10h après, et les cellules meurent par catastrophe mitotique en interphase hyperploïde. Ces résultats présentent donc ces deux inhibiteurs de kinase comme nouveaux inducteurs de la catastrophe mitotique (Vitale et al, 2011).

Nous avons aussi démontré que cette catastrophe mitotique sélective aux cellules tumorales p53 déficientes est en partie induite par l'inhibition de la kinase MPS1, cible commune de SP600125 et la reversine.

Afin de valoriser nos travaux et de trouver les mécanismes exactes via les quels ces deux agents pharmacologiques agissent, nous collaborons avec la firme Bayer Shering Pharma à développer des inhibiteurs spécifiques de MPS1 (data non shown/papier en préparation).

En effet, nous avons caractérisé deux molécules qui possèdent une grande affinité à la kinase MPS1 et nous avons démontré *via* ces agents que l'inhibition de MPS1 abrège le SAC et ces principaux composants (BubR1 et MAD2) et induit par conséquent une augmentation des défauts d'attachement des microtubules au kinetochore et le mauvais alignement des chromosomes. Les cellules, sans la formation d'un fuseau équatorial correct et malgré la présence de chromosomes non alignés, entrent en anaphase prématurément. La mitose est accélérée dans les cellules traitées avec nos inhibiteurs de MPS1 confirmant aussi l'implication de la kinase dans la régulation du SAC et la ségrégation des chromosomes. Ces résultats concordent avec d'autres travaux sur des inhibiteurs de MPS1 (Tardif et al, 2011 ; Colombo et al, 2010 ; Hewitt et al, 2010 ; Kwiatkowski et al, 2010 ; Santaguida et al, 2010 ; Sliedrecht et al, 2010).

Cette dérégulation de l'exécution de la mitose après inhibition de MPS1 provoque deux sortes de "destin cellulaire" : (i) soit la cellule se divise asymétriquement et génère deux cellules aneuploïdes qui mourront par catastrophe mitotique en interphase, (ii) soit elle n'arrive pas à accomplir la cytokinèse et devient donc tétraploïde, s'en suit un arrêt du cycle et/ou catastrophe mitotique.

Il existe néanmoins une fraction de ces cellules tétraploïdes qui continuera un deuxième round de mitose abortive avec défaut de cytokinèse et ainsi les mêmes conséquences que pour les cellules "de première génération" soit la mort par catastrophe mitotique en anaphase après division asymétrique soit la polyploïdie.

Il est intéressant de noter que l'impact de l'inhibition de MPS1 dans la polyploïdisation est sujet à controverse. En effet, certains groupes stipulent que l'inhibition de MPS1 ne perturbe point la bi-orientation des chromosomes et la division bipolaire des cellules (Colombo et al, 2010 ; Santaguida et al, 2010 ; Tardif et al, 2011), tandis que d'autres démontrent que l'absence de MPS1 induit des défauts de cytokinèse et la polyploïdie (Fisk et al, 2003 ; Hewitt et al, 2010 ; Jelluma et al, 2008). Cette divergence peut être expliquée par la différence des modèles utilisés ainsi que la stratégie, plus ou moins efficace, pour l'inhibition de MPS1.

Ceci dit, ces résultats impliquant directement MPS1 dans la polyploïdisation des cellules sont concordants avec ce que nous avons trouvé en inhibant MPS1 avec des siRNA et avec la reversine et SP600125, ou encore la réduction de la polyploïdie induite par SP600125 après surexpression de la forme mutée de MPS1 (MPS1^{M602Q}).

Partant du constat que l'instabilité génomique et la désactivation du SAC induite par l'inhibition de MPS1 dans les cellules cancéreuses provoque la catastrophe mitotique et la mort de ces cellules, nous avons combiné deux molécules avec des doses minimales et sub-létales. Le taxol (agent qui augmente la fréquence de défaut de ségrégation des chromosomes) et nos inhibiteurs pharmacologiques de MPS1 (doses n'induisant aucun désordre mitotique et mortalité). Cette combinaison agit en parfaite synergie et induit une augmentation considérable des défauts de ségrégations des chromosomes et leur non alignement sur le fuseau mitotique, le spindle assembly checkpoint est aussi désactivé offrant la possibilité à ces cellules d'entrer en anaphase prématurément. La plupart de ces cellules ne réussissent pas à accomplir une cytokinèse correcte et polyploïdisent (un ou plusieurs autres cycles de mitoses aberrantes), et finissent par mourir par apoptose en interphase.

Cette extraordinaire synergie constitue une réelle piste pour le développement des inhibiteurs de MPS1 en clinique. Et concorde avec d'autres travaux qui ont démontré l'intérêt et l'efficacité de combiner "augmentation des défauts de ségrégation chromosomique" et "inhibition du SAC" dans l'élimination sélective des cellules cancéreuses (Janssen et al, 2009).

Nos études permettront sans doute à promouvoir le potentiel clinique que porte l'inhibition de MPS1 dans la lutte contre les formes résistantes de tumeurs, et plus spécialement celles p53 déficientes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abrieu A, Magnaghi-Jaulin L, Kahana JA, Peter M, Castro A, Vigneron S, Lorca T, Cleveland DW, Labbe JC (2001) Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* **106**(1): 83-93
- Anand S, Penrhyn-Lowe S, Venkitaraman AR (2003) AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* **3**(1): 51-62
- Ando K, Kakeji Y, Kitao H, Imori M, Zhao Y, Yoshida R, Oki E, Yoshinaga K, Matumoto T, Morita M, Sakaguchi Y, Maehara Y High expression of BUBR1 is one of the factors for inducing DNA aneuploidy and progression in gastric cancer. *Cancer Sci* **101**(3): 639-645
- Anzola M, Burgos JJ (2003) Hepatocellular carcinoma: molecular interactions between hepatitis C virus and p53 in hepatocarcinogenesis. *Expert Rev Mol Med* **5**(28): 1-16
- Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M (1993) mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J* **12**(2): 461-468
- Barbieri E, Mehta P, Chen Z, Zhang L, Slack A, Berg S, Shohet JM (2006) MDM2 inhibition sensitizes neuroblastoma to chemotherapy-induced apoptotic cell death. *Mol Cancer Ther* **5**(9): 2358-2365
- Barr AR, Gergely F (2007) Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *J Cell Sci* **120**(Pt 17): 2987-2996
- Bartussek C, Naumann U, Weller M (1999) Accumulation of mutant p53(V143A) modulates the growth, clonogenicity, and radiochemosensitivity of malignant glioma cells independent of endogenous p53 status. *Exp Cell Res* **253**(2): 432-439
- Baudier J, Delphin C, Grunwald D, Khochbin S, Lawrence JJ (1992) Characterization of the tumor suppressor protein p53 as a protein kinase C substrate and a S100b-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(23): 11627-11631
- Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, Kang DH, Wahrer DC, Shannon KE, Lubratovich M, Verselis SJ, Isselbacher KJ, Fraumeni JF, Birch JM, Li FP, Garber JE, Haber DA (1999) Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* **286**(5449): 2528-2531
- Bhonde MR, Hanski ML, Budczies J, Cao M, Gillissen B, Moorthy D, Simonetta F, Scherubl H, Truss M, Hagemeyer C, Mewes HW, Daniel PT, Zeitz M, Hanski C (2006) DNA damage-induced expression of p53 suppresses mitotic checkpoint kinase hMps1: the lack of this suppression in p53MUT cells contributes to apoptosis. *J Biol Chem* **281**(13): 8675-8685
- Biegging KT, Attardi LD Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression. *Trends Cell Biol* **22**(2): 97-106
- Biggins S, Murray AW (2001) The budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint. *Genes Dev* **15**(23): 3118-3129
- Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CS, Novotny M, Slamon DJ, Plowman GD (1998) A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* **17**(11): 3052-3065
- Bischoff JR, Friedman PN, Marshak DR, Prives C, Beach D (1990) Human p53 is phosphorylated by p60-cdc2 and cyclin B-cdc2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(12): 4766-4770

- Blandino G, Levine AJ, Oren M (1999) Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. *Oncogene* **18**(2): 477-485
- Bourhis E, Lingel A, Phung Q, Fairbrother WJ, Cochran AG (2009) Phosphorylation of a borealin dimerization domain is required for proper chromosome segregation. *Biochemistry* **48**(29): 6783-6793
- Brosh R, Rotter V (2009) When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* **9**(10): 701-713
- Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ (1995) Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* **377**(6549): 552-557
- Carmena M, Ruchaud S, Earnshaw WC (2009) Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins. *Curr Opin Cell Biol* **21**(6): 796-805
- Castedo M, Coquelle A, Vitale I, Vivet S, Mouhamad S, Viaud S, Zitvogel L, Kroemer G (2006a) Selective resistance of tetraploid cancer cells against DNA damage-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* **1090**: 35-49
- Castedo M, Coquelle A, Vivet S, Vitale I, Kauffmann A, Dessen P, Pequignot MO, Casares N, Valent A, Mouhamad S, Schmitt E, Modjtahedi N, Vainchenker W, Zitvogel L, Lazar V, Garrido C, Kroemer G (2006b) Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells. *EMBO J* **25**(11): 2584-2595
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G (2004) Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* **23**(16): 2825-2837
- Chan GK, Yen TJ (2003) The mitotic checkpoint: a signaling pathway that allows a single unattached kinetochore to inhibit mitotic exit. *Prog Cell Cycle Res* **5**: 431-439
- Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1999) 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* **401**(6753): 616-620
- Cheeseman IM, Chappie JS, Wilson-Kubalek EM, Desai A (2006) The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell* **127**(5): 983-997
- Chen J, Marechal V, Levine AJ (1993) Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol* **13**(7): 4107-4114
- Chen S, Zhang Q, Wu X, Schultz PG, Ding S (2004) Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule. *J Am Chem Soc* **126**(2): 410-411
- Chen X, Cheung ST, So S, Fan ST, Barry C, Higgins J, Lai KM, Ji J, Dudoit S, Ng IO, Van De Rijn M, Botstein D, Brown PO (2002) Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol Biol Cell* **13**(6): 1929-1939
- Cheek CF, Verma CS, Baselga J, Lane DP Translating p53 into the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* **8**(1): 25-37
- Chin CF, Yeong FM Safeguarding entry into mitosis: the antephasis checkpoint. *Mol Cell Biol* **30**(1): 22-32

Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, Chan FK (2009) Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* **137**(6): 1112-1123

Chu ML, Chavas LM, Douglas KT, Evers PA, Tabernero L (2008) Crystal structure of the catalytic domain of the mitotic checkpoint kinase Mps1 in complex with SP600125. *J Biol Chem* **283**(31): 21495-21500

Chu ML, Lang Z, Chavas LM, Neres J, Fedorova OS, Tabernero L, Cherry M, Williams DH, Douglas KT, Evers PA Biophysical and X-ray crystallographic analysis of Mps1 kinase inhibitor complexes. *Biochemistry* **49**(8): 1689-1701

Ciciarello M, Mangiacasale R, Casenghi M, Zaira Limongi M, D'Angelo M, Soddu S, Lavia P, Cundari E (2001) p53 displacement from centrosomes and p53-mediated G1 arrest following transient inhibition of the mitotic spindle. *J Biol Chem* **276**(22): 19205-19213

Colombo R, Caldarelli M, Mennecozzi M, Giorgini ML, Sola F, Cappella P, Perrera C, Depaolini SR, Rusconi L, Cucchi U, Avanzi N, Bertrand JA, Bossi RT, Pesenti E, Galvani A, Isacchi A, Colotta F, Donati D, Moll J Targeting the mitotic checkpoint for cancer therapy with NMS-P715, an inhibitor of MPS1 kinase. *Cancer Res* **70**(24): 10255-10264

Crighton D, O'Prey J, Bell HS, Ryan KM (2007) p73 regulates DRAM-independent autophagy that does not contribute to programmed cell death. *Cell Death Differ* **14**(6): 1071-1079

Crighton 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**(1): 121-134

D'Alise AM, Amabile G, Iovino M, Di Giorgio FP, Bartiromo M, Sessa F, Villa F, Musacchio A, Cortese R (2008) Reversine, a novel Aurora kinases inhibitor, inhibits colony formation of human acute myeloid leukemia cells. *Mol Cancer Ther* **7**(5): 1140-1149

Dai C, Gu W p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med* **16**(11): 528-536

Dang CV, Lee WM (1989) Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myb, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins. *J Biol Chem* **264**(30): 18019-18023

Daniel J, Coulter J, Woo JH, Wilsbach K, Gabrielson E High levels of the Mps1 checkpoint protein are protective of aneuploidy in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(13): 5384-5389

David AR, Zimmerman MR Cancer: an old disease, a new disease or something in between? *Nat Rev Cancer* **10**(10): 728-733

Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P (1995) Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* **82**(4): 675-684

Ding Z, Yang X, Pater A, Tang SC (2000) Resistance to apoptosis is correlated with the reduced caspase-3 activation and enhanced expression of antiapoptotic proteins in human cervical multidrug-resistant cells. *Biochem Biophys Res Commun* **270**(2): 415-420

- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS, Bradley A (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**(6366): 215-221
- Donzelli S, Biagioni F, Fausti F, Strano S, Fontemaggi G, Blandino G (2008) Oncogenomic Approaches in Exploring Gain of Function of Mutant p53. *Curr Genomics* **9**(3): 200-207
- Dornan D, Bheddah S, Newton K, Ince W, Frantz GD, Dowd P, Koeppen H, Dixit VM, French DM (2004) COP1, the negative regulator of p53, is overexpressed in breast and ovarian adenocarcinomas. *Cancer Res* **64**(20): 7226-7230
- Duiker EW, Meijer A, van der Bilt AR, Meersma GJ, Kooi N, van der Zee AG, de Vries EG, de Jong S Drug-induced caspase 8 upregulation sensitises cisplatin-resistant ovarian carcinoma cells to rhTRAIL-induced apoptosis. *Br J Cancer* **104**(8): 1278-1287
- 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**(5995): 646-649
- Emre D, Terracol R, Poncet A, Rahmani Z, Karess RE A mitotic role for Mad1 beyond the spindle checkpoint. *J Cell Sci* **124**(Pt 10): 1664-1671
- Eom YW, Kim MA, Park SS, Goo MJ, Kwon HJ, Sohn S, Kim WH, Yoon G, Choi KS (2005) Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene* **24**(30): 4765-4777
- Erster S, Moll UM (2004) Stress-induced p53 runs a direct mitochondrial death program: its role in physiologic and pathophysiologic stress responses in vivo. *Cell Cycle* **3**(12): 1492-1495
- Erster S, Moll UM (2005) Stress-induced p53 runs a transcription-independent death program. *Biochem Biophys Res Commun* **331**(3): 843-850
- Espeut J, Gaussen A, Bieling P, Morin V, Prieto S, Fesquet D, Surrey T, Abrieu A (2008) Phosphorylation relieves autoinhibition of the kinetochore motor Cenp-E. *Mol Cell* **29**(5): 637-643
- Feinberg AP, Tycko B (2004) The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* **4**(2): 143-153
- Fields S, Jang SK (1990) Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* **249**(4972): 1046-1049
- Fisk HA, Mattison CP, Winey M (2003) Human Mps1 protein kinase is required for centrosome duplication and normal mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(25): 14875-14880
- Flores ER, Tsai KY, Crowley D, Sengupta S, Yang A, McKeon F, Jacks T (2002) p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* **416**(6880): 560-564
- Frazier MW, He X, Wang J, Gu Z, Cleveland JL, Zambetti GP (1998) Activation of c-myc gene expression by tumor-derived p53 mutants requires a discrete C-terminal domain. *Mol Cell Biol* **18**(7): 3735-3743
- Freedman DA, Wu L, Levine AJ (1999) Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci* **55**(1): 96-107

Friedlander P, Haupt Y, Prives C, Oren M (1996) A mutant p53 that discriminates between p53-responsive genes cannot induce apoptosis. *Mol Cell Biol* **16**(9): 4961-4971

Friess H, Lu Z, Graber HU, Zimmermann A, Adler G, Korc M, Schmid RM, Buchler MW (1998) bax, but not bcl-2, influences the prognosis of human pancreatic cancer. *Gut* **43**(3): 414-421

Fuller BG, Lampson MA, Foley EA, Rosasco-Nitcher S, Le KV, Tobelmann P, Brautigam DL, Stukenberg PT, Kapoor TM (2008) Midzone activation of aurora B in anaphase produces an intracellular phosphorylation gradient. *Nature* **453**(7198): 1132-1136

Gadea BB, Ruderman JV (2006) Aurora B is required for mitotic chromatin-induced phosphorylation of Op18/Stathmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(12): 4493-4498

Galluzzi L, Kroemer G (2008) Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell* **135**(7): 1161-1163

Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Tajeddine N, Kroemer G (2008) Targeting p53 to mitochondria for cancer therapy. *Cell Cycle* **7**(13): 1949-1955

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nunez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* **19**(1): 107-120

Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, Petersen S, Thaesler Z, Pacyna-Gengelbach M, van de Rijn M, Rosen GD, Perou CM, Whyte RI, Altman RB, Brown PO, Botstein D, Petersen I (2001) Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 13784-13789

Gartel AL, Radhakrishnan SK (2005) Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res* **65**(10): 3980-3985

Gatz SA, Wiesmuller L (2006) p53 in recombination and repair. *Cell Death Differ* **13**(6): 1003-1016

Giono LE, Manfredi JJ (2006) The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *J Cell Physiol* **209**(1): 13-20

Gladhaug IP, Westgaard A, Schjolberg AR, Burum-Auensen E, Pomianowska E, Clausen OP Spindle proteins in resected pancreatic head adenocarcinomas: BubR1 is an independent prognostic factor in pancreatobiliary-type tumours. *Histopathology* **56**(3): 345-355

Goldberg Z, Vogt Sionov R, Berger M, Zwang Y, Perets R, Van Etten RA, Oren M, Taya Y, Haupt Y (2002) Tyrosine phosphorylation of Mdm2 by c-Abl: implications for p53 regulation. *EMBO J* **21**(14): 3715-3727

Goldstein I, Marcel V, Olivier M, Oren M, Rotter V, Hainaut P Understanding wild-type and mutant p53 activities in human cancer: new landmarks on the way to targeted therapies. *Cancer Gene Ther* **18**(1): 2-11

Golstein P, Kroemer G (2005) Redundant cell death mechanisms as relics and backups. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1490-1496

- Gorina S, Pavletich NP (1996) Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science* **274**(5289): 1001-1005
- Gottifredi V, Prives C (2001) Molecular biology. Getting p53 out of the nucleus. *Science* **292**(5523): 1851-1852
- Hached K, Xie SZ, Buffin E, Cladiere D, Rachez C, Sacras M, Sorger PK, Wassmann K Mps1 at kinetochores is essential for female mouse meiosis I. *Development* **138**(11): 2261-2271
- Hall SR, Campbell LE, Meek DW (1996) Phosphorylation of p53 at the casein kinase II site selectively regulates p53-dependent transcriptional repression but not transactivation. *Nucleic Acids Res* **24**(6): 1119-1126
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1): 57-70
- Hardwick KG (2005) Checkpoint signalling: Mad2 conformers and signal propagation. *Curr Biol* **15**(4): R122-124
- Harvey M, Vogel H, Morris D, Bradley A, Bernstein A, Donehower LA (1995) A mutant p53 transgene accelerates tumour development in heterozygous but not nullizygous p53-deficient mice. *Nat Genet* **9**(3): 305-311
- Hauf S, Cole RW, LaTerra S, Zimmer C, Schnapp G, Walter R, Heckel A, van Meel J, Rieder CL, Peters JM (2003) The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* **161**(2): 281-294
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y (2003) Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* **116**(Pt 20): 4077-4085
- Henry H, Thomas A, Shen Y, White E (2002) Regulation of the mitochondrial checkpoint in p53-mediated apoptosis confers resistance to cell death. *Oncogene* **21**(5): 748-760
- Hewitt L, Tighe A, Santaguida S, White AM, Jones CD, Musacchio A, Green S, Taylor SS Sustained Mps1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1-C-Mad2 core complex. *J Cell Biol* **190**(1): 25-34
- Higuchi Y (2003) Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem Pharmacol* **66**(8): 1527-1535
- Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge SJ, Mak TW (2000) DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* **287**(5459): 1824-1827
- Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degtarev A, Xavier RJ, Yuan J (2008) Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* **135**(7): 1311-1323
- Ho GH, Calvano JE, Bisogna M, Abouezzi Z, Borgen PI, Cordon-Cardo C, van Zee KJ (2001) Genetic alterations of the p14ARF -hdm2-p53 regulatory pathway in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* **65**(3): 225-232

- Hogg D, Guidos C, Bailey D, Amendola A, Groves T, Davidson J, Schmandt R, Mills G (1994) Cell cycle dependent regulation of the protein kinase TTK. *Oncogene* **9**(1): 89-96
- Homer H, Gui L, Carroll J (2009) A spindle assembly checkpoint protein functions in prophase I arrest and prometaphase progression. *Science* **326**(5955): 991-994
- Horn HF, Vousden KH (2007) Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* **26**(9): 1306-1316
- Hsieh JK, Chan FS, O'Connor DJ, Mitnacht S, Zhong S, Lu X (1999) RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Mol Cell* **3**(2): 181-193
- Hsieh TC, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Wu JM (2007) The 2,6-disubstituted purine reversine induces growth arrest and polyploidy in human cancer cells. *Int J Oncol* **31**(6): 1293-1300
- Hua SC, Chang TC, Chen HR, Lu CH, Liu YW, Chen SH, Yu HI, Chang YP, Lee YR Reversine, a 2,6-disubstituted Purine, as an Anti-cancer Agent in Differentiated and Undifferentiated Thyroid Cancer Cells. *Pharm Res* **29**(7): 1990-2005
- Huang YF, Chang MD, Shieh SY (2009) TTK/hMps1 mediates the p53-dependent postmitotic checkpoint by phosphorylating p53 at Thr18. *Mol Cell Biol* **29**(11): 2935-2944
- Ianzini F, Mackey MA (1997) Spontaneous premature chromosome condensation and mitotic catastrophe following irradiation of HeLa S3 cells. *Int J Radiat Biol* **72**(4): 409-421
- Iliakis G, Wang Y, Guan J, Wang H (2003) DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* **22**(37): 5834-5847
- Itahana K, Dimri G, Campisi J (2001) Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem* **268**(10): 2784-2791
- Jackman D, Pao W, Riely GJ, Engelman JA, Kris MG, Janne PA, Lynch T, Johnson BE, Miller VA Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **28**(2): 357-360
- Jallepalli PV, Lengauer C, Vogelstein B, Bunz F (2003) The Chk2 tumor suppressor is not required for p53 responses in human cancer cells. *J Biol Chem* **278**(23): 20475-20479
- Janssen A, Kops GJ, Medema RH (2009) Elevating the frequency of chromosome mis-segregation as a strategy to kill tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(45): 19108-19113
- Jelluma N, Brenkman AB, van den Broek NJ, Cruijnsen CW, van Osch MH, Lens SM, Medema RH, Kops GJ (2008) Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment. *Cell* **132**(2): 233-246
- Jenkins JR, Rudge K, Chumakov P, Currie GA (1985) The cellular oncogene p53 can be activated by mutagenesis. *Nature* **317**(6040): 816-818
- Johnson GG, Sherrington PD, Carter A, Lin K, Liloglou T, Field JK, Pettitt AR (2009) A novel type of p53 pathway dysfunction in chronic lymphocytic leukemia resulting from two interacting single nucleotide polymorphisms within the p21 gene. *Cancer Res* **69**(12): 5210-5217

