HAL
open science

Mise en évidence d'une relation entre la protéine Damaged DNA-Binding 2 et le facteur de transcription NF-kB : conséquences sur les capacités migratrices et invasives des tumeurs mammaires

Marie Ennen

To cite this version:

Marie Ennen. Mise en évidence d'une relation entre la protéine Damaged DNA-Binding 2 et le facteur de transcription NF-kB : conséquences sur les capacités migratrices et invasives des tumeurs mammaires. Interactions cellulaires [q-bio.CB]. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0236 . tel-01749628v2

HAL Id: tel-01749628

https://theses.hal.science/tel-01749628v2

Submitted on 31 Oct 2013

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Marie ENNEN**

Mise en évidence d'une relation entre la protéine Damaged DNA-Binding 2 et le facteur de transcription NF-κB : conséquences sur les capacités migratrices et invasives des tumeurs mammaires

Le 04 Décembre 2012

Membres du jury :

Rapporteurs :	Professeur Xuefen LEBOURHIS	INSERM U908-Université de Lille, Lille.
	Professeur Agnès NOEL	LBTD, GIGA-CANCER-Université de Liège, Liège.
Examinateurs :	Professeur Didier WOLF	CRAN-CNRS UMR 7039-Université de Lorraine, Nancy.
	Docteur Alain JUNG	EA3430-Centre Paul Strauss, Strasbourg.
	Professeur Philippe BECUWE	EA4421 SIGRETO- Université de Lorraine, Nancy. **Co-directeur de thèse**
	Docteur Stéphanie GRANDEMANGE	EA4421 SIGRETO- Université de Lorraine, Nancy. **Co-directeur de thèse**

Laboratoire EA4421 Signalisation, Génomique et Recherche Translationnelle en Oncologie.
Faculté des Sciences, Université de Lorraine. 54506-Vandoeuvre-lès-Nancy.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Philippe Becuwe, qui m'a accueillie au sein de son équipe. Merci pour votre encadrement et pour vos encouragements tout au long de ce travail de thèse. Je vous suis sincèrement reconnaissante pour la disponibilité, la rigueur scientifique ainsi que pour l'investissement personnel dont vous avez fait preuve durant ces 3 années. Veuillez trouver ici, l'expression de mon plus grand respect.

Je remercie chaleureusement le Docteur Stéphanie Grandemange, ma co-directrice de thèse. Merci pour tes conseils et ton soutien. Tu sais te montrer à l'écoute des autres, une grande qualité à mes yeux. J'espère réaliser une carrière comme que la tienne…

Tous mes remerciements aux Professeurs Xuefen Lebourhis et Agnès Noel, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et d'y avoir consacré du temps. J'exprime également ma sincère gratitude au Professeur Didier Wolf et au Docteur Alain Jung pour juger ce travail en tant qu'examinateurs.

J'adresse ensuite tous mes remerciements à l'ensemble des membres de l'équipe SIGRETO et des personnes avec lesquelles j'ai pu travailler de près ou de loin et ont ainsi participé à la bonne réalisation de ce travail.

Un grand merci à nos deux « super » techniciennes du laboratoire, les deux « inséparables » ! Votre aide et votre soutien ont été très précieux pour moi. Vanessa, je n'oublierai pas ta bonne humeur et tes discours toujours très « gestuels » que l'on apprécie tant ! Emilie, gentillesse et douceur sont deux grandes qualités qui te représentent le mieux, merci pour ton écoute !

A mes collègues doctorants : Rémi et Claire. Rémi, un clown à toi tout seul ! Je n'oublierai pas tes blagues qui m'ont d'ailleurs tant fait rire ainsi que tes fameuses imitations de l'accent belge ! Bonne continuation à toi. Claire, toute nouvelle recrue et que l'on appelle l'autre « blonde » du laboratoire ! Et oui, pas facile, mais il faut assumer. Je te souhaite courage et bonne chance pour la suite.

Aux Docteurs Nadège Touche et Lionel Domenjoud, les deux spécialistes de la biologie moléculaire, merci à vous deux pour vos conseils. Merci également à Sylvie et Murielle.

Je remercie ensuite les membres de l'équipe de la faculté de médecine en particulier le docteur Sophie Pinel. Merci pour tes précieux conseils « *in vivo* ». Je remercie également très sincèrement le Professeur François Plénat, qui a toujours su accorder du temps à la réalisation de mon étude.

A ma famille,

A mes parents, sans qui je ne serais jamais arrivée jusqu'ici. Je vous remercie pour votre soutien et vos encouragements. Maman, tu t'es toujours tellement investie pour Delphine et moi ! Tu as été d'un grand réconfort pendant mes études. Je me rappelle l'époque où petite, je te récitais mes cours de Biologie ! Que le temps passe vite !

A ma sœur Delphine, la « parisienne ». Que nos coudes restent serrés et nos cœurs liés.

Et enfin à Florian. Tout ce que je pourrais écrire, ne serait pas suffisant. Dix ans, que tu m'épaules, me soutiens et surtout supportes mon « petit caractère ». Je le reconnais, je suis un peu « râleuse » ! Que la vie continue à nous gâter…

SOMMAIRE

ABREVIATIONS **1**
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE **7**
INTRODUCTION **9**
I. LA GLANDE MAMMAIRE 9
1. Structure anatomique 9
2. Les différents types de cellules 9
II. LE CANCER DU SEIN 11
1. Epidémiologie 11
2. Facteurs de risques 11
2.1. Le sexe féminin 11
2.2. Facteurs héréditaires 11
2.3. Les hormones ovariennes 12
2.4. L'âge de la femme à la 1ère grossesse et durée allaitement 12
2.5. Facteurs métaboliques 13
3. Les différents types de tumeurs mammaires et leur classification 13
3.1. Les cancers du sein *in situ* 14
3.2. Les carcinomes infiltrants 14
4. Les autres tumeurs malignes du sein 16
5. Les métastases 16
6. Les marqueurs biologiques du cancer du sein 17
7. Stratégies thérapeutiques 20
7.1. Chirurgie 20
7.2. Radiothérapie 20
7.3. Chimiothérapie 21
7.4. Hormonothérapie 21
7.5. Thérapies ciblées 21
7.5.1. Le trastuzumab 22
7.5.2. Le bévacizumab 22
7.5.1. Le lapatinib 22

8. La tumorigenèse mammaire 23
8.1. Altérations génétiques et cancérogenèse 23
8.2. Progression tumorale, invasion et métastases 27
8.2.1. Les signaux de prolifération conduisant à la croissance tumorale 27
8.2.1.1. Les œstrogènes 27
8.2.1.2. La progestérone 27
8.2.1.3. Les facteurs de croissance 29
8.2.1.4. Les voies Wnt/β-caténine et Notch 32
8.2.1.5. L'influence des cellules environnant la tumeur 32
8.3. L'angiogenèse 33
8.4. La transition épithélio-mésenchymateuse à l'origine des capacités migratrices et invasives des cellules tumorales 33
8.5. La dissémination métastatique 36

III. LA VOIE DE SIGNALISATION NF-κB 38
1. Structure du complexe NF-κB 38
2. Régulation de l'activité du complexe NF-κB 39
2.1. Régulation par les inhibiteurs IκB 39
2.2. Régulation par la protéine IκBα 39
2.2.1. Structure de la protéine IκBα 40
2.2.2. Régulation transcriptionnelle du gène codant IκBα 41
2.2.3. Régulation par phosphorylation 42
2.2.4. Régulation par les micro-ARN 43
3. Les voies d'activation du complexe NF-κB 43
3.1. La voie classique d'activation 44
3.2. La voie alternative 44
3.3. La voie atypique d'activation 45
4. Les rôles biologiques du complexe NF-κB 45
4.1. Généralités 45
4.2. Rôle de NF-κB dans le développement des tumeurs 46
4.2.1. Activation constituitive du complexe NF-κB 46
4.2.2. Rôle de NF-κB dans la résistance aux traitements anticancéreux 47
4.2.3. Rôle dans la prolifération 47

4.2.4. Role dans l'invasion des cellules tumorales 48
4.2.5. Rôle dans l'angiogenèse tumorale 49
5. NF-κB dans le cancer du sein 50
5.1. Expression et régulation de NF-κB dans les cancers du sein 50
5.2. Rôle de NF-κB dans les capacités de migration et d'invasion des cellules tumorales mammaires 51
5.3. NF-κB et la résistance aux traitements anticancéreux dans les cellules tumorales mammaires 53

IV. LA PROTEINE DAMAGED DNA-BINDING 2 (DDB2) 55
1. Structure du gène et de la protéine 55
2. Activités biologiques 55
2.1. Réparation de l'ADN endommagé par les UV 56
2.1.1. DDB2 dans la structure du complexe DDBP 56
2.1.2. DDB2 dans la reconnaissance des lésions induites de l'ADN 57
2.1.3. Rôle de DDB2 dans la relation entre réplication et réparation de l'ADN 57
2.2. Remodelage de la chromatine 59
2.3. Rôle dans le cycle cellulaire 60
2.4. Rôle dans l'apoptose 61
2.5. Rôle dans la transcription 62

OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE 64

MATERIELS & METHODES 67
I. Culture cellulaire et échantillons cliniques 67
1. Conditions de culture 67
2. Développement de modèles de cellules tumorales mammaires transgéniques 67
2.1. Cellules tumorales mammaires surexprimant la protéine DDB2 67
2.2. Développement de modèles de cellules tumorales mammaires surexprimant la protéine DDB2 et la GFP 68
2.3. Cellules tumorales mammaires ayant une inhibition de la protéine IκBα par la technique de l'interférence à l'ARN 68
3. Les échantillons de tumeurs mammaires provenant de patientes 69

II. Etude de l'expression des gènes au niveau transcriptionnel 70
1. Extraction des ARNs totaux 70
2. Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) 70
3. PCR quantitative en temps réel 71
III. Etude de l'expression des gènes au niveau traductionnel 72
1. Par immuno-réplique 72
1.1. Extraction et dosage des protéines totales, cytoplasmiques et nucléaires 72
1.2. Electrophorèse et transfert sur membrane 72
1.3. Détection immunologique 73
2. Par cyto-immunofluorescence 74
3. Analyse sur gel de l'activité gélatinase 74
IV. Analyse de l'activité de protéines nucléaires sur l'ADN par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) 76
1.1. Extraction de la chromatine 76
1.2. Immunoprécipitation des protéines d'intérêt 76
1.3. Analyse par PCR 77
2. Etude de l'activité de fixation des protéines nucléaires sur l'ADN par gel retard 77
2.1. Marquage des sondes oligonucléotidiques 78
2.2. Interaction des protéines sur l'ADN et analyse du complexe 78
3. Etude de l'activité transcriptionnelle des protéines nucléaires 79
3.1. Construction du plasmide contenant la partie proximale du promoteur du gène IκBα .. 79
3.2. Mutagenèse dirigée de la région nucléotidique O_3 81
3.3. Transfections transitoires et mesure de l'activité luciférase 82
V. Analyse des capacités migratrices et invasives 83
1. Analyse des capacités migratrices et invasives *in vitro* 83
1.1. Par la méthode en chambre de Boyden 83
1.2. Par le test de blessure 84
2. Analyse des capacités invasives *in vivo* 84
2.1. Injections des cellules et xenogreffes de tumeurs chez la souris 84
2.2. Quantification des cellules invasives par cytométrie en flux 85
2.3. Quantification des cellules invasives par analyse histologique 85
VI. Analyses statistiques 86

RESULTATS **88**

I. Mise en évidence du mécanisme moléculaire impliquant DDB2 dans le contrôle des capacités migratrices et invasives des cellules tumorales mammaires 88

1. Résultats préliminaires 88

2. Importance de la protéine DDB2 dans les capacités migratrices et invasives *in vitro* et *in vivo* 88

3. Identification du mécanisme moléculaire expliquant en partie le rôle de DDB2 dans le contrôle des capacités invasives 90

4. Conclusions 113

II. Importance de la relation entre DDB2 et NF-κB dans la régulation de l'expression du gène SOD Mn dans les cellules tumorales mammaires 114

1. Introduction et résultats préliminaires 114

2. Résultats obtenus 115

3. Conclusions 118

DISCUSSION **120**

I. DDB2, invasion tumorale mammaire et régulation de gènes cibles 120

1. DDB2 et invasion tumorale mammaire 120

II. Relation entre DDB2, ses gènes cibles et l'invasion tumorale mammaire 122

III. Importance de DDB2 dans la transcription de gènes 123

1. Le cas du gène *IκBα* 123

2. Le cas du gène *SOD Mn* 125

IV. Relation entre DDB2 et NF-κB dans les capacités invasives des cellules tumorales mammaires 127

1. DDB2 et l'activité constitutive de NF-κB 127

2. Importance du contrôle de DDB2 sur NF-κB dans la croissance tumorale 128

V. Relation entre DDB2 et NF-κB et la SOD Mn dans la croissance tumorale mammaire 131

VI. Intérêt clinique de DDB2 133

CONCLUSION **137**

PERSPECTIVES **138**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **140**

ABREVIATIONS

- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- ADNc : Acide Désoxyribonucléique Complémentaire
- ADP : Adénosine Diphosphate
- AIP : 1-Amino-3-iminopropène
- ANK : Ankyrine
- ARN : Acide Ribonucléotidique
- ARNm : Acide Ribonucléotidique messager
- AP-1 : Activator Protein-1
- AP-2 : Activator Protein-2
- ATM : Ataxia-Telengiectasia-Mutated
- ATP : Adénosine Triphosphate
- ATR : ATM anti-Rad3 related protein kinase

B

- Bcl-2/3 : B-cell lymphoma 2/3
- BER : Excision de Bases
- BET : Bromure d'éthidium
- BRCA : Breast Cancer
- BRAP2 : BRCA1-associated Protein 2
- BSA : Albumine Sérique Bovine

C

- Ca^{2+} : Calcium
- $CaCl_2$: Chlorure de calcium
- CBP/p300 : cREB Binding Protein/p300
- CCDN1: Cycline D1
- CD : Cluster Differenciation
- CDK : Cyclin-Dependent Kinase
- Cdt : Cytolethal distending toxins
- C/EBP : CAAT/Enhancer Binding Protein
- CHC : Carcinomes hépatocellulaires
- CHEK2 : Check point homolog 2
- ChIP : Immunoprecipitation sur chromatine
- C-IAP: Cellular Inhibitor of Apoptosis
- CKII : Casein Kinase II

- CK 14 : Cytokératine 14
- CREB : c-AMP Response Element Binding
- CRM1 : Exportine1 ou Chromosome Region Maintenance 1
- CSA : Cocaine Syndrome A
- CSC : Cellules Souches Cancéreuses
- CSN : Cellules Souches Normales
- Cu^{2+} : Cuivre
- Cul-4A : Culline-4A

D

- DAPI : 4', 6'. Di amidino-2-Phényl Indole
- dATP : Désoxyadénosine Triphosphate
- DCAF : DDB1 and Cul-4A-Associated Factors
- dCTP : Désoxycytidine Triphosphate
- DDB1 : Damaged DNA-Binding 1
- DDB2 : Damaged DNA-Binding 2
- DDBP : Damaged DNA-Binding Protein
- dGTP : Désoxyguanidine Triphosphate
- DHFR : Dihydrofolate Réductase
- DMSO : Diméthylsulfoxide
- dNTP : Déoxynucléotides Triphosphates
- D-PBS : Tampon phosphate salin
- DTT : Dithiothréithiol
- dTTP : Désoxythimidine Triphosphate

E

- E_2 : Œstradiol
- E2F1 : E2F transcription Factor 1
- EAO : Espèces Actives de l'Oxygène
- EDTA : Ethylène Diamine Tétracétique
- EGF : Epidermal Growth Factor
- EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
- ER : Récepteur aux œstrogènes
- ERE : Estrogen Response Element
- ERK : Extracellular-Regulated Kinases
- Ets-1 : Etwenty-six-1

F

- FADD : Fas-Associated protein with Death Domain
- FAK : Focal Adhesion Kinase

G

- G3BP2 : rasGAP SH3-Binding Protein 2
- GG-NER : Global Genome repair

H

- H_2O : Eau
- H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
- HCl : Acide Chlorhydrique
- HER : Human Epidermal growth factor Receptor
- HER2/neu : Human Epidermal growth factor 2
- HGF : Hepatocyte Growth Factor
- HGF-SF : Hepatocyte Growth Factor-Scatter Factor
- HIF : Hypoxia Inductible Factor
- Hsp90 : Heat shock protein 90

I, J

- IAP-1 : Inhibiting Apoptosis Protein-1
- I-CAM-1 : Inter-Cellular Adhesion Molecule-1
- IGF-1 : Insulin like Growth Factor-1
- IGF-1R : Insulin like Growth Factor-1 Receptor
- IGFBP : Insulin like Growth Factor-1 Binding Protein
- IκBα : Inhibitory kappaB alpha
- IKK : IκB kinase inhibitor
- IL-1 : Interleukine-1

K, L

- KCl : Chlorure de potassium
- kDa : Kilo Dalton

- Ki-67 : Kinase inhibitor-67
- LB : Lysogeny Broth
- LPS : Lipopolysaccharides
- Luc : Luciferase
- LZ : Leuzine-Zipper

M

- MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
- MDA : Malondialdéhyde
- MDM2 : Murine Double Minute-2
- MDR1 : MultiDrug Resistance 1
- MET : Mesenchymal-Epithelial Transition factor
- $MgCl_2$: Chlorure de magnesium
- MiRNA : MicroRNA
- MKK : MAP Kinase Kinase
- MMP : Métalloprotéase matricielle
- MOI : Multiplicity of infection
- MUC-1 : Mucine-1

N, O

- NaCl : N-acétyl-L-Cystéine
- NaOH : Hydroxyde de sodium
- NEMO : NF-κB Essential Modulator
- NER : Nucleotide Excision Repair
- NF-1 : Nuclear Factor-1
- NF-κB : Nuclear Factor-kappa B
- NIK : NF-κB Induced Kinase
- NκRF : NF-κB Repressing Factor
- NLS : Signal de Localisation Nucléaire
- NRG1 : Neureguline 1
- O_2 : Oxygène singulet

P

- PAF : Paraformaldehyde
- PAI : Plasminogen Activator Inhibitor
- PARP : Poly-ADP-Ribose Polymerase
- Pb : Paire de bases

- PCNA : Proliferating Cell Antigen
- PCR : Réaction de polymérisation en chaine
- PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
- pGP : Glycoprotéine P
- PIC : Cocktail d'inhibiteurs de protéases
- PIP : PCNA Interacting Peptide
- PI3K : Phosphatidyl Inositol 3-Kinase
- PKC : Protéine Kinase C
- PMA : Phorbol 12-Myristate 13 Acétate
- PMSF : Phénylméthylsulfonylfluoride
- PR : Récepteur à la Progestérone
- PRB : Protéine du Rétinoblastome
- PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
- PVDF : Polyvinyldifluoride

R, S, T

- RHD : Rel Homology Domain
- RIP : Receptor Interacting Protein
- RPA : Facteur de Réplication A
- RT-PCR : Transcription inverse PCR
- SBR : Scarff Bloom Richardson
- SDF-1 : Stroma-cell-Derived Factor-1
- SDS : Sodiumdodécylsulfate
- siRNA : Small interfering RNA
- SMA : Smooth Muscle Actin
- SOD Mn : Superoxide Dismutase à Manganèse
- Sp1 : Specificity protein 1
- SRD : Signal Response Domain
- STK11 : Serine/Thréonine Kinase 11
- SVF : Sérum de Veau Fœtal
- TAD : Transactivation Domain
- TAK : Transforming growth factor β-Activated Kinase
- TBE : Tris Borate EDTA
- TBS : Tris Borate Sodium
- TC-NER : Transcription-Coupled repair
- TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
- TGF : Transforming Growth Factor
- THS : Traitements Hormonaux Substitutifs
- TIMP-1 : Metallopeptidase Inhibitor 1
- TNF : Tumor Necrosis Factor
- TP-53 : Tumor Protein-53

- TRADD : TNF Receptor type 1-Associated Death Domain

U, V, W, X, Z

- uPA : Urokinase-type Plasminogen Activator
- URL : Unité Relative de Lumière
- UV : Ultraviolets
- VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1
- VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
- XP : Xeroderma Pigmentosum
- WD40 : Tryptophane-acide aspartique dipeptide
- ZEB-1 : Zinc finger E-box binding homeobox-1

INTRODUCTION

A l'heure actuelle, le cancer du sein reste la pathologie la plus fréquente, avec plus d'un million de nouveaux cas et environ 373 000 décès enregistrés dans le monde et ceci, malgré beaucoup de progrès dans son traitement et dans son diagnostic. Les mécanismes moléculaires de la carcinogénèse mammaire ne sont pas entièrement compris et élucidés, en particulier ceux conduisant au pouvoir métastatique et à l'échappement aux thérapies anticancéreuses de certaines cellules tumorales mammaires. Actuellement, quelques protéines ont été mises en évidence, ainsi que la régulation de leur activité, mais elles ne permettent pas d'expliquer la progression des cellules tumorales mammaires vers un état prolifératif et/ou invasif.

Une des thématiques de recherche du laboratoire, dans lequel l'ensemble de ce travail a été réalisé, consiste à identifier de nouveaux marqueurs moléculaires, qui jouent un rôle dans le développement des tumeurs mammaires. Dans ce sens, le laboratoire a identifié la protéine DDB2 (Damaged DNA-Binding 2) comme étant impliquée dans le contrôle de la prolifération des cellules tumorales mammaires, une protéine connue jusque là pour son implication dans la réparation de l'ADN par excision de nucléotides. Cette nouvelle activité biologique de DDB2 dépend de son implication dans la régulation de gènes comme celui codant la superoxyde dismutase mitochondriale (SOD Mn), une enzyme antioxydante. Une analyse transcriptomique sur puce à ADN a conduit à l'identification d'un autre gène cible : le gène codant la protéine IkappaB alpha (IκBα). Ce gène est un candidat intéressant, car il code l'inhibiteur cytoplasmique du facteur de transcription Nuclear Factor-kappaB (NF-κB). Ce dernier joue un rôle important mais encore mal compris dans le développement de tumeurs, qui dépend de l'origine tissulaire des cellules tumorales, ainsi que de son activité constitutive.

CHAPITRE 1

ANALYSE

BIBLIOGRAPHIQUE

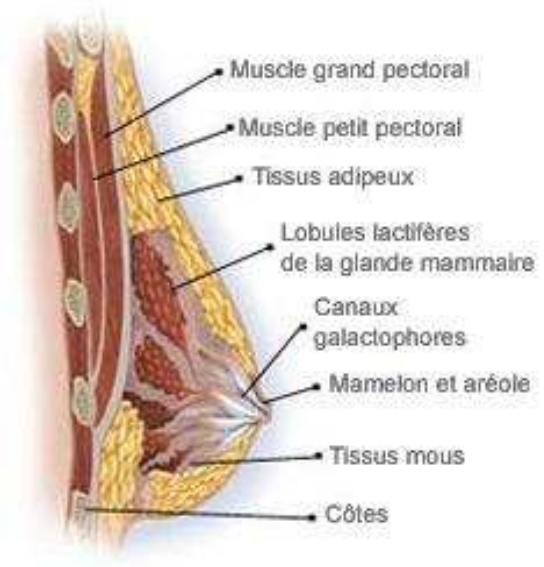


Figure 1 : Anatomie de la structure de la glande mammaire (http://www.cancer-du-sein.org/lanatomie-du-sein).

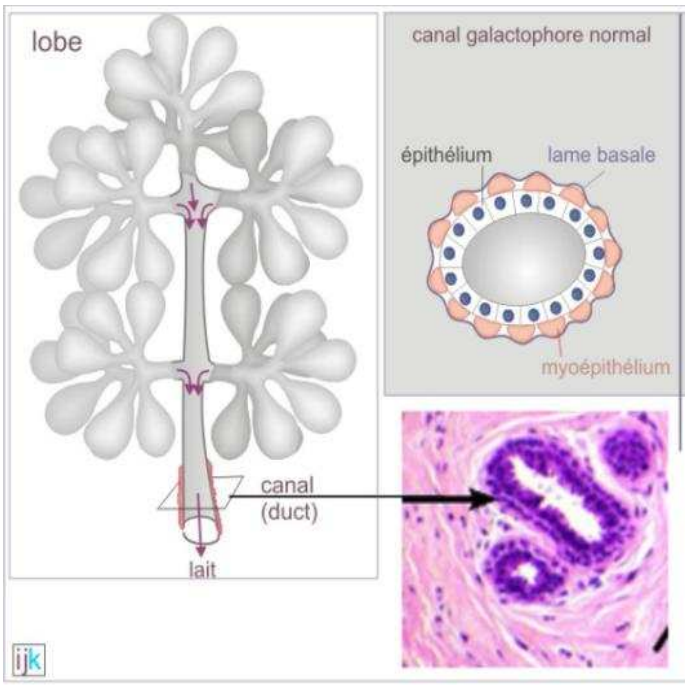


Figure 2 : Structure d'un lobe mammaire : un lobe mammaire comporte 20 à 40 lobules eux-mêmes constitués de 10 à 100 alvéoles. Les alvéoles sont formées d'un épithélium sécrétoire qui éjecte la sécrétion lactée dans les réseaux de canalicules, puis dans les canaux galactophores, grâce à la contraction des cellules myoépithéliales constituant le myoépithélium (d'après le livre « Histoire de la thérapie ciblée en cancérologie », édition AMGEN, 2007).

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LA GLANDE MAMMAIRE

1. Structure anatomique

Le sein est une glande exocrine située sur la face antéro-supérieure du thorax. Il repose au niveau de la cage thoracique sur les muscles pectoraux grâce aux ligaments de Cooper. Le sein, principalement constitué d'un tissu graisseux, est entouré d'un revêtement cutané se terminant à son extrémité par un relief appelé mamelon. La peau qui entoure le mamelon, appelée auréole, est pigmentée et contient des glandes sébacées (glandes de Morgani). Lors de la grossesse, ces glandes s'hypertrophient, prenant alors le nom de tubercule de Mongomery. La glande mammaire est structurée par deux compartiments distincts : le compartiment mésenchymateux qui concerne l'irrigation et l'innervation et le compartiment épithélial qui comprend un réseau de canaux, de canalicules et de lobules. Le sein est constitué de 15 à 20 lobes. Chaque lobe est constitué de 20 à 40 lobules comprenant chacun un canal intermédiaire se jetant dans un canal lactifère. Ces lobules sont constitués de 10 à 100 alvéoles, chacune ayant un canalicule qui lui est propre (Figure 1 et Figure 2).

Son développement commence au cours de la vie fœtale, dès la quatrième semaine, à partir de l'ectoderme. C'est lors du troisième trimestre de la grossesse que les œstrogènes et la progestérone produits par la mère, provoquent une canalisation de l'épithélium mammaire, une différenciation du parenchyme, la formation des canaux galactophores ainsi que le développement du réseau lobulo-alvéolaire. Au moment de la puberté, la mise en place du cycle menstruel permet la croissance des canaux et du stroma ainsi qu'une augmentation du volume de la glande mammaire liée à une accumulation de tissu graisseux. Les alvéoles restent peu développées. Celles-ci subissent une croissance active lors de la grossesse, prenant la place du tissu adipeux, sous l'influence notamment des hormones œstrogènes/progestérone et de facteurs de croissance tels que le TGF-α (Transforming Growth Factor-α) ou l'IGF-1 (Insulin like Growth Factor-1) (Lamote *et al.*, 2004). A la fin de la grossesse, les cellules alvéolaires sont totalement différenciées et deviennent fonctionnelles. Jusqu'à l'accouchement, la lactation est inhibée par une action négative de la progestérone sur la

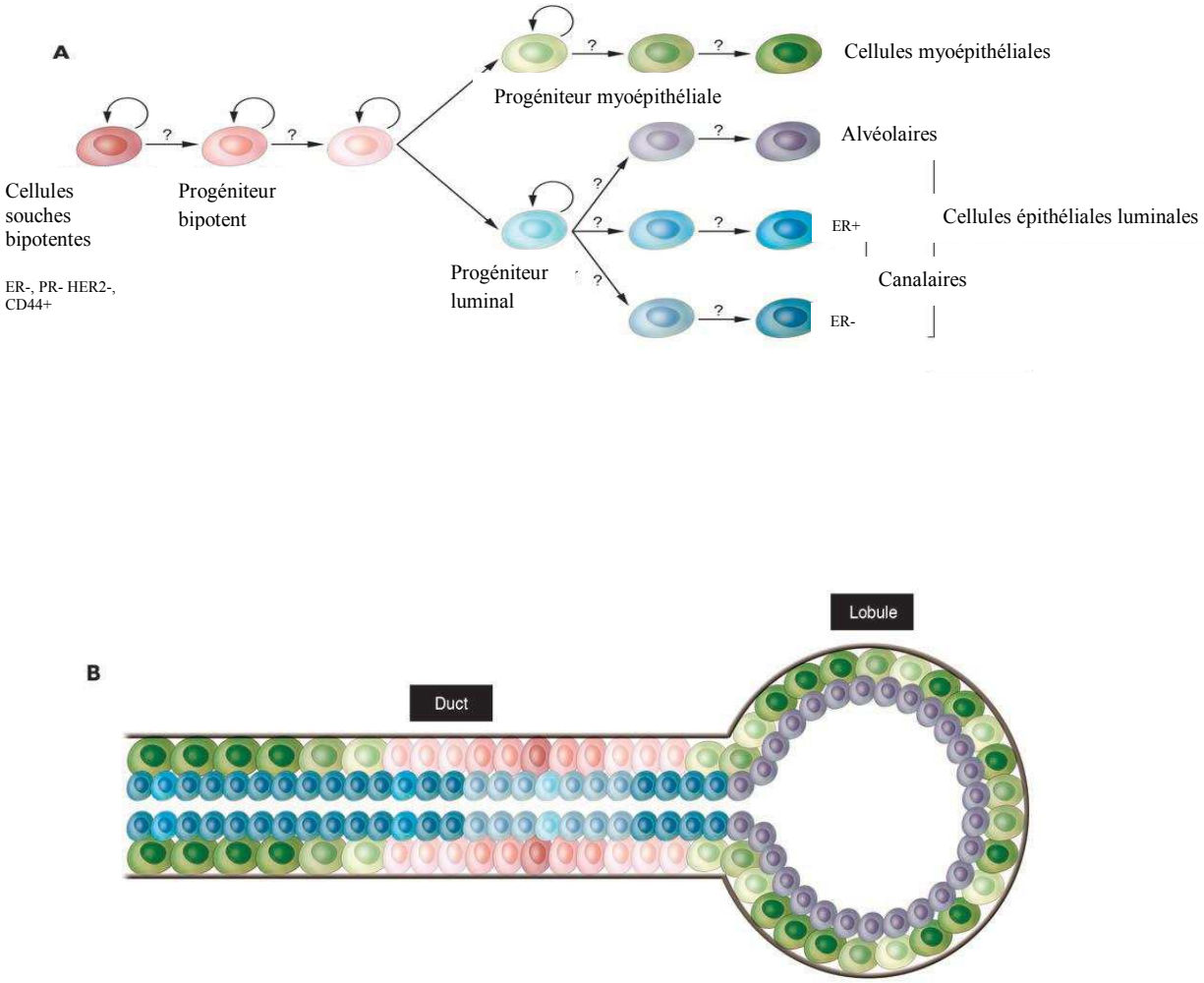


Figure 3 : Modèle hypothétique de la hiérarchie et de la différenciation de l'épithélium mammaire : (A) : les cellules souches bipotentes se différencient en cellules épithéliales (alvéolaires et canalaires) et en cellules myoépithéliales, mais les étapes intermédiaires et les régulations intervenant dans ce processus sont encore inconnues (sur le schéma :?). (B) : schéma de bourgeon terminal avec les localisations possibles des différentes cellules souches, épithéliales et myoépithéliales. Les canaux se développent dans la glande mammaire, avec une couche de cellules épithéliales alvéolaires dans la partie lobulaire (« lobule ») et une couche de cellules épithéliales canalaires dans la partie canalaire (« duct »). Ces cellules épithéliales alvéolaires ou canalaires recouvrent une couche de cellules myoépithéliales ou une couche de cellules souches (Polyak., 2007).

prolactine. Après l'accouchement, la glande mammaire n'achève son développement qu'avec la première lactation.

2. Les différents types cellulaires

L'épithélium mammaire provient de cellules souches bipotentes, c'est-à-dire que leur différenciation génère deux sous-types cellulaires, appelés cellules progénitrices, qui constituent les canaux et les lobules mammaires (Figure 3). Les progéniteurs myoépithéliaux, se diviseront et se différencieront en cellules myoépithéliales, contractiles, pour constituer les canaux galactophores. Les progéniteurs luminaux, donneront la couche interne des canaux en se différenciant en cellules épithéliales luminales canalaires sécrétrices de lait ou en cellules luminales alvéolaires. Au cours de leur différenciation en cellules myoépithéliales, les progéniteurs vont développer un cytosquelette très contractile, caractéristique des cellules musculaires lisses et exprimer des protéines comme l'actine des muscles lisses ou la « Smooth Muscle Actin » (SMA). Les progéniteurs acquièrent une densité intracellulaire importante de microfilaments et de plaques d'adhérence (cellules/matrice). Une fois différenciées, les cellules myoépithéliales reposent sur une lame basale qu'elles synthétisent et qui les sépare du stroma. Les cellules myoépithéliales sont majoritairement présentes dans les canaux, mais sont également retrouvées en plus petit nombre dans les lobules mammaires. Ces cellules jouent le rôle de barrière cellulaire entre les cellules luminales et les fibroblastes du micro-environnement ou stroma mammaire, et assurent ainsi le maintien de la structure de la glande mammaire en orientant les cellules luminales. Les cellules myoépithéliales expriment certains marqueurs comme celui de la cytokératine 14 (CK14) et le CD (« Cluster Differentiation ») 10.

La différenciation des progéniteurs luminaux en cellules luminales s'accompagne d'une perte d'expression du marqueur CD61. La proportion de ces progéniteurs décroît durant la puberté au moment de l'élongation du réseau de canaux galactophores ainsi qu'en fin de puberté lorsque la différenciation alvéolaire s'effectue. Les cellules luminales expriment des marqueurs tels que les récepteurs hormonaux (récepteurs aux œstrogènes ER et à la progestérone PR) ainsi que certaines cytokératines (CK8/18). La fonction première des cellules luminales alvéolaires au moment de l'allaitement est la fabrication de lait. Ces cellules luminales ayant une activité sécrétrice sont d'ailleurs caractérisées par l'expression de glycoprotéines de surface comme la Mucine (Muc-1) (Polyak., 2007).

II. LE CANCER DU SEIN

1. Epidémiologie

A l'heure actuelle, le cancer du sein représente la pathologie cancéreuse la plus fréquente, avec plus d'un million de nouveaux cas et environ 373 000 décès enregistrés dans le monde. D'après les données du Ministère de la santé de 2001, le cancer du sein a une incidence de plus de 33 800 nouveaux cas par an en France, représentant ainsi 32% des nouveaux cas de cancer féminin. Il est responsable de 10 800 décès par an soit 19% des décès féminin par cancer, et 40% de décès prématurés avant 65 ans. La probabilité pour une femme française d'avoir un cancer du sein au cours de sa vie est de 10,1%. Près de 300 000 personnes vivent aujourd'hui en France avec un cancer du sein. En Europe, la France occupe une place médiane tant pour le nombre de nouveaux cas que pour la mortalité, entre les pays de l'Europe du nord, à risque élevé, et ceux du sud, à risque plus faible. Son incidence et sa mortalité varient largement, en Europe (en Belgique elles sont presque le double qu'en Pologne) et plus encore dans le monde (huit fois plus grandes au Canada qu'au Japon).

2. Facteurs de risques

Ces dernières années, nous disposons d'études épidémiologiques et expérimentales convergentes concernant les facteurs de risque associés aux cancers du sein. Ils concernent surtout les cancers du sein sporadiques mais peuvent aussi influencer les cancers « héréditaires ».

2.1. Le sexe féminin

Quatre vingt dix neuf pour cent des cancers du sein apparaissent chez la femme. Seul 1% des hommes sont concernés.

2.2. Facteurs héréditaires

Les formes familiales représentent 6 à 10% de l'ensemble des cancers du sein (Wooster et Weber., 2003). Parmi ceux-ci, les mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* (Breast Cancer 1 et 2) sont retrouvées dans la majorité des cas, les mutations de *TP 53* (Tumor Protein 53), *PTEN* (Phosphatase and Tensin homolog), *STK 11* (Serine/Thréonine Kinase 11) étant beaucoup plus rares (Dumitrescu *et al*., 2005). Une mutation délétère est retrouvée chez seulement 2% des femmes, signifiant ainsi un risque accru de cancer du sein. Dans 60 à 80% des formes familiales aucune mutation pathologique de ces 5 gènes ne sera mise en évidence. Les recherches se poursuivent pour définir dans les familles à risque de nouveaux gènes de susceptibilité, des polymorphismes et des facteurs épigénétiques. Le risque au cours d'une vie pour une femme porteuse d'une mutation de *BRCA1* de développer un cancer du sein est de l'ordre de 60% et un cancer de l'ovaire de l'ordre de 40%. Pour une femme porteuse d'une mutation de *BRCA2* ces chiffres sont respectivement de 40% et de 10%. A noter que le mode de vie et les facteurs hormonaux peuvent moduler ce risque et la pénétrance semble avoir augmentée au cours des 20 dernières années, suggérant que les mêmes facteurs que ceux responsables de l'augmentation d'incidence des cancers sporadiques pourraient être impliqués.

2.3. Les Hormones ovariennes

L'exposition du sein à ces hormones serait l'un des principaux facteurs de risque (Rochfort., 2008). En effet, l'apparition du cycle menstruel avant 12 ans ainsi qu'une ménopause tardive sont liés à un risque plus élevé de cancer du sein (Brinton *et al*., 1988 ; Jiang *et al*., 2012). En France, les traitements hormonaux substitutifs THS (Thydroïd Stimulating Hormone) semblent responsables d'environ 2% de l'ensemble des cancers du sein.

2.4. L'âge de la femme à la première grossesse et duré de l'allaitement

La grossesse a des effets protecteurs, surtout si elle survient avant 25 ans ; le risque est supérieur chez les nullipares (MacMahon *et al*., 1970 ; Albrektsen *et al*., 2005 ; Schnabel

et al., 2012). De même il est augmenté de 50% si la première grossesse survient après 30 ans. La protection augmenterait avec le nombre de grossesses à terme et surtout plus l'âge de la première grossesse est précoce plus la protection est grande. Par contre un premier enfant après 30 ans entraîne un risque supérieur à celui des nullipares et le double, après 35 ans (IARC., 2007 ; Schnabel *et al*., 2012). C'est l'âge de la mère au premier enfant qui parait être le facteur principal. De nombreuses recherches sont en cours pour comprendre pourquoi les grossesses précoces protègent contre la carcinogenèse. C'est sans doute parce ce que les brusques variations des concentrations hormonales en fin de grossesse causent la disparition d'une grande proportion de cellules souches mammaires, notamment parmi celles étant initiées vers une transformation néoplasique (Rochefort., 2008).

L'allaitement au sein protège la mère du risque de cancer du sein. Cet effet protecteur augmente avec la durée de l'allaitement (environ 5% de diminution du risque par mois d'allaitement par rapport aux femmes qui n'allaitent pas). Il serait en grande partie responsable de la plus faible incidence des cancers du sein dans les pays en voie de développement. Cette protection s'explique à la fois par la diminution du nombre de cycles ovariens et par l'élimination de cellules souches mutées durant et à la fin de la période de lactation (IARC., 2007).

2.5. Facteurs métaboliques

L'obésité, l'inactivité physique, l'alcool et le tabagisme sont des facteurs qui participeraient au développement d'un cancer du sein (IARC., 2007). L'ensemble de ces facteurs de risque, intégrés aux facteurs familiaux (gènes de susceptibilité), devrait permettre d'améliorer les indices permettant la quantification du risque individuel de cancer du sein.

3. Les différents types de tumeurs mammaires et leur classification

Le type histologique (tissulaire) de cancer du sein est l'un des facteurs importants pour déterminer le pronostic de la maladie. Les tumeurs mammaires sont soit lobulaires ou canalaires selon qu'elles se développent au niveau des lobules ou des canaux de la glande mammaire. Les cancers du sein peuvent être classés dans l'une des 2 catégories suivantes: les carcinomes *in situ* et les carcinomes infiltrants.

3.1. Les cancers du sein *in-situ*

15%-20% des cancers du sein sont des cancers très précoces. Ils sont parfois appelés carcinome *in-situ*. Il existe 2 types de carcinome du sein *in-situ*. Le premier type est le carcicome canalaire *in-situ* (« duct ou intraductal carcinoma ») ; le second type est le carcinome lobulaire (« lobular carcinoma ») *in-situ* (Figure 4).

Le carcinome canalaire *in-situ* est une forme pré-invasive de cancer du sein. Il s'agit d'un cancer qui est confiné aux cellules de l'épithélium de la lumière des canaux. Il a un excellent pronostic et représente environ 2% des cancers.

Le carcinome lobulaire *in-situ* se définit comme un carcinome intéressant les acini des lobules sans envahissement du tissu conjonctif voisin. Les acini renferment une prolifération épithéliale faite de petites cellules monomorphes. Il représente environ 2,5% des cancers et se caractérise par son caractère multicentrique et sa tendance à la bilatéralisation.

3.2. Les carcinomes infiltrants

Soixante quinze pourcent des carcinomes infiltrants sont canalaires. Ils peuvent présenter trois types d'architectures : bien différenciée avec des structures tubulaires prédominantes, moyennement différenciée et indifférenciée avec une absence de structures glandulaires. Le stroma, d'abondance variable est fibreux et peut être le siège de remaniement (infiltrat inflammatoire, microcalcifications…) (Figure 5).

Le carcinome lobulaire infiltrant représente 4 à 11% des cancers infiltrants. Macroscopiquement, la tumeur est mal limitée. La forme typique est constituée de cellules rondes isolées, ayant un cytoplasme peu abondant et creusé d'une vacuole rejetant le noyau en périphérie. Certaines formes plus atypiques, réalisent des cordons, des alvéoles ou même des tubes. Ces derniers auraient un pronostic plus défavorable que la forme typique.

Le carcinome mucineux représente 1% des carcinomes mammaires infiltrants et survient le plus souvent chez la femme âgée. Il s'agit d'un carcinome riche en mucus extracellulaire. Histologiquement, cette tumeur est constituée de nappes de mucus ponctuées de petits îlots épithéliomateux avec ou sans différenciation glandulaire.

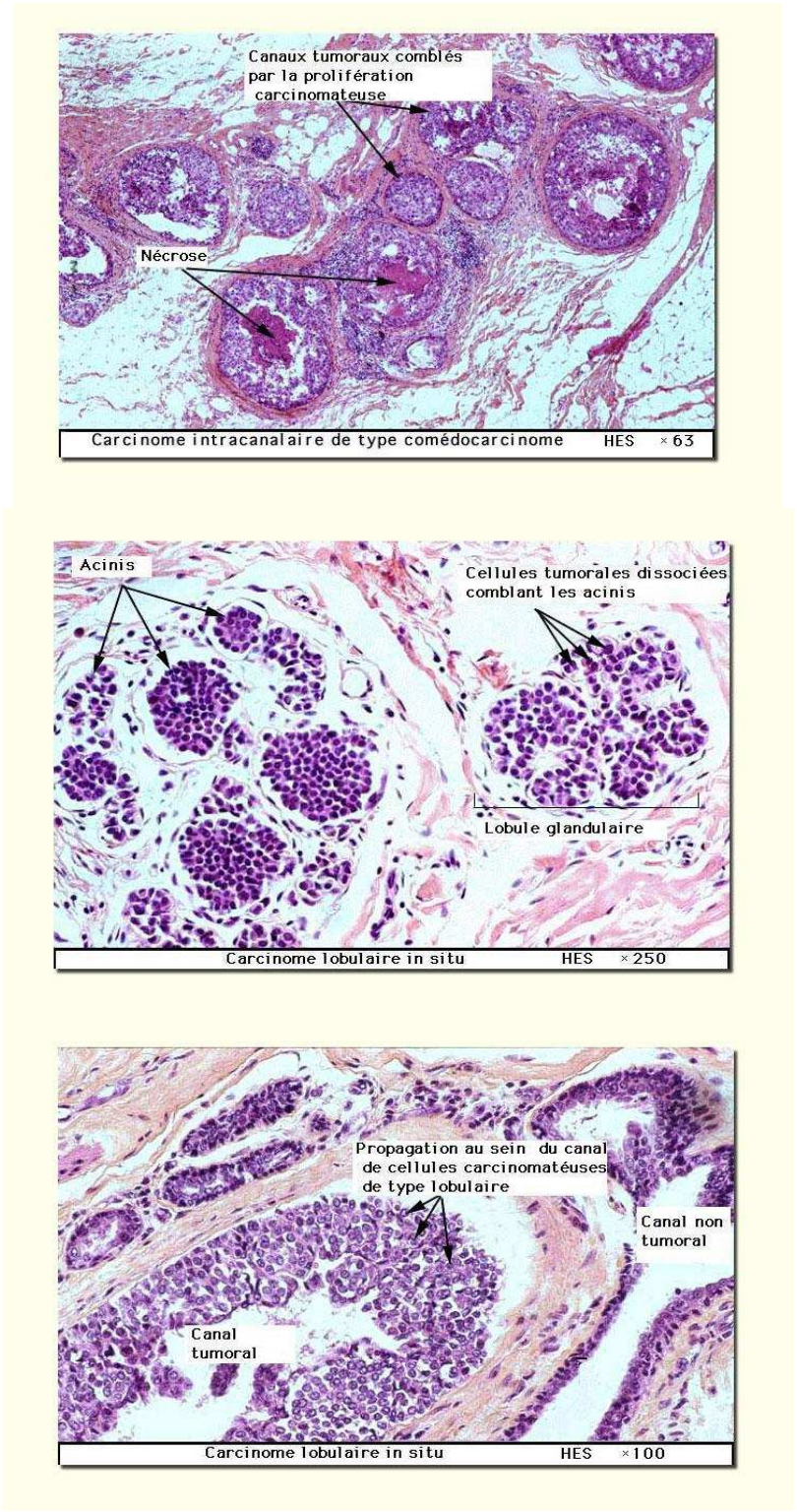
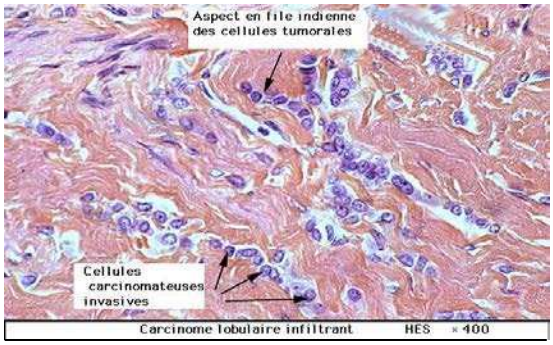
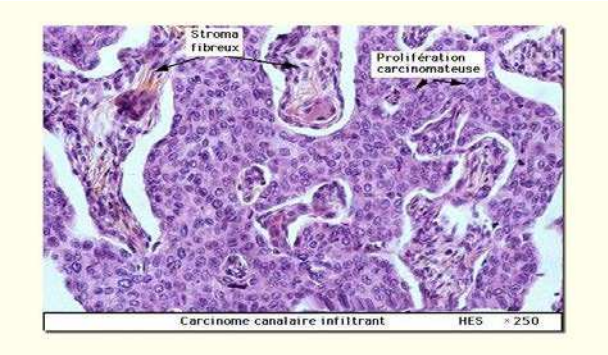
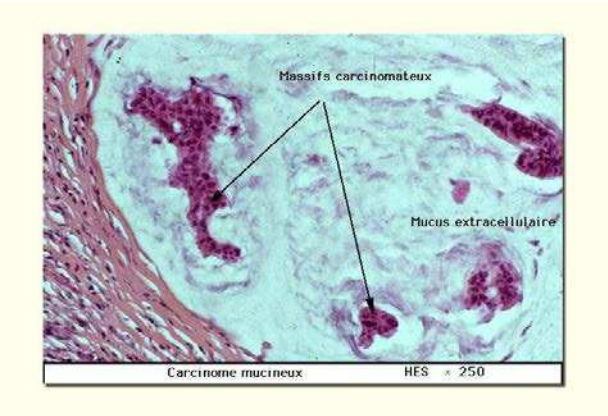


Figure 4 : Représentations histologiques des carcinomes mammaires *in situ*

(Modifié d'après le site internet : http://www.cancersein.fr/front/new_index).







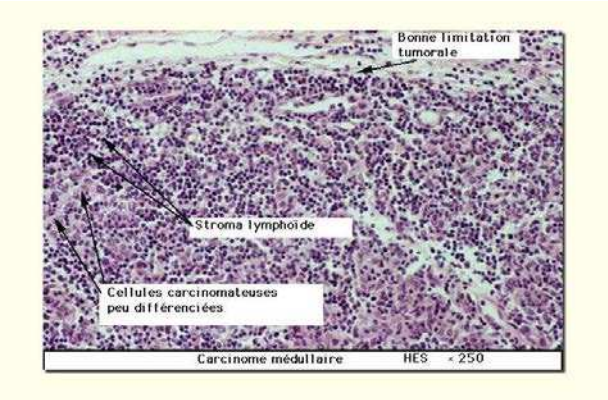


Figure 5 : Représentations histologiques des carcinomes mammaires infiltrants

(Modifié d'après le site internet : http://www.cancersein.fr/front/new_index).

Le carcinome médullaire est un carcinome bien limité, constitué de nappes de cellules peu différenciées dans un stroma peu abondant, lymphoïde. Cette tumeur maligne est associée à un bon pronostic.

Certains critères permettent de déterminer le grade des tumeurs provenant de carcinomes infiltrants : l'envahissement ganglionnaire, la taille de la tumeur primitive, la présence de récepteurs hormonaux, le caractère Erb-2 ou HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*), le grade SBR (Scarff Bloom et Richardson). L'ensemble de ces critères représentent des facteurs pronostiques anatomopathologiques.

Le grade histopronostique de Scarff Bloom et Richardson (SBR) comprend trois grades I, II, III, obtenu par l'addition de trois critères cotés en 1, 2 et 3 :

-architecture,

-atypies cytonucléaires,

-nombre de mitoses.

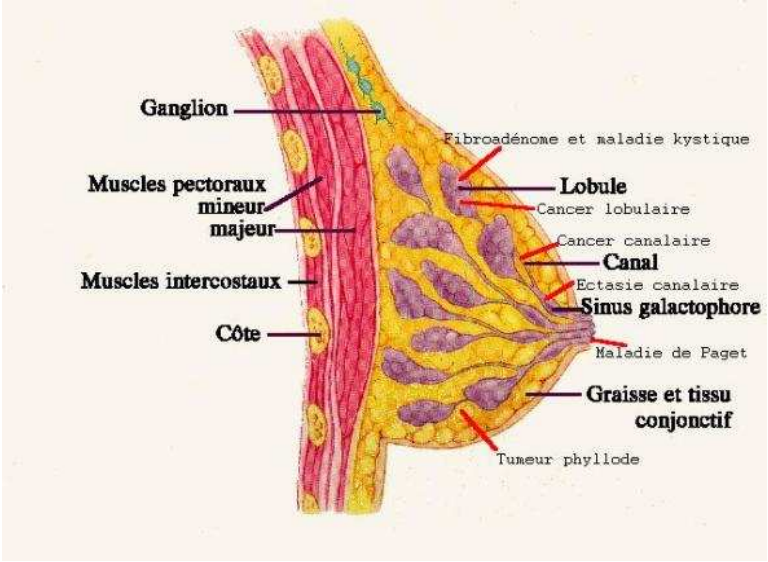
Le premier critère est l'architecture : si la tumeur ne comprend que des tubes, le critère est coté en 1. Le critère est coté en 2 si la tumeur est partiellement tubulaire et en 3 si la tumeur ne comprend aucun tube.

Le deuxième critère correspond aux atypies cytonucléaires. Il est coté en 1 si des noyaux réguliers monomorphes sont présents, en 2, si les atypies sont modérées et en 3 si des noyaux pléomorphes avec atypies marquées sont présents.

Le troisième critère se définit par le nombre de mitose recherché sur 20 champs en périphérie de la tumeur. Si le nombre est de 1 ou de 0, le critère est coté en 1. Si le nombre est de 2, le critère est coté en 2. Enfin, si le nombre est de 3 ou plus, le critère est coté en 3.

L'addition des trois critères permet de réaliser le grade : Grade I : 3, 4, 5 ; Grade II : 6, 7 et Grade III : 8, 9. Le grade SBR est réalisé sur tous les types histologiques de cancer infiltrant sauf le carcinome médullaire.

A



B

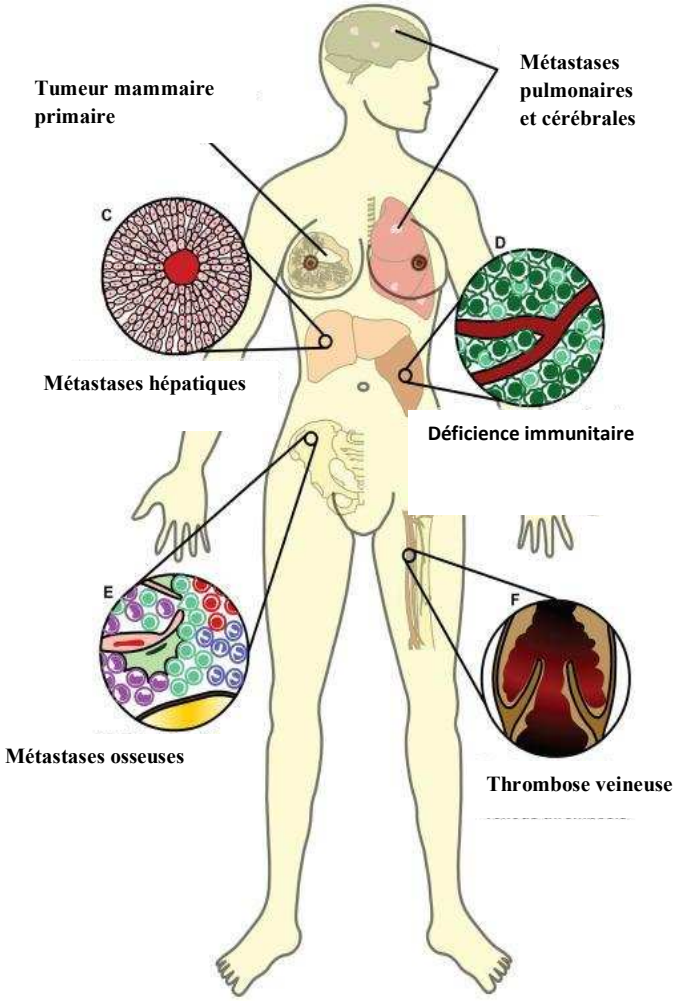


Figure 6 : Anatomie du sein et localisation des métastases

A- Coupe sagittale de sein : localisation anatomique de certains carcinomes

B- Localisation des organes cibles des métastases du cancer du sein (Figure modifiée d'après la revue de Egeblad *et al*., 2010).

4. Les autres tumeurs malignes du sein

Les tumeurs malignes en dehors des carcinomes primitifs du sein sont rares. Elles représentent moins de 1% de toutes les tumeurs malignes du sein et constituent un groupe de lésions disparates comportant les sarcomes phyllodes, les sarcomes mésenchymateux ou sarcomes du stroma, les angiosarcomes, les lymphomes malins non Hodgkiniens primitifs du sein.

5. Les métastases

Les métastases d'origine mammaire surviennent généralement à un stade tardif de l'évolution de la maladie. Les métastases les plus souvent rencontrées sont localisées dans les poumons, les os, le cerveau, le tractus digestif et l'appareil uro-génital (Figure 6). Ces métastases se présentent sous la forme de nodule bien délimité simulant une tumeur bénigne.

6. Les marqueurs biologiques du cancer du sein

Parmi les marqueurs biologiques, l'utilisation des facteurs pronostiques et prédictifs est nécessaire et fondamentale pour la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer du sein. En effet, de l'hétérogénéité des cancers du sein résulte des schémas thérapeutiques différents. La caractérisation des tumeurs permet d'adapter le traitement de manière à obtenir un pronostic optimal et d'éviter ainsi un traitement inutile. Cependant, malgré des avancées considérables dans la connaissance de la biologie des cancers, il n'existe pas à ce jour de facteurs permettant de prédire de façon systématique le risque de rechute et/ou de métastases. En effet, de nouvelles classifications moléculaires et signatures géniques ouvriraient un nouvel horizon pour la discrimination de certaines populations de patientes. Mis à part le statut ganglionnaire, la taille tumorale, le grade histologique, la présence d'emboles vasculaires et l'âge, les facteurs pronostiques actuellement validés sont les récepteurs hormonaux, exprimés ou non et la surexpression du gène *c-erbB2.*

Les méta-analyses du groupe d'Oxford (EBCTCG., 2005) ont permis de bien évaluer l'apport global de la chimiothérapie, en fonction de l'expression des récepteurs hormonaux (récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone). En effet, la présence des récepteurs aux œstrogènes (ER) dans la tumeur dite luminale, est le reflet d'une bonne différenciation tumorale et constitue un facteur prédictif de la réponse à l'hormonothérapie (Mauriac *et al.,* 1986). Les récepteurs nucléaires aux œstrogènes existent sous deux formes, ERα et ERβ. Cependant, la signification biologique d'ERβ n'est pas encore clairement définie (Speirs et Kerin., 2000 ; Powell *et al*., 2012). Les récepteurs de la progestérone, qui existent sous deux isoformes (PRA et PRB), sont sous le contrôle des œstrogènes et reflètent ainsi la fonctionnalité des récepteurs aux œstrogènes (Giangrande *et al*., 1997 ; Le Romencier *et al*., 2011). L'expression des récepteurs aux œstrogènes permet de proposer une stratégie thérapeutique basée sur l'hormonothérapie, qui consiste à utiliser un médicament inhibant soit la biosynthèse endogène d'œstrogènes, correspondant à la catégorie médicamenteuse des anti-aromatases, soit les récepteurs aux hormones, comme le tamoxifène. La présence dans le tissu tumoral de l'un des deux récepteurs (ER ou PR) est nécessaire pour définir l'hormonosensibilité. En l'absence de récepteurs hormonaux, il n'y a pas d'indication à un traitement hormonal. Le dosage des récepteurs aux hormones (à l'œstradiol et à la progestérone) se fait actuellement par immuno-histochimie en anatomopathologie sur des coupes de tumeur.

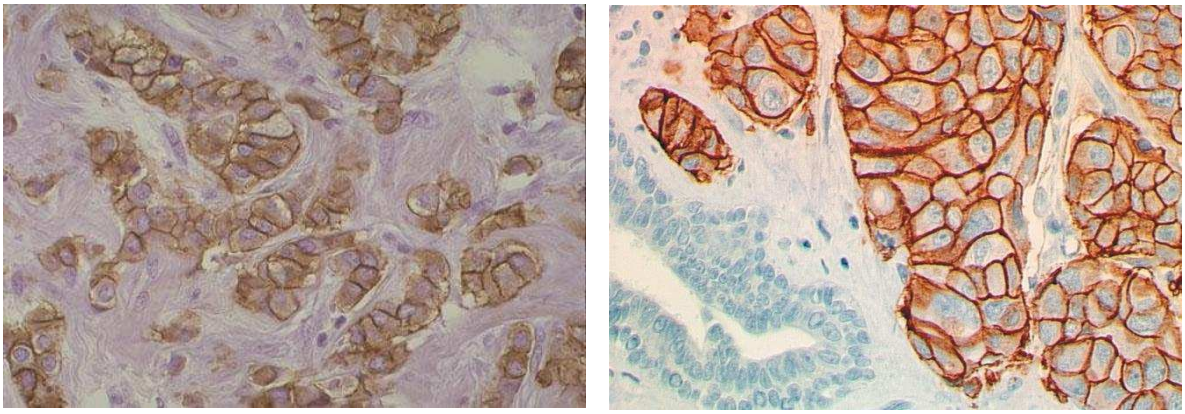


Figure 7 : Mise en évidence par immunohistochimie de la protéine HER2. Seules les cellules néoplasiques qui surexpriment le gène *c-ErB2* (HER2 positives) au sein de la tumeur sont révélées par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps spécifique mettant en évidence la protéine HER2 au niveau de leur membrane plasmique.