- Johnson VL, Scott MI, Holt SV, Hussein D, Taylor SS (2004) Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression. *J Cell Sci* **117**(Pt 8): 1577-1589
- Jones SN, Roe AE, Donehower LA, Bradley A (1995) Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* **378**(6553): 206-208
- Kaesler MD, Iggo RD (2002) Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 95-100
- Kalitsis P, Earle E, Fowler KJ, Choo KH (2000) Bub3 gene disruption in mice reveals essential mitotic spindle checkpoint function during early embryogenesis. *Genes Dev* **14**(18): 2277-2282
- Kandioler-Eckersberger D, Ludwig C, Rudas M, Kappel S, Janschek E, Wenzel C, Schlagbauer-Wadl H, Mittlböck M, Gnant M, Steger G, Jakesz R (2000) TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **6**(1): 50-56
- Katayama H, Brinkley WR, Sen S (2003) The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev* **22**(4): 451-464
- Kilpinen S, Ojala K, Kallioniemi O Analysis of kinase gene expression patterns across 5681 human tissue samples reveals functional genomic taxonomy of the kinome. *PLoS One* **5**(12): e15068
- Kim JA, Lee J, Margolis RL, Fotodar R SP600125 suppresses Cdk1 and induces endoreplication directly from G2 phase, independent of JNK inhibition. *Oncogene* **29**(11): 1702-1716
- Kim PK, Mahidhara R, Seol DW (2001) The role of caspase-8 in resistance to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat* **4**(5): 293-296
- Kim SB, Chae GW, Lee J, Park J, Tak H, Chung JH, Park TG, Ahn JK, Joe CO (2007) Activated Notch1 interacts with p53 to inhibit its phosphorylation and transactivation. *Cell Death Differ* **14**(5): 982-991
- Kitzen JJ, de Jonge MJ, Verweij J Aurora kinase inhibitors. *Crit Rev Oncol Hematol* **73**(2): 99-110
- Knight ZA, Lin H, Shokat KM Targeting the cancer kinome through polypharmacology. *Nat Rev Cancer* **10**(2): 130-137
- Kojima H, Endo K, Moriyama H, Tanaka Y, Alnemri ES, Slapak CA, Teicher B, Kufe D, Datta R (1998) Abrogation of mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in acquired multidrug resistance. *J Biol Chem* **273**(27): 16647-16650
- Koster R, di Pietro A, Timmer-Bosscha H, Gibcus JH, van den Berg A, Suurmeijer AJ, Bischoff R, Gietema JA, de Jong S Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer. *J Clin Invest* **120**(10): 3594-3605
- Krajewski S, Blomqvist C, Franssila K, Krajewska M, Wasenius VM, Niskanen E, Nordling S, Reed JC (1995) Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res* **55**(19): 4471-4478

- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nunez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**(1): 3-11
- Kuntzen C, Sonuc N, De Toni EN, Opelz C, Mucha SR, Gerbes AL, Eichhorst ST (2005) Inhibition of c-Jun-N-terminal-kinase sensitizes tumor cells to CD95-induced apoptosis and induces G2/M cell cycle arrest. *Cancer Res* **65**(15): 6780-6788
- Kuwahara D, Tsutsumi K, Oyake D, Ohta T, Nishikawa H, Koizuka I (2003) Inhibition of caspase-9 activity and Apaf-1 expression in cisplatin-resistant head and neck squamous cell carcinoma cells. *Auris Nasus Larynx* **30 Suppl**: S85-88
- Kwiatkowski N, Jelluma N, Filippakopoulos P, Soundararajan M, Manak MS, Kwon M, Choi HG, Sim T, Deveraux QL, Rottmann S, Pellman D, Shah JV, Kops GJ, Knapp S, Gray NS Small-molecule kinase inhibitors provide insight into Mps1 cell cycle function. *Nat Chem Biol* **6**(5): 359-368
- Lain S, Lane D (2003) Improving cancer therapy by non-genotoxic activation of p53. *Eur J Cancer* **39**(8): 1053-1060
- Lan W, Cleveland DW A chemical tool box defines mitotic and interphase roles for Mps1 kinase. *J Cell Biol* **190**(1): 21-24
- Landi MT, Dracheva T, Rotunno M, Figueroa JD, Liu H, Dasgupta A, Mann FE, Fukuoka J, Hames M, Bergen AW, Murphy SE, Yang P, Pesatori AC, Consonni D, Bertazzi PA, Wacholder S, Shih JH, Caporaso NE, Jen J (2008) Gene expression signature of cigarette smoking and its role in lung adenocarcinoma development and survival. *PLoS One* **3**(2): e1651
- Lane DP, Crawford LV (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**(5701): 261-263
- Lane DP, Lain S (2002) Therapeutic exploitation of the p53 pathway. *Trends Mol Med* **8**(4 Suppl): S38-42
- Lavin MF, Gueven N (2006) The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* **13**(6): 941-950
- Lee S, Thebault P, Freschi L, Beaufile S, Blundell TL, Landry CR, Bolanos-Garcia VM, Elowe S Characterization of spindle checkpoint kinase Mps1 reveals domain with functional and structural similarities to tetratricopeptide repeat motifs of Bub1 and BubR1 checkpoint kinases. *J Biol Chem* **287**(8): 5988-6001
- Lee YR, Wu WC, Ji WT, Chen JY, Cheng YP, Chiang MK, Chen HR Reversine suppresses oral squamous cell carcinoma via cell cycle arrest and concomitantly apoptosis and autophagy. *J Biomed Sci* **19**: 9
- Leng M, Chan DW, Luo H, Zhu C, Qin J, Wang Y (2006) MPS1-dependent mitotic BLM phosphorylation is important for chromosome stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(31): 11485-11490
- Leng RP, Lin Y, Ma W, Wu H, Lemmers B, Chung S, Parant JM, Lozano G, Hakem R, Benchimol S (2003) Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell* **112**(6): 779-791

Leonetti C, Biroccio A, Candiloro A, Citro G, Fornari C, Mottolese M, Del Bufalo D, Zupi G (1999) Increase of cisplatin sensitivity by c-myc antisense oligodeoxynucleotides in a human metastatic melanoma inherently resistant to cisplatin. *Clin Cancer Res* **5**(9): 2588-2595

Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**(3): 323-331

Levine AJ, Oren M (2009) The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* **9**(10): 749-758

Liu X, Winey M The MPS1 Family of Protein Kinases. *Annu Rev Biochem* **81**: 561-585

Lopez-Girona A, Furnari B, Mondesert O, Russell P (1999) Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* **397**(6715): 172-175

Lu H, Levine AJ (1995) Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(11): 5154-5158

Ludwig RL, Bates S, Vousden KH (1996) Differential activation of target cellular promoters by p53 mutants with impaired apoptotic function. *Mol Cell Biol* **16**(9): 4952-4960

MacCorkle RA, Tan TH (2004) Inhibition of JNK2 disrupts anaphase and produces aneuploidy in mammalian cells. *J Biol Chem* **279**(38): 40112-40121

Maciejowski J, George KA, Terret ME, Zhang C, Shokat KM, Jallepalli PV Mps1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complexes during interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint signaling. *J Cell Biol* **190**(1): 89-100

MacLachlan TK, Dash BC, Dicker DT, El-Deiry WS (2000) Repression of BRCA1 through a feedback loop involving p53. *J Biol Chem* **275**(41): 31869-31875

MacLachlan TK, Takimoto R, El-Deiry WS (2002) BRCA1 directs a selective p53-dependent transcriptional response towards growth arrest and DNA repair targets. *Mol Cell Biol* **22**(12): 4280-4292

Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Jr., Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, et al. (1990) Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* **250**(4985): 1233-1238

Maltzman W, Czyzyk L (1984) UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol* **4**(9): 1689-1694

Mandinova A, Lee SW The p53 pathway as a target in cancer therapeutics: obstacles and promise. *Sci Transl Med* **3**(64): 64rv61

Martinez-Rivera M, Siddik ZH Resistance and gain-of-resistance phenotypes in cancers harboring wild-type p53. *Biochem Pharmacol* **83**(8): 1049-1062

Matsuura S, Matsumoto Y, Morishima K, Izumi H, Matsumoto H, Ito E, Tsutsui K, Kobayashi J, Tauchi H, Kajiwara Y, Hama S, Kurisu K, Tahara H, Oshimura M, Komatsu K, Ikeuchi T, Kajii T (2006) Monoallelic BUB1B mutations and defective mitotic-spindle checkpoint in seven families with premature chromatid separation (PCS) syndrome. *Am J Med Genet A* **140**(4): 358-367

Mattison CP, Stumpff J, Wordeman L, Winey M Mip1 associates with both the Mps1 kinase and actin, and is required for cell cortex stability and anaphase spindle positioning. *Cell Cycle* **10**(5): 783-793

May P, May E (1999) Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* **18**(53): 7621-7636

Maya R, Balass M, Kim ST, Shkedy D, Leal JF, Shifman O, Moas M, Buschmann T, Ronai Z, Shiloh Y, Kastan MB, Katzir E, Oren M (2001) ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev* **15**(9): 1067-1077

McGuinness BE, Anger M, Kouznetsova A, Gil-Bernabe AM, Helmhart W, Kudo NR, Wuensche A, Taylor S, Hoog C, Novak B, Nasmyth K (2009) Regulation of APC/C activity in oocytes by a Bub1-dependent spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* **19**(5): 369-380

McMillin DW, Delmore J, Weisberg E, Negri JM, Geer DC, Klippel S, Mitsiades N, Schlossman RL, Munshi NC, Kung AL, Griffin JD, Richardson PG, Anderson KC, Mitsiades CS Tumor cell-specific bioluminescence platform to identify stroma-induced changes to anticancer drug activity. *Nat Med* **16**(4): 483-489

Meek DW, Anderson CW (2009) Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**(6): a000950

Meraldi P, Honda R, Nigg EA (2002) Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *EMBO J* **21**(4): 483-492

Meraldi P, Sorger PK (2005) A dual role for Bub1 in the spindle checkpoint and chromosome congression. *EMBO J* **24**(8): 1621-1633

Mills GB, Schmandt R, McGill M, Amendola A, Hill M, Jacobs K, May C, Rodricks AM, Campbell S, Hogg D (1992) Expression of TTK, a novel human protein kinase, is associated with cell proliferation. *J Biol Chem* **267**(22): 16000-16006

Mingo-Sion AM, Marietta PM, Koller E, Wolf DM, Van Den Berg CL (2004) Inhibition of JNK reduces G2/M transit independent of p53, leading to endoreduplication, decreased proliferation, and apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* **23**(2): 596-604

Miyamoto-Yamasaki Y, Yamasaki M, Tachibana H, Yamada K (2007) Induction of endoreduplication by a JNK inhibitor SP600125 in human lung carcinoma A 549 cells. *Cell Biol Int* **31**(12): 1501-1506

Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J (1998) The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res* **26**(15): 3453-3459

Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**(7): 1237-1245

Mueller T, Voigt W, Simon H, Fruehauf A, Bulankin A, Grothey A, Schmoll HJ (2003) Failure of activation of caspase-9 induces a higher threshold for apoptosis and cisplatin resistance in testicular cancer. *Cancer Res* **63**(2): 513-521

Murphy M, Ahn J, Walker KK, Hoffman WH, Evans RM, Levine AJ, George DL (1999) Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev* **13**(19): 2490-2501

Musacchio A Spindle assembly checkpoint: the third decade. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**(1584): 3595-3604

Musacchio A, Salmon ED (2007) The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(5): 379-393

Nezi L, Musacchio A (2009) Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* **21**(6): 785-795

Nihira K, Taira N, Miki Y, Yoshida K (2008) TTK/Mps1 controls nuclear targeting of c-Abl by 14-3-3-coupled phosphorylation in response to oxidative stress. *Oncogene* **27**(58): 7285-7295

O'Brate A, Giannakakou P (2003) The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code? *Drug Resist Updat* **6**(6): 313-322

O'Connor PM, Jackman J, Bae I, Myers TG, Fan S, Mutoh M, Scudiero DA, Monks A, Sausville EA, Weinstein JN, Friend S, Fornace AJ, Jr., Kohn KW (1997) Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* **57**(19): 4285-4300

Ohi R, Sapra T, Howard J, Mitchison TJ (2004) Differentiation of cytoplasmic and meiotic spindle assembly MCAK functions by Aurora B-dependent phosphorylation. *Mol Biol Cell* **15**(6): 2895-2906

Olaussen KA, Commo F, Tailler M, Lacroix L, Vitale I, Raza SQ, Richon C, Dessen P, Lazar V, Soria JC, Kroemer G (2009) Synergistic proapoptotic effects of the two tyrosine kinase inhibitors pazopanib and lapatinib on multiple carcinoma cell lines. *Oncogene* **28**(48): 4249-4260

Oren M (2003) Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* **10**(4): 431-442

Oren M, Rotter V Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(2): a001107

Ota T, Suto S, Katayama H, Han ZB, Suzuki F, Maeda M, Tanino M, Terada Y, Tatsuka M (2002) Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. *Cancer Res* **62**(18): 5168-5177

Padilla LA, Leung BS, Carson LF (2002) Evidence of an association between human papillomavirus and impaired chemotherapy-induced apoptosis in cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* **85**(1): 59-66

Perego P, Gatti L, Righetti SC, Beretta GL, Carenini N, Corna E, Dal Bo L, Tinelli S, Colangelo D, Leone R, Apostoli P, Lombardi L, Beggiolin G, Piazzoni L, Zunino F (2003) Development of resistance to a trinuclear platinum complex in ovarian carcinoma cells. *Int J Cancer* **105**(5): 617-624

Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M (2007) TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* **26**(15): 2157-2165

Pietenpol JA, Tokino T, Thiagalingam S, el-Deiry WS, Kinzler KW, Vogelstein B (1994) Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(6): 1998-2002

Pike AN, Fisk HA Centriole assembly and the role of Mps1: defensible or dispensable? *Cell Div* **6**: 9

Pugacheva EN, Ivanov AV, Kravchenko JE, Kopnin BP, Levine AJ, Chumakov PM (2002) Novel gain of function activity of p53 mutants: activation of the dUTPase gene expression leading to resistance to 5-fluorouracil. *Oncogene* **21**(30): 4595-4600

Rao CV, Yamada HY, Yao Y, Dai W (2009) Enhanced genomic instabilities caused by deregulated microtubule dynamics and chromosome segregation: a perspective from genetic studies in mice. *Carcinogenesis* **30**(9): 1469-1474

Reddy SK, Rape M, Margansky WA, Kirschner MW (2007) Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation. *Nature* **446**(7138): 921-925

Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, Barrette T, Pandey A, Chinnaiyan AM (2004) ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia* **6**(1): 1-6

Rieder CL, Maiato H (2004) Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev Cell* **7**(5): 637-651

Rogoff HA, Pickering MT, Debatis ME, Jones S, Kowalik TF (2002) E2F1 induces phosphorylation of p53 that is coincident with p53 accumulation and apoptosis. *Mol Cell Biol* **22**(15): 5308-5318

Roman-Gomez J, Castillejo JA, Jimenez A, Gonzalez MG, Moreno F, Rodriguez Mdel C, Barrios M, Maldonado J, Torres A (2002) 5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21(CIP1/WAF1/SDI1) gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **99**(7): 2291-2296

Royou A, Gagou ME, Karess R, Sullivan W BubR1- and Polo-coated DNA tethers facilitate poleward segregation of acentric chromatids. *Cell* **140**(2): 235-245

Sakamuro D, Sabbatini P, White E, Prendergast GC (1997) The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* **15**(8): 887-898

Salvatore G, Nappi TC, Salerno P, Jiang Y, Garbi C, Ugolini C, Miccoli P, Basolo F, Castellone MD, Cirafici AM, Melillo RM, Fusco A, Bittner ML, Santoro M (2007) A cell proliferation and chromosomal instability signature in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res* **67**(21): 10148-10158

Sampath J, Sun D, Kidd VJ, Grenet J, Gandhi A, Shapiro LH, Wang Q, Zambetti GP, Schuetz JD (2001) Mutant p53 cooperates with ETS and selectively up-regulates human MDR1 not MRP1. *J Biol Chem* **276**(42): 39359-39367

Samuel T, Weber HO, Funk JO (2002) Linking DNA damage to cell cycle checkpoints. *Cell Cycle* **1**(3): 162-168

Samuels-Lev Y, O'Connor DJ, Bergamaschi D, Trigiante G, Hsieh JK, Zhong S, Campargue I, Naumovski L, Crook T, Lu X (2001) ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell* **8**(4): 781-794

Santaguida S, Tighe A, D'Alise AM, Taylor SS, Musacchio A Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine. *J Cell Biol* **190**(1): 73-87

- Schmidt M, Bachhuber A, Victor A, Steiner E, Mahlke M, Lehr HA, Pilch H, Weikel W, Knapstein PG (2003) p53 expression and resistance against paclitaxel in patients with metastatic breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **129**(5): 295-302
- Schmidt M, Budirahardja Y, Klompaker R, Medema RH (2005) Ablation of the spindle assembly checkpoint by a compound targeting Mps1. *EMBO Rep* **6**(9): 866-872
- Schmitt CA (2007) Cellular senescence and cancer treatment. *Biochim Biophys Acta* **1775**(1): 5-20
- Schuler M, Green DR (2001) Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* **29**(Pt 6): 684-688
- Schumacher B, Hofmann K, Boulton S, Gartner A (2001) The *C. elegans* homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis. *Curr Biol* **11**(21): 1722-1727
- Sengupta S, Vonesch JL, Waltzinger C, Zheng H, Wasylyk B (2000) Negative cross-talk between p53 and the glucocorticoid receptor and its role in neuroblastoma cells. *EMBO J* **19**(22): 6051-6064
- Shieh SY, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C (2000) The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* **14**(3): 289-300
- Shikama N, Lee CW, France S, Delavaine L, Lyon J, Krstic-Demonacos M, La Thangue NB (1999) A novel cofactor for p300 that regulates the p53 response. *Mol Cell* **4**(3): 365-376
- Sliedrecht T, Zhang C, Shokat KM, Kops GJ Chemical genetic inhibition of Mps1 in stable human cell lines reveals novel aspects of Mps1 function in mitosis. *PLoS One* **5**(4): e10251
- Smith ND, Rubenstein JN, Eggener SE, Kozlowski JM (2003) The p53 tumor suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder cancer. *J Urol* **169**(4): 1219-1228
- Song H, Xu Y (2007) Gain of function of p53 cancer mutants in disrupting critical DNA damage response pathways. *Cell Cycle* **6**(13): 1570-1573
- Song S, Wientjes MG, Gan Y, Au JL (2000) Fibroblast growth factors: an epigenetic mechanism of broad spectrum resistance to anticancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(15): 8658-8663
- Sotillo R, Hernando E, Diaz-Rodriguez E, Teruya-Feldstein J, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Benezra R (2007) Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell* **11**(1): 9-23
- Soussi T, Beroud C (2001) Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* **1**(3): 233-240
- Soussi T, Lozano G (2005) p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **331**(3): 834-842
- St Clair S, Manfredi JJ (2006) The dual specificity phosphatase Cdc25C is a direct target for transcriptional repression by the tumor suppressor p53. *Cell Cycle* **5**(7): 709-713

- Storch H (1976) [Accidental hypothermia--case contribution to the clinical aspects and therapy]. *Z Gesamte Inn Med* **31**(1): 20-24
- Straight PD, Giddings TH, Jr., Winey M (2000) Mps1p regulates meiotic spindle pole body duplication in addition to having novel roles during sporulation. *Mol Biol Cell* **11**(10): 3525-3537
- Strano S, Dell'Orso S, Mongiovi AM, Monti O, Lapi E, Di Agostino S, Fontemaggi G, Blandino G (2007) Mutant p53 proteins: between loss and gain of function. *Head Neck* **29**(5): 488-496
- Stuhmer T, Bargou RC (2006) Selective pharmacologic activation of the p53-dependent pathway as a therapeutic strategy for hematologic malignancies. *Cell Cycle* **5**(1): 39-42
- Sturm I, Kohne CH, Wolff G, Petrowsky H, Hillebrand T, Hauptmann S, Lorenz M, Dorken B, Daniel PT (1999) Analysis of the p53/BAX pathway in colorectal cancer: low BAX is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases. *J Clin Oncol* **17**(5): 1364-1374
- Sturm I, Papadopoulos S, Hillebrand T, Benter T, Luck HJ, Wolff G, Dorken B, Daniel PT (2000) Impaired BAX protein expression in breast cancer: mutational analysis of the BAX and the p53 gene. *Int J Cancer* **87**(4): 517-521
- Sudakin V, Chan GK, Yen TJ (2001) Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* **154**(5): 925-936
- Sui G, Affar el B, Shi Y, Brignone C, Wall NR, Yin P, Donohoe M, Luke MP, Calvo D, Grossman SR (2004) Yin Yang 1 is a negative regulator of p53. *Cell* **117**(7): 859-872
- Suzuki A, Tsutomi Y, Miura M, Akahane K (1999) Caspase 3 inactivation to suppress Fas-mediated apoptosis: identification of binding domain with p21 and ILP and inactivation machinery by p21. *Oncogene* **18**(5): 1239-1244
- Suzuki K, Ojima M, Kodama S, Watanabe M (2003) Radiation-induced DNA damage and delayed induced genomic instability. *Oncogene* **22**(45): 6988-6993
- Szak ST, Mays D, Pietenpol JA (2001) Kinetics of p53 binding to promoter sites in vivo. *Mol Cell Biol* **21**(10): 3375-3386
- Tabori U, Shlien A, Baskin B, Levitt S, Ray P, Alon N, Hawkins C, Bouffet E, Pienkowska M, Lafay-Cousin L, Gozali A, Zhukova N, Shane L, Gonzalez I, Finlay J, Malkin D TP53 alterations determine clinical subgroups and survival of patients with choroid plexus tumors. *J Clin Oncol* **28**(12): 1995-2001
- Talis AL, Huibregtse JM, Howley PM (1998) The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. *J Biol Chem* **273**(11): 6439-6445
- Tanaka TU, Rachidi N, Janke C, Pereira G, Galova M, Schiebel E, Stark MJ, Nasmyth K (2002) Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell* **108**(3): 317-329
- Tang Z, Shu H, Oncel D, Chen S, Yu H (2004) Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint. *Mol Cell* **16**(3): 387-397
- Tardif KD, Rogers A, Cassiano J, Roth BL, Cimborra DM, McKinnon R, Peterson A, Douce TB, Robinson R, Dorweiler I, Davis T, Hess MA, Ostanin K, Papac DI, Baichwal V, McAlexander I, Willardsen JA,

Saunders M, Christophe H, Kumar DV, Wettstein DA, Carlson RO, Williams BL Characterization of the cellular and antitumor effects of MPI-0479605, a small-molecule inhibitor of the mitotic kinase Mps1. *Mol Cancer Ther* **10**(12): 2267-2275

Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Criollo A, Morselli E, Zhu C, Harper F, Nannmark U, Samara C, Pinton P, Vicencio JM, Carnuccio R, Moll UM, Madeo F, Paterlini-Brechot P, Rizzuto R, Szabadkai G, Pierron G, Blomgren K, Tavernarakis N, Codogno P, Cecconi F, Kroemer G (2008) Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* **10**(6): 676-687

Toledo F, Wahl GM (2006) Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* **6**(12): 909-923

Turbin DA, Cheang MC, Bajdik CD, Gelmon KA, Yorida E, De Luca A, Nielsen TO, Huntsman DG, Gilks CB (2006) MDM2 protein expression is a negative prognostic marker in breast carcinoma. *Mod Pathol* **19**(1): 69-74

Vader G, Lens SM (2008) The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1786**(1): 60-72

Vakifahmetoglu H, Olsson M, Tamm C, Heidari N, Orrenius S, Zhivotovsky B (2008) DNA damage induces two distinct modes of cell death in ovarian carcinomas. *Cell Death Differ* **15**(3): 555-566

Vanden Bosch A, Raemaekers T, Denayer S, Torrekens S, Smets N, Moermans K, Dewerchin M, Carmeliet P, Carmeliet G NuSAP is essential for chromatin-induced spindle formation during early embryogenesis. *J Cell Sci* **123**(Pt 19): 3244-3255

Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR (1998) Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int J Cancer* **79**(5): 468-475

Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(6): 385-392

Vitale I, Galluzzi L, Senovilla L, Criollo A, Jemaa M, Castedo M, Kroemer G Illicit survival of cancer cells during polyploidization and depolyploidization. *Cell Death Differ* **18**(9): 1403-1413

Vogelstein B, Kinzler KW (1992) p53 function and dysfunction. *Cell* **70**(4): 523-526

Vousden KH, Lane DP (2007) p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(4): 275-283

Vousden KH, Lu X (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* **2**(8): 594-604

Wang Y, Prives C (1995) Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. *Nature* **376**(6535): 88-91

Weaver BA, Cleveland DW (2005) Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell* **8**(1): 7-12

Wei JH, Chou YF, Ou YH, Yeh YH, Tyan SW, Sun TP, Shen CY, Shieh SY (2005) TTK/hMps1 participates in the regulation of DNA damage checkpoint response by phosphorylating CHK2 on threonine 68. *J Biol Chem* **280**(9): 7748-7757

- Werness BA, Levine AJ, Howley PM (1990) Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**(4951): 76-79
- Williams BR, Prabhu VR, Hunter KE, Glazier CM, Whittaker CA, Housman DE, Amon A (2008) Aneuploidy affects proliferation and spontaneous immortalization in mammalian cells. *Science* **322**(5902): 703-709
- Williams LH, Choong D, Johnson SA, Campbell IG (2006) Genetic and epigenetic analysis of CHEK2 in sporadic breast, colon, and ovarian cancers. *Clin Cancer Res* **12**(23): 6967-6972
- Woo RA, McLure KG, Lees-Miller SP, Rancourt DE, Lee PW (1998) DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature* **394**(6694): 700-704
- Xia X, Ma Q, Li X, Ji T, Chen P, Xu H, Li K, Fang Y, Weng D, Weng Y, Liao S, Han Z, Liu R, Zhu T, Wang S, Xu G, Meng L, Zhou J, Ma D Cytoplasmic p21 is a potential predictor for cisplatin sensitivity in ovarian cancer. *BMC Cancer* **11**: 399
- Xu Y (2008) Induction of genetic instability by gain-of-function p53 cancer mutants. *Oncogene* **27**(25): 3501-3507
- Yazlovitskaya EM, DeHaan RD, Persons DL (2001) Prolonged wild-type p53 protein accumulation and cisplatin resistance. *Biochem Biophys Res Commun* **283**(4): 732-737
- Yeh YH, Huang YF, Lin TY, Shieh SY (2009) The cell cycle checkpoint kinase CHK2 mediates DNA damage-induced stabilization of TTK/hMps1. *Oncogene* **28**(10): 1366-1378
- Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, Tavares S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM (2009) Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* **23**(7): 798-803
- Yu J, Zhang L (2003) No PUMA, no death: implications for p53-dependent apoptosis. *Cancer Cell* **4**(4): 248-249
- Yuan B, Xu Y, Woo JH, Wang Y, Bae YK, Yoon DS, Wersto RP, Tully E, Wilsbach K, Gabrielson E (2006) Increased expression of mitotic checkpoint genes in breast cancer cells with chromosomal instability. *Clin Cancer Res* **12**(2): 405-410
- Yuan K, Li N, Huo Y, Yan F, Yang Y, Ward T, Jin C, Yao X (2009) Recruitment of separase to mitotic chromosomes is regulated by Aurora B. *Cell Cycle* **8**(9): 1433-1443
- Zantema A, Schrier PI, Davis-Olivier A, van Laar T, Vaessen RT, van der EA (1985) Adenovirus serotype determines association and localization of the large E1B tumor antigen with cellular tumor antigen p53 in transformed cells. *Mol Cell Biol* **5**(11): 3084-3091
- Zhang F, Hamanaka RB, Bobrovnikova-Marjon E, Gordan JD, Dai MS, Lu H, Simon MC, Diehl JA (2006) Ribosomal stress couples the unfolded protein response to p53-dependent cell cycle arrest. *J Biol Chem* **281**(40): 30036-30045
- Zhang P, Wang J, Gao W, Yuan BZ, Rogers J, Reed E (2004) CHK2 kinase expression is down-regulated due to promoter methylation in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* **3**: 14

Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR, Sen S (1998) Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* **20**(2): 189-193

Zong WX, Thompson CB (2006) Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev* **20**(1): 1-15

Zuckerman V, Wolynec K, Sionov RV, Haupt S, Haupt Y (2009) Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *J Pathol* **219**(1): 3-15

PAPIERS

Selective killing of p53-deficient cancer cells by SP600125

Mohamed Jemaà^{1,2,3†}, Ilio Vitale^{1,2,3†}, Oliver Kepp^{1,2,3}, Francesco Berardinelli⁴, Lorenzo Galluzzi^{1,2,3}, Laura Senovilla^{1,2,3}, Guillermo Mariño^{1,2,3}, Shoaib Ahmad Malik^{1,2,3}, Santiago Rello-Varona^{1,2,3}, Delphine Lissa^{1,2,3}, Antonio Antocchia⁴, Maximilien Tailler^{1,2,3}, Frederic Schlemmer^{1,2,3}, Francis Harper⁵, Gérard Pierron⁵, Maria Castedo^{1,2,3}, Guido Kroemer^{1,6,7,8,9*}

Keywords: caspases; HCT 116; high-throughput screening; mitochondrial outer membrane permeabilization; MPS1

DOI 10.1002/emmm.201200228

Received October 14, 2011

Revised January 16, 2012

Accepted February 02, 2012

The genetic or functional inactivation of p53 is highly prevalent in human cancers. Using high-content videomicroscopy based on fluorescent *TP53*^{+/+} and *TP53*^{-/-} human colon carcinoma cells, we discovered that SP600125, a broad-spectrum serine/threonine kinase inhibitor, kills p53-deficient cells more efficiently than their p53-proficient counterparts, *in vitro*. Similar observations were obtained *in vivo*, in mice carrying p53-deficient and -proficient human xenografts. Such a preferential cytotoxicity could be attributed to the failure of p53-deficient cells to undergo cell cycle arrest in response to SP600125. *TP53*^{-/-} (but not *TP53*^{+/+}) cells treated with SP600125 became polyploid upon mitotic abortion and progressively succumbed to mitochondrial apoptosis. The expression of an SP600125-resistant variant of the mitotic kinase MPS1 in *TP53*^{-/-} cells reduced SP600125-induced polyploidization. Thus, by targeting MPS1, SP600125 triggers a polyploidization program that cannot be sustained by *TP53*^{-/-} cells, resulting in the activation of mitotic catastrophe, an oncosuppressive mechanism for the eradication of mitosis-incompetent cells.

INTRODUCTION

The genetic or functional inactivation of the tumour suppressor p53 is (one of) the most frequent molecular characteristic(s) of human cancer (Cheek et al, 2011). It has been estimated that nowadays 11 million people are living with a cancer that

contains an inactivating mutation of *TP53* and additional 11 millions have neoplasms in which the p53 pathway is interrupted due to defects in the molecules that act either upstream or downstream of p53 (Brown et al, 2009).

p53 has recently been shown to control cellular homeostasis via multiple mechanisms (Vousden & Ryan, 2009). Still, p53 is best known as the major mediator of the cellular response to stress, a phenomenon that entails both transcriptional (nuclear) and non-transcriptional (cytoplasmic) p53 functions (Green & Kroemer, 2009; Vousden & Prives, 2009). Thus, in response to adverse conditions, p53 can stimulate the execution of apoptotic cell death, mainly through the transactivation of several pro-apoptotic genes (Beckerman & Prives, 2010) or physical interactions with proteins that regulate mitochondrial outer membrane permeabilization (Galluzzi et al, 2011a). Alternatively, stress-activated p53 can arrest the cell cycle, either by transactivating inhibitors of cyclin-dependent kinases or, perhaps, by direct interactions with essential cell cycle regulators (Tritarelli et al, 2004). Therefore, p53-deficient cells are notoriously resistant against the induction of apoptosis (Cheek et al, 2011) and fail to undergo cell cycle arrest in

(1) INSERM, U848, Villejuif, France

(2) Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

(3) Université Paris Sud/Paris XI, Le Kremlin Bicêtre, France

(4) Dipartimento Di Biologia, Università Roma Tre, Rome, Italy

(5) CNRS, UMR8122, Villejuif, France

(6) Metabolomics Platform, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

(7) Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France

(8) Pôle de Biologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, France

(9) Faculté de Médecine, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

*Corresponding author: Tel: +33 1 42 11 60 46; Fax: +33 1 4211 6047; E-mail: kroemer@orange.fr

†These authors contributed equally to this work.

response to DNA damaging agents, implying that they become genomically unstable (Talos & Moll, 2010). The absence of p53 reportedly favours spontaneous tetraploidization in several distinct contexts (Davoli & de Lange, 2011; Ganem et al, 2007). Moreover, in response to mitotic inhibitors such as microtubular poisons, p53-incompetent cells can override mitotic checkpoints and hence can become polyploid, a property that is thought to contribute to chromosomal instability (Aylon et al, 2006; Finkin et al, 2008; Ha et al, 2007; Vitale et al, 2010) as well as to resistance to chemo- and radiotherapy (Castedo et al, 2006; Galluzzi et al, 2011b; Shen et al, 2008).

Thus, p53 plays a prominent role in coupling the effects of DNA damaging agents (such as ionizing radiations or chemicals including platinum derivatives and topoisomerase inhibitors) to the therapeutic induction of senescence or apoptosis. Given the prevalence and functional impact of p53 defects, many groups have attempted to identify pharmacological agents that preferentially kill p53-incompetent cells (Brown et al, 2009). While some of these compounds directly interact with mutant p53 proteins and reestablish their functions via conformational effects (Athar et al, 2011; Selivanova, 2010; Wiman, 2010), others were designed to inhibit the p53-targeting ubiquitin ligase HDM2, leading to increased p53 concentrations (Shangary & Wang, 2009). Moreover, some agents kill p53-deficient cancer cells based on their increased tendency to undergo polyploidization. VX-680 (an inhibitor of Aurora kinases) causes the endoreplication of p53-deficient cells, resulting in their death (Gizatullin et al, 2006). A combination of irradiation and BI-2536 (a inhibitor of Polo-like kinase 1, PLK1) kills *TP53*^{-/-} cells more efficiently than their *TP53*^{+/+} counterparts (Sur et al, 2009), and the selective toxicity of GSK461364A (another PLK1 inhibitor) against p53-deficient cells has been attributed to their failure to undergo cell cycle arrest at a tetraploid stage (Degenhardt et al, 2010). Similarly, 7-hydroxystaurosporine (UCN-01, an inhibitor of the checkpoint kinase CHEK1) has been shown to abrogate DNA damage-induced cell cycle arrest selectively in p53-defective cancer cells (Levesque et al, 2005).

In this study, we launched yet another attempt to identify compounds that kill p53-deficient cells more efficiently than their p53-positive counterparts. Using a novel videomicroscopic assay, we identified SP600125 as an agent whose cytotoxicity is exacerbated in conditions in which p53 is deleted, depleted or inhibited, *in vitro* and *in vivo*. The mechanisms through which SP600125 mediates these effects involve the selective polyploidization of p53-deficient cells due to the inhibition of the mitotic kinase MPS1. Preferentially in the context of p53 deficiency, this results in abortive mitosis, followed by the activation of mitotic catastrophe and cell death via the mitochondrial pathway of apoptosis.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of SP600125 as a selective inhibitor of p53-deficient cells

p53-deficient (*TP53*^{-/-}) human colon carcinoma HCT 116 cells or their p53-proficient wild-type (WT) counterparts stably

expressing red fluorescent protein (RFP)- or green fluorescent protein (GFP)-tagged histone 2B, respectively, were co-cultured in 96-well plates for 48 h in the absence or presence of 480 distinct compounds from the ICCB library of bioactive agents. Throughout this period, the ratio of green WT *versus* red *TP53*^{-/-} HCT 116 cells was quantitatively monitored by videomicroscopy. In line with the fact that p53 often mediates the cytotoxic effects of DNA-damaging agents, 10-hydroxycamptothecin and cisplatin depleted more efficiently WT than *TP53*^{-/-} cells. In contrast SP600125, a broad-spectrum inhibitor of serine/threonine kinases including Aurora kinase A (IC₅₀ = 60 nM) and B (190 nM), CDC7/DBF4 (1.59 μM), CDK2/CYCA (880 nM), CK2 (650 nM), FLT3 (90 nM), Haspin (510 nM), IKK2 (1 μM), JAK3 (410 nM), KIT (870 nM), MELK (110 nM), PDK1 (1.06 μM), PIM2 (1.05 μM), RET (1.09 μM), SYK (1.8 μM), TRKA (70 nM), TYK2 (880 nM) and VEGFR3 (300 nM) (Colombo et al, 2010), but best known for inhibiting c-Jun N-terminal kinases (JNK) 1–3 (100–200 nM) (Bennett et al, 2001; Heo et al, 2004) and MPS1 (IC₅₀ 1.95 μM) (Chu et al, 2008; Schmidt et al, 2005), was the most efficient agent in increasing the ratio between WT and *TP53*^{-/-} cells (Fig 1A–C). These results are consistent with previous observations (Mingo-Sion et al, 2004), and were validated using two alternative methods for measuring cell proliferation and death, namely the xCELLigence[®] system, which quantifies the impedance of adherent cells (Fig 1D), and cytofluorometry (Fig 1E) (Castedo et al, 2002; Galluzzi et al, 2009, 2007). Upon co-staining with the vital dye propidium iodide (PI) and the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$) sensor DiOC₆(3), the frequency of dying (DiOC₆(3)^{low} PI⁻) and dead (DiOC₆(3)^{low} PI⁺) cells was markedly increased among SP600125-treated *TP53*^{-/-} cells but less so among WT control cells (Fig 1E). Altogether, these results suggest that SP600125 is endowed with the capacity of selectively killing p53-deficient tumour cells.

Polyploidization of p53-deficient cells responding to SP600125

Since SP600125 can perturb mitosis and/or induce endoreplication (Kim et al, 2010; Schmidt et al, 2005) we investigated its effect on the cell cycle of WT and *TP53*^{-/-} HCT 116 cells. WT cells treated with SP600125 progressively acquired a 4*n* DNA content (which corresponds to the normal amount of DNA in the G₂ or M phase of the cell cycle), while *TP53*^{-/-} cells accumulated a higher DNA content (8*n* or 16*n*), indicating that they became tetraploid or higher-order polyploid (Fig 2A and B). Accordingly, SP600125 blocked the incorporation of the thymidine analog 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) into DNA in WT but not in *TP53*^{-/-} cells. Moreover, at odds with their WT counterparts, *TP53*^{-/-} cells continued to incorporate EdU even when they possessed a 4*n* or 8*n* DNA content (Fig 2C). A significant fraction of *TP53*^{-/-} (but not WT) cells exhibited histone H3 phosphorylation, an indicator of ongoing mitosis, or stained positively for the mitotic-specific phosphopitope MPM2 at the 8*n* stage (Fig 2D and Fig S1 of Supporting Information). Moreover, in response to SP600125, WT (but not *TP53*^{-/-}) cells exhibited a marked decline in cyclin B (the cyclin associated with the G₂/M phase) levels and increased amounts of cyclin E

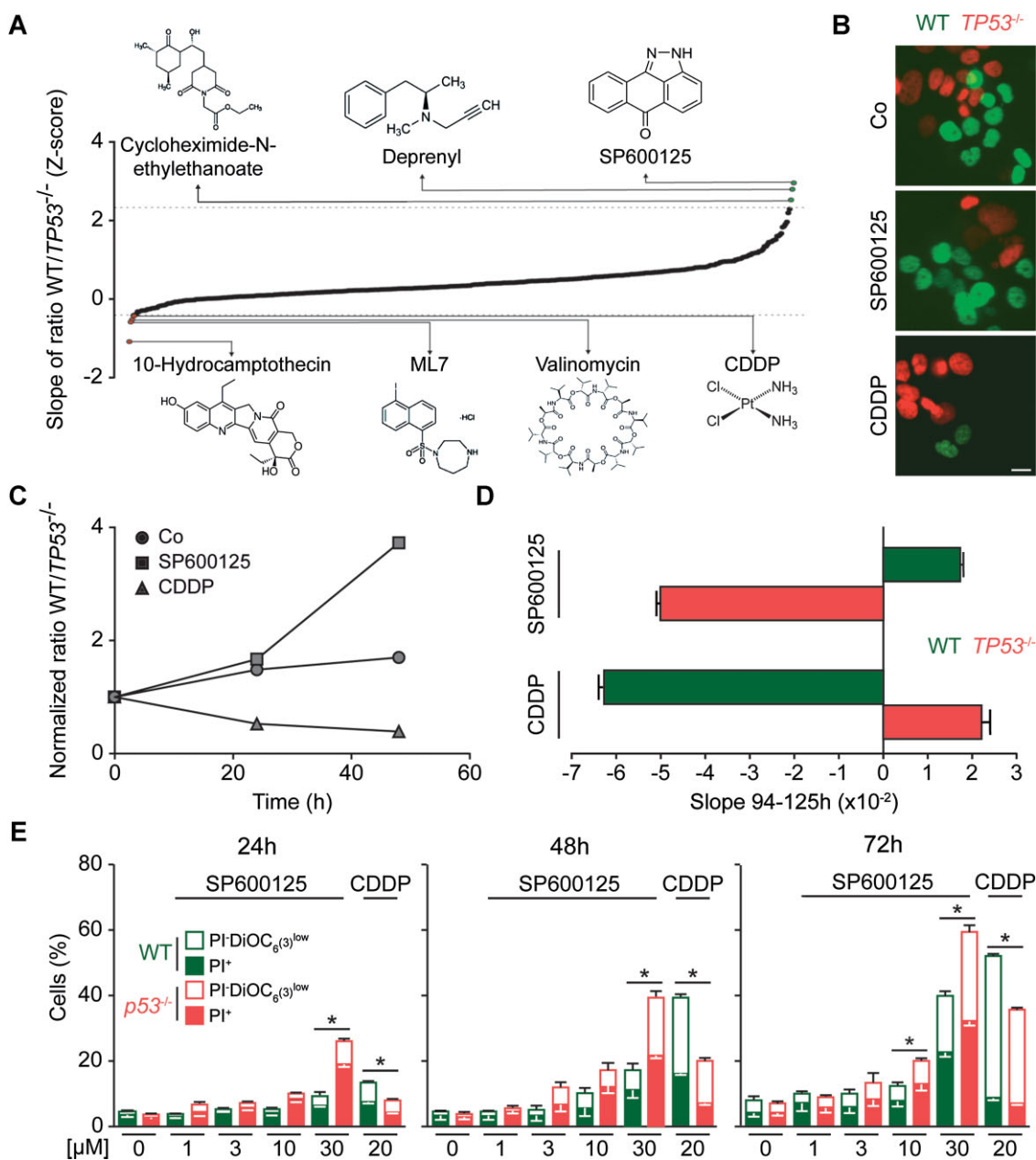


Figure 1. Identification of SP600125 as a selective inhibitor of p53-deficient cells.

A-C. Screening of the ICCB Known Bioactives Library on WT (GFP-H2B-expressing) and TP53^{-/-} (RFP-H2B-expressing) human colon carcinoma HCT 116 cells. Cells were co-cultured at an initial 1:1 ratio in the absence (Co) or presence of 480 distinct signal transduction inhibitors and the capacity of the agents to change the ratio between GFP and RFP-labelled cells was assessed over 48 h by epifluorescence videomicroscopy. The Z-score analysis for all 480 components is reported in (A), snapshots taken at 48 h are shown in (B) (scale bar = 10 μm) and representative changes in the WT/TP53^{-/-} cell ratio upon 30 μM SP600125 or 20 μM cisplatin (CDDP) administration are depicted in (C).

D,E. Confirmation of the preferential effect of SP600125 on TP53^{-/-} cells. HCT 116 cells with the indicated genotype were cultured on plates that allow for the real-time measurement of impedance of adherent cells (for more details refer to Materials and Methods Section), in the presence or absence of 30 μM SP600125, and the slope of the growth curve was determined for triplicates ± SEM (D). Alternatively, cells left were left untreated or incubated with the indicated concentration of SP600125 or CDDP for the indicated time, followed by cytofluorometry for the assessment of cell death-related parameters. Green/red and black columns illustrate the percentage of dying (PI⁻ DiOC₆(3)^{low}) and dead (PI⁺) cells, respectively (means ± SEM; n = 9). *p < 0.05 (Student's t-test).

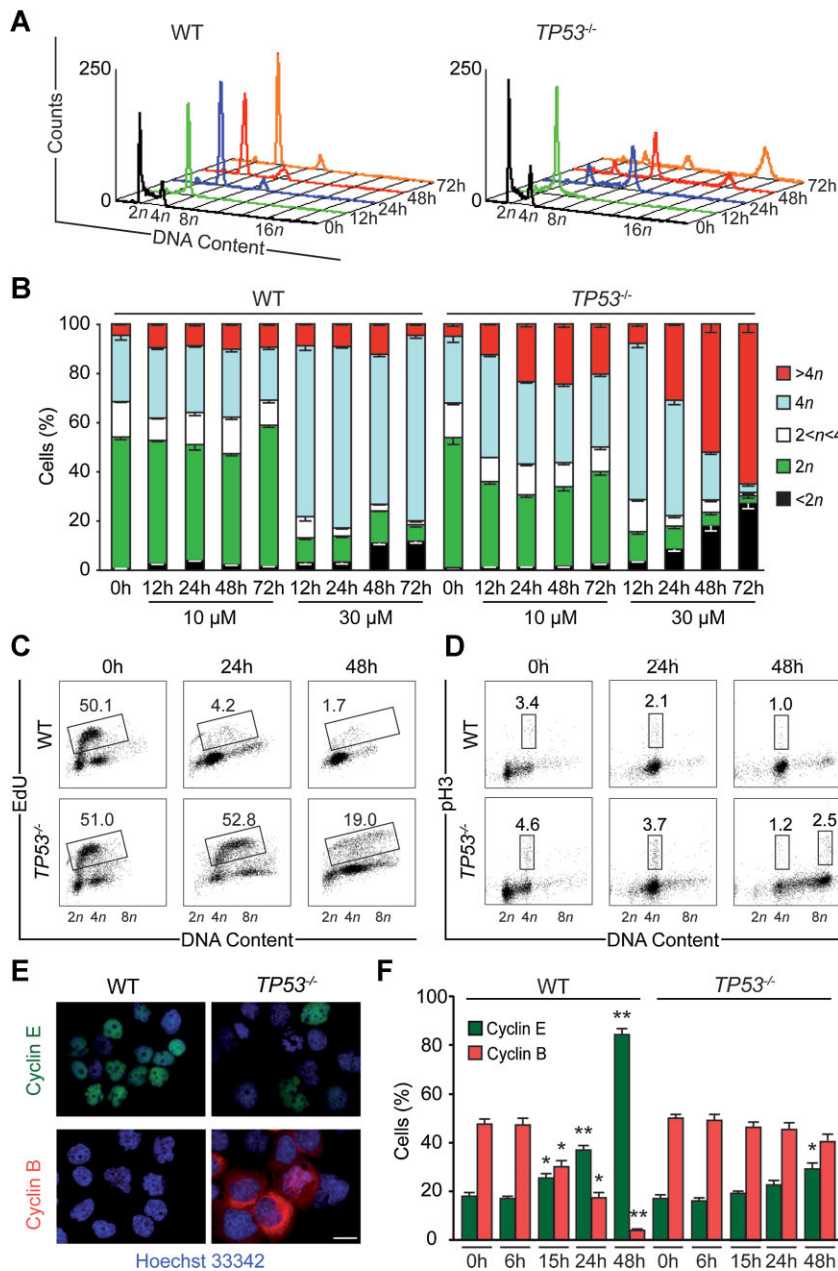


Figure 2. Selective polyploidization of p53-deficient cells in response to SP600125.

A,B. Cell cycle analysis. WT and *TP53*^{-/-} human colon carcinoma HCT 116 cells were exposed to the indicated dose of SP600125 (30 μM where not specified) for the indicated time, followed by the assessment of cell cycle distribution. Panel (A) reports representative cell cycle distributions, panel (B) depicts quantitative data (means ± SEM; *n* = 9).

C-F. Paradoxical antiproliferative effects of SP600125. p53-proficient and p53-deficient cells were cultured in the presence of 30 μM SP600125 as indicated and either labelled with the thymidine analogue EdU during the last 30 min of the assay, followed by fixation and detection of EdU fluorescence (C) or subjected to the immunodetection of phospho-histone H3 (pH3) (D). PI was used to label DNA prior to cytofluorometric acquisitions. Numbers indicate the percentage of cells found in each gate. Alternatively, WT and *TP53*^{-/-} cells were stained for the detection of cyclin B (in red) and cyclin E (in green) (E and F). Representative immunofluorescence microphotographs of cells treated with SP600125 for 48 h are shown in (E) (scale bar = 10 μm), while quantitative results (means ± SEM; *n* = 3) are reported in (F). **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 (Student's *t*-test), as compared to cells of the same genotype left untreated.

(the cyclin associated with the G₁/S phase) (Fig 2E and F and Fig S2 of Supporting Information). Moreover, in response to SP600125, the mitotic index (MI; *i.e.*, the fraction of cells that manifest morphological signs of mitosis) decreased more rapidly in WT cells than in their *TP53*^{-/-} counterparts (Fig 3A). SP600125 indistinguishably induced the disappearance of anaphases and telophases in WT and *TP53*^{-/-} cells (Fig 3A), suggesting that, in the continuative presence of SP600125, *TP53*^{-/-} cells underwent abortive mitoses. Accordingly, in response to SP600125, metaphases became disorganized in both WT and *TP53*^{-/-} cells, as SP600125 abolished the spindle assembly checkpoint (SAC), stimulated the degradation of cyclin B in cells with morphologically evident metaphases, and

increased the number of centrosomes per cell (Fig 3B and C and Fig S3 of Supporting Information).