Les études de profil d'expression génique dans les tumeurs mammaires ont permis de mettre en évidence une amplification du gène *c-erbB2* ou *HER2*/*NEU*, un des membres de la famille des gènes *HER* (*Human Epidermal growth factor Receptor*). *HER2* est un proto-oncogène qui code une glycoprotéine à activité tyrosine kinase. L'amplification du gène joue un rôle important dans la pathogénie du cancer du sein (Esteva et Lorenzo., 1998). Sa valeur pronostique a été clairement démontrée pour la 1ère fois en 1987 (Slamon *et al*., 1987). En effet, cette amplification génique conduit à la surexpression de la protéine ErbB2, dès les premiers stades de la carcinogenèse mammaire. Celle-ci est surexprimée dans 20 à 30% des carcinomes infiltrant (Yamauchi *et al*., 2001 ; Jeyakumar *et al*., 2012) et est synonyme de mauvais pronostic pour la patiente. Ces tumeurs présentent des caractéristiques agressives avec une survie sans récidive diminuée pour la patiente ainsi qu'un risque accru de métastases cérébrales (Figure 7).

La protéine nucléaire Ki-67 est utilisée comme facteur pronostique et d'aide à la décision pour une thérapie néo-adjuvante (Penault *et al*., 2009). Cette protéine est exclusivement exprimée dans les cellules en prolifération, au cours des phases G1, S, G2 et M du cycle cellulaire. Elle est absente en phase G0. De nombreuses études ont été réalisées dans des tumeurs mammaires, la révélant ainsi comme un excellent marqueur proliferatif des cellules tumorales mammaires (Nicolini *et al*., 2006). Des études rétrospectives d'essais cliniques révèlent que Ki-67 pourrait être un facteur prédictif de l'efficacité d'une chimiothérapie à base de taxanes (Viale *et al*., 2008).

D'autres marqueurs sont actuellement à l'étude. Parmi eux, le récepteur du facteur de croissance IGF-1 ou IGF-R1 (Insulin-like Growth Factor-1 Receptor) apparait important. L'activité de ce récepteur est essentiellement régulée par la disponibilité de ces ligands (insuline et IGF-1), présents dans la circulation ou sécrétés de façon autocrine ou paracrine au niveau tissulaire. La liaison du ligand sur le récepteur, va conduire à son activation par autophosphorylation (voir paragraphe 8.2.1.3). L'activité biologique est *in fine* en faveur d'une promotion de la prolifération et de la survie cellulaire. Des observations conduisent à l'hypothèse selon laquelle le risque de cancer du sein est augmenté chez les femmes ayant des taux plasmatiques élevés d'insuline, et/ou une augmentation des taux d'IGF-1 (Ellis *et al.*, 1998 ; Kaaks *et al*., 2003 ; Key *et al*., 2010). Plusieurs études de phases 1 concernant l'utilisation d'anticorps anti-IGFR1 ont été initiées (Sachdev *et al*., 2006 ; Zhao *et al*., 2011). De même, le récepteur c-MET du facteur de croissance HGF pour « Hepatocyte Growth Factor » a une expression aberrante dans de nombreux types tumoraux, qui est associée à un

phénotype agressif et à un mauvais pronostic (d'après le livre GSK « résistance aux thérapies ciblées anticancéreuses »).

Les activateurs et les inhibiteurs du plasminogène semblent être des candidats intéressants. Le système urokinase-type plasminogen activator (uPA) consiste en une sérine protéase, un récepteur uPAR et deux inhibiteurs PAI 1 et PAI 2 (Plasminogen Activator Inhibitor 1 et 2). Ce système joue un rôle dans l'invasion et le processus métastatique en participant à la dégradation de la matrice extracellulaire. L'équipe de Duffy, a été la première à montrer que, parmi les patientes atteintes d'un cancer du sein, celles présentant des niveaux élevés de uPA ont un taux de survie plus faible (Weigelt *et al*., 2005).

Le vascular endothelial growth factor (VEGF) est le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire. C'est une protéine dont le rôle est de déclencher la formation de néovaisseaux (angiogenèse). Cinq molécules différentes ont été identifiées, VEGF-A à VEGF-E. Les VEGFs sont intéressants car ils jouent un rôle dans la croissance tumorale et le développement des métastases en favorisant la néoangiogenèse. Ils se lient à divers récepteurs appelés VEGFR 1, 2, etc…, présents à la surface des cellules endothéliales et déclenchent la prolifération de ces cellules. De nombreuses études ont montré que les cellules tumorales mammaires exprimant le VEGFR présentent un facteur pronostique défavorable (Ellis *et al*., 2001 ; Ferrara *et al*., 2009).

Le gène codant pour la topo-isomérase IIα (enzyme clé dans la réplication de l'ADN), plus récemment étudié dans le cancer du sein, est associé au gène *HER2/NEU* par sa localisation sur le bras long du chromosome 17 (17q12-21), ce qui engendre une co-amplification des deux gènes dans une proportion non négligeable de tumeurs. Les données actuelles indiquent que la topo-isomérase IIα pourrait être un facteur prédictif de la réponse aux anthracyclines. Les tumeurs qui présentent une co-amplification de HER2 et de la topo-isomérase IIα répondraient mieux aux anthracyclines que les tumeurs HER2-positives uniquement (Di Léo *et al.*, 2008). D'autres études sont cependant encore nécessaires pour comprendre les mécanismes de régulation de l'expression de la topo-isomérase IIα et définir si c'est le statut de son gène ou de la protéine, voire des deux, qui est potentiellement le plus prédictif de la réponse aux anthracyclines.

7. Stratégies thérapeutiques

Il existe différents types de traitements qui peuvent être réalisés seuls ou en association.

7.1. Chirurgie

Il en existe 2 types: la chirurgie conservatrice (tumorectomie) et la chirurgie non conservatrice (mastectomie). La tumorectomie consiste à retirer la tumeur et une petite quantité des tissus qui l'entourent de façon à conserver la plus grande partie du sein (Houssami *et al.*, 2006). La mastectomie consiste à retirer la totalité du sein. En cas de tumeur infiltrante, il est également nécessaire de retirer un ou plusieurs ganglions lymphatiques axillaires.

7.2. Radiothérapie

La radiothérapie utilise des rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses en bloquant leur capacité à se multiplier. La radiothérapie cible uniquement les parties du corps où les cellules cancéreuses sont susceptibles de se développer : c'est un traitement locorégional des cancers. L'irradiation a pour but de détruire les cellules cancéreuses tout en préservant le mieux possible les tissus sains et les organes avoisinants. On distingue la radiothérapie externe et la curiethérapie. Le cancer du sein est le plus souvent traité par radiothérapie externe. Les rayons sont émis en faisceau par un appareil, un accélérateur linéaire de particules, situé à proximité de la patiente ; ils traversent la peau pour atteindre la zone à traiter. La curiethérapie peut aussi être utilisée pour traiter le cancer du sein. Une substance radioactive (ou radio-isotope) est insérée dans la région du sein où la tumeur a été retirée à l'aide de petits tubes creux (cathéters). Ces radio-isotopes délivrent un rayonnement de faible énergie, limité à la zone traitée. Ces tubes sont retirés lorsque la curiethérapie est terminée. De nouvelles techniques de radiothérapie sont en plein développement, comme la radiothérapie pendant la chirurgie (per-opératoire) et de nouvelles modalités d'irradiation partielle (Brennan *et al.*, 2005 ; Versmessen *et al.*, 2012).

7.3. Chimiothérapie

Il s'agit d'un traitement utilisé pour les formes métastatiques pour lesquelles la chimiosensibilité est largement démontrée, et en traitement adjuvant pour les formes non métastatiques. De nombreux médicaments existent et sont prescrits seuls ou en association. Ils peuvent être classés en 4 familles selon leur mode d'action : les anti-mitotiques qui bloquent les cellules en métaphase aboutissant ainsi à l'apoptose (Taxane) ; les agents alkylants qui sont des molécules de synthèse qui inhibent la progression de l'ADN polymérase au cours de la réplication de l'ADN (Cisplatine) ; les antimétabolites qui perturbent la synthèse de l'ADN en bloquant les enzymes nécessaires à la synthèse des nucléotides (6-mercaptopurine, Methotrexate) et enfin les inhibiteurs de la topoisomérase II qui inhibent la religation des 2 brins d'ADN après le relâchement des contraintes de torsion nécessaires au processus de réplication (Etoposide). La durée optimale de la chimiothérapie est en général de quatre ou six cures. Le taux de réponse est relativement élevé puisqu'il est de 70 à 90% quelque soit l'agent choisi (Brain *et al.*, 1999).

7.4. Hormonothérapie

Ce traitement est efficace uniquement sur les tumeurs hormono-sensibles, c'est-à-dire celles dont les cellules tumorales expriment les récepteurs hormonaux, notamment celui des œstrogènes (ER) et de la progestérone (PR). Les patientes présentant des tumeurs ER+/PR+ seraient 80% à répondre à l'hormonothérapie alors que le taux de réponse n'est que de 30% pour les tumeurs ER+/PR- et de 45% pour les tumeurs ER- /PR+ (Wittliff *et al.*, 1984). Deux types d'hormonothérapie sont utilisés pour traiter les femmes atteintes d'un cancer du sein : les traitements médicamenteux tels que le tamoxifène, un antagoniste de ERα et les anti-aromatases (stéroidiens : Aromasine ou non stéroidiens : Arimidex), qui inhibent la synthèse des œstrogènes. Le tamoxifène et les anti-aromatases peuvent être utilisés dans les cancers du sein métastatiques. Ces médicaments, très efficaces, peuvent durablement prolonger la durée de vie chez certaines femmes.

7.5. Thérapies ciblées

On appelle thérapies ciblés des médicaments qui agissent spécifiquement sur des mécanismes favorisant le développement de la tumeur.

7.5.1. Le trastuzumab

Connu aussi sous son nom commercial Herceptin®, le trastuzumab fait partie de la famille des anticorps monoclonaux. Il a été spécialement conçu pour reconnaître une région extracellulaire de la protéine HER2, et empêcher ainsi sa dimérisation avec le récepteur de l'EGF ou HER1. Les cellules cancéreuses deviennent insensibles à l'EGF, entraînant une diminution importante de leur prolifération. Le trastuzumab est par ailleurs capable de stimuler le système immunitaire contre les cellules cancéreuses. Cette thérapie ciblée est actuellement utilisée en association avec une chimiothérapie à base d'un taxane dans le traitement des cancers du sein métastatiques.

7.5.2. Le bévacizumab

Commercialisé sous le nom d'Avastin®, le bévacizumab fait partie de la famille des anticorps monoclonaux. Il a été conçu pour reconnaître et neutraliser le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), une protéine qui circule dans le sang et qui agit sur la croissance des vaisseaux sanguins. La diminution de la néoangiogenèse tumorale entraîne le ralentissement de la croissance des tumeurs.

7.5.3. Le lapatinib

Commercialisé sous le nom de Tyverb®, le lapatinib appartient à un groupe de médicaments, qui sont des inhibiteurs de protéine kinase. Le lapatinib est un inhibiteur de la tyrosine kinase située dans le domaine cytoplasmique du co-récepteur de l'EGF, HER2, qui est surexprimé dans 20 à 30% des tumeurs mammaires. Son action inhibitrice entraîne l'absence de signalisation depuis la tyrosine kinase de HER2 et contribue ainsi à contrôler la division des cellules cancéreuses et donc le développement des tumeurs.

8. La tumorigenèse mammaire

8.1. Altérations génétiques et carcinogenèse

La carcinogenèse correspond à un ensemble d'étapes successives, conduisant à la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse. Elle résulte de l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques, allant de mutations somatiques à des délétions, voire des cassures, des translocations, des duplications ou des pertes (aneuploidie) chromosomiques, ou encore des amplifications et réarrangements géniques. Ces altérations génétiques sont difficilement réparées, car les systèmes de réparations (par excision de nucléotides ou NER, de bases ou BER, des cassures simple ou double brin) sont déficients (Karihtala *et al.*, 2006 ; Agnoletto *et al*., 2007). Ces changements touchent non seulement les cellules malignes mais peuvent également atteindre les cellules qui interagissent avec la tumeur telles que les cellules immunitaires, vasculaires et stromales (Osborne *et al.*, 2004 ; Hanahan *et al*., 2011). La plupart des modifications génétiques sont acquises, dans le cas de cancers du sein sporadiques. Dans seulement 10% des cas, ces altérations génétiques sont héritées et prédisposent les individus à développer ce type de cancer. En effet, dans les formes familiales, la cancérogenèse est associée à une perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeurs tels que *BRCA1* et *BRCA2*. Dans tous les cas, ces évènements aboutissent à une instabilité génomique permettant aux cellules d'acquérir un certain nombre de caractéristiques: autonomie vis-à-vis des signaux de croissance cellulaire, perte de la sensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance cellulaire (activation d'oncogènes et inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs), résistance à la mort cellulaire programmée (apoptose), potentiel de réplication illimité, capacité d'invasion tissulaire (potentiel métastatique) et capacité à activer une néoangiogenèse (Hanahan *et al.*, 2000 ; Hanahan *et al*., 2011).

De très nombreuses données tendent à prouver l'existence d'une hiérarchie cellulaire dans les tumeurs solides, dirigée par des cellules cancéreuses ayant des propriétés de cellules souches : les cellules souches cancéreuses (CSC). Les cellules souches normales (CSN) épithéliales organisent le fonctionnement de la glande mammaire grâce à des propriétés intrinsèques spécifiques. Ces propriétés associent une longue durée de vie, une capacité à s'auto-renouveler et à produire des cellules filles capables de se différencier. La capacité d'auto-renouvellement permet de préserver et de réguler le *pool* de CSN dans la glande

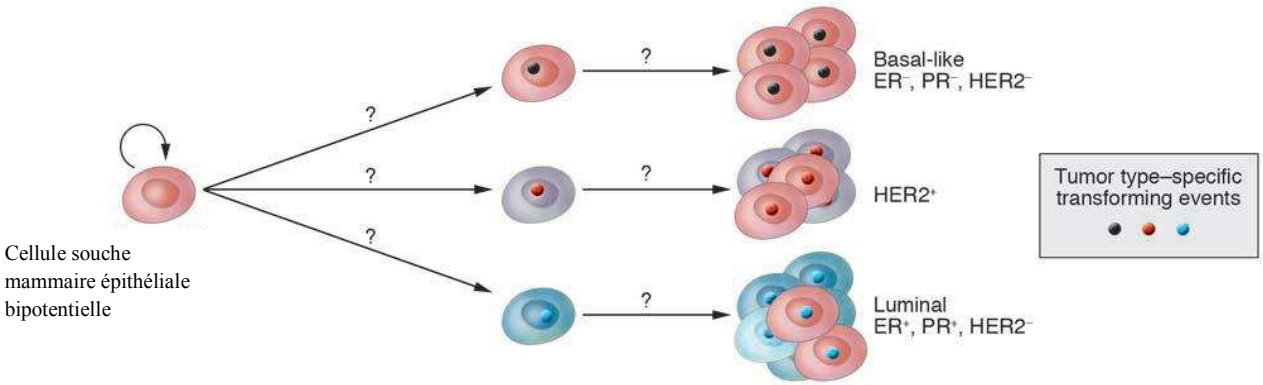


Figure 8 : Modèle hypothétique expliquant les différents sous-types des tumeurs mammaires. Les différents sous types des tumeurs mammaires seraient la conséquence d'évènements génétiques et épigénétiques touchant une cellule souche de l'épithélium (Polyak., 2007).

mammaire. Dans les tumeurs mammaires, les CSC, caractérisées par l'expression de marqueurs protéiques à leur surface $CD44^+$ et $CD24^-$, proviendraient directement des cellules souches normales adultes de l'épithélium mammaire, qui seraient seules le siège des altérations génétiques à l'origine de leur transformation, de leur expansion et de leur sélection (Ginestier *et al*., 2007 ; Easwaran *et al*., 2012 ; Narod., 2012). Ces altérations seraient à l'origine des différents sous-types de tumeurs mammaires (Figure 8). Le sous type luminal est le plus important (67%) ; il représente le sous-type aux récepteurs hormonaux positifs qui exprime les cytokératines CK8/18. Dans 13% des cas, ces tumeurs sont associées à une mutation de *TP53*. Le sous-type *basal-like* correspond quant à lui à des tumeurs n'exprimant ni les récepteurs hormonaux ni HER2, mais ont une forte expression des CK5/7 et 17 et des gènes de prolifération. Dans 82% des cas, la TP53 est mutée. C'est dans ce groupe, que se retrouve très souvent la mutation BRCA1. Le dernier sous groupe, est celui du sous-type HER2+. Les cellules de ces tumeurs, expriment HER-2 et présentent un taux de mutation de *TP53* de l'ordre de 71% (Perou *et al*., 2000 ; Sorlie *et al*., 2001 ; Jeyakumar *et al*., 2012).

Enfin, les données épidémiologiques (voir paragraphe II-1) montrent qu'une grossesse précoce diminue considérablement le risque de cancer du sein et ce, parce qu'elle entraîne une différenciation terminale des cellules épithéliales mammaires (Polyak *et al.*, 2001 ; Schnabel *et al*., 2012).

Dans la carcinogenèse, se dissocient classiquement 3 grandes étapes. La 1ère, est l'initiation qui correspond à la première mutation d'une cellule normale qui devient alors irréversiblement altérée. Il s'agit d'une altération génétique des cellules qui pourront alors proliférer de façon anarchique pour former une excroissance tissulaire appelée hyperplasie. Cette hyper-prolifération se poursuivra ensuite lors de l'étape de promotion, aboutissant à l'apparition d'un carcinome *in-situ*. Lors de cette phase, les cellules acquièrent d'autres altérations génétiques, leur conférant ainsi de nouvelles propriétés biologiques telles qu'une indépendance vis-à-vis des facteurs biologiques, une résistance à l'apoptose ou encore une perte de la capacité de communication intercellulaire. Ces altérations génèrent de nouveaux phénotypes, stables et totalement indépendants des facteurs externes grâce notamment à l'activation d'oncogènes et/ou à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs : c'est la phase de dissémination (Trosko *et al.*, 2005). C'est lors de cette étape, que les cellules cancéreuses vont envahir le tissu conjonctif adjacent (Figure 9).

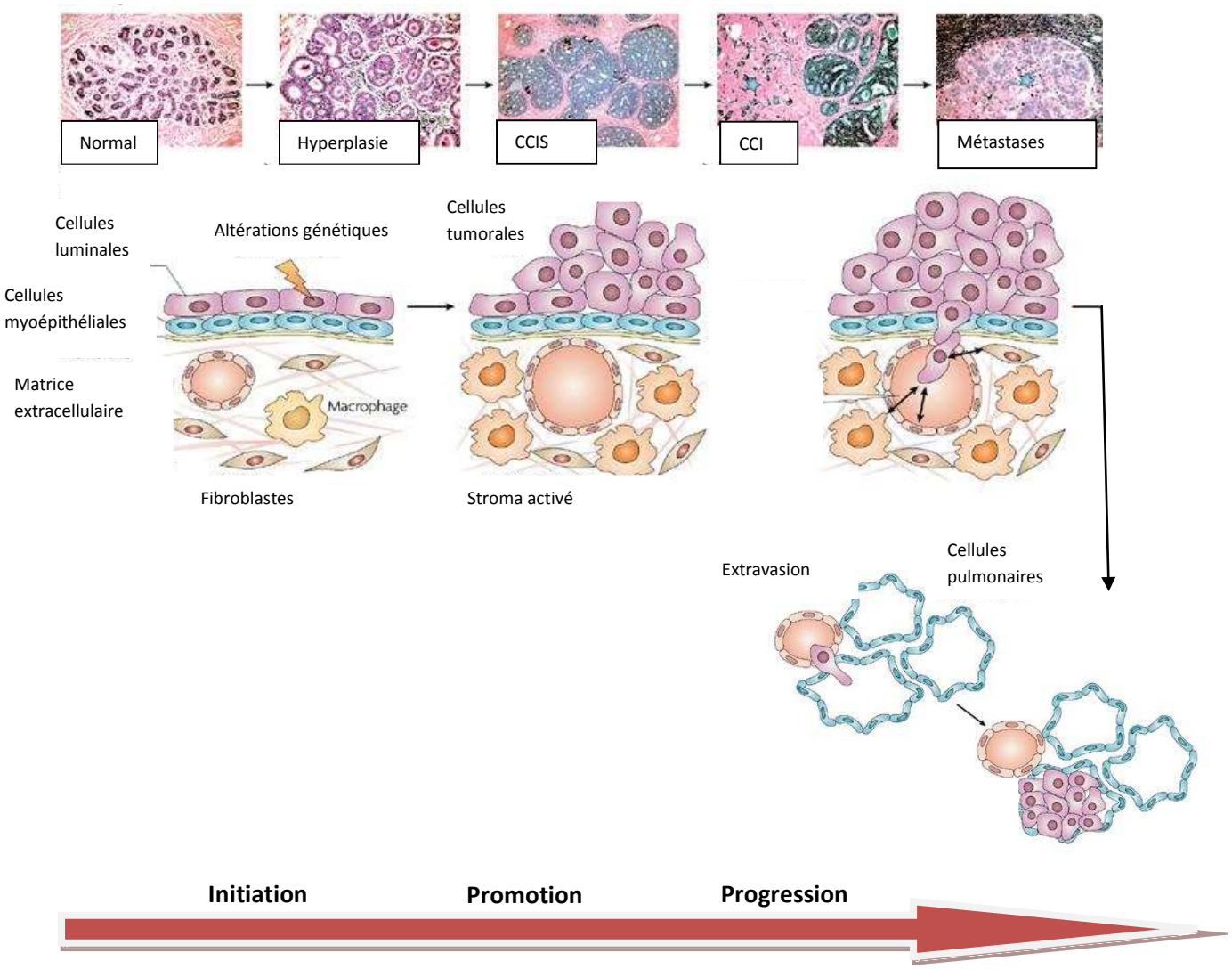


Figure 9 : Les différentes étapes de la cancérogenèse mammaire. Lors d'une altération génétique, les cellules de l'épithélium mammaire subissent au cours du temps une transformation, les rendant hyperplasiques, puis tumorales. Suite à une prolifération anarchique, ces cellules conduisent au développement d'un carcinome *in-situ*, limité à la lame basale. L'étape suivante correspond à la dissémination des cellules cancéreuses dans le tissu conjonctif adjacent pour former une tumeur maligne, suite à la rupture de la lame basale. Cette tumeur invasive, maligne pourra être à l'origine de métastases. Ces différentes étapes sont représentées à la fois par des coupes histologiques et des représentations schématiques. CCIS : carcinome canalaire *in-situ* ; CCI : carcinome canalaire infiltrant. (Figure modifiée d'après Vargo-Gogola et Rosen., 2007).

Les gènes suppresseurs de tumeurs et les oncogènes jouent un rôle prépondérant dans la carcinogenèse mammaire. Les gènes suppresseurs de tumeurs jouent un rôle fondamental dans l'inhibition de la prolifération cellulaire. Lorsqu'ils sont inactivés par une mutation, par exemple, ils n'exercent plus leur rôle de régulation négative. Les oncogènes sont des gènes qui, activés ou surexprimés, induisent des signaux de prolifération cellulaire. Les oncogènes agissent d'une façon dominante (une seule copie est nécessaire à leur activité) et affranchissent ainsi la cellule de contraintes qui régulent sa prolifération. Plus d'une centaine d'oncogènes ont été identifiés. Certains sont fréquemment retrouvés dans le cancer du sein. Parmi ceux-ci, se distingue l'oncogène *HER-2*. L'oncogène *HER-2*, connu également sous le nom de c-*erbB2*, code un récepteur à activité tyrosine kinase de la famille de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). Ce récepteur est dit orphelin car, à ce jour, son ligand n'est pas connu. Ce proto-oncogène peut être amplifié et surexprimé dans 20 à 30% des cancers du sein invasifs. Cette surexpression augmente ainsi la sensibilité à l'EGF des cellules épithéliales mammaires transformées, puisque la protéine HER2 s'hétérodimérise préférentiellement avec le récepteur de l'EGF ou HER1. Certaines altérations génétiques peuvent également concerner le récepteur HER1, notamment les mutations touchant le domaine de la tyrosine kinase de ce récepteur. Ce dernier présente alors une activité tyrosine kinase constitutive, qui s'accompagne d'une activation continue de nombreuses voies de signalisation conduisant à la prolifération et à la migration cellulaires, l'angiogenèse et la résistance à l'apoptose (Stern *et al*., 2000 ; Jeyakumar *et al*., 2012). L'oncogène *c-MYC* code pour une protéine nucléaire, qui sous forme phosphorylée, régule la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, en formant un dimère avec la protéine Max (Osborne *et al.*, 2004 ; Wazer *et al*., 1999). La protéine c-MYC est surexprimée dans 15 à 25% des tumeurs mammaires et plusieurs études l'associent à un mauvais pronostic dans les tumeurs de haut grade (Blancato *et al*., 2004 ; Liao et Dickson., 2000 ; Horiuchi *et al*., 2012).

Deux gènes suppresseurs de tumeurs majeurs interviennent dans la régulation du cycle cellulaire : la protéine du rétinoblastome (pRB) et le produit du gène *p53*.

La protéine RB codée par le gène *RB1*, intervient dans le contrôle du cycle cellulaire au niveau de la transition G1/S en fonction de son état de phosphorylation. La protéine RB empêche de façon active les cellules en phase G0 ou G1 du cycle cellulaire d'initier la phase S en étant complexée avec le facteur de transcription E2F1. Ce dernier est un facteur essentiel pour l'expression de nombreux gènes nécessaires pour la phase S, comme la cycline A ou la DHFR (Dihydrofolate Reductase). Au fur et à mesure que les cellules progressent vers la phase S, RB est phosphorylée par Cdk2 et Cdk4, ce qui entraîne sa dissociation de E2F1. Ce

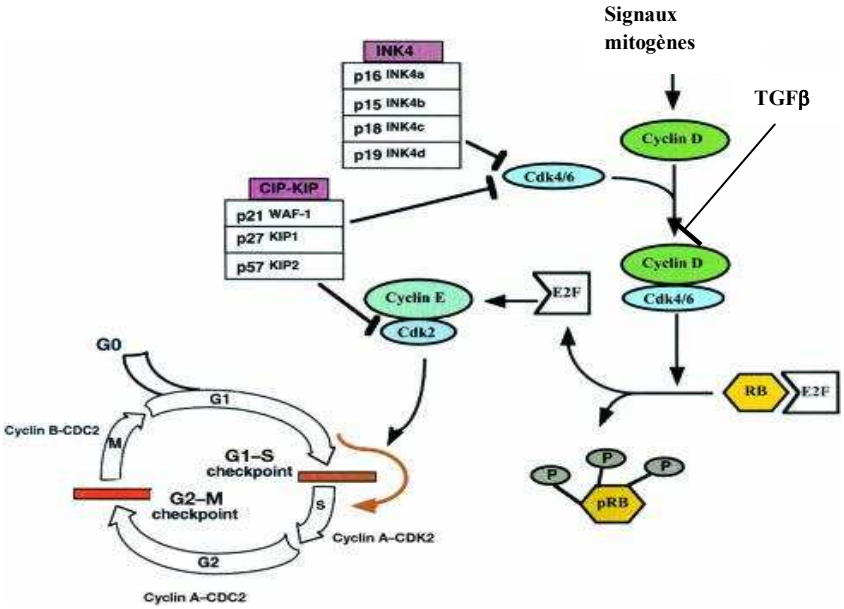


Figure 10 : Représentation schématique du cycle cellulaire. RB et pRB représentent les formes non phosphorylée et phosphorylée de la protéine du rétinoblastome. RB présente des résidus sérines ou thréonines qui sont phosphorylés par des kinases dépendantes de cyclines (Cdks). La protéine RB à l'état hypophosphorylé bloque le cycle cellulaire en phase G1 *via* la séquestration du facteur de transcription E2F. Sous l'influence de facteurs mitogènes, la protéine RB perd son état hypophosphorylé et le cycle cellulaire progresse. Le facteur de transcription E2F peut alors initier la transcription d'ARNm nécessaires à l'entrée en phase S du cycle cellulaire (d'après Dupont *et al*., 2001).

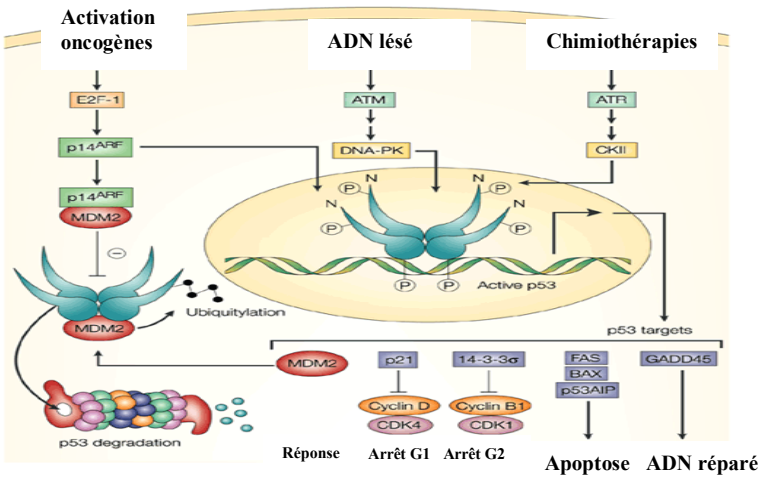


Figure 11 : Régulation de la protéine p53. Dans les cellules normales, la transcription de MDM2 (Murine Double Minute 2) par p53 conduit à la dégradation de cette dernière. Un stress cellulaire, comme une activation d'un oncogène, induit $p14^{ARF}$, qui séquestre MDM2. De plus des dommages dans l'ADN ou des agents de chimiothérapie activent des protéines kinases, telles que ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) ou ATR (Ataxia Telangiectasia Related), qui par l'intermédiaire de la DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase) et de la CKII (Casein Kinase II), phosphorylent p53. Ces phosphorylations permettent d'une part d'empêcher la liaison avec MDM2 et d'autre part sa fixation sur des séquences spécifiques à l'ADN. Ces évènements conduisent à une augmentation du niveau de p53 et à la transcription de ses gènes cibles (*p21, BAX*, …) (d'après Alex *et al*., 2001).

dernier ainsi libéré, peut initier la phase S grâce à son rôle dans la transcription des gènes nécessaires à la réalisation de cette phase. La phosphorylation de RB (ou pRB) suit l'apparition des complexes cycline/Cdk. Dans un premier temps, seule Cdk4 associée à la cycline D phosphoryle RB. Cette phosphorylation induit le changement de conformation de pRB et permet ainsi le recrutement du complexe cycline E/cdk2 qui phosphoryle une deuxième fois pRb sur des sites différents de ceux utilisés par Cdk4 (Figure 10). L'hypophosphorylation de pRb est notamment maintenue par le TGF-β (Tumor Growth Factor-β). Ceci explique qu'une perte de sensibilité au TGF-β suite à une mutation du gène codant son récepteur entraîne la phosphorylation de pRB, et donc la progression des cellules dans le cycle cellulaire. Dans le cancer du sein, l'absence d'expression de la protéine RB suite à une mutation non sens de son gène sur un allèle et une perte d'hétérozygotie sur l'autre allèle, sont observées dans 25 à 30% des cas (Bosco et Knudsen., 2007). De plus, des études récentes suggèrent que le statut de RB aurait un impact sur la résistance des cancers ER positifs au tamoxifène (Witkiewicz et Knudsen., 2011).

La protéine p53, appelée « gardienne du génome » intervient dans l'arrêt du cycle cellulaire entre la phase G1 et la phase S, et dans l'apoptose (Figure 11). La protéine p53 se fixe sur une séquence spécifique d'ADN aboutissant à la transcription de gènes régulant les points de contrôle des phases du cycle cellulaire et des gènes qui participent à la réparation de l'ADN. Par ces activités, p53 assure l'intégrité du génome en interdisant la réplication ou la ségrégation des chromosomes endommagés, et en induisant la réparation de l'ADN. Lors d'une agression cellulaire, la concentration et la demi-vie de p53 s'accroissent par une diminution de sa dégradation physiologique. Il a été montré expérimentalement qu'une simple lésion double brin suffisait à induire une augmentation du taux de p53. Lorsque des lésions sont trop importantes, p53 peut orienter la cellule vers l'apoptose, éliminant ainsi les cellules potentiellement malignes. En présence de p53 mutée, l'ADN n'est plus réparé, ce qui entraîne une instabilité génomique, associée à une accumulation de mutations qui provoquent une croissance incontrôlée (Wazer *et al*., 1999 ; Hanahan *et al*., 2011). La mutation du gène de la protéine p53 représente ainsi un des moyens de s'opposer à l'apoptose. P53, en tant que facteur de transcription, induit entre autre l'expression de la protéine pro-apoptotique BAX, tandis qu'elle réprime celle de Bcl2 (Basu *et al*., 1998 ; Zinkel *et al*., 2006). Le gène *TP53* est muté dans 25% des cancers mammaires (IARC TP53 Database., 2009) et certaines études montrent un lien entre le statut de p53 et la réponse aux traitements (Varna *et al*., 2011).

Les gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont également suppresseurs de tumeurs, dont les altérations prédisposent aux cancers du sein héréditaires (détaillé dans le paragraphe I).

Des altérations peuvent également toucher des gènes agissant sur le « remodelage » de la chromatine ou sur le degré de méthylation de l'ADN (altérations épigénétiques) ce qui a pour conséquence de provoquer des modifications de l'expression de gènes. C'est par exemple le cas du gène suppresseur de tumeur *PTEN* (Phosphatase and Tensin homolog), inactivé par hyperméthylation de ses séquences promotrices dans 40% des cancers du sein sporadiques (Khan *et al*., 2004 ; Hanahan *et al*., 2011).

8.2. Progression tumorale, invasion et métastases

Les cancers évoluent en deux phases: une phase locale caractérisée par la croissance tumorale et une phase générale se traduisant par une dissémination des cellules tumorales à distance de la tumeur initiale pour former des métastases. Cette phase de dissémination nécessite différentes étapes: la croissance de la tumeur, l'angiogenèse (néovascularisation) et la transition épithélio-mésenchymateuse caractérisée par une production accrue d'enzymes protéolytiques et l'acquisition de capacités migratrices et invasives (Heimann *et al*., 2000).

8.2.1. Les signaux de prolifération conduisant à la croissance tumorale

La croissance des tumeurs mammaires se fait essentiellement sous l'influence de signaux de prolifération d'origine endocrine (les œstrogènes et la progestérone), paracrine ou autocrine (facteurs de croissance : EGF (Epidermal Growth Factor), IGF (Insulin like Growth Factor) et HGF-SF (Hepatocyte Growth Factor-Scatter Factor)) (Stull *et al.*, 2004). Ces signaux sont souvent à l'origine de dérégulations du cycle cellulaire et peuvent également permettre aux cellules cancéreuses d'échapper à l'apoptose. En effet, des mutations du gène *P53*, l'expression de Bcl2 dépendante des œstrogènes, ou encore l'activation constitutive de la voie de survie déclenchée par les facteurs de croissance sont impliquées dans cet échappement à l'apoptose.

8.2.1.1. Les œstrogènes

Les hormones impliquées dans la prolifération tumorale mammaire sont essentiellement les œstrogènes. De nombreuses études, *in vitro* et *in vivo,* ont montré que les œstrogènes ont une activité mitogène sur les cellules cancéreuses mammaires (Platet *et al.*, 2004).

Ces hormones agissent par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires qui existent sous deux formes : ERα (Estrogen Receptor alpha) et ERβ (Estrogen Receptor beta). Le récepteur alpha des œstrogènes est présent dans 50 à 80% des tumeurs mammaires. Seul ERα serait clairement impliqué dans la prolifération cellulaire induite par les œstrogènes. ERβ exercerait quant à lui des effets anti-prolifératifs (DeNardo *et al*., 2005, Powell *et al*., 2012). Les tumeurs mammaires ER-positives sont caractérisées par une croissance rapide et sont souvent moins invasives que les tumeurs ER-négatives, ce qui explique que leur pronostic soit de ce fait généralement meilleur.

Il existe quatre voies distinctes impliquées dans la signalisation de ER : la voie génomique classique ou non classique, la voie alternative indépendante du ligand et la voie non génomique (Le Romancer *et al*., 2011).

La voie classique d'activation des ER passe par la liaison du ligand, l'œstradiol (E_2) sur le récepteur, ce qui entraîne un changement de conformation de celui-ci. En absence de ligand, le récepteur se présente sous forme monomérique, complexé avec des protéines chaperonnes HSP (Heat Shock Proteins), principalement HSP70 et HSP90. La fixation du ligand permet la libération des protéines chaperonnes, entraînant ainsi son homodimérisation, puis sa liaison à l'élément de réponse aux œstrogènes (ERE) sur l'ADN pour induire la transcription de certains gènes cibles comme :

- Celui codant le récepteur à la progestérone (PR).
- Ceux codant les facteurs de croissance impliqués dans la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose tels que l'EGF et l'IGF-1 (Surmacz et Bartucci., 2004).
- Ou encore celui codant le gène *Bcl-2*, dont la protéine est impliquée dans la résistance à l'apoptose (Mintz *et al*., 2008).

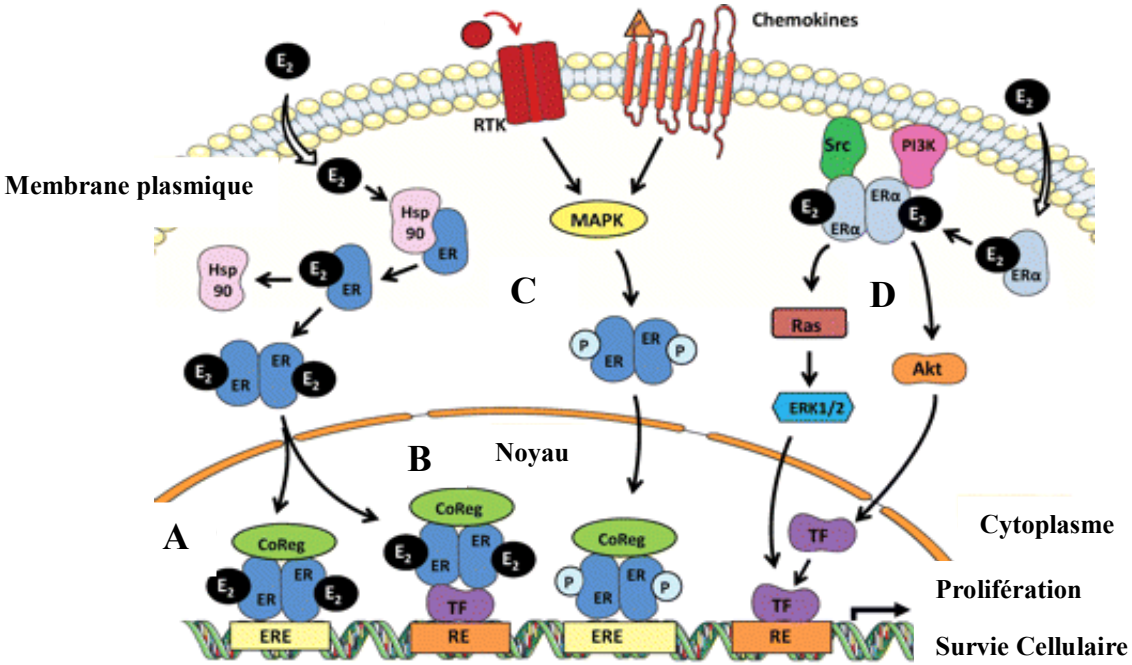


Figure 12 : Représentation schématique des 4 voies de signalisation déclenchées par les œstrogènes. La voie A correspond à la voie génomique classique. En liant l'œstradiol (E_2), ER s'homodimérise et est transloqué dans le noyau pour se fixer sur des éléments ERE en amont de ses gènes cibles, dont il active la transcription. La voie B correspond à la voie génomique non classique, qui implique des interactions entre l'homodimère ER ayant reconnu E_2 et des facteurs de transcription tels que AP-1. La voie C est indépendante de E_2 et implique une activation de ER par des phosphorylations induites par la voie dépendante des MAPK déclenchée par des facteurs de croissance. La voie D, non génomique, dépendante de E_2, implique l'interaction entre l'homodimère ER ayant reconnu son ligand et des protéines impliquées dans la transduction des signaux divers, telles que des kinases comme la PI3K (Phosphatidyl Inositol 3-Kinase) ou encore des protéines G comme Ras (Le Romancer *et al.*, 2011).

La voie d'activation non classique implique la fixation de l'œstradiol sur le récepteur, mais l'information est transmise par la transactivation du complexe AP-1 (Activator Protein-1). Ce facteur de transcription nucléaire est constitué d'un hétérodimère de protéines issues de la famille des proto-oncogènes *FOS* et *JUN*, qui se fixe sur un élément de réponse et active des gènes cibles impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaires (Denardo *et al*., 2005 ; Le Romancer *et al*., 2011).

L'activation de la transcription de gènes par le récepteur des œstrogènes peut également se produire en l'absence du ligand. Cette activation est produite principalement pardes facteurs de croissance tel que l'EGF (Epidermal Growth Factor). Ceux-ci phosphorylent le récepteur des œstrogènes par l'intermédiaire de voies communes telle que celle des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases). Cette voie permet à ces facteurs de croissance de conférer des propriétés de croissance aux cellules ER positives indépendamment des œstrogènes.

Les dimères ERα peuvent également être à l'origine d'une cascade d'activation de signaux de transduction et ceci, de part des interactions directes de ER avec certaines protéines dont la tyrosine kinase Src, la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), la sérine kinase Akt, ou encore la protéine Ras. Il s'agit de la voie d'activation non-génomique (Figure 12) (Le Romancer *et al*., 2011).

8.2.1.2. La progestérone

La progestérone est également impliquée entre autre dans la prolifération cellulaire, par l'intermédiaire de deux récepteurs nucléaires (PRA et PRB), dont les gènes correspondants sont les cibles des œstrogènes (McGowan *et al.*, 2004 ; Jacobsen *et al.*, 2002 ; Le Romancer *et al*., 2011).

8.2.1.3. Les facteurs de croissance

Plusieurs facteurs de croissance sont décrits pour leur rôle dans l'activation de la prolifération des cellules tumorales mammaires. Il s'agit des facteurs de croissance épidermiques (EGF), l'IGF-1 et l'HGF-SF, qui agissent par l'intermédiaire de récepteurs

membranaires pour déclencher plusieurs voies de signalisation dans les cellules tumorales mammaires qui les expriment.

Les facteurs de croissance épidermiques se fixent sur des récepteurs membranaires, codés par la famille des gènes *HER* (*Human Epidermal growth factor Receptor*). Cette famille comprend quatre récepteurs : HER1 (Erb-B1, EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor), HER2 (Erb-B2), HER3 (Erb-B3) et HER4 (Erb-B4) qui partagent une grande homologie de structure primaire. Excepté HER3, tous ces récepteurs possèdent une activité tyrosine kinase. L'activation de ces récepteurs nécessite leur dimérisation, consécutive à la fixation du ligand. La dimérisation entraîne l'activité tyrosine kinase, qui est essentielle à la régulation de la croissance, de la survie ou encore de la migration cellulaire. Il existe de nombreux ligands spécifiques des récepteurs HER, qui présentent tous un domaine EGF-like qui leur confère leur spécificité de liaison. Les ligands HER1 sont l'EGF, le TGF-α et l'amphiréguline. Les ligands connus de HER3 et HER4 sont, parmi les facteurs de croissance, de la famille des neurégulines (NRG1 ou NRG2). Même en absence de ligand connu, HER2 est le partenaire préférentiel dans les hétérodimères et peut être transactivé par un ligand reconnu par l'autre partenaire. HER2 participe ainsi à la transmission du signal même en absence de ligand spécifique. Cette diversité de possibilités de dimérisation, ainsi que la diversité des ligands permet une large gamme de possibilités quant aux conséquences de l'activation de ces récepteurs.

Bien que les 4 gènes de la famille Erb-B2 semblent tous intervenir dans la tumorigenèse mammaire, seul le proto-oncogène c-erbB2 est amplifié et surexprimé suite à certaines mutations. Une première mutation consiste en l'altération d'un acide aminé (valine remplacée par glutamine) dans la région transmembranaire du récepteur. Il est aussi possible d'observer dans les cas de mutations, une délétion qui cause la perte du domaine extracellulaire d'interaction avec le ligand. Ces deux mutations ont toutes deux comme impact de causer une dimérisation même en absence de ligand et de provoquer ainsi une activation constitutive de l'activité kinasique de l'oncoprotéine résultante (Stern., 2000 ; Jeyakumar *et al*., 2012).

La surexpression de la protéine ErbB2 est présente dès les premiers stades de la cancérogenèse mammaire et augmente ainsi le nombre de récepteurs dimérisés HER1/HER2 à la surface de la cellule, qui s'accompagne d'une prolifération accrue, d'une activation constitutive de la voie de survie et des mécanismes de migration et d'invasion des cellules cancéreuses mammaires (Moasser., 2007). Ces réponses biologiques dépendent d'une cascade de phosphorylations initiées au niveau du récepteur, qui conduisent à l'activation de certains

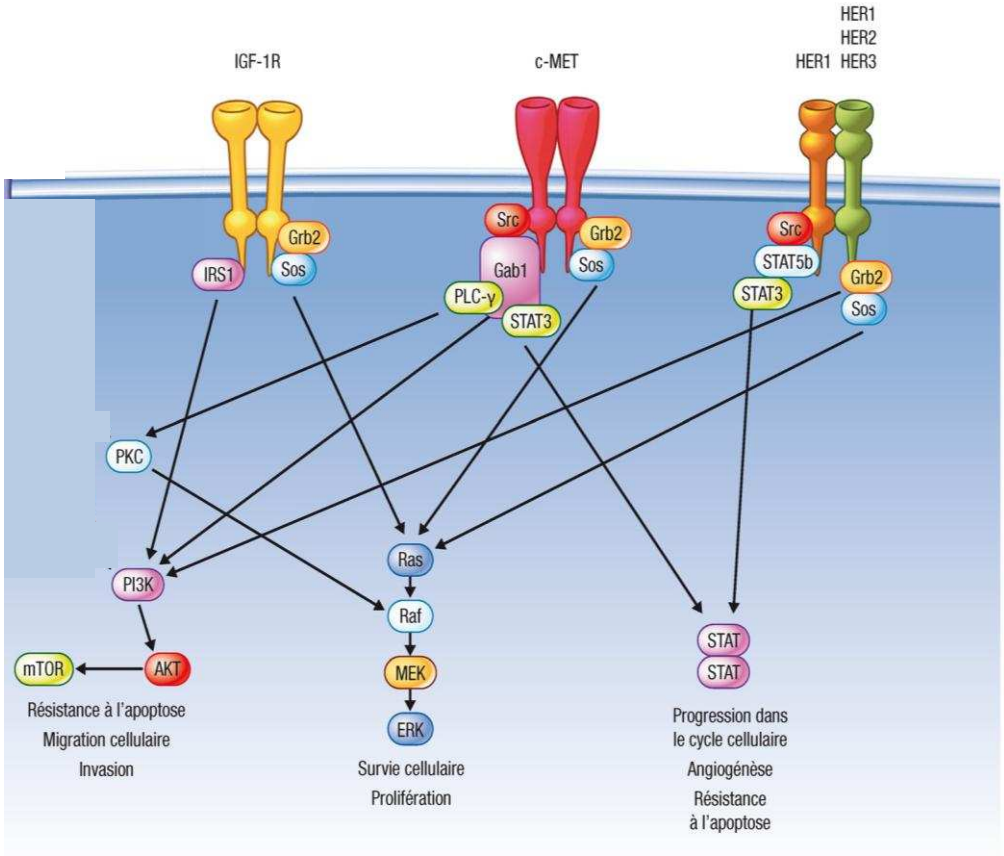


Figure 13 : Voies de signalisation associées à l'IGF-1R, c-MET et HER. Ce schéma représente les interconnections possibles entre les différentes voies de signalisation (d'après le livre GSK : Résistance aux thérapies ciblées en cancérologie).

facteurs de transcription comme cMyc, Ets, ainsi que les complexes c-Fos/c-Jun et NF-κB (Nuclear Factor-kappa B) (Kim *et al*., 2001 ; Biswas *et al*., 2004). Cliniquement, les tumeurs HER2 positives sont caractérisées par une forte croissance cellulaire ainsi qu'à une augmentation du potentiel métastatique.

L'IGF-1 est un facteur de croissance dont la structure chimique est proche de celle de l'insuline. Il se fixe avec une grande affinité sur des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase, composée de quatre sous-unités. Les deux sous-unités α sont extracellulaires et forment le site de liaison aux ligands tandis que les deux sous-unités β correspondent à la partie transmembranaire du récepteur et portent l'activité tyrosine kinase. L'activité d'IGFR-1 est essentiellement régulée par la disponibilité de ses ligands, présents dans la circulation et transportés par des protéines spécifiques comme les IGFBP (Insulin like Growth Factor Binding Protein), ou sécrétés de façon autocrine et paracrine au niveau tissulaire. Après la liaison du ligand, le récepteur est activé par autophosphorylation et participe alors à la transduction du signal *via* plusieurs voies intracytoplasmiques, dont les principales sont les voies Ras/Raf/MAPK/ERK et PI3K/AKT. *In fine,* l'activité biologique est très similaire à celle déclenchée par l'EGF sur son récepteur, et conduit à la prolifération, à la survie cellulaire et à des mécanismes de migration et d'invasion des cellules cancéreuses mammaires (Figure 13) (Surmacz., 2000 ; Key *et al*., 2010). Des résultats indiquent qu'il existe des relations entre IGF-R et les récepteurs de la famille HER. La résistance au trastuzumab des cellules mammaires surexprimant HER2 est souvent associée à une augmentation de l'activité IGF-1R (Lu *et al*., 2004 ; Zhao *et al*., 2012).

L'insuline, comme l'IGF-1 peut stimuler directement le développement des tumeurs mammaires, *via* le récepteur membranaire, ce qui conduit à l'hypothèse selon laquelle le risque de cancer du sein est augmenté chez les femmes ayant des taux plasmatiques élevés d'insuline (Kaaks., 2003 ; Key *et al*., 2010) (Figure 13). Il a également été montré que les œstrogènes, *via* la forme alpha du récepteur nucléaire, rendent les cellules tumorales ER-positives, sensibles à l'IGF-R (Surmacz *et al*., 2004).

Le gène *MET* (pour Mesenchymal-Epithelial Transition factor) code un précurseur, qui est ensuite clivé et glycosylé pour devenir un récepteur membranaire comprenant une sous-unité α extracellulaire et une sous-unité transmembranaire β, liées par des ponts disulfures. Le ligand de ce récepteur transmembranaire tyrosine kinase MET est l'Hepatocyte Growth Factor (HGF) (ou encore appelé HGF-SF, Hepatocyte Growth Factor-Scatter Factor), qui a

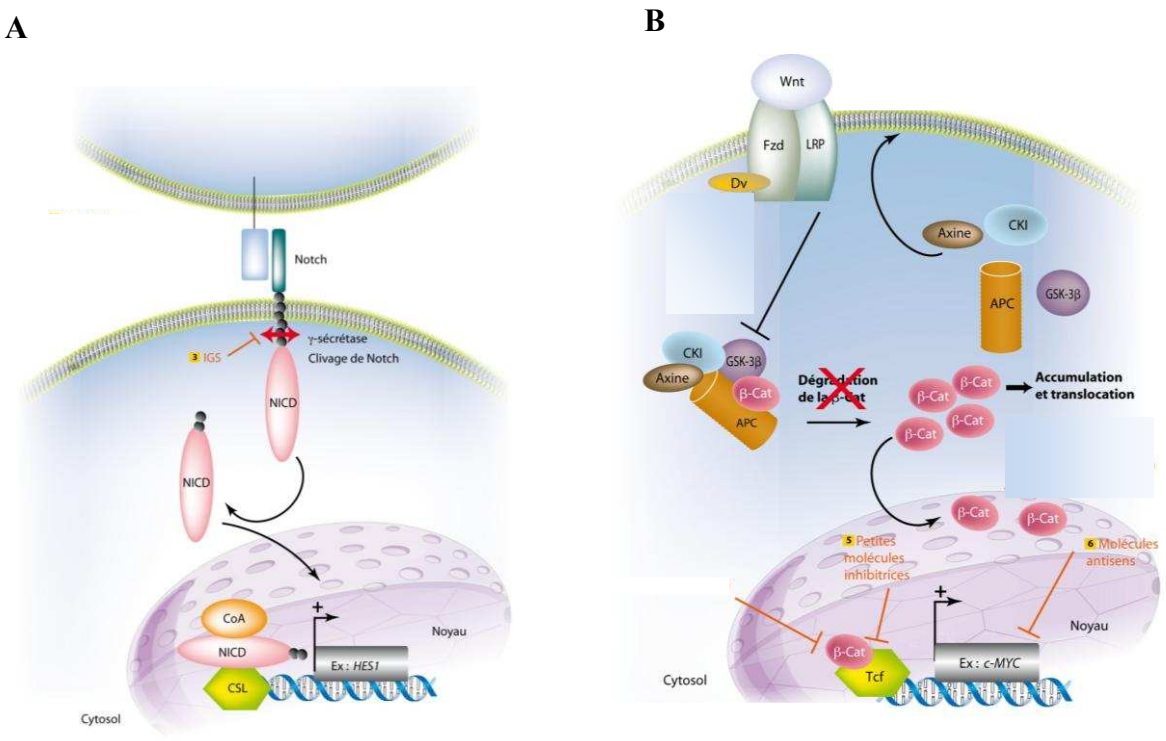


Figure 14 : A-Mécanisme de l'activation de la voie Notch. La fixation d'un ligand DII ou Jagged sur son récepteur Nocth entraîne le clivage du domaine intracellulaire de Notch (NICD) puis sa translocation dans le noyau où il s'associe au facteur de transcription CSL et active l'expression des gènes cibles. Dll : Delta-like ; IGS : inhibiteurs de la γ-sécrétase ; NICD : Notch intracellular domain ; CoA : coactivateur ; CSL : called supressor of hairless ; HES1 : hairy and enhancer of slit homolog-1. (D'après le livre: Thérapies ciblées des cancers, édition John Libbey).

Figure 14 : B-Mécanisme de l'activation de la voie Wnt. La fixation d'un ligand Wnt sur son récepteur Fzd-LRP entraîne l'accumulation de la β-caténine (β-cat) dans le cytosol puis sa translocation dans le noyau. Fzd-LRP : frizzeled-low density lipoprotein receptor-related protein ; Dvl : dishevelled ; APC : adenomatous polyposis coli ; CKI : caséine kinases ; GSK-3β : glycogène synthase kinase 3β ; Tcf : T-cell factor. (D'après le livre: Thérapies ciblées des cancers, édition John Libbey).

été initialement décrit comme un puissant mitogène pour les hépatocytes adultes (Birchmeier *et al*., 2003 ; Gluck *et a*l., 2011). L'activation de MET par son ligand, génère des effets importants dans la croissance et la survie cellulaires, ainsi que sur la mobilité et l'invasion cellulaires (Figure 13).

8.2.1.4. Les voies Wnt/β-caténine et Notch

Très récemment, les voies de signalisation dépendantes respectivement de la Wnt/β-caténine et de Notch, ont été montrées comme jouant un rôle important dans la prolifération des cellules tumorales mammaires triple-négatives (ER, PR et HER-2 négatives), ainsi que des cellules souches, selon le mécanisme présenté dans les Figures 14 A et 14 B.

Lors de la fixation de son ligand, le récepteur Notch subit un clivage enzymatique, permettant au domaine intracellulaire du récepteur d'être transféré dans le noyau où il active l'expression de gènes cibles comme NF-κB. Une expression constitutive de la partie intracellulaire de Notch est d'ailleurs retrouvée dans certains cancers du sein (Guo *et al*., 2011).

L'activation du récepteur formé d'un hétérodimère Frizzled et le « low density lipoprotein receptor-related protein » (FZD-LRP) lors de la fixation de son ligand Wnt, conduit à la phosphorylation de la protein dishevelled (Dvl) qui, par son association avec l'axine, empêche la GSK3β de phosphoryler la β-caténine. Cette dernière, sous forme phosphorylée, est libérée dans le cytoplasme, puis transloquée dans le noyau où elle s'associe aux facteurs de transcription TCF, pour induire l'expression de gènes comme celui codant la cycline D1 (Khramtsov *et al*., 2010).

8.2.1.5. L'influence des cellules environnant la tumeur

Le tissu épithélial mammaire fait partie d'un microenvironnement complexe qui est sous l'influence, non seulement de nombreux facteurs de croissance et des hormones, mais également des cellules environnantes, tels que les fibroblastes et les cellules endothéliales des capillaires du stroma. Ces cellules environnantes contribuent également au développement d'une tumeur de la glande mammaire. Les fibroblastes, sous l'influence de l'EGF ou du FGF sécrétés par les cellules tumorales, subissent des modifications dans leur profil d'expression et dans leur aspect morphologique, devenant plus allongé, par l'apparition de fibres de stress d'actine. Ces cellules subissent également des modifications dans leur activité de remaniement de la matrice extracellulaire du stroma (sécrétion de métalloprotéases et de

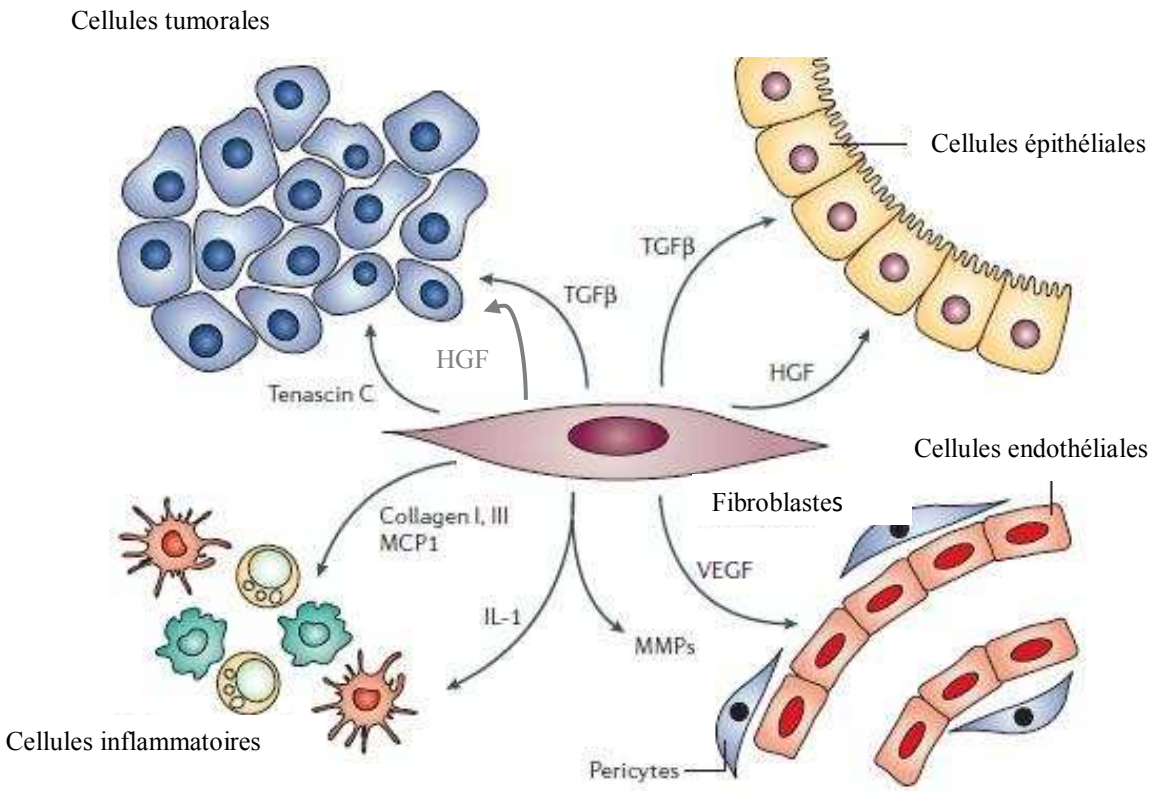


Figure 15 : Implication des fibroblastes dans le stroma de la tumeur. Les fibroblastes communiquent avec les cellules souches cancéreuses, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les péricytes et les cellules inflammatoires, en sécrétant des chémokines et des facteurs de croissance. Les fibroblastes interagissent avec les micro-vaisseaux en sécrétant des MMP et du VEGF. Les fibroblastes émettent également des signaux oncogéniques tels que le TGF-β et l'HGF aux cellules épithéliales résidentes. Ces signaux, en plus du SDF-1 (Stroma-cell-Derived Factor 1) peuvent également directement stimulés la prolifération puis l'invasion des cellules tumorales (d'après Kalluri *et al*., 2006).

protéines de la matrice extracellulaire), pour devenir des fibroblastes associés au carcinome (CAF). En retour, ces CAF sécrètent de nombreux facteurs de croissance, tels que l'HGF, le facteur dérivé des cellules stromales (SDF-1), ainsi que le facteur angiogénique, VEGF et des chémokines. Ces dernières activent également les cellules inflammatoires comme les macrophages infiltrant et associés aux tumeurs (TAM), qui à leur tour, sécrètent également du VEGF et de l'EGF (Figure 15). Plus tard, les CAF sécrèteront du TGF-β et les macrophages activés produiront du TNFα, qui conduiront les cellules tumorales mammaires à acquérir des capacités migratrices et invasives selon un programme appelé la transition épithélio-mésenchymateuse ou TEM (Kalluri et Zeisberg., 2006 ; Dirat *et al*., 2011).

8.3. L'angiogenèse

L'angiogenèse est un mécanisme de néovascularisation prenant naissance à partir d'un réseau capillaire préexistant. Elle est particulièrement importante et indispensable pour la croissance des tumeurs et le développement des métastases. Elle permet un apport d'oxygène et de nutriments à la tumeur. L'angiogenèse physiologique est régulée par un équilibre entre des facteurs pro-angiogéniques et des facteurs anti-angiogéniques. Le premier facteur pro-angiogénique identifié fut le "Fibroblast Growth Factor" ou FGF (Gospodarowioz *et al*., 1978). De nombreux agents ont depuis été identifiés. Ils constituent un ensemble très hétérogène de par leur nature, leur mécanisme d'activation et leur fonctionnement. Cet ensemble comprend des substances dont l'activité est essentiellement vasculaire comme l'angiogénine, l'angiotropine, le facteur de perméabilité vasculaire, et surtout des facteurs de croissance (TGF-α, TGF-β, EGF, FGFb, VEGF…) (Hanahan *et al*., 2011 ; Guinebretiere *et al.*, 2005). Parmi ces substances, le VEGF est l'un des facteurs les plus étudiés. Il est surexprimé dans les cellules cancéreuses ainsi que dans les cellules entourant la tumeur (Ferrara *et al*., 2009 ; Boudreau *et al.*, 2003). L'angiogenèse se met en place en condition d'hypoxie. Sous l'action de facteurs pro-angiogéniques issus de la tumeur, les cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux synthétisent des enzymes protéolytiques qui vont digérer la lame basale les entourant. Ces cellules endothéliales prolifèrent sous l'action du VEGF et synthétisent les éléments constitutifs de la lame basale du nouveau vaisseau. Cette néovascularisation permet le développement de la tumeur et la mise en place du processus métastatique.

8.4. La Transition épithélio-mésenchymateuse à l'origine des capacités migratrices et invasives des cellules tumorales

Le développement d'une tumeur dans la glande mammaire ne se limite pas à une prolifération anarchique et incontrôlée de cellules néoplasiques exposées à des signaux de prolifération. Au cours de leur prolifération, les cellules cancéreuses peuvent ainsi subir une dédifférenciation plus importante, qui leur permet d'acquérir des propriétés migratrices et invasives des tissus environnants de la glande mammaire. Ces nouvelles propriétés se définissent sous le terme de transition epithélio-mésenchymateuse (TEM) que subissent les cellules tumorales mammaires et qui reflètent les modifications dans les interactions entre cellules au sein du tissu mammaire et un changement important dans l'expression des gènes. La transition épithélio-mésenchymateuse serait initiée lorsque les cellules cancéreuses se trouvent en condition d'hypoxie. En effet, une étude a montré que le facteur HIF-1α active la TEM dans certaines cellules cancéreuses (Zhou *et al*., 2009). De plus, durant l'hypoxie, les mitochondries augmentent leur production d'espèces réactives de l'oxygène, ce qui faciliterait le processus de TEM (Zhou *et al*., 2009).

Les étapes précoces de la TEM correspondent à une perte d'adhérence entre les cellules tumorales d'origine épithéliale, par une diminution d'expression de gènes codant en particulier des claudines, la desmoplaquine et la cadhérine E, protéines constituant les jonctions intercellulaires, mais également les cytokératines typiquement épithéliales. Cette TEM s'accompagne également d'un remaniement du cytosquelette d'actine qui permet aux cellules plutôt ovales d'acquérir une forme fibroblastoïde. En effet, lorsque les cellules tumorales acquièrent des capacités migratrices, elles subissent des modifications morphologiques afin de se déplacer dans la matrice extracellulaire. Les cellules cancéreuses mammaires émettent des prolongements leur permettant de s'ancrer *via* la mise en place d'adhésions focales (Figure 16). Lorsqu'elles acquièrent des propriétés invasives, les cellules tumorales mammaires, expriment d'autres gènes, codant en particulier des protéines caractéristiques des cellules mésenchymateuses, telles que la vimentine et la cadhérine N (McSherry *et al.*, 2007 ; Polyak *et al*., 2009 ; Jing *et al*., 2011).

L'acquisition d'un pouvoir migrant, invasif et métastatique, s'accompagne également de la capacité des cellules tumorales mammaires à sécréter des substances telles que des métalloprotéases matricielles (MMP). Il s'agit de l'étape suivante de la TEM qui nécessite en effet la digestion de la lame basale qui entoure la tumeur. Les métalloprotéases constituent une famille de protéases impliquées dans la dégradation protéolytique de nombreuses

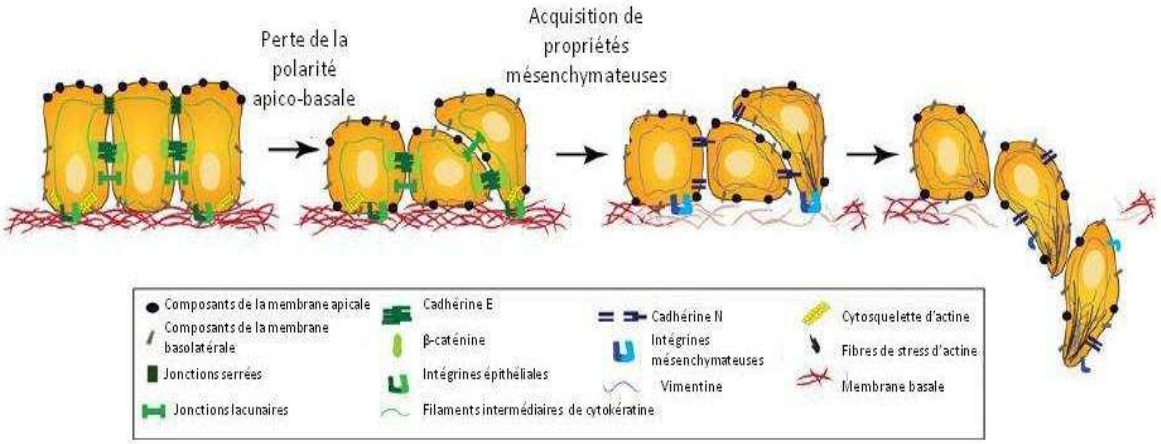


Figure 16: Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la transition épithélio-mésenchymateuse. Au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse, les cellules d'origine épithéliale perdent leur polarité apico-basale et se détachent les unes des autres par disparition progressive des jonctions intercellulaires. En particulier, la cadhérine E n'est plus exprimée, au profit de la cadhérine N. Les cellules acquièrent également une morphologie plus allongée, dîte fibroblastoïde, par un remaniement du cytosquelette, consistant au remplacement des filaments intermédiaires de cytokératine par de la vimentine, et l'apparition de fibres de stress d'actine. Toutes ces modifications, caractéristiques d'un phénotype mésenchymateux, confèrent aux cellules des capacités migratrices et invasives. (D'après Micalizzi *et al*., 2010).

protéines de la matrice extracellulaire dont la lame basale. Les MMP sont d'ailleurs des cibles potentielles dans le traitement anticancéreux (Egeblad et Werb., 2002 ; López-Otín *et al*., 2010 ; Noel *et al*., 2012). Les MMPs sont classées en quatre catégories : les collagénases interstitielles (MMP1, MMP8 et MMP13), les gélatinases (MMP2 et MMP9), les stromélysines (MMP13 et MMP10) et les MMP transmembranaires (MMP14, 15, 16, 17, 24, 25). Les collagénases et les gélatinases, qui dégradent le collagène de la matrice extracellulaire, sont particulièrement sécrétées par les cellules tumorales mammaires malignes et peuvent ainsi promouvoir des métastases osseuses (Wyatt *et al*., 2005 ; Rose et Siegel., 2006 ; Noel *et al*., 2012).

Il a été décrit que les cellules de carcinomes mammaires canalaires, représentant 80% des cancers du sein, qui, après une phase de prolifération importante, envahissent le canal galactophore et acquièrent des propriétés invasives. Celles-ci débutent par la digestion de la lame basale après sécrétion de MMP par les cellules tumorales, en particulier les MMP1, MMP2 et MMP9, puis par l'envahissement du stroma.

Au cours de la TEM, les cellules tumorales dynamisent leurs capacités migratrices et invasives en modifiant la matrice extracellulaire du stroma riche en fibronectine et en collagène de type I. Elles sécrètent en abondance à la fois des protéines différentes telles que la tenascine C, la thrombospondine-1 et la fibronectine, mais aussi des protéoglycanes complexes comme le versican, tous favorables à la migration cellulaire (Gritsenko *et al*., 2012).

D'autres gènes sont également exprimés par les cellules tumorales mammaires migratrices, favorisant ainsi leur interaction avec les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins du stroma, avant de gagner la circulation sanguine et de se disséminer dans l'organisme. En plus du gène codant la cadhérine N, celui qui code la protéine appartenant à la superfamille des immunoglobulines, I-CAM-1 pour « Intercellular Adhesion Molecule 1» est également exprimé pour favoriser l'interaction entre les cellules tumorales migrantes et les cellules endothéliales.

En dehors des modifications dans l'expression des protéines impliquées dans l'adhérence cellulaire, il existe également des variations dans l'expression des gènes codant des protéines membranaires, telles que les intégrines et CD44. En effet, les cellules tumorales, ayant subi la TEM, digèrent la lame basale, rencontrent le tissu interstitiel, appelé stroma, de

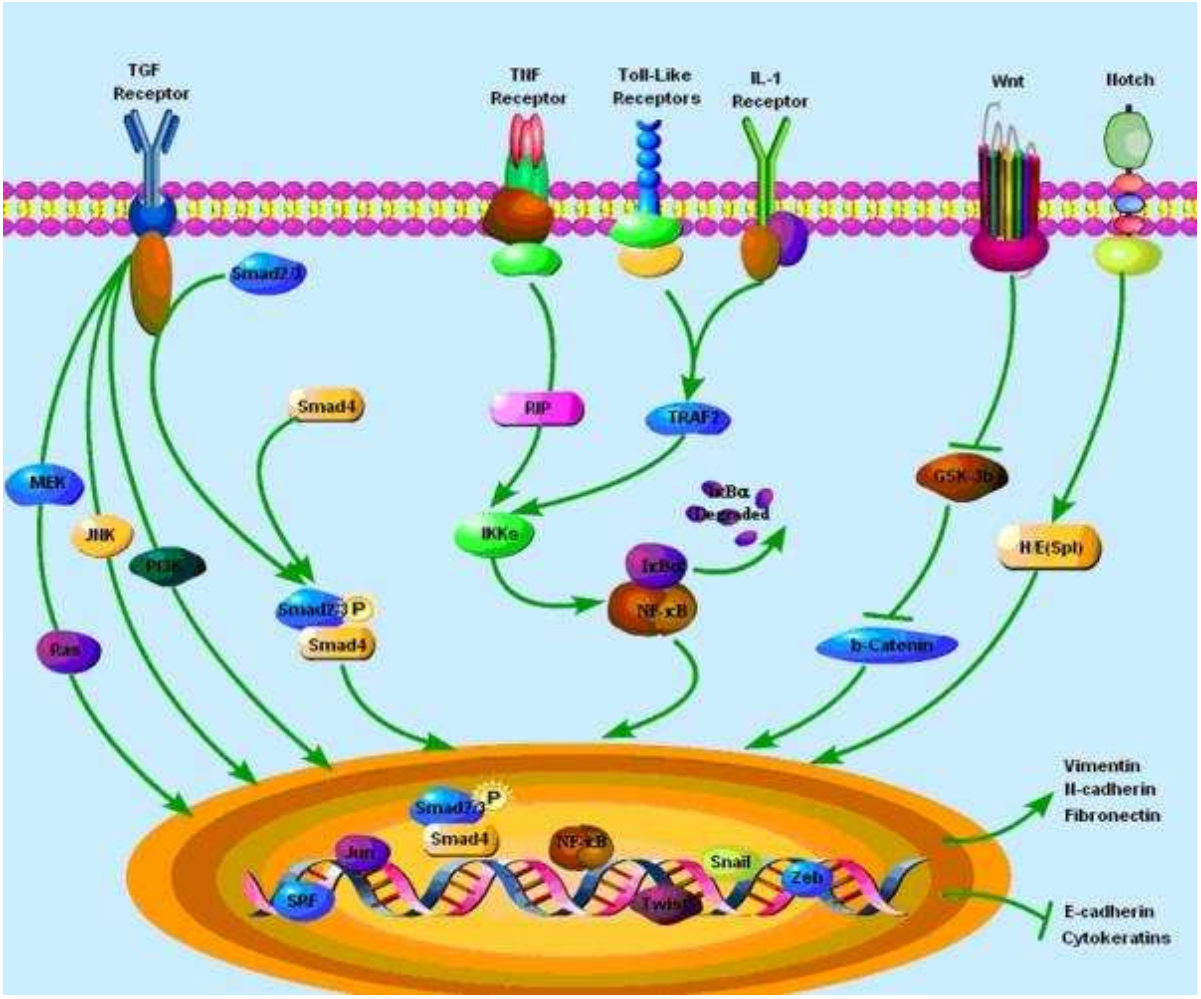


Figure 17 : Voie de signalisation de la TEM : la transition épithélio-mésenchymateuse est induite par plusieurs voies de signalisation comme celles déclenchées par des facteurs de croissance (FGF, EGF, HGF, Transforming Growth Factor ou TGF-α et β), ou les ligands Wnt. Ces voies de signalisation conduisent à l'activation de facteurs de transcription comme Snail (SNA1 et 2), Slug, Zeb, Twist et NF-κB. Ces derniers régulent la transcription de gènes, de façon négative comme celui de la cadhérine E, ou positive comme celui de la cadhérine N. Les cellules d'origine épithéliale acquièrent ainsi un phénotype plutôt mésenchymateux. Le TGF-β est l'un des médiateurs essentiels dans ce processus. Sa liaison au récepteur induit la phosphorylation de Smad 2 et 3, l'assemblage avec Smad 4, la migration du complexe dans le noyau et l'induction de la transcription des gènes impliqués dans la TEM. Le TGF-β active également des voies de signalisation Smad-indépendantes impliquées dans la TEM, comme par exemple les petites protéines GTPases (Rho, Rac et cdc42), la voie des MAPKinases avec notamment les c-jun-N terminal kinases, toutes deux impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et la plasticité cellulaire, ou bien la voie PI3K/Akt qui inhibe la glycogène-synthase kinase 3 (GSK3β) et active la voie Wnt. (Receptor : récepteur) (Jing *et al*., 2011).

la glande mammaire, dans lequel elles migrent par perte d'adhérence transitoire avec la matrice extracellulaire et ce par l'intermédiaire des intégrines qu'elles expriment à leur surface. Ces adhérences transitoires nécessitent donc l'expression d'intégrines, composées d'une sous-unité α et une β, adaptées à la nature des composants de la matrice extracellulaire du stroma. Ces intégrines sont observables sous forme de points focaux d'adhérence. Ces derniers correspondent à des ponts dans le cytoplasme des cellules tumorales entre les intégrines et un réseau local de fibres de stress d'actine, par l'intermédiaire de protéines de liaison telles que la taline, la paxilline, la tensine et la vinculine. L'activation, depuis les intégrines, de voies de signalisation passant par une tyrosine kinase indirectement attachée à ces protéines membranaires et appelée « Focal Adhesion Kinase » (FAK), et par les protéines G de la famille Rho/Rac, permet la formation d'extensions membranaires ou filipodes, puis le désassemblage des points focaux d'adhérence qui tire les cellules en avant (Figure 16) (McSherry *et al*., 2007).

Le programme d'expression des gènes caractérisant la TEM est dépendant et entretenu par des signaux activateurs, agissant sur les cellules tumorales au cours de leur migration dans les tissus environnants. Le TGF-β est l'un de ces signaux essentiel dans ce processus. D'autres, tels que les facteurs de croissance (EGF, IGF-1, et HGF), ainsi que Wnt/β-caténine et Notch, déclenchent des voies de signalisation, *via* leur récepteur membranaire respectif, qui conduisent à l'activation de facteurs de transcription typiques de la TEM comme NF-κB, Twist, Snail, Slug, Zeb1 et 2 (Figure 17) (Jing *et al*., 2011). Ces signaux sont originaires, non seulement des cellules tumorales mammaires elles-mêmes, mais aussi des fibroblastes (CAF) activés et associés au tumeurs, qui remanient la matrice extracellulaire propice à la migration et l'invasion tumorale, et des macrophages infiltrant la tumeur (TAM) qui secrètent de l'EGF et du TGF-β (McSherry *et al*., 2007 ; Jing *et al*., 2011). Enfin, certaines études suggèrent que les cellules souches mésenchymateuses présentes dans l'environnement tumoral, participeraient à la croissance tumorale et ainsi favoriseraient le potentiel métastatique des cellules cancéreuses mammaires (Martin *et al*., 2010).

8.5. La dissémination métastatique

Pour coloniser les organes à distance, les cellules tumorales pénètrent dans la circulation sanguine ou lymphatique et doivent dégrader la lame basale du stroma de

composition particulière et sécrètent donc des MMP qui peuvent être différentes de celles sécrétées lors de l'invasion locale. Les cellules tumorales mammaires invasives sécrètent également la protéine uPA (urokinase-type Plasminogen Activator) qui est une sérine protéinase qui dégrade de nombreux composants de la MEC et le taux d'uPA serait corrélé au niveau d'agressivité de la tumeur. En effet, une forte sécrétion d'uPA est observée dans les cellules hautement métastatiques MDA-MB231 (Nakshatri *et al*., 1997). La dégradation du stroma par les cellules tumorales et le processus d'entrée des cellules dans la circulation sont connus sous le nom d'intravasation. Une fois dans la circulation sanguine, les cellules tumorales se retrouvent dans un environnement hostile. Les cellules cancéreuses circulantes déclenchent une réponse immunitaire qui va conduire à l'élimination de la plupart d'entre elles. Cependant, certaines cellules malignes sont capables d'interagir avec des cellules plaquettaires, les protégeant ainsi du système immunitaire et des contraintes physiques dues à la pression sanguine (Nguyen *et al*., 2009). Le processus suivant correspond au phénomène d'extravasion. Les cellules tumorales s'arrêtent au niveau d'un organe et sortent des vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Le mécanisme de cet arrêt au niveau de certains sites n'est pas connu. Certains organes, sont en effet le site préférentiel de développement de métastases. Les cellules tumorales mammaires colonisent par exemple en majorité les tissus pulmonaires, osseux et du cerveau. Les cellules endothéliales expriment des molécules d'adhérence différentes en fonctions des organes. Ainsi CXCR4, récepteur de la chémokine SDF-1α serait responsable de l'extravasation des cellules tumorales mammaires MDA-MB231 (Lechertier *et al*., 2004). Les cellules traversent la paroi des vaisseaux *via* le phénomène de la MTE (Migration TransEndotheliale). Les intégrines jouent un rôle important dans la régulation de la MTE. Ainsi, l'adhésion des cellules à certaines intégrines (αvβ1) induit l'extravasation. Les cellules tumorales ayant réussi à envahir un organe et à former des micrométastases, peuvent rester en dormance plusieurs semaines voir des années avant de proliférer et de former des macrométastases. L'état de dormance des cellules tumorales serait dû aux signaux envoyés par le nouvel environnement que les cellules perçoivent comme des signaux de stress par la modulation des voies ERK et p38 MAPK (Hanahan *et al*., 2011 ; Barkan *et al*., 2010 ; Aguirre-Ghiso *et al*., 2004). L'angiogenèse permettrait la reprise de la prolifération et le développement des métastases.

Un certain nombre de mécanismes moléculaires de la tumorigenèse mammaire, impliquant de nombreux acteurs protéiques, a été identifié, puis caractérisé. Parmi ces acteurs, le facteur de transcription NF-κB semble jouer un rôle central, en particulier dans la croissance et la progression métastatique des tumeurs mammaires, comme le rapportent de nombreuses études.

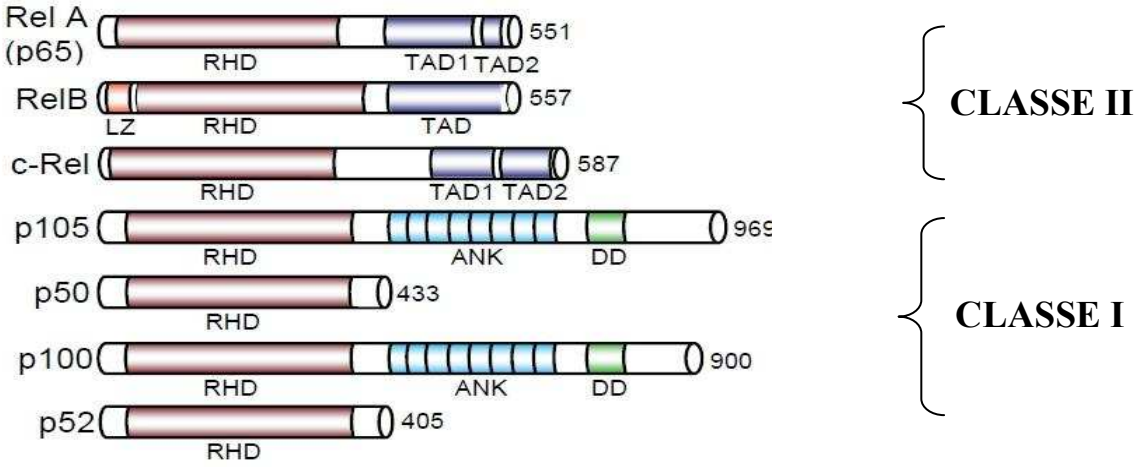


Figure 18 : Structure des protéines de la famille Rel constituant les complexes NF-κB.

Les protéines Rel sont caractérisées par un domaine d'homologie avec c-Rel (RHD), qui est responsable de la dimérisation, de l'interaction avec l'inhibiteur IκB et de la liaison avec l'ADN. Les protéines sont subdivisées en deux classes I et II. La classe I comprend les protéines précurseurs p105 et p100, possédant des répétitions ankyrines (ANK) et une région homologue au domaine de mort (DD : death domain) retrouvé dans le récepteur du TNFα, et les protéines p50 et p52, dépourvues d'un domaine de transactivation. La classe II est constituée de RelA (p65), c-Rel et RelB, qui contiennent un domaine de transactivation (TAD). RelB possède en plus du côté NH2-terminal un domaine TAD ayant un motif de type leucine-zipper (LZ) (d'après Espinosa *et al*., 2011).

III. LA VOIE DE SIGNALISATION NF-κB

NF-κB (Nuclear Factor-kappa B) est un facteur de transcription qui a été initialement découvert dans les lymphocytes B en tant que régulateur du gène codant la chaîne kappa des immunoglobulines (Sen et Baltimore, 1986). Depuis, de nombreuses études ont montré son implication dans diverses fonctions biologiques, telles que la réponse immunitaire, l'inflammation, l'apoptose, et la croissance cellulaire, mais également dans plusieurs pathologies comme l'arthrite, les maladies neuro-dégénératives et certains cancers (Courtois *et al*., 2006 ; Espinosa *et al*., 2011).

Différents mécanismes permettent de décrire la régulation de l'activité du complexe NF-κB : la nature des complexes formés par les différentes sous-unités NF-κB, la participation d'inhibiteurs spécifiques, les voies de signalisations et les sites κB retrouvés sur les promoteurs des gènes cibles de NF-κB.

1. Structure du complexe NF-κB

Ce complexe est composé d'homo- ou d'hétérodimères, formant une famille de facteurs de transcription. L'ensemble de ces protéines au nombre de 5 actuellement décrites dans les cellules de mammifères, appartient à la famille des protéines Rel : p50 et son précurseur p105 (NF-κB1), p52 et son précurseur p100 (NF-κB2), RelA (p65), RelB et c-Rel (Inoue *et al*., 2007 ; Espinosa *et al*., 2011). La figure 18 présente la structure de ces différentes protéines regroupées en deux classes selon leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles. L'ensemble des sous-unités NF-κB est caractérisé par la présence d'un domaine très conservé du coté NH2 terminal, d'environ 300 acides aminés, nommé « domaine Rel » ou RHD (Rel Homolgy Domain). Ce domaine permet à la fois la dimérisation, la translocation dans le noyau grâce à la présence d'un signal de translocation nucléaire (NLS), la fixation à l'ADN, ainsi que la liaison à un inhibiteur cytoplasmique IκB (inhibitor of NF-κB). Tandis que les protéines p52 et p50 ne possèdent pas de domaine de transactivation, les protéines RelA, RelB et c-Rel en possèdent un ou deux dans leur région C-terminale.

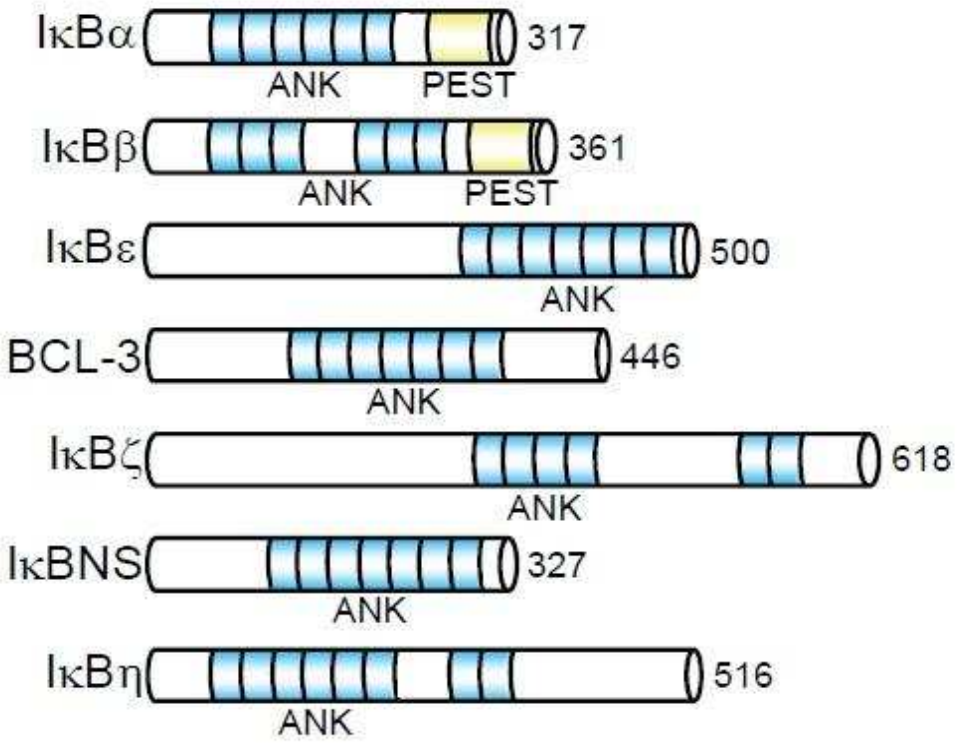


Figure 19 : Structure des protéines de la famille IκB.

Cette famille de protéines est caractérisée par la présence de répétitions ankyrines (ANK). Les proteines IκBα et IκBβ possèdent en plus un domaine PEST, riche en proline (P), glutamate (E), serine (S) et thréonine (T) (d'après Espinosa *et al*., 2011).

Les protéines précurseurs p100 et p105 se distinguent par la présence de répétition de motifs ankyrines dans leur partie carboxy-terminale, qui peuvent interagir avec leur propre domaine RHD et masquer la NLS, conduisant ainsi à leur localisation cytoplasmique.

La diversité de combinaison des homo- ou des hétérodimères des protéines Rel contribue à la régulation de différents groupes de gènes. Tous les dimères se fixent spécifiquement sur des séquences d'ADN de 10 paires de base, nommées « sites -κB », dont la séquences consensus est 5'-GGGRNYYYCC-3' (R indique la base A ou G, Y indique C ou T et N une base quelconque). Le complexe transcriptionnel plus communément décrit dans la majorité des cellules est l'hétérodimère p50/p65, activateur de la transcription de nombreux gènes.

2. Régulation de l'activité du complexe NF-κB

L'activité de NF-κB est régulée principalement par son interaction avec une protéine inhibitrice de la famille IκB.

2.1. Régulation par les inhibiteurs IκB

Dans la cellule, le complexe NF-κB existe sous une forme inactive, retenu dans le cytoplasme par une protéine inhibitrice appelée I kappa B ou IκB (Inoue *et al*., 2007 ; Espinosa *et al*., 2011). Cette dernière recouvre la séquence NLS de chaque protéine Rel, empêchant ainsi la translocation nucléaire du complexe NF-êB. Il existe plusieurs protéines IκB ayant des affinités différentes pour les complexes NF-κB (Figure 19). La famille des protéines IκB inclut : les inhibiteurs « classiques » IκBα, IκBβ, IκBε, les précurseurs IκBγ (p105) et IκBδ (p100) et les inhibiteurs « atypiques » comme Bcl3 (B cell CLL/lymphome 3), IκBζ (ou INAP), et IκBNS. Récemment, une nouvelle protéine, proche structuralement d'IκBα a été identifiée et nommée IκBη. Celle-ci, est classée parmi les inhibiteurs « atypiques », qui interviennent sur la régulation de la transcription des gènes cibles de NF-κB, en se fixant sur l'ADN, sous l'action de stimuli telles que des cytokines proinflammatoires durant la réponse immune, sans agir sur la translocation nucléaire des protéines Rel (Yamaushi *et al*., 2010

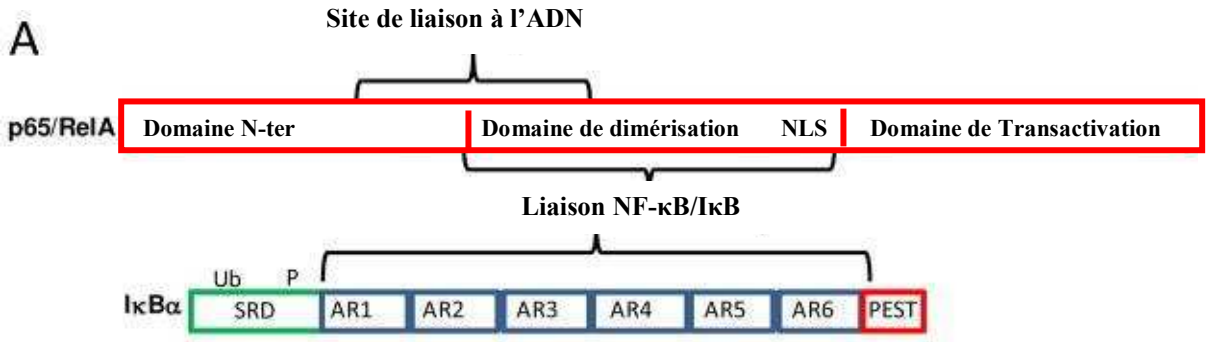


Figure 20 : Structure de la protéine IκBα.

La protéine IκBα est composée d'un domaine SRD (Signal Response Domain), qui est la cible des phosphorylations du complexe IKK (IκB kinase) et des ubiquitinylations qui conduisent à sa dégradation par le protéasome. Elle possède 6 motifs ankyrine (AR) qui permettent les interactions protéines-protéines et du domaine PEST qui intervient dans les interactions avec le facteur de transcription NF-κB (d'après Diego *et al*., 2010).

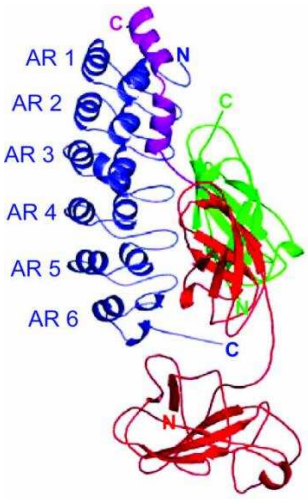


Figure 21 : Structure cristallographique de la liaison entre NF-κB (p50, vert ; p65, rouge) et IκBα (bleue).

Les hélices 3 et 4 de p65 (magenta) interagissent avec les domaines AR 1 à 3 d'IκBα. Dans le complexe NF-κB, la protéine p65, associée à p50 interagit avec la séquence PEST d'IκBα, par l'intermédiaire de son domaine NH2 terminal. Le domaine N-terminal de p50 (non représenté dans la structure), n'est pas impliqué dans la liaison avec IκBα (d'après Diego *et al*., 2010).

L'activité des inhibiteurs est régulée par des réactions de phosphorylation, puis d'ubiquitinylation qui conduisent à leur dégradation par le protéasome. En plus des sites de phosphorylation et d'ubiquitinylation, les protéines IκB possèdent dans leur structure des répétitions de type ANK, similaires à celles retrouvées dans la protéine du cytosquelette, l'ankyrine (Karin et *al*., 2000). Ces protéines IκB présentent des affinités différentes pour toutes les combinaisons de dimères NF-κB. Par exemple, IκBα et IκBβ interagissent préférentiellement avec c-Rel ou RelA (Karin *et al*., 2000), alors que Bcl-3 uniquement avec des dimères composés de p50 et p52. Quant à IκBζ et IκBNS, ils interagissent avec la sous-unité p50 (Yamamoto *et al*., 2008).

Dans la suite de notre travail, et sur la base des résultats de l'analyse transcriptomique, montrant IκBα comme gène cible potentiel de DDB2, nous nous intéresserons plus particulièrement à cette protéine inhibitrice de NF-κB qui est la mieux caractérisée et dont l'interaction avec le complexe p50/p65 est bien décrite.

2.2. Régulation par la protéine IκBα

2.2.1. Structure de la protéine IκBα

Nous venons de voir que les protéines IκB interagissent avec les dimères NF-κB. Nous allons maintenant détailler sa structure, qui révèle comment IκBα exerce ses effets inhibiteurs sur NF-κB, en interagissant avec le complexe p50/p65.

Le premier mécanisme, par lequel IκBα inhibe l'activité du complexe NF-κB, est la rétention dans le cytoplasme de ce dernier. La protéine IκBα est composée de 6 à 7 répétitions de motifs ankyrines qui lui permettent d'interagir avec les domaines RHD du complexe p50/p65. Ce sont les 2 premières répétitions ankyrines qui masquent la séquence NLS du complexe (Diego *et al*., 2010). Chaque motif ankyrine est formé de 2 hélices α interne et externe reliées entre elles par une boucle. Les 6 répétitions sont reliées entre elles par un tour β. C'est l'ensemble de cette structure qui lie l'hétérodimère p50/p65.

Le second mécanisme d'inhibition fait intervenir la capacité d'IκBα d'être transloquée dans le noyau des cellules, sans posséder une séquence de localisation nucléaire conventionnelle, et ce sous certaines conditions telles qu'une exposition aux UV ou à des

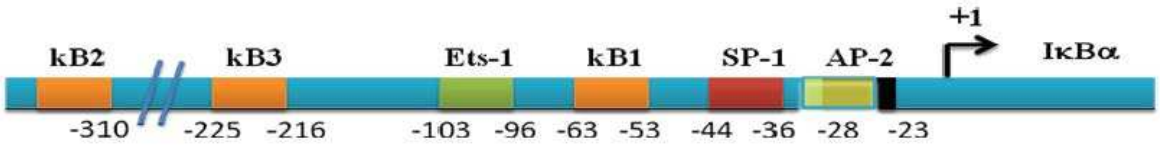


Figure 22 : Représentation schématique de la région proximale du promoteur du gène codant IκBα. Proche du site d'initiation de la transcription (+1), le promoteur proximal d'IκBα présente plusieurs sites de fixation, reconnus par différents facteurs de transcription : 3 pour NF-κB (κB1 à κB3), un pour AP-2, Sp-1 et Ets-1. Ces facteurs de transcription sont connus pour réguler la transcription du gène *IκBα*. En jaune, un site κB-like est aussi reconnu par NF-κB dans certains types cellulaires, celui-ci chevauche celui d'AP-2 (d'après Algarte *et al*, 1999).

radiations ionisantes (Turpin *et al*., 1997 ; Birbach *et al*., 2002). Une fois dans le noyau, IκBα provoque le déplacement du complexe NF-κB de ses séquences cibles d'ADN, en amont de ses gènes cibles dont il régule la transcription, en interagissant avec les dimères p50 /p65. La présence d'une séquence PEST (Figures 20, 21) dans la structure d'IκBα est responsable de la déstabilisation de l'interaction entre l'ADN et le dimère p50/p65. Cette séquence PEST induit une rotation du RHD de la protéine p65 du complexe NF-κB, et déplace ainsi les dimères p50/p65 de l'ADN.

Le troisième mécanisme d'inhibition, par lequel IκBα inhibe l'activité de NF-κB, résulte de la possibilité du complexe IκBα-p50/p65 formé, d'être exporté du noyau. Cette exportation du noyau dépend de la présence d'une séquence d'exportation nucléaire (NES) située du coté N-terminal de la protéine IκBα (Tam *et al*., 2000). Cette séquence est reconnue par le récepteur CRM1 (exportine 1 ou Chromosome Region Maintenance 1) qui, en conjonction avec la protéine Ran-GTP, permet l'export nucléaire (Ossareh *et al*., 1999 ; Lee *et al*., 2001). Le complexe IκBα/NF-κB serait alors retenu dans le cytoplasme grâce à la liaison à une protéine nommée G3BP2 (rasGAP SH3-binding protein 2) sur le domaine N-terminal de la protéine IκBα (Prigent *et al*., 2000).

2.2.2. Régulation transcriptionnelle du gène codant IκBα

Bien qu'IκBα a un rôle dans la régulation du complexe NF-κB bien décrit dans la littérature, il existe peu de données actuellement quant à la régulation de l'expression de son gène.

IκBα est codée par un gène d'environ 3,5kb, possédant six exons et cinq introns. Plusieurs sites de fixation de facteurs de transcription ont été identifiés sur le promoteur proximal du gène. Il s'agit de trois sites de fixation pour NF-κB, et un à la fois pour Sp-1, AP-2 et Ets-1 (Figure 22) (Ito *et al*., 1994 ; Algarte *et al*., 1999). En présence d'un stimulus approprié, tel qu'un ester de phorbol comme le PMA ou encore une cytokine proinflammatoire comme le TNFα, l'activation de NF-κB entraîne non seulement l'expression de ses gènes cibles responsables de la réponse biologique, mais également l'induction du gène codant IκBα par sa fixation au niveau du site κB1 du promoteur proximal, en association avec des coactivateurs de la transcription (SRC1, SRC2). C'est ainsi

que NF-κB, en induisant l'expression d'IκBα, exerce un rétrocontrôle négatif sur sa propre activation et explique son activité transitoire sur l'induction de ses gènes cibles (Gao *et al*., 2005). Des expériences de mutagénèse dirigée contre les sites NF-κB1 ou Sp1, révèlent cependant l'importance de ces facteurs de transcription dans l'induction de l'expression d'IκBα dans les cellules Jurkat, en présence de TNFα ou de PMA (Algarte *et al*., 1999).

Enfin très récemment, il a été identifié dans des cellules de glioblastome un micro-ARN capable de réguler négativement l'expression du gène codant IκBα au niveau post-transcriptionnel en ciblant spécifiquement une séquence dans la région non transcrite (3'-UTR) de l'ARNm et en catalysant ainsi sa dégradation (Jiang et *al.,* 2012).

2.2.3. Régulation par phosphorylation

Les complexes NF-κB sont régulés positivement par des phosphorylations, constitutives ou induites (Inoue *et al*., 2007 ; Espinosa *et al*., 2011). L'hyperphosphorylation de la protéine p50 est essentielle à la translocation nucléaire du complexe et augmente son affinité pour les sites κB. Une des cibles de la protéine kinase C, activée par les esters de phorbol est la protéine p50. De même, plusieurs travaux ont montré la capacité de différentes kinases à induire la phosphorylation et l'activation de la protéine p65 du complexe NF-κB, dans le cytoplasme ou dans le noyau. En effet, la phosphorylation de p65 sur la Ser276 par la sous-unité catalytique de PKA (Protéine Kinase A) après dégradation d'IκBα, permet d'augmenter son affinité pour des cofacteurs de la transcription telle que la protéine CREB Binding Protein (CBP) ou P300 (Campbell *et al*., 2004). La Ser276 peut également être phosphorylée par MSK1 « Mitogen-and-Stress-activated protein Kinase-1 » dans le noyau pour une activation optimale de p65 après stimulation par le TNFα (Vermeulen *et al*., 2003). La fixation de facteurs de croissance tel que l'IGF sur son récepteur à la surface des cellules tumorales conduit à l'activation d'une voie de signalisation qui passe par l'activation des kinases PI3K/AKT, qui ont pour cibles, d'une part IκB, d'autre part la protéine p65 du complexe NF-κB (Waes *et al*., 2007).

2.2.4. Régulation par les Micro-ARN

Les micro-ARN sont de petites molécules d'ARN de 20-25 nucléotides de long qui régulent négativement l'expression de gènes en ciblant la région 3' de l'ARNm. Certains de ces petits ARN interviennent dans la régulation de NF-κB, en particulier dans certaines cellules cancéreuses.

Le micro ARN-146 (miR-146) a été initialement identifié comme un régulateur du système immunitaire lors d'une infection microbienne chez les mammifères. Cependant, une étude a montré que miR-146 agit comme un régulateur négatif de NF-κB. En effet, la phosphorylation de la serine 32 d'IκBα, qui est essentielle à sa dégradation, est diminuée d'environ 20 à 40% dans les cellules cancéreuses mammaires qui expriment miR-146a et miR-146b (Bhaumik *et al*., 2008). Il a également été identifié dans des cellules cancéreuses ovariennes la présence du miR-199a, qui a été caractérisé pour son rôle dans la régulation négative de l'expression d'IKKβ, une kinase contrôlant l'activité de NF-κB. Il s'en suit une réduction de l'activité de NF-κB dans ces cellules cancéreuses ovariennes (Chen *et al*., 2008). Enfin, certains micro-ARN sont capables d'activer NF-κB. C'est le cas par exemple du miR-301a, qui a pour cible l'ARNm codant NκRF (NF-κB repressing factor), un répresseur nucléaire de NF-κB, impliqué spécifiquement dans la répression du gène *IL-8/CXCL8*. Il s'en suit une activation du complexe NF-κB (Lu *et al*., 2011). En conclusion, les miR-RNA ont pour cible des effecteurs de la voie de signalisation de NF-κB participant ainsi à un contrôle positif ou négatif de celle-ci.

3. Les voies d'activation du complexe NF-κB

Dans la majorité des cellules, NF-κB est présent dans le cytoplasme sous forme latente, complexé à une protéine IκB. L'activité des complexes NF-κB est régulée selon deux voies principales, en réponse à une large variété de stimuli (cytokines pro-inflammatoires, radiations ionisantes, stress oxydant, divers xénobiotiques) : la voie classique ou canonique et la voie alternative ou non canonique. Il existe également une 3ème voie, moins décrite, aboutissant à l'activation des homodimères p50.

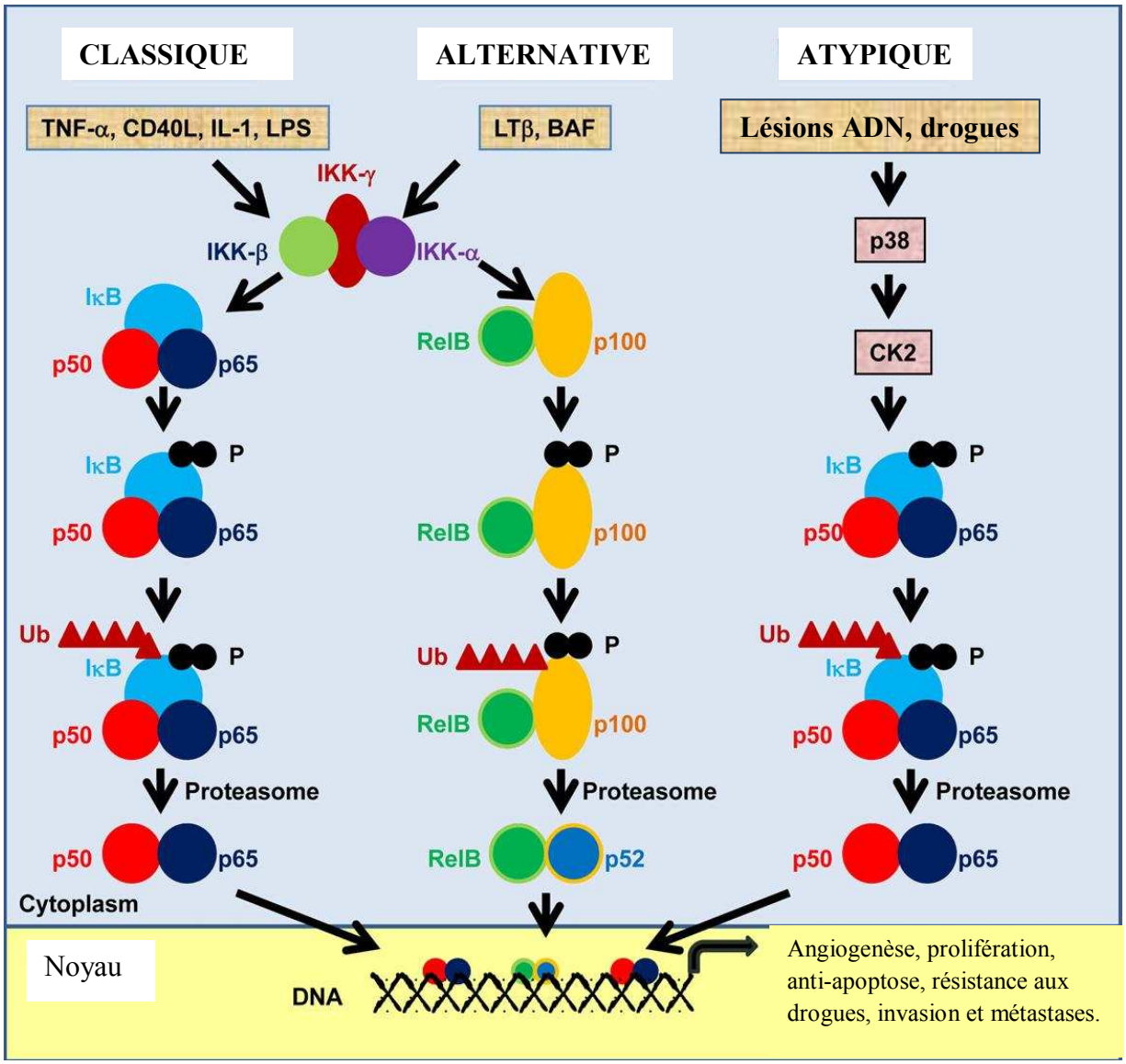


Figure 23 : Représentation schématique des différentes voies d'activation de NF-κB (Morais *et al*., 2011). Le détail est donné dans le texte.

3.1. La voie classique d'activation

La voie canonique est activée depuis un certain nombre de récepteurs comme ceux des cytokines pro-inflammatoires TNFα et IL-1 (Berberich *et al*., 1994 ; Osborn *et al*., 1989 ; Morais *et al*., 2011) et par des produits bactériens ou viraux. Dans le cas du TNFα, sa fixation sur son récepteur spécifique entraîne le recrutement de différentes protéines adaptatrices : TRADD, RIP, TRAF2 et TRAF5. L'événement clé dans l'activation de la voie classique est la phosphorylation de la protéine IκBα au niveau des résidus sérine 32 et 36 situés dans sa partie NH2 terminale. La phosphorylation de l'inhibiteur IκBα dépend de l'activation d'un complexe protéique composé de sérine kinases spécifiques ou IKK (IκB kinase), elle-même phosphorylée par une kinase associée au récepteur du TNFα et appelée TAK1. La kinase IKK est formée de deux sous unités catalytiques, IKKα et IKKβ, et une sous-unité régulatrice IKKγ aussi appelée NEMO (NF-κB Essential MOdulator) (Israel., 2000 ; Morais *et al*., 2011). Dans la voie classique, la phosphorylation de l'inhibiteur IκBα dépend de l'activation d'IKKβ et entraîne alors son ubiquitinylation, puis sa dégradation par le protéasome 26S (Karin et Ben-Neriah., 2000). La dégradation de l'inhibiteur permet de démasquer le signal de localisation nucléaire des sous-unités NF-κB, conduisant ainsi au transport des complexes dans le noyau. Une fois dans le noyau, les dimères NF-κB peuvent alors se fixer sur les séquences promotrices pour activer ou réprimer leurs gènes cibles. Cette voie d'activation s'applique majoritairement aux complexes RelA/p50 et c-Rel/p50 (Figure 23).

3.2. La voie alternative

La voie d'activation alternative est induite par différents stimuli tels que la lymphotoxine β ou le facteur BAFF (B cell Activating Factor) (Claudio *et al*., 2002 ; Saito *et al*., 2003 ; Morais *et al*., 2011). Ces signaux activent une sérine kinase intermédiaire, appelée NIK pour NF-κB Inducing Kinase, interagissant au niveau des récepteurs membranaires. Puis, NIK phosphoryle IKKα. Cette dernière interagit avec le précurseur p100, dont elle phosphoryle plusieurs sérines présentes dans les répétitions ankyrines de l'extrémité carboxy-terminale. Cette phosphorylation entraîne l'ubiquitinylation de p100, qui se retrouve dégradée partiellement du coté C-terminal, libérant ainsi la forme mature p52. La protéine p52 s'associe alors avec la protéine RelB pour former l'hétérodimère p52/RelB. Le complexe NF-κB, ainsi formé et actif, est alors transloqué dans le noyau pour réguler ses gènes cibles (Figure 23).

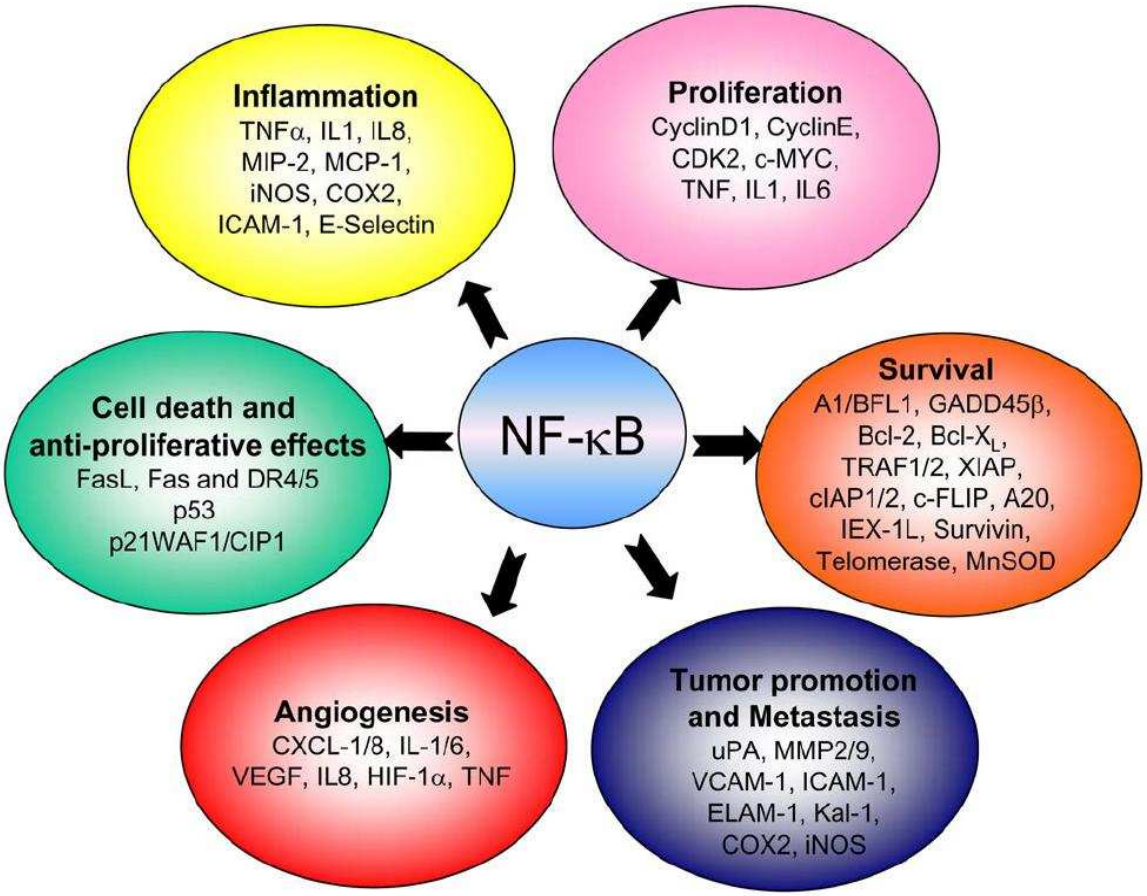


Figure 24 : L'importance biologique de NF-κB dans la croissance et la progression métastatique des tumeurs.

NF-κB exerce ces différentes fonctions dans le développement des tumeurs, en régulant l'expression de nombreux gènes cibles, indiqués sur cette figure. (Survival pour survie ; tumor promotion and metastasis pour promotion tumorale et métastases ; cell death and anti-proliferative effects pour mort cellulaire et effets anti-prolifératifs). (D'après Baud et Karin, 2009).

3.3. Voie « atypique d'activation »

Cette troisième voie est dite atypique car elle est indépendante des kinases IKK. Elle est activée suite à une altération dans l'ADN provoquée par divers agents chimiques ou physiques. Dans cette voie, IκBα est phosphorylée au niveau de son extrémité C-terminale par la sérine thréonine kinase appelée caséine kinase 2 (CKII), elle-même activée par la p38 MAP kinase (Viatour *et al*., 2005 ; Morais *et al*., 2011). Cette MAPK appartient à la famille des MAPK activée dans les cellules exposées à un stress, comme une exposition aux UV (Figure 23).

4. Les rôles biologiques du complexe NF-κB

4.1. Généralités

Les réponses biologiques induites par NF-κB varient d'un type cellulaire à l'autre et selon les signaux activateurs. Elles dépendent du profil d'expression de nombreux gènes régulant notamment la prolifération, l'apoptose ou l'invasion (Figure 24).

Plus de 150 gènes cibles de NF-κB ont été mis en évidence. Nous ne présenterons ici qu'une partie des gènes induits par le facteur de transcription NF-κB. Plusieurs articles et revues ont tenté de répertorier les gènes cibles de NF-κB (Kucharczak *et al*., 2003 ; Lin *et al*., 2010).

NF-κB intervient dans l'inflammation en régulant des gènes majeurs de la réponse inflammatoire comme le TNFα, les interleukines IL-6 et IL-8 (Son *et al*., 2008). Il est connu pour contrôler l'expression de gènes régulateurs du cycle cellulaire comme les cyclines D1 et D2 et CDK6 (Cyclin Dependant Kinase 6) (Iwanaga *et al*., 2008 ; Toualbi-Abed *et al*., 2008 ; Chaturvedi *et al*., 2011). NF-κB a également pour gènes cibles, des gènes codant des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et A20 (Catz et Johnson., 2001). De même, NF-κB est impliqué dans l'angiogenèse, en induisant l'expression de gènes cibles, qui codent des facteurs angiogéniques comme le VEGF (Vascular Enthothelial Growth Factor) (Chilov *et al*., 1997 ; Chaturvedi *et al*., 2011). Enfin, NF-κB, en régulant des gènes cibles comme ceux codant des métalloprotéases ou encore des protéines d'adhésion, joue un rôle important dans les processus de migration et d'invasion des cellules normales au cours du développement, ou des cellules tumorales (Yan *et al*., 2004 ; Chaturvedi *et al*., 2011).

:

Nous porterons notre intérêt uniquement sur le rôle de NF-κB dans le développement des tumeurs

4.2. Rôle de NF-κB dans le développement des tumeurs

4.2.1. Activation constitutive du complexe NF-κB dans les cellules cancéreuses

De nombreuses études révèlent le rôle important que joue NF-κB dans la croissance et la progression métastatique des tumeurs (Naugler *et al*., 2008). L'activation du complexe NF-κB peut dépendre de la production de cytokines par les cellules inflammatoires infiltrant les tumeurs. Cependant, il est observé dans une grande variété de cellules tumorales malignes, une activité constitutive élevée de NF-κB, selon divers mécanismes moléculaires. Dans les cancers de la tête et du cou, des leucémies myéloïdes ou encore dans certains cancers du sein, le mécanisme responsable d'une activité constitutive élevée dans les cellules tumorales peut correspondre à une sécrétion autocrine de médiateurs inflammatoires (chémokines et cytokines comme le TNFα ou IL-1). Dans d'autres cas, des mutations et/ou une surexpression de certains signaux extracellulaires et/ou de leurs récepteurs correspondants, comme celui de l'EGF (Epidermal Growth Factor) par exemple (Fan *et al*., 2005 ; Chaturvedi *et al*., 2011), peuvent être à l'origine d'une activité constitutive élevée de NF-κB. Une expression et/ou une activation aberrante(s) de kinases intervenant dans la voie de signalisation de NF-κB, comme IKK dans les gliomes (Kaur *et al*., 2012), ou encore NIK dans les mélanomes (Dhawan *et al*., 2008), peuvent être la conséquence d'une activation constitutive de ce facteur de transcription. Enfin, très récemment, il a été observé qu'une expression élevée de microARN, ciblant l'ARNm codant IκBα, pouvait être responsable d'une activité constitutive élevée de NF-κB dans certains gliomes (Jiang *et al*., 2012). L'activité constitutive élevée de NF-κB peut également dépendre de réarrangements chromosomiques et d'amplifications géniques qui concernent les gènes codant certaines protéines Rel du complexe NF-κB, comme cela est observé dans certains lymphomes (Jost *et al*., 2007).