These results suggest that SP600125 augments the DNA content (preferentially of *TP53*^{-/-} cells) in the absence of normal mitotic chromosome separation, nuclear division (karyokinesis) and daughter cell formation (cytokinesis). Accordingly, interphase FISH indicates that the SP600125-mediated increase in DNA content is not accompanied by a proportional increase in chromosome number but entails a higher hybridization signal, suggesting chromatid segregation failure (Fig 3D and E). In line with these observations, HCT 116 cells in which one single chromosome locus is labelled by GFP (because that locus contains multiple *lacO* copies that are stained by transgene-

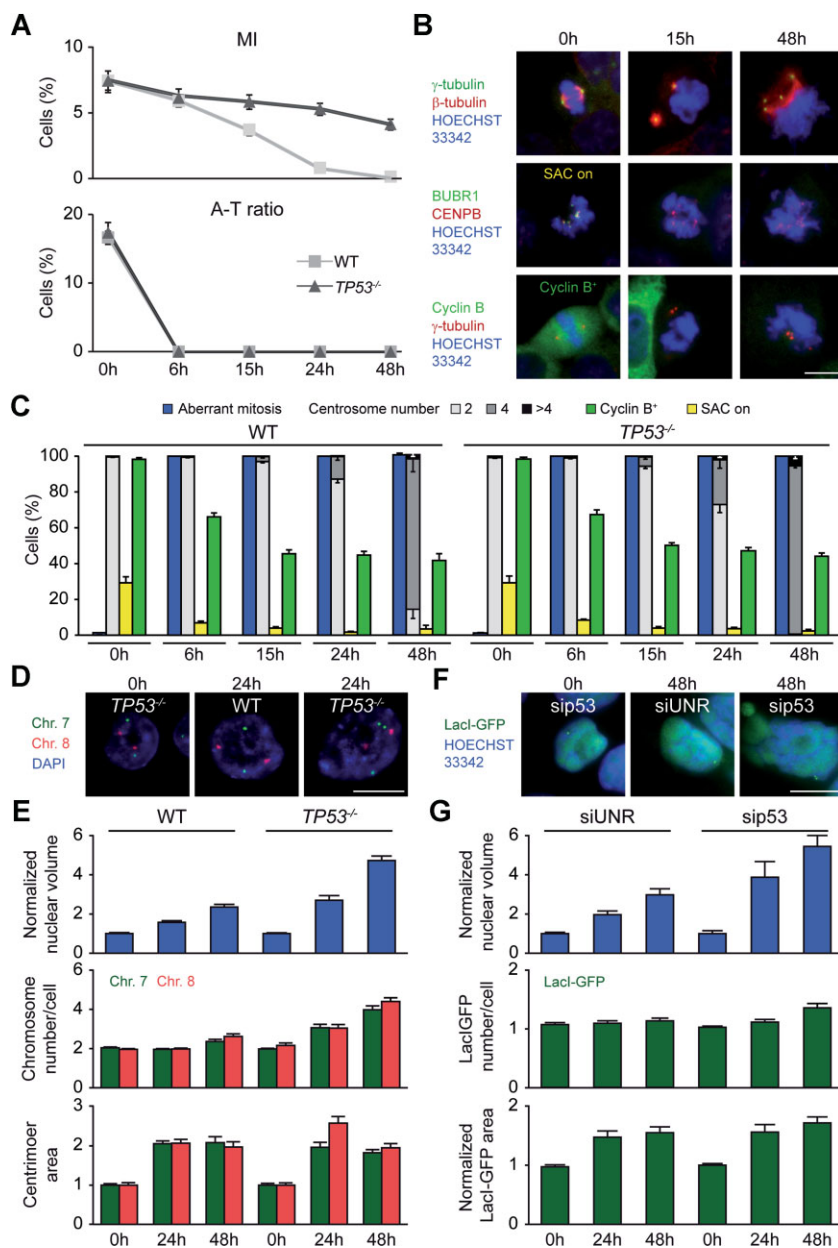


Figure 3. p53-modulated effects of SP600125 on mitotic execution.

A. Mitotic progression in SP600125-treated WT or *TP53*^{-/-} cells. The total frequency of mitoses (MI) and the proportion of anaphases plus telophases among mitotic figures (A-T ratio) as determined by immunofluorescent microscopy are shown in human colon carcinoma HCT 116 cells exposed to 30 μM SP600125 for the indicated time (means ± SEM; n = 5).

B,C. Functional and morphological characterization of metaphases upon SP600125 treatment. Representative immunofluorescence microphotographs of mitoses in *TP53*^{-/-} cells treated with 30 μM SP600125 for the indicated time are shown in (B) and quantitative data are reported in (C) (means ± SEM; n = 4). Centrosomes and kinetochores are visualized with antibodies that recognize γ tubulin and CENP-B, respectively. The activation of the SAC is monitored by the localization at kinetochore of BUBR1. Please note that in (C) only (pro-) metaphases were quantified.

D,E. Interphase FISH of SP600125-treated WT or *TP53*^{-/-} HCT 116 cells. Representative images of WT and *TP53*^{-/-} cells treated with 30 μM SP600125 for 24 h are shown in (D). Panel (E) reports the nuclear volume (normalized to that of untreated cells), the copy number of chromosome 7 (in green) and 8 (in red) per cells, and the centromere hybridization signal area for chromosomes 7 and 8 (normalized to those of untreated cells), as determined by computerized image analyses (means ± SEM, n = 100 cells).

F-G. Effect of SP600125 and p53 on HCT 116 cells that contain one single GFP-labelled chromosome (LacI-GFP). Panel (F) shows representative images of WT HCT 116 cells treated with 30 μM SP600125 for 48 h, either in control conditions (siUNR) or upon the siRNA-mediated p53 knockdown (sip53). Quantitative data on nuclear volume, number of LacI-GFP spots/per cell and LacI-GFP signal area (normalized to that of untreated cells) are shown in (G) (means ± SEM, n = 100 cells). Please note that the nuclear volume in (E) and (G) is directly proportional to ploidy. Scale bar = 10 μm.

expressed LacI-GFP) (Thompson & Compton, 2010) responded to SP600125 with an increase in DNA content that was not paralleled by an increase in chromosome number, in particular upon siRNA-mediated depletion of p53 (Fig 3F and G and Fig S4A of Supporting Information). In this system, chromosomal GFP labelling became more intense, further suggesting that SP600125 induces chromatin duplication in the absence of chromosomal separation.

Involvement of MPS1 in the preferential cytotoxicity of SP600125 against p53-deficient cells

Next, we investigated whether the effects of SP600125 depend on the inhibition of MPS1 or are mediated by off-target

mechanisms. Transfection-enforced expression of WT MPS1 and more so of an SP600125-refractory MPS1 variant (MPS1-M602Q) (Schmidt et al, 2005), reduced the capacity of SP600125 to trigger polyploidization in *TP53*^{-/-} cells (Fig 4A and B and Fig S4B of Supporting Information). The overexpression of MPS1 (and more so of MPS1-M602Q) also reduced the frequency of SP600125-treated *TP53*^{-/-} cancer cells manifesting polyploid S phases and mitoses (Fig 4A, C and D) and staining positively for cyclin B (Fig 4E). In line with the interpretation that SP600125 mediates its effects (at least in part) by inhibiting MPS1, we observed that the siRNA-mediated depletion of MPS1 induced polyploidization more efficiently in *TP53*^{-/-} cells than in their WT counterparts (Fig 4F and G and Fig S4C of

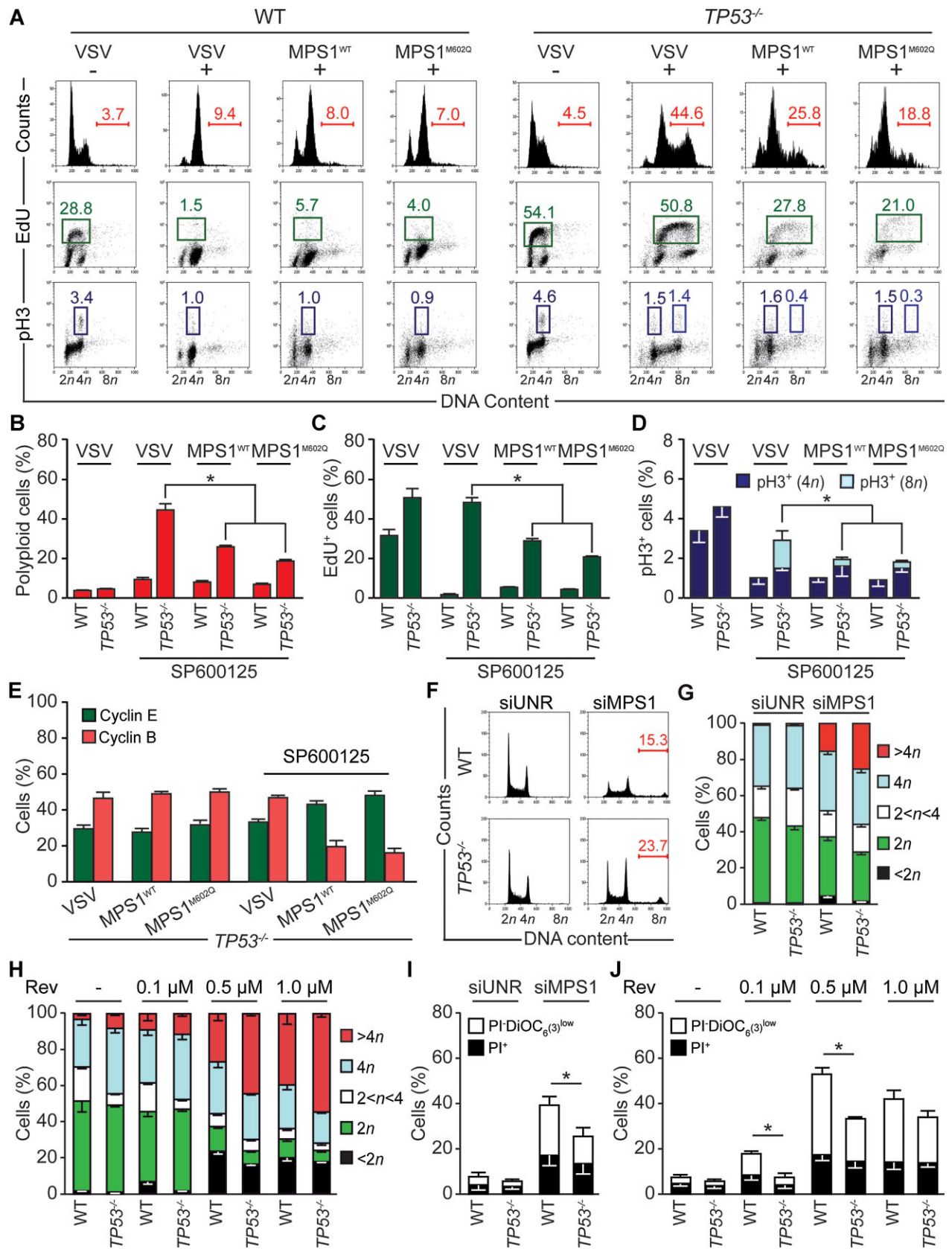


Figure 4.

Supporting Information). Similarly, the highly specific MPS1 inhibitor reversine (Santaguida et al, 2010) induced the preferential polyploidization of $TP53^{-/-}$ cells (Fig 4H). Nonetheless, depletion or inhibition of MPS1 failed to kill p53-deficient cells more efficiently than their WT counterparts (Fig 4I and J and Fig S5 of Supporting Information), suggesting that MPS1 inhibition is required but not sufficient for the selective killing of $TP53^{-/-}$ cells by SP600125. Finally, the preferential killing of p53-negative over p53-expressing cells was not reproduced by the selective depletion of Aurora kinase A, Aurora kinase B, CHEK1, CHEK2, FLT3, JNK1, JNK2 and MEK1 alone or in various combinations including with MPS1 (Figs S6–S8 of Supporting Information).

Mechanisms of cell death induced by SP600125

To understand the link(s) between the polyploidization of $TP53^{-/-}$ cells and their enhanced mortality, we performed detailed videomicroscopic analyses of histone 2B (H2B)-GFP-expressing WT and $TP53^{-/-}$ cells responding to SP600125 (Fig 5A). While there were no differences in the proliferative potential of untreated WT and $TP53^{-/-}$ cells, dramatic discrepancies became apparent upon exposure to SP600125 (Fig 5B). In the presence of SP600125, indeed, WT cells did not manifest a mitotic arrest but typically underwent one round of abortive mitosis featuring a transient phase of chromatin condensation but not a symmetric metaphase plate, followed by karyokinesis failure, no cytokinesis and either quiescence (no further mitosis) or cell death (Fig 5A and B and Video 1 of Supporting Information). In contrast, more than half of SP600125-treated $TP53^{-/-}$ cells underwent two consecutive rounds of abortive mitosis (in the absence of karyokinesis and cytokinesis), leading to increased nuclear size and DNA content (Fig 5A–D and Video 2 of Supporting Information). Importantly, in a significant fraction of these cells, the first or second round of abortive mitosis was followed by the activation of mitotic catastrophe and cell death (Vitale et al, 2011), which always occurred 10 h after from mitotic failure (and never during mitosis) (Fig 5A–D and Video 3 of Supporting Information). In line with these results, non-proliferating $TP53^{-/-}$ cells (cultured either in presence of low serum concentrations or at high confluence) were partially protected against SP600125, and their selective susceptibility to the drug was lost (Fig 6A). This finding

unambiguously proves the causal link between proliferation and cell death as induced by SP600125. Clonogenic assays confirmed that SP600125 was more efficient in permanently reducing the clonogenic potential of $TP53^{-/-}$ cells than that of their WT counterparts (Fig 6B). This loss of proliferative capacity was accompanied by the activation of mitochondrial pathways of apoptosis, as documented by the $\Delta\psi_m$ dissipation (see above), the release of cytochrome *c* from mitochondria and the subsequent activation of caspase-3 and chromatin condensation (Fig 6C). The knockdown of pro-apoptotic proteins such as PUMA and BAX (but not BAK) reduced, while the depletion of Bcl-2-like apoptosis inhibitors (*i.e.* Bcl-2, Bcl-X_L and MCL-1) enhanced, the fraction of $TP53^{-/-}$ cells succumbing to SP600125 (Fig 6D). The broad-spectrum caspase inhibitor Z-VAD-fmk inhibited cell death as well as the appearance of a sub-diploid population of apoptotic bodies as induced by SP600125 (Fig 6E).

Altogether, these results suggest that SP600125 kills $TP53^{-/-}$ cells secondary to one or two rounds of mitotic abortion and following the activation of the mitochondrial pathway of apoptosis. Thus, SP600125 triggers one program of mitotic catastrophe, preferentially in p53-deficient cells.

p53-deficient cancer cell killing by SP600125 *in vitro* and *in vivo*

SP600125 selectively killed $TP53^{-/-}$ (as opposed to WT as well as to $BAX^{-/-}$, $CHK2^{-/-}$ and $CDKN1A^{-/-}$) HCT 116 cells, suggesting that its effect is specific (Fig 7A). The depletion of p53 by three distinct siRNAs and the transient transfection of two dominant-negative p53 mutants (His175 and His273) sensitized WT HCT 116 cells to SP600125, mimicking the effect of gene knockout (Fig 7B and C and Fig S2D of Supporting Information). Similarly, the deletion, depletion or inhibition of p53 sensitized cell lines other than HCT 116 to SP600125. This applied to human colorectal cancer RKO cells subjected to the siRNA-mediated knockdown of p53 (Fig 7D and Fig S2E of Supporting Information), human osteosarcoma Saos-2 cells expressing p53-His273 in a doxycycline-inducible fashion (Fig 7E), human ovarian carcinoma SKOV-3 cells expressing two different variants of dominant-negative p53 (Fig 7F) and mouse embryonic fibroblasts (MEFs) lacking *Tp53* due to homologous recombination (Fig 7G). Moreover, SP600125 killed non-

Figure 4. Implication of MPS1 in the p53-dependent effects of SP600125 on the cell cycle.

- A–D.** Contribution of MPS1 to cell cycle progression. WT and $TP53^{-/-}$ human colon carcinoma HCT 116 cells were transfected with an empty vector (VSV) or with a plasmid encoding WT MPS1 or an SP600125-resistant variant of MPS1 (MPS1^{M602Q}), then left untreated (–) or treated with 30 μ M SP600125 for 24 h (+) and subjected to cell cycle analysis and assessed for active DNA synthesis (by means of EdU labelling) and histone H3 phosphorylation (by immunofluorescence). Representative cell cycle distributions and scatter plots are shown in (A) (numbers refer to the percentage of cells found in each gate) and quantitative results (means \pm SEM, $n = 3$) are reported in (B–D). * $p < 0.05$ (Student's *t*-test).
- E.** Impact of MPS1 on cyclin B and E levels in $TP53^{-/-}$ HCT 116 cells. The frequency of cells expressing cyclin E (in green) or cyclin B (in red) upon transfection with the indicated plasmids and treatment with 30 μ M SP600125 for 24 h was determined by immunofluorescence (means \pm SEM, $n = 3$).
- F–J.** Effects of MPS1 depletion or inhibition on WT or $TP53^{-/-}$ cells. Seventy-two hours after transfection with a control siRNA (siUNR) or with a siRNA targeting MPS1 (siMPS1) (F, G and I) or 48 h after the administration of the indicated concentrations of reversine (Rev) (H and J), WT or $TP53^{-/-}$ HCT 116 cells were stained to measure DNA content (F–H) or cell death-related parameters (I and J). Representative cell cycle distributions are shown in (F) (numbers refers to the percentage of cells displaying a $>4n$ DNA content), and quantitative data are reported in G–J (means \pm SEM, $n = 6$). In (I and J), white and black columns illustrate the percentage of dying (PI[–] DiOC₆(3)^{low}) and dead (PI⁺) cells, respectively (means \pm SEM; $n = 6$). * $p < 0.05$ (Student's *t*-test), as compared to $TP53^{-/-}$ cells transfected with the same siRNA (I) or treated with the same concentration of Rev (J).

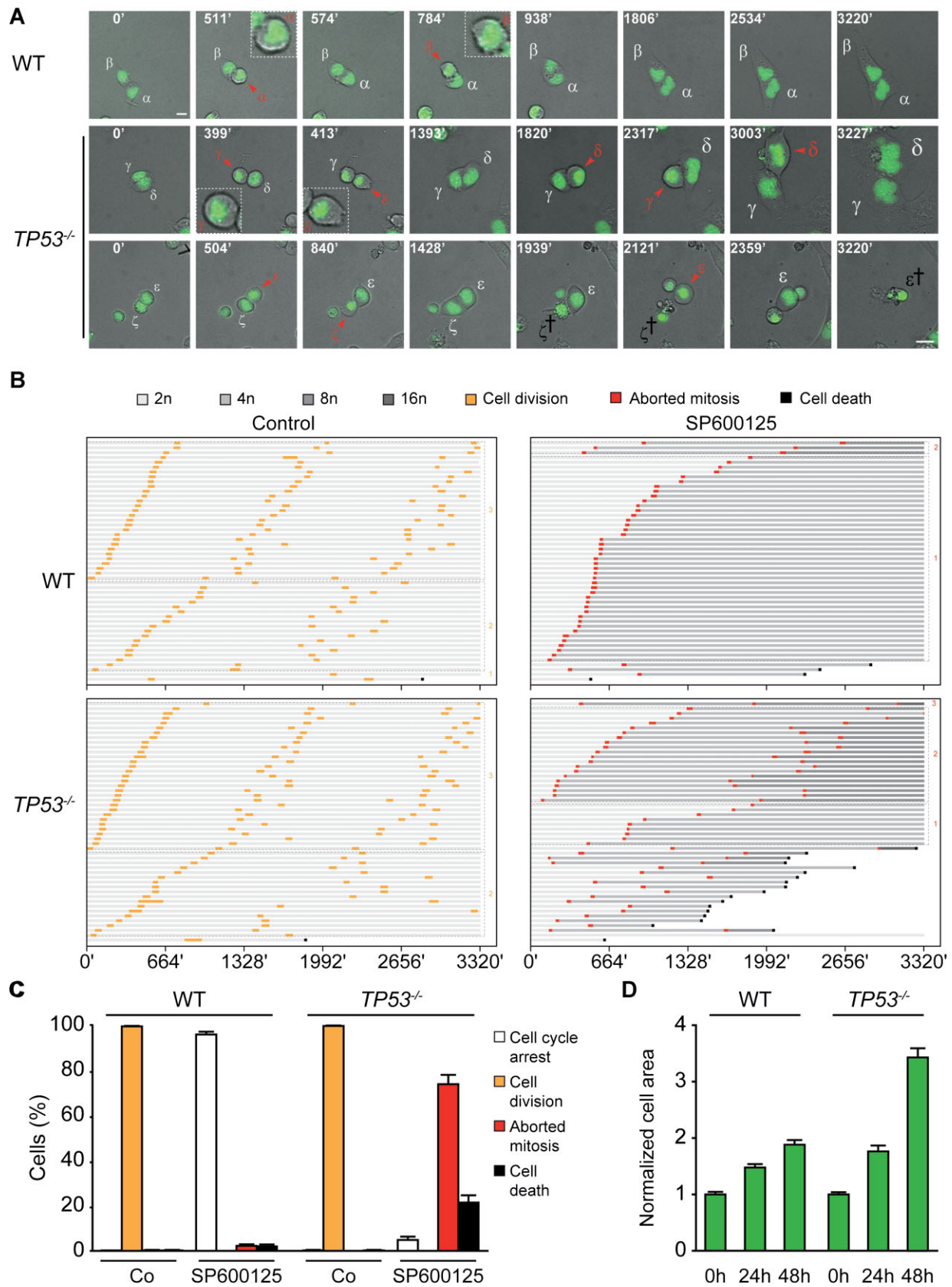


Figure 5.

immortalized *Tp53*^{-/-} mouse adult fibroblasts (at early culture passages) more efficiently than their p53-sufficient counterparts (Fig 7H). These results suggest that the capacity of SP600125 to selectively eliminate *TP53*^{-/-} cells can be generalized. Importantly, not only the absence of p53 but also the continuative presence of SP600125 is required for efficient cell death induction, confirming the notion that, in p53-deficient contexts, SP600125 promotes mitotic aberrations that activate a delayed program of mitotic catastrophe-induced cell death (Fig S9 of Supporting Information). Of note, the intraperitoneal administration of SP600125 did not affect the growth of p53-proficient WT HCT 116 tumours xenografted in athymic mice. However, the same systemic regimen was able to inhibit the growth of isogenic *TP53*^{-/-} HCT 116 tumours (Fig 7I), underscoring the notion that SP600125 can mediate selective therapeutic effects against p53-deficient tumours *in vivo*.

CONCLUDING REMARKS

In this paper, we identified SP600125 as an agent that induces polyploidization and cell death preferentially in p53-deficient cells. SP600125 is a multi-kinase inhibitor (Colombo et al, 2010) and its selective toxicity on *TP53*^{-/-} cells could not be recapitulated by the selective depletion of several among its most prominent pharmacological targets including JNK1, JNK2 or MPS1, alone or in combination. This is in contrast with previous results indicating that SP600125-induced cell death depends on JNK (Mingo-Sion et al, 2004) and that *TP53*^{-/-} cells are sensitive to JNK2 depletion (Potapova et al, 2000). Rather, our results suggest that SP600125 mediates its cytotoxic effects via a multipronged inhibitory action on several serine/threonine kinases. Nonetheless, it appears that the inhibition of MPS1 is at least co-responsible for the preferential effects of SP600125 on the cell cycle of *TP53*^{-/-} cells. Indeed, transfection with MPS1 (and more so with an SP600125-resistant mutant of MPS1) limited the polyploidization of *TP53*^{-/-} cells responding to SP600125. Thus, one of (but not the sole) targets of SP600125 underlying its therapeutic profile against p53-deficient cells is MPS1. Highly specific MPS1 inhibitors are currently in preclinical and clinical development (Colombo et al, 2010; Hewitt et al, 2010; Kwiatkowski et al, 2010; Santaguida et al, 2010; Sliedrecht et al, 2010). However, there are no reports indicating that such compounds would preferentially kill p53-deficient cells. It should be noted that the simultaneous

inhibition of several kinases may exert synergistic pro-apoptotic actions (Olaussen et al, 2009) and that less specific kinase inhibitors may have broader anticancer effects than highly targeted agents, as this has been determined in several clinical studies (Knight et al, 2010). Thus, the relative non-specificity of SP600125 may turn into a therapeutic advantage.