Cette activité constitutive de NF-κB peut avoir des conséquences cliniques importantes, comme une diminution de l'efficacité des traitements anticancéreux (chimiothérapie et radiothérapie). C'est pourquoi, l'activité du complexe NF-κB est de plus en

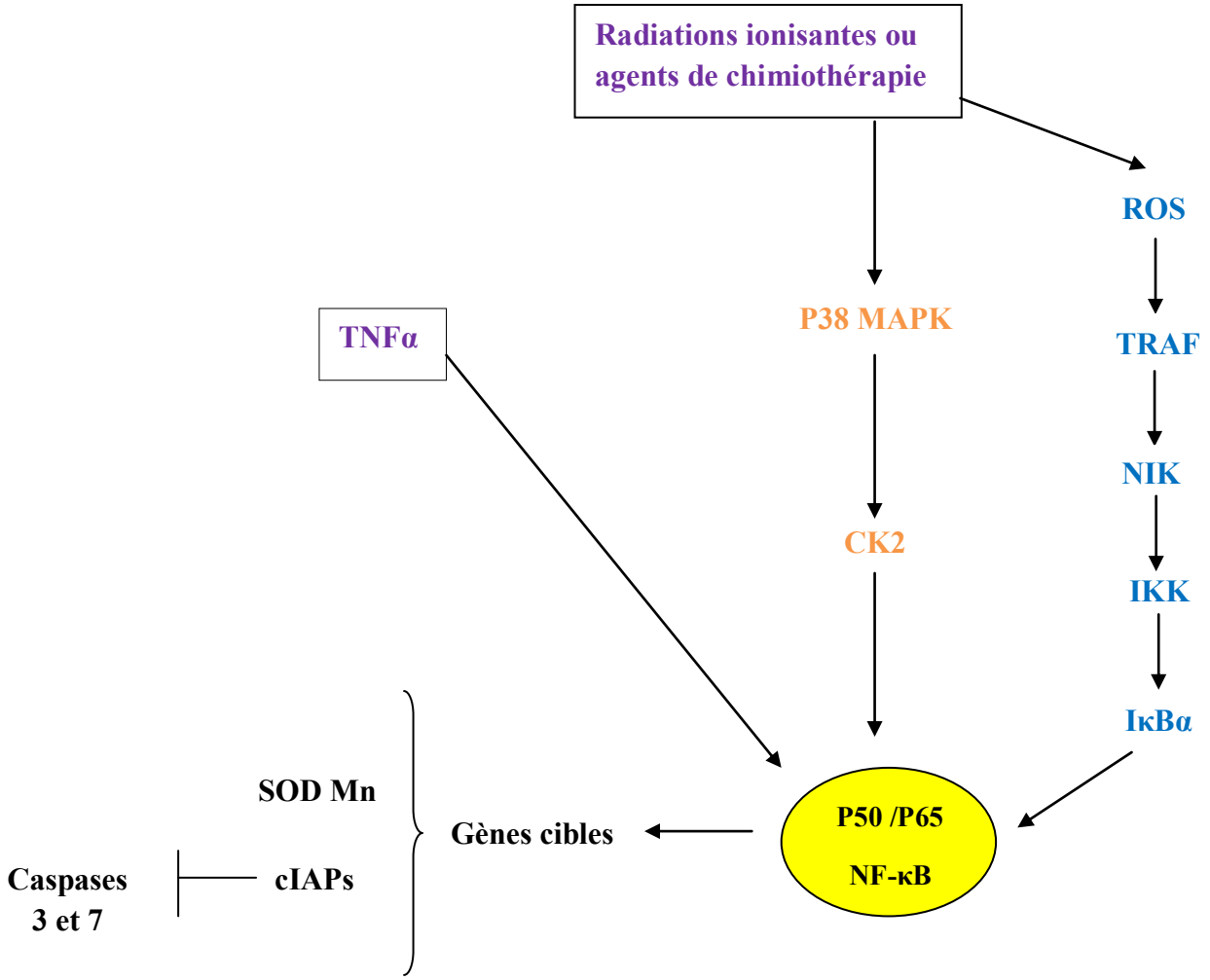


Figure 25 : Mécanismes connus impliqués dans l'activation de NF-κB lors de la résistance aux traitements. NF-κB exerce ses activités anti-apoptotiques à travers la régulation de gènes cibles tels que cIAP 1 ou 2. cIAPs inhibent l'activation des caspases 3 et 7.

plus considérée comme un facteur pronostic en clinique dans les carcinomes ovariens métastatiques (Bratasz *et al*., 2006 ; Yang *et al*., 2011).

4.2.2. Rôle de NF-κB dans la résistance aux traitements anticancéreux

Malgré certaines études contradictoires, un grand nombre d'entre-elles démontrent clairement l'activité anti-apoptotique de NF-κB dans les cellules cancéreuses, expliquant en partie le rôle de ce facteur de transcription dans la résistance aux traitements anticancéreux. Son rôle important dans la survie cellulaire dépend de son implication dans la régulation de gènes dont les protéines correspondantes ont une action anti-apoptotique, telles que les c-IAP (Inhibitor-Apoptosis Protein) 1 et 2, BclxL et la SOD Mn (Chen *et al*., 2001 ; Prasad *et al*., 2010). L'implication de NF-κB dans la survie cellulaire semble primordiale dans la diminution de la réponse des cellules tumorales à certains agents anticancéreux cytotoxiques, ainsi qu'aux radiations ionisantes. Ainsi, les cellules cancéreuses, ayant une activité élevée de NF-κB, présentent une moins grande sensibilité vis-à-vis des agents anticancéreux tels que le cisplatine ou encore le paclitaxel. Ceci a été montré pour des cellules de carcinomes ovariens, de lymphomes ou d'ostéosarcomes (Yang *et al*., 2011 ; Kim *et al*., 2006 ; Staudt *et al*., 2010). De même, les radiations ionisantes utilisées en radiothérapie anticancéreuse peuvent induire une activation de NF-κB, comme dans les cellules cancéreuses de la prostate ou de l'ovaire (Mokym *et al*., 2008). Cette activation de NF-κB correspond à une réponse adaptative, qui en induisant l'expression de la SOD Mn et des c-IAP, peut conduire à une résistance aux radiations ionisantes des cellules cancéreuses (Holley *et al*., 2011).

En dehors des mécanismes soulignés en page 46, conduisant à une activité élevée de NF-κB, ceux qui l'induisent sont encore mal connus.

Les EAO (espèces actives de l'oxygène), générées par la métabolisation des agents anticancéreux cytotoxiques, ou encore par la radiolyse des molécules d'eau sous l'action des radiations ionisantes, peuvent être en partie responsable de l'activation de NF-κB *via* la voie de signalisation impliquant TRAF (Ahmed et Li., 2008), ou impliquant la p38 MAPK selon la voie atypique (Figure 23). Des données récentes rapportent également que l'environnement cellulaire des tumeurs peut être responsable de l'activation de NF-κB dans les cellules tumorales. C'est le cas des macrophages infiltrant les tumeurs, qui en sécrètant du TNFα,

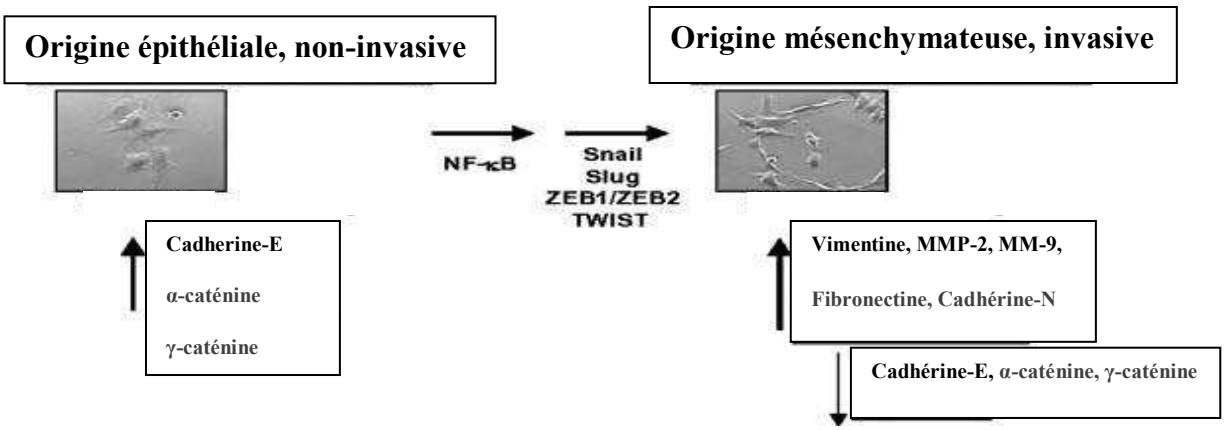


Figure 26 : Importance de NF-κB dans la TEM. L'activation constitutive de NF-κB conduit les cellules tumorales d'origine épithéliale à subir la TEM, pour acquérir des propriétés migratrices et invasives. Cette TEM se traduit par la diminution de protéines d'origine épithéliale et l'expression élevée de marqueurs mésenchymateux dont la plupart des gènes sont régulés par NF-κB (d'après Min *et al.,* 2008).

connu pour activer NF-κB, participent ainsi à la résistance aux traitements anticancéreux. En effet, l'exposition des cellules tumorales au TNFα leur confère une résistance acquise vis-à-vis des radiations ionisantes ou des antracyclines (Ahmed et Li., 2008 ; Cachaco et *al*., 2010).

L'ensemble de ces données de la littérature révèlent donc NF-κB comme un facteur pouvant prédire une diminution de la sensibilité aux agents anticancéreux, et que l'augmentation de son activité est souvent associée à un mauvais prognostic (Prasad *et al*., 2010). C'est pourquoi, NF-κB représente une cible thérapeutique intéressante, pour laquelle, les industries pharmaceutiques ont des molécules inhibitrices en cours de développement.

4.2.3. Rôle dans la prolifération

Certaines données de la littérature suggèrent une implication de NF-κB dans la prolifération des cellules tumorales. En effet, plusieurs gènes cibles de NF-κB codent des protéines impliquées dans la progression des cellules tumorales dans la phase G1/S du cycle cellulaire, telles que les cyclines D1 et E, ou encore c-MYC (Chen *et al*., 2001 ; Prasad *et al*., 2010). L'inhibition de NF-κB entraîne un ralentissement dans la progression du cycle des cellules de glioblastomes ainsi que des cellules HeLa (Chen *et al*., 2001 ; Kaltschmidt *et al*., 1999).

4.2.4. Rôle dans l'invasion des cellules tumorales

NF-κB est impliqué dans le développement de métastases. Ces dernières se forment à partir de cellules tumorales qui subissent une dédifférenciation importante, leur permettant d'acquérir des propriétés migratrices et invasives. Ces nouvelles propriétés correspondent à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), au cours de laquelle une activation importante de NF-κB, passant par la voie classique, est observée (Naugler *et al*., 2008). Une activité élevée de NF-κB est souvent observée dans des cellules tumorales, ayant des capacités importantes de migration et d'invasion, et à développer des métastases. C'est le cas pour des cellules de carcinomes pulmonaires, pancréatiques, prostatiques, ovariens et mammaires (Chen *et al*., 2011 ; Melisi *et al*., 2009 ; Min *et al*., 2010 ; Yang *et al.*, 2012 ; Merkhofer *et al.*, 2010 ; Nakshatri *et al*., 1997).

Les capacités migratrices et invasives, conduisant au développement de métastases, nécessitent que les cellules tumorales subissent la TEM, qui correspond à une perte de caractères d'origine épithéliale, au profit de l'acquisition de caractéristiques mésenchymateuses (Figure 26). NF-κB joue son rôle dans la TEM, en régulant des gènes, impliqués dans le maintien du phénotype épithélial, ou dans l'apparition d'un phénotype mésenchymateux. Ce facteur de transcription a pour gènes cibles, ceux codant d'autres facteurs de transcription, typiquement exprimés au cours de la TEM, tels que Snail, Slug, Zeb1 et 2 et Twist (Chua *et al*., 2007 ; Wu *et al*., 2010 ; Min *et al*., 2008). Ces derniers sont connus pour réprimer des gènes codant des caractères épithéliaux, telles que les protéines de jonctions intercellulaires (cadhérine E, protéine ZO1, desmoplaquines), expliquant la perte d'adhérence entre les cellules épithéliales dans l'étape précoce de la TEM. NF-κB a également des gènes cibles, codant des marqueurs mésenchymateux, tels que la vimentine, la cadhérine N, les MMP1 et 9, ainsi que l'activateur du plasminogène ou uPA. Au cours de la TEM, les cellules tumorales favorisent leurs capacités migratrices et invasives en modifiant la matrice extracellulaire du stroma qu'elles rencontrent. Elles sécrètent ainsi de nombreuses protéines matricielles, dont certains de leur gène correspondant est une cible de NF-κB. C'est le cas de celui codant la fibronectine, la tenascine C les collagènes de type I, 5α1 et 6α1 (Maity *et al*., 2010 ; Midwood *et al*., 2009 ; Medici *et al*., 2009). Enfin, NF-κB a pour gène cible le gène codant le TGFβ1. Ce facteur de croissance est connu pour son rôle dans le maintien des caractères mésenchymateux acquis par les cellules tumorales d'origine épithéliale, leur permettant ainsi de coloniser des tissus cibles divers pour développer des métastases (Massagué *et al*., 2008 ; Tobar *et al*., 2010).

Le pouvoir métastatique des cellules tumorales dépend également de leurs capacités à traverser les vaisseaux sanguins (intravasation) pour se retrouver dans la circulation sanguine. L'intravasation nécessite un mécanisme d'adhérence entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales, par l'intermédiaire de protéines d'adhésion intercellulaires ou I-CAM-1 pour « Intercellular Adhesion Molecule 1», dont le gène est régulé par NF-κB (Lin *et al*., 2010)

4.2.5. Rôle dans l'angiogenèse tumorale

La formation de néo-vaisseaux est essentielle pour la croissance et la progression des tumeurs. Cette néo-angiogenèse dépend de signaux extracellulaires émis par les cellules

:

tumorales et les macrophages infiltrant les tumeurs (Naugler *et al*., 2009). Parmi ces signaux, le principal est le VEGF, dont le gène est une cible de l'activité constitutive ou induite de NF-κB (Basseres *et al*., 2006). Les macrophages infiltrant activent indirectement l'angiogenèse, en sécrétant des cytokines inflammatoires, en particulier le TNFα, qui agissent sur les cellules tumorales en induisant l'activation de NF-κB (Baay *et al*., 2011).

La néo-angiogenèse est également stimulée par des cellules tumorales se trouvant en conditions hypoxiques dans les tumeurs. Dans ces cellules tumorales hypoxiques, l'activation du facteur de transcription, HIF-1α (Hypoxia-Inducible Factor-1α), induit l'expression du VEGF, en interagissant avec NF-κB, en se fixant sur leur élément de réponse concomitant localisés sur la région promotrice du gène (Gorlach *et al*., 2008). Ceci explique la corrélation positive entre l'expression et/ou l'activité de NF-κB et HIF-1α dans les tumeurs, en particulier colorectales et dans certains ostéosarcomes (Van Uden *et al*., 2008 ; Kwon *et al*., 2010).

5. NF-κB dans le cancer du sein

5.1. Activation constitutive du complexe NF-κB

Une activité constitutive élevée de NF-κB est retrouvée dans plus de 50% des lignées tumorales mammaires et contribue à l'initiation et à la progression des cancers du sein (Sovak *et al*., 1997 ; Shostak *et al*., 2011). Plusieurs études ont montré que le complexe NF-κB, formé de l'hétérodimère p50/p65, est constitutivement activé à la fois *in vitro* dans des cellules tumorales et *in vivo* dans des tumeurs mammaires n'exprimant pas le récepteur aux œstrogènes (ER négatives). Ce même constat a été vérifié dans des tumeurs ErbB2 positives (Biswas *et al*., 2004). Ces tumeurs ER négatives et/ou ErbB2 positives sont d'ailleurs généralement plus agressives et sont souvent à l'origine de métastases. Au contraire, les cellules cancéreuses mammaires ER positives et non métastatiques telles que les cellules de la lignée MCF-7 présentent une expression faible de NF-κB. (Nakshatri *et al*., 1997). Une étude suggère que ERα inhiberait la néosynthèse de NF-κB dans ces cellules cancéreuses mammaires ER positives selon un mécanisme encore mal défini (Belguise *et al*., 2007).

Les mécanismes moléculaires expliquant l'activation constitutive de NF-κB dans les cellules tumorales mammaires agressives sont encore mal connus. Dans le cas des cellules tumorales HER2 et/ou IGFR positives, elle dépend de la voie de signalisation déclenchée par

:

la fixation de l'EGF ou l'IGF-1, correspondant à la voie de survie cellulaire et faisant intervenir la PI3K et AKT. Ces kinases ont pour cibles, d'une part la protéine p65 du complexe NF-κB, d'autre part IKKβ, qui phosphoryle à son tour IκBα (Sliva *et al*., 2002 ; Pianetti *et al*., 2001).

Il a également été rapporté que l'activation constitutive de NF-κB dans les cellules tumorales mammaires « basal like », triple négatives, résulterait d'une expression forte de NIK (NF-κB-Inducing Kinase), une protéine impliquée dans l'activation des kinases IKK (I κB kinase), suite à des modifications épigénétiques de son gène, comme l'acétylation des histones H3 (Yamamoto *et al*., 2010). De même, une autre étude avait montré antérieurement que l'activité constitutive de NF-κB pouvait dépendre d'une expression aberrante des kinases, directement impliquées dans le contrôle de la stabilité d'IκBα, s'agissant des IKK et de la caséine kinase II (Romieu-Mourez *et al*., 2001).

Lorsque les tumeurs mammaires se trouvent dans un environnement inflammatoire et hypoxique, l'activation constitutive du complexe NF-κB peut dépendre également d'une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα. Ce dernier est sécrété par les macrophages infiltrant les tumeurs. La fixation du TNFα sur son récepteur, conduit à la phosphorylation de la protéine IκBα, par l'intermédiaire d'une cascade de kinase dépendant de la kinase associée au récepteur du TNFα (TAK1) et d'IKKβ (Aggarwal *et al*., 2003).

5.2. NF-κB dans les capacités migratrices et invasives des cellules tumorales mammaires.

Plus haut (paragraphe 4.2.4), nous avons décrit l'importance de NF-κB dans les capacités de migration et d'invasion des cellules cancéreuses et dans le développement de métastases. Les cellules cancéreuses mammaires ER négatives, comme les cellules de la lignée MDA-MB231, pouvant être HER2 positives telles que les cellules SKBR3, présentent une activité constitutive de NF-κB, associée à de fortes capacités invasives et un haut pouvoir métastatique, en subissant le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse. Pour les cellules tumorales mammaires, cette transition épithélio-mésenchymateuse correspond à un ensemble de mécanismes moléculaires déjà décrits dans le paragraphe 4.2.4.

La TEM intervient de manière prépondérante dans l'évolution de certaines tumeurs mammaires, vers un potentiel métastatique, en conférant aux cellules tumorales des propriétés

:

mésenchymateuses au profit d'une perte du phénotype épithélial. Nous avons décrit dans le paragraphe 4.2.4 page 49, combien NF-κB joue un rôle important dans la TEM, en régulant négativement des gènes impliqués dans le maintien de caractères épithéliaux, et au contraire positivement des gènes codant des protéines caractéristiques d'un phénotype mésenchymateux. Ce rôle important de NF-κB dans la TEM a été démontré dans les cellules immortalisées MCF-10A, qui dérivent de cellules épithéliales mammaires normales. Ces cellules, lorsqu'elles surexpriment la protéine p65 du complexe NF-κB, subissent la TEM, caractérisée par la répression de la cadhérine E et par une augmentation des facteurs de transcription Snail, ZEB1 et ZEB2 (Wu *et al*., 2010 ; Chua *et al*., 2007). En effet, comme décrit dans le paragraphe 4.2.4, NF-κB régule des gènes codant des facteurs de transcription exprimés au cours de la TEM, tels que Snail, ZEB1 et 2 (Zinc finger E-box binding homeobox 1/2) (Chua *et al*., 2007 ; Min *et al*., 2008). Ces facteurs de transcription répriment des gènes codant des caractères épithéliaux, telle que la protéine cadhérine E (Wu *et al*., 2010). Cette dernière est exprimée dans les cellules cancéreuses mammaires non métastatiques, présentant une activité faible de NF-κB, telles que les cellules MCF-7 et T47D.

NF-κB a également des gènes cibles codant des marqueurs d'origine mésenchymateuse, dont il régule positivement et directement l'expression, tels que la vimentine, la cadhérine N, la MMP-9 ou encore l'activateur du plasminogène uPA (Himelstein., 1997 ; Kalluri *et al*., 2009 ; Sliva *et al*., 2001). La vimentine est très souvent surexprimée dans les lignées tumorales mammaires agressives, en relation avec leurs fortes capacités de migration et d'invasion (Gilles *et al*., 2003). Une étude montre que la surexpression de la vimentine après introduction de son gène, permet aux cellules tumorales mammaires MCF-7 non-invasives d'acquérir des capacités invasives. Inversement, l'inhibition de l'expression de la vimentine, par une stratégie utilisant des ARN antisens, entraîne une diminution des capacités invasives des cellules tumorales mammaires MDA-MB231 (Hendrix *et al*., 1997). Dans le même sens, une étude immunohistologique, réalisée sur des échantillons cliniques de tumeurs mammaires, provenant de patientes atteintes d'un cancer du sein, révèle que l'expression de la vimentine est observée de façon prédominante dans les carcinomes canalaires de haut grade et exprimant peu ERα (Korsching *et al*., 2005). Dans le cas de la MMP-9, qui participe au phénotype invasif des cellules tumorales en dégradant la matrice extracellulaire, son expression est souvent associée à une forte agressivité des tumeurs mammaires et donc à un mauvais pronostic des cancers du sein (Vizoso *et al*., 2007 ; Kalluri *et al*., 2009). Les cellules tumorales mammaires invasives

:

sécrètent également de l'uPA, une sérine protéase capable de remodeler la matrice extracellulaire, en convertissant spécifiquement le plasminogène en une molécule active, la plasmine. Les cellules tumorales hautement métastatiques telles que les cellules MDA-MB231 et SKBR3 qui présentent une activité constitutive de NF-κB, sécrètent constitutivement de l'uPA contrairement aux cellules non-invasives (Sliva *et al*., 2002 ; Merkhofer *et al*., 2010 ; Foekens *et al*., 2000).

NF-κB, activé de façon constitutive, permet également aux cellules tumorales mammaires de développer des relations avec le microenvironnement tumoral, une étape importante pour le développement de métastases, ceci en régulant certains gènes cibles. C'est le cas en particulier du gène cible codant le TGFβ1. Ce dernier intervient dans la communication entre les cellules tumorales et les fibroblastes associés aux tumeurs. Sous l'action du TGFβ1, ces fibroblastes sécrètent le SDF-1 (Stromal cell-Derived Factor-1), une chémokine qui participe à l'activation des capacités invasives des cellules tumorales mammaires. Ce SDF-1 agit sur son récepteur appelé CXCR4, présent à la surface des cellules tumorales mammaires, dont le gène est également une cible de NF-κB et dont la surexpression est corrélée à de fortes propriétés invasives (Drabsch *et al*., 2011 ; Helbig *et al*., 2003 ; Muller *et al*., 2001). Enfin, le TGFβ1 participe également au développement de métastases au sein du tissu osseux. Les cellules tumorales mammaires invasives, interagissent avec les ostéoclastes du tissu osseux, par l'intermédiaire du TGFβ1 qu'elles sécrètent mais également un autre médiateur dont l'expression est induite par ce dernier, tel que le CTGF pour « Connective Tissue Growth Factor ». Cette interaction cellulaire conduit à l'activation des ostéoclastes, dont l'activité ostéolytique favorise ainsi la nidation au sein du tissu osseux des cellules tumorales métastatiques d'origine mammaire (Drabsch *et al*., 2011 ; Kakonen *et al*., 2002 ; Tian *et al*., 2003).

5.3. NF-κB et la résistance aux traitements anticancéreux dans les cellules tumorales mammaires

L'importance de NF-κB dans la résistance aux traitements anticancéreux, que ce soit de la chimiothérapie ou de la radiothérapie, des cellules tumorales mammaires, n'est pas encore clairement définie. Certains agents cytotoxiques activent NF-κB (Lin *et al*., 2010). C'est le cas du paclitaxel, un agent anti-mitotique et pro-apoptotique appartenant à la famille

des taxanes, qui en activant NF-κB, agit plus faiblement sur les cellules tumorales mammaires. Il a été montré que cette diminution d'efficacité du paclitaxel résultait d'une forte augmentation de l'expression des gènes cibles de NF-κB, comme la SOD Mn et cIAP2 (Patel *et al*., 2000). De même, la résistance à un agent anticancéreux comme le tamoxifène, utilisé dans le traitement des cancers du sein hormono-dépendants, peut dépendre de l'activation exacerbée de la voie PI3K/AKT, entraînant ainsi l'activation de NF-κB (DeGraffenried *et al*., 2004).

Les radiations ionisantes utilisées en radiothérapie peuvent également activer NF-κB par la voie atypique (Figure 23) dans les cellules cancéreuses mammaires, qui à son tour induit l'expression de gènes cibles tels que la MMP9, de l'uPA et de la SOD Mn. Il en résulte une diminution de l'efficacité du traitement (Kunigal *et al*., 2008 ; Mokym *et al*., 2008). Actuellement, NF-κB est considéré comme un facteur important dans la résistance aux radiations ionisantes.

Enfin, d'autres mécanismes impliquant NF-κB pourraient participer directement au mécanisme de résistance à certains agents cytotoxiques, pouvant être efflués des cellules tumorales mammaires par la glycoprotéine transmembranaire P ou pGp. En effet, cette glycoprotéine est codée par le gène *MDR1* (Multidrug Resistance 1), dont NF-κB induit l'expression (Lin *et al*., 2012 ; Akman *et al*., 1990).

Dans le laboratoire, la recherche, l'identification et la caractérisation de marqueurs protéiques, permettant de mieux comprendre le développement des tumeurs mammaires et de prédire leur progression vers un statut métastatique, nous a conduit, depuis quelques années, vers une protéine appelée Damaged DNA-Binding 2 (DDB2). En dehors de son rôle bien décrit dans la réparation de l'ADN par excision des nucléotides lésés, la protéine DDB2 a été montrée par le laboratoire d'accueil, jouant un rôle dans la prolifération des cellules tumorales mammaires, en exerçant une activité sur la transcription génique. Un travail préliminaire d'analyse transcriptomique globale, visant à rechercher d'autres gènes cibles potentiels, nous a d'ailleurs amenés vers celui codant IκBα. D'autres activités biologiques de DDB2 récemment mises en évidence apparaissent dans la littérature.

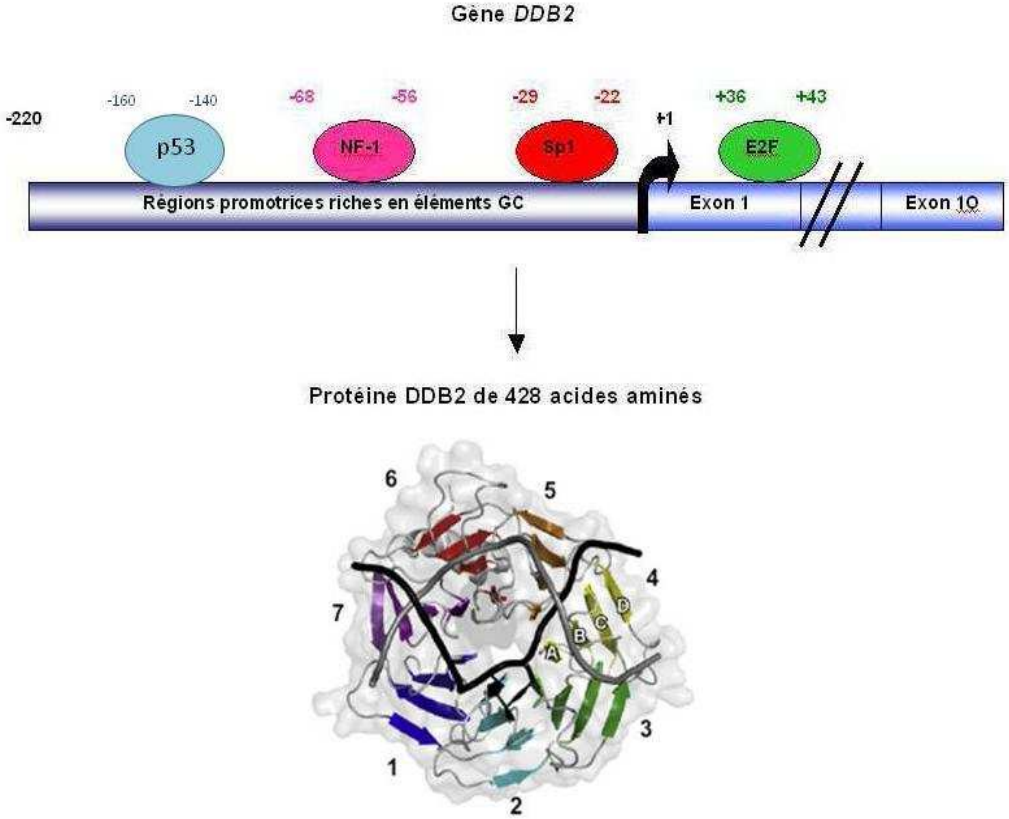


Figure 27: Représentation schématique de la structure du gène et de la protéine humaine DDB2. Le gène *DDB2* est constitué de 10 exons et code une protéine de 48 kDa. La région promotrice présente plusieurs éléments de réponse fixant les facteurs de transcription p53, NF-1, Sp1 ou E2F. La structure de la protéine est divisée en 7 domaines (numérotés sur la figure) comportant des motifs répétés WD40 ainsi qu'un motif hélice boucle hélice en N-terminal. Chaque domaine WD40 comporte 4 feuillets β indiqués A, B, C et D sur la figure. (D'après Scrima *et al*., 2008).

IV. LA PROTEINE DAMAGED DNA-BINDING 2 (DDB2)

1. Structure du gène et de la protéine

La protéine humaine "Damaged DNA-Binding 2" (DDB2), a été identifiée pour la 1ère fois dans le placenta humain (Feldberg *et al*., 1982), au sein d'un complexe protéique appelé DDBP (Damaged DNA-Binding protein). DDBP se présente sous la forme de deux sous-unités, respectivement de 127 kDa, appelée DDB1, et de 48 kDa ou DDB2. Les gènes respectifs de ces deux sous-unités sont localisés sur le chromosome 11 (Dualan *et al*., 1995). Tandis que le gène codant DDB1 est très conservé chez les eucaryotes, celui codant DDB2 est identifié uniquement chez les mammifères (Tang et Chu., 2002). DDB1 est exprimée de manière constitutive alors que DDB2 est codée par un gène inductible lors d'une exposition aux ultraviolets ou UV. La protéine DDB2 présente une localisation exclusivement nucléaire, tandis que la protéine DDB1 se trouve à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Tang et Chu., 2002).

La protéine DDB2, composée de 428 acides aminés, est la mieux connue des deux sous-unités du complexe DDBP. Elle possède plusieurs domaines dans sa structure et contient deux séquences d'adressage vers le noyau du côté N-terminal, expliquant la localisation exclusivement nucléaire de cette protéine (Inoki *et al*., 2004). La protéine DDB2 présente un domaine N-terminal, sous la forme d'une hélice-boucle-hélice comme structure. De plus, elle possède un domaine constitué de feuillets β et renfermant 7 répétitions tryptophane-acide aspartique, appelées motifs WD40, caractéristique des protéines interagissant avec la chromatine. Le domaine N-terminal intervient dans l'interaction avec DDB1, tandis que les motifs WD40 permettent à DDB2 d'interagir avec des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, telles que XPC-hHR23B, XPA et RPA (replication protein A) (Liu *et al*., 2000), ou dans la régulation de la transcription telle que CBP (CREB Binding Protein)/p300. Ces motifs assurent également la reconnaissance des lésions de l'ADN, particulièrement par l'intermédiaire d'une boucle formée de 3 acides aminés (Phe-Gln-His) et située entre les feuillets β (Scrima *et al*., 2008 ; Scrima *et al*., 2010).

Le gène est constitué de 10 exons, à l'origine de variants protéiques produits par épissage alternatif, qui ont été caractérisés dans les cellules HeLa. Ces variants jouent le rôle de dominants négatifs de la protéine DDB2 sauvage, sur l'activité DDBP (Inoki *et al.,* 2004).

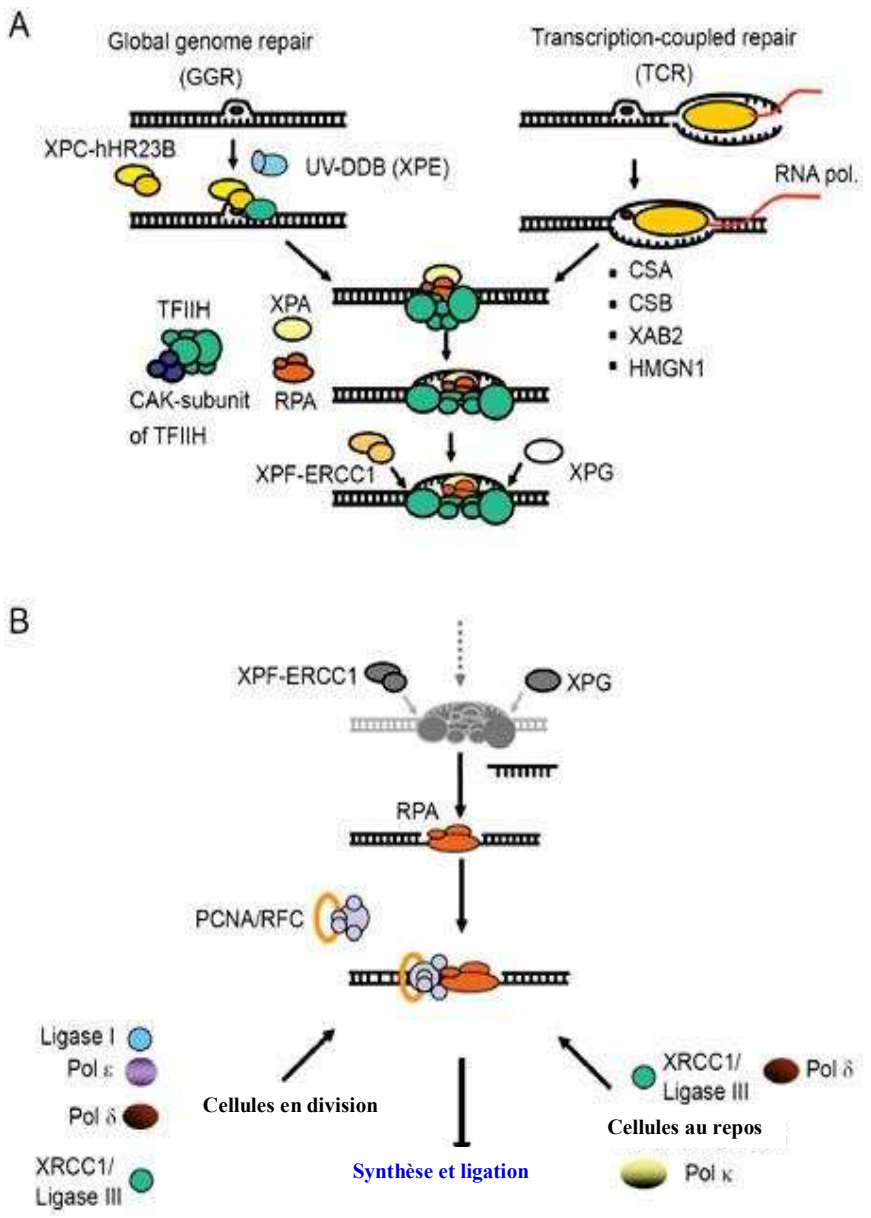


Figure 28: Mécanisme de réparation par excision de nucléotides (NER).

(A) Il existe deux voies du NER selon que la lésion provoquée par les UV se trouve dans l'ADN non transcrit (GGR pour global genome repair) ou l'ADN transcrit (TCR pour transcription-coupled repair). Ces voies ne diffèrent que par le mode de détection de la lésion: par les complexes XPE (DDB1/DDB2) et XPC-hHR23B (XP pour *Xeroderma Pigmentosum*) dans le cas du GGR, et par le blocage de la machinerie de transcription dans le cas du TCR. Pour le TCR, les molécules CSA et CSB (Cocaine Syndrome A et B) participent à la détection du dommage au même titre que l'ADN polymérase impliquée dans la synthèse du brin. Une fois détectée, la lésion est rendue accessible pour les autres protéines de la réparation par maintien de l'ouverture de la double hélice grâce aux deux helicases XPB et XPD du complexe TFIIH. (B) Les nucléases XPG et XPF-ERCC1 effectuent alors l'excision d'une partie du brin endommage puis l'ADN polymérase effectue une nouvelle synthèse de brin et la ligation est assurée par l'ADN ligase (d'après Van Hoffen *et al*., 2003).

La régulation de l'expression de DDB2 est peu connue. Il a été rapporté seulement que BRCA1 et p53 sont capables d'activer le gène *DDB2*. En effet, BRCA1 augmenterait la liaison de p53 sur son élément de réponse localisé au niveau de -145 pb du site d'initiation de la transcription dans le promoteur proximal du gène et activer ainsi sa transcription (Takimoto *et al*., 2002 ; Roy *et al*., 2012). De plus, p53 régule l'expression basale du gène *DDB2* et ceci même en l'absence de lésions sur l'ADN (Hwang *et al*., 1999). Les études suivantes, réalisées sur les cellules HeLa, ont montré que le promoteur proximal du gène (220 pb du site d'initiation de la transcription) est composé de régions riches en éléments GC et qu'il ne possède pas de boîte TATA. Plus précisément, l'analyse de cette région a permis de mettre en évidence de multiples éléments de réponses de facteurs de transcription, comme NF-1 (-104 à 92 pb), Sp1 (-123 à -115 pb), N-myc (-56 à -51 pb) ou encore E2F1 (+36 à +43 pb) (Figure 27) (Nichols *et al*., 2003).

2. Activités biologiques

2.1. Réparation de l'ADN endommagé par les UV

2.1.1. DDB2 dans la structure du complexe DDBP

DDB2 fait partie du complexe DDBP qui participe à la réparation par excision de nucléotides (NER) de lésions de l'ADN induites par les UV, les radiations ionisantes, des agents alkylants ou des générateurs d'EAO (Tang et Chu., 2002 ; Moser *et al*., 2005 ; Roy *et al*., 2012) (Figure 28). Une déficience du système NER est associée à une maladie génétique autosomique récessive appélée *Xeroderma Pigmentosum* (XP) prédisposant au cancer de la peau induit par les UV. Les cellules de ces malades présentent une capacité réduite à réparer les lésions de l'ADN. Les patients atteints de *Xeroderma pigmentosum* présentent de nombreux troubles cutanés et leur risque de développer un mélanome est de 2000 fois supérieur à celui d'un individu sain (Chu et Chang., 1988 ; Keeney *et al*., 1994). Les travaux sur la maladie ont permis de mettre en évidence 7 groupes de complémentation : XP-A, XP-B, XP-C, XP-D, XP-E, XP-F et XP-G. Ces groupes correspondent tous à des protéines impliquées dans le système NER auxquelles ils ont donné leur nom (XPA à XPG). Les malades porteurs de mutations au niveau de l'un de ces 7 gènes ou complexes sont donc déficients pour le mécanisme de réparation NER. C'est le cas du groupe E (XP-E), qui présente une déficience du complexe protéique DDBP. Cette déficience est associée à des

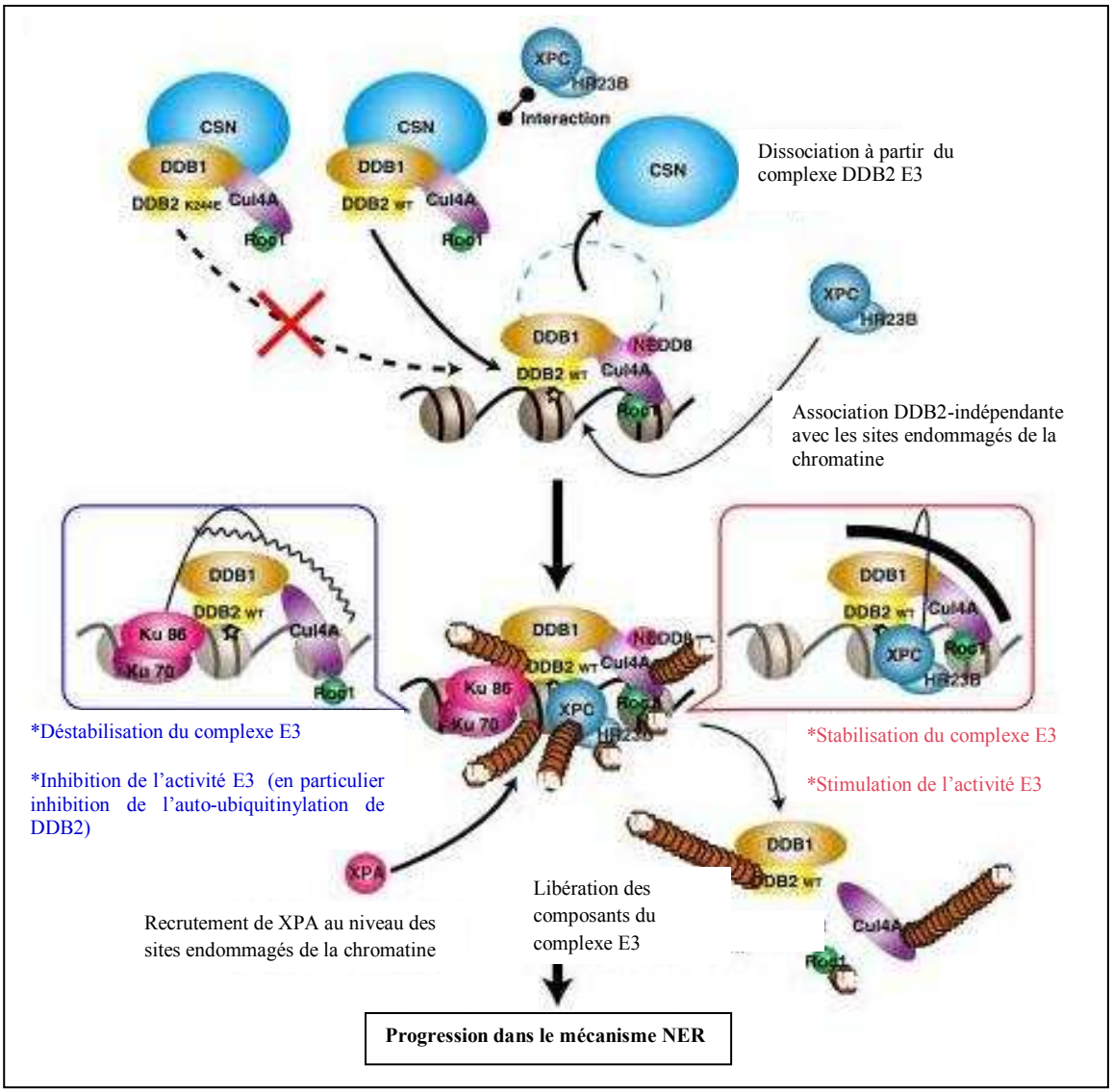


Figure 29: Régulation du complexe DDBP/Cul4A/Roc1. Sans irradiation aux UV, l'activité E3 ligase du complexe DDB2 est supprimée par le CSN (signalosome COP9). En réponse à une irradiation aux UV, le complexe se lie à l'ADN lésé, conduisant ainsi à la dissociation de ce dernier avec le CSN. En conséquence, l'activité E3 du complexe est stimulée. La protéine XPC, qui lie les sites endommagés grâce à sa propre activité de liaison, stabilise et interagit avec le complexe DDB2. Au contraire, Ku déstabilise ce complexe, notamment en inhibant l'auto-ubiquitinylation de DDB2 (d'après Takedachi *et al*., 2010).

mutations dans la partie codante du gène *DDB2* (Nichols *et al*., 1996 ; Nichols *et al*., 2000). L'injection de DDB2 dans des fibroblastes provenant de patients du groupe E suffit à la restauration de l'activité du complexe DDBP et à une diminution de la sensibilité aux UV (Chu et Chang., 1988).

Puis la protéine DDB1 interagit avec DDB2 pour former le complexe DDBP, mais également avec deux autres protéines, ROC1 et Culline-4A (Cul-4A). Cette dernière possède une activité E3 ligase (Nag *et al*., 2001 ; Li *et al*., 2006 ; Stoyanova *et al*., 2009). Il a été montré que des mutants XP-E de DDB2 sont incapables de lier la CUL4A. Ces observations suggèrent donc l'importance de l'association DDB2-Cul-4A dans le mécanisme NER (Stoyanova *et al*., 2009). Le complexe DDBP-Cul-4A ainsi formé est régulé négativement par le complexe Ku (Takedachi *et al*., 2010). En effet, l'équipe de Takedachi et Tanaka a récemment montré que le complexe Ku, formé de l'hétérodimère Ku70/Ku86, régule négativement l'activité E3 ligase du complexe DDB2 par une déstabilisation de ce dernier (Figure 29). Ku est principalement connue pour son implication dans la réparation des lésions double brin (DSB) mais également pour son rôle dans la compaction de la chromatine (Takedachi *et al*., 2010 ; Bailey *et al*., 1999 ; Thrower *et al*., 2001).

L'activité du complexe DDBP dépend de BRCA1 et de p53, qui interviennent dans l'activation de l'expression du gène de *DDB2* (Hartman et Ford., 2003). En effet, BRCA1 stabiliserait la liaison de la protéine p53 sur le promoteur du gène *DDB2* pour activer sa transcription (Takimoto *et al*., 2002 ; Roy *et al*., 2012). Cependant, une étude réalisée sur des fibroblastes humains, dans lesquels la protéine p53 est inactivée, révèle que l'expression basale de DDB2 est suffisante pour amorcer la réparation de l'ADN endommagé par les UV (Fitch *et al*., 2003). Enfin, une autre étude rapporte que la régulation de l'activité du complexe DDBP dans la réparation par excision de nucléotides suite à une irradiation aux UV, dépend de la p38 MAPK, qui accélère la dégradation de la protéine DDB2 en la phosphorylant (Zhao *et al*., 2008).

2.1.2. DDB2 dans la reconnaissance des lésions induites de l'ADN

Dans le complexe DDBP ainsi formé, c'est la protéine DDB2 qui reconnait les différentes lésions de l'ADN tels que les dimères de cyclobutane pyrimidique, les sites apuriniques et apyrimidiques et les mésappariements (Wittschieben *et al*., 2005). Dès la reconnaissance de la lésion par la protéine DDB2, le complexe semble jouer un rôle

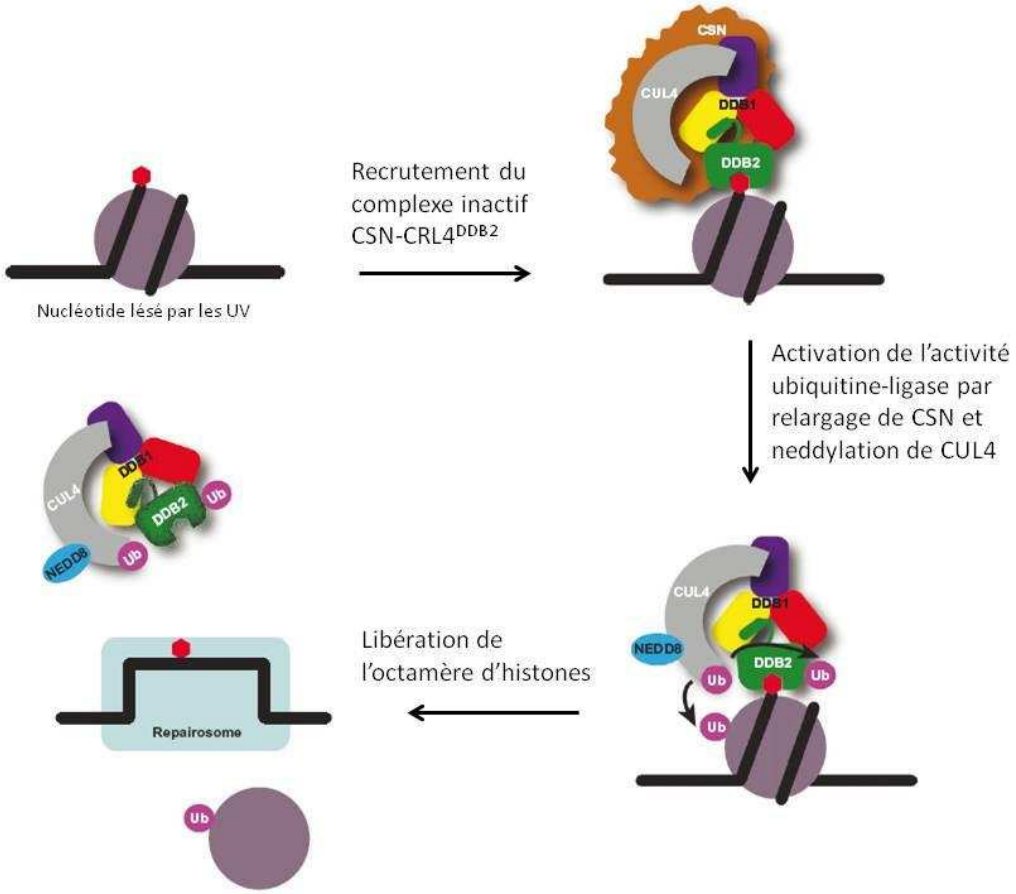


Figure 30 : Rôle DDB2 dans le système NER. La reconnaissance de nucléotides lésés par DDB2 provoque le recrutement d'un complexe multi-protéique faisant notamment intervenir DDB1, CSN, Cul4A. La neddylation du complexe entraîne l'activation de l'ubiquitine ligase sur DDB2. L'ubiquitinylation de cette dernière entraîne sa dégradation par le protéasome. L'octamère d'histones, représenté par une sphère grise, est lui aussi ubiquitinylé, puis se détache de la région où le(s) nucléotide(s) lésé(s) se situe(nt) pour laisser place à la machinerie de réparation (repairosome), constituée d'une succession de protéines, qui conduiront à l'élimination de la ou les lésion(s), et à son remplacement par un ou des nucléotide(s) correct(s). (D'après Scrima *et al*., 2011).

accessoire en permettant le recrutement de protéines indispensables pour l'excision du nucléotide endommagé. Il permet également d'activer la réparation génomique globale (Figure 28) (Hwang *et al*., 1999).

La présence de DDB1 est indispensable au sein du complexe pour la reconnaissance du nucléotide endommagé, car la protéine DDB2 seule, ne présenterait pas d'activité de liaison sur l'ADN lésé (Keeney *et al*., 1993). Lorsque les nucléotides sont reconnus par DDB2, celle-ci s'associe avec le complexe protéique XPC-hHR23B, qui est indispensable pour le recrutement d'autres protéines impliquées dans le mécanisme de réparation par excision de nucléotides telles que XPA ou RPA (Fitch *et al*., 2003 ; Fei *et al*., 2011). XPC régule l'activité E3 ligase du complexe DDB2. En effet, XPC serait non seulement un substrat de l'activité E3 ligase, mais il agirait également comme un stimulateur en stabilisant le complexe autour des sites endommagés (Takedahi *et al*., 2010). A la suite de cette interaction avec le complexe XPC-hHR23B, la protéine DDB2 est ubiquitinylée par l'activité E3 ligase de la Cul-4A, dont l'activité est dépendante d'une phosphorylation par l'oncoprotéine tyrosine kinase c-Abl (Chen *et al*., 2006). Avant qu'elle soit dégradée par le protéasome 26S, l'ubiquitinylation de DDB2 entraîne le détachement du complexe DDBP-Cul-4A-ROC1 des nucléotides endommagés (Li *et al*., 2006, El-Mahdy *et al*., 2006). L'auto-ubiquitinylation de la cul-4A est également impliquée dans le détachement de l'ensemble de la région lésée de l'ADN (Sugasawa *et al*., 2005) (Figure 30).

2.1.3. Rôle de DDB2 dans la relation entre réplication et réparation de l'ADN

La réparation de la lésion par le système NER nécessite un arrêt de la réplication de l'ADN. Il a été montré une interaction physique avec des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN et le complexe DDBP-Cul-4A-ROC1, ce qui a pour conséquence un arrêt de la réplication de l'ADN endommagé. La protéine DDB1 associée à la Culline-4A interagit avec la protéine Cdt2. Cdt2 est une protéine de la famille DCAF (DDB1 and Cul-4A-associated Factors) qui interagit avec la chromatine grâce à ses domaine WD40. Elle catalyse la dégradation de la protéine Cdt1, décrite pour interagir avec la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) pour initier la réplication. En effet, Cdt1 se lie par le biais de son domaine PIP (PCNA Interacting Peptide) à PCNA au niveau des fourches de réplication. Cdt1 liée à PCNA est reconnue par le complexe Cul-4A-DDB1-Cdt2 conduisant à sa dégradation

par le protéasome. L'inactivation de ce facteur dans le début de la phase S permet de contrôler l'initiation de la réplication. La dégradation de Cdt1 conduit donc à un blocage de la réplication de l'ADN endommagé (Senga *et al*., 2006 ; Kim et Kipreos., 2007). De même, il a été montré une 2ème interaction conduisant à un arrêt de la réplication. Cette interaction dépend d'une association entre la protéine DDB2 et la claspine, une protéine connue pour son rôle dans le contrôle de l'arrêt de la réplication lorsque l'ADN est lésé. La claspine est une protéine adaptatrice capable de lier BRCA1 et CHEK1 (Chekpoint Kinase 1) pour faciliter leur phosphorylation (ATR-dépendante) lors d'un stress induit par les UV, entraînant ainsi un arrêt de la réplication et une inhibition dans la progression dans le cycle cellulaire (Praetorius-Ibba *et al*., 2007). D'après les auteurs de cette étude, cette interaction semble indispensable pour activer la protéolyse de DDB2 en même temps que l'arrêt de la réplication est indispensable pour la réparation de l'ADN (Praetorius-Ibba *et al*., 2007).

Il est également connu que la réparation par le système NER implique la protéine p53, dont le niveau d'expression est contrôlé par le complexe DDBP-Cul4A-ROC1. Lorsque des lésions de l'ADN sont détectées dans la cellule, la protéine p53 est rapidement phosphorylée par le complexe ATM/ATR (Ataxia Telangiectasia Mutated /ATM anti-Rad3 related protein kinase) avant d'induire l'expression de ses gènes cibles comme p21 Waf1/Cip1, puis d'être dégradée. A partir d'un modèle de fibroblastes embryonnaires de souris invalidées pour le gène *DDB2*, il a été montré que la dégradation de la protéine p53 dépend de DDB2 au cours de la réparation de l'ADN. En effet, la protéine DDB2, en facilitant le passage de DDB1 dans le noyau, active la formation du complexe DDBP-Cul-4A-ROC1, qui en coopérant avec la protéine MDM2, active la dégradation de p53, se traduisant par une diminution de l'expression de la p21 Waf1/Cip1 (Banks *et al*., 2006 ; Stoyanaova *et al*., 2008).

2.2. Remodelage de la chromatine

La présence des domaines répétés de type WD40 dans la structure de la protéine DDB2 a conduit certains auteurs à penser que cette protéine pourrait jouer un rôle dans le remodelage de la chromatine. En effet, ces répétitions sont présentes dans des protéines telles que le complexe STAGA ou la CBP/p300, qui appartiennent à la famille des histones acétyltransferases et qui participent activement au remodelage de la chromatine, indispensable pour la transcription des gènes (Otrin *et al*., 1997 ; Martinez *et al*., 2001 ; Datta *et al*., 2001). Certaines études ont permis de démontrer l'implication de la protéine DDB2 dans le

remodelage de la chromatine lors de la réparation de l'ADN lésé facilitant probablement l'accès des protéines de réparation aux lésions de l'ADN (Luijsterburg *et al*., 2012). Suite à l'activation du complexe DDBP-Culline-4A-ROC1 au niveau de la région lésée de l'ADN, la protéine DDB2 activerait la mono-ubiquitinylation des histones H2A, H3 et H4 (Li *et al*., 2012 ; Kapetanaki *et al*., 2006 ; Wang *et al*., 2006). La modification de ces histones désagrègerait les nucléosomes, entraînant ainsi une relaxation de la chromatine autour de la région endommagée de l'ADN. L'équipe de Rapic-Otrin a révélé la présence de la Culline-4B, un paralogue de la Culline-4A, formant un complexe DDBP-Culline-4B-ROC1. Elle montre que la Culline-4B favorise la translocation nucléaire de DDB1, même lorsque DDB2 est absente, et qu'elle augmente l'efficacité du système NER comme la Culline-4A, en modifiant la structure de la chromatine par ubiquitinylation de l'histone H2A (Guerrero-Santoro *et al*., 2008). Cependant, il existe une activité du complexe DDB1-Cul-4A-ROC1 sur le remodelage de la chromatine, d'une façon indépendante de la protéine DDB2, puisque ce complexe a été montré d'une part capable d'interagir avec plusieurs protéines ayant des domaines répétés de type WD40 et d'autre part capable de réguler la méthylation des histones H3 (Higa *et al*., 2006).

Il a également été décrit que DDB2 peut interagir avec certains facteurs de remodelage de la chromatine, tels que le complexe STAGA ou encore SWI/SNF, ou INO80, ce qui faciliterait la relaxation de la chromatine, nécessaire à l'activité de réparation des lésions de l'ADN. En particulier, l'interaction entre DDB2 et la sous-unité ATP-synthase Brg1 (Brahma-Related Gene 1) du complexe SWI/SNF entraîne l'ouverture de la chromatine permettant ainsi l'accessibilité des protéines de réparation aux lésions (Kapetanaki *et al*., 2006 ; Wang *et al*., 2006 ; Gang *et al*., 2006).

2.3. Rôle dans le cycle cellulaire

Certaines données de la littérature laissent supposer que la protéine DDB2 jouerait un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire. Son expression, qui n'est pas détectable dans les cellules ne se divisant pas, varie au cours du cycle cellulaire. Dans les cellules normales, le niveau d'expression de DDB2 est le plus haut en fin de la phase G1 et à la transition G1/S, mais est fortement diminué au cours de la phase S du cycle cellulaire (Nag *et al*., 2001). De plus, DDB2 interagit avec des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, telle que la culline-4A, qui appartient à une famille de protéines impliquées; dans

l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire (Nag *et al*., 2001). Par ailleurs, c'est également le cas de l'interaction entre DDB2 et le domaine d'activation de E2F1, un facteur de transcription qui contrôle l'expression des gènes cibles impliqués dans la réplication de l'ADN et l'entrée en phase S, en se fixant sur des éléments de réponse de type TTTCGCGC. Cette dernière interaction, qui conduit à une augmentation de la transcription des gènes cibles de E2F1, semble dépendre d'une séquence homologue à la protéine du rétinoblastome RB présente dans la structure primaire de la protéine DDB2 (Hayes *et al*., 1998).

Des résultats publiés par le laboratoire ont montré pour la 1ère fois que DDB2 active la prolifération des cellules tumorales mammaires dépendantes des œstrogènes. Cette protéine est surexprimée à la fois dans des lignées cellulaires et dans des tumeurs mammaires exprimant le récepteur aux œstrogènes (ER positives). Cette expression est cependant très faible mais pas nulle dans les cellules tumorales et les tumeurs mammaires ER négatives. L'inhibition par ARN interférence de l'expression de DDB2 dans les cellules tumorales mammaires ER positives entraîne une forte diminution de leurs capacités proliératives. Cette prolifération accrue est associée à une augmentation très significative de l'expression de gènes impliqués dans ces processus et régulés par le facteur E2F1, tels que la cycline E, PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et la DHFR pour Dihydrofolate réductase. Inversement, la surexpression du gène codant DDB2 dans les cellules tumorales ER négatives stimule leurs capacités proliératives. Cette protéine joue un rôle d'activateur de la prolifération des cellules tumorales mammaires ER positives. Ces résultats montrant l'action stimulatrice de la prolifération dans les cellules surexprimant DDB2, ont été complétés par une analyse plus précise, qui révèle que la protéine active l'entrée dans la phase de transition G1/S et la progression dans la phase S du cycle cellulaire des cellules tumorales mammaires la surexprimant (Kattan *et al*., 2008a). Un des mécanismes, par lequel DDB2 joue ce rôle d'activateur de la prolifération a été mis en évidence. Il s'agit de l'implication de cette protéine dans la régulation négative du gène codant une enzyme antioxydante, la superoxyde dismutase mitochondriale (SOD Mn) (Minig *et al*., 2009).

2.4. Rôle dans la mort cellulaire par apoptose

Certaines données de la littérature indiquent que la protéine DDB2 est impliquée dans le mécanisme d'apoptose. Un défaut de la réparation par excision de nucléotides est responsable de la maladie autosomique récessive, le *Xeroderma Pigmentosum*. Les patients

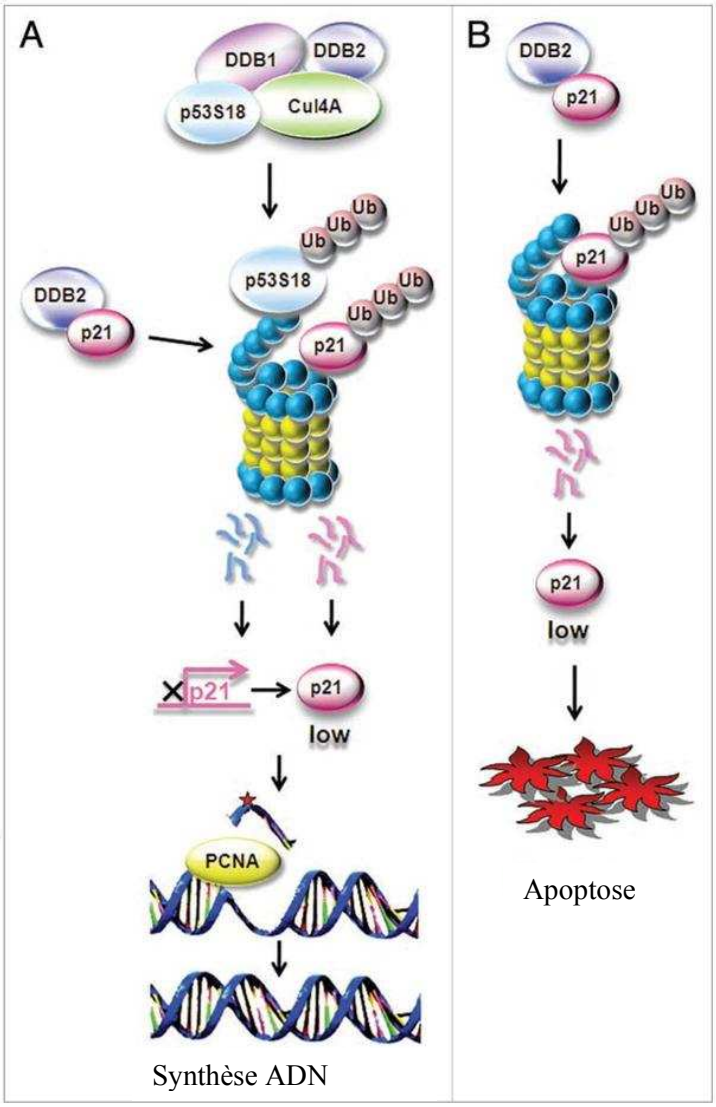


Figure 31 : Participation de DDB2 dans le mécanisme NER et l'apoptose. (A) DDB2 active le mécanisme NER en régulant $p21^{Waf1/Cip1}$. Lorsque les cellules sont faiblement irradiées par les UV, DDB2 régule $p21^{Waf1/Cip1}$ à la fois au niveau de sa transcription et de sa protéolyse. En régulant le niveau de $p21^{Waf1/Cip1}$, DDB2 assure l'efficacité du mécanisme de réparation de l'ADN endommagé. (B) Sous de fortes irradiations aux UV ou sous l'effet du traitement causant des dommages non réparables à l'ADN, DDB2 régule $p21^{Waf1/Cip1}$ par protéolyse, conduisant ainsi les cellules vers l'apoptose (d'après Stoyanova *et al*., 2009).

atteints de cette maladie se protègent des UV solaires, parce qu'ils présentent des risques élevés de développer des mélanomes (Itoh., 2006) (voir paragraphe 2). Cependant, des souris homozygotes, dont le gène *DDB2* a été invalidé, développent spontanément des tumeurs dans d'autres organes, même en l'absence d'irradiations aux UV (Itoh *et al*., 2004 ; Itoh *et al*., 2007 ; Yoon *et al*., 2005). A l'inverse, une surexpression de DDB2 protège les souris de l'action carcinogène d'irradiations chroniques aux UV, en favorisant l'apoptose des cellules normales (Alekssev *et al*., 2005). L'ensemble de ces études suggèrent donc que la protéine DDB2 jouerait un rôle suppresseur de tumeur.

D'autres travaux ont montré que la protéine DDB2 serait impliquée dans l'entrée en apoptose de fibroblastes murins embryonnaires (MEF) exposés aux UV. Cette protéine activerait leur apoptose en régulant la protéolyse de p21waf1/Cip1, un régulateur du cycle cellulaire (Figure 31) (Stoyanova *et al*., 2009). Ceci explique que l'invalidation du gène *DDB2* dans les MEF entraîne une incapacité des cellules à entrer en apoptose, et ceci, même après une irradiation aux UV ou à des radiations ionisantes (Itoh *et al*., 2003 ; Itoh *et al*., 2004 ; Stoyanova *et al*., 2009).

Inversement, un article récent montre que la surexpression de DDB2 entraîne une augmentation de la sensibilité des cellules cancéreuses de l'ovaire à un agent anticancéreux, tel que le cisplatine en diminuant l'expression du gène codant la protéine anti-apoptotique Bcl2 (Barakat *et al*., 2010). Cette grande sensibilité au cisplatine a été reliée à l'implication de la protéine DDB2 dans le remodelage de la chromatine, favorisant le contact entre l'ADN et l'agent anticancéreux ; augmentant ainsi le nombre de lésions induites. Un autre travail montre au contraire que la surexpression de DDB2 entraîne plutôt une diminution de la sensibilité des cellules d'adénocarcinome du col utérin HeLa aux UV, en relation avec une augmentation de l'expression d'une protéine anti-apoptotique c-FLIP (Sun *et al*., 2010). Le mécanisme par lequel DDB2 jouerait un rôle dans l'apoptose reste néanmoins largement inconnu.

2.5. Rôle dans la transcription

Grâce à la présence des domaines répétés de type WD40 dans sa structure, la protéine DDB2 interagit avec des protéines tel que le facteur de transcription E2F1, qui augmente l'activité biologique de ce dernier. Cette interaction peut expliquer en partie le rôle de DDB2 dans l'activation de la prolifération des cellules d'adénocarcinome mammaire exprimant le

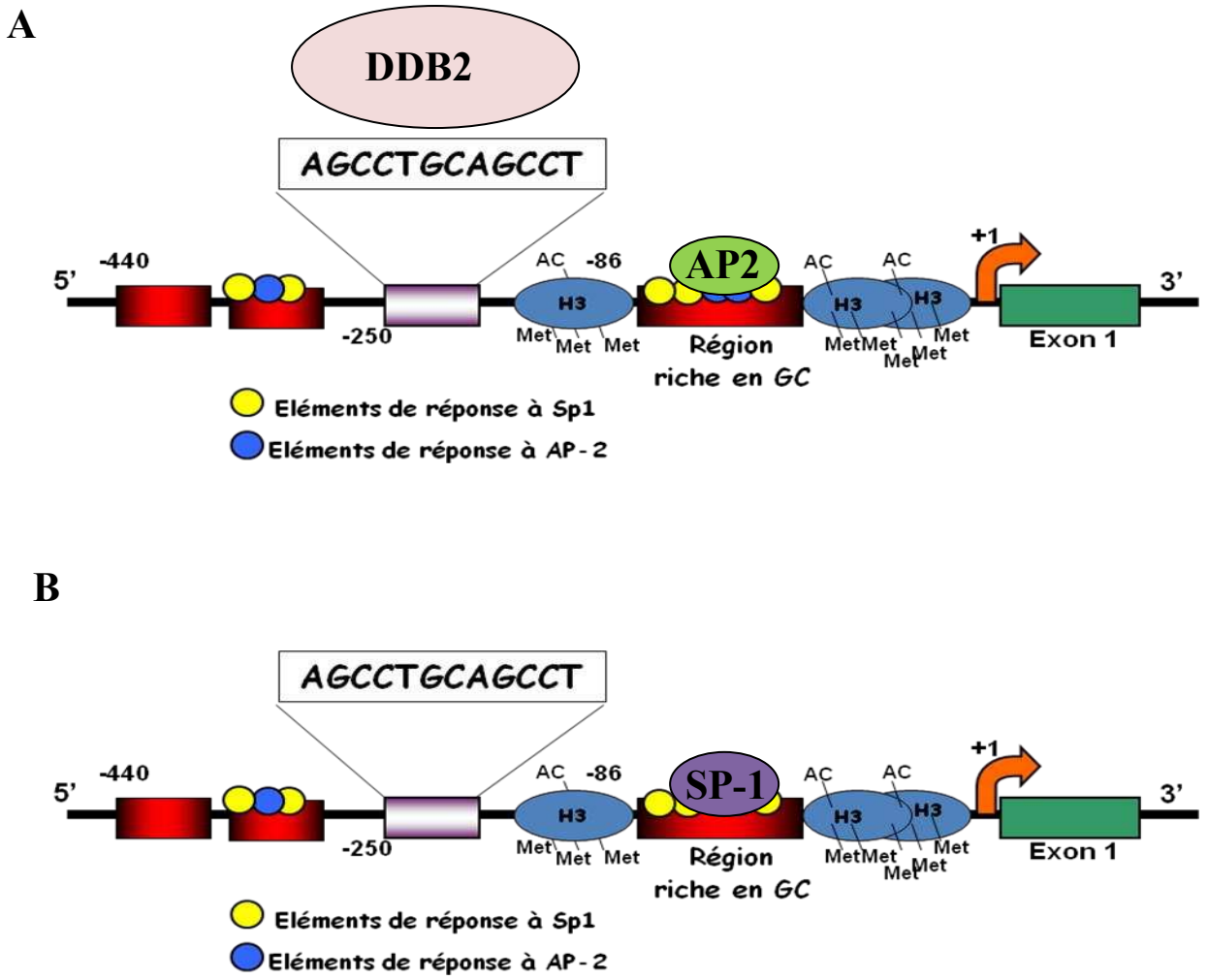


Figure 32 : A. Représentation schématique du promoteur de la SOD Mn dans les cellules cancéreuses mammaires ER positives et non métastatiques (MCF-7). La fixation de DDB2 sur sa séquence cible entraîne le recrutement du facteur de transcription AP-2 et est associée à une hypoacétylation des histones.

B. Représentation schématique du promoteur de la SOD Mn dans les cellules cancéreuses mammaires ER négatives et métastatiques (MDA-MB231). L'absence de DDB2 sur sa séquence cible est associée à une hyperacétylation des histones ainsi qu'à la fixation du facteur de transcription Sp-1.

récepteur aux œstrogènes (Hayes *et al*., 1998 ; Shiyanov *et al*., 1999). De plus, la présence des domaine WD40 permet à la protéine DDB2 d'interagir avec des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine favorable à la transcription des gènes, tels que des membres de la famille des histones acétyltransférases comme la protéine CBP/p300 et le complexe STAGA (Datta *et al*., 2001 ; Martinez *et al*., 2001 ; Otrin *et al*., 1997), ou encore un complexe participant à la désagrégation des nucléosomes par hydrolyse de l'ATP comme SWI/SNF (Zhao *et al*., 2009).

Récemment, le laboratoire a montré que DDB2 intervient dans la régulation de l'expression du gène codant l'enzyme antioxydante, la superoxyde dismutase à manganèse (SOD Mn). DDB2 maintient une transcription faible du gène codant la SOD Mn dans les cellules d'adénocarcinome mammaire exprimant le récepteur aux œstrogènes, en se fixant spécifiquement sur une séquence d'ADN qui est constituée de la répétition d'un pentanucléotide, séparée par deux nucléotides charnières, et localisée dans la région proximale du promoteur du gène codant l'enzyme antioxydante (Minig *et al*., 2009). Cette activité dépend à la fois d'une hypoacétylation des histones H3 à proximité du site d'initiation de la transcription, mais également du recrutement d'un facteur de transcription, tel que l'activator protein-2 alpha (AP-2α), qui est connu pour réguler négativement la transcription du gène de la SOD Mn (Minig *et al*., 2009 ; Zhu *et al*., 2001). Inversement, l'absence ou la faible expression de DDB2 dans les cellules d'adénocarcinome mammaire n'exprimant pas le récepteur aux œstrogènes entraîne l'hyperacétylation des histones H3 et facilite la fixation du facteur de transcription Sp1, nécessaire pour l'expression constitutive du gène codant la SOD Mn (Minig *et al*., 2009 ; Yeh *et al*., 1998 ; Xu *et al*., 2002). Ces résultats expliquent en partie comment DDB2 active la prolifération des cellules tumorales mammaires ER positives. En maintenant une expression constitutive faible de la SOD Mn, la protéine DDB2 entraînerait une accumulation d'anions superoxyde, qui est connue pour son rôle de second messager dans l'activation des voie de prolifération dans les cellules (Li *et al*., 2000 ; Hu *et al*., 2005).

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Beaucoup de progrès dans le traitement ainsi que dans le diagnostic des cancers du sein ont été réalisés. Cependant, les mécanismes moléculaires de la tumorigenèse mammaire connus à l'heure actuelle ne permettent pas de comprendre pourquoi et à quel moment certaines cellules tumorales acquièrent des propriétés migratrices et invasives ainsi qu'un pouvoir métastatique, à l'origine de leur échappement aux thérapies anticancéreuses. De plus, aucun marqueur protéique suffisamment fiable, ne permet de prédire ces changements de propriétés des cellules tumorales mammaires. La recherche, l'identification et la caractérisation de marqueurs protéiques représentent un enjeu majeur en cancérologie clinique. Cette thématique de recherche constitue l'objectif principal de l'équipe d'accueil, par son travail, depuis quelques années, sur la protéine DDB2 et ses nouvelles activités biologiques.

Sur la base des résultats déjà obtenus et publiés par l'équipe d'accueil, la protéine DDB2 présente un intérêt en tant que marqueur de la prolifération tumorale mammaire. Parmi ces résultats publiés, plusieurs observations laissent à penser que cette protéine pourrait également intervenir dans les capacités invasives des cellules tumorales mammaires. En effet, DDB2 est surexprimée naturellement dans les cellules tumorales mammaires non invasives, dont elle active la prolifération, mais peu ou pas dans les cellules invasives (Kattan *et al*., 2008a). De plus, la protéine DDB2 exerce en partie son activité sur la prolifération des cellules tumorales non invasives, en agissant négativement sur la transcription basale du gène codant la SOD Mn (Minig *et al*., 2009). Par ailleurs, notre équipe a montré que cette enzyme antioxydante favorise les capacités invasives des cellules tumorales mammaires métastatiques qui la surexpriment naturellement (Kattan *et al*., 2008b).

En dehors des résultats publiés, une analyse transcriptomique a récemment été réalisée par l'équipe d'accueil, selon l'expression de DDB2, dans le but de rechercher d'autres gènes, dont la régulation de leur expression peut impliquer cette protéine. Cette analyse a comparé des cellules d'adénocarcinome mammaire MCF-7 non invasives et surexprimant naturellement DDB2 avec les mêmes cellules, dont l'expression de cette protéine est inhibée par ARN interférence. Parmi des gènes cibles potentiels, celui codant IκBα a retenu notre attention. En effet, nous avons rapporté dans l'analyse bibliographique, combien NF-κB, la

cible d'IκBα, joue un rôle important dans les mécanismes de migration et d'invasion des cellules tumorales. Néanmoins, le rôle exact de ce facteur de transcription dans ces mécanismes est encore mal défini. De même, les mécanismes de régulation de son activité constitutive dans les cellules cancéreuses mammaires sont mal connus.

Sur la base de ces observations, les objectifs principaux de la thèse ont donc été (i) d'évaluer l'importance de DDB2 dans les capacités migratrices et invasives des cellules tumorales mammaires à la fois *in vitro* et *in vivo*, (ii) et d'identifier les mécanismes moléculaires associés, en étudiant en particulier la relation qui existe entre DDB2 et NF-κB. Cette 2ème partie des objectifs a consisté à évaluer dans quelle mesure la protéine DDB2 participe à la régulation du gène codant IκBα, et en conséquence, qu'elle joue un rôle dans les capacités invasives et métastatiques des cellules tumorales mammaires *via* NF-κB.

Ce travail a été réalisé sur les lignées de cellules tumorales mammaires, disponibles dans le laboratoire.

- Les lignées d'adénocarcinomes mammaires MDA-MB231 et SKBR3, métastatiques, qui expriment une protéine p53 mutée et non fonctionnelle, mais pas le récepteur aux œstrogènes (ER négative). De plus, ces lignées expriment très faiblement DDB2 (Kattan *et al*., 2008a).
- La lignée d'adénocarcinome mammaire MCF-7, non métastatique, qui exprime le récepteur aux œstrogènes (ER positive) et une protéine p53 fonctionnelle. De plus cette lignée exprime fortement DDB2 (Kattan *et al*., 2008a).

CHAPITRE 2

MATERIELS
&
METHODES

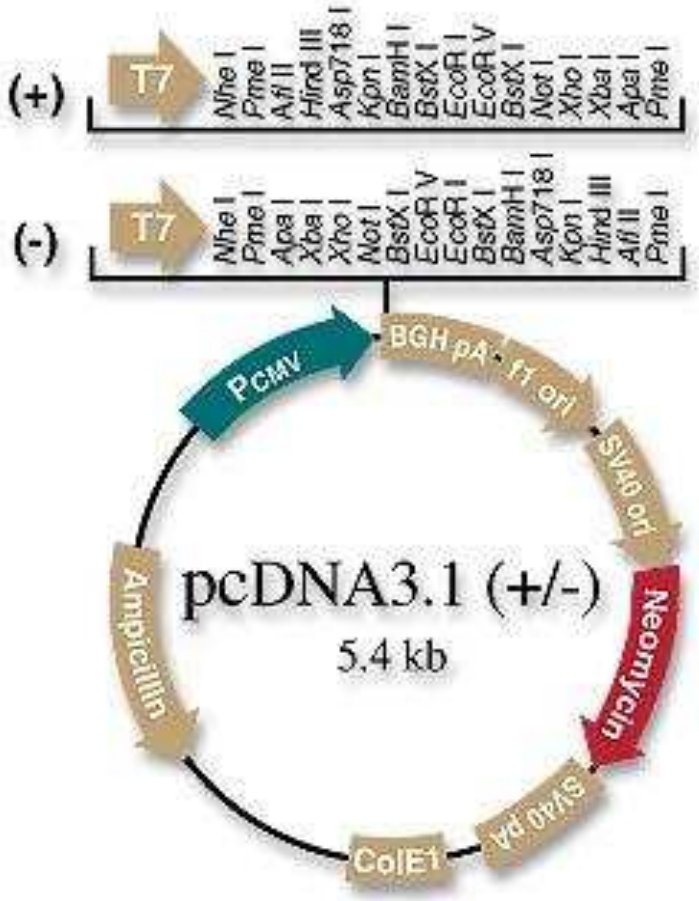


Figure 33: Représentation de la carte du vecteur plasmidique pcDNA3.1 (+/-) (Invitrogen). L'ADNc codant la protéine DDB2 a été intégré dans ce plasmide au niveau de la région d'insertion entre les sites de restriction *Kpn* I et *Xba* I (d'après Kattan *et al*., 2008a).

MATERIELS ET METHODES

I. CULTURE CELLULAIRE ET ECHANTILLONS CLINIQUES

1. Conditions de culture

Les lignées de cellules humaines d'adénocarcinome mammaire MDA-MB231, SKBR3, T-47D et MCF-7 sont cultivées en monocouche dans des flacons de 25 cm² dans un milieu RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen, UK), contenant 2mM de glutamine, 0,1 mg/ml de gentamicine (Gibco) et 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF), (Sigma, France) préalablement décomplémenté à 56°C pendant 30 min. La culture cellulaire est réalisée à 37°C sous atmosphère humide maintenue à 5% de CO2 (Roche, Meylan, France). Le milieu de culture est renouvelé tous les 2 jours. Deux fois par semaine, les cellules à confluence sont mises en suspension par dissociation à l'aide d'une solution de trypsine 0,1%-10 µM EDTA diluée dans un tampon phosphate salin (D-PBS, Gibco). Pour certaines expériences, les cellules sont traitées avec 50 µg/ml de peptide SN50 (inhibiteur de la translocation nucléaire de p50 NF-κB) ou de peptide contrôle (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

2. Développement de modèles de cellules tumorales mammaires transgéniques

2.1. Cellules tumorales mammaires surexprimant la protéine DDB2

Lors d'un travail précédent dans le laboratoire, l'ADNc codant DDB2 (1300 pb) a été intégré dans le vecteur plasmidique pcDNA3.1(+) (Invitrogen), entre les sites de restriction KpnI et XbaI (Kattan *et al*., 2008a).

Les cellules tumorales mammaires MDA-MB231 et SKBR3 sont transfectées avec le vecteur plasmidique, en utilisant le poly-éthylènimine linéaire comme agent de transfection (Trans PEI, Eurogentec). Ce Trans PEI (8 µl), dilué dans 150 mM de NaCl, est mis en contact avec 4 µg de vecteur plasmidique dans du milieu RPMI complet, durant 30 min à température ambiante. Ce mélange est ajouté à une culture de cellules ensemencées 24 heures auparavant à raison de 10^5 cellules/puits dans une plaque 6 puits. Apres 24 heures, les cellules tumorales ayant reçu le plasmide portant un gène de résistance (Figure 33), sont sélectionnées durant 3

semaines en présence de 400 µg/ml de Néomycine (Gibco) ajoutée dans le milieu de culture afin d'obtenir une expression de DDB2 stable dans le temps. En parallèle, des cellules ayant été transfectées avec un vecteur vide sont sélectionnées de la même façon.

2.2. Développement de cellules tumorales mammaires surexprimant la protéine DDB2 et la GFP

Les cellules MDA-MB231 surexprimant DDB2 ainsi que les cellules contrôles sont rendues fluorescentes par infection virale. Les particules lentivirales produites contiennent le plasmide pRIX-PGK-GFP-W (from Trono, Addgene, Cambridge, MA, USA). Des cellules HEK ont été utilisées pour la production de ces particules. Pour cela 20 µg de plasmide RIX, 15 µg de plasmide psPAX2 (Packaging) et 5 µg de plasmide pMD2G (Enveloppe) ont été transfectés dans les cellules HEK ensemencées en boîte de 10 cm de diamètre. Vingt-quatre heures après la transfection le milieu de culture est collecté, centrifugé à 1000 g pendant 10 min et filtré sur filtre de 0,45 µm. Ce milieu filtré contenant les particules virales est ensuite utilisé pour l'infection des cellules MDA-MB231, à raison de 4mL par boite 6 cm et le milieu est remplacé par du milieu frais 12 h plus tard. Après vérification de l'expression de la GFP au microscope, nous avons utilisé une population de cellules exprimant à 95% minimum la GFP.

2.3. Cellules tumorales mammaires ayant une inhibition de la protéine IκBα par la technique de l'ARN interférant.

Les cellules tumorales mammaires MDA-MB231 surexprimant DDB2 sont transfectées avec les particules lentivirales shRNA IκBα (1,0 x 10^6 transducing units ou TU) (sc-29360-V Santa-Cruz). Celles-ci contiennent 3 constructions spécifiques, chacune permettant la synthèse d'un shRNA de 19 à 25 nucléotides, qui assure l'inhibition de l'expression du gène. Les cellules sont ensemencées dans une plaque 96 puits à la densité de 15000 cellules/puit dans du milieu RPMI sans sérum. Après 24 heures, les cellules sont infectées avec les particules virales à une MOI (multiplicity of infection) de 2. Vingt-quatre heures après, le milieu est aspiré et remplacé par du milieu RPMI complet. Les cellules tumorales sont ensuite sélectionnées durant 7 jours en présence de 1 µg/ml de puromycine afin d'obtenir des lignées stables. En parallèle, des cellules ayant été transfectées avec des

particules lentivirales permettant la synthèse d'un shRNA control, non spécifique (sc-108080, Santa-Cruz) sont sélectionnées de la même façon.

3. Les échantillons de tumeurs mammaires provenant de patientes

Les échantillons de tumeurs sont obtenus à partir de 92 patientes après une mastectomie sans radiation ou chimiothérapie préalable. Un fragment de chaque tumeur est immédiatement congelé et stocké dans de l'azote liquide. Le reste de la tumeur est fixé dans un tampon de formaldehyde 6% et inclus dans la paraffine pour les analyses histologiques. Les tumeurs mammaires sont classées selon leur extension anatomique grâce à la méthode de classification TNM validée par l'UICC (Union Internationale contre le cancer) (Sobin *et al*., 1997). Le grade histologique des tumeurs est déterminé selon la méthode de Scarff, Bloom et Richardson (SBR) (Bloom *et al*., 1957). La présence des récepteurs aux œstrogènes (ER) et à la progestérone (PR) est mesurée à l'aide d'un test qui consiste à déterminer la quantité de ces hormones marquées radioactivement au tritium (Thorpe *et al*., 1987).

II. ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES AU NIVEAU TRANSCRIPTIONNEL

1. Extraction des ARN totaux

A partir de cultures de cellules confluentes à 90%, lavées deux fois avec du D-PBS, puis congelées à -80°C, l'extraction des ARN totaux est réalisée selon la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987), en ajoutant 1 ml de « RNA Now » (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Un volume de 200 µl de chloroforme y est ajouté, puis l'ensemble est mélangé vigoureusement avant d'être centrifugé à 12000 g à 4°C pendant 15 min. Après avoir isolé le surnageant correspondant à la phase aqueuse, un volume d'isopropanol est ajouté, puis les tubes sont placés à -20°C pendant 1 heure minimum. Le mélange est ensuite centrifugé à 12000 g à 4°C pendant 10 min. Le culot d'ARN totaux obtenu est alors lavé par de l'éthanol 75% froid, avant d'être dissout dans de l'eau stérile. Le dosage des ARN est effectué par spectrophotométrie au nanodrop 2000c (Thermo Scientific, France), en mesurant l'absorbance à 260 nm, en tenant compte du facteur de dilution et du fait qu'une unité d'absorbance équivaut à 40 µg/ml d'ARN. Une double mesure à 280 nm permet d'estimer la contamination des ARN totaux par des protéines. Les expériences suivantes ont été réalisées avec des ARN pour lesquels le rapport DO 260nm/280nm était supérieur à 1,8.

2. Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR)

La synthèse d'ADNc est réalisée à partir de 2 µg d'ARN totaux extraits précédemment, selon une méthode utilisant une solution à 0,2 µg/ml d'amorces aléatoires diluées 15 fois (Invitrogen). Dans un volume final de 20 µl, sont ajoutés : 250 mM de tampon (Invitrogen), et 200 unités de reverse transcriptase (M-MLV, Invitrogen). Le mélange réactionnel est ensuite incubé pendant 2 heures à 37°C.

La PCR est réalisée avec les ADNc précédemment synthétisés par RT, dans un volume final de 50 µl. L'ensemble de la PCR contient 2 µl d'ADNc, 250 mM de tampon PCR 10X (Invitrogen), 1,5 mM de $MgCl_2$ (Invitrogen), 0,2 mM de dNTP (Fermentas), 1 µM d'amorces spécifiques et 2,5 unités de Taq polymérase (Invitrogen). Les amorces sens et antisens spécifiques de chaque gène utilisées pour la PCR sont décrites dans le Tableau 1 et sont synthétisées par la société Eurogentec (Liège, Belgique). Le milieu réactionnel de PCR est placé dans un thermocycleur (Biorad) et soumis à une dénaturation initiale durant 3 min 30 à 94°C, suivie d'un certain nombre de cycles comprenant une dénaturation de 30 sec à 94 °C,

une hybridation à une température variable selon les amorces utilisées (Tableau 1) durant 30 sec et une élongation à 72°C de 30 sec. Ce programme est terminé par une élongation finale à 72°C durant 10 min. Les fragments amplifiés sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 2%. Le gel est calibré par un marqueur de taille connu (Gene Ruler 100pb Plus DNA Ladder, Fermentas) et déposé en même temps que les échantillons. L'exploitation des résultats est réalisée avec le logiciel Quantity One sur l'appareil GelDoc 2000 (Biorad).

3. PCR quantitative en temps réel

Les ARN totaux sont extraits à partir d'une quantité de 25-30 mg de tissu de tumeurs mammaires, préalablement congelées, en utilisant le Mini Kit RNeasy Plus Universal (Qiagen, France) selon les instructions du fabricant. La synthèse d'ADNc est réalisée sur 0,5 µg d'ARN totaux à l'aide du kit iScript^{TM} cDNA Synthesis de Bio-Rad (Hercules, CA, USA), contenant tous les ingrédients nécessaires (transcriptase inverse, amorces aléatoires et déoxynucléotides triphosphates). Un µl d'ADNc dilué est amplifié par PCR en temps réel, à l'aide d'un mélange contenant tous les ingrédients nécessaires et permettant l'incorporation du SyberGreen (Roche), dans un thermocycleur (LightCycler 480, Roche). Les données de qRT-PCR sont analysées grâce au logiciel LightCycler^{R}. Les niveaux de Ct pour DDB2 sont normalisés à partir des valeurs des Ct des contrôles internes UBB (Ubiquitine B) et RPLPO dont les séquences des amorces sont données dans le Tableau 2.

III. ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES AU NIVEAU TRADUCTIONNEL

1. Par immunoréplique (Western blotting)

1.1. Extraction et dosage des protéines totales, cytoplasmiques et nucléaires

Les cellules tumorales sont récupérées et lysées dans un tampon Tris/HCl 10 mM, pH 7,2 contenant 5 mM d'EDTA, 1% de Triton X100 ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases, puis lysées pendant 20 min sur la glace. Après une centrifugation à 17000 g pendant 20 min à 4°C, les protéines totales sont présentes dans le surnageant.

Les protéines cytoplasmiques et nucléaires sont extraites à l'aide d'un kit commercial (Active Motif, Belgique). Après un lavage avec du PBS contenant un inhibiteur des phosphatases, les cellules sont mises en suspension par grattage dans 3 ml de cette même solution, puis centrifugées à 500 g, pendant 10 min à 4°C. Le culot cellulaire est resuspendu dans du tampon hypotonique 1X, puis laissé sur glace pendant 15 min. Les noyaux sont isolés par homogénéisation après addition de détergent et centrifugés à 14000 g pendant 30 sec à 4°C. Le surnageant correspondant à la fraction cytoplasmique est récupéré et stocké à –80°C. Les protéines nucléaires sont ensuite extraites par lyse des noyaux dans un tampon fourni dans le kit et contenant 10 mM de dithiotréitol (DTT) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases, sur glace pendant 30 min. Après une centrifugation à 14000 g et à 4°C pendant 10 min, les protéines nucléaires contenues dans le surnageant sont stockées à -80°C avant d'être utilisées.

La concentration protéique est ensuite déterminée spectrophotométriquement à 595 nm selon la méthode de Bradford (Biorad) en utilisant une gamme étalon correspondant à différentes concentrations connues d'albumine sérique bovine (BSA).

1.2. Electrophorèse et transfert des protéines sur membrane

Les protéines totales (50µg), cytoplasmiques (20µg) et nucléaires (15µg) sont séparées selon leur taille en conditions dénaturantes à 100°C durant 5 min dans un tampon Tris/HCl 62,5 mM (pH 6,8) contenant 2% de sodium Dodécyl Sulfate (SDS), 20% de saccharose (pH 6,8) et contenant

du bleu de bromophénol, d'après la méthode de Laemmli (1970). Les protéines dénaturées sont déposées

Tableau 3 : Origine et référence des différents anticorps utilisés dans l'étude.

Anticorps polyclonaux	Dilution utilisée	Origine animale	Origine commerciale
Anti-p65	1/200	lapin	sc-109, Santa Cruz Biotechnology
Anti-p50	1/200	lapin	sc-7178, Santa Cruz Biotechnology
Anti-DDB2	1/250	lapin	Développé chez le lapin au laboratoire contre un peptide, correspondant à la partie N-terminale de DDB2, couplé à l'hémaglutinine de patelle
Anti-IκBα	1/2000	lapin	I0505 Sigma
Anti-β-actine	1/2000	chèvre	sc-1615, Santa Cruz Biotechnology
Anti-vimentine	1/1000	souris	sc-6260, Santa Cruz Biotechnology
Anti-SODMn	1/500	lapin	LabFrontier, Séoul, Corée du Sud
Anti-Sp1	1/200	lapin	PEP2: sc-59X, Santa Cruz Biotechnology

dans un gel de concentration contenant 5% de polyacrylamide et préparé dans un tampon Tris/HCl 0,25 M (pH 6,8) contenant 0,1% de SDS, puis sont séparées dans un gel de séparation contenant 10% de polyacrylamide, préparé dans un tampon Tris/HCl 0,375 M (pH 8,8) contenant 0,1% de SDS. L'électrophorèse est ensuite réalisée à 30 mA durant 1 h dans un tampon de migration Tris 0,05 M/Glycine 0,384 M et contenant 0,1% de SDS (pH 8,3).

Les protéines sont ensuite transférées du gel sur une membrane de Nylon de polyvinyldifluoride (NEN, France) entre deux piles de feuilles de papier Whatman imbibées de tampon Tris (48 mM)/Glycine (38 mM) (pH 7,9) contenant 0,037% de SDS et 20% de méthanol, pendant 30 min en montage liquide en courant constant à 100 volts. La membrane est calibrée à l'aide de marqueurs de masse moléculaire connue et pré-colorés (Fermentas).

1.3. Détection immunologique

La présence des protéines étudiées est détectée immunologiquement sur la membrane à l'aide de l'anticorps approprié en utilisant un kit commercial de révélation par chimioluminescence (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Pour éviter toute révélation non spécifique, la membrane est saturée grâce à un agent bloquant (10%) dilué dans du TBS composé de Tris/HCl 50 mM, pH 7,5 contenant 150 mM de NaCl pendant 1 h 30 sous agitation. Les anticorps polyclonaux, dilués dans du TBS contenant 0,5% d'agent bloquant, sont ajoutés au bain d'incubation précédent pendant 1 h 30 à température ambiante. Pour chacun des anticorps utilisés, la dilution optimale est préalablement définie et rapportée dans le Tableau 3. Apres 3 lavages de 5 min chacun avec du tampon TBS-Tween (Tris/HCl 50 mM, pH 7,5 ; 150mM de NaCl et 0,1% de Tween 20) puis un lavage avec du TBS contenant 0,5% d'agent bloquant, la membrane est incubée pendant 30 min à température ambiante avec les anticorps anti-immunoglobulines de lapin à 0,04 U/ml couplé à la peroxydase (A9169, Sigma), dilués dans du TBS contenant 0,5% d'agent bloquant. Après 3 lavages de 5 min chacun avec du TBS-Tween 0,1%, l'activité de la peroxydase est révélée à l'aide du substrat chimioluminescent. La bande correspondant à la protéine spécifique reconnue par l'anticorps primaire est mise en évidence par une caméra à effet Peltier équipant le ChemiDoc. Après cette révélation, la membrane est colorée durant 5 min par une solution de bleu de Coomassie ou de rouge ponceau afin de montrer l'équivalence en quantité de protéines déposées dans chaque piste.

Tableau 1 : Séquences des différentes amorces spécifiques de chaque gène utilisées pour les réactions de PCR, ainsi que la taille des fragments d'ADNc amplifiés et la température optimale d'hybridation.

Gènes	Couple d'amorces	Taille des fragments amplifiés	Température d'hybridation
DDB2	5'-ACCAGTTTTACGCCTCCTCAATGG-3' 5'-TTTCCCTCTAACCTGGCGCAGGTC-3'	300 bp	54°C
IκBα	5'-TGGAAGCAGCAGCTCACCGA-3' 5'-AGGGCAGTCCGGCCATTACA-3'	467 bp	66°C
MMP-9	5'-TCCCTGGAGACCTGAGAACC-3' 5'-GGCAAGTCTTCCGAGTAGTTT-3'	364 bp	60°C
β-ACTINE	5'-GGCTCCGGCATGTGCAAGG-3' 5'-AGATTTTCTCCATGTCGTCC-3'	220 bp	45°C

Tableau 2 : Séquences des différentes amorces spécifiques de chaque gène utilisées pour les réactions de PCR en temps réel.

RT-PCR Quantitative	Amorces
DDB2	F: 5'-ACCAGTTTTACGCCTCCTCAATGG-3' R: 5'-TTTCCCTCTAACCTGGCGCAGGTC-3'
RPLPO	F: 5'-GAAGGCTGTGGTGCTGATGG-3' R: 5'-CCGGATATGAGGCAGCAGTT-3'
UBB	F: 5'-GCTTTGTTGGGTGAGCTTGT-3' R: 5'-CGAAGATCTGCATTTTGACCT-3'

2. Par cytoimmunofluorescence

Les cellules tumorales, cultivées sur des lamelles fines de verre dans des boîtes de Petri de 35 mm de diamètre, sont fixées par une solution de paraformaldéhyde (PAF) à 4%, pendant 20 min à température ambiante. Après rinçage avec du D-PBS, les cellules fixées sont incubées pendant 30 min à température ambiante avec du D-PBS contenant 2% de BSA (blocage des sites non spécifiques) et 0,2% de Triton X-100 pour les perméabiliser. Les cellules sont ensuite incubées pendant 1 h à température ambiante dans une chambre humide avec un anticorps primaire (IκBα, p50, p65 et DDB2) dilué au 50ème dans du D-PBS-triton + BSA. Après 3 lavages avec du D-PBS, les cellules sont incubées avec un anticorps polyclonal anti-lapin conjugué au fluorochrome, l'alexa, dilué au 1/100ème dans du D-PBS-triton + BSA pendant 1 h. Après 3 lavages avec du D-PBS, les noyaux des cellules sont colorés par une solution HOECHST (Invitrogen) diluée au 10000ème dans du D-PBS-triton + BSA. Enfin, le montage est réalisé en plaçant une goutte par lamelle d'un liquide de fixation (fluor-safe, Calbiochem) sur une lame. Les lames sont observées à l'objectif 40 d'un microscope à épifluorescence qui est équipé d'une caméra pour l'acquisition des images (Nikon, France).

3. Analyse sur gel de l'activité gélatinase

Les cellules MDA-MB231 et SKBR3, sont cultivées dans du milieu sans sérum avec ou sans fibronectine (5 µg/ml), pendant 24 heures jusqu'à environ 90% de confluence dans une plaque 6 puits. Dans le cas des cellules SKBR3, 25 µg/ml d'EGF est ajouté dans le milieu de culture sans sérum. Le surnageant contenant les activités gélatinases, est ensuite récupéré, et des échantillons de 10 µl sont repris dans un tampon Tris/HCL 62,5mM pH 6,8 contenant 2% de SDS et 20% de saccharose, avant d'être déposés dans un gel de concentration à 5% de polyacrylamide préparé comme dans le paragraphe III.1.2, mais contenant 0,1% de gélatine. L'électrophorèse est ensuite réalisée à 30 mA pendant une heure dans un tampon de migration Tris/Glycine avec SDS. Après incubation du gel dans un tampon Tris/HCl 50 mM pH 8 contenant 2,5% de triton X-100 durant 3 heures à température ambiante, puis un rinçage à l'eau, les gélatinases sont renaturées par incubation avec du tampon Tris/HCl 50 mM pH 8 contenant 10 mM de CaCl2, 50 mM d'Azide de Sodium durant 20 heures à 37°C. L'activité gélatinase est ensuite révélée dans une solution de Bleu de Coomassie à 0,2% (p/v) dans 25% d'isopropanol et 10% d'acide acétique durant 30 min à température ambiante. Après

décoloration du gel dans un bain contenant 10% de méthanol et 10% d'acide acétique, les bandes non colorées correspondant aux activités gélatinases, apparaissent dans le gel.

IV. ANALYSE DE L'ACTIVITE DE PROTEINES NUCLEAIRES SUR L'ADN

1. Etude de l'activité de fixation des protéines nucléaires sur l'ADN par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Cette méthode est réalisée en utilisant un kit commercial (Actif motif, Belgique) contenant les solutions pour extraire, puis fragmenter de façon enzymatique la chromatine, ainsi que les billes magnétiques sur lesquelles est greffée la protéine G pour l'étape d'immunoprécipitation.

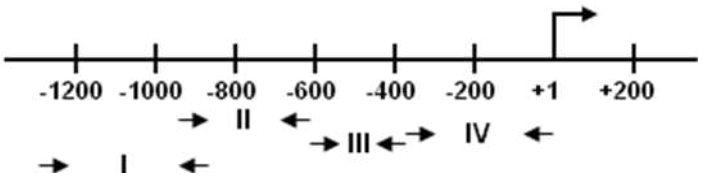
1.1. Extraction de la chromatine

Des cellules tumorales mammaires MDA-MB231, cultivées jusqu'à 80% de confluence, sont fixées avec une solution de formaldéhyde 37% dans du milieu de culture RPMI-1640 sans sérum pendant 10 minutes à température ambiante. Après deux lavages successifs, la fixation au formaldéhyde est arrêtée par un lavage des cellules avec une solution de D-PBS contenant 125 mM de Glycine, durant 5 min à température ambiante. Les cellules ainsi fixées, sont ensuite récupérées par grattage dans une solution de D-PBS contenant 2 mM de PMSF, puis par centrifugation à 720 g pendant 10 min à 4°C. Le culot des cellules est resuspendu dans un tampon de lyse fourni par le kit commercial, dans lequel sont ajoutés extemporanément 2% du volume d'un cocktail d'inhibiteur de protéases (PIC) et 2 mM de PMSF. Les cellules en suspension sont lysées dans le tampon à l'aide d'un appareil de Dounce, et le lysat obtenu est centrifugé à 2400 g pendant 10 min à 4°C. Le culot correspondant aux noyaux est ensuite resuspendu dans un tampon de digestion contenant 2% de PIC et 2 mM de PMSF. Apres une pré-incubation du mélange à 37°C, pendant 5 min, le cocktail enzymatique, nécessaire pour fragmenter la chromatine, est ajouté à raison de 200 U/ml et laissé en contact avec les noyaux pendant 10 min à 37°C. Ce temps optimisé permet d'obtenir des fragments de chromatine de 200 à 1000 pb, conformément aux instructions du kit. La réaction est arrêtée par l'ajout de 0,5 M d'EDTA. Une centrifugation de 10 min à 12000 g et à 4°C permet de récupérer la chromatine fragmentée dans le surnageant, qui est immédiatement congelée à -80°C jusqu'à utilisation. Un échantillon de 25 µl est prélevé afin d'extraire l'ADN par un mélange de phénol/chloroforme, suivi d'une précipitation par 2 volumes d'éthanol absolu à -20°C. L'ADN dissout dans de l'eau stérile est finalement quantifié au nanodrop 2000c afin d'estimer la quantité d'ADN contenu dans l'extraction de

Tableau 4 : Les différentes amorces utilisées pour l'analyse par ChIP sur le promoteur proximal du gène *IκBα*.

Amorces ChIP	Couple d'amorces	Taille des fragments amplifiés	Température d'hybridation
Promoteur IκBα (région I)	5'-TCTGAAGAGCTCTGACCGAA-3' 5'-AGGATCGTGAGCCTACTTCT-3'	391 bp	60°C
Promoteur IκBα (région II)	5'-CCAGAAGTAGGCTCACGAT-3' 5'-TTTGGAGGAGTGAAAAGCCT-3	289 bp	58°C
Promoteur IκBα (région III)	5'-CAAAGAGCCTGGTATAGGCAGA-3' 5'-AACCTGCCGGTCCTTTCCGTTT-3'	162 bp	66°C
Promoteur IκBα (région IV)	5'-AGGTCGGCGTCCTTGGGATCT-3' 5'-TATAAACGCTGGCTGGGGATTTC-3'	364 bp	57°C

Promoteur *IκBα*



chromatine. La qualité de la préparation de la chromatine fragmentée est analysée par une électrophorèse sur gel de 1% d'agarose en TBE 1X.

1.2. Immunoprécipitation des protéines

Chaque immunoprécipitation est réalisée à l'aide des solutions fournies dans le kit commercial. Brièvement, le mélange pour chaque réaction est réalisé dans un volume final de 100 µl, contenant 25 µl de billes magnétiques portant la protéine G, un volume correspondant au minimum à 6,3 µg de chromatine fragmentée, 10 µl de tampon d'incubation (ChIP Buffer 1), 1 µl de PIC, 2 µg d'anticorps spécifiques dirigés contre les protéines d'intérêt, telles que DDB2 (sc25386 Santa Cruz Biotechnology), Histone acétylé sur la lysine 27 ou diméthylé sur la lysine 4 (30134 et 39142 Active-Motif), CBP/p300 (ab14984 Abcam), RNA polymerase II (polII) (101307 Active-Motif), p65 NF-κB (sc109X Santa Cruz Biotechnology) ou encore des immunoglobulines G contrôles non spécifique (A9169, Sigma) servant de témoin négatif, le tout complété par de l'eau stérile. L'ensemble est ensuite placé à 4°C pendant 4 heures sous rotation. Après 3 lavages à l'aide des tampons de ChIP 1 et 2, l'ensemble correspondant aux anticorps ayant reconnue leur protéine spécifique sur la chromatine, et retenu sur les billes magnétiques de protéine G, est élué par 50 µl de tampon d'élution fourni dans le kit commercial, durant 15 min à température ambiante. Avant l'analyse par PCR, la chromatine immunoprécipitée est ensuite débarrassée de ces protéines fixées par un traitement avec un 1 µg de protéinase K pendant 1 heure à 37°C. L'ADN libéré de la chromatine est ensuite conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

1.3. Analyse par PCR

L'ADN, libéré de la chromatine immunoprécipitée est amplifié par PCR, selon la méthode décrite dans le paragraphe II, en utilisant des amorces spécifiques de la région du promoteur du gène *IκBα*, dont les séquences sont données dans le Tableau 4. Ces régions du promoteur précédemment immunoprécipitées, sont amplifiées après 35 cycles de PCR, et les résultats sont analysés sur gel de 1,5% d'agarose, calibré par un marqueur de taille connu (Gene Ruler 100 pb Plus DNA Ladder). L'exploitation des résultats est réalisée avec le logiciel Quantity One sur l'appareil GelDoc 2000 (Biorad).

Eléments de réponse	Séquences 5'-3'
Sonde O_1	5'-GTGTTTCTGCCTATACCAGG-3' 5'-CAAAGAGCGTGGTACAGGCAGA-3'
Sonde O_2	5'-CACCGGCGCGGCCTGCAGCCC-3' 5'-GTTAGGGGCTGCAGGCCGCG-3'
Sonde O_3	5'-CCACAGTGCGTCCTTCCCCTTAG-3' 5'-ACTGTGGTAAGGGGCTGCA-3'
Sonde O_4	5'-TCTGGGGAAAGCAAATCCCTACGC-3' 5'-TGGGCGTAGGGATTTGCTTTC-3'
Sonde O_5	5'-AGCCATCATTTCCACTCTTGCGTT-3' 5'- TGAAAACGCAAGAGTGGAAAT-3'
Sonde O_6	5'-AGATCAAAAACGGAAAGGACGG-3' 5'-AACTGCCGGTCCTTTCCGTTTTT-3'
Sonde O_3Mut 1	5'AAACAGTGCGTCCTTCCCCTTAGAAGT-3' 5'-ACTGTGGTAAGGGGCTGCA-3'
Sonde O_3Mut 2	5'-CCGTAGTGCGTCCTTCCCCTTAGAAGT-3' 5'-ACTGTGGTAAGGGGCTGCA-3'
Sonde O_3Mut 3	5'-CCACCTTGCGTCCTTCCCCTTAGAAGT-3' 5'-ACTGTGGTAAGGGGCTGCA-3'
Sonde O_3Mut 4	5'-CCACAGGTCGTCCTTCCCCTTAGAAGT-3' 5'-ACTGTGGTAAGGGGCTGCA-3'
Sonde O_3Mut 5	5'-CCACAGTGATTCCTTCCCCTTAGAAGT-3' 5'-ACTGTGGTAAGGGGCTGCA-3'
Sonde O_3Mut 6	5'-CCACAGTGCGGACTTCCCCTTAGAAGT-3' 5'-ACTGTGGTAAGGGGCTGCA-3'
Sonde O_3Mut 7	5'-CCACAGTGCGTCAGTCCCCTTAGAAGT-3' 5'-ACTGTGGTAAGGGGCTGCA-3'
Sonde O_3Mut 8	5'-CCACAGTGCGTCCTGACCCTTAGAAGT-3' 5'-ACTGTGGTAAGGGGCTGCA-3'
Sonde O_3Mut 9	5'-CCACAGTGCGTCCTTCAACTTAGAAGT-3' 5'-ACTGTGGTAAGGGGCTGCA-3'

Sonde O_3Mut 10	5'CCACAGTGCGTCCTTCCCAGTAGAAGT-3' 5'-ACTGTGGTAAGGGGCTGCA-3
Sonde O_3Mut 11	5'-CCACAGTGCGTCCTTCCCCTGCGAAGT-3' 5'-ACTGTGGTAAGGGGCTGCA-3'
Sonde O_3Mut 12	5'-CCACAGTGCGTCCTTCCCCTTATGAGT-3' 5'-ACTGTGGTAAGGGGCTGCA-3'
Sonde O_3Mut 13	5'-CCACAGTGCGTCCTTCCCCTTAGAGTT-3' 5'-ACTGTGGTAAGGGGCTGCA-3'
Sonde NF-κB	5'-AGTTGAGGGGACTTT-3' 3'-CCCTGAAAGGGTCCG-5'
Sonde Sp1	5'-GCCCGCCC-3' 3'-GCGGGCGG-5'

Tableau 5 : Les différents oligonucléotides utilisés par gel retard

2. Etude de l'activité de fixation des protéines nucléaires sur l'ADN par gel retard

2.1. Marquage des sondes oligonucléotidiques

Six sondes oligonucléotidiques correspondant à la région III du promoteur proximal du gène *IκBα*, identifiée par ChIP, ont été synthétisées dans le commerce (Eurogentec). D'autres sondes oligonucléotidiques, correspondantes aux séquences reconnues par les facteurs de transcription NF-κB et Sp1 ont été synthétisées dans le commerce (Eurogentec) et sont utilisées comme témoins d'expérience. Toutes les séquences sont répertoriées dans le Tableau 5.

Après hybridation des parties complémentaires de chaque oligonucléotide (10 ng) dans le tampon d'incubation de l'ADN polymérase du fragment de Klenow (Fermentas), pendant 10 min à 4°C, les extrémités simple brin sont synthétisées par élongation pendant 30 min à 37°C après addition de 0,5 mM de dATP, de dGTP, de dTTP et du d[αP^{32}]CTP, et de 10 unités d'enzyme. La sonde double brin ainsi radiomarquée, est séparée des nucléotides non incorporés par gel filtration sur une matrice de séphadex G25 (Amersham, UK). La radioactivité émise par chaque sonde est appréciée à l'aide d'un compteur Geiger.

2.2. Interaction des protéines sur l'ADN et analyse du complexe

Les protéines nucléaires (2µg), extraites selon la méthode décrite dans la partie III.1.1., sont incubées avec 1 ng d'oligonucléotide radiomarqué, dans un tampon d'incubation 10 mM Hepes, pH 7,9, contenant 2 mM de $MgCl_2$, 0,4 mM d'EDTA, 16 mM de KCl, 0,4 mM de DTT et 1 µg de poly dI-dC, l'ensemble dans un volume final complété par de l'eau stérile à 10 µl. Après 30 min d'incubation sur la glace, 1 µl de tampon de dépôt correspondant au tampon d'incubation additionné de bleu de bromophénol et contenant 10% de glycérol est ajouté au volume réactionnel.

La spécificité de l'interaction ADN-protéine est étudiée en incubant les extraits nucléaires avec des quantités croissantes (25, 50, 100 fois en excès) de sonde oligonucléotidique froide et double brin, soit identique à celle radiomarquée, soit non spécifique et correspondant à l'élément consensus de reconnaissance du facteur de transcription NF-κB (5'-AGTTGAGGGGACTTT-3'), durant 5 min sur la glace, avant d'y ajouter la sonde spécifique radiomarquée.

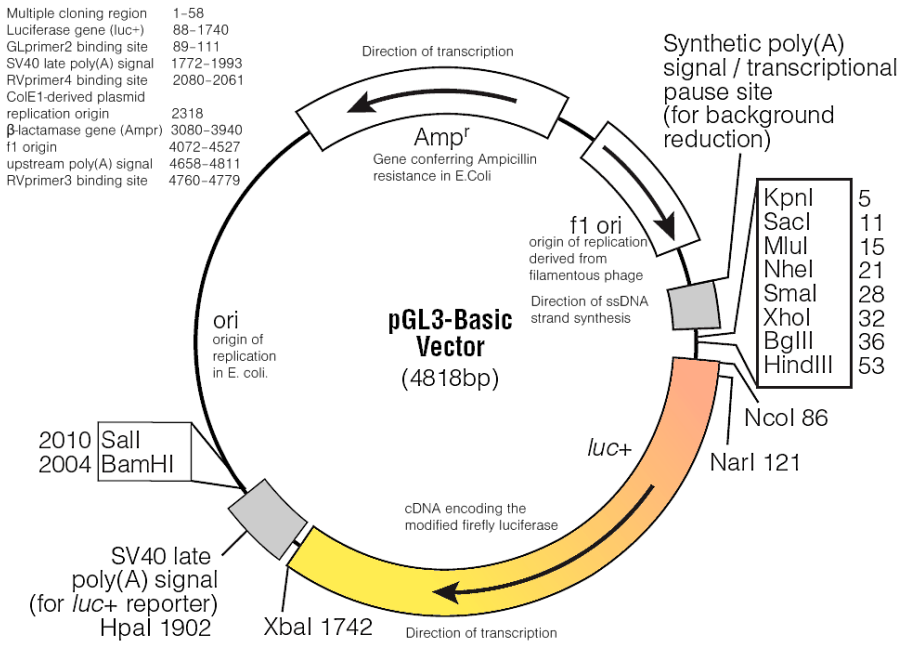


Figure 34: Représentation de la carte du plasmide pGL3-luc (Promega).

Le vecteur pGL3 est constitué du gène rapporteur codant la luciférase et d'un gène de résistance à l'ampicilline, ainsi que d'une région d'insertion contenant les différents sites d'enzymes de restriction.

Le complexe ADN-protéine est ensuite analysé par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à 5% préparé dans un tampon Tris 45 mM/Borate 45 mM/1mM EDTA pH 8 (TBE 0,5X). Les échantillons rapidement déposés sont soumis à un voltage constant de 110 V pendant 30 min dans le tampon TBE 0,5X. Après séchage sous vide à 80°C pendant 20 min, le gel est exposé sur un film photographique à -80°C (X-Omat, Kodak).

La nature du complexe retardé sur gel est caractérisée par une analyse par super-retard, en utilisant un anticorps reconnaissant spécifiquement une protéine soupçonnée d'être fixée sur la sonde oligonucléotidique radiomarquée. Brièvement, après incubation des protéines nucléaires avec la sonde radiomarquée, 1 µg d'anti-DDB2, anti-p65NF-κB, anti-p50NF-κB, ou encore anti-Sp1 (Santa Cruz Biotechnology) est ajouté à l'ensemble pendant 30 min à 4°C. Le complexe super-retardé est ensuite analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (5%) comme précédemment.

3. Etude de l'activité transcriptionnelle des protéines nucléaires

3.1. Construction du plasmide contenant la partie proximale du promoteur du gène *IκBα*

Cette construction consiste à placer le gène rapporteur luciférase dans le plasmide pGL3 basique (Proméga, France) sous le contrôle de la partie proximale du promoteur du gène *IκBα*, cloné à partir de l'ADN génomique humain (Figure 34).

La partie proximale du promoteur (1512 pb) du gène *IκBα* est amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique extrait de leucocytes humains, en utilisant des amorces spécifiques : amorces sens 5'-TGAATTCAGTCCATGGCTTGCAGGC-3' et antisens 5'-GGATCTCCTGCAGCTCCTTGACCAT-3'. La PCR est réalisée dans un volume de 50 µL contenant 100 ng d'ADN génomique, le tampon d'incubation iProof GC (Bio-rad), 0,35 mM de déoxynucléotides triphosphates (dNTP) néosynthétisés, 5 mM MgCl2, 0,25 µM de chacune des amorces et 2,5 unités d'iProof™ high-fidelity DNA polymérase (Bio-rad). La réaction a lieu dans un thermocycler Techne TC-300 et est soumise à une dénaturation initiale d'1 min à 98°C, suivie de 35 cycles de dénaturation de 30 secondes à 98°C, une hybridation de 30s à 70°C et d'une élongation de 1 min 30s à 72°C. Le programme se termine par une étape d'élongation finale de 7 minutes à 72°C. Le produit d'amplification est observé par

électrophorèse dans un gel à 0,8 % d'agarose (P/V) en tampon TBE 1X (90 mM Tris, 90 mM Borate, 2 mM EDTA, pH 8,0) / BET (Bromure d'éthidium) à 110 V pendant 45 minutes.
Après sa purification depuis le gel d'agarose, à l'aide du kit commercial 'illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit' (GE Healthcare Bio Sciences), le fragment de 1512 pb à bout franc, correspondant au promoteur proximal du gène *IκBα*, est inséré dans le vecteur pGL3 basique (Promega, France), contenant un gène rapporteur de type luciférase, préalablement linéarisé par digestion avec l'enzyme de restriction *Sma I* selon la méthode suivante. Cette digestion du plasmide par *SmaI* est réalisée à 25°C pendant 16h sur 1 µg de plasmide pGL3-basique dans un volume réactionnel de 20 µL, contenant 2 µL de tampon de digestion 10X, 10 unités d'enzyme de restriction (Promega) et complété par de l'eau. Après vérification de l'efficacité de la digestion par une électrophorèse sur gel 0,8% d'agarose (P/V), le plasmide est purifié par extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique. Le plasmide digéré est ensuite précipité dans 200 µl d'éthanol absolu à -20°C, contenant 1/10ème de volume d'acétate de sodium 3M. Après un lavage à l'éthanol à 75°C, le plasmide linéarisé est dissous dans l'eau et sa quantité est estimée sur un gel à 0,8% d'agarose par comparaison avec un marqueur de taille identique et de quantité connue. La ligation s'effectue dans un volume réactionnel de 10 µL contenant 1µl de tampon de ligation 10X et 1 unité de T4 DNA ligase (Proméga) durant 15 min à température ambiante.

L'ensemble de la ligation est ensuite mis en contact avec des bactéries *Escherichia coli* de souches TG1, rendues préalablement compétentes par le $CaCl_2$. Après un choc thermique de 30 sec à 42°C, puis 2 min sur la glace, les bactéries transformées sont alors incubées 1h à 37°C sous agitation dans un volume final de 1 ml de milieu LB (10 g/l tryptone, 5 g/l extait de levure, 10 g/l NaCl, pH 7). Apres étalement des bactéries sur boite de pétri de 90 mm en milieu LB (contenant 20 g/l de bactoagar) et de l'ampicilline, les clones bactériens sont incubés 1 nuit à 37°C. Les colonies sont ensuite repiquées et mises en culture dans 2 ml de LB contenant 20µg/ml d'ampicilline, durant 8 heures (pré-culture). Un dixième du volume de cette pré-culture est cultivé dans 5 ml de LB/20µg/ml d'ampicilline pendant une nuit. Après centrifugation à 1200 g pendant 10 min, le plasmide contenant l'insert est extrait par lyse alcaline des bactéries, à l'aide du kit Nucleobond (Macherey Nagel Allemagne). L'ADN plasmidique est finalement précipité, séché sous vide, puis dosé au nanodrop 2000c. La présence de l'insert est vérifiée par une digestion enzymatique du plasmide avec *HindIII* (Fermentas), suivie d'une électrophorèse en gel d'agarose 2 % (P/V) en TBE 1X. La présence de deux fragments de 800 et 720 pb est attendue. Le promoteur proximal de 1512 pb ainsi cloné dans le vecteur pGL3 basique est séquencé par la société Beckmann Coulter (France).