Previous groups reported that SP600125 can induce polyploidization in NIH 3T3 MEFs (Schmidt et al, 2005) and in multiple different human cancer cells, including non-small cell lung carcinoma (A549) (Miyamoto-Yamasaki et al, 2007), small lung carcinoma (Calu-1), cervical carcinoma (HeLa; MacCorkle & Tan, 2004), breast cancer (MCF-7, MDA MB-231, and 21PT) (Mingo-Sion et al, 2004), osteosarcoma (U2OS) (Kim et al, 2010) and mantle cell lymphoma cells (Wang et al, 2009). Two different mechanisms have been proposed for this effect, namely subsequent rounds of mitosis in the absence of karyokinesis and cytokinesis or, alternatively, direct endoduplication from the G₂ phase, due to the inhibition of CDK1. This latter mechanism has been described to occur in p53-sufficient cells, and has been attributed to the (indirect) inhibition of CDK1 secondary to that of Aurora kinase A and PLK1 (Kim et al, 2010). To our knowledge, no systematic studies have been performed so far to compare the efficacy of SP600125-induced polyploidization in p53-sufficient and p53-deficient cells with one exception (Kuntzen et al, 2005). In this study, upon SP600125 administration for a short time period (16 h), the authors observed no differences in cell cycle distribution and cell death activation in presence or absence of p53. At odds with this, our results suggest that p53 has a profound impact on the efficacy (and perhaps the mechanism) of polyploidization as induced by SP600125. In response to SP600125, *TP53*^{-/-} cells reach higher level of ploidy than their *TP53*^{+/+} counterparts, and they do so while contracting their chromosomes periodically in abortive (pro-)metaphases without forming *bona fide* metaphase plates, perhaps because centrosomes aggregate in a single cluster or they are not able to orchestrate a correct mitotic spindle. Thereafter, the chromosomes of *TP53*^{-/-} cells decondense with no signs of anaphase-associated chromosomal movements and in the absence of complete chromosome separation, as indicated by FISH and live chromosome labelling. *TP53*^{-/-} cells are able to go through this round of abortive mitosis up to three times in the presence of SP600125. In any of these rounds (most often in the first or second one, rarely in the third one), the mitochondrial pathway of apoptosis gets activated, most frequently with a latency of approximately 10 h after mitosis.

Figure 5. Videomicroscopic cell cycle profiling of SP600125 effects on WT and *TP53*^{-/-} cells. WT and *TP53*^{-/-} human colon carcinoma HCT 116 cells engineered to express a GFP-histone 2B fusion protein were treated with 30 μ M SP600125 (time = 0 min) and then followed by live videomicroscopy for 3320 min.

- Representative images. Greek letters refer to individual cells that underwent abortive mitosis (red labelling and arrowhead) – with transient chromatin condensation (inserts) – or apoptosis (black labelling and cross). Please note the increase in cell diameter (depicted by the increase in letter size), in particular among *TP53*^{-/-} cells.
- Cell fate profiles of untreated (control) or SP600125-treated cells with the indicated genotypes, as shown for 50 cells in each condition. Orange and red traits depict productive cell divisions and aborted mitoses, respectively. Grey darkening indicates an increase in cell ploidy.
- Quantification of cell fates (C) or cell size increments (D) among WT and *TP53*^{-/-} HCT 116 cells left untreated (Co) or administered with 30 μ M SP600125 for 48 h (means \pm SEM, n = 100 cells per data point). In (C), only cells generated by a normal or abortive mitosis within the first 300 min of the assays were tracked and quantified. Scale bar = 10 μ m.

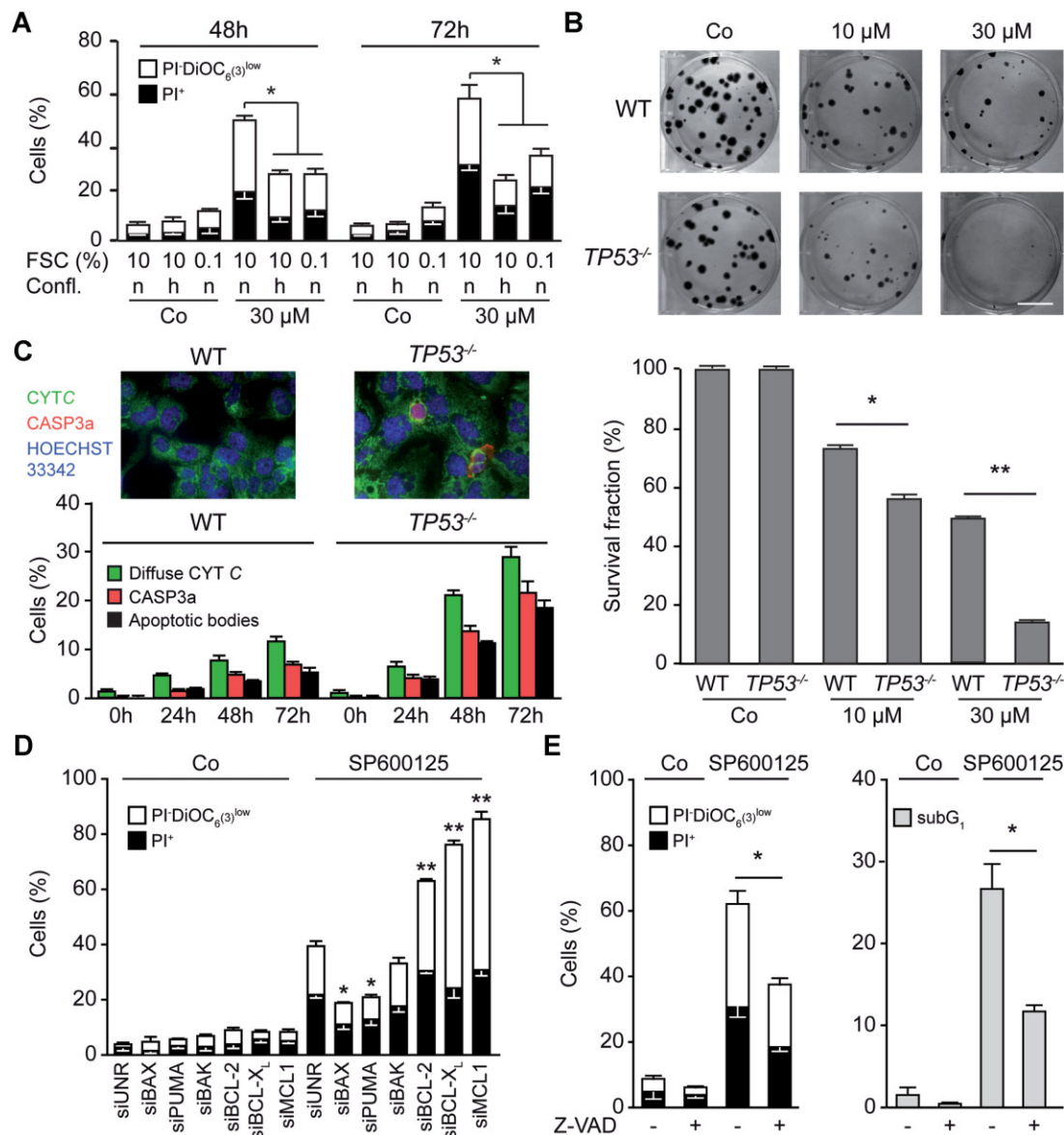


Figure 6. Mechanisms of SP600125-induced cell death in TP53^{-/-} cells.

- A.** Impact of cell proliferation on cell death triggered by SP600125. TP53^{-/-} colon carcinoma HCT 116 cells were maintained in the presence of in the absence of 10% foetal calf serum (FCS) or cultured at normal (n) or high (h) confluence and treated or not with 30 μM SP600125 for the indicated time, followed by cytofluorometric assessment of the cell death-related parameters (means ± SEM; n = 4). *p < 0.05, (Student's t-test).
- B.** Clonogenic survival of WT and TP53^{-/-} HCT 116 cells. Representative plates as well as quantitative data (means ± SEM, n = 6, upon normalization to untreated cells of the same genotype) are shown. *p < 0.05 and **p < 0.01 (Student's t-test). Scale bar = 3 cm.
- C.** Mitochondrial cytochrome c release upstream of caspase-3 activation. Cells were stained to visualize cytochrome c (CYTC, green fluorescence), activated caspase-3 (CASP3a, red fluorescence) and nuclei (Hoechst 33342, blue fluorescence), and the percentage of cells exhibiting diffuse (as opposed to punctuate) CYTC staining or caspase-3 activation was determined, together with the frequency of apoptotic bodies. Representative fluorescence microphotographs of WT and TP53^{-/-} HCT 116 cells treated with 30 μM SP600125 for 72 h and quantitative results at the indicated time (means ± SEM, n = 4) are shown. Scale bar = 10 μm.
- D.** Involvement of Bcl-2-like proteins in the death of TP53^{-/-} HCT 116 cells as induced by SP600125. Cells were subjected to siRNA-mediated depletion of the indicated proteins (siUNR = control siRNA) for 24 h, followed by the administration of 30 μM SP600125 for further 48 h and cytofluorometric assessment of cell death-related phenomena (means ± SEM; n = 4). *p < 0.05 and **p < 0.01 (Student's t-test), as compared to siUNR-transfected cells exposed to SP600125. In (A, C and D), white and black columns illustrate the percentage of dying (PI⁻ DiOC₆(3)^{low}) and dead (PI⁺) cells, respectively.
- E.** Effects of Z-VAD-fmk on SP600125-induced manifestations of cell death. TP53^{-/-} HCT 116 cells were left untreated (Co) or treated for 72 h with 30 μM SP600125 alone or in combination with 25 μM Z-VAD-fmk (Z-VAD), followed by staining with Hoechst 33342 (to assess DNA degradation to a subdiploid level, subG₁) or DiOC₆(3)/PI co-staining and cytofluorometry (means ± SEM, n = 3). *p < 0.05 (Student's t-test).

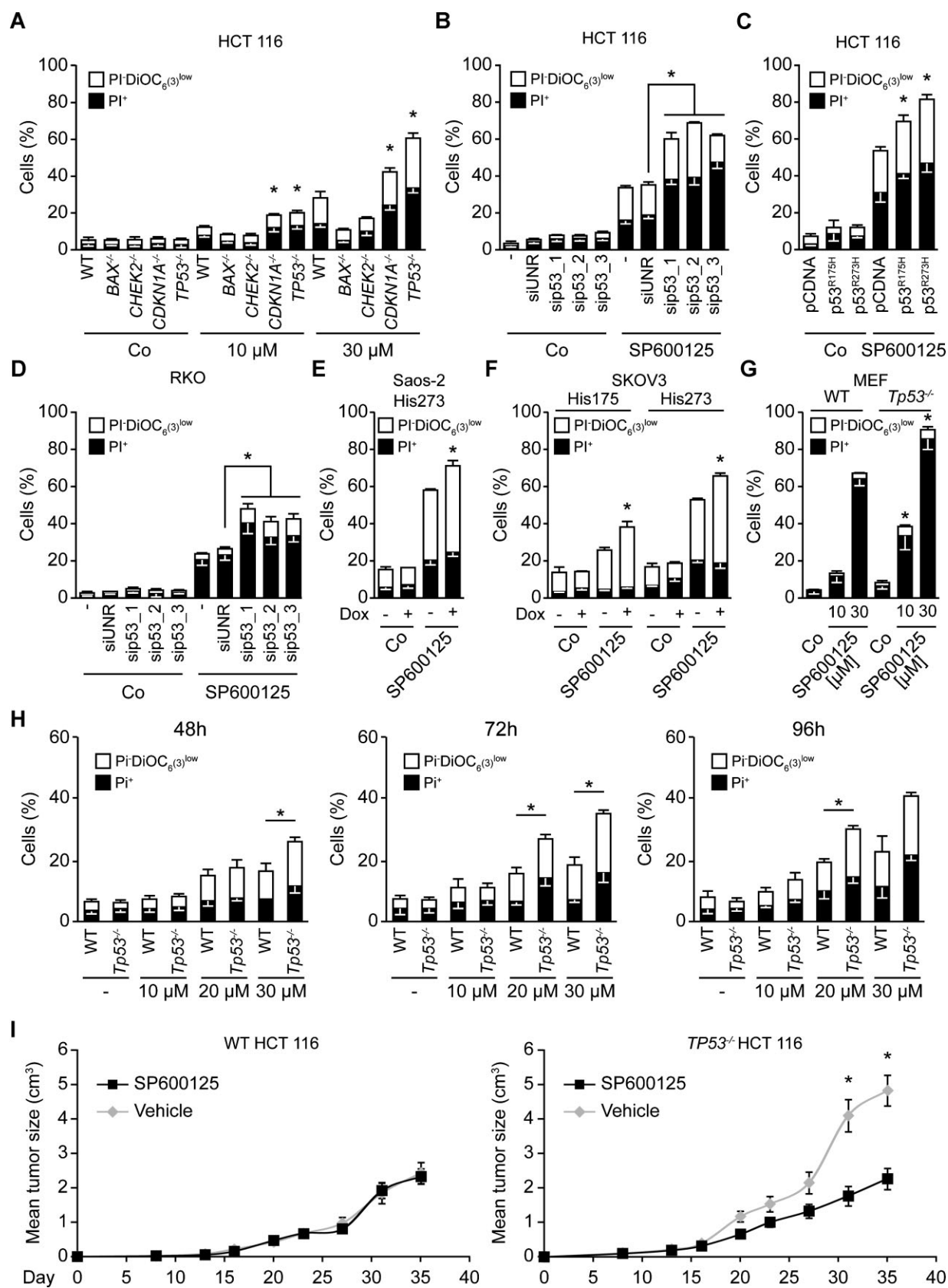


Figure 7.

Thus, the killing of *TP53*^{-/-} cells triggered by SP600125 is closely coupled to abortive mitosis, indicating that SP600125 constitutes a novel inducer of mitotic catastrophe (Vitale et al, 2011). Future studies must decipher the mechanisms that link SP600125-induced abortive mitosis to apoptosis, and address the potential clinical utility of this agent.

MATERIALS AND METHODS

Unless otherwise indicated, media and supplements for cell culture were purchased from Gibco-Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) and plasticware from Corning B.V. Life Sciences (Corning, NY, USA).

Chemicals

SP600125 (anthra [1,9-cd] pyrazole-6 (2H)-one) was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) and stocked as a 30 mM solution in DMSO. Reversine (2-(4-oropholinoanilino)-6-cyclohexylaminopurine) was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA) and stocked as a 10 mM solution in DMSO. The pan-caspase inhibitor *N*-benzyloxy-carbonyl-Val-Ala-Asp.fluoromethylketone (z-VAD-fmk) was obtained from Bachem Bioscience (Bubendorf, Switzerland) and stocked as a 50 mM solution in DMF. The appropriate amount of DMSO and/or DMF was always employed for negative control conditions.

Compound screen

A total of 4×10^4 WT HCT 116 cells stably expressing H2B-GFP and *TP53*^{-/-} HCT 116 cells stably expressing H2B-RFP were seeded at a ratio of 1:1 in Black/Clear 96-well Imaging Plates (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Twenty-four hours later, cells were treated with the agents from the ICCB Known Bioactives Library (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA) at final concentrations ranging from 1 to 12 μ M and kept in a Cytomat 2c automated incubator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Every 6 h, plates were instantly transferred to a BD Pathway 855 automated microscope (BD Biosciences) by means of a robotized Twister II plate handler (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA), and four view fields in the centre of each well were acquired using a 20X objective (Olympus, Center Valley, PA, USA), for a total assay time of 48 h. Images were analysed for cell density and fluorescence intensity with the BD

Attovision software (BD Biosciences) and the slope of growth curves of each subpopulation over 48 h was calculated by using the linear regression function of Microsoft Excel (Microsoft Co., Redmond, WA, USA).

RNA interference

Custom-designed siRNAs targeting MPS1 (siMPS1_1 sense 5'-CCCA-GAGGACUGGUUGAGUdTdT-3'; siMPS1_2 sense 5'-GCAACCACUUAUG-GUACUGdTdT-3'; siMPS1_3 sense 5'-GCACGUGACUACUUCAAAdTdT-3') (Stucke et al, 2004; Xu et al, 2009), p53 (sip53_1 sense 5'-GACUCCAGUGGUAUACdTdT-3'; sip53_2 sense 5'-GCAUGAACCG-GAGGCCAUdTdT-3'; sip53_3 sense 5'-CUACUUCUGAAACAACGdTdT-3') (Gu et al, 2004; Martinez et al, 2002), AURKB (5'-GGAGGAGAU-CUACUUGAUTT-3'), CHEK1 (sense 5'-UCGUGAGCGUUUGUUAAGCTT-3'), CHEK2 (sense 5'-UGUGUGAAUGACAACUACUTT-3'), Bcl-2 (Vicencio et al, 2009), Bcl-X_L (de La Motte Rouge et al, 2007), MCL1 (Kepp et al, 2009) and PUMA (Vitale et al, 2007), were purchased from Sigma-Proligo (The Woodlands, TX, USA).

Alternatively, siRNA duplexes for the downregulation of FLT3 and MPS1 (siGENOME Smart-pool M-003137 and M-004105, respectively), were purchased from Dharmacon (Chicago, IL, USA), siRNAs targeting JNK1 (sc-29380) from Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), siRNAs for the down-regulation of AURKA, JNK2 and MEK1 (SIHK0142, SIHK1224 and SIHK1098, respectively), from Sigma-Aldrich and siRNAs for the down-regulation of BAK1 and BAX (Hs_BAK1_5 and Hs_BAX_10 HP Validated siRNAs, respectively) from Qiagen (Hilden, Germany) (de La Motte Rouge et al, 2007). As a control, a non-targeting siRNA with a sequence unrelated to the human genome was used (UNR, sense 5'-GCCGGUAGCCGGUUAAGUdTdT-3').

Cells pre-seeded in 12-well plates were transfected with plasmids at 80% confluence by means of the Attractene Transfection reagent (Qiagen) as recommended by the manufacturer, or with siRNAs at 30–40% confluence by means of the HiPerFect[®] transfection reagent (Qiagen), as previously described (Hoffmann et al, 2008). After 48 or 72 h, transfection efficiency was determined by immunoblotting.

Immunofluorescence and videomicroscopy

Immunofluorescence microscopy determinations were performed as previously described (Vitale et al, 2007, 2008). For videomicroscopy,

Figure 7. Effects of the deletion depletion or inhibition of p53 on SP600125 cytotoxicity in several cell lines.

A–H. Lethal effects of SP600125 on p53-deficient cancer cells *in vitro*.

A–C. Human colon carcinoma HCT 116 cells with different knockout genotypes (**A**), subjected to the transient depletion of p53 (for 24 h) with three distinct siRNAs (**B**) or transiently transfected (for 24 h) with dominant-negative p53 mutants (His175 and His273) (**C**) were left untreated or treated with SP600125 for 72 h as illustrated (30 μ M where not specified).

D–F. Alternatively human colon carcinoma RKO cells subjected to the siRNA-mediated knockdown of p53 (**D**), human osteosarcoma Saos-2 cells (**E**) or human ovarian carcinoma SKOV-3 cells (**F**) expressing doxycycline (Dox)-inducible p53 mutants cultured for 1 week in the absence or presence of Dox were kept in control conditions or treated with 30 μ M SP600125 for 72 h.

G, H. Similarly, MEFs (**G**) or early passage mouse adult fibroblasts (AFs) obtained from the ears mice of the indicated genotype (**H**) were compared for their susceptibility to SP600125-induced killing. In all cases (**A–H**), DiOC₆(3)/PI co-staining and cytofluorometric analysis were performed to assess cell death-related variables. White and black columns illustrate the percentage of dying (PI⁻ DiOC₆(3)^{low}) and dead (PI⁺) cells, respectively (means \pm SEM, $n = 3$). siUNR, control siRNA. * $p < 0.05$ (Student's *t*-test), as compared to WT cells (**A** and **G**) cells transfected with the empty vector pCDNA (**C**), cells not exposed to Dox (**E** and **F**), treated with the same concentration of SP600125.

I. *In vivo* growth arrest of p53-deficient tumours by SP600125. WT or *TP53*^{-/-} HCT 116 cells were injected subcutaneously into athymic mice (30 mice for SP600125-treated groups, 15 mice for vehicle-treated controls), and 1 week later intraperitoneal injections of SP600125 were performed, as described in Materials and Methods Section. Tumour size was then routinely monitored by means of a common calliper. Results are reported as means \pm SEM. * $p < 0.05$ (two-tailed Student's *t*-test), as compared to vehicle-treated mice.

The paper explained

PROBLEM:

p53 is the tumour suppression protein whose function is most frequently lost in human cancer. Thus, more than 20 million people worldwide live with cancers in which p53 is mutated or the p53 pathway is interrupted due to the inactivation of molecules that act either upstream or downstream of p53. The loss of p53 reduces the efficacy of several conventional anticancer agents, meaning that p53-deficient tumours are intrinsically chemoresistant. This work has been designed to identify small molecules that preferentially kill cancer cells lacking p53 expression or expressing a mutated p53 variant.

RESULTS:

A screen in which p53-sufficient and p53-deficient tumour cells were systematically compared for their response to known or experimental anticancer agents led to the identification of one molecule, SP600125, that killed p53-deficient cells more efficiently than their p53-expressing counterparts. This property of SP600125 was validated on multiple cell lines that differed relative to the function of the p53 system. In particular, we found that human p53-deficient cancer cells growing on immunode-

ficient mice responded to chemotherapy with SP600125 in conditions in which similar cancer cells that express intact p53 failed to do so. We characterized the mechanisms through which SP600125 can kill p53-deficient (but not p53-sufficient) cancer cells. We found that p53-sufficient cells underwent a cell cycle arrest upon exposure to SP600125 and ultimately survived. In contrast, p53-deficient cells exposed to SP600125 undertook a series of abortive mitoses (featuring karyokinesis but no cytokinesis), eventually generating giant cells that finally underwent apoptotic cell death.

IMPACT:

Altogether, these results delineate a novel strategy to selectively target cells that lack functional p53. SP600125 exemplifies a class of drugs that kill p53-deficient cells in a preferential fashion, based on the incapacity of such cells to undergo a cell cycle arrest in particular circumstances. Hence, SP600125 (and its analogues/derivatives) might be used for cancer chemoprevention (for eliminating pre-malignant cells that have inactivated p53) or chemotherapy of p53-deficient cancers.

HCT 116 cells stably expressing a H2B-GFP fusion were grown in 96-well imaging plates (BD Biosciences) under standard culture conditions and subjected to pulsed observations (every 7 min for up to 48 h) with a BD pathway 855 automated live cell microscope (BD Biosciences). Images were analysed with the open source software Image J. Cell fate profile are illustrated as previously published (Rello-Varona et al, 2010).

In vivo xenograft models

Athymic *nu/nu* female mice (age ~42 days, body weight ~20g, provided by the Institut Gustave Roussy, Villejuif, France in-house animal facility) were used throughout this study in strict compliance with widely accepted ethical guidelines for animal experimentation. Mice were kept in Makrolons type III wire mesh laboratory cages (Charles River, Boston, MA, USA), under poor germ conditions at 24°C and 50–60% humidity, and were allowed for food and water *ad libitum*. Light cycle was artificially controlled to provide 14 h of light (from 06:30 a.m. to 08:30 p.m.). After 4 days of acclimation period, mice were subcutaneously xenografted with 2×10^6 WT or *TP53*^{-/-} HCT 116 cells (Vitale et al, 2007). After 1 week, mice were injected i.p. with 5 mg/kg SP600125 (or an equivalent volume of vehicle) every 2–3 days. Due to its limited solubility in water, SP600125 was injected in 2% DMSO, 2% polyethylene glycol 600 (PEG600) and 2% Tween 80 in PBS. Statistical analyses were carried out by means of the SigmaStat package (Systat Software, San Jose, CA, USA). Statistical significance was determined by means of two-tailed unpaired Student's *t*-test ($*p < 0.05$) in the context of a pairwise comparison procedure.