La construction plasmidique ainsi réalisée est appelée pGL3/IκB Luc. Un plasmide, contenant le promoteur proximal du gène *IκBα* dans le sens inverse, est également obtenu et appelé pGL3/IκBRev Luc. Il sera utilisé comme contrôle négatif.

3.2. Mutagenèse dirigée de la région nucléotidique O_3

Les oligonucléotides O3 Mut10, incapables de fixer DDB2, sont utilisés comme amorces pour intégrer par PCR les 2 nucléotides mutés dans le promoteur proximal du gène *IκBα,* en utilisant le plasmide pGL3/IκB Luc comme matrice d'ADN. La PCR est réalisée dans un volume final de 20µl, contenant 1 ng de plasmide pGL3/IκB Luc, 1 mM d'amorces O3 Mut10 sous forme phosphorylées à l'extrémité 5, 0,4U de polymérase iproof (BioRad), 200µM de chaque dNTP (BioRad), 4µl de tampon HF (Biorad), le tout complété par de l'eau stérile. Les réactions d'amplification sont effectuées dans un thermocycleur à gradient de température (thermal cycler 170-0709, BioRad), selon le programme suivant : une étape de dénaturation initiale de 3 minutes à 98°C, suivie de 30 cycles comportant une dénaturation de 30 secondes à 98°C, une hybridation de 30 secondes à 61°C et une élongation de 1min 30 secondes à 72°C. La réaction est terminée par une étape d'élongation finale de 7 minutes à 72°C. Le produit de PCR est ensuite purifié par une extraction phénol/chloroforme.

Vingt-cinq ng du produit de PCR contenant la mutation Mut10 sont circularisés par ligation selon le protocole du kit finzymes phusion (Biolabs) et sont utilisés pour la transformation, comme précédemment, des bactéries compétentes DH5α. Afin d'éviter toutes mutations introduites dans le plasmide pGL3 lors de la PCR, le promoteur proximal du gène *IκBα* est sous-cloné dans un vecteur sain. Pour cela, le plasmide ayant servi de matrice pour intégrer par PCR les mutations du site de fixation de DDB2 est digéré par les enzymes de restriction *NheI/KpnI*. Le promoteur muté ainsi libéré est inséré par ligation dans un plasmide pGL3 basique sain et préalablement linéarisé avec les mêmes enzymes de restriction. Après vérification par séquençage, par la Société Beckmann Coulter, de la présence des mutations sur le site de fixation de DDB2, la construction plasmidique ainsi obtenue est appelée pGL3/IκB Mut10 Luc.

3.3. Transfection transitoire et mesure de l'activité luciférase

Un jour avant la transfection, 10^5 cellules/ml sont ensemencées en plaque 24 puits. En présence de Trans PEI (Eurogentec), les cellules MDA-MB231, SKBR3 et MCF-7 sont co-transfectées avec 0,2 µg d'un plasmide contrôle appelé pSV40/βGal, contenant le gène codant la β-galactosidase (BS Biosciences Clontech), et 0,8 µg de plasmide pGL3-Luc, qui contient le gène luciférase dont l'expression est, soit sous le contrôle de la partie proximale du promoteur du gène *IκBα* (Figure 34), soit sous le contrôle d'une séquence fixant le complexe NF-κB (plasmide fournit par le Docteur Marc Diederich) ou encore sous le contrôle du TNFRE (pGL3/TNFRE Luc). Ce plasmide, fournit par le Professeur Corinne Abbadie (Bernard *et al*., 2001) correspond à l'élément de réponse est appelée « TNFRE » ou « Tumor Necrosis Factor Response Element » qui contient un motif κB sur lequel se fixe le facteur de transcription NF-κB sous la forme d'un hétérodimère p50/p65 pour induire l'expression du gène de la SOD Mn en présence de TNFα (Bernard *et al*., 2001, Josson *et al*., 2006). Après 24 heures, les cellules sont lavées 2 fois avec du D-PBS, puis lysées, avant de mesurer l'activité luciférase et β-galactosidase, à l'aide d'un kit commercial (Roche). La luminescence émise lors des réactions enzymatiques respectives est quantifiée en Unité Relative de Lumière (URL) à l'aide d'un luminomètre (TD-20/20, Turner designs, Sunnyvalley, CA, USA). Les résultats sont exprimés en activité relative de la luciférase, qui correspond au nombre d'URL de luciférase divisé par celui de la β-galactosidase, et sont présentés comme la moyenne ± la déviation standard des valeurs de trois expériences indépendantes, chaque expérience comportant trois mesures.

VI. ANALYSE DES CAPACITES INVASIVES ET MIGRATRICES

1. Analyse des capacités migratrices et invasives *in vitro*

1.1. Par la méthode en chambre de Boyden

Les capacités d'invasion et de migration sont évaluées par la méthode en chambre de Boyden modifiée. Cette méthode consiste à mesurer les capacités des cellules tumorales à traverser des pores de 8 µm de diamètre en présence (invasion) ou en absence (migration) de matrigel, au niveau d'une membrane en polycarbonate placée au sein d'une chambre insérée (chambre de Boyden) au dessus des puits d'une plaque en comportant 24 au total (BD Biosciences, France). Le matrigel (BD Biosciences, France) reconstitue une matrice extracellulaire, composée de laminine, de collagène de type IV, d'entactine et d'héparane sulfate. Les membranes des chambres supérieures ou insert, utilisées pour mesurer les capaités invasives sont recouvertes de 20 µg de matrigel, dilué dans du milieu RPMI 1640 sans SVF et placées pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules MDA-MB231 et SKBR3 sont ensemencées à $2x10^5$cellules/ml dans les chambres supérieures dans 300 µl de milieu sans SVF. Dans la partie inférieure de chaque puits, 500 µl de milieu contenant 10% de SVF sont ajoutés comme chimio-attractant. Ce milieu complet de la chambre inférieure est complété avec 50 ng/ml d'EGF pour les cellules SKBR3. Apres 36 ou 48 heures d'incubation, respectivement pour les cellules MDA-MB231 et SKBR3 à 37°C, les cellules non invasives ou non migratrices restées dans la chambre supérieure sont délicatement éliminées à l'aide d'un coton-tige. Par contre, les cellules invasives ou migratrices, se retrouvant sur la face externe des inserts, sont fixées avec une solution de PAF 4% pendant 10 minutes et sont ensuite colorées pendant 30 minutes par une solution de Crystal violet (0,05%) contenant 0,2% d'éthanol. Après plusieurs lavages à l'eau, les inserts sont séchés puis observés à l'aide d'un microscope inversé (Motic type 101M), équipé d'une caméra pour l'acquisition des images. Les cellules sont ensuite lysées avec une solution d'acide acétique 4%. Cent-cinquante µl de cette dernière solution sont transférés dans une plaque de microtitration de 96 puits, afin de mesurer l'absorbance à 560 nm, proportionnelle au nombre de cellules invasives et migrantes, à l'aide d'un lecteur de microplaque (Labsystem, Cergy-Pontoise, France).

1.2. Par le test de blessure

Les cellules sont incubées dans une plaque 6 puits et cultivées en milieu complet RPMI-1640. Lorsque ces cellules arrivent à confluence, une blessure est réalisée sur le tapis cellulaire à l'aide d'une pointe stérile correspondant à celle d'un cône bleu de pipette automatique. Les cellules mises en suspension par la blessure sont éliminées par plusieurs lavages avec du D-PBS, et leur milieu de culture est changé. A partir du temps 0 heure, la culture au niveau de la blessure est photographiée toutes les 12 heures, jusqu'à 36 heures, à l'aide d'un microscope inversé, équipé d'une caméra pour l'acquisition des images.

2. Analyse des capacités invasives *in vivo*

2.1. Injection des cellules et xénogreffes de tumeurs chez la souris

Des souris femelles Nude immuno-déficientes NMRI-ni (nu/nu) (Laboratoire Janvier, le Genest-Saint-Isle, France) âgées de 6 semaines sont maintenues à une température ambiante de 20-22°C et sont soumises à des cycles de 12 heures alternant lumière/obscurité. L'eau et la nourriture sont fournies *ad libitum*.
Un inoculât contenant $2x10^6$ cellules MDA-MB231 GFP-positives, Wt, Neo1 ou Clone 1 est préparé dans un volume de 100 µL de sérum physiologique, puis est injecté en sous-cutanée en position inguinale bilatérale chez chaque animal. La croissance tumorale est suivie en mesurant le volume des tumeurs deux fois par semaine à l'aide d'un pied à coulisse. Le volume est calculé selon la formule suivante : $V= Dxd^2 /2$ (d = petit diamètre et D = grand diamètre). Les souris sont sacrifiées lorsque la tumeur atteint un volume d'environ 1100 mm^3. Certains morceaux de tumeurs sont récupérés soigneusement et transplantés pour xénogreffes au niveau des deux flancs de l'animal. Après 3 passages successifs de xénogreffes chez la souris, comme précédemment, les poumons des animaux sont récupérés lorsque les tumeurs atteignent un volume d'environ 1100 mm^3, puis sont divisés en deux fragments pour les analyses par cytométrie en flux et par histologie.

2.2. Quantification des cellules invasives par cytométrie en flux

Le nombre de cellules tumorales GFP positives, ayant envahi les poumons des souris est évalué par cytométrie en flux. Pour cela, les poumons sont incubés pendant 1 heure à 37°C

dans une solution saline de Hank (HBSS), contenant, de la collagénase de type IV (0.6 Wunsch Unit/ml, Eurobio), de la dispase II (1mg/ml, Sigma), de la DNAse I (200 UI/ml, Roche), 75 µM de $CaCl_2$ et 125 µM de $MgCl_2$. puis passés dans un filtre de nylon (100 µm) (Dutscher). Après une centrifugation à 100 g durant 7 minutes et à 4°C, les culots sont resolubilisés dans un tampon HBSS contenant 200 UI/ml de DNAse I et 125 µM de $MgCl_2$. Les cellules en suspension sont centrifugées à 100 g pendant 7 minutes et resuspendues dans un tampon de lyse des globules rouges (NH_4Cl (0.15 M), $KHCO_3$ (10 mM) EDTA (100 µM). Pour finir, les cellules sont centrifugées à 100 g pendant 3 minutes avant d'être analysées par cytométrie en flux. Parmi 200000 cellules analysées, celles exprimant la GFP et donc fluorescentes sont comptées par l'appareil. Les données sont ensuite traitées avec le logiciel Cell Quest Software (BD Biosciences).

2.3. Quantification des cellules invasives par analyse histologique

Les cellules tumorales mammaires ayant envahi les poumons des souris sont mis en évidence et énumérées par une analyse histologique, qui consiste en une révélation spécifique du génotype des cellules humaines au sein du tissu murin, par une méthode d'hybridation *in situ.*

Des morceaux de poumons des souris xénogreffées sont fixés dans une solution de 5 % de formol tamponné à pH 7,2 - 7,4 pendant 48 heures, à température ambiante. Après le temps de fixation, les prélèvements sont déshydratés dans un automate de type LEICA ASP 300, avant d'être inclus dans de la paraffine liquide préalablement chauffée. Les blocs de paraffine obtenus sont découpés en tranches fines d'environ 2 µm d'épaisseur, à l'aide d'un microtome de type LEICA RM 2135 à rotation et à commande manuelle. La coupe est déposée et collée sur une lame en verre. Cette préparation est ensuite soumise à une étape de déparaffinage, puis d'hydratation. Pour cela, la lame est trempée successivement dans des bains de toluène, d'alcool à gradient décroissant, puis d'eau. Afin de faciliter la réaction d'hybridation *in situ* entre acides nucléiques, les coupes subissent un traitement à la protéinase K, pour digérer les protéines, dans un tampon citrate à pH 6, durant 10 minutes à 37°C.

La fabrication de la sonde se fait dans un tampon d'incubation en présence d'ADN génomique humain couplé à la digoxigénine. Un marquage Random aléatoire est réalisé avec l'enzyme Klenow. Pour ce faire, un mélange contenant 2 µl d'hexanucleoltides (Hexanucleotide Mix 10X, Roche 11277081001), 2 µl de digoxygénine DNA labeling (Roche

11277065910) et 1 µl d'enzyme klenow (Promega M218A) est réalisé et placé une nuit à 37°C. La réaction est arrêtée le lendemain avec 2 µl d'EDTA. La sonde ADN ainsi marquée par la digoxigénine est déposée sur la lame, et l'étape d'hybridation *in situ* est réalisée selon le programme suivant : dénaturation durant 15 minutes à 37°C suivie d'une hybridation d'une nuit à 37°C. La lame est ensuite trempée pendant 15 minutes dans des bains de formamide et d'un tampon citrate de sodium (SSC). Un bain de caséine 1% est réalisé après un lavage dans une solution de TBS-tween. L'hybridation des sondes ADN avec l'ADN des cellules tumorales invasives est révélée. Un anticorps secondaire anti-digoxigénine couplé à la peroxydase (Roche 11093274910) est ajouté pendant un temps d'incubation d'une heure à l'obscurité. L'activité de la peroxydase est révélée à l'aide du substrat chimioluminescent NBT-BCIP (Roche 11681451001). La révélation (environ 15 minutes) est suivie sous un microscope.

Le comptage des cellules invasives colorées est réalisé à l'aide du logiciel Axiovision 4.8 et du microscope (Axioscop 2, Leica).

VII. ANALYSE STATISTIQUE

Toutes les expériences sont réalisées au moins trois fois, de manière indépendante. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± la déviation standard ou l'erreur standard. L'analyse statistique est réalisée à l'aide du test de Student (Graphpad prism 5.0, GrapPad Softwar, San Diego, CA) pour les résultats obtenus en PCR semi-quantitative, en western blot, en test de migration et d'invasion, les mesures d'activité de la luciférase après transfection transitoire. Pour les expériences *in vivo*, l'analyse statistique est réalisée avec le test de Mann et Whitney (Graph Pad Prism 5.0). Enfin, les données provenant de la RT-PCR quantitative sur les échantillons cliniques sont analysées statistiquement à l'aide du test ANOVA et de Student-Newman-Keuls. Les résultats sont statistiquement significatifs pour un $p < 0,05$.

CHAPITRE 3

RESULTATS

RESULTATS

I. MISE EN EVIDENCE D'UN MECANISME MOLECULAIRE IMPLIQUANT DDB2 DANS LE CONTROLE DES CAPACITES MIGRATRICES ET INVASIVES DES CELLULES TUMORALES MAMMAIRES

1. Résultats préliminaires

Il a été montré que la protéine DDB2 est impliquée dans la croissance des cellules tumorales mammaires. En effet, elle est surexprimée dans les cellules cancéreuses mammaires non métastatiques, et active leur prolifération en favorisant l'entrée dans la phase G1/S du cycle cellulaire ainsi que leur progression à travers la phase S du cycle. DDB2 stimule la prolifération de ces cellules en maintenant une expression faible de la SOD Mn. Tandis que cette dernière a un niveau d'expression élevée, la protéine DDB2 est faiblement, voire pas exprimée dans les cellules cancéreuses mammaires métastatiques (Kattan *et al*., 2008a). Ces résultats ont été montrés pour la 1ère fois être dépendants d'une implication de DDB2 dans la transcription génique, en particulier du gène codant la SOD Mn (Minig *et al*., 2009). Dans le but de rechercher d'autres gènes cibles potentiels de DDB2, une analyse transcriptomique sur puce à ADN, comparative entre des cellules exprimant ou non DDB2, a été réalisée. Parmi les gènes cibles potentiels, nous nous sommes intéressés à celui codant IκBα comme cible potentielle de DDB2.

2. Importance de la protéine DDB2 dans les capacités migratrices et invasives *in vitro* et *in vivo*

Ces résultats préliminaires nous ont conduits à étudier dans un 1er temps l'importance de DDB2 dans les capacités migratrices et invasives des cellules cancéreuses mammaires métastatiques à la fois *in vitro* et *in vivo*. Pour cela, nous avons développé deux modèles de cellules invasives et hautement métastatiques, tels que les MDA-MB231 et SKBR-3, ayant reçu une construction plasmidique, réalisée précédemment dans le laboratoire d'accueil (Kattan *et al*., 2008b) et conduisant à la surexpression de DDB2. Les conséquences de cette surexpression sur les propriétés migratrices, invasives et métastatiques des cellules

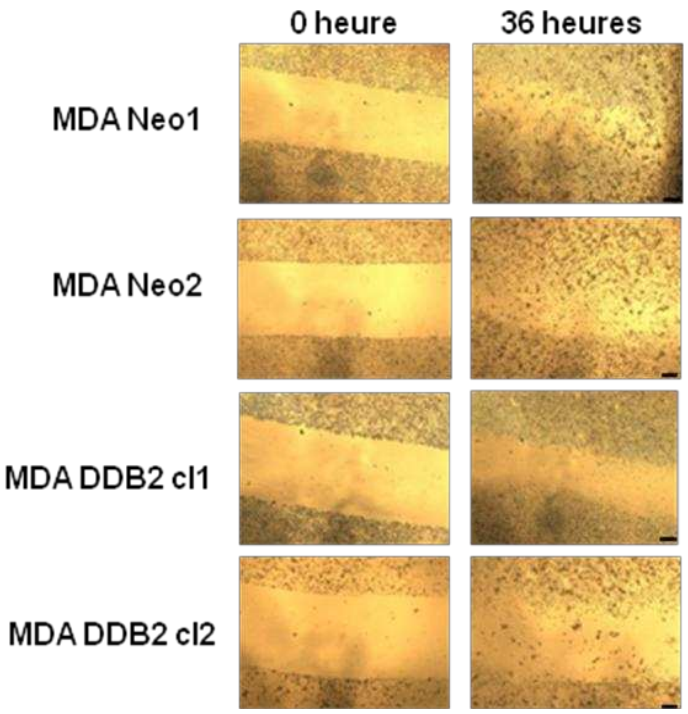


Figure 1' : Analyse *in vitro* des capacités migratrices des cellules MDA-MB231 surexprimant DDB2 par le test de blessure. Une blessure artificielle est réalisée à l'aide d'une pointe de pipette sur un tapis de cellules à confluence et cultivées en puits d'une plaque de 6 puits. Les capacités migratrices de ces cellules au niveau de la blessure sont ainsi suivies durant 36 heures à l'aide d'un microscope à contraste de phase équipé d'une caméra. Cette figure est représentative de trois expériences réalisées indépendamment (la barre : 100 µm).

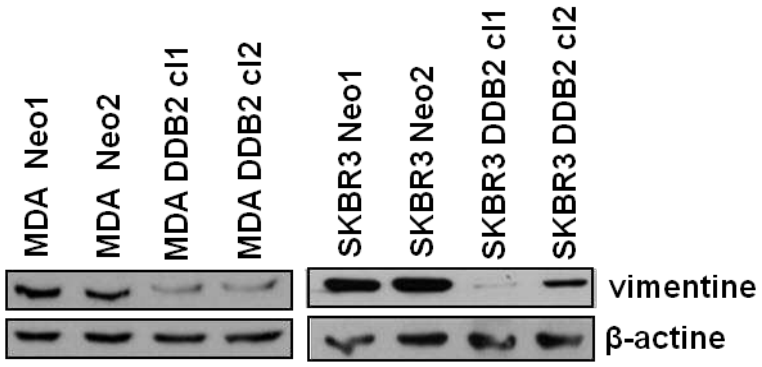


Figure 2': Expression de la vimentine dans les cellules tumorales mammaires surexprimant DDB2. L'expression de la vimentine est analysée par Western Blot dans les cellules MDA-MB231 et SKBR3 surexprimant DDB2 et comparée aux cellules contrôles Neo respectives. La β-actine est également révélée pour témoigner de l'équivalence des dépôts de protéines totales pour chaque condition (50 µg). Cette figure est représentative de trois expériences réalisées indépendamment.

cancéreuses mammaires sont ainsi étudiées. Les résultats révèlent que, quelque soit la méthode utilisée (test de blessure ou chambre modifiée de Boyden), la surexpression de DDB2 réduit très significativement les capacités migratrices *in vitro* des cellules qui surexpriment cette protéine, comparativement aux cellules parentales sauvages (Wt) ou transfectées avec la construction plasmidique ne contenant aucun transgène (Neo) (Figure 1'et Article 1).

Les expériences réalisées avec les chambres de Boyden, dans lesquelles la membrane poreuse est recouverte d'une matrice extracellulaire, révèlent que la surexpression de DDB2 réduit très significativement les capacités des cellules tumorales à dégrader cette matrice pour traverser les pores, suggérant ainsi de profondes modifications dans leurs capacités invasives. Afin de rechercher une cause associée à cette réduction importante des capacités invasives des cellules tumorales surexprimant DDB2, nous avons analysé par zymographie, et ce en présence ou non de fibronectine, ou encore d'EGF pour les SKBR3, la sécrétion dans le milieu de culture des MMP-2 et -9. Ces MMP sont connues principalement pour leur rôle dans la progression métastatique des tumeurs mammaires (Deryugina *et al*., 2006). Cette analyse associe la réduction des capacités invasives des cellules tumorales mammaires surexprimant DDB2, avec une réduction forte de la MMP-9 mais pas de la MMP-2, comparativement aux cellules témoins Wt et Neo (Article 1). En parallèle, nous avons également vérifié l'expression de la vimentine, une protéine du cytosquelette d'origine mésenchymateuse, qui est connue pour son implication dans les capacités migratrices et invasives des cellules, comme nous l'avons décrit dans l'analyse bibliographique (Gilles *et al*., 2003). Elle est fortement exprimée dans les cellules tumorales hautement invasives, qui ont subi la transition épithélio-mésenchymateuse. Nous observons, comme pour la MMP-9, que l'expression de la vimentine est fortement diminuée dans les cellules MDA-MB231 et SKBR3 qui surexpriment DDB2, par rapport aux cellules témoins respectives (Figure 2').

L'analyse *in vivo* des capacités invasives des cellules tumorales mammaires MDA-MB231 selon l'expression de DDB2 a été réalisée par des expériences de xénogreffes chez la souris nude. Ces xénogreffes sont réalisées de 2 façons : par primo-injection des cellules tumorales et par greffes de tumeurs développées par ces cellules et préalablement maintenues durant trois passages chez l'animal. Afin d'évaluer le nombre de cellules invasives dans les poumons, ces cellules surexprimant ou non DDB2 sont rendues fluorescentes en leur introduisant le gène codant la GFP par une stratégie utilisant des particules lentivirales. Les résultats montrent que les cellules tumorales surexprimant DDB2 envahissent beaucoup

Figure 3'. Résultats des analyses par cytométrie en flux, montrant la distribution des cellules invasives quantifiées dans les poumons des souris injectées avec les cellules MDA Neo ou DDB2.

	Cellules Neo			Cellules DDB2		
% cellules GFP positives	<0.03	0.03-0.1	>0.1	<0.03	0.03-0.1	>0.1
Poumons	2/7	3/7	2/7	5/5	0/5	0/5

Les poumons ont été dissociés et les suspensions cellulaires contenant les cellules tumorales GFP positives ont été analysées par FACS. Les données sont issues de 7 souris injectées avec les cellules Neo et de 5 souris injectées avec les cellules surexprimant DDB2.

Figure 4'. Données issues des analyses obtenues par cytométrie en flux, montrant la distribution des cellules invasives quantifiées dans les poumons des souris xénogreffées avec un fragment de tumeur MDA Neo ou surexprimant DDB2.

	Cellules Neo			Cellules DDB2		
% cellules GFP positives	<0.1	0.1-1	>1	<0.1	0.1-1	>1
Poumons	0/5	4/5	1/5	6/6	0/6	0/6

Les différentes tumeurs MDA-MB231 ont été établies chez les souris durant 3 passages. Les poumons ont été dissociés et les suspensions cellulaires contenant les cellules GFP positives ont été analysées par FACS. Les résultats sont issus de 5 souris xénogreffées avec les tumeurs Neo et de 6 souris xénogreffées avec les tumeurs surexprimant DDB2.

moins le parenchyme pulmonaire des souris nude, que les cellules témoins, et ce quelque soit la méthode utilisée pour l'évaluation des cellules métastatiques, la cytométrie en flux ou l'analyse histologique (Article 1). Cette diminution de l'envahissement du parenchyme pulmonaire avec la surexpression de DDB2 est encore plus marquée après xénogreffes de tumeurs préalablement établies par trois passages chez la souris (Figures 3' et 4', et Article 1).

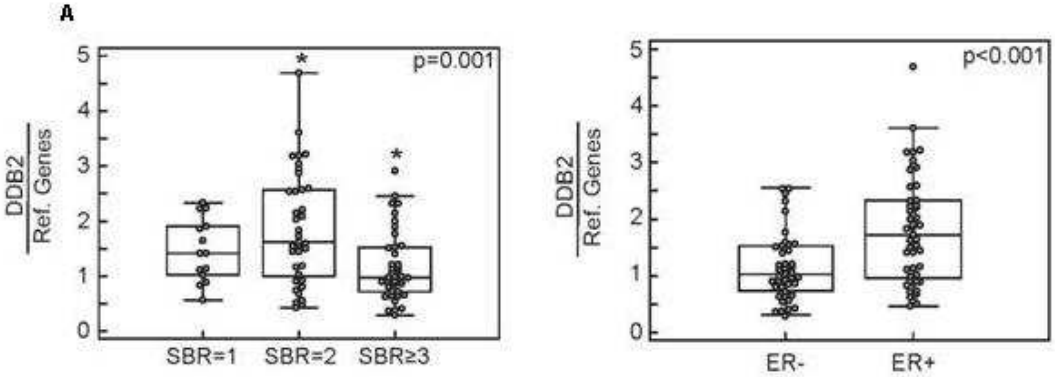
Afin de compléter les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*, nous avons étudié l'expression de DDB2 par RT-PCR en temps réel sur une série de 92 échantillons de tumeurs mammaires issues de patientes. Cette série a été préalablement analysée pour des marqueurs pronostiques connus, comme les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone ainsi que pour le grade histologique, au sein du Centre Régional de Lutte contre le Cancer Paul Strauss de Strasbourg (Figure 5'). Nos résultats indiquent que le niveau d'expression de DDB2 est inversement corrélé avec le grade histologique SBR. En effet, les tumeurs mammaires faiblement différenciées de haut grade (SBR $\geq$ 3) expriment significativement moins DDB2 ($p = 0,001$) que celles de faible grade (SBR = 1), bien différenciées (Figure 5'). En accord avec la distribution des échantillons de tumeurs entre l'expression de ERα et le grade SBR, dans laquelle 86% d'entre eux avec un grade SBR = 1 sont ERα positifs et 73% avec un grade SBR $\geq$ 3 sont ERα négatives, l'expression de DDB2 est également corrélée ($p < 0,001$) avec celle du récepteur aux œstrogènes (Figure 5').

3. Identification du mécanisme moléculaire expliquant en partie le rôle de DDB2 dans le contrôle des capacités invasives

Sur la base de l'analyse transcriptomique révélant que DDB2 puisse avoir comme gène cible celui codant IκBα, nous nous sommes intéressés à étudier les conséquences sur l'activité de NF-κB. Dans un 1er temps, nous avons vérifié par RT-PCR, Western blot et immunocytofluorescence, l'expression d'IκBα selon l'expression de DDB2, dans les deux modèles cellulaires. Ces analyses révèlent que la surexpression de DDB2 est corrélée à une augmentation de l'expression d'IκBα aux niveaux transcriptionnel et traductionnel, confirmant l'observation préalable lors de l'analyse transcriptomique sur puce à ADN. Les conséquences sur l'activité transcriptionnelle de NF-κB par un gène rapporteur sous contrôle de motifs κB, sont alors évaluées et les résultats montrent que cette activité est fortement diminuée dans les cellules surexprimant DDB2, comparativement aux cellules témoins. De même, l'expression au niveau transcriptionnel de la MMP-9, un gène cible de NF-κB, est

également fortement diminuée avec la surexpression de DDB2. En relation avec ces résultats, la translocation nucléaire des protéines p50 et p65 constituant le complexe NF-κB est fortement diminuée dans les cellules surexprimant DDB2, comparativement aux cellules témoins.

Dans un 2ème temps, nous avons voulu montrer si DDB2 est directement impliquée dans l'induction de l'expression du gène codant IκBα. Pour cela, une analyse globale sur le promoteur proximal de ce gène par immunoprécipitation sur chromatine a été réalisée sur les cellules MDA-MB231 surexprimant ou non DDB2, afin d'identifier un site de fixation de cette protéine. A l'aide de sondes oligonucléotidiques, délimitant 4 régions du promoteur proximal (régions I à IV) du gène codant IκBα, l'analyse par immunoprécipitation sur chromatine révèle un site spécifique de fixation de DDB2 dans la région III, localisé entre -555 et -394 pb, (Article 1). Afin de caractériser la partie de la région III fixant DDB2, 6 séquences oligonucléotidiques (O_1 à O_6) représentant cette région, ont été synthétisées et utilisées en gel retard. Parmi ces 6 séquences, seule la O_3 est capable de fixer spécifiquement la protéine DDB2. Plusieurs oligonucléotides mutés sur deux bases consécutives de cette séquence O_3 ont permis en gel retard de caractériser précisément la séquence TCCCCTTA (localisée entre -491 et -483 pb), comme le site de fixation de DDB2 dans la région proximale du promoteur du gène codant IκBα (Article 1). Ce site de fixation de DDB2 est localisé en dehors des sites déjà caractérisés pour d'autres facteurs de transcription, tels que Sp1 et NF-κB. Enfin, une analyse fonctionnelle du promoteur a été réalisée à partir du clonage d'une région de 1512 pb correspondant au promoteur proximal du gène codant IκBα, qui est intégrée en amont d'un gène rapporteur de type luciférase dans le vecteur plasmidique pGL3 basique. A l'aide de cet outil, nous avons montré par transfection transitoire que l'activité du promoteur du gène IκBα est fortement plus élevée dans les cellules MDA-MB231 surexprimant DDB2 que dans les cellules témoins. De même, lorsque le site de fixation de DDB2 nouvellement caractérisé est muté dans la région proximale du promoteur du gène d'IκBα, qui contrôle le gène rapporteur, l'expression de celui-ci est fortement diminuée dans les cellules MDA-MB231 surexprimant DDB2 (Article 1). Cette analyse fonctionnelle du promoteur du gène d'IκBα confirme ainsi l'analyse transcriptionnelle de ce gène, réalisée précédemment par RT-PCR entre les cellules MDA-MB231 qui surexpriment ou non la protéine DDB2. L'ensemble de ces résultats est également démontré avec la lignée de cellules tumorales mammaires MCF-7, qui surexpriment naturellement DDB2 (Figure 6'). Nous avons tenté de comprendre comment DDB2, en se fixant sur son site spécifique, induit l'expression



B

	ERα positifs	ERα negatifs
Nombre de patients	49	43
Grade histologique (SBR)		
1	12/14 (86%)	2/14 (14%)
2	26/37 (70%)	11/37 (30%)
≥ 3	11/41 (27%)	30/41 (73%)

Figure 5' : Expression de DDB2 dans les échantillons cliniques de tumeurs mammaires, selon leur grade histologique et leur statut ER.

(A) Les ARNs totaux sont extraits à partir de 92 tumeurs mammaires issues de patientes. L'expression de DDB2 est évaluée par RT-PCR en temps réel dans chaque tumeur (3 mesures). Les niveaux de Ct de DDB2 sont normalisés avec les valeurs des Ct des contrôles internes : Ubiquitine B (UBB) et RPLPO. Cette expression de DDB2 est corrélée avec le grade histologique SBR et l'expression de ERα. Les barres horizontales dans les graphiques, représentent la médiane pour chaque grade SBR et selon le statut d'ER (+ ou -). Les différences entre les groupes sont statistiquement évaluées par le test ANOVA one -way et parewised, puis comparées avec un test de Student-Newman-Keuls. Les différences sont significatives pour un $p<0,05$. (B) Les échantillons de tumeurs des patients (n=92) se distribuent selon l'expression de ERα et le grade histologique SBR.

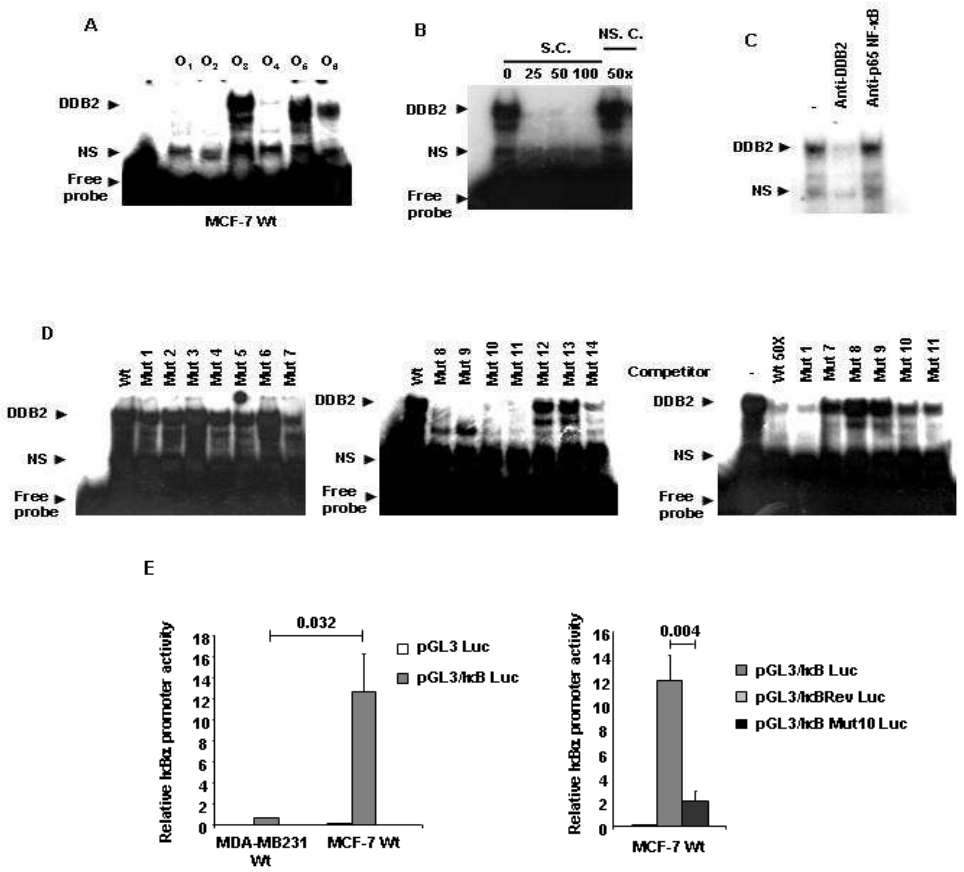


Figure 6' : Identification précise du site de fixation de DDB2 dans le promoteur proximal et conséquence sur l'expression du gène IκBα dans les cellules tumorales mammaires MCF-7. (A) Six oligonucléotides (O_1 à O_6) marqués au ^{32}P et correspondant à la région III du promoteur IκBα (voir Article 1), sont utilisés pour des expériences de gel retard avec des protéines nucléaires (2 µg) extraites de cellules MCF-7 sauvages. NS pour complexe non-spécifique et Free probe pour sonde libre. (B) La spécificité de l'activité de liaison de DDB2 sur l'oligonucléotide O_3 est montrée par un test de compétition en gel retard, en utilisant un excès de sonde spécifique O_3 non marquée (S.C.) de 0 à 100 fois en excès, ou avec un oligonucléotide non spécifique correspondant au site consensus NF-κB 50 fois en excès (NS.C.) (C) La présence de DDB2 est confirmée par un super-retard, utilisant 2 µg de protéines nucléaires de cellules MCF-7, pré-incubées avec un anticorps spécifiquement dirigé contre DDB2 (anti-DDB2). La spécificité du résultat est montrée par un super-retard avec un anticorps non spécifique tel que celui dirigé contre la p65 du complexe NF-κB (anti-p65 NF-κB). (D) La séquence du site de fixation de DDB2 est déterminée précisément par gel retard en utilisant des protéines nucléaires (2 µg) de cellules MCF-7 incubées avec différents oligonucléotides O_3 marqués, mutés sur 2 nucléotides consécutifs et nommés Mut1 à Mut 14. Une expérience de compétition est réalisée sur la sonde O_3 sauvage radiomarquée avec les oligonucléotides mutés non marqués et 50 fois en excès. NS signifie complexe non-spécifique. (E) La conséquence de la surexpression de DDB2 sur la transcription du gène IκBα est étudiée par une analyse fonctionnelle de son promoteur proximal. Les cellules tumorales mammaires sauvages (Wt) sont transfectées transitoirement avec un plasmide portant le gène rapporteur codant la luciférase, placé sous le contrôle du promoteur proximal d'IκBα, sauvage et dans la bonne orientation (pGL3/IκB Luc), ou inversé (pGL3/IκBRev Luc) comme contrôle négatif, ou encore muté selon l'oligonucléotide O_3 Mut10 dans le site de fixation de DDB2 (pGL3/IκB Mut10 Luc). En même temps, les cellules sont également transfectées avec pSV40/β-galactosidase, comme plasmide de normalisation. Après lyse des cellules transfectées, les activités luciférase et β-galactosidase sont mesurée. L'activité relative du promoteur IκBα est déterminée comme la moyenne ± la déviation standard de 3 expériences indépendantes (3 mesures par expérience) des rapports de l'activité luciférase sur celle de la β-galactosidase. Les différences entre les cellules MDA-MB231 et MCF-7, ou encore entre pGL3/IκB Mut10 Luc et pGL3/IκB Luc sont significatives pour un $p<0,05$.

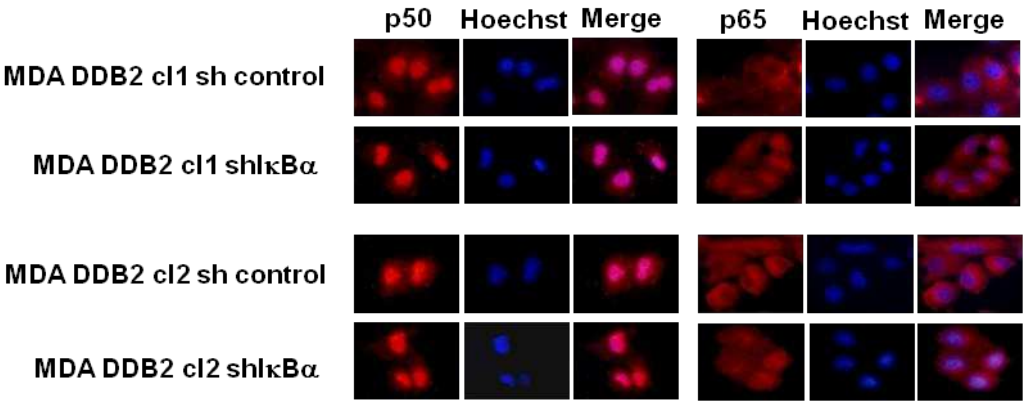


Figure 7': Conséquence de l'inhibition de l'expression d'IκBα induite par DDB2 sur la translocation nucléaire du complexe p50 et p65 de NF-κB. L'expression d'IκBα est inhibée dans les cellules MDA-MB231 surexprimant DDB2, en utilisant des particules lentivirales contenant les shARN spécifiques. Les cellules témoins correspondent aux cellules MDA-MB231 surexprimant DDB2, mais infectées par des particules lentivirales permettant la synthèse de shARN non spécifiques. Les conséquences de l'inhibition de l'expression d'IκBα sur la translocation nucléaire des protéines p50 et p65 NF-κB sont évaluées par immunocytofluorescence à l'aide des anticorps spécifiques correspondants. Deux clones (MDA DDB2 cl1shIκBα 1 et 2), présentant une inhibition forte de l'expression d'IκBα, après l'analyse par RT-PCR et Western blot, sont utilisés dans cette évaluation, et comparés à deux cellules témoins (MDA DDB2 cl1shcontrol1 et 2). Les noyaux des cellules sont colorés au Hoechst. Merge signifie la superposition de la révélation de p50 ou p65 NF-κB sur la révélation au Hoechst des noyaux. Cette figure est représentative de trois expériences réalisées indépendamment.

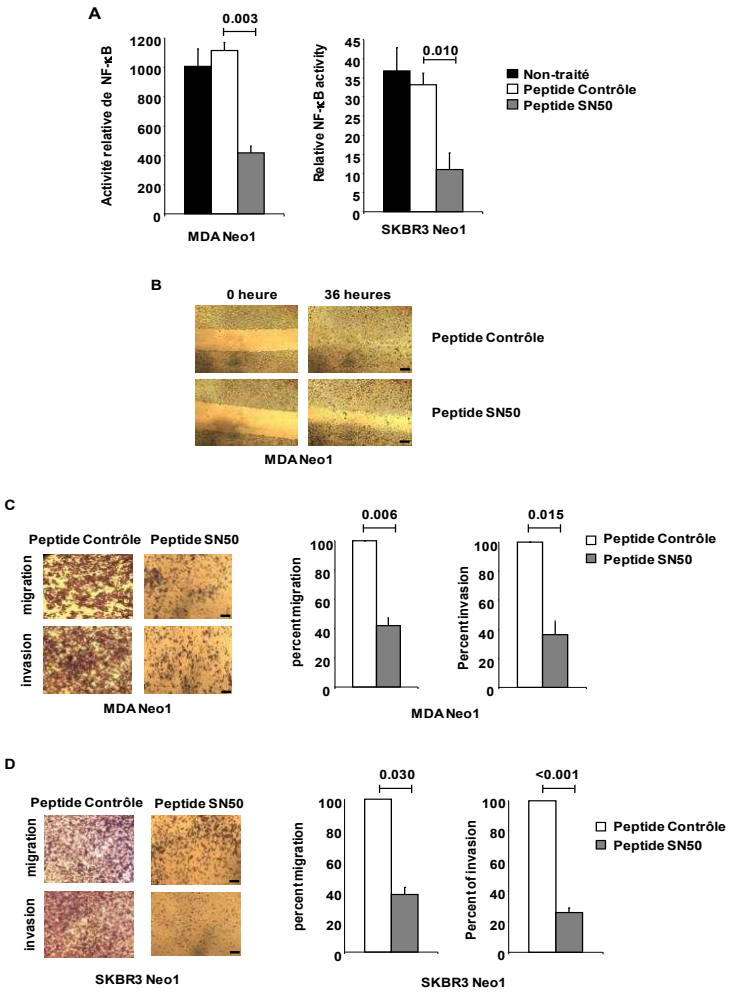


Figure 8'. Importance de NF-κB dans les capacités migratrices et invasives des cellules tumorales témoins Neo MDA-MB231 et SKBR3. (A) Les cellules sont traitées avec 50 µg/ml de peptide SN50 ou contrôle pendant 24 heures. Afin de mesurer l'inhibition de ce traitement sur NF-κB, l'activité transcriptionnelle de ce dernier est évaluée en transfectant les cellules, traitées par SN50 ou le peptide contrôle, avec le pGL3/NF-κB Luc à nouveau pendant 24 heures, en présence du plasmide pSV40/β-gal pour la normalisation. L'activité transcriptionnelle de NF-κB est ensuite mesurée en dosant la luciférase dans les cellules. Les résultats sont exprimés comme l'activité relative de NF-κB, qui correspond à la moyenne ± la déviation standard de 3 expériences indépendantes (3 mesures par expérience) des rapports de l'activité luciférase sur celle de la β-galactosidase. Les différences entre les cellules MDA-MB231 traitées avec le peptide contrôle et celles avec le peptide SN50 sont significatives pour un $p<0,05$. Aucune différence significative n'est observée entre les cellules Neo non traitées et les cellules traitées avec le peptide contrôle. (B) Les capacités migratrices des cellules Neo, traitées avec 50 µg/ml de SN50 ou de peptide contrôle, sont évaluées par le test de blessure durant 36 heures et la figure est représentative de trois expériences réalisées indépendamment. (C et D) Les capacités migratrices et invasives des cellules traitées avec 50 µg/ml de peptide SN50 ou contrôle, sont évaluées durant 36 heures par la méthode de la chambre modifiée de Boyden, respectivement sans ou avec du matrigel. Les cellules migratrices et invasives sont colorées avec du Crystal violet et l'absorbance est mesuré à 560 nm. Les données sont issues de 3 expériences indépendantes (3 mesures par expérience) et sont exprimées comme la moyenne ± SEM du pourcentage de cellules traitées avec le peptide contrôle, fixé comme le 100% de l'expérience. Les différences entre les cellules traitées avec le SN50 et celles avec le peptide contrôle sont significatives pour un $p<0,05$. Les images présentées et obtenues grâce à un microscope à contraste de phase équipé d'une caméra sont représentatives des 3 expériences réalisées indépendamment (la barre : 100 µm).

du gène codant IκBα. Pour cela, nous avons analysé par immunoprécipitation de chromatine, d'éventuelles modifications épigénétiques (acétylation et méthylation) au niveau des histones H3, ainsi que la présence des acétyltransférases de la famille CBP/p300, connue pour interagir avec DDB2 (Martinez *et al*., 2001 ; Datta *et al*., 2001) au niveau du promoteur proximal du gène codant IκBα. Ces résultats, présentés dans l'Article 1, ne montrent aucune variation au niveau des modifications épigénétiques des histones H3. Par contre, la surexpression de DDB2 dans les cellules MDA-MB231 entraîne une augmentation du recrutement de CBP/p300 au niveau du site d'initiation de la transcription du promoteur du gène codant IκBα, par rapport aux cellules témoins Neo.

Dans un 3ème temps, nous avons montré que DDB2 réduit les capacités invasives des cellules tumorales mammaires en participant à l'induction de l'expression d'IκBα, qui entraîne la diminution de l'activité constitutive de NF-κB. Pour cela, nous avons développé une lignée de cellules MDA-MB231 surexprimant DDB2, dans laquelle l'expression induite d'IκBα est inhibée par la stratégie d'ARN interférence à l'aide de particules lentivirales spécifiques. L'inhibition de l'expression d'IκBα est vérifiée par RT-PCR et Western blot (Article 1). De même, les conséquences de cette inhibition sur l'activité de NF-κB sont vérifiées par transfection transitoire à l'aide du plasmide portant un gène rapporteur sous contrôle de motifs κB (Article 1), et par immunofluorescence permettant de visualiser la translocation nucléaire du complexe p50 et p65 (Figure 7'). Nous rapportons dans l'article 1, que l'inhibition de l'expression d'IκBα, induite par DDB2, restaure en partie les capacités migratrices en chambre modifiée de Boyden, ainsi que les capacités invasives des cellules MDA-MB231, associée à une réexpression de la MMP-9. En parallèle, nous avons montré que le traitement des cellules témoins Wt ou Neo avec le peptide SN50, qui inhibe la translocation nucléaire du complexe NF-κB, entraîne également une diminution très significative de leurs capacités migratrices et invasives, en comparaison à leur traitement avec le peptide contrôle (Figure 8').

Ces résultats font l'objet d'un article actuellement en révision dans Cancer Research.

<u>Article 1</u> : Damaged DNA binding 2 : A novel regulator of breast tumor invasion and NF-κB activity.

DAMAGED DNA BINDING 2: A NOVEL REGULATOR OF BREAST TUMOR INVASION AND NF-κB ACTIVITY.

Marie Ennen[1], Nadège Touche[1], Sophie Pinel[1], Rémi Klotz[1], Vanessa Besancenot[1], Emilie Brunner[1], Denise Thiebaut[2], Lionel Domenjoud[1], François Plénat[1,2], Stéphanie Grandemange[1]*, Philippe Becuwe[1]*

[1]CRAN, Centre de Recherche en Automatique de Nancy, UMR 7039 CNRS, Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506, Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

[2]Service d'anatomie et cytologie pathologiques, hôpitaux de Brabois, CHU de Nancy, Université de Lorraine, 5, allée du Morvan, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Corresponding author:

Philippe Becuwe, CRAN, Centre de Recherche en Automatique de Nancy, UMR 7039 CNRS, Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506, Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

E-mail : Philippe.Becuwe@univ-lorraine.fr, Phone: +33 3 83 68 42 19

* These authors contributed equally to the co-supervising of this study.

Running title: DDB2 controls breast tumor invasion *via* NF-κB

Key words: DDB2, NF-κB, breast cancer, migration, invasion

Word count: 4985

Total number of display items: 7

ABSTRACT

Damaged DNA Binding 2 (DDB2) is known for its role in DNA repair. Recently, we reported that DDB2 is overexpressed constitutively in noninvasive breast tumor cells, and plays a role as an activator of cell cycle progression by regulating gene expression. However, this protein is not expressed in invasive breast tumor cells. Also, we conducted the present study to evaluate the consequence of DDB2 overexpression in invasive properties of aggressive breast tumor cells and to identify the molecular mechanism involved. We report that DDB2-overexpressing invasive breast tumor cells display a significant reduction in motility and invasiveness *in vitro* as well as colonization of lungs *in vivo* using xenograft models. This was associated with a decrease in the constitutive nuclear factor-kappa B (NF-κB) activity and matrix metalloprotease (MMP)9 expression. We demonstrate that DDB2 decreases NF-κB activity by upregulating the IκBα gene expression, through its binding to DNA sequence located in the proximal promoter of this gene. In addition, we show that DDB2 exerts its negative control of invasive abilities of breast tumor cells through its involvement to the IκBα gene expression. Indeed, knockdown of DDB2-induced IκBα gene expression restored NF-κB activity and MMP9 expression as well as invasive properties of DDB2-overexpressing aggressive breast tumor cells. By the identification of this novel molecular mechanism, in which DDB2 plays an important role, our findings bring a new understanding of how breast cancer cells progress toward an invasive phenotype and reveal the potential clinical interest of DDB2.

INTRODUCTION

Development of metastatic disease is the primary cause of mortality in patients with breast cancer. This is a multistep event, comprising invasion of mammary carcinoma cells into the adjacent tissues, entry of tumor cells in the systemic circulation, extravasation to distant organs, and finally metastatic colonization, mainly in lungs, liver, bones and the central nervous system (1). Despite significant advances in diagnosing and treating breast cancer, one of the major clinical and scientific problems which remain unresolved is the prediction of breast tumor progression toward metastasis. Also, identification of new predictive markers of metastatic development appears relevant.

We described recently that the Damaged DNA binding 2 (DDB2) protein, which was originally identified as an accessory factor in nucleotide excision repair of UV-induced DNA

damage, is involved in breast tumor growth. DDB2 is overexpressed in nonmetastatic breast tumor cells and plays a role in their proliferation by favouring G1/S transition entry and their progression through the S phase of the cell cycle (2). We reported that DDB2 stimulates the proliferation of nonmetastatic breast tumor cells, at least in part by maintaining a low basal expression of mitochondrial superoxide dismutase (MnSOD) through its binding to a specific and well characterized DNA sequence in the proximal promoter of the MnSOD gene (3). In addition, in metastatic breast tumor cells DDB2 is not expressed and a high basal MnSOD level is observed, which is sharp in contrast to non metastatic cells. In these cells, the antioxidant enzyme was involved in the invasive ability of these cells through its control of matrix metalloprotease 9 (MMP-9) activity (4).

Based on these results, we hypothesized that the DDB2 protein might be involved in the control of cell migration, invasiveness and breast tumor progression. To verify this hypothesis, we studied the consequence of DDB2 overexpression in the invasive and metastatic properties of aggressive breast cancer cells. Here we demonstrate *in vitro* as well as *in vivo* that DDB2 reduces significantly motility and invasiveness of metastatic breast cancer cells when its gene is overexpressed. We have identified that DDB2 plays this role through its involvement in Inhibitor kappa B alpha (IκBα) gene expression and in consequence in the negative control of constitutive nuclear factor-kappa B (NF-κB) activity. This latter binds to DNA as hetero-or homodimers that are composed of five possible proteins belonging to the Rel family (c-Rel, RelB and p65/RelA, p50 and p52), and which are maintained in a latent form in the cytoplasm through interaction with the inhibitory IκBα protein (5). NF-κB transcription factor is constitutively activated in metastatic breast tumor cells and plays a role in their migration and invasive abilities by regulating the expression of target genes (6, 7). However, the molecular mechanism involved in the constitutive activation of NF-κB is not yet clearly defined in breast cancer.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

The pcDNA3(+) expression vector containing the DDB2 open reading frame cDNA was constructed as described previously (3). Lentiviral shRNA clones targeting IκBα and nontargeting control sequences were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. The transcriptional activity of NF-κB was assessed using a luciferase reporter plasmid under

control of NF-κB binding site and named pGL3/NF-κB Luc (BD Biosciences). For animal studies, the DDB2-overexpressing and control MDA-MB231 cells were rendered fluorescent by transfection with the pWPT-GFP expression vector (Addgene). The 5'-flanking region (from –1224 to +288 nucleotide residues) of the human IκBα gene were amplified by PCR from genomic DNA using the following primer pair: forward 5'-TGAATTCAGTCCATGGCTTGCAGGC-3'; reverse 5'-GGATCTCCTGCAGCTCCTTGACCAT-3' and the iProof™ high-fidelity DNA polymerase according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad). The 1512-bp fragment of the IκBα promoter was ligated (fast ligation system, Promega) blunt end to the *Sma I* linearized promoterless pGL3-basic vector containing the firefly luciferase gene (Promega). The proper sense of the IκBα promoter into the plasmid was verified by the complete DNA sequence analysis (Beckman coulter genomics, Meylan, France) and the resulting plasmid was designed pGL3/ IκB Luc. One plasmid containing the reversed IκBα promoter was used as negative control and designed pGL3/ IκB Rev Luc.

The DDB2 binding site was mutated according to the nucleotide changes in the mutant oligonucleotide O_3Mut 10. Plasmid carrying point mutations in the DDB2 binding site was obtained by high fidelity PCR amplification using the iProof™ high-fidelity DNA polymerase, the pGL3/ IκB Luc as template (1 ng) and the following 5'-phosphorylated primers: forward 5'-TGCGTCCTTCCCagTAGAAGTCTG-3' (nucleotides in lowercase indicate point mutations in the DDB2 binding site), and reverse 5'-ACTGTGGTTAGGGGGCTGC-3'. The PCR-amplified plasmid was circularized by ligation with the fast ligation system (Promega) and the presence of point mutations in the DDB2 binding site was verified by DNA sequence analysis of the IκBα promoter (Beckman coulter genomics).

Cell culture, transfections and infections

Human breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB231 and SKBR3) were cultured in RPMI 1640 medium without phenol red (Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (Sigma-Aldrich), as described previously (2). Cells were transiently transfected with different luciferase reporter plasmids (1 µg), and the pSV40/β-gal plasmid (0.1 µg) expressing β-galactosidase (Invitrogen) as control for transfection efficiency, using JetPEI reagent (Ozyme), and harvested 24 hours after transfection. Cells were stably transfected with 4 µg of pcDNA3(+) expression vector containing the DDB2 open reading frame cDNA, using JetPEI reagent (Ozyme). One day later, the clones were selected with 400 µg/mL of G418 for 4

weeks. Resistant clones were isolated and then screened for DDB2 expression by RT-PCR and Western blot analysis. One week before experiments, cells were placed into complete medium without G418. Transduction-ready viral particles (1.0 x 10^6 transducing units or TU) containing either 3 target-specific constructs that encode short hairpin RNA (shRNA) designed to knockdown IκBα gene expression, or nontargeting control sequences, and a puromycin resistance gene for selection of transduced cells, were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Optimal conditions for efficient transduction and gene silencing with puromycin selection were determined for MDA-MB231 cells as 2 TU/cell. Two days later, the clones were selected with 1 µg/mL of puromycin for 7 days. Efficiency of IκBα knockdown was determined in resistant cells by RT-PCR and western blot analyses.

Preparation of total, nuclear and cytoplasmic extracts

Human breast cancer cell lines were lysed in a 10 mM Tris/HCl buffer, pH 7.4, containing 5 mM EDTA, 1% Triton X-100 and a protease inhibitor cocktail, at 4°C for 20 min. After centrifugation at 17,000 x *g* for 20 min at 4°C, the supernatant was collected as total protein extract. Nuclear and cytoplasmic extracts were prepared with nuclear extract kit according to the manufacturer's instructions (Active Motif). Protein concentrations were determined according to Lowry et al., (8) using bovine serum albumin (BSA) as a standard (Bio-Rad).

Antibodies, western blot and immunocytofluorescence

Antibodies used for western blot and immunocytofluorescence at the optimized dilutions are done in Supplementary Methods. Western blot and detection with chemiluminescent substrate were carried out as described previously (4), with total (50 µg), cytoplasmic (20 µg) and nuclear (15 µg) proteins.

Breast tumor cells were cultured onto glass side for 5 days before confluence. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde over 20 min at room temperature, then blocked and permeabilized with PBS containing 2% bovine serum albumin/0.2% Triton X-100. After exposure to the primary polyclonal antibodies diluted at 1:50 for 1 hour at room temperature and three washes in PBS, cells were incubated with the Alexa 594-conjugated secondary antibodies, diluted at 1:100 in PBS containing BSA and Triton X-100 for 1 hour at room temperature. Nuclei were stained with DAPI diluted at 1:1000 in PBS containing BSA and

Triton X-100. The cells were then mounted in anti-fading medium (fluorsafe, Merck) and observed with an epifluorescence microscope Eclipse 80i with 40X objective (Nikon). Images were collected with a digital camera (Nikon, DXM1200F) and monitored with Image Analysis Systems Lucia G (Laboratory Imaging s.r.o. software, version 4.81).

Gelatin zymography

The enzymatic activities of MMP2 and MMP9 were determined by gelatin zymography. Breast tumor cells were cultured under normal conditions and then in a serum-free medium for 24 hours with or not 5 µg/mL fibronectin, as described previously (9). SKBR3 cell medium was supplemented with 25 ng/mL of EGF. The conditioned medium was collected and equal aliquots were analyzed on gelatin substrate gels, as we described in details previously (4). Gelatinase activities were visible as clear bands, indicative of proteolysis of the substrate protein.

Luciferase assay

The luciferase assays were performed using the luciferase reporter gene assay system and β-galactosidase activity was detected using luminescent β-Gal detection assay (Roche). Relative luciferase activities were obtained by the ratio of luciferase/β-gal and expressed as mean ± SD from at least three independent experiments, each done in triplicate.

RT-PCR analysis

Total RNA was isolated from the tumor cell lines using TRIzol RNA-now (Ozyme, France) according to the manufacturer's instructions and their quantity and quality were determined spectroscopically using a nanodrop 2000c (Thermo Scientific, France). The cDNA synthesis and semi-quantitative RT-PCR were performed as described elsewhere (3), using primers given in Supplementary Table S1. Data were determined as the ratio of the quantified fluorescence intensity of IκBα, DDB2 or MMP9 band to the β-actin band from three independent experiments, and expressed as fold increases ± SD over values for control cells fixed at 1.

Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP), electrophoretic mobility shift and supershift assays

Chromatin isolation and enzymatic shearing were carried out using the ChIP-IT Express kit (Active Motif) and immunoprecipitations with either anti-DDB2, anti-p65 NF-κB, anti-histone modifications (acetylated on lysine 27 or dimethylated on lysine 4), anti-RNA polymerase II(polII) from Active Motif, and anti-CREB Binding Protein (CBP)/p300 (Abcam) were performed as described previously (3).

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and supershift assay for NF-κB and Sp1 were performed with a ^{32}P-labeled oligonucleotide representing the respective consensus site as probe, as described previously (10). EMSA and the supershift assay for DDB2 were carried out as detailed previously (3), with the oligonucleotides representing the region of the IκBα promoter where the binding of DDB2 was detected by ChIP assay.

Migration and invasion assays

Migration and invasion assays were performed in BD BioCoat Matrigel invasion chambers according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences), containing uncoated porous filters (8 µm pore size)for cell migration and precoated filters with 20 µg Matrigel (BD Biosciences) for cell invasion. Subsequently, $2x10^5$ cells were applied to the upper chambers in serum free medium. The lower chambers were filled with serum-containing medium as chemoattractant for cells, supplemented with 50 ng/mL EGF for SKBR3 cells. After 36 hours of incubation at 37°C, noninvading cells were removed from the upper chambers with a cotton-tipped swab. Migrating and invading cells in the lower chambers were fixed with 4% PAF during 10 min, and stained with 0.05 % crystal violet during 30 min. Images to chambers were taken with microscope (Motic) equipped with a camera (Moticam 2300). Then, cells were lysed using acetic acid (4 %). One hundred fifty microliters of each sample were transferred to a 96-well microtiter plate and the absorbance at 560 nm was measured in a microplate reader (Labsystem, Cergy-Pontoise, France). Three independent experiments were done, each in triplicate.

In Vivo Invasion Assay

All experiments were performed wiht immunodeficient (nu/nu) mice (6 week-old) from Janvier Laboratories (Le Genest-Saint-Isle, France) in accordance with national animal care guidelines (European Commission directive 86/609/CEE; French decree no.87-848). *In vivo* invasive cells were evaluated after tumor cell injections as well as tumor xenografts. Each mouse was injected subcutaneously into both hind legs with either DDB2-overexpressing (clone 1) or Neo MDA-MB231 cells (2 x 10^6/flank), respectively, which were rendered fluorescent after transfection with a GFP expression vector. When tumors reached about 1000 mm^3, mice were sacrificed and their lungs removed and sliced for fluorescence-activated cell sorting (FACS) and histological analyses for invasion assay after cell injection. Some MDA-MB231 tumor xenografts were initiated by implantation of tumor fragments with the same size into the hind legs of each anesthetized mouse and were established *in vivo* during 3 sequential passages, as described previously (11). When tumors reached about 1000 mm^3 after the third passage, invasive cells were evaluated in the lungs by FACS and histological analyses.

Infiltrated lungs were dissociated according to the protocol detailed in the Supplementary data and cell suspensions were analyzed by FACS (FACScalibur, BD). For each analysis, the data were collected from 200,000 events and invasive cells for their GFP expression were quantified, using Cell Quest software (BD Biosciences Clontech). For histological analysis, several slices from each lung per mouse were cut and fixed in 4% buffered-formaldehyde for 16 h and embedded in paraffin. Several sections (5 µm thick) were processed for *in situ* hybridization to detect specifically the genotype of human infiltrating breast tumor cells with the fragmented human genomic DNA, which was first digoxigenin-labeled by a random primer labeling method, as described previously (12). Digoxigenin was detected using specific alkaline phosphatase-labeled anti-digoxigenin polyclonal antibodies from sheep (Roche) with a substrate solution containing 5-bromo-chloro-indolyl phosphate and nitroblue tetrazolium. After the color development, total numbers of human infiltrating cells, appearing purple in mouse tissue, were observed by microscopy (Axioscop 2, Leica) and counted in at least 8 sections per lung. Images were acquired using AxioVision 4.8 software.

Statistical analysis

The experiments were repeated at least three times. Results were expressed as mean ± SD or SEM, as indicated. All statistical analyses for migration, invasion, luciferase assays, semi-quantitative RT-PCR and Western blot analyses were performed using two-tailed Student's *t* test (GraphPad Prism 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA). For *in vivo* experiments with animals, statistical analyses were performed using the Mann Whitney test (GraphPad Prism 5.0). In all cases, differences were considered to be statistically significant at a value of $p<0.05$.

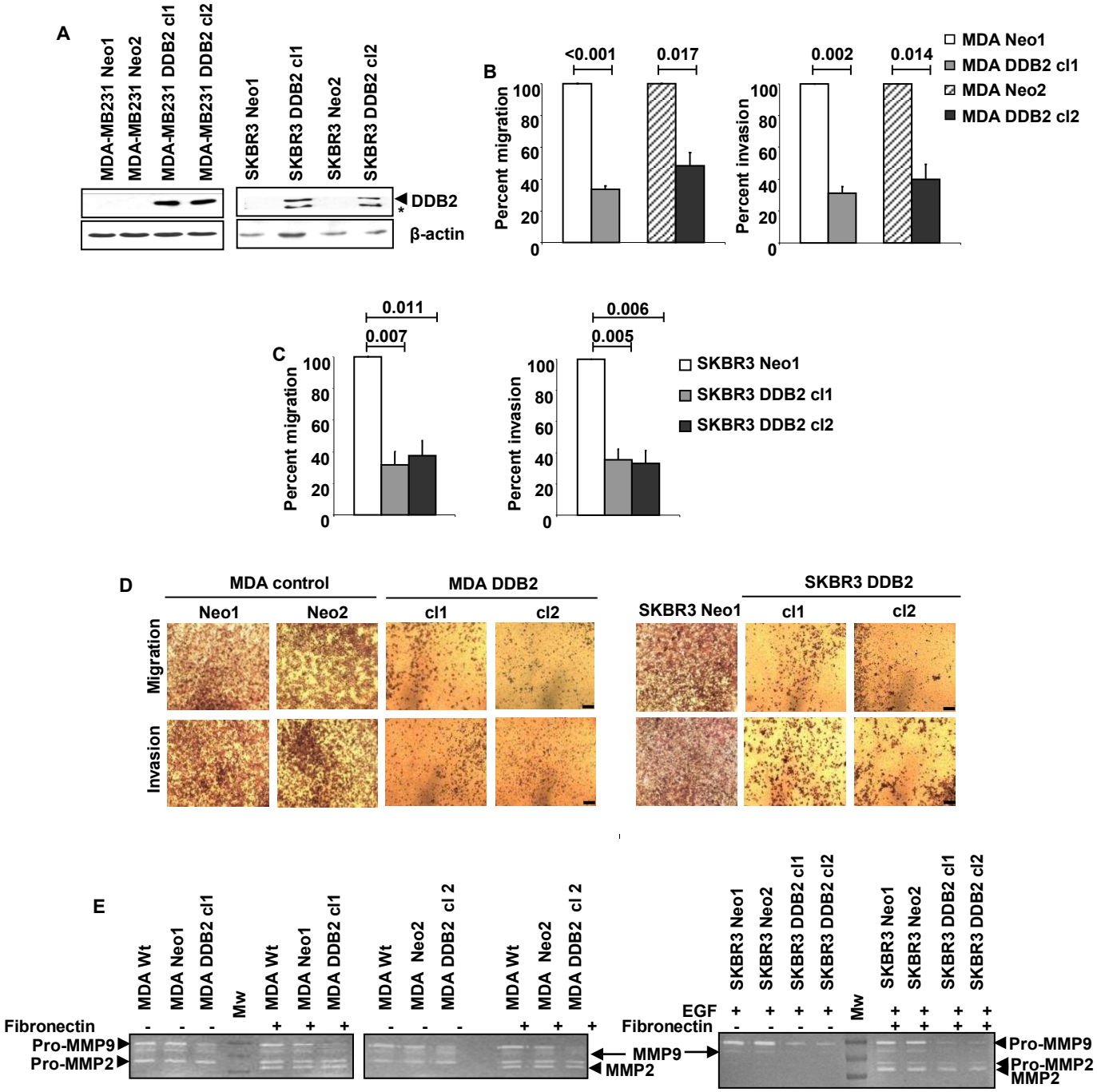


Figure 1. Overexpression of DDB2 reduces migratory and invasive abilities *in vitro* of aggressive breast tumor cells. A, breast cancer MDA-MB231 and SKBR3 cell lines were transfected stably with the DDB2 expression vector. Expression of DDB2 was then analyzed by Western blot in two representative clones (cl1 and cl2) and compared to the control (empty vector only) Neo cells (* position of a nonspecific band). β-actin was used as the protein loading control. B and C, cell migration and invasion assays through uncoated (migration) and matrigel-coated membrane (invasion), respectively, were evaluated for control and DDB2-overexpressing cells after 36 hours. Migrating and invading cells were stained with crystal violet and absorbance at 560 nm was measured. Data from three independent experiments (each performed in triplicate) were expressed as mean ± SEM of percentage of the Neo cells, defined as 100% of migrating or invading cells. Statistical differences between DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells and control cells for $p<0.05$. D, representative image of B and C, respectively, was visualized using phase-contrast microscopy. Scale bar, 100 µm. E, MMP2 and MMP9 gelatinase secretion by control (Neo and wild-type Wt) and DDB2-overexpressing cells was analyzed by zymography. Cells were grown in the presence (+) or absence of fibronectin for 24 hours in serum free culture medium. For HER2-positive SKBR3 cells, medium was supplemented with 25 ng/mL of EGF.

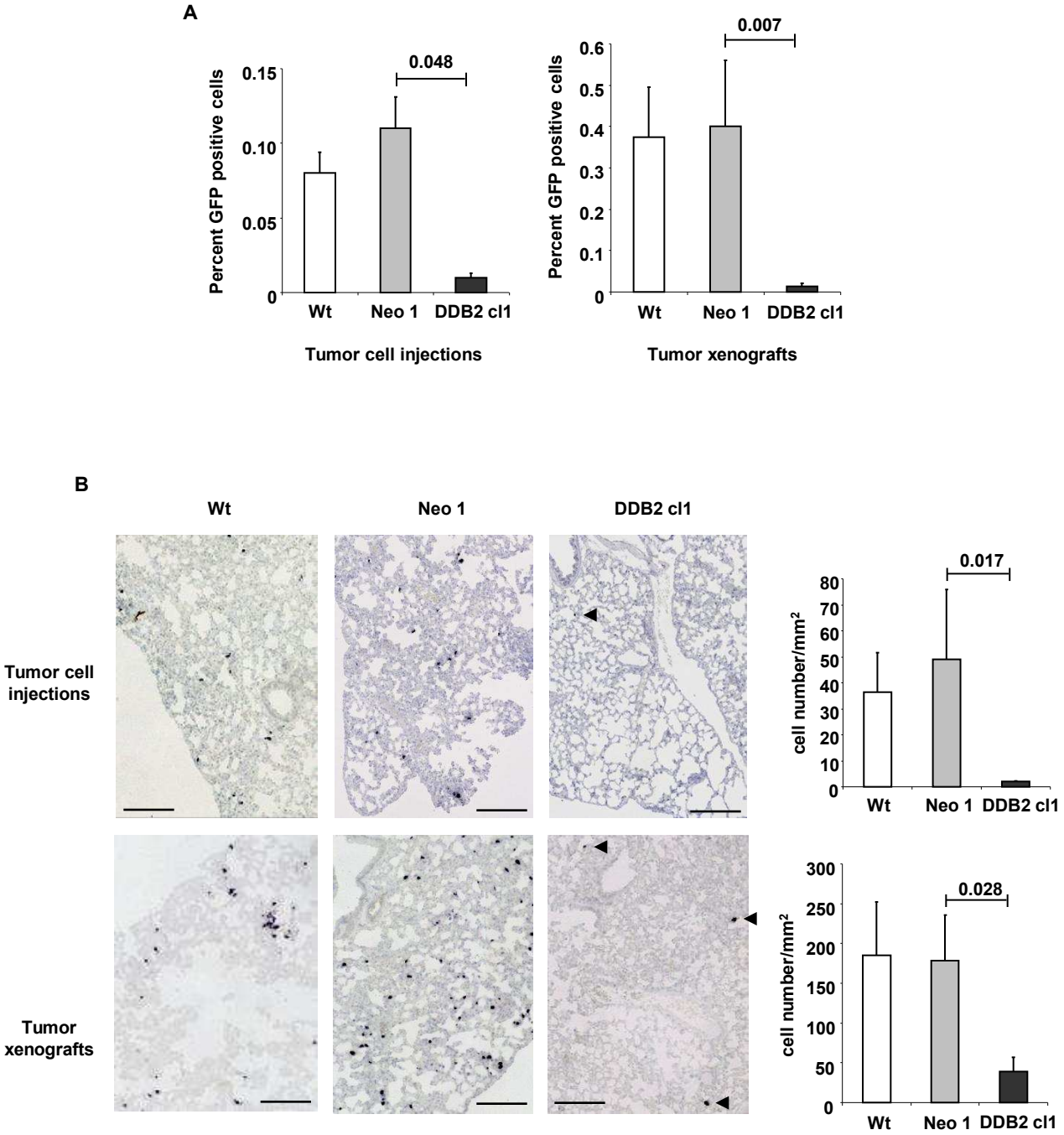


Figure 2. Overexpression of DDB2 reduces invasive abilities in lungs of the aggressive breast tumor cells. A, quantification by flow cytometry analysis of GFP expressing and invading cells in lungs from Nude mice injected or xenografted subcutaneously with GFP and DDB2-overexpressing cells (left graph) or established tumors (right graph), respectively. Histograms from cell injection results represent the mean of data from 7 and 5 mice injected with Neo and DDB2-overexpressing cells, respectively. Graph from tumor xenograft results represents the mean of data from 5 and 6 mice bearing Neo and DDB2-overexpressing tumors, respectively. Data expressed as % of GFP positive cells are mean ± SEM. B, quantification by histological analysis of invasive cells in lungs from mice injected or xenografted subcutaneously with DDB2-overexpressing cells or established tumors, respectively. Representative micrographs showing invasive breast tumor cells (in black) detected by *in situ* hybridization using human fragmented DNA as the probe. Bars represent 200 µm and black arrows indicate invasive MDA-DDB2 cl1 cells. Data are presented as mean number ± SEM of cells per mm^2 infiltrated organs from at least 6 sections of the lungs per animal. Differences between DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells and control cells were statistically significant for $p<0.05$.

RESULTS

DDB2 overexpression reduces migration and invasion *in vitro* of aggressive breast tumor cells

To examine the effect of DDB2 overexpression on migratory and invasive abilities of aggressive breast tumor cells, wild-type (Wt) MDA-MB231 and SKBR3 cell lines were stably transfected with the pcDNA 3(+) DDB2 expression vector or the pcDNA 3(+) control vector (Neo). For each cell line, two clones expressing DDB2 (MDA or SKBR3 DDB2 cl1 and 2) were used for the subsequent studies (Fig. 1A). We next evaluated the motility of MDA-MB231 and SKBR3 cells expressing DDB2 in migration and invasion assays. Both migration and invasion were reduced between 50 and 65% according to the DDB2-expressing cell clones, as compared with control Neo cells (Fig. 1B-D). Similar results were obtained also by performing a wound healing-induced migration assay (see Fig. 1'). We also evaluated the secretion of MMP2 and MMP9, which are related to migration and invasion abilities of metastatic breast tumor cells (13). Zymographic analyses were carried out in the presence or absence of fibronectin, which has been reported to activate rapidly pro-MMP2 (72 kDa) and pro-MMP9 (92 kDa) (9).Overexpression of DDB2 decreased significantly pro- and mature MMP9 (82 kDa) but not pro- and mature MMP2 (64 kDa) secretion in MDA-MB231 cells with or without fibronectin, as compared to control cells (Fig. 1E). These results were confirmed with HER2-positive SKBR3 cells cultured in the presence of epithelial growth factor or EGF (Fig. 1E).

DDB2 overexpression reduces colonization of lungs *in vivo* by aggressive breast tumor cells

We next evaluated the invasive abilities *in vivo* by generating DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells and control Neo cells stably expressing green fluorescent protein (GFP). These cells were controlled by FACS for their GFP expression and exhibited similar *in vitro* properties as their parental counterparts (data not shown). Invasive abilities of GFP-positive cells were then evaluated after their subcutaneous injection into nude mice. The invasive cells quantified by FACS were reduced significantly by 7.5-fold in lungs of mice that received DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells, in contrast to Neo cells (Fig. 2A, left graph and Supplementary Figure 3'). Invasive abilities of GFP-positive cells were then evaluated by

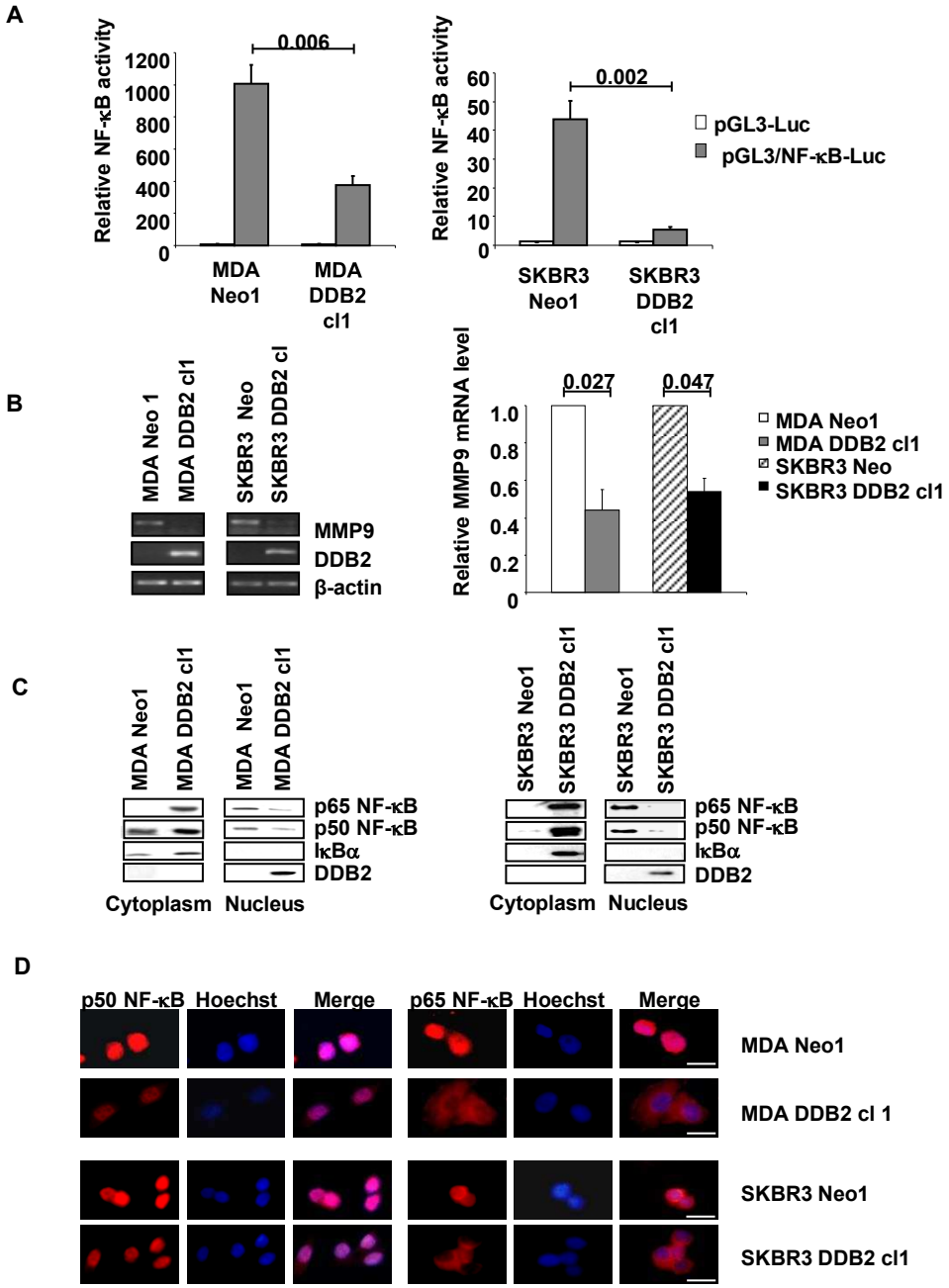


Figure 3. DDB2 decreases the constitutive NF-κB activity and MMP9 expression in aggressive breast cancer cells. A, the transcriptional activity of NF-κB was measured in breast tumor cells by a luciferase assay following transient transfection with pGL3/NF-κB-Luc for 24 hours in the presence of pSV40/β-galactosidase for normalization. Results from three separate experiments done in triplicate are means ± SD of luciferase activity normalized to β-galactosidase activity and indicated as relative NF-κB activity. B, total RNAs were isolated from MDA-MB231 or SKBR3 cells overexpressing or not DDB2, and then subjected to RT-PCR analysis. The relative DDB2 and MMP9 mRNA levels were normalized to β-actin mRNA. Relative band intensities were quantified by densitometry and data are expressed as fold increases over values for Neo MDA-MB231 and SKBR3 control cells fixed at 1 (mean ± SD from three separate experiments). C, cytoplasmic and nuclear extracts from control and DDB2-overexpressing MDA-MB231 and SKBR3 cells were used for Western blot analysis of the nuclear translocation of p65 and p50NF-κB complex. D, cytoplasmic or nuclear localization of the NF-κB complex has been shown by immunocytofluorescence of breast tumor cells using appropriate antibodies (scale bar, 50μm). For A and B, differences are significant ($p<0.05$) between DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells and control cells.

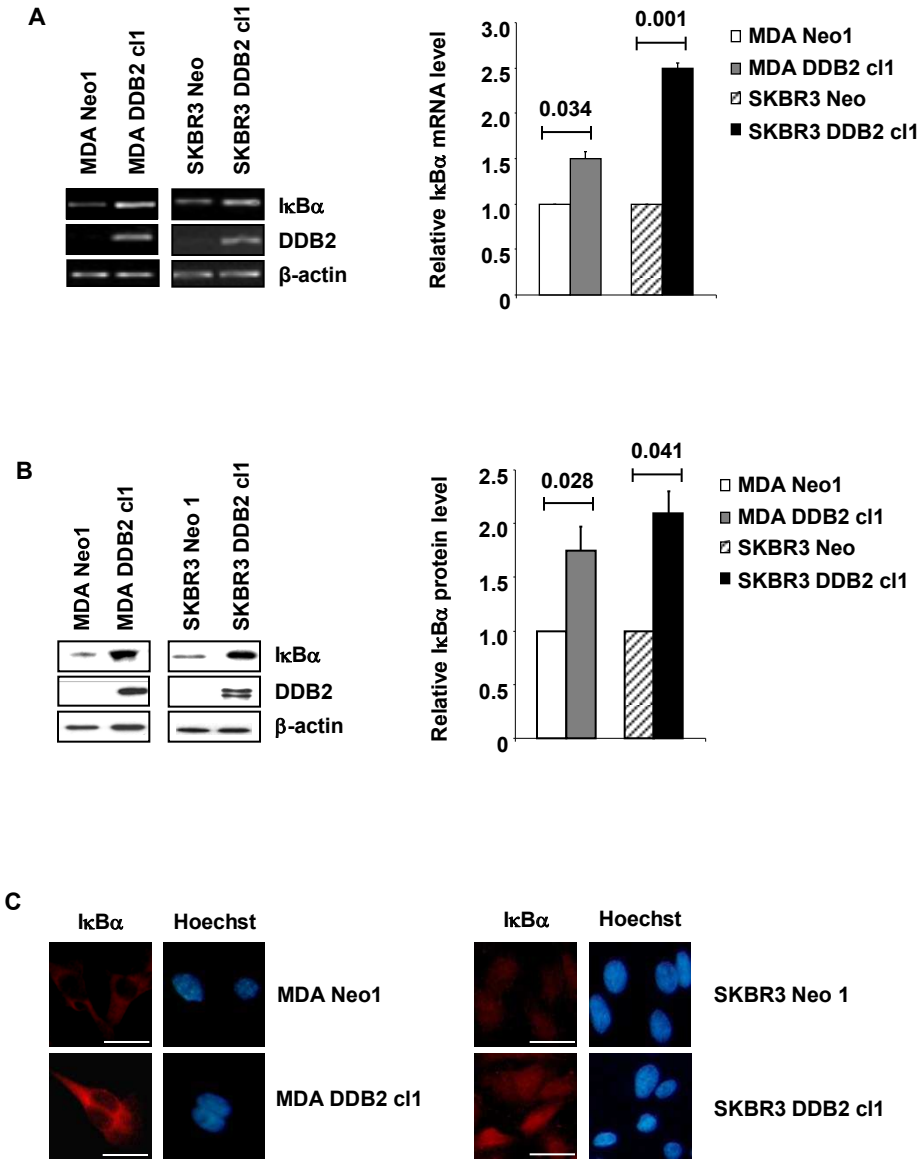


Figure 4. DDB2 influences positively IκBα gene expression.
A, total RNAs were isolated from MDA-MB231 or SKBR3 cells overexpressing or not DDB2, and then subjected to RT-PCR analysis. The relative IκBα and DDB2 mRNA levels were normalized to β-actin mRNA.
B, total protein extracted from breast tumor Neo and DDB2-overexpressing cells were used to analyse the IκBα and DDB2 protein levels by Western blot with appropriate antibodies. C, the breast tumor cells fixed and permeabilized were immunostained with a specific antibody to analyse IκBα protein level at the same time exposure for image acquisition. Hoechst was used for nuclear staining (scale bar, 30µm). Each result shown is representative of three separate experiments. For A and B, relative band intensities for RT-PCR and western blot analysis were quantified by densitometry and data are expressed as fold increases over values for Neo MDA-MB231 and SKBR3 control cells fixed at 1. Differences were significant ($p<0.05$) between DDB2 overexpressing and Neo control cells.

control Neo or DDB2-overexpressing tumor xenografts, established after 3 sequential passages in mice (Fig. 2A, right graph and Supplementary Figure 4'). We confirmed that the quantified invasive cells were strongly and reduced significantly by 31.0-fold in lungs of mice with DDB2-overexpressing tumor xenografts, in contrast to control Neo tumors. Interestingly, the invasive cells from MDA-MB231 Neo tumor xenografts, quantified by FACS, were significantly increased by 4.0-fold in lungs of mice, in contrast to the results from mice with MDA-MB231 Neo cell injections. These results were confirmed by histological analysis where human breast cancer cells were detected by *in situ* hybridization using human fragmented and digoxigenin-labeled DNA as the probe and numbered by microscopic examination of different sections of lungs per mouse. We observed once again that the invasive cells were reduced significantly in lungs of mice injected or xenografted with DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells or tumors, respectively, in contrast to those with Neo control cells or tumor (Fig. 2B). These *in vitro* and *in vivo* data indicate clearly that DDB2 plays a negative role in the migratory and invasive abilities of aggressive breast tumor cells.

DDB2 overexpression is associated with a decrease in the constitutive NF-κB activity

As we observed a decrease in the secretion of MMP9 in aggressive DDB2-overexpressing tumor cells, and this gene is regulated by NF-κB (14, 15), we verified if DDB2 influenced the activity of this transcription factor. The transcriptional activity of NF-κB was evaluated using a luciferase reporter gene system under the control of a κB motif. NF-κB activity was decreased by 2.7 and 8.0-fold in DDB2-overexpressing MDA-MB231 and SKBR3 cells, respectively, in contrast to the respective control cells (Fig. 3A). This was confirmed by showing a decrease in MMP9 gene expression at the transcriptional level in DDB2-overexpressing MDA-MB231 and SKBR3 cells compared to control cells (Fig. 3B). In addition, the decrease in NF-κB activity was the consequence of a strong decrease in p65NF-κB nuclear translocation in DDB2-overexpressing cells, as seen by Western blotting with cytoplasmic and nuclear extracts as well as cytoimmunofluorescence (Fig. 3C and D). Only in DDB2-overexpressing SKBR3 cells was the p50NF-κB nuclear translocation decreased markedly. In addition, we observed that these results were associated with a strong increase in the IκBα protein level in the cytoplasmic extract from DDB2-overexpressing cells in contrast to control cells (Fig. 3C). We confirmed, by studying IκBα gene expression at the transcriptional and the translational levels, that an increase in IκBα mRNA as well as its

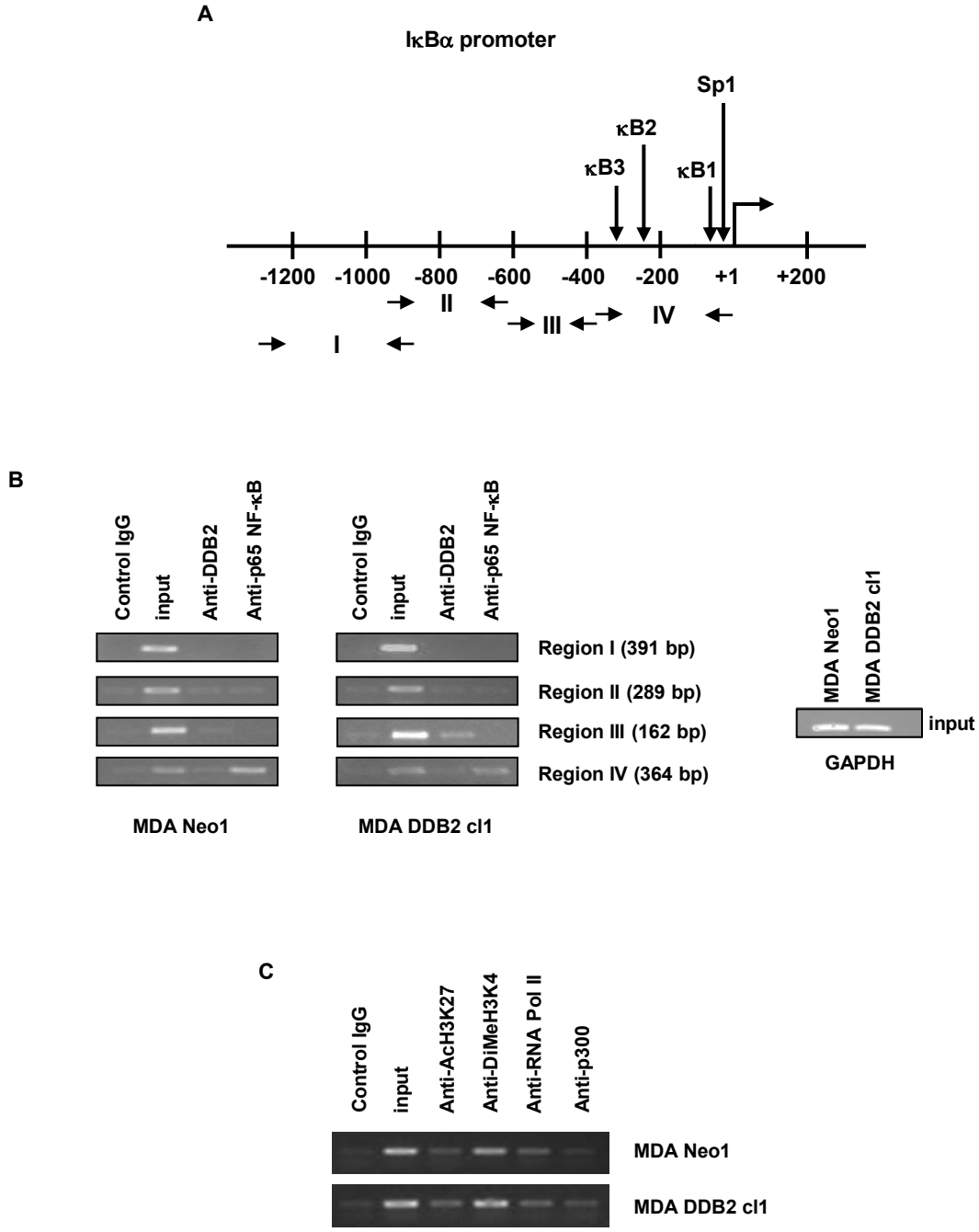


Figure 5. DDB2 is bound to the proximal promoter of the IκBα gene. A, the diagram shows the primers used to detect *in vivo* the interaction of DDB2 with the IκBα promoter, and they are indicated by horizontal arrows encompassing four regions (I, II, III and IV). The initiation transcription site is indicated by a single arrowhead at position +1. Positions of NF-κB and Sp1 binding sites are indicated by vertical arrows. B, binding of DDB2 to the IκBα promoter was detected by ChIP assay in control (Neo) and DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells. The immunoprecipitated chromatin with anti-DDB2, IgG control or anti-p65 NF-κB was amplified by PCR using appropriate primers for each region, as shown in A. C, the presence of acetylated (AcH3K27) or dimethylated H3 histone (DiMeH3K4), and p300 were detected by ChIP assay in control (Neo) and DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells using appropriate antibodies. The immunoprecipitated chromatin was amplified by PCR using the primers for the region IV.

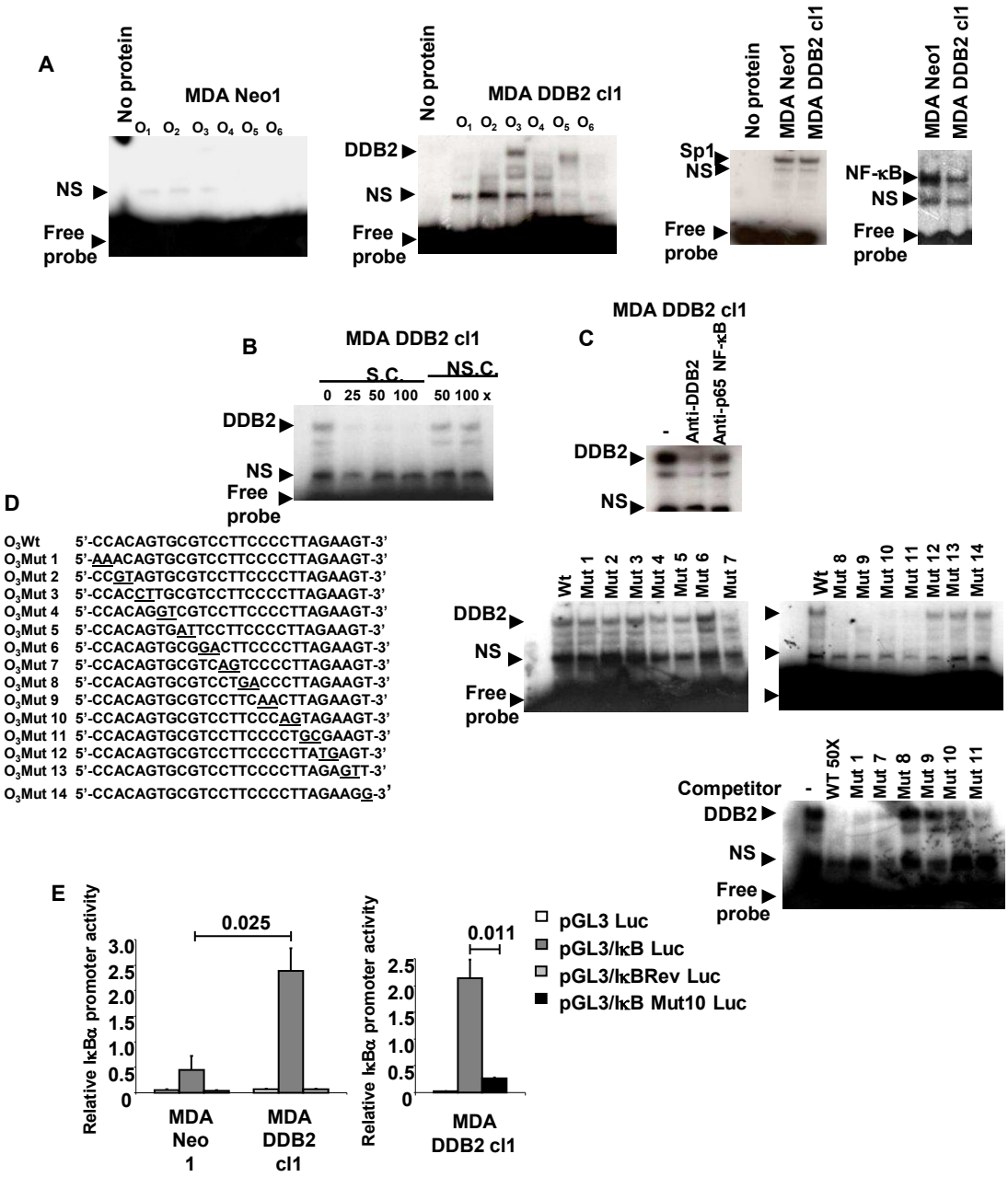


Figure 6. DDB2 is involved in the induction of IκBα gene transcription. A, six oligonucleotides (O_1 to O_6), corresponding to the region III of the IκBα promoter, where DDB2 was detected by ChIP assay, were used as ^{32}P-labeled for EMSA experiments, using nuclear proteins (2 µg) from control and DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells. The DNA binding activity of Sp1 or NF-κB was used as the nuclear protein loading control. NS for nonspecific complex. B, the specificity of the DNA binding activity on ^{32}P-labeled O_3 oligonucleotide was demonstrated by EMSA using either an excess of specific and unlabeled O_3 (S.C.) or with a nonspecific oligonucleotide corresponding to the NF-κB consensus site (NS.C.) as competitor. C, the presence of DDB2 was confirmed by the supershift experiment, using nuclear proteins (2 µg) from DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells incubated with anti-DDB2 or anti-p65NF-κB. D, the sequence of the DDB2 binding site was determined by EMSA using nuclear proteins (2 µg) from DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells and different ^{32}P-labeled mutant O_3 oligonucleotides with two nucleotide changes (Mut 1 to Mut 14) as probes. Competition was carried out with ^{32}P-labeled wild-type O_3 oligonucleotide and 50-fold molar excess of unlabeled mutant oligonucleotides. NS for nonspecific complex. E, consequence of the DDB2 overexpression on the IκBα transcription gene was studied in MDA-MB231 cells by luciferase reporter gene assay placed under the control of the wild-type IκBα promoter (pGL3/ IκB Luc), the reversed IκBα promoter (pGL3/IκB Rev Luc) as negative control, or mutated for DDB2-binding site (pGL3/IκB Mut10 Luc). Cells were transfected with these plasmids for 24 hours in the presence of pSV40/β-galactosidase for normalization. Relative IκBα promoter activity was determined as means ± SD from three independent experiments, each done in triplicate, as luciferase activity normalized to β-galactosidase activity. Significant differences are indicated, either between DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells and control Neo cells, or pGL3/IκB Mut10 Luc and pGL3/IκB Luc for $p<0.05$.

protein expression was observed in DDB2-overexpressing cells, in contrast to control Neo cells (Fig. 4).

DDB2 decreases NF-κB activity through its role in transcriptional IκBα gene expression

Given that overexpression of DDB2 increased IκBα expression, and decreased constitutive NF-κB activity as well as invasive abilities of aggressive breast tumor cells, we hypothesized that DDB2 could be involved in the regulation of the IκBα gene. Also, the occupancy of the IκBα promoter by DDB2 was investigated by ChIP experiments with MDA-MB231 cells, using different sets of primers which delineated four regions covering 1.4 kb of the proximal promoter of the IκBα gene (Fig. 5A). The results showed that specific binding of DDB2 to region III (between -555 and -394 bp from initiation transcription site) only was observed in DDB2-overexpressing cells, in contrast to control Neo cells, indicating that the protein binds to the IκBα promoter gene (Fig. 5B). Interestingly, p65NF-κB was detected in region IV, containing a well known NF-κB binding site (16), in contrast to DDB2-overexpressing cells. We analyzed by ChIP if DDB2 binding to the IκBα proximal promoter was associated with an epigenetic process such as posttranslational histone modifications and recruitment of CBP/p300. Whereas no differences were observed in the acetylation as well as methylation of H3 histone to the lysine residues 27 and 4, respectively between MDA-MB231 cells expressing or not DDB2, the presence of the p300 protein was more strongly detected for DDB2-overexpressing cells (Fig. 5C).

To identify precisely the sequence of the DDB2 binding site, a set of six oligonucleotides named O_1 to O_6 and corresponding to region III determined by ChIP assay were used for EMSA . Among them, only the O_3 oligonucleotide formed a shifted DNA-protein complex in DDB2-overexpressing MDA cells compared with control cells (Fig. 6A), which was specific, as shown competition experiment using different amounts of unlabeled O_3 probe and a nonspecific NF-κB probe (Fig. 6B). The presence of DDB2 was detected on the O_3 oligonucleotide by a marked decrease in its DNA binding activity by supershift experiment using specific polyclonal antibodies (Fig. 6C). The shift formed with the O_5 oligonucleotide was verified as nonspecific by competition using different amounts of unlabeled O_5 probe (data not shown). A collection of mutant O_3 oligonucleotides (Mut 1 to 14) were tested by EMSA to better characterize the DDB2-binding site. Only Mut 8, 9, 10 and 11 were unable to bind DDB2 (Fig. 6D). This result was confirmed by competition, showing that these mutant

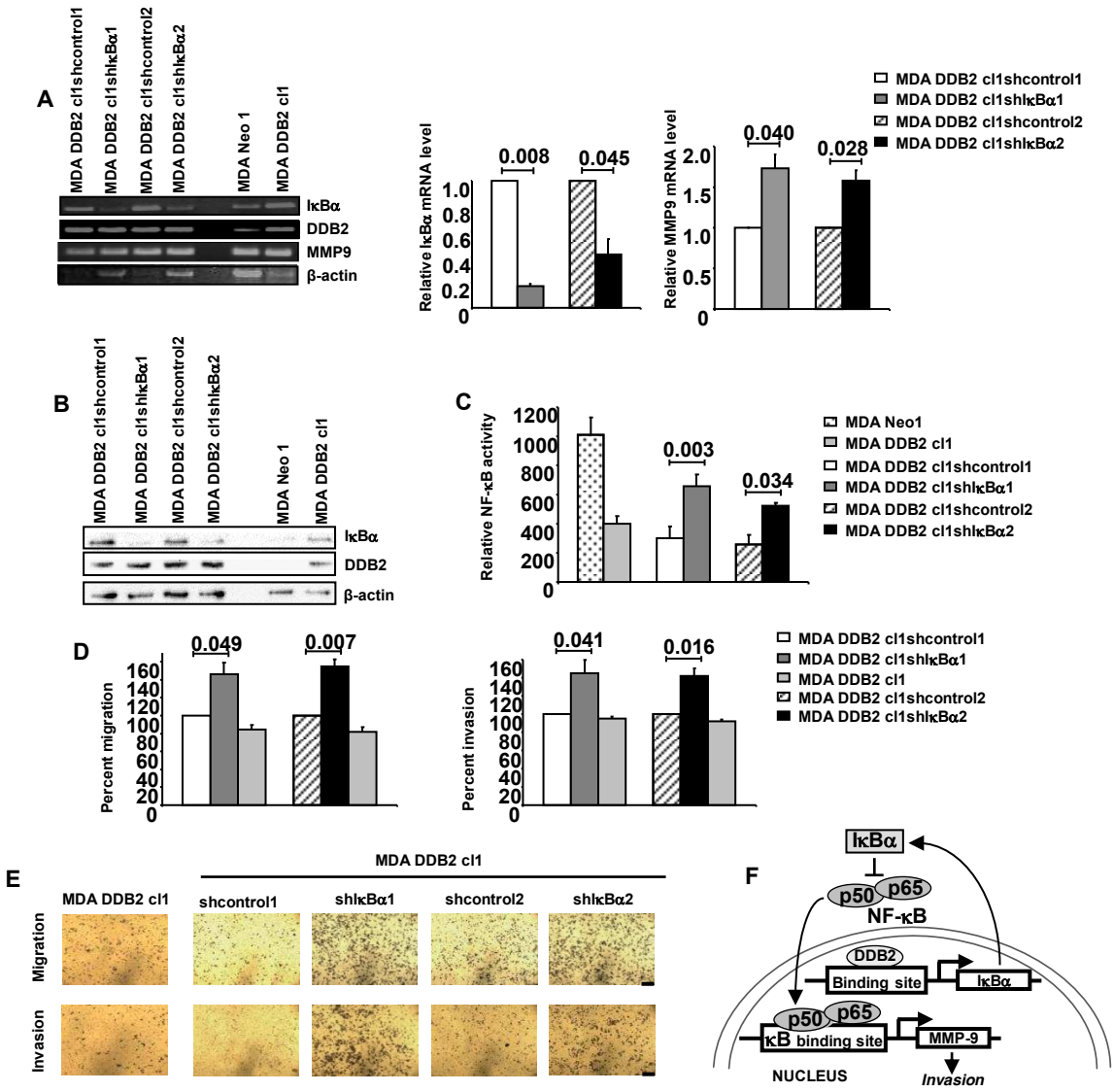


Figure 7. Knockdown of IκBα expression suppresses the negative effect of DDB2 on the invasive abilities of aggressive breast tumor cells. A, IκBα expression was knocked down in DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells (MDA DDB2 cl1), using lentiviral shRNAs, and two cell clones were isolated (MDA DDB2 cl1sh IκBα 1 and 2). The knockdown of IκBα expression and the consequence on MMP9 expression were verified in these two clones by RT-PCR analysis and compared to the MDA DDB2 cl1 transfected with shRNA control (MDA DDB2 cl1shcontrol 1 and 2) and to parental MDA DDB2 cl1 cells. The result shown is representative of three separate experiments. The relative IκBα and MMP9 mRNA levels were normalized to β-actin mRNA. Relative band intensities were quantified by densitometry and data were expressed as fold increases ± SD over values for MDA-MB231 DDB2 cl1 shcontrol cells fixed at 1. Differences were significant ($p<0.05$) between the MDA DDB2 cl1shIκBα and shcontrol cells. No significant difference was observed between all control cells. B, the knockdown of IκBα expression was verified in MDA DDB2 cl1sh IκBα1 and 2 by Western blot analysis with appropriate antibodies and compared to the different control cells. C, consequence of the knockdown of IκBα expression on the transcriptional activity of NF-κB was measured in MDA DDB2 cl1shIκBα and control cells by luciferase assay following transient transfection with pGL3/NF-κB-Luc for 24 hours in the presence of pSV40/β-galactosidase for normalization. Results from three independent experiments done in triplicate are means ± SD of luciferase activity normalized to β-galactosidase activity and indicated as relative NF-κB activity. Differences were significant ($p<0.05$) between the MDA DDB2 cl1shIκBα and shcontrol cells. No significant difference was observed between all control cells. D, cell migration and invasion assays through uncoated (migration) and matrigel-coated membranes (invasion), respectively, were evaluated for control and MDA DDB2 cl1shIκBα cells after 36 hours. Data from three independent experiments (each performed in triplicate) were expressed as mean ± SEM of percentage of the shcontrol cells, defined as 100% of migrating or invading cells. Differences were significant ($p<0.05$) between the MDA DDB2 cl1shIκBα and shcontrol cells. E, representative image of D was visualized by phase-contrast microscopy (scale bar, 100 μm). F, a summarized model illustrates the molecular mechanism involving DDB2 in the reduction of the migratory and invasive properties of aggressive breast tumor cells.

oligonucleotides were unable to compete with wild type O_3. Taken together, these data suggest that the TCCCCTTA (between -491 and -483 bp from initiation transcription site) sequence in the O_3 oligonucleotide was important for DDB2 binding to the IκBα proximal promoter. The consequence of this DDB2 binding in the expression of the IκBα gene was studied using the luciferase reporter gene system under the control of the proximal IκBα promoter. Transfection reporter assays indicated that the transcription of the IκBα gene was increased significantly in DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells, in contrast to neo cells (Fig. 6E). The functionality of the DDB2 binding site was tested by mutating it specifically in the pGL3/IκB Luc construct. The resulting construct (pGL3/IκB Mut10 Luc), containing two mutated residues and corresponding to the O_3Mut10 sequence, was transfected into DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells. The response to DDB2 in cells transfected with the mutant construct, was decreased dramatically (Fig. 6E). These results were confirmed with MCF-7 cells, which overexpress naturally DDB2 (Fig. 6').

DDB2 reduces the invasive potential of aggressive breast tumor cells by controlling negatively the constitutive NF-κB activity

To evaluate whether DDB2 reduced the migratory and invasive abilities of aggressive breast tumor cells by inducing IκBα gene, this latter was knocked down in DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells, using lentiviral short hairpin RNAs (shRNAs). Two DDB2-overexpressing cell clones transfected with shRNA IκBα were isolated (Fig. 7A), in which NF-κB activity, MMP9 expression, and migratory and invasive abilities were restored in part (Fig. 7B-E). No significant difference was observed between parental and shRNA control DDB2-overexpressing cells. These results support the negative effect of DDB2 on constitutive NF-κB activity by inducing IκBα gene expression to reduce the migratory and invasive potential of tumor cells. We confirmed that inhibition of NF-κB by treatment of control Neo cells with the cell-permeative peptide SN50 decreased invasive cell abilities (Fig. 8').

DISCUSSION

We observed previously that DDB2 expression was inversely correlated with the invasive properties of breast tumor cells, and that a constitutive overexpression of DDB2 in nonmetastatic cells induced cell proliferation by activating the G1/S transition phase of the cell cycle (2). In the present study, our findings summarized in Fig. 7F provide for the first time strong evidence that DDB2 plays a role as a negative regulatory factor in the migratory and invasive abilities of breast tumor cells *in vitro* as well as *in vivo*. We demonstrated that DDB2 plays this role *via* decreasing NF-κB activity, by its involvement in the regulation of the IκBα gene.

Several studies have reported that NF-κB plays also a key role in the induction of invasive abilities of cancer cells and is required for maintenance of the malignant phenotype, particularly for breast cancer cells. Inhibition of the NF-κB pathway abrogates generation of the Ras-dependent invasive phenotype acquired by breast cancer cells *in vitro* and prevents metastasis in a mouse model (17). In accordance with this study, inhibition of the constitutive or induced NF-κB pathway in MDA-MB231 and HER2 positive SKBR3 cells, respectively, using the SN50 peptide (18), decreased migration and invasion of these cells (Fig. 8'). The NF-κB-dependent acquisition of invasive properties of breast cancer cells and tumors as well as of carcinogen-induced primary rat mammary tumors is often associated with an aberrant constitutive activation of this transcription factor (6, 19). Two molecular mechanisms have been identified to be related to the constitutive activation of NF-κB in breast cancer cells. An aberrant expression of IκB kinases and casein kinase II was observed in some human breast cancer cells and primary tumors, which was responsible for constitutive NF-κB activation by controlling IκBα stability (20). It has been reported also that the constitutive activation of NF-κB could be due to an enhanced expression of NF-κB-inducing kinase involved in the activation of IκB kinases, resulting to an epigenetic alteration of its gene in the malignant basal-like breast cancer (21). Concerning HER2-positive breast cancer cells, as the SKBR3 cell line, NF-κB is activated constitutively by the survival signalling pathway via PI3K/Akt and NIK/IκB kinase, which is triggered by the binding of EGF to its overexpressed membrane receptor (22). This may explain the marked effect of DDB2 on NF-κB activity and the migration/invasion properties of EGF-sensitive SKBR3 cells. In the present study, we identified for the first time a new molecular mechanism corresponding to a lack of DDB2 expression in aggressive breast cancer cells, which leads to a low IκBα expression and a high constitutive NF-κB activity.

NF-κB plays a causal role in the migration and invasion of tumor cells by regulating positively target genes. Among them, the gene encoding MMP9 is a well known target gene of NF-κB, whose promoter contains a NF-κB site at -599 bp from the transcription start site (14). MMP9, a type IV collagenase, is partly responsible for the invasive phenotype of tumor cells, by degrading the basement membrane (7). In addition, MMP9 expression is correlated often with advanced tumor grade in breast cancer (23). The fact that MMP9 expression is reduced by the DDB2-dependent decrease in NF-κB activity could explain in part that DDB2 plays a negative role in the invasive properties of aggressive tumor cells. It is not excluded that DDB2 plays this role by maintaining a low expression of the MnSOD gene, *via* its binding to the proximal promoter, as we demonstrated recently (3). MnSOD, which is constitutively overexpressed in highly invasive breast tumor cells, participates in the invasive properties of these cells by increasing the level of secreted MMP9 *via* the hydrogen peroxide produced from its enzymatic activity on the superoxide anion (4).

We identified that the involvement of DDB2 in the regulation of the IκBα gene is the molecular mechanism by which DDB2 plays a negative role in the invasive abilities of aggressive breast tumor cells. Knockdown of IκBα gene expression induced by DDB2 restored constitutive NF-κB activity and invasive properties of aggressive breast tumor cells. The IκBα gene is the second newly identified target gene for DDB2. In contrast to the MnSOD gene, its expression is positively regulated in the presence of DDB2. The binding site of DDB2 is localized in the proximal IκBα gene promoter and differs from the one identified for the MnSOD gene (3). It is difficult to consider that the difference in the sequence of the binding site explains the distinct role of DDB2 in expression of IκBα and MnSOD genes. The regulation of IκBα gene expression is not well known, and from a footprinting analysis, only three κB sites and one Sp1 site in the proximal IκBα gene promoter have been characterized, all close to the TATA box and the initiation transcription site (Fig. 5). The κB1 and Sp1 sites have been shown to be required in an autoregulatory loop for full TNFα-mediated induction of the IκBα gene in Jurkat T cells (16). Whereas no Sp1 binding was detected on its site whatever the DDB2 expression (data not shown), we observed constitutive p65NF-κB binding to the κB1 site in control breast cancer cells. This was decreased in DDB2-overexpressing cells because of the decrease in the nuclear translocation of the p65NF-κB protein, suggesting that this latter is not involved in DDB2 dependent-induction of the IκBα gene. This explains also why DDB2 is able to maintain a low expression of the MnSOD gene, by decreasing NF-κB binding to a κB site located in intron 2, as we demonstrated recently (24).

To attempt to explain the role of DDB2 in the induction of the IκBα gene, we examined if the DDB2 dependent-increase in IκBα expression was associated with an epigenetic process such as posttranslational histone modification, as demonstrated previously by us and others (3, 25). Both methylation and acetylation of histone H3 are known to be indicative of the active transcription of genes. The IκBα gene, which has a basal transcription level, is located into a region of chromatin opened continuously by basal histone modifications (http://genome.ucsc.edu/), explaining the presence on the proximal promoter of p65 NF-κB binding to the κB1 site and acetylated and dimethylated H3 histones to the lysine residue 27 and 4, respectively, in control cells. No changes were observed for histone modifications, regardless of the DDB2 expression. Only the p300 protein was detected more at region IV close to the transcription start site in DDB2-overexpressing cells than in control cells, which may explain the DDB2-dependent increase in IκBα expression. Indeed, the CBP/p300 family is well known to enhance transcription, not only by modifying chromatin structure through its histone acetyltransferase activity, but also by facilitating the assembly of activating transcription complexes at the promoter (26). In addition, these proteins are able to interact with a variety of proteins, including DDB2, to increase their activity as co-activators of transcription (27).

The present findings bring a new understanding of how breast cancer cells progress toward an invasive phenotype, by decreasing the DDB2 expression. The involvement of DDB2 in the control of migratory and invasive abilities of breast tumor cells *in vitro* as well as *in vivo* will need to investigate the expression level of the DDB2 gene in poorly-differentiated high-grade breast carcinomas. The present findings support the idea that DDB2 may represent a good candidate for predicting breast tumor progression toward a malignant phenotype. Finally, the molecular mechanism identified in our study may represent an interesting pathway for future development of new anticancer therapies, because NF-κB is considered already as a good therapeutic target (28).

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

We declare that we have no conflicts of interest related to the publication of this manuscript.

Author's Contributions

Conception and design: M. Ennen, S. Grandemange, P. Becuwe

Development of methodology: M. Ennen, V. Besancenot, E. Brunner, D. Thiebaut, R. Klotz, S. Grandemange, N. Touche , P. Becuwe

Acquisition of data: M. Ennen, V. Besancenot, E. Brunner, S. Pinel, D. Thiebaut, R. Klotz, S. Grandemange, N. Touche , F. Plenat, P. Becuwe

Analysis and interpretation of data: M. Ennen, S. Grandemange, N. Touche , S. Pinel, F. Plenat, R. Klotz, L. Domenjoud, P. Becuwe

Writing and review of the manuscript: M. Ennen, S. Grandemange, N. Touche, P. Becuwe

Study supervision: S. Grandemange, P. Becuwe

Acknowledgments

The authors are grateful to Prof. S.N. Thornton for critical reading of the manuscript.

Grant Support

Financial support was provided by the Ligue contre le Cancer (Comités Meuse and Vosges), the University of Lorraine and Région Lorraine. M. Ennen has a fellowship from the French Research Ministry.

REFERENCES

1. Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. Nat Rev Cancer 2009;9:274-84.
2. Kattan Z, Marchal S, Brunner E, Ramacci C, Leroux A, Merlin JL, et al. Damaged DNA binding protein 2 plays a role in breast cancer cell growth. PLoS One 2008a;3:e2002.
3. Minig V, Kattan Z, van Beeumen J, Brunner E, Becuwe P. Identification of DDB2 protein as a transcriptional regulator of constitutive SOD2 gene expression in human breast cancer cells. J Biol Chem 2009;284:14165-76.
4. Kattan Z, Minig V, Leroy P, Dauça M, Becuwe P. Role of manganese superoxide dismutase on growth and invasive properties of human estrogen-independent breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat 2008b;108:203-15.
5. Prasad S, Ravindran J, Aggarwal B. NF-κB and cancer: how intimate is this relationship. Mol Cell Biochem 2010;336:25-37.

6. Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJJr, Sledge GWJr. Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. Mol Cell Biol 1997;17:3629-39.
7. Min C, Eddy SF, Sherr DH, Sonenshein GE. NF-kappaB and epithelial to mesenchymal transition of cancer. J Cell Biochem 2008;104:733-44.
8. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-75.
9. Das S, Banerji A, Frei E, Chatterjee A. Rapid expression and activation of MMP-2 and MMP-9 upon exposure of human breast cancer cells (MCF-7) to fibronectin in serum free medium. Life Sci 2008;82:467-76.
10. Becuwe P, Bianchi A, Didelot C, Barberi-Heyob M, Dauça M. Arachidonic acid activates a functional AP-1 and an inactive NF-kappaB complex in human HepG2 hepatoma cells. Free Radic Biol Med 2003;35:636-47.
11. Pinel S, Barberi-Heyob M, Cohen-Jonathan E, Merlin JL, Delmas C, Plenat F, et al. Erythropoietin-induced reduction of hypoxia before and during fractionated irradiation contributes to improvement of radioresponse in human glioma xenografts. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2004;59:250-9.
12. Antunes L, Angioi-Duprez KS, Bracard SR, Klein-Monhoven NA, Le Faou AE, Duprez AM, et al. Analysis of tissue chimerism in nude mouse brain and abdominal xenograft models of human glioblastoma multiforme: what does it tell us about the models and about glioblastoma biology and therapy? J Histochem Cytochem 2000;48:847-58.
13. Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. Cancer Metastasis Rev 2006;25:9-34.
14. Himelstein BP, Lee EJ, Sato H, Seiki M, Muschel RJ. Transcriptional activation of the matrix metalloproteinase-9 gene in an H-ras and v-myc transformed rat embryo cell line. Oncogene 1997;14:1995-8.
15. Chua HL, Bhat-Nakshatri P, Clare SE, Morimiya A, Badve S, Nakshatri H. NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. Oncogene 2007;26:711-24.

16. Algarté M, Kwon H, Génin P, Hiscott J. Identification by in vivo genomic footprinting of a transcriptional switch containing NF-kappaB and Sp1 that regulates the IkappaBalpha promoter. Mol Cell Biol 1999;19:6140-53.
17. Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grünert S, Sommer A, Pehamberger H, et al. NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. J Clin Invest 2004;114:569-81.
18. Lin YZ, Yao S, Veach RA, Torgerson TR, Hawiger J. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-κB by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. J Biol Chem 1995;270:14255-8.
19. Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, Zanieski GJ, Rogers AE, Traish AM, et al. Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. J Clin Invest 1997;100:2952-60.
20. Romieu-Mourez R, Landesman-Bollag E, Seldin DC, Traish AM, Mercurio F, Sonenshein GE. Roles of IKK kinases and protein kinase CK2 in activation of nuclear factor-kappaB in breast cancer. Cancer Res 2001;61:3810-8.
21. Yamamoto M, Ito T, Shimizu T, Ishida T, Semba K, Watanabe S, et al. Epigenetic alteration of the NF-κB-inducing kinase (NIK) gene is involved in enhanced NIK expression in basal-like breast cancer. Cancer Sci 2010;101:2391-7.
22. Pianetti S, Arsura M, Romieu-Mourez R, Coffey RJ, Sonenshein GE. Her-2/neu overexpression induces NF-kappaB via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of IkappaB-alpha that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN. Oncogene 2001;20:1287-99.
23. Vizoso FJ, González LO, Corte MD, Rodríguez JC, Vázquez J, Lamelas ML, et al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. Br J Cancer 2007;96:903-11.
24. Ennen M, Minig V, Grandemange S, Touche N, Merlin JL, Besancenot V, et al. Regulation of the high basal expression of the manganese superoxide dismutase gene in aggressive breast cancer cells. Free Radic Biol Med 2011;50:1771-9.
25. Roy N, Stoyanova T, Dominguez-Brauer C, Park HJ, Bagchi S, Raychaudhuri P. DDB2, an essential mediator of premature senescence. Mol Cell Biol 2010;30:2681-92.
26. Kalkhoven E. CBP and p300: HATs for different occasions. Biochem Pharmacol 2004;68:1145-55.