Statistical procedures

Unless otherwise specified, all experiments were carried out in triplicate parallel instances and independently repeated at least three times. Data were analysed with Microsoft Excel (Microsoft) and statistical significance was assessed by means of two-tailed unpaired Student's *t*-test ($*p < 0.05$; $**p < 0.001$).

The complete set of experimental and statistical procedures can be found online as Supporting Information.

Author contributions

MJ, OK, FB, LS, GM, SAM, SRV, DL, AA, MT, FS, FH, GP and MC designed and performed experiments and analysed data; IV designed and performed experiments, analysed data and wrote the paper; LG designed experiments and wrote the paper; GK designed experiments, wrote the paper and directed biological studies.

Acknowledgements

We are indebted to Bert Vogelstein for WT and *TP53*^{-/-} HCT 116 cells, Tyler Jacks for MEF cells and Duane A. Compton for HCT 116 cells with a single GFP-labelled chromosome. We thank Klas Wiman for the generous gift of cell lines expressing inducible p53 mutants. We acknowledge the kind gift of cDNAs encoding MPS1 by Rene Medema and of p53 dominant negatives mutants by Dr. Thierry Soussi. We thank Caterina Tanzarella for the help in the design of interphase FISH experiment and for the critical reading of the manuscript. IV is

supported by the Ligue Nationale contre le Cancer, SRV by the Fondation de France and LG from Apo-Sys and SAM by the Higher Education Commission (HEC) of Pakistan. This work was supported by grants to GK from the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée), Agence Nationale pour la Recherche (ANR), European Commission (Active p53, Apo-Sys, ChemoRes, ApopTrain), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Institut National du Cancer (INCa), Cancéro-pôle Ile-de-France, Fondation Bettencourt-Schueller and the LabEx Onco-Immunology.

Supporting Information is available at EMBO Molecular Medicine online.

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Athar M, Elmets CA, Kopelovich L (2011) Pharmacological activation of p53 in cancer cells. *Curr Pharm Des* 17: 631-639
- Aylon Y, Michael D, Shmueli A, Yabuta N, Nojima H, Oren M (2006) A positive feedback loop between the p53 and Lats2 tumor suppressors prevents tetraploidization. *Genes Dev* 20: 2687-2700
- Beckerman R, Prives C (2010) Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a000935
- Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, *et al* (2001) SP600125, an anthracycline inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13681-13686
- Brown CJ, Lain S, Verma CS, Fersht AR, Lane DP (2009) Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat Rev Cancer* 9: 862-873
- Castedo M, Ferri K, Roumier T, Metivier D, Zamzami N, Kroemer G (2002) Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. *J Immunol Methods* 265: 39-47
- Castedo M, Coquelle A, Vivet S, Vitale I, Kauffmann A, Dessen P, Pequignot MO, Casares N, Valent A, Mouhamad S, *et al* (2006) Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells. *EMBO J* 25: 2584-2595
- Cheok CF, Verma CS, Baselga J, Lane DP (2011) Translating p53 into the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* 8: 25-37
- Chu ML, Chavas LM, Douglas KT, Eyers PA, Tabernero L (2008) Crystal structure of the catalytic domain of the mitotic checkpoint kinase Mps1 in complex with SP600125. *J Biol Chem* 283: 21495-21500
- Colombo R, Caldarelli M, Mennecozzi M, Giorgini ML, Sola F, Cappella P, Perrera C, Depaolini SR, Rusconi L, Cucchi U, *et al* (2010) Targeting the mitotic checkpoint for cancer therapy with NMS-P715, an inhibitor of MPS1 kinase. *Cancer Res* 70: 10255-10264
- Davoli T, de Lange T (2011) The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annual Rev Cell Dev Biol* 27: 585-610
- de La Motte Rouge T, Galluzzi L, Olausson KA, Zermati Y, Tasdemir E, Robert T, Ripoche H, Lazar V, Dessen P, Harper F, *et al* (2007) A novel epidermal growth factor receptor inhibitor promotes apoptosis in non-small cell lung cancer cells resistant to erlotinib. *Cancer Res* 67: 6253-6262
- Degenhardt Y, Greshock J, Laquerre S, Gilmartin AG, Jing J, Richter M, Zhang X, Bleam M, Halsey W, Hughes A, *et al* (2010) Sensitivity of cancer cells to Plk1 inhibitor GSK461364A is associated with loss of p53 function and chromosome instability. *Mol Cancer Ther* 9: 2079-2089
- Finkin S, Aylon Y, Anzi S, Oren M, Shaulian E (2008) Fbw7 regulates the activity of endoreduplication mediators and the p53 pathway to prevent drug-induced polyploidy. *Oncogene* 27: 4411-4421
- Galluzzi L, Zamzami N, de La Motte Rouge T, Lemaire C, Brenner C, Kroemer G (2007) Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis. *Apoptosis* 12: 803-813
- Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bazan NG, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, *et al* (2009) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ* 16: 1093-1107
- Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Vitale I, Pinti M, Kroemer G (2011a) Mitochondrial liaisons of p53. *Antioxid Redox Signal* 15: 1691-1714
- Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G (2011b) Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. DOI: 10.1038/onc.2011.384
- Ganem NJ, Storchova Z, Pellman D (2007) Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Current Opin Genet Dev* 17: 157-162
- Gizatullin F, Yao Y, Kung V, Harding MW, Loda M, Shapiro GI (2006) The Aurora kinase inhibitor VX-680 induces endoreduplication and apoptosis preferentially in cells with compromised p53-dependent postmitotic checkpoint function. *Cancer Res* 66: 7668-7677
- Green DR, Kroemer G (2009) Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458: 1127-1130
- Gu J, Zhang L, Swisher SG, Liu J, Roth JA, Fang B (2004) Induction of p53-regulated genes in lung cancer cells: implications of the mechanism for adenoviral p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 23: 1300-1307
- Ha GH, Baek KH, Kim HS, Jeong SJ, Kim CM, McKeon F, Lee CW (2007) p53 activation in response to mitotic spindle damage requires signaling via BubR1-mediated phosphorylation. *Cancer Res* 67: 7155-7164
- Heo YS, Kim SK, Seo CI, Kim YK, Sung BJ, Lee HS, Lee JI, Park SY, Kim JH, Hwang KY, *et al* (2004) Structural basis for the selective inhibition of JNK1 by the scaffolding protein JIP1 and SP600125. *EMBO J* 23: 2185-2195
- Hewitt L, Tighe A, Santaguida S, White AM, Jones CD, Musacchio A, Green S, Taylor SS (2010) Sustained Mps1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1-C-Mad2 core complex. *J Cell Biol* 190: 25-34
- Hoffmann J, Vitale I, Buchmann B, Galluzzi L, Schwede W, Senovilla L, Skuballa W, Vivet S, Lichtner RB, Vicencio JM, *et al* (2008) Improved cellular pharmacokinetics and pharmacodynamics underlie the wide anticancer activity of sagopilone. *Cancer Res* 68: 5301-5308
- Kepp O, Gottschalk K, Churin Y, Rajalingam K, Brinkmann V, Machuy N, Kroemer G, Rudel T (2009) Bim and Bmf synergize to induce apoptosis in *Neisseria gonorrhoeae* infection. *PLoS Pathog* 5: e1000348
- Kim JA, Lee J, Margolis RL, Fotedar R (2010) SP600125 suppresses Cdk1 and induces endoreplication directly from G2 phase, independent of JNK inhibition. *Oncogene* 29: 1702-1716
- Knight ZA, Lin H, Shokat KM (2010) Targeting the cancer kinome through polypharmacology. *Nat Rev Cancer* 10: 130-137
- Kuntzen C, Sonuc N, De Toni EN, Opelz C, Mucha SR, Gerbes AL, Eichhorst ST (2005) Inhibition of c-Jun-N-terminal-kinase sensitizes tumor cells to CD95-induced apoptosis and induces G2/M cell cycle arrest. *Cancer Res* 65: 6780-6788
- Kwiatkowski N, Jelluma N, Filippakopoulos P, Soundararajan M, Manak MS, Kwon M, Choi HG, Sim T, Deveraux QL, Rottmann S, *et al* (2010) Small-molecule kinase inhibitors provide insight into Mps1 cell cycle function. *Nat Chem Biol* 6: 359-368
- Levesque AA, Kohn EA, Bresnick E, Eastman A (2005) Distinct roles for p53 transactivation and repression in preventing UCN-01-mediated abrogation of DNA damage-induced arrest at S and G2 cell cycle checkpoints. *Oncogene* 24: 3786-3796
- MacCorkle RA, Tan TH (2004) Inhibition of JNK2 disrupts anaphase and produces aneuploidy in mammalian cells. *J Biol Chem* 279: 40112-40121
- Martinez LA, Naguibneva I, Lehrmann H, Vervisch A, Tchenio T, Lozano G, Harel-Bellan A (2002) Synthetic small inhibiting RNAs: efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14849-14854
- Mingo-Sion AM, Marietta PM, Koller E, Wolf DM, Van Den Berg CL (2004) Inhibition of JNK reduces G2/M transit independent of p53, leading to

- endoreduplication, decreased proliferation, and apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* 23: 596-604
- Miyamoto-Yamasaki Y, Yamasaki M, Tachibana H, Yamada K (2007) Induction of endoreduplication by a JNK inhibitor SP600125 in human lung carcinoma A 549 cells. *Cell Biol Int* 31: 1501-1506
- Olausson KA, Commo F, Tailler M, Lacroix L, Vitale I, Raza SQ, Richon C, Dessen P, Lazar V, Soria JC, *et al* (2009) Synergistic proapoptotic effects of the two tyrosine kinase inhibitors pazopanib and lapatinib on multiple carcinoma cell lines. *Oncogene* 28: 4249-4260
- Potapova O, Gorospe M, Dougherty RH, Dean NM, Gaarde WA, Holbrook NJ (2000) Inhibition of c-Jun N-terminal kinase 2 expression suppresses growth and induces apoptosis of human tumor cells in a p53-dependent manner. *Mol Cell Biol* 20: 1713-1722
- Rello-Varona S, Kepp O, Vitale I, Michaud M, Senovilla L, Jemaà M, Joza N, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G (2010) An automated fluorescence videomicroscopy assay for the detection of mitotic catastrophe. *Cell Death Dis* 1: e25
- Santaguida S, Tighe A, D'Alise AM, Taylor SS, Musacchio A (2010) Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine. *J Cell Biol* 190: 73-87
- Schmidt M, Budirahardja Y, Klompaker R, Medema RH (2005) Ablation of the spindle assembly checkpoint by a compound targeting Mps1. *EMBO Rep* 6: 866-872
- Selivanova G (2010) Therapeutic targeting of p53 by small molecules. *Semin Cancer Biol* 20: 46-56
- Shangary S, Wang S (2009) Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49: 223-241
- Shen H, Moran DM, Maki CG (2008) Transient nutlin-3a treatment promotes endoreduplication and the generation of therapy-resistant tetraploid cells. *Cancer Res* 68: 8260-8268
- Sliedrecht T, Zhang C, Shokat KM, Kops GJ (2010) Chemical genetic inhibition of Mps1 in stable human cell lines reveals novel aspects of Mps1 function in mitosis. *PLoS ONE* 5: e10251
- Stucke VM, Baumann C, Nigg EA (2004) Kinetochore localization and microtubule interaction of the human spindle checkpoint kinase Mps1. *Chromosoma* 113: 1-115
- Sur S, Pagliarini R, Bunz F, Rago C, Diaz LA, Jr., Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N (2009) A panel of isogenic human cancer cells suggests a therapeutic approach for cancers with inactivated p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 3964-3969
- Talos F, Moll UM (2010) Role of the p53 family in stabilizing the genome and preventing polyploidization. *Adv Exp Med Biol* 676: 73-91
- Thompson SL, Compton DA (2010) Proliferation of aneuploid human cells is limited by a p53-dependent mechanism. *J Cell Biol* 188: 369-381
- Tritarelli A, Oricchio E, Ciciarello M, Mangiacasale R, Palena A, Lavia P, Soddu S, Cundari E (2004) p53 localization at centrosomes during mitosis and postmitotic checkpoint are ATM-dependent and require serine 15 phosphorylation. *Mol Biol Cell* 15: 3751-3757
- Vicencio JM, Ortiz C, Criollo A, Jones AW, Kepp O, Galluzzi L, Joza N, Vitale I, Morselli E, Tailler M, *et al* (2009) The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1. *Cell Death Differ* 16: 1006-1017
- Vitale I, Galluzzi L, Vivet S, Nanty L, Dessen P, Senovilla L, Olausson KA, Lazar V, Prudhomme M, Golsteyn RM, *et al* (2007) Inhibition of Chk1 kills tetraploid tumor cells through a p53-dependent pathway. *PLoS ONE* 2: e1337
- Vitale I, Senovilla L, Galluzzi L, Criollo A, Vivet S, Castedo M, Kroemer G (2008) Chk1 inhibition activates p53 through p38 MAPK in tetraploid cancer cells. *Cell Cycle* 7: 1956-1961
- Vitale I, Senovilla L, Jemaà M, Michaud M, Galluzzi L, Kepp O, Nanty L, Criollo A, Rello-Varona S, Manic G, *et al* (2010) Multipolar mitosis of tetraploid cells: inhibition by p53 and dependency on Mos. *EMBO J* 29: 1272-1284
- Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G (2011) Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 385-392
- Vousden KH, Prives C (2009) Blinded by the light: The growing complexity of p53. *Cell* 137: 413-431
- Vousden KH, Ryan KM (2009) p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer* 9: 691-700
- Wang M, Atayar C, Rosati S, Bosga-Bouwer A, Kluin P, Visser L (2009) JNK is constitutively active in mantle cell lymphoma: cell cycle deregulation and polyploidy by JNK inhibitor SP600125. *J Pathol* 218: 95-103
- Wiman KG (2010) Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to the cancer patient. *Oncogene* 29: 4245-4252
- Xu Q, Zhu S, Wang W, Zhang X, Old W, Ahn N, Liu X (2009) Regulation of kinetochore recruitment of two essential mitotic spindle checkpoint proteins by Mps1 phosphorylation. *Mol Biol Cell* 20: 10-20

Preferential killing of p53-deficient cancer cells by reversine

Mohamed Jemaà,^{1,3} Lorenzo Galluzzi,^{2,4} Oliver Kepp,^{1,3} Alice Boilève,^{1,3} Delphine Lissa,^{1,3} Laura Senovilla,^{1,3} Francis Harper,^{2,3,5} Gérard Pierrot,^{2,3,5} Francesco Berardinelli,⁶ Antonio Antocchia,⁶ Maria Castedo,^{1,3} Ilio Vitale^{1,3,t,*} and Guido Kroemer^{1,4,7-9,t,*}

¹INSERM; U848; Villejuif, France; ²Institut Gustave Roussy; Villejuif, France; ³Université Paris Sud/Paris XI; Le Kremlin Bicêtre, France; ⁴Université Paris Descartes; Sorbonne Paris Cité; Paris, France; ⁵CNRS; UMR8122; Villejuif, France; ⁶Dipartimento Di Biologia; Università Roma Tre; Rome, Italy; ⁷Metabolomics Platform; Institut Gustave Roussy; Villejuif, France; ⁸Centre de Recherche des Cordeliers; Paris, France; ⁹Pôle de Biologie; Hôpital Européen Georges Pompidou; AP-HP; Paris, France

^tIlio Vitale and Guido Kroemer share senior co-authorship.

Keywords: aneuploidy, H2B-GFP, HCT 116, HDM2, mitochondrial membrane permeabilization, SP600125

Reversine is a small synthetic molecule that inhibits multiple mitotic kinases, including MPS1 as well as Aurora kinase A and B (AURKA and AURKB). Here, we investigated the effects of reversine on p53-deficient vs. p53-proficient cancer cells. We found that low doses (~0.5 μ M) of reversine, which selectively inhibit MPS1 and hence impair the spindle assembly checkpoint, kill human *TP53*^{-/-} colon carcinoma cells less efficiently than their wild-type counterparts. In sharp contrast, high doses (~5 μ M) of reversine induced hyperploidization and apoptosis to a much larger extent in *TP53*^{-/-} than in *TP53*^{+/+} cells. Such a selective cytotoxicity could not be reproduced by the knockdown of MPS1, AURKA and AURKB, neither alone nor in combination, suggesting that it involves multiple (rather than a few) molecular targets of reversine. Videomicroscopy-based cell fate profiling revealed that, in response to high-dose reversine, *TP53*^{-/-} (but not *TP53*^{+/+}) cells undergo several consecutive rounds of abortive mitosis, resulting in the generation of hyperpolyloid cells that are prone to succumb to apoptosis upon the activation of mitotic catastrophe. In line with this notion, the depletion of anti-apoptotic proteins of the BCL-2 family sensitized *TP53*^{-/-} cells to the toxic effects of high-dose reversine. Moreover, the knockdown of BAX or APAF-1, as well as the chemical inhibition of caspases, limited the death of *TP53*^{-/-} cells in response to high-dose reversine. Altogether, these results suggest that p53-deficient cells are particularly sensitive to the simultaneous inhibition of multiple kinases, including MPS1, as it occurs in response to high-dose reversine.

Introduction

Over the past three decades, unprecedented efforts have been dedicated to the elucidation of the nuclear and cytoplasmic signaling pathways whereby p53 mediates tumor suppressive functions.¹ The reasons for such a profound interest in p53, which de facto has not yet begun to decrease, are multiple. First, p53 was one of the first tumor suppressor proteins ever described,²⁻⁵ and it has progressively become clear that p53 inhibits oncogenesis not only due to its central role in the cellular response to stress,^{6,7} but also because it constitutively regulates the cell metabolism in physiological settings.⁸ Second, the genetic or epigenetic inactivation of p53 is by far the most common alteration across all forms of cancer. Recent estimates suggest that at least 10 (and probably more than 20) million people worldwide are currently living with a malignancy in which either *TP53* is affected by loss-of-function mutations or one of the signaling pathways that involve p53 is inactivated.^{9,10} Third, defects in the p53 system (be they genetic or epigenetic) have been associated with an elevated resistance of cancer cells to radio- and chemotherapy,^{9,11} exacerbated genomic instability¹² as well as increased tumor aggressiveness linked to

worsened prognosis in a large spectrum of neoplasms.^{13,14} Finally, both pharmacological and genetic strategies aimed at reconstituting the oncosuppressive functions of p53 have been shown to exert consistent anticancer effects in vivo in a wide array of preclinical models of neoplasia as well as in cancer patients participating in clinical trials (reviewed in ref. 9). Of note, gendicine, a recombinant adenovirus engineered to express wild-type (WT) human p53, represents the first gene therapy product ever approved for clinical use in humans.¹⁵

Although p53 has recently been ascribed with a number of cytoplasmic functions, it was first (and perhaps best) characterized as a transcription factor that regulates DNA repair, cell cycle progression and cell death in response to stress.^{1,7,16} Common *TP53* point mutations affect its DNA binding domain (DBD) and result in the synthesis of transcription-incompetent p53 proteins.^{13,17} As the DBD is also responsible for the interaction of p53 with anti-apoptotic members of the BCL-2 proteins (including BCL-2 and BCL-X_L), some p53 mutations constitute double hits, inhibiting both the nuclear and (pro-apoptotic) cytoplasmic functions of the protein. Thus, a large number of p53 mutants can neither respond to stress by transactivating cell cycle-arresting

*Correspondence to: Ilio Vitale and Guido Kroemer; Email: kroemer@orange.fr and iliovit@gmail.com

Submitted: 05/01/12; Accepted: 05/03/12

<http://dx.doi.org/>

and pro-apoptotic genes, nor can they engage cytoplasmic mechanisms of cell death.^{11,18} Moreover, as p53 regulates transcription as a tetramer,¹⁹ some p53 mutants operate as dominant-negative variants, inhibiting gene transactivation by the WT protein.²⁰ This implies that, at least in some cases, heterozygous *TP53* mutations are sufficient for abolishing the transcriptional activity of p53. Finally, specific p53 mutations have been shown to confer new oncogenic functions to the protein, thereby behaving as loss-of-function and gain-of-function mutations at the same time.¹¹

During the last decade, multiple approaches have been developed for reconstituting the functionality of the p53 system in tumors bearing *TP53* mutations or other p53-inactivating alterations.^{9,21} For instance, pharmacological compounds have been designed that can bind specific p53 mutants to restore a conformation (and functionality) similar to that of the WT protein.^{22,23} Alternatively, as in many tumors p53 is inactive secondary to the overexpression of the ubiquitin ligase HDM2 (which normally controls p53 levels by targeting it to proteasomal degradation), compounds that specifically target the p53-HDM2 interaction have been developed.^{24,25} These agents, including the so-called nutlins, function by stabilizing p53 and can induce cancer cell death in a relatively selective fashion, a property that justifies their extensive characterization in ongoing clinical trials (<http://clinicaltrials.gov>).⁹ Finally, therapeutic approaches have been ideated for taking advantage of the fact that p53-deficient cancer cells exhibit defects in (physiological and stress-induced) cell cycle regulation.⁹ In particular, the absence of p53 renders most cancer cells incapable of undergoing cell cycle arrest (both at the G₁ and G₂/M checkpoints) in response to DNA damaging agents, implying that p53-deficient tumor cells are prone to enter the S and M phases in the presence of damaged DNA.^{19,26} On one hand, this is intrinsically linked to the propensity of p53-incompetent cancer cells to become hyperploid and genomically unstable.^{12,27,28} On the other hand, a transient exposure to DNA damaging agents such as anthracyclines appears to kill *TP53*^{-/-} cells more efficiently than their WT counterparts,^{29,30} most likely due to the fact that absent cell cycle arrest coupled to DNA damage culminates in the activation of mitotic catastrophe, i.e., an oncosuppressive mechanism that specifically eliminates mitosis-incompetent cells.³¹ The checkpoint kinase 1 (Chk1) inhibitor 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) also abrogates DNA damage-induced cell cycle arrest and triggers mitotic catastrophe preferentially in p53-deficient cancer cells.³² Along similar lines, the Polo-like kinase 1 (PLK1) inhibitor GSK461364A has recently been shown to induce mitotic slippage, polyploidy and cell death selectively in p53-incompetent cancer cells, an effect that was linked to a weakened tetraploidy checkpoint.³³ Taken together, these observations suggest that p53-deficient tumor cells might be more sensitive than their WT counterparts to mitotic perturbations, alone or in the context of DNA damage.

Recently, we reported that SP600125, a broad spectrum serine/threonine kinase inhibitor, can selectively kill *TP53*^{-/-} cells by triggering a hyperploidy program that results in the activation of mitotic catastrophe.^{31,34} By means of a SP600125-resistant variant of the mitotic kinase MPS1, we were able to demonstrate that at least part of this preferential cytotoxicity involves MPS1

inhibition.³⁴ Driven by these observations, we decided to investigate whether another commercially available MPS1 inhibitor, reversine,³⁵ would also be able to selectively kill *TP53*^{-/-} cells over their *TP53*^{+/+} counterparts. We found that the specific inhibition of MPS1 with siRNAs or low-dose reversine preferentially kills *TP53*^{+/+} rather than *TP53*^{-/-} cells. On the contrary, high doses of reversine, which inhibit MPS1 as well as several other kinases, did induce the selective death of *TP53*^{-/-} cells through mitotic catastrophe.

Results and Discussion

Preferential sensitivity of *TP53*^{-/-} cells to high-dose reversine.

To evaluate the cytotoxic profile of reversine (in doses ranging from 0.1 to 10 μ M) in p53-proficient vs. p53-deficient tumor cells, we took advantage of a couple of isogenic human colon carcinoma HCT 116 cell lines differing from each other by the status of the *TP53* locus.³⁶ Thus, when employed at a concentration of 5 μ M, which we refer to as “high-dose,” reversine killed *TP53*^{-/-} human colon carcinoma HCT 116 cells more efficiently than their WT *TP53*^{+/+} counterparts, resembling the broad spectrum serine/threonine kinase inhibitor SP6000125.³⁴ Such a preferential cytotoxicity of reversine was observed using multiple techniques for the detection of cell death-associated parameters, including the cytofluorometric assessment of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) and plasma membrane integrity (Fig. 1A and B; Fig. S1) as well as measurements of the impedance of adherent cells growing on microelectrode-coated plates, which is an indirect indicator of cellular density, morphology and viability (Fig. 1C). Consistent with these results, high-dose reversine reduced the clonogenic potential of *TP53*^{-/-} HCT 116 cells more remarkably than that of WT cells, as determined in clonogenic assays (Fig. 1D). In stark contrast to these observations, 0.5 μ M reversine, which we refer to as “low-dose,” preferentially killed WT over *TP53*^{-/-} HCT 116 cells (Fig. 1A and B), thus resembling a widely employed DNA damaging agent, cisplatin. Of note, the sensitivity of WT HCT 116 to high-dose reversine was greatly exacerbated, hence becoming similar to that of *TP53*^{-/-} cells (see Fig. S1B), upon transfection with three distinct small interfering RNAs (siRNAs) targeting p53 (Fig. 1E), corroborating our observations in a model of transient p53 deficiency. Previous studies indicate that submicromolar concentrations of reversine strongly and selectively inhibit the mitotic kinase MPS1, while higher doses in the low micromolar range are efficient against a panel of additional kinases, Aurora kinase A and B (AURKA and AURKB).³⁵ Thus, it may be speculated that the preferential killing of p53-insufficient cells by high-dose reversine may involve the simultaneous inhibition of multiple kinases.

The depletion of anti-apoptotic members of the Bcl-2 family, including BCL-2, BCL-X_L and MCL-1, sensitized *TP53*^{-/-} HCT 116 cells to reversine-induced cell death. Conversely, the knockdown of pro-apoptotic proteins, including the Bcl-2 family members BAX and PUMA as well as that of the post-mitochondrial caspase activator APAF1, exerted consistent cytoprotective effects (Fig. 1F). In line with these observations, the

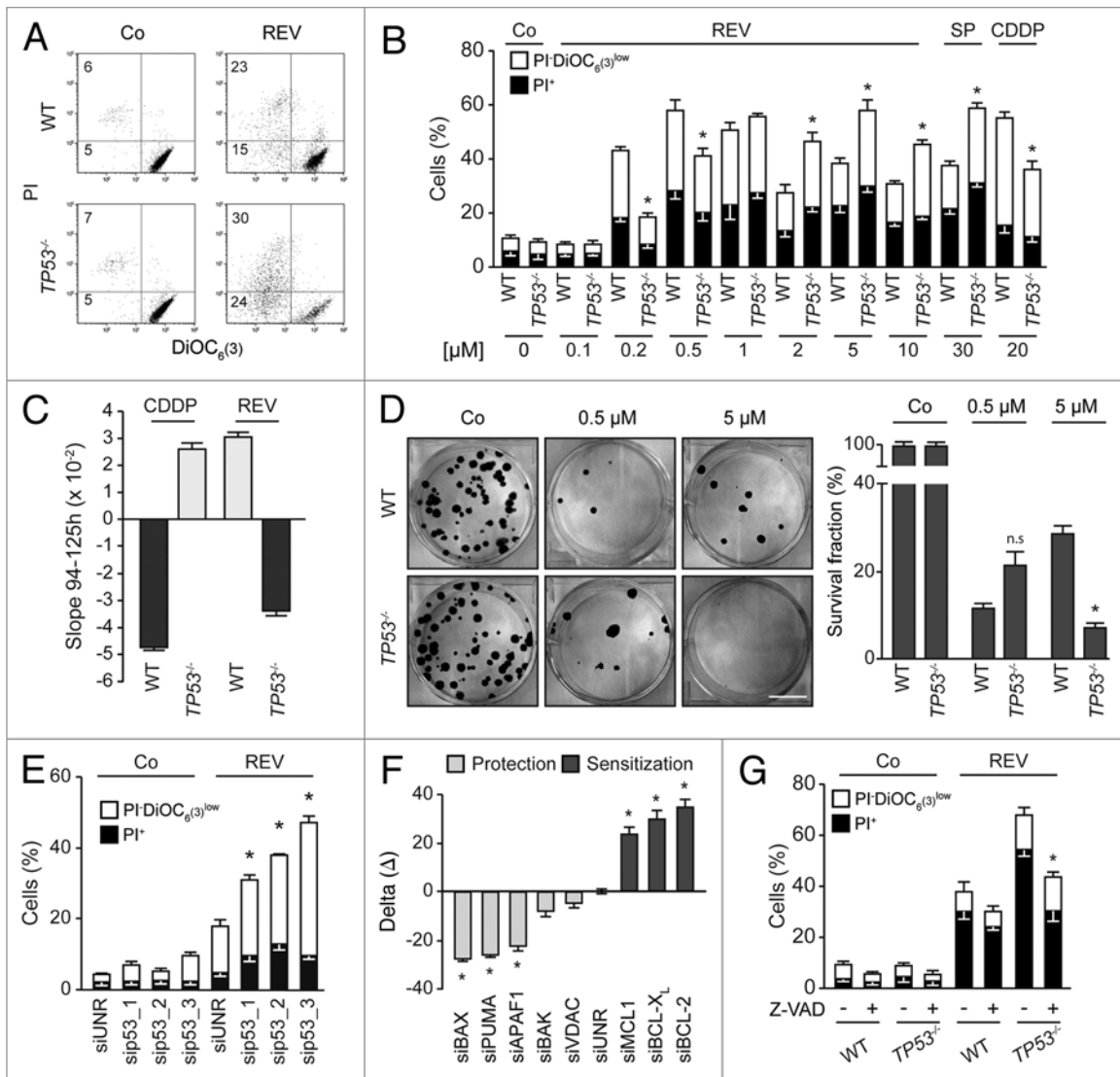


Figure 1. Preferential killing of p53-deficient cells by high-dose reversine. (A and B) Wild-type (WT) and *TP53*^{-/-} human colon carcinoma HCT 116 cells were left untreated (Co.) or incubated with the indicated concentration of reversine (REV)—5 μ M, if not specified, 30 μ M cisplatin (CDDP) or 30 μ M SP600125 (SP) for 72 h, then co-stained with DiOC₆(3) and propidium iodide (PI) for the assessment of apoptosis-associated parameters. (A and B) illustrate representative dot plots (numbers indicate the percentage of cells found in the corresponding quadrant) and quantitative data, respectively. (C) HCT 116 cells of the indicated genotype were seeded on microelectrode-coated plates and then cultured in control conditions or in the presence of 5 μ M REV or 30 μ M CDDP for a total time of 72 h, while constantly monitoring impedance. Columns report the slope of impedance curves (mean \pm SEM; n = 3). *p < 0.05 (Student's t-test), as compared with WT cells treated with the same compound. (D) WT and *TP53*^{-/-} HCT 116 cells were treated with the indicated concentration of REV for 24 h, followed by drug washout and seeding at low cell density for clonogenic determinations. Representative plates as well as quantitative data upon normalization to plating efficiency (mean \pm SEM; n = 3) are shown. *p < 0.05, n.s. = non-significant (Student's t-test), as compared with WT cells treated with the same dose of REV. Scale bar = 3 cm. (E) WT HCT 116 cells were transfected with a control siRNA (siUNR) or with three validated siRNAs targeting p53 (sip53_1–3) for 24 h, followed by culture in control conditions or in the presence of 5 μ M REV for further 48 h and cytofluorometry for the assessment of cell-death related variables as in (A). (F) *TP53*^{-/-} HCT 116 cells were transfected with a control siRNA (siUNR) or with validated siRNAs targeting the indicated proteins for 24 h, followed by culture in the presence of 5 μ M REV for additional 48 h and cytofluorometric determinations of cell-death related parameters. Columns illustrate Δ = the percentage of REV-induced death in cells transfected with the indicated siRNAs—the percentage of REV-induced death in siUNR-transfected cells (mean \pm SEM; n = 3). In this setting, Δ values > 0 indicate chemosensitization, while values < 0 represent cytoprotective effects. *p < 0.05 (Student's t-test), as compared with siUNR-transfected cells exposed to REV. Of note, all these siRNA per se induced negligible levels of cell death (not shown). (G) HCT 116 cells of the indicated genotype were left untreated or treated for 72 h with 5 μ M REV alone or in combination with 25 μ M Z-VAD-fmk (Z-VAD), followed by the cytofluorometric assessment of cell death-associated parameters as in (A). In (B, E and G) white and black columns illustrate the percentage (mean \pm SEM; n = 3) of dying (PI⁻ DiOC₆(3)^{low}) and dead (PI⁺) cells, respectively. *p < 0.05 (Student's t-test), as compared with WT cells treated with the same dose of REV (B), WT cells transfected with the same siRNA and treated with REV (E) or *TP53*^{-/-} cells treated with REV only (G).

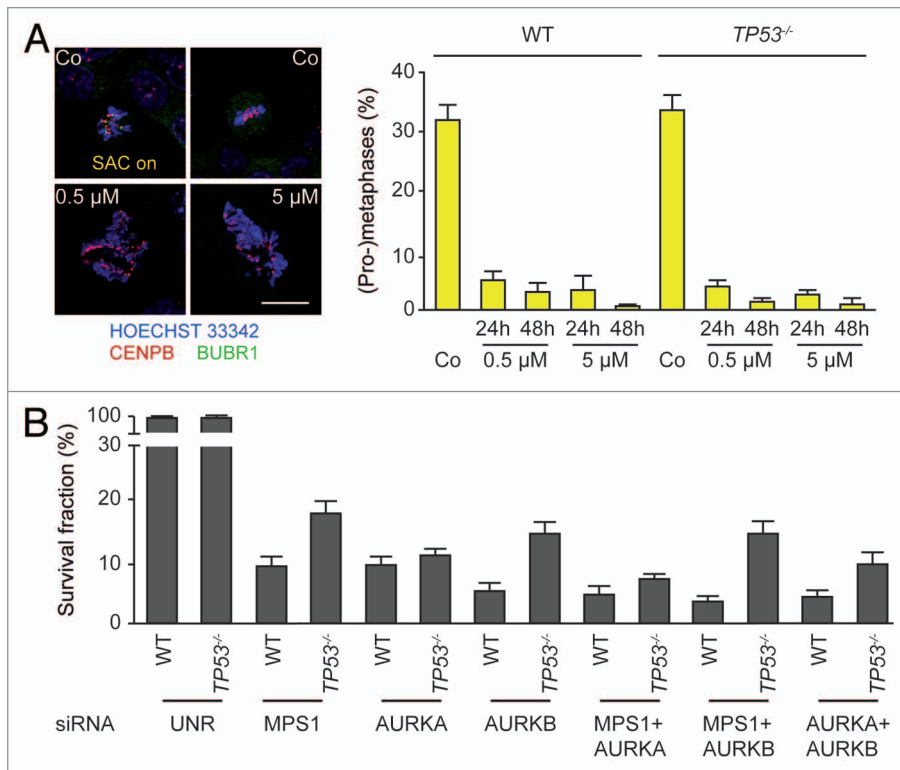


Figure 2. Molecular mechanisms of reversine-induced killing of p53-deficient cells. (A) Wild-type (WT) and *TP53*^{-/-} human colon carcinoma HCT 116 cells were left untreated (Co.) or treated with reversine (REV) as indicated, then processed for the immunofluorescence-assisted detection of spindle assembly checkpoint (SAC) activation (as indicated by the localization of BUBR1 at CENPB⁺ kinetochores). In (A) representative microphotographs of a normal prometaphase (SAC ON), a normal metaphase (SAC OFF), as well as an abnormal prometaphase triggered by REV (SAC OFF) are reported (for *TP53*^{-/-} cells treated for 48 h). Scale bar = 10 μ m. Columns illustrate the percentage of prometaphases and metaphases exhibiting SAC activation (mean \pm SEM; n = 3). (B) HCT 116 cells of the indicated genotype were transfected with a control siRNA (siUNR) or with siRNAs targeting MPS1, AURKA and AURKB, alone or in combination, for 48 h, followed by seeding at low cell density for clonogenic determinations. Quantitative data upon normalization to plating efficiency (mean \pm SEM; n = 3) are shown.

broad-spectrum caspase inhibitor Z-VAD-fmk partially rescued *TP53*^{-/-} HCT 116 cells from reversine-induced cell death (Fig. 1G). Taken together, these findings demonstrate that high-dose reversine ultimately kills *TP53*^{-/-} cells by activating the mitochondrial pathway of apoptosis.

High-dose reversine triggers mitotic catastrophe in *TP53*^{-/-} cells. To get further insights into the mechanisms whereby high-dose reversine selectively kills p53-deficient over p53-proficient cells, we focused our attention on cellular processes in which the main molecular targets of reversine (i.e., MPS1, AURKA and AURKB) exert a prominent role, notably the regulation of the spindle assembly checkpoint (SAC) and progression along the cell cycle.

As assessed by the immunofluorescence-assisted localization of the SAC component BUBR1 at kinetochores, both WT and *TP53*^{-/-} HCT 116 cancer cells exhibit SAC activation in approximately 30% of detectable prometaphases and metaphases (Fig. 2A), a normal and transient process preventing anaphase onset until all chromosomes are properly attached to the spindle

bundle.³⁷ Both low- and high-dose reversine completely abolished SAC activation in HCT 116 cells, irrespective of their *TP53* genotype (Fig. 2A). These observations confirm that both low- and high-dose reversine efficiently inhibited MPS1, which is a bona fide SAC regulator,³⁷ in our experimental model. Nevertheless, the siRNA-mediated knockdown of MPS1, AURKA and AURKB, alone or in combination, failed to mimic the ability of high-dose reversine to selectively kill *TP53*^{-/-} HCT 116 cells (Fig. 2B). Altogether, these results suggest that high-dose reversine acts on multiple targets, rather than on MPS1 alone, to preferentially induce the death of p53-deficient cells.

The administration of reversine provoked dramatic cell cycle perturbations in both WT and *TP53*^{-/-} HCT 116 cells. Cytofluorometric determinations revealed that high-dose (and to lesser extents low-dose) reversine stimulates a progressive hyperploidization that is more pronounced in *TP53*^{-/-} HCT 116 cells than in their WT counterparts (Fig. 3A and B; Fig. S2). While 72 h after the administration of high-dose reversine WT HCT 116 cells had not (yet) trespassed an ~8n stage, a consistent proportion of their p53-deficient derivatives had attained a ~16n stage (Fig. 3A). In line with this notion, upon exposure to high-dose *TP53*^{-/-} (but less so WT) HCT 116 cells exhibited a marked capacity to incorporate the thymidine analog 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU), an indicator of active DNA synthesis (Fig.

3C). Along similar lines, p53-deficient HCT 116 cells responding to high-dose reversine exhibited higher percentages of cyclin B1 positivity, marking cells in the G₂ and M phases of the cell cycle (Fig. 3D), and of histone H3 phosphorylation, a marker of ongoing mitosis (Fig. 3E), than their p53-proficient counterparts. Taken together, these findings suggest that WT cells undergo a cell cycle arrest, most often at a ~4n or ~8n stage, in response to high-dose reversine, whereas p53-deficient cells fail to do so and undergo consecutive rounds of endoreplication. In support of this hypothesis, both light (Fig. 4A) and electron microscopy (Fig. 4B) inspections confirmed that *TP53*^{-/-}, but not WT, HCT 116 cells respond to high-dose reversine with a prominent increase in cell size, which is often paralleled by the appearance of multilobated nuclei and amplified centrosomes.

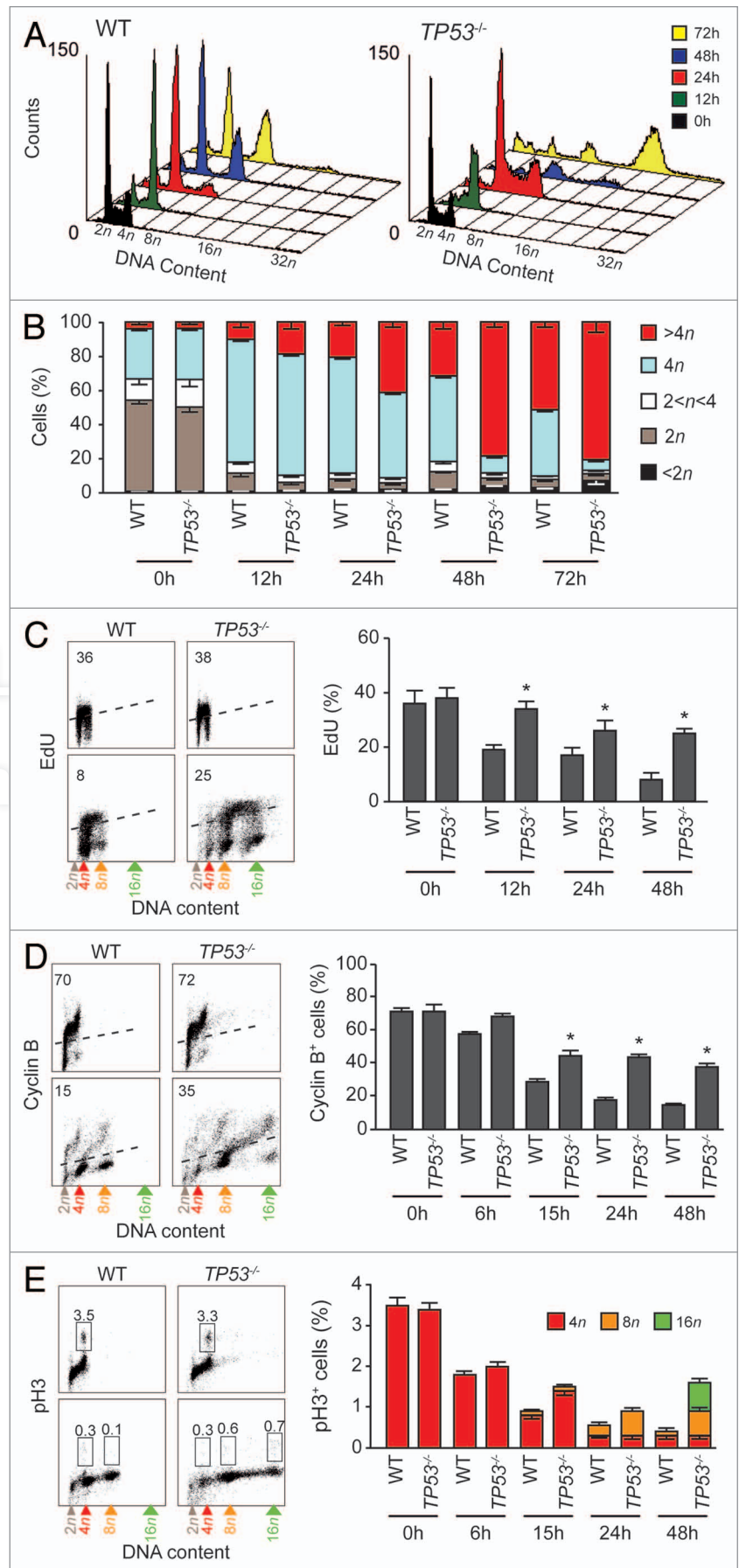
To better understand the mechanisms by which high-dose reversine triggers hyperploidization, we took advantage of WT and *TP53*^{-/-} HCT 116 cells engineered to stably express a GFP-tagged variant of histone 2B (H2B-GFP),^{27,38} allowing us to visualize chromatin and to monitor the cell cycle by live

Figure 3. Selective hyperpolyploidization of p53-deficient cells in response to reversine. (A and B) Wild-type (WT) and *TP53*^{-/-} human colon carcinoma HCT 116 cells were exposed to 5 μ M reversine (REV) for the depicted time, and then stained with propidium iodide for the cytofluorometric assessment of cell cycle progression. (A and B) report representative cell cycle distributions and quantitative data (mean \pm SEM; n = 9), respectively. (C–E) WT and *TP53*^{-/-} HCT 116 cells were cultured in the presence of 5 μ M REV for the indicated time and co-labeled with PI (to exclude dead cells from the analysis) and the thymidine analog EdU, which selectively stains cells in the S phase of the cell cycle (C), an antibody recognizing cyclin B, which accumulates starting from the early G₂ phase through the end of mitosis (D) or an antibody specific for phosphorylated histone 3 (pH3), which is a mitosis-specific marker (E). Representative scatter plots (REV, low plots) and quantitative results (mean \pm SEM; n = 3) are shown. Numbers indicate the percentage of cells found in each quadrant. *p < 0.05 (Student's t-test), as compared with WT cells treated with REV for the same time.

videomicroscopy (Fig. 4C; Movies S1–4). In response to high-dose reversine, most WT HCT 116 cells underwent one or two abortive rounds of mitosis, featuring transient chromatin condensation, improper organization of metaphase plates, karyokinesis failure and the formation of viable cells with oversized nuclei (Fig. 4C and D; Movie S2). In contrast, most *TP53*^{-/-} HCT 116 cells manifested three and sometimes four consecutive aborted mitoses and finally died following the activation of mitotic catastrophe (Fig. 4C and D; Movies S3 and 4).^{31,39} In this latter scenario, cell death most often occurred after three abortive mitoses, as determined by cell fate profiling (Fig. 4D). Taken together, these findings corroborate the notion that p53-deficient cells are particularly prone to die in response to mitotic perturbations following the activation of mitotic catastrophe.

Concluding Remarks

Reversine has previously been shown to promote the de-differentiation of lineage-committed cells⁴⁰ and to trigger growth arrest, hyperploidy and apoptosis in cell lines derived from multiple human neoplasms, including acute myeloid leukemia, thyroid, head and neck, colon, prostate and cervical cancers.^{35,41–45} These findings indicate that reversine exerts relatively broad anticancer effects. Here, we show that low-dose reversine, 0.5 μ M, a concentration at which reversine selectively inhibits MPS1, fails to preferentially kill *TP53*^{-/-} HCT 116 colon carcinoma cells. Conversely, high-dose reversine, 5 μ M, a



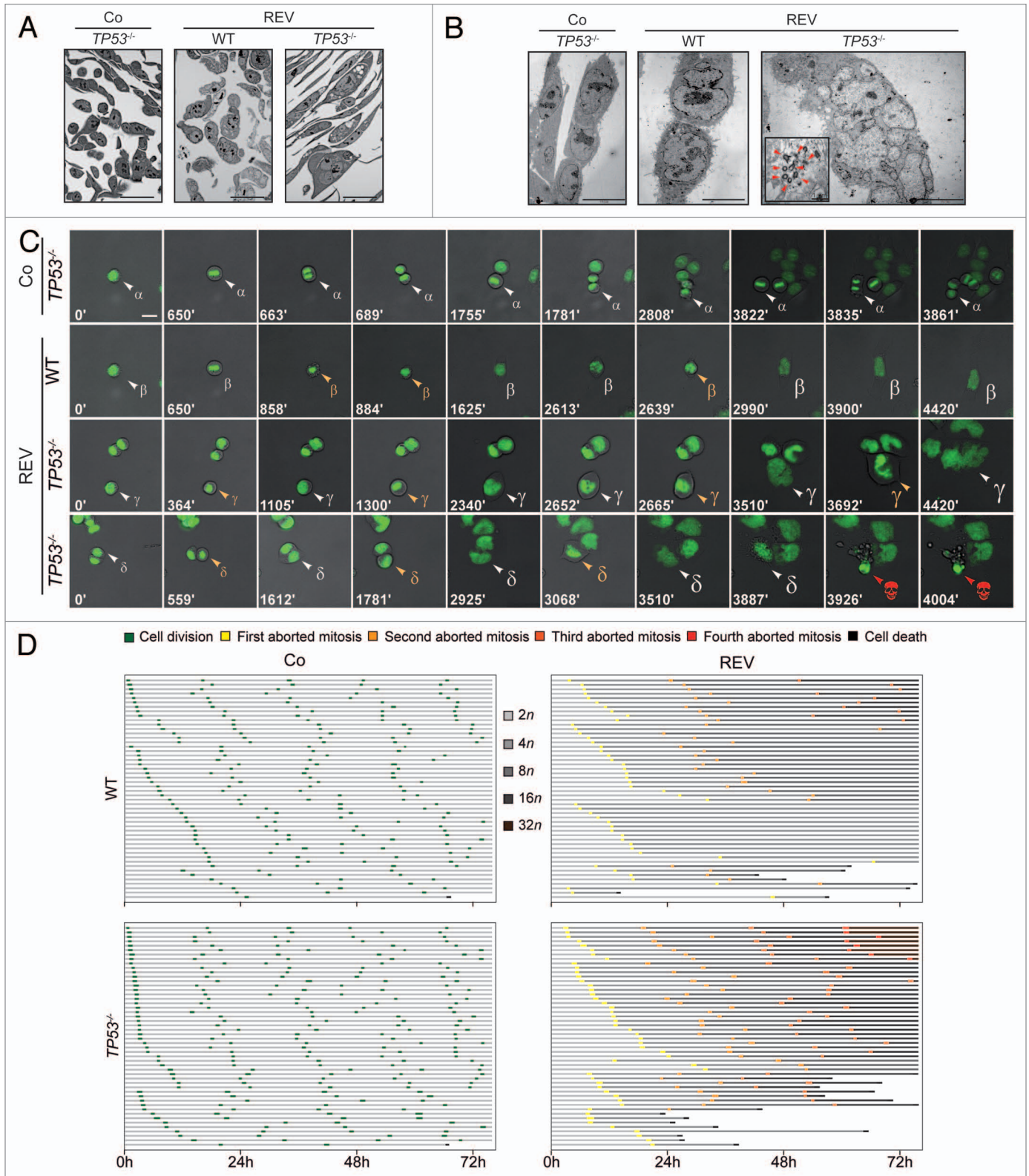


Figure 4. For figure legend, see page 7.

concentration at which reversine inhibits MPS1 as well as several other kinases, including AURKA and AURKB, does kill p53-deficient cells more efficiently than their WT counterparts.

Such preferential effects of high-dose reversine on *TP53*^{-/-} cells involve their inability to properly undergo cell cycle arrest, even at a hyperloid stage, which presumably derives from intrinsic

Figure 4. Mitotic catastrophe activation in response to high-dose reversine. (A and B) Wild-type (WT) and *TP53*^{-/-} human colon carcinoma HCT 116 cells were left untreated (Co.) or exposed for 72 h to 5 μ M reversine (REV), followed by fixation for light and transmission electron microscopy imaging. Representative images are reported. (A) Scale bar = 20 μ m; (B) Scale bar = 10 μ m. Note that in the absence of p53 the administration of REV dramatically increases both the cell size and the number of centrioles (indicated by red arrowheads with the insert). (C and D) WT and *TP53*^{-/-} human colon carcinoma HCT 116 cells engineered to express a GFP-histone 2B fusion protein were left untreated or exposed to 5 μ M REV and then followed by live videomicroscopy for more than 72 h. Representative snapshot (scale bar = 10 μ m) and cell fate profiles, as shown for 50 cells in each condition, are reported in (C and D), respectively. Representative full-length movies are provided as Movies S1–4. Greek letters in (C) refer to individual cells that underwent normal cell division (white arrowheads), abortive mitosis (orange arrowheads) or apoptosis (red skulls). Please note the increase in cell size, also depicted by increased font size, in particular among *TP53*^{-/-} cells. In (D) green traits depict normal cell divisions whereas yellow, light orange, dark orange and red traits depict the first, second, third and fourth aborted mitosis, respectively. Line darkening represents an increase in cell ploidy.

defects in the regulation of cell cycle checkpoints.^{6,12} Indeed, in the presence of high-dose reversine, *TP53*^{-/-} HCT 116 cells proceeded through several rounds of unproductive mitoses, usually 3–4, and finally died upon the activation of mitotic catastrophe in hyperploid interphase, frequently 8–12 h after the last round of abortive mitosis. As they succumbed, high-dose reversine-treated *TP53*^{-/-} cells exhibited the morphological hallmarks of apoptosis, including chromatin condensation, nuclear fragmentation and blebbing.³⁹ In addition, p53-deficient cells responding to high-dose reversine manifested an early $\Delta\psi_m$ dissipation, which is a widely accepted biochemical sign of the intrinsic pathway of apoptosis.^{39,46} In line with this observation, the death of *TP53*^{-/-} HCT 116 cells as induced by high-dose reversine was exacerbated by the knockdown of anti-apoptotic Bcl-2-like proteins and inhibited by the depletion of pro-apoptotic Bcl-2 family members or APAF-1 as well as by the chemical inhibition of caspases.

Our data suggest that the selective cytotoxicity of high-dose reversine for p53-deficient cells might result from the simultaneous inhibition of several kinases, rather than from the selective blockage of a single enzymatic activity. In support of this hypothesis, it has previously been shown that relatively unspecific kinase inhibitors may have broader anticancer effects than highly-targeted agents⁴⁷ and/or may avoid the compensatory activation of pathways that sustain cell survival.⁴⁸ As an example, the combination of several tyrosine kinase inhibitors with different specificities, as well as elevated concentrations of a single compound, reportedly lead to a rapid collapse of the tyrosine kinase network, resulting in efficient cell killing.⁴⁹

What are the mechanisms through which the inactivation of p53 augments the susceptibility of cancer cells to the cytotoxic effects of high-dose reversine? Based on our observations, it is tempting to hypothesize that the preferential cytotoxicity of high-dose reversine for p53-deficient cells might be intimately linked to specific cell cycle aberrations, in turn resulting from the deregulation of cell cycle checkpoints. Indeed, whereas WT HCT 116 cells responding to high-dose reversine accumulated at a -4n or -8n stage, their *TP53*^{-/-} counterparts entered several rounds of abortive mitosis. The interval between two consecutive rounds of abortive mitosis was slightly augmented (-12–14 h) in *TP53*^{-/-} HCT 116 cells exposed to high-dose reversine as compared with untreated cells of the same type (-10–12 h). Such an increase was much more pronounced in WT HCT 116 cells, corroborating the notion that p53-deficient cells are more prone to slippage than their WT counterparts.

In essence, our results point to high-dose reversine as to an efficient strategy for the preferential killing of p53-deficient cells.

Thus far, high-dose reversine appears to act similarly to SP600125, an inhibitor of several kinases, including MPS1. The precise identification of the molecular targets that are shared by high-dose reversine and SP600125 will provide additional insights into the molecular mechanisms accounting for the differential sensitivity of p53-proficient and p53-deficient cells to mitotic perturbations.

Materials and Methods

Cell lines and culture conditions. Unless otherwise indicated, media and supplements for cell culture were purchased from Gibco-Life Technologies Corporation and plasticware from Corning B.V. Life Sciences. Wild-type and *TP53*^{-/-} human colon carcinoma HCT 116 cells, kindly provided by Bert Vogelstein, Johns Hopkins Kimmel Cancer Center, were routinely maintained in McCoy's 5A medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 10 mM HEPES buffer, 100 units/mL penicillin G sodium and 100 μ g/mL streptomycin sulfate. WT and *TP53*^{-/-} HCT 116 cells transfected with a cDNA coding for a histone 2B-green fluorescent protein (H2B-GFP) (from PharMingen) were grown in McCoy's 5A medium supplemented as above plus 20 μ g/mL blasticidine. Cells were seeded onto the appropriate supports (6-, 12-, 24- or 96-well plates) 24 h before the beginning of experiments.

Chemicals. Reversine [2-(4-orpholinoanilino)-6-cyclohexylaminopurine] was purchased from Calbiochem and stocked as a 10 mM solution in DMSO. The pan-caspase inhibitor Z-VAD-fmk (*N*-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp.fluoromethylketone) was obtained from Bachem Bioscience and stocked as a 50 mM solution in DMF. Cis-diammineplatinum(II) dichloride (cisplatin, CDDP) and anthra (1,9-cd) pyrazole-6 (2H)-one (SP600125) were purchased from Sigma-Aldrich. An appropriate volume of DMSO and/or DMF was always employed to provide negative control conditions.

Real-time measurements of cell impedance. 5 x 10³ HCT 116 cells were seeded in 96-well E-plate and left to adapt and recover growth for 24 h. Thereafter, cells were treated with 5 μ M reversine or 30 μ M CDDP for an additional 72 h. During this interval, the adherence of cells was monitored every 15 min as a function of cellular impedance by means of an xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (Roche). Cell adherence was measured in six parallel wells for each experimental condition. Results are reported as slope of the mean cell index value, which constitutes an indication of electrode impedance \pm SEM.

Clonogenic survival assays. To evaluate clonogenic survival, WT and *TP53*^{-/-} HCT 116 cells that had previously been left

untreated or transfected with a control siRNA or with siRNAs targeting MPS1, AURKA and AURKB, alone or in combination, were seeded at different concentrations (from 0.1 to 5×10^3 cells/well) in 6-well plates. Twenty-four hours later, cells were treated with 5 μM reversine for a further 24 h followed by drug washout and culture in standard conditions for up to 15 d. Colonies were then fixed/stained with an aqueous solution containing 0.25% (w/v) crystal violet, 70% (v/v) methanol and 3% (v/v) formaldehyde (Carlo Erba Reagents) and counted as previously described in reference 50. Only colonies made of >30 cells were included in the quantification. For each treatment, the survival fraction (SF) was estimated according to the formula: SF = number of colonies formed/number of cells seeded. Plating efficiency was represented by the SF in untreated conditions.

Cytofluorometric studies. For the simultaneous quantification of plasma membrane integrity and mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$), cells were collected and stained with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide (PI), which only incorporates into dead cells, and 40 nM 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide [$\text{DiOC}_6(3)$], a $\Delta\psi_m$ -sensitive dye (Molecular Probes-Invitrogen), for 30 min at 37°C.^{51,52} For the assessment of cell cycle distribution, cells were collected, washed once with 0.1% (w/v) D-glucose (Sigma-Aldrich) in PBS and then fixed by gentle vortexing in ice-cold 80% (v/v) ethanol (Carlo Erba Reagents) for 30 sec. After overnight incubation at -20°C, samples were centrifuged to remove ethanol and stained with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI in 0.1% (w/v) D-glucose in PBS supplemented with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (w/v) RNase A (Sigma-Aldrich) for 30 min at 37°C. Afterwards, samples were incubated for at least 2 h at 4°C before cytofluorometric analysis.⁵³ For the simultaneous measurement of DNA content and histone H3 phosphorylation or cyclin B levels, cells were fixed with 70% (v:v) ethanol in PBS, permeabilized with 0.25% (v:v) Tween20 in PBS and co-stained with 10 μM 4',6-diamidino-2-phenylindole DAPI (Molecular Probes-Invitrogen) and a rabbit antiserum specific for phosphorylated histone H3 (rabbit polyclonal IgG1 #06-570, Millipore-Chemicon International), or a mouse antiserum specific for Cyclin B (mouse monoclonal IgG1 #610219, BD Biosciences). For the EdU assay, cells were incubated with 10 μM EdU for 30 min at 37°C, fixed, permeabilized and stained with the Fluorescent dye azide (Click-iT™ reaction cocktail, from Invitrogen) and PI according to the manufacturer's instructions. Cytofluorometric acquisitions were performed by means of a FACSCalibur (BD Biosciences) or a FACSscan (BD Biosciences) cytofluorometer equipped with a 70 μm nozzle or with a Gallios cytofluorometer (Beckman Coulter). Data were statistically evaluated using the CellQuest™ (Becton Dickinson) or Kaluza (Beckman Coulter) software. Only the events characterized by normal forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) parameters were gated for inclusion in the statistical analysis.

RNA interference. The knockdown of proteins reported in Table S1 was performed with validated specific small interfering RNAs (siRNA) purchased from Sigma-Proligo.^{54,55} Alternatively, siRNA duplexes for the downregulation of AURKA (SIHK0142) were purchased from Sigma-Aldrich and siRNAs for the downregulation of BAK1 and BAX (Hs_BAK1_5 and Hs_BAX_10 HP Validated siRNAs, respectively) from Qiagen. Cells pre-seeded in

12-well plates were transfected with siRNAs at 30–40% confluence by means of the HiPerFect® transfection reagent (Qiagen), as previously described in reference 56. After 48 or 72 h, transfection efficiency was determined by immunoblotting.

Immunofluorescence. Immunofluorescence microscopy determinations were performed as previously described in references 38 and 57. Briefly, cells were fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS, permeabilized with 0.1% SDS and stained with antibodies specific for BUBR1 (mouse monoclonal IgG1 #612502, BD Biosciences) and CENPB (rabbit polyclonal IgG1 #sc22788, Santa Cruz Biotechnology Inc.). Slides were then incubated with the appropriate AlexaFluor conjugates (Molecular Probes-Invitrogen) in the presence of 10 μM Hoechst 33342 (Molecular Probes-Invitrogen), which was used for nuclear counterstaining. Fluorescence images were captured using an IRE2 microscope equipped with a DC300F camera, both from Leica Microsystems GmbH. Signals from different probes were acquired in sequential scan mode and image analysis was performed with the open source software Image J (freely available from the National Institute of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Videomicroscopy. HCT 116 cells stably expressing a H2B-GFP fusion were grown in 96-well imaging plates (BD Biosciences) standard culture conditions and subjected to pulsed observations (every 13 min for up to 72 h) with a BD pathway 855 automated live cell microscope (BD Biosciences). Images were analyzed with the open source software Image J. Cell fate profiles are illustrated as previously published in reference 34.

Light and transmission electron microscopy. Cells were fixed in 3% glutaraldehyde in Sørensen buffer pH 7.3, post-fixed in aqueous 2% osmium tetroxide, stained with 2% uranyl acetate and, after dehydration in ethanol, were embedded in Epon 812. For light microscopy, 1 μm semi-thin sections were mounted on a glass slide, incubated 20 min in sodium hydroxide-saturated ethanol, stained with 1% thionine blue and washed in ethanol and xylene. Samples were examined in contrast-phase microscopy, using a Primo Star microscope (Carl Zeiss). Photomicrographs were recorded digitally at 40x magnification using a AxioCam ERc 5s camera (Carl Zeiss). For electron microscopic analysis, 80 nm ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined with a FEI Tecnai 12 microscope at 80 Kv (FEI).

Statistical procedures. Unless otherwise specified, all experiments were performed in triplicate parallel instances and independently repeated at least three times. Data were analyzed with Microsoft Excel (Microsoft), and statistical significance was assessed by means of two-tailed unpaired Student t-test (* $p < 0.05$).

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgements

We are indebted to Bert Vogelstein (John Hopkins University) for WT and *TP53*^{-/-} HCT 116 cells. We thank Caterina Tanzarella for the help in the design of experiment and for the critical reading of the manuscript. This work is supported by grants to G.K. from

the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipes labellisée), Agence Nationale pour la Recherche (ANR), European Commission (Active p53, Apo-Sys, ChemoRes, ApopTrain), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Institut National du Cancer (INCa), Cancéropôle Ile-de-France, Fondation Bettencourt-Schueller and the LabEx Onco-Immunology.

Note

Supplemental materials can be found at:
www.landesbioscience.com/journals/cc/article/20621

References

1. Lane D, Levine A. p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2:893; PMID:20463001; <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a000893>.
2. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244:217-21; PMID:2649981; <http://dx.doi.org/10.1126/science.2649981>.
3. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989; 57:1083-93; PMID:2525423; [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90045-7](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(89)90045-7).
4. Lane DP. Cancer, p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358:15-6; PMID:1614522; <http://dx.doi.org/10.1038/358015a0>.
5. Eliyahu D, Michalovitz D, Eliyahu S, Pinhasi-Kimhi O, Oren M. Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:8763-7; PMID:2530586; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.86.22.8763>.
6. Kastan MB, Bartek J. Cell cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004; 432:316-23; PMID:15549093; <http://dx.doi.org/10.1038/nature03097>.
7. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 2009; 137:413-31; PMID:19410540; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.037>.
8. Vousden KH, Ryan KM. p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:691-700; PMID:19759539; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2715>.
9. Cheok CF, Verma CS, Baselga J, Lane DP. Translating p53 into the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8:25-37; PMID:20975744; <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.174>.
10. Brown CJ, Lain S, Verma CS, Fersht AR, Lane DP. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:862-73; PMID:19935675; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2763>.
11. Oren M, Rotter V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2:1107; PMID:20182618; <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a001107>.
12. Aylon Y, Oren M. p53: guardian of ploidy. *Mol Oncol* 2011; 5:315-23; PMID:21852209; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2011.07.007>.
13. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on Tp53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC Tp53 database. *Hum Mutat* 2007; 28:622-9; PMID:17311302; <http://dx.doi.org/10.1002/humu.20495>.
14. Olivier M, Petitjean A, Marcel V, Pétrel A, Mounawar M, Plymoth A, et al. Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther* 2009; 16:1-12; PMID:18802452; <http://dx.doi.org/10.1038/cgt.2008.69>.
15. Peng Z. Current status of gene therapy in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther* 2005; 16:1016-27; PMID:16149900; <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2005.16.1016>.
16. Fields S, Jang SK. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 1990; 249:1046-9; PMID:2144363; <http://dx.doi.org/10.1126/science.2144363>.
17. Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:701-13; PMID:19693097.
18. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007; 87:99-163; PMID:17237344; <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>.
19. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:402-12; PMID:18431400; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2395>.
20. Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol* 2011; 223:116-26; PMID:21125670; <http://dx.doi.org/10.1002/path.2784>.
21. Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Tajeddine N, Kroemer G. Targeting p53 to mitochondria for cancer therapy. *Cell Cycle* 2008; 7:1949-55; PMID:18642442; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.7.13.6222>.
22. Wiman KG. Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to the cancer patient. *Oncogene* 2010; 29:4245-52; PMID:20498645; <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2010.188>.
23. Athar M, Elmets CA, Kopelovich L. Pharmacological activation of p53 in cancer cells. *Curr Pharm Des* 2011; 17:631-9; PMID:21391904; <http://dx.doi.org/10.2174/138161211795222595>.
24. Shangary S, Wang S. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009; 49:223-41; PMID:18834305; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094723>.
25. Dickens MP, Fitzgerald R, Fischer PM. Small-molecule inhibitors of MDM2 as new anticancer therapeutics. *Semin Cancer Biol* 2010; 20:10-8; PMID:19897042; <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2009.10.003>.
26. Jackson SP, Bartek J. The DNA damage response in human biology and disease. *Nature* 2009; 461:1071-8; PMID:19847258; <http://dx.doi.org/10.1038/nature08467>.
27. Castedo M, Coquelle A, Vivet S, Vitale I, Kauffmann A, Dessen P, et al. Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells. *EMBO J* 2006; 25:2584-95; PMID:16675948; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601127>.
28. Vitale I, Senovilla L, Jemaà M, Michaud M, Galluzzi L, Kepp O, et al. Multipolar mitosis of tetraploid cells: inhibition by p53 and dependency on Mos. *EMBO J* 2010; 29:1272-84; PMID:20186124; <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2010.11>.
29. Park SS, Eom YW, Choi KS. Cdc2 and Cdk2 play critical roles in low dose doxorubicin-induced cell death through mitotic catastrophe but not in high dose doxorubicin-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334:1014-21; PMID:16036217; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.06.192>.
30. Lin YC, Wang FF. Mechanisms underlying the pro-survival pathway of p53 in suppressing mitotic death induced by adriamycin. *Cell Signal* 2008; 20:258-67; PMID:18006273; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.10.017>.
31. Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12:385-92; PMID:21527953; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3115>.
32. Levesque AA, Kohn EA, Bresnick E, Eastman A. Distinct roles for p53 transactivation and repression in preventing UCN-01-mediated abrogation of DNA damage-induced arrest at S and G₂ cell cycle checkpoints. *Oncogene* 2005; 24:3786-96; PMID:15782134; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1208451>.
33. Degenhardt Y, Greshock J, Laquerre S, Gilmartin AG, Jing J, Richter M, et al. Sensitivity of cancer cells to Plk1 inhibitor GSK461364A is associated with loss of p53 function and chromosome instability. *Mol Cancer Ther* 2010; 9:2079-89; PMID:20571075; <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0095>.
34. Jemaà M, Vitale I, Kepp O, Berardinelli F, Galluzzi L, Senovilla L, et al. Selective killing of p53-deficient cancer cells by SP600125. *EMBO Mol Med* 2012; In press; PMID:22438244; <http://dx.doi.org/10.1002/emmm.201200228>.
35. Santaguida S, Tighe A, D'Alise AM, Taylor SS, Musacchio A. Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine. *J Cell Biol* 2010; 190:73-87; PMID:20624901; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201001036>.
36. Bunz F, Hwang PM, Torrance C, Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, et al. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest* 1999; 104:263-9; PMID:10430607; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI6863>.
37. Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:379-93; PMID:17426725; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2163>.
38. Vitale I, Galluzzi L, Vivet S, Nanty L, Dessen P, Senovilla L, et al. Inhibition of Chk1 kills tetraploid tumor cells through a p53-dependent pathway. *PLoS ONE* 2007; 2:1337; PMID:18159231; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001337>.
39. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Bachrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012; 19:107-20; PMID:21760595; <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2011.96>.
40. Chen S, Zhang Q, Wu X, Schultz PG, Ding S. Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule. *J Am Chem Soc* 2004; 126:4101-1; PMID:14719906; <http://dx.doi.org/10.1021/ja037390k>.
41. Lee YR, Wu WC, Ji WT, Chen JY, Cheng YP, Chiang MK, et al. Reversine suppresses oral squamous cell carcinoma via cell cycle arrest and concomitantly apoptosis and autophagy. *J Biomed Sci* 2012; 19:9; PMID:22283874; <http://dx.doi.org/10.1186/1423-0127-19-9>.
42. D'Alise AM, Amabile G, Iovino M, Di Giorgio FP, Bartiromo M, Sessa F, et al. Reversine, a novel Aurora kinases inhibitor, inhibits colony formation of human acute myeloid leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 2008; 7:1140-9; PMID:18483302; <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-2051>.
43. McMillin DW, Delmore J, Weisberg E, Negri JM, Geer DC, Klippel S, et al. Tumor cell-specific bioluminescence platform to identify stroma-induced changes to anticancer drug activity. *Nat Med* 2010; 16:483-9; PMID:20228816; <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2112>.

44. Hsieh TC, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Wu JM. The 2,6-disubstituted purine reversine induces growth arrest and polyploidy in human cancer cells. *Int J Oncol* 2007; 31:1293-300; PMID:17982654.
45. Hua SC, Chang TC, Chen HR, Lu CH, Liu YW, Chen SH, et al. Reversine, a 2,6-disubstituted Purine, as an Anti-cancer Agent in Differentiated and Undifferentiated Thyroid Cancer Cells. *Pharm Res* 2012; PMID:22477067; <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-012-0727-3>.
46. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al.; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009; 16:3-11; PMID:18846107; <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2008.150>.
47. Knight ZA, Lin H, Shokat KM. Targeting the cancer kinome through polypharmacology. *Nat Rev Cancer* 2010; 10:130-7; PMID:20094047; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2787>.
48. Duncan JS, Whittle MC, Nakamura K, Abell AN, Midland AA, Zawistowski JS, et al. Dynamic Reprogramming of the Kinome in Response to Targeted MEK Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer. *Cell* 2012; 149:307-21; PMID:22500798; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.053>.
49. Olausson KA, Commo F, Tailler M, Lacroix L, Vitale I, Raza SQ, et al. Synergistic proapoptotic effects of the two tyrosine kinase inhibitors pazopanib and lapatinib on multiple carcinoma cell lines. *Oncogene* 2009; 28:4249-60; PMID:19749798; <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2009.277>.
50. Zhang P, Castedo M, Tao Y, Violot D, Métivier D, Deutsch E, et al. Caspase independence of radio-induced cell death. *Oncogene* 2006; 25:7758-70; PMID:16862186; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1209744>.
51. Kepp O, Galluzzi L, Lipinski M, Yuan J, Kroemer G. Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10:221-37; PMID:21358741; <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3373>.
52. Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ* 2009; 16:1093-107; PMID:19373242; <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2009.44>.
53. Criollo A, Galluzzi L, Maiuri MC, Tasdemir E, Lavandro S, Kroemer G. Mitochondrial control of cell death induced by hyperosmotic stress. *Apoptosis* 2007; 12:3-18; PMID:17080328; <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-006-0328-x>.
54. de La Motte Rouge T, Galluzzi L, Olausson KA, Zermati Y, Tasdemir E, Robert T, et al. A novel epidermal growth factor receptor inhibitor promotes apoptosis in non-small cell lung cancer cells resistant to erlotinib. *Cancer Res* 2007; 67:6253-62; PMID:17616683; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0538>.
55. Galluzzi L, Morselli E, Vitale I, Kepp O, Senovilla L, Criollo A, et al. miR-181a and miR-630 regulate cisplatin-induced cancer cell death. *Cancer Res* 2010; 70:1793-803; PMID:20145152; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3112>.
56. Hoffmann J, Vitale I, Buchmann B, Galluzzi L, Schwede W, Senovilla L, et al. Improved cellular pharmacokinetics and pharmacodynamics underlie the wide anticancer activity of sagopilone. *Cancer Res* 2008; 68:5301-8; PMID:18593931; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0237>.
57. Vitale I, Senovilla L, Galluzzi L, Criollo A, Vivet S, Castedo M, et al. Chk1 inhibition activates p53 through p38 MAPK in tetraploid cancer cells. *Cell Cycle* 2008; 7:1956-61; PMID:18642443; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.7.13.6073>.

© 2012 Landes Bioscience.
Do not distribute.