27. Datta A, Bagchi S, Nag A, Shiyanov P, Adami GR, Yoon T, et al. The p48 subunit of the damaged-DNA binding protein DDB associates with the CBP/p300 family of histone acetyltransferase. Mutat Res 2001;486:89-97.
28. Shen HM, Tergaonkar V. NFkappaB signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy. Apoptosis 2009;14:348-63.

4. Conclusions

L'ensemble de nos résultats révèle pour la 1ère fois une nouvelle activité biologique de la protéine DDB2, dans le contrôle des propriétés invasives des cellules tumorales mammaires. Nous avons montré que son rôle négatif sur les capacités migratrices et invasives des cellules tumorales mammaires lorsqu'elles la surexpriment, dépend en partie de son activité inductrice sur l'expression du gène codant IκBα, et en conséquence à une diminution de l'activité constitutive de NF-κB et de l'expression de la MMP-9 (voir Figure 7 dans Article 1). Ces résultats, observés à la fois *in vitro* et *in vivo*, sont également associés au niveau d'expression faible de DDB2 mesuré dans les tumeurs mammaires de haut grade. C'est la 1ère fois qu'une relation entre DDB2 et NF-κB est mise en évidence, qui permet de mieux comprendre la progression des cellules tumorales mammaires vers un statut invasif et métastatique et représente également une voie intéressante pour le développement de nouvelles thérapies anticancéreuses. Ces résultats renforcent également l'idée que DDB2 présente un intérêt clinique potentiel, comme marqueur prédictif de la progression métastatique des tumeurs mammaires.

.

II. IMPORTANCE DE LA RELATION ENTRE DDB2 ET NF-κB DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION DU GENE SOD Mn DANS LES CELLULES TUMORALES MAMMAIRES

1. Introduction et résultats préliminaires

Lors de travaux précédents, le laboratoire d'accueil a mis en évidence pour la 1ère fois, une relation entre la protéine DDB2 et l'expression de la SOD Mn, ainsi qu'un rôle de cette enzyme anti-oxydante dans les capacités invasives des cellules tumorales mammaires hautement métastatiques. En effet, le laboratoire a montré que DDB2 agit négativement sur la transcription basale du gène de la SOD Mn, d'une part en se fixant sur une séquence d'ADN spécifique située dans la partie proximale du promoteur, d'autre part en favorisant à la fois la diminution de l'acétylation des histones et le recrutement d'un répresseur transcriptionnel tel qu'AP-2α sur la région promotrice. Il avait également été montré que DDB2 exerce en partie son activité stimulatrice de la prolifération des cellules tumorales mammaires non métastatiques, en maintenant une expression faible de la SOD Mn (Kattan *et al*., 2008a ; Minig *et al*., 2009). Ces résultats expliquent également en partie ceux obtenus plus antérieurement, qui montrent, qu'en absence d'expression de DDB2, la SOD Mn a une expression basale élevée dans les cellules tumorales mammaires hautement métastatiques, ayant pour conséquence une surproduction de peroxyde d'hydrogène issue de l'activité enzymatique de cette enzyme anti-oxydante. Ce peroxyde d'hydrogène joue un rôle dans les capacités invasives des cellules tumorales mammaires hautement métastatiques, en activant en particulier la MMP-9 (Kattan *et al*., 2008b).

Le mécanisme moléculaire responsable de l'expression élevée de la SOD Mn dans les cellules tumorales mammaires métastatiques n'est pas connu. Dans ce sens, des travaux, commencés dans le cadre de la thèse de Doctorat de V. Minig, ont démontré l'implication de Sp1 dans l'expression basale élevée de la SOD Mn dans les cellules MDA-MB231. Ces résultats montrent que l'inactivation de Sp1 par un traitement pendant 6 heures des cellules MDA-MB231 avec de l'acide okadaique entraîne une diminution de l'expression de la SOD Mn. Cet acide est un inhibiteur de l'activité de la protéine phosphatase 2A, qui maintient la protéine Sp1 sous sa forme phosphorylée, dépourvue d'activité transcriptionnelle. De même, des expériences d'inhibition de l'expression de Sp1 par ARN interférence, révèlent également une forte inhibition de l'expression de l'enzyme anti-oxydante. Enfin, V. Minig a montré par

immunoprécipitation de chromatine et par une analyse fonctionnelle du promoteur proximal du gène de la SOD Mn, que Sp1 induit l'expression de l'enzyme anti-oxydante dans les cellules MDA-MB231 en se fixant spécifiquement sur le site le plus proche de celui initiant la transcription, parmi d'autres (Ennen M, Minig V. *et al*., 2011 Article 2). Par contre, aucune fixation de Sp1 sur ce site n'est observée dans les cellules MCF-7 Wt, comme il a été démontré précédemment, à cause de la présence de DDB2 (Minig *et al*., 2009).

A lui seul, Sp1 ne permet pas d'expliquer l'expression élevée de la SOD Mn dans les cellules tumorales hautement invasives. L'hypothèse d'une implication de NF-κB a donc été proposée, car il est connu que ce facteur de transcription possède un élément de réponse localisé dans le 2ème intron du gène de la SOD Mn et déjà montré fonctionnel. Cet élément de réponse est appelée « TNFRE » ou « Tumor Necrosis Factor Response Element », et contient un motif κB sur lequel se fixe le facteur de transcription NF-κB sous la forme d'un hétérodimère p50/p65 pour induire l'expression du gène de la SOD Mn en présence de TNFα (Bernard *et al*., 2001 ; Josson *et al*., 2006).

Les résultats précédents, décrits dans l'article 1, ont montré un contrôle négatif de DDB2 sur l'activité du complexe NF-κB dans les cellules tumorales mammaires exprimant très faiblement la SOD Mn. Aussi, l'objectif de cette partie du travail a consisté à montrer si NF-κB joue un rôle dans l'expression élevée de la SOD Mn, en l'absence de DDB2, dans les cellules tumorales mammaires hautement invasives.

2. Résultats obtenus

Dans un 1er temps, nous avons vérifié l'activité constitutive de NF-κB dans les cellules MCF-7 et MDA-MB231, utilisées précédemment dans notre étude du rôle de DDB2 dans la régulation de l'expression de la SOD Mn. L'activité transcriptionnelle de NF-κB est mesurée par transfection transitoire à l'aide de deux plasmides, contenant un gène rapporteur de type luciférase, mis sous contrôle de motifs κB (pGL3/NF-κB Luc) ou du TNFRE (pGL3/TNFRE Luc). Les cellules MDA-MB231 sauvages (Wt), ayant une expression élevée de la SOD Mn, ont une activité constitutive de NF-κB fortement plus élevée que les cellules MCF-7 Wt exprimant très faiblement l'enzyme anti-oxydante, et ce quelque soit le plasmide utilisé. Par gel retard et super-retard, nous avons montré que cette activité transcriptionnelle élevée de NF-κB dans les cellules MDA-MB231 Wt dépend de l'hétérodimère p50/p65. En relation

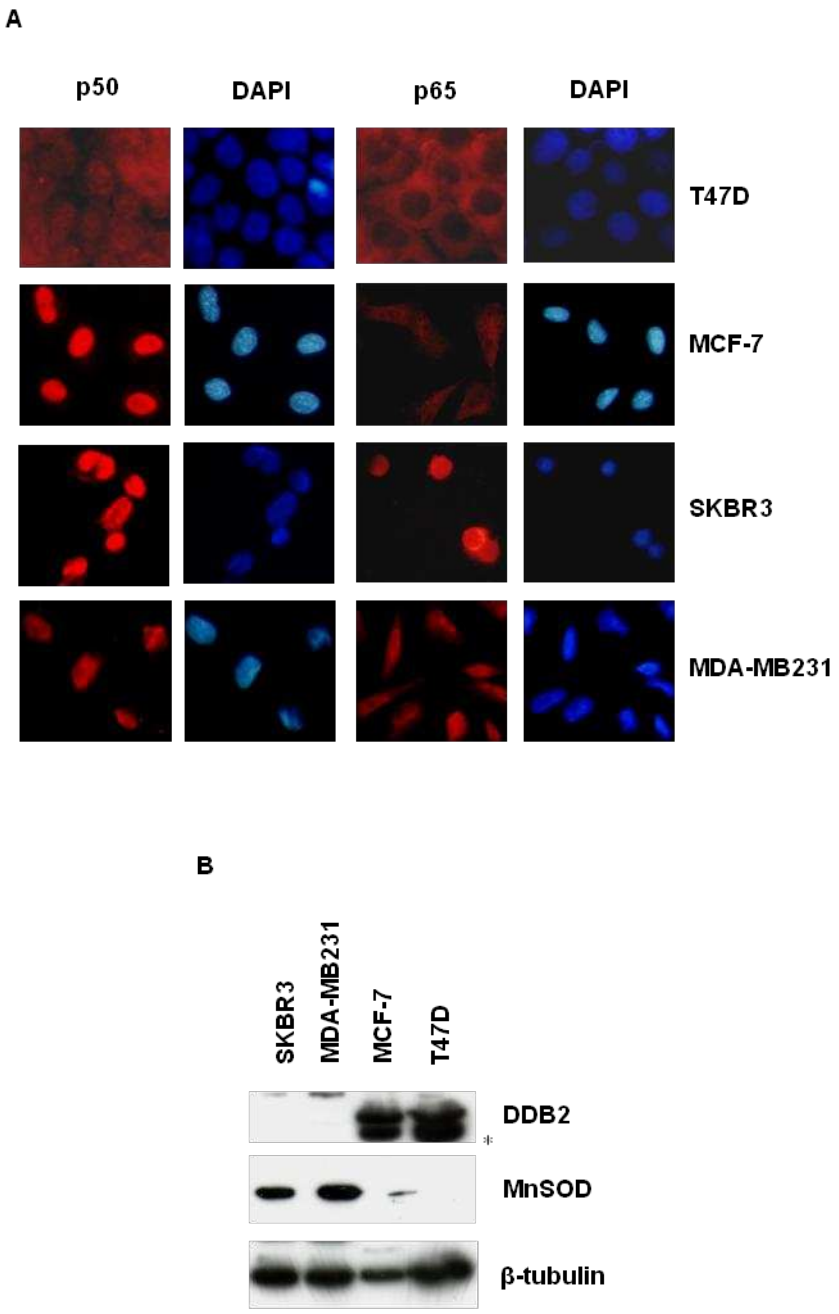


Figure 10: Comparaison entre l'expression de DDB2, la SOD Mn et l'activité constitutive de NF-κB dans différentes lignées de cellules tumorales mammaires. (A) L'expression de DDB2 et de la SOD Mn est analysée par Western blot sur 50 µg de protéines totales, extraites des différentes lignées cellulaires tumorales, à l'aide des anticorps polyclonaux spécifiques respectifs (*, position d'une bande non spécifique). La β-tubuline est également révélée pour témoigner de l'équivalence des dépôts de protéines totales pour chaque type cellulaire. Cette figure est représentative de trois expériences réalisées indépendamment. (B) L'activité constitutive de NF-κB est étudiée dans chaque type cellulaire par immunocytofluorescence, en suivant la translocation nucléaire de p50 et p65 NF-κB, à l'aide des anticorps polyclonaux respectifs. Les noyaux sont colorés au DAPI.

avec ces résultats, p50 et p65 NF-κB sont exclusivement localisées dans le noyau des cellules MDA-MB231 Wt, alors que p65 est strictement cytoplasmique dans les cellules MCF-7 Wt. Nous avons étendu notre comparaison entre l'activité constitutive de NF-κB et l'expression de la SOD Mn, associée à celle de la protéine DDB2, dans deux autres lignées cellulaires tumorales mammaires telles que T47D et SKBR3. Les cellules T47D exprimant faiblement la SOD Mn mais fortement DDB2, présentent une activité constitutive faible de NF-κB, comme en témoigne l'absence de p65 NF-κB dans leur noyau par immunocytofluorescence. Au contraire, les cellules SKBR3, qui expriment fortement la SOD Mn mais peu ou pas DDB2, ont une activité constitutive forte de NF-κB, représentée par une localisation strictement nucléaire de p65 NF-κB (Figure 10).

Dans un 2ème temps, nous avons montré l'importance de l'activité constitutive de NF-κB dans l'expression élevée de la SOD Mn dans les cellules MDA-MB231 Wt. Pour cela, ces cellules ont été traitées pendant 24 heures avec 50 µg/ml de peptide SN50, l'inhibiteur spécifique de la translocation nucléaire des protéines du complexe NF-κB, ou le peptide contrôle. Après avoir vérifié l'efficacité de l'inhibition par le peptide SN50 du complexe NF-κB, à la fois par immunocytofluorescence au niveau de la translocation nucléaire de p50 et p65 NF-κB et par mesure de l'activité transcriptionnelle avec le plasmide pGL3/NF-κB Luc, les conséquences du traitement sont évaluées sur l'expression de la SOD Mn au niveau transcriptionnel. Les résultats montrent que le peptide SN50 provoque une diminution importante de l'expression basale de la SOD Mn dans les cellules MDA-MB231 Wt, comparativement au traitement avec le peptide contrôle.

A la suite de ces résultats, nous avons montré par immunoprécipitation de chromatine que NF-κB induit l'expression de la SOD Mn dans les cellules MDA-MB231 Wt, en se fixant sur son élément de réponse TNFRE situé dans l'intron 2 du gène codant l'enzyme anti-oxydante, et ceci en association avec une hyperacétylation des histones H3. Au contraire, dans les cellules MCF-7 Wt, aucune hyperacétylation des histones H3 n'est observée et NF-κB est très faiblement présent sur son élément de réponse TNFRE, en accord avec la présence de DDB2 et l'activité constitutive faible de NF-κB dans ces cellules (Article 2). Cette observation faite pour les cellules MCF-7 Wt, à savoir l'influence de DDB2 sur la fixation du complexe NF-κB au TNFRE de l'intron 2 du gène codant la SOD Mn a été vérifiée par immunoprécipitation de chromatine en utilisant le modèle de cellules MDA-MB231 qui surexpriment DDB2. Par rapport aux cellules témoins MDA-MB231 Neo, les cellules surexprimant DDB2 ont une fixation fortement diminuée de p65 NF-κB sur le TNFRE, sans

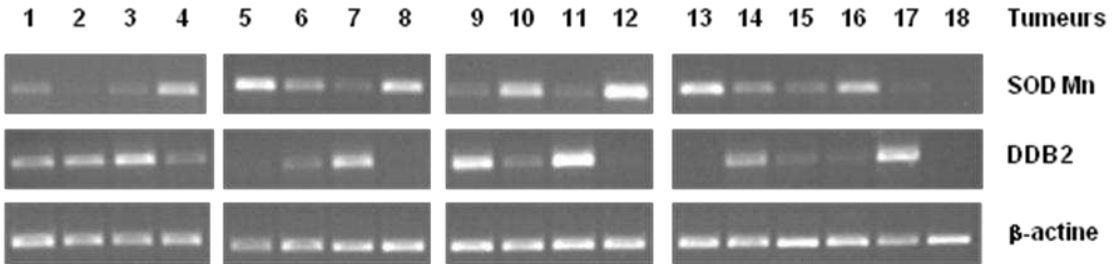


Figure 11: Analyse par RT-PCR de l'expression de DDB2 et de la SOD Mn dans des échantillons cliniques de tumeurs mammaires. Les ARNs totaux sont extraits à partir de 18 tumeurs mammaires issues de patientes. L'expression de DDB2 et de la SOD Mn est évaluée par RT-PCR. Les résultats sont exprimés comme l'expression relative des gènes qui résulte du rapport de l'intensité des bandes obtenue pour la SOD Mn ou DDB2 sur celle de la β-actine, utilisée comme contrôle interne. La corrélation entre l'expression relative de la SOD Mn et DDB2 est évaluée par la méthode du coefficient de corrélation de Pearson (voir Article 2) et considérée statistiquement significative pour un $p<0,05$. Cette analyse statistique a été réalisée par le Dr A.S. Chrétien de l'Unité de Biologie des Tumeurs du Centre régional de lutte contre le cancer Alexis Vautrin à Vandoeuvre lès Nancy.

changement significatif sur l'hyperacétylation des histones H3. Cette observation est corrélée avec la diminution de l'expression au niveau transcriptionnel du gène codant la SOD Mn (Article 2). La corrélation inverse entre l'expression de DDB2 et la SOD Mn a par ailleurs été vérifiée par RT-PCR, dans des échantillons cliniques de tumeurs mammaires provenant de patientes atteintes d'un cancer du sein. Nos résultats montrent bien une corrélation inverse ($r = -0,768$), significative ($p = 0,001$) entre l'expression de ces deux gènes pour une série de 18 tumeurs mammaires (Article 2 et Figure 11).

Ces résultats font l'objet d'un article publié en 2011 dans Free Radical Biology and Medicine.

Article 2: Regulation of the high basal expression of the manganese superoxide dismutase gene in aggressive breast cancer cells.

Free Radical Biology & Medicine 50 (2011) 1771–1779

Contents lists available at ScienceDirect

Free Radical Biology & Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/freeradbiomed

Original Contribution

Regulation of the high basal expression of the manganese superoxide dismutase gene in aggressive breast cancer cells

Marie Ennen [a,1], Vanessa Minig [a,1], Stéphanie Grandemange [a], Nadège Touche [a], Jean-Louis Merlin [a,b], Vanessa Besancenot [a], Emilie Brunner [a], Lionel Domenjoud [a], Philippe Becuwe [a,*]

[a] EA 4421 Signalisation, Génomique et Recherche Translationnelle en Oncologie, Faculté des Sciences, Université Henri Poincaré, Nancy-Université, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

[b] Unité de Biologie des Tumeurs, Centre Anticancéreux Régional Alexis Vautrin, Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 September 2010
Revised 4 March 2011
Accepted 8 March 2011
Available online 16 March 2011

Keywords:
Manganese superoxide dismutase
Breast cancer
Transcription
Sp1
NF-κB
Damaged DNA binding 2
Histone modifications
Free radicals

ABSTRACT

A high basal expression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) has been reported in aggressive breast cancer cells, according to an unknown mechanism, and contributes to their invasive abilities. Here, we report the involvement of Sp1 and nuclear factor-κB (NF-κB) transcription factors in this high basal expression of MnSOD in aggressive breast cancer cells. Suppression or inactivation of Sp1 showed that it plays an essential role in the high MnSOD expression in aggressive breast cancer cells through a unique binding site identified by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay and functional analysis of the MnSOD proximal promoter. Treatment of cells with a specific NF-κB inhibitor peptide decreased significantly high basal MnSOD expression. A ChIP assay showed binding of a constitutive p50/p65 NF-κB complex to the MnSOD intronic enhancer element, associated with hyperacetylation of the H3 histone. Finally, high basal expression of MnSOD resulted in the lack of expression of Damaged DNA binding 2 (DDB2) protein in aggressive breast cancer cells. DDB2 overexpression prevented the binding of Sp1 as well as of NF-κB to their respective elements on the MnSOD gene. These results contribute to a better understanding of MnSOD up-regulation, which may be clinically important in the prediction of breast tumor progression.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Manganese superoxide dismutase (MnSOD) is a mitochondrial enzyme that catalyzes the dismutation of superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$) into hydrogen peroxide (H_2O_2) and molecular oxygen (O_2). H_2O_2 is further converted to water by catalase, glutathione peroxidase, or peroxiredoxins [1]. MnSOD is encoded by a nuclear gene located on chromosome 6q25. This antioxidant enzyme is essential for the survival of aerobic organisms and plays an antiapoptotic role against oxidative stress, inflammatory cytokines, and ionizing radiation [2].

MnSOD also plays a role in the development of cancer, depending on its basal expression. Compared to normal cells, an altered expression of MnSOD has been reported in several types of cancer cell. Low MnSOD expression is correlated with a high rate of tumor cell growth, whereas high MnSOD content is associated with the invasive and metastatic abilities of tumor cells [3]. This alteration in MnSOD expression is often associated with that of H_2O_2-detoxifying enzymes, leading to an imbalance in the redox state by an increase in the level of reactive oxygen species [4,5]. This is the case for breast cancer cells, which display altered transcription of the MnSOD gene. Recently, we reported a high basal expression of MnSOD and decreased levels of H_2O_2-detoxifying enzymes in aggressive breast tumor MDA-MB231 and SKBR3 cell lines, compared with nonaggressive breast tumor MCF-7 and T47D cell lines. As a consequence, H_2O_2 from MnSOD activity was overproduced and played a role in the invasive ability of the aggressive breast tumor cells, particularly by activating matrix metalloprotease 9 [6].

We have shown recently that the low basal expression of MnSOD in nonaggressive breast tumor cells was dependent on the binding of Damaged DNA binding 2 (DDB2) protein to a specific and well-characterized DNA sequence that was associated with the recruitment of the repressor activator protein-2α transcription factor and hypoacetylation of H3 histones on the proximal promoter of the MnSOD gene [7,8]. DDB2 was originally known to play a role in nucleotide excision repair of UV-induced DNA damage when it is associated with DDB1 to form a UV–DDB complex [9]. However, the mechanism responsible for the high basal expression of MnSOD in aggressive breast tumor cells is not yet known.

It has been demonstrated previously that the Sp1 transcription factor plays an important role in the basal MnSOD expression in HepG2 cells through GC binding motifs in the proximal promoter [10]. In addition, Sp1 may interfere with the DNA-binding site of nuclear factor-κB (NF-κB), which is located into the second intron of the MnSOD gene and identified as a TNF-responsive element [11,12]. NF-κB is a transcription factor that is usually present in the cytosol as an inactive p50/p65 heterodimer bound to an inhibitory binding protein, IκBα.

* Corresponding author. Fax: +33 3 83 68 42 19.
E-mail address: becuwe@scbiol.uhp-nancy.fr (P. Becuwe).

[1] These authors contributed equally to this work.

0891-5849/$ – see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.013

However, this NF-κB has been shown to be constitutively activated in aggressive breast cancer cell lines [13]. Our hypothesis was that Sp1 and NF-κB could be involved in the high basal expression of MnSOD in aggressive breast cancer cells.

In this study, we report that both Sp1 and NF-κB, associated with histone hyperacetylation and the lack of DDB2 expression, are involved in the high basal expression of MnSOD in aggressive breast cancer cells.

Material and methods

Cell culture and treatments

Human breast cancer MDA-MB231, MCF-7, SKBR3, and T47D cell lines were cultured in RPMI 1640 medium, without phenol red (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 2 mM L-glutamine, and 5 μg/ml gentamicin at 37 °C in a water-saturated atmosphere with 5% CO_2, 95% air. Cells were seeded at 5×10^4 cells/ml and cultured for 72 h before treatment with 0.5 μM okadaic acid (Sigma Chemical Co.) for 6 h or with 50 μg/ml SN50 or SN50 control peptide (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) for 24 h.

Tumor material

Eighteen anonymous (20–30 mg) breast tumor samples were obtained from surgical pieces of infiltrating breast carcinomas taken from patients to make a diagnosis before appropriate treatment. According to the French bioethical law of 6 August 2004 (No. 2004–800), which was then completed by the law of 10 August 2007 (No. 2007–1220; NOR: ESRR 0757 103D), samples used for this retrospective study did not require written consent from patients. These samples were kept as frozen specimens in liquid nitrogen and then were certified as tumor material by morphological characterization by a senior pathologist.

RT-PCR analysis

Total RNA was isolated by TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and used for RT-PCR analysis. Two micrograms of total RNA were reverse-transcribed for 50 min at 42 °C in 20 μl of PCR buffer with 2.5 mM dNTPs, 5 μM random hexamer primers, 1.5 mM $MgCl_2$, and 200 U SuperScript II reverse transcriptase. Primer sequences (Invitrogen) and the expected product sizes of MnSOD, Cu/ZnSOD, Sp1, AP-2α, DDB2, and β-actin are detailed in Table 1. Annealing temperature was 55 °C for AP-2α and 58 °C for Sp1 and as described previously for the other genes. PCR analysis was carried out, as described previously [6,14]. Ethidium bromide-stained bands resulting from the amplification were visualized by UV transillumination and the fluorescence intensity was quantified using a Gel Doc 2000 system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Western blotting analysis

Total protein (50 μg) was run on SDS–polyacrylamide gels (10%) according to Laemmli [15] and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane as described previously [6], followed by immunoblot analysis using polyclonal anti-MnSOD (LabFrontier, Seoul, South Korea), anti-Sp1 (PEP2, sc-59; Santa Cruz Biotechnology), anti-AP-2α (A0844; Sigma), anti-Cu/ZnSOD (Biovalley, Marne-La-Vallée, France), anti-DDB2, and anti-β-tubulin (sc-25368 and sc-9104, respectively; Santa Cruz Biotechnology) antibodies at the optimized dilutions. Bands were detected using an IgG polyclonal antibody conjugated to peroxidase (Sigma), after exposure to a chemiluminescence substrate (Santa Cruz Biotechnology). The equal loading of the proteins was confirmed by Coomassie blue staining of blots.

Preparation of total and nuclear extracts

Human breast cancer cell lines were harvested and lysed in a 10 mM Tris/HCl buffer, pH 7.4, containing 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, and a protease inhibitor cocktail, at 4 °C for 20 min. After centrifugation at 17,000*g* for 20 min at 4 °C, the supernatant was collected as total protein extract. Nuclear extracts were prepared as described by Olnes and Kurl [16], without modification. Protein concentrations were determined in the total and nuclear extracts according to Lowry et al. [17] using bovine serum albumin as a standard (Bio-Rad).

Electrophoretic mobility-shift assay (EMSA) and supershift assay

Oligonucleotides with complementary sequences at their 3′ terminals corresponding to the binding sites for Sp1 and NF-κB (Table 1) were annealed and the protruding single-stranded regions were filled in with [α-^{32}P]dCTP using the Klenow fragment of DNA polymerase I (Euromedex, Strasbourg, France). The binding reaction mixture (10 μl) for EMSA, containing 1 ng of DNA probe, 1 of μg poly (dI–dC), and 5 μg of nuclear proteins in 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.4 mM dithiothreitol, and 2 mM $MgCl_2$, was incubated for 30 min at 0 °C. The DNA–protein complexes were resolved in native 5% polyacrylamide gels in 0.5× Tris–borate/EDTA at 100 V for 45 min. The dried gels were exposed to Trimax XM film overnight at −80 °C. To test the specificity of the binding, competition studies were performed in the presence of a 100-fold molar excess of unlabeled specific double-stranded oligonucleotide (corresponding to that of Sp1 for DNA binding of NF-κB and inversely), before the addition of 1 ng of the radiolabeled probe. To identify the proteins present in the complex, supershift assays were carried out with 2 μg of antibodies raised against Sp1, AP-2α, p50, or p65 (Santa Cruz Biotechnology, Cat. Nos. sc59X, sc12726X, sc109X, and sc7178, respectively). The antibodies were incubated 15 min at 0 °C with nuclear proteins before the addition of the specific labeled probe.

Table 1
Primers for RT-PCR and ChIP analysis.

Gene or regulatory sequence	Forward primer	Reverse primer	Size (bp)
Gene			
MnSOD	5′-CGACCTGCCCTACGACTAC-3′	5′-TGACCACCACCATTGAACTTC-3′	198
Cu/ZnSOD	5′-ACTTTCTTCATTTCCACCTTTGCC-3′	5′-GCGACGAAGGCCGTGTGCGTGC-3′	300
Sp1	5′-AGCAGGTGGAGAGGAAGG-3′	5′-CGCAGGTGAGAGGTCTTG-3′	200
AP-2α	5′-CTCCTCCACCTCCTCTCC-3′	5′-ATTATCCGTCAATTTCCAAAGC-3′	150
DDB2	5′-ACCAGTTTTACGCCTCCTCAATGG-3′	5′-TTTCCCTCTAACCTGGCGCAGGTC-3′	300
β-Actin	5′-GGCTCCGGCATGTGCAAGG-3′	5′-AGATTTTCTCCATGTCGTCC-3′	220
Regulatory sequence for ChIP			
Region I	5′-ACTCAAGTACGGCAGACAGGCAG-3′	5′-TTAAGAAAGCGCGGGGAGCAG-3′	232
Region II	5′-CTGCTCCCCGCGCTTTCTTAA-3′	5′-GCTGCTAGTGCTGGTGCTACCGCTGA-3′	199
Region III	5′-GGAAAAGGCCCCGTGATTT	5-TCCTGGTGTCAGATGTTGCC-3′	116

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

Chromatin isolation and enzymatic shearing were carried out using the ChIP-IT Express kit (Active Motif, Rixensart, Belgium) as described previously [8]. Prepared chromatin was then mixed with 2 μg of polyclonal antibodies specific to Sp1, p65 NF-κB (Santa Cruz Biotechnology; sc59X and sc109X, respectively), H3 histone methylated at lysine-4 (dimeH3K4), H3 histone acetylated at lysine-27 (AcH3K27), RNA polymerase II phosphorylated at serine-5 (RNA Pol II), and control immunoglobulin G (Active Motif). PCR was performed using primer pairs encompassing either the proximal promoter (regions I and II) or intron 2 (region III) in the MnSOD gene, which are listed in Table 1 and localized in Fig. 3. PCR was carried out in a final volume of 25 μl, containing 2.5 μl of PCR buffer, 15 μl of immunoprecipitated or 5 μl of not immunoprecipitated (input) chromatin, 0.4 μM specific forward and reverse primers, 0.25 mM each dNTP, 2.5 U of *Taq* polymerase, and water. The reaction mixture was incubated at 94 °C for 3 min for an initial denaturation and 40 cycles were performed with the following PCR program: denaturing at 94 °C for 45 s, annealing at 54 °C for 45 s for intron 2 and 59 °C for 45 s for proximal region 1 or 2, elongation at 72 °C for 45 s. Ten microliters of each PCR were subjected to electrophoresis on a 2% Tris–borate/EDTA agarose gel, and DNA bands were detected by ethidium bromide staining and by the Gel Doc 2000 system (Bio-Rad). PCR positive controls used GAPDH primers from a ChIP control kit (Active Motif) and generated a 166-bp product.

RNA interference

Predesigned double-stranded siRNA against human Sp1 was purchased from Eurogentec (Liège, Belgium) with the sequence 5′-CCAGCAACAUGGGAAUUAU-3′. As a negative control, a scrambled siRNA was obtained from Eurogentec. Transfection of siRNAs (50 nM) was performed as described previously [14].

Construction of luciferase reporter plasmids

All restriction enzymes were purchased by Promega (Charbonnières les Bains, France). The 5′-flanking region (from −3340 to +260 nucleotide residues) of the human *SOD2* gene ligated with the promoterless pGL3-basic vector (−3340pGL3) containing the firefly luciferase gene (Promega) was kindly provided by Dr. Moon B. Yim [18]. Different plasmids shown in Fig. 2A were constructed as described previously [8]. The −3340pGL3 plasmid was digested with the restriction enzymes *Bss*HII/*Pvu*II, *Kpn*I/*Stu*I, *Kpn*I/*Pst*I, or *Kpn*I/*Pvu*II to generate the Δ200pGL3, Δ2905pGL3, Δ3125pGL3, and Δ3270pGL3 plasmids, respectively. The noncohesive ends of the various linearized plasmids were then filled in using the Klenow fragment of DNA polymerase I, followed by ligation. As a control, the fragment from −3340 to −70 nucleotide residues, resulting from the previous *Kpn*I/*Pvu*II digestion of the 5′ flanking region of the *SOD2* gene, was purified and ligated in the SV40 promoter pGL3 vector (SV40pGL3) linearized with *Kpn*I and *Sma*I. The resulting plasmid was named Δ70SV40pGL3.

Transient transfection and luciferase assays

MCF-7 and MDA-MB231 cells were transiently transfected with the various luciferase reporter plasmids (1 μg), using JetPEI reagent (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France), according to the manufacturer's instructions, and harvested 24 h after transfection. As a control for transfection efficiency, the pSV40/β-Gal plasmid (0.1 μg) expressing β-galactosidase (Invitrogen) was used. The luciferase assays were performed using the luciferase reporter gene assay system (Roche, Meylan, France), and β-galactosidase activity was detected using a luminescent β-Gal detection assay (Roche). Relative luciferase activities were calculated by dividing by the activity found for β-Gal and expressed as means ± standard deviation (SD) from at least three independent experiments, each being performed in triplicate.

NF-κB transcriptional activity

To assess the transcriptional activity of NF-κB in MCF-7 and MDA-MB231 cells, we used a luciferase reporter plasmid driven either by the consensus DNA-binding site of NF-κB or by the one located in the second intron of the MnSOD gene, which were named pGL3/NF-κB-Luc (BD Biosciences, Le Pont-de-Chaix, France) and pGL3/TNFRE-Luc (a gift from Professor C. Abbadie and described in [19]), respectively. These plasmids were used for transient transfection experiments with pSV40/β-Gal for normalization, and relative luciferase activities were determined according to the experimental conditions described above.

Expression vector and stable transfection

The DDB2 pcDNA3(+) expression vector was constructed and used for stable transfection of MDA-MB231 cells, as described elsewhere [14].

Immunocytofluorescence

Breast tumor cells were cultured on glass slides for 5 days before confluence. The cells were rinsed twice with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature. Then the cells were blocked and permeabilized with PBS containing 2% bovine serum albumin/0.2% Triton X-100 and exposed to the primary polyclonal anti-p50 or anti-p65 NF-κB (Santa Cruz Biotechnology) antibodies diluted at 1:50 for 1 h at room temperature. After three washes in PBS, the cells were incubated with Alexa-conjugated anti-rabbit immunoglobulins, diluted at 1:100 in PBS containing bovine serum albumin and Triton X-100, for 1 h at room temperature. After three washes with PBS, the nuclei were stained with DAPI diluted at 1:1000 in PBS containing BSA and Triton X-100. The cells were then mounted in antifading medium (Fluorsafe; Merck, Darmstadt, Germany) and were observed with an epifluorescence microscope (Eclipse 80i) with a 40× objective equipped with a digital camera (Nikon) for image acquisition.

Statistical analysis

Statistical significance was assessed using analysis of variance and the Fisher protected least-significant difference test. Statistical significance is indicated as $p<0.05$. Statistical analysis for breast cancer samples from patients was performed using the Mann–Whitney test. Correlation between different gene expressions was performed with the Pearson correlation coefficient method. Differences were considered to be statistically significant at $p<0.05$.

Results

Sp1 plays a role in the basal expression of MnSOD in aggressive breast cancer cells

To investigate the involvement of Sp1 in the high basal expression of MnSOD, we verified if this transcription factor was expressed constitutively in our MDA-MB231 cells in comparison with MCF-7 cells. Our results show that Sp1 was expressed at the transcriptional and translational levels by RT-PCR and Western blot analyses, respectively, in MDA-MB231 as well as in MCF-7 cells. In contrast, the negative transcriptional regulators AP-2α and DDB2 were expressed only in MCF-7 cells (Figs. 1A and B). In addition, EMSA experiments show that Sp1 was activated constitutively in MDA-MB231 as well as in MCF-7 cells (Fig. 1C).

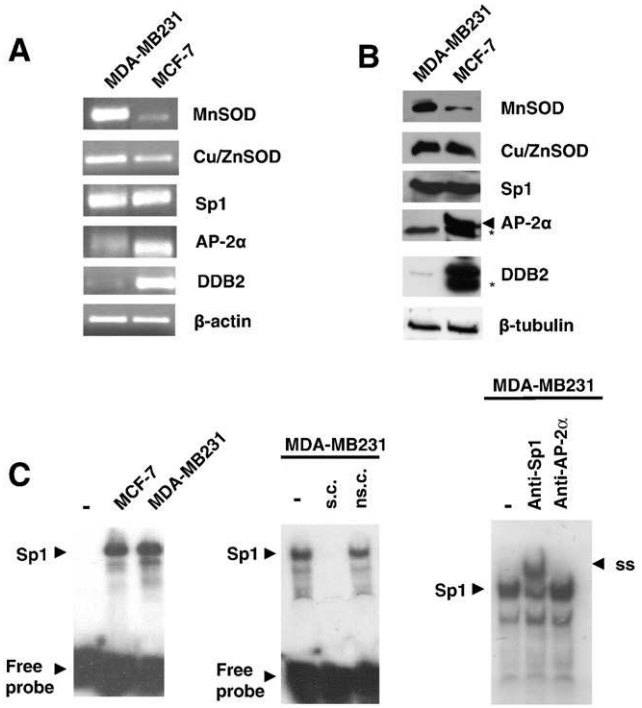


Fig. 1. Constitutive Sp1 levels in breast cancer MCF-7 and MDA-MB231 cell lines. (A) Total RNA was extracted from cells and then subjected to RT-PCR analysis. The β-actin mRNA level was used as an internal control. (B) Levels of Sp1 and other proteins were analyzed in the total proteins (50 μg) extracted from cells by Western blotting using specific polyclonal antibodies (*position of a nonspecific band). A β-tubulin control is shown for protein loading. (C) The DNA-binding activity of Sp1 was determined by EMSA using 5 μg of nuclear proteins from breast cancer cells and the ^{32}P-labeled oligonucleotide corresponding to the specific Sp1 consensus site. Competition was carried out with a 100-fold molar excess of the unlabeled DNA-binding site of Sp1 (s.c.) or with the nonspecific oligonucleotide corresponding to the NF-κB consensus site (ns.c.). Supershift experiments were made with nuclear proteins from cells incubated with 2 μg of antibodies raised against Sp1 or AP-2α before the addition of the specific ^{32}P-labeled oligonucleotide. The supershifted band is indicated by ss and the position of the free probe is not visualized. Each result shown is representative of three separate experiments.

We demonstrated the importance of Sp1 in the basal expression of MnSOD in MDA-MB231 cells. Inactivation of Sp1 by a treatment of MDA-MB231 cells for 6 h with 0.5 μM okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatase 2A, led to a strong decrease in MnSOD expression at the transcriptional and translational levels (Figs. 2A and B). The same results were obtained when the expression of Sp1 was depleted selectively using siRNA (Fig. 2C).

A unique Sp1 binding site is responsible for the basal MnSOD expression

We determined the binding of Sp1 to the proximal promoter of the MnSOD gene in vivo by ChIP assay using chromatin extracted from MDA-MB231 cells, anti-Sp1 polyclonal antibodies, and a primer set encompassing regions I and II (Fig. 3A). As we described already [8], Sp1 was bound to its DNA-binding site located in the proximal region II of the MnSOD gene only in MDA-MB231 cells and not in MCF-7 cells (Fig. 3B). To analyze the importance of the Sp1 binding to its DNA sequence on transcriptional activity of the MnSOD proximal promoter, we used the luciferase reporter gene system under the control of various promoter constructs of the MnSOD gene (Fig. 4B). MDA-MB231 cells transfected with the −3340pGL3 plasmid gave a luciferase activity corresponding to the 5′-flanking-region-dependent transcriptional activity of the MnSOD gene. However, the deletion of various regions shown in Fig. 4B did not reduce the transcriptional activity of the reporter gene, suggesting that the DNA-binding site of Sp1 located between −70 and +1 (Fig. 4A) was sufficient for the transcriptional

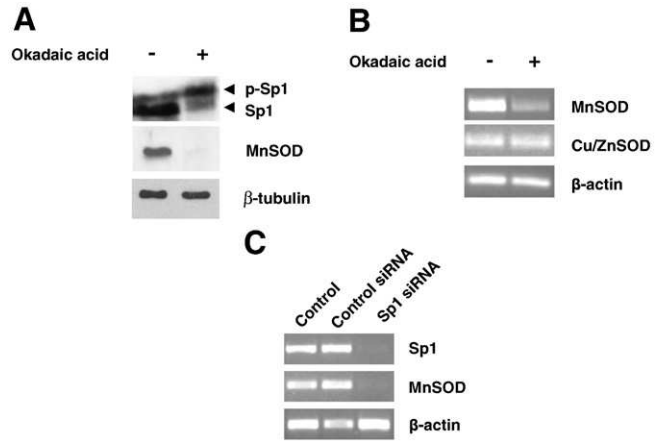


Fig. 2. Effect of Sp1 inhibitor or siRNA on basal MnSOD expression in MDA-MB231 cells. (A) Western blot analyses of Sp1, phosphorylated Sp1 (p-Sp1), and MnSOD levels were performed using total proteins (50 μg) from MDA-MB231 cells treated or not with 0.5 μM okadaic acid for 6 h. A β-tubulin control is shown for protein loading. (B) Total RNAs were isolated from MDA-MB231 cells treated with okadaic acid and then subjected to RT-PCR analysis. The relative MnSOD and Cu/ZnSOD mRNAs were normalized to β-actin mRNA. (C) MDA-MB231 cells were transfected transiently with 50 nM Sp1 siRNA or control siRNA for 24 h and the total RNAs isolated were subjected to RT-PCR analysis. Relative Sp1 and MnSOD mRNAs were normalized to β-actin mRNA. Each result shown is representative of three separate experiments.

activity of the MnSOD proximal promoter. This result was confirmed by the deletion of the 70-bp region containing the DNA-binding site of Sp1 (construct Δ70SV40pGL3), which abolished the transcriptional activity of the proximal promoter of the MnSOD gene.

NF-κB plays a role in the basal expression of MnSOD in aggressive breast cancer cells

To investigate the involvement of NF-κB in the high basal expression of MnSOD, we verified if this transcription factor was constitutively activated in our MDA-MB231 cells in comparison with

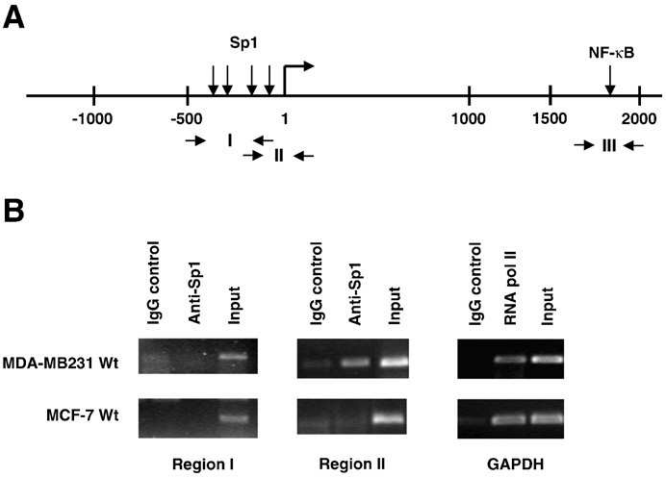


Fig. 3. Association of Sp1 with MnSOD proximal promoter in MDA-MB231 cells. (A) The primers used to detect in vivo interaction of proteins with the MnSOD promoter are indicated by horizontal arrows and encompass three regions (I, II, and III). Positions of binding sites of transcription factors are indicated by vertical arrows. (B) The binding of Sp1 to the promoter of the MnSOD gene was evaluated in vivo by ChIP assay in MDA-MB231 and MCF-7 cells, as described under Material and methods. Chromatin was immunoprecipitated by Sp1, RNA Pol II, or control IgG antibodies. The immunoprecipitated chromatin was analyzed by PCR using primers targeting the Sp1 in the proximal promoter (regions I and II). Primers for the GAPDH promoter were used as a positive control. Input represents a portion of the enzymatically sheared chromatin before immunoprecipitation. Each result shown is representative of three separate experiments.

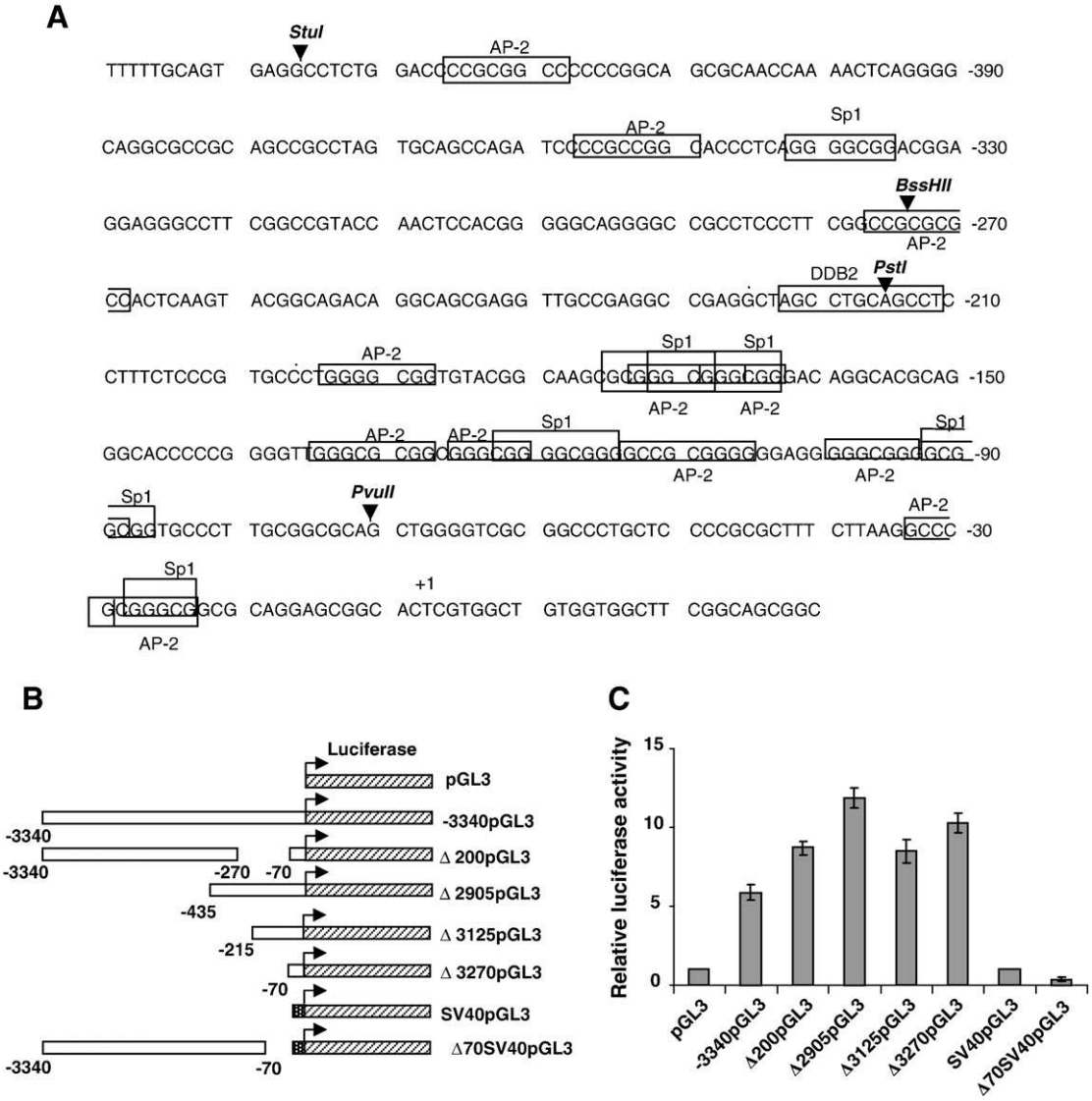


Fig. 4. Importance of the 5′ flanking region containing the Sp1-binding sites on the basal expression of the MnSOD gene in MDA-MB231 cells. (A) DNA sequence of the human proximal promoter of the MnSOD gene and the locations of the Sp1-, AP-2α-, and DDB2-binding sites are shown. The sequence numbers are relative to the transcription initiation site (+1). Restriction enzyme recognition sites used in this study are marked. (B) Schematic representation of the deletion series in the promoter region of the MnSOD gene relative to the full construct −3340pGL3 upstream of the luciferase reporter gene. (C) Wild-type MDA-MB231 cells were transfected transiently with luciferase reporter gene under the control of the various deletions in the promoter region of MnSOD gene. After 24 h of transfection, cells were lysed and relative luciferase activities were measured and corresponded to the MnSOD gene transcription depending on the 5′ flanking region. Relative luciferase activities are the means ± SD from three independent experiments done in triplicate.

MCF-7 cells. By EMSA, we show that the DNA-binding activity of the NF-κB complex was higher in MDA-MB231 cells than in MCF-7 cells (Fig. 5A, left). The nature of the activated complex in MDA-MB231 cells was determined as a heterodimeric p50/p65 by supershift experiment (Fig. 5A, right). These results were confirmed by immunofluorescence. Whereas p50 was localized in the nuclei of both breast cancer cell lines, p65 was translocated into the nuclei only in MDA-MB231 cells (Fig. 5B). The evidence that the high basal MnSOD expression was associated with a high constitutive NF-κB activation and inversely correlated with the DDB2 expression was confirmed in the second aggressive breast cancer SKBR3 cell line, compared to the nonaggressive T47D cell line (see Supplementary Fig. S1). In addition, transcriptional activity of NF-κB was evaluated using a reporter gene driven by either the consensus NF-κB-binding element (pGL3/NF-κB-Luc) or an enhancer element in the second intron of the MnSOD gene (pGL3/TNFRE-Luc). Transcriptional activity of NF-κB was 6.9- and 30.7-fold higher in MDA-MB231 than in MCF-7 cells using the pGL3/NF-κB-Luc and pGL3/TNFRE-Luc reporter genes, respectively (Figs. 5C and D).

The importance of NF-κB activity in the basal expression of MnSOD was assessed by treatment of MDA-MB231 cells with the cell-permeative peptide SN50, which inhibits nuclear translocation of the NF-κB complex [20]. The efficacy of our treatment with 50 μg/ml SN50 for 24 h was first evaluated by evaluating the p65 NF-κB nuclear translocation and by measuring the transcriptional activity of NF-κB after transient transfection of cells with pGL3/TNFRE-Luc. We observed by immunofluorescence that the nuclear translocation of p65 NF-κB was blocked in SN50-treated MDA-MB231 cells in contrast to the cells treated with SN50 control peptide (Fig. 6A). In consequence, the relative luciferase activity in SN50-treated MDA-MB231 cells was decreased threefold in contrast to cells treated with the SN50 control peptide. No significant differences were observed between cells treated with the control peptide and untreated cells (Fig. 6B). As shown in Fig. 6C, treatment with the SN50 peptide decreased highly the MnSOD mRNA

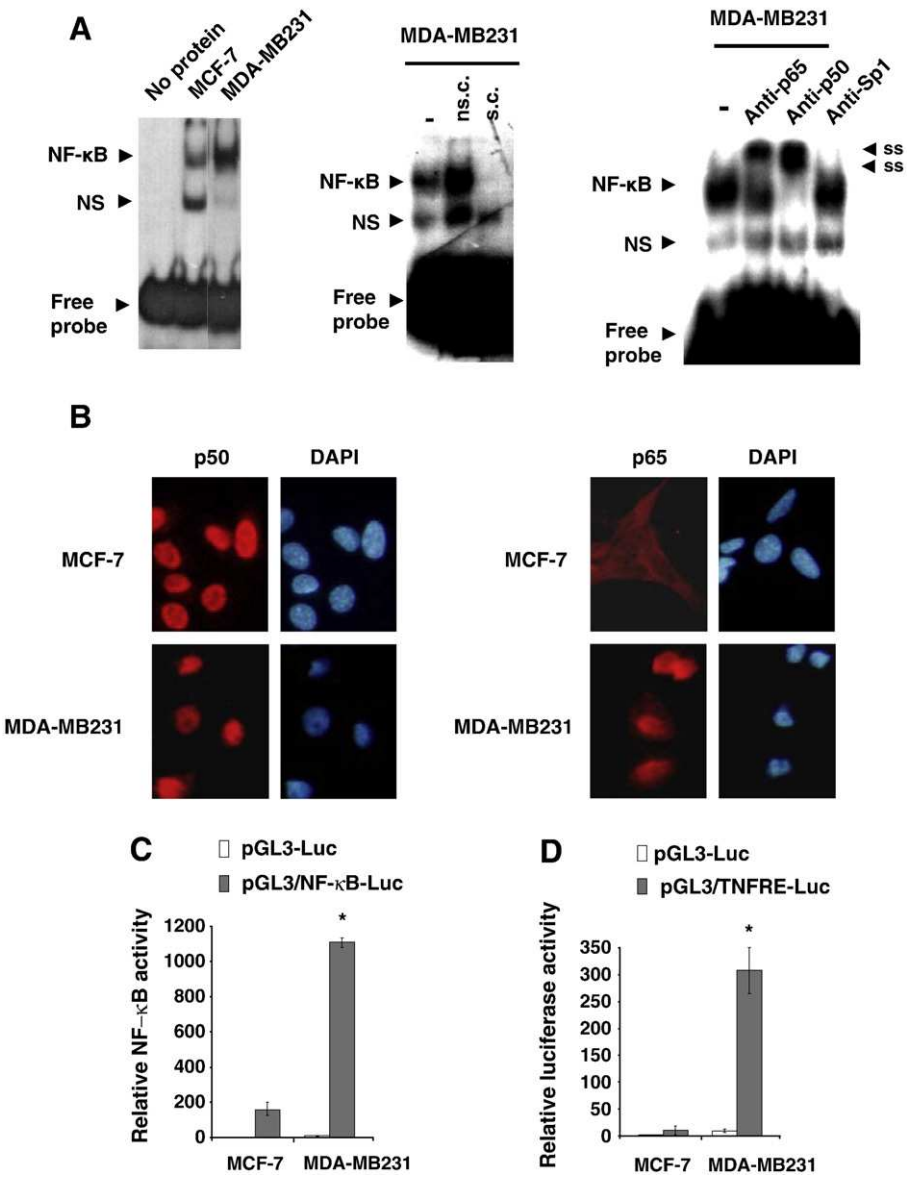


Fig. 5. Constitutive activation of NF-κB in breast cancer MCF-7 and MDA-MB231 cell lines. (A) DNA-binding activity of NF-κB was determined by EMSA using 5 μg of nuclear proteins from breast cancer cells and the ^{32}P-labeled oligonucleotide corresponding to the specific NF-κB consensus site. Competition was carried out with a 100-fold molar excess of the unlabeled DNA-binding site of NF-κB (s.c.) or with the nonspecific oligonucleotide corresponding to the Sp1 consensus site (ns.c.). Supershift experiments were made with nuclear proteins from cells incubated with 2 μg of antibodies raised against p50, p65, or Sp1 before the addition of the specific ^{32}P-labeled oligonucleotide. The supershifted bands are indicated by ss. Nonspecific complex is indicated by NS. (B) NF-κB activation was studied by following the nuclear translocation of p50 and p65 by immunocytofluorescence using polyclonal antibodies. DAPI was used for nuclear staining. (C and D) Transcriptional activity of NF-κB was measured in MCF-7 and MDA-MB231 cells by luciferase assay following transient transfection with either pGL3/NF-κB-Luc or pGL3/TNFRE-Luc for 24 h in the presence of pSV40/β-Gal for normalization. Results from three independent experiments done in triplicate are means ± SD of luciferase activity normalized to β-galactosidase activity and indicated as relative NF-κB activity or relative luciferase activity. $^{*}p<0.05$, significant difference between MDA-MB231 cells and MCF-7 cells. Each result shown in (A) and (B) is representative of three separate experiments.

level in MDA-MB231 cells in contrast to the SN50 control peptide, suggesting involvement of NF-κB in the basal transcription of the MnSOD gene.

The enhancer element of intron 2 is the NF-κB binding site involved in the basal MnSOD expression

We demonstrated that the involvement of NF-κB in the basal expression of the MnSOD gene was associated with the binding of the transcription factor associated with H3 histone modifications to the enhancer element in intron 2 of the gene in MDA-MB231 cells. Using a ChIP assay with chromatin from MDA-MB231 and MCF-7 cells, the appropriate antibodies, and the primer set encompassing region III (Fig. 3A), we detected a binding of NF-κB to its specific motif located in the second intron in MDA-MB231 cells, but very weakly in MCF-7 cells. Whereas dimeH3K4 was bound to the enhancer element of the MnSOD intron 2, regardless of which breast cancer cells were used, AcH3K27 was detected at the MnSOD intron 2 only in MDA-MB231 cells (Fig. 7).

The high basal MnSOD expression is associated with a lack of DDB2 expression

As shown in Fig. 1 and in Supplementary Fig. S1, expression of DDB2 was inversely correlated with MnSOD expression in breast tumor cell lines. We examined the expression level of DDB2 and MnSOD in breast cancer samples from 18 patients (Fig. 8). In concordance with the results

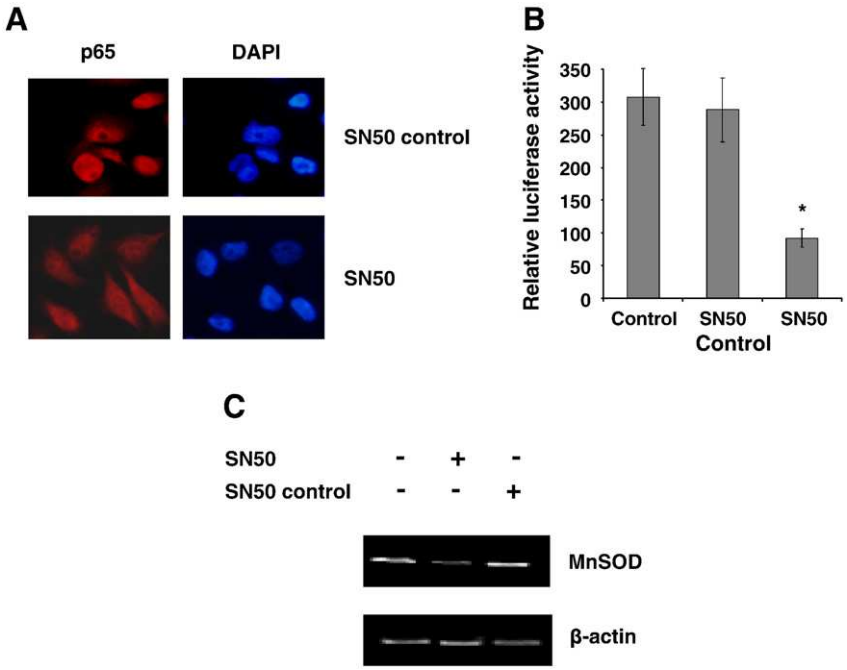


Fig. 6. Effect of a specific inhibitor of NF-κB nuclear translocation on basal MnSOD expression in MDA-MB231 cells. (A) Cells were treated with 50 μg/ml SN50 or control peptide for 24 h and the consequence on NF-κB activation was studied by following the nuclear translocation of p65 by immunocytofluorescence using polyclonal antibodies. DAPI was used for nuclei staining. (B) Cells were treated with 50 μg/ml SN50 or control peptide for 24 h before their transfection with pGL3/TNFRE-Luc for 24 h in the presence of pSV40/β-Gal for normalization. Transcriptional activity of NF-κB was then measured in cells by luciferase assay. Results from three independent experiments done in triplicate are means ± SD of luciferase activity normalized to β-galactosidase activity and indicated as relative luciferase activity. $^{*}p<0.05$, significant difference between MDA-MB231 cells untreated or treated with control peptide and SN50 peptide. (C) Total RNAs were isolated from MDA-MB231 cells treated with 50 μg/ml SN50 or control peptide for 24 h and then subjected to RT-PCR analysis. The relative MnSOD mRNAs were normalized to β-actin mRNA. The result shown is representative of three separate experiments.

from the breast cancer cell lines, the relative DDB2 mRNA level was inversely correlated with the MnSOD mRNA level ($p=0.001$).

As described previously, the high basal level of MnSOD was strongly decreased in DDB2-overexpressing MDA-MD231 cells (Figs. 9A and B), because DDB2 protein prevented the binding of Sp1 to the MnSOD proximal promoter with a decrease in the level of acetylated H3 histones [8]. In addition, we report here by ChIP assay a decrease in NF-κB binding to the enhancer element of the MnSOD intron 2 in DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells, without a decrease in the acetylated or methylated H3 histones (Fig. 9C).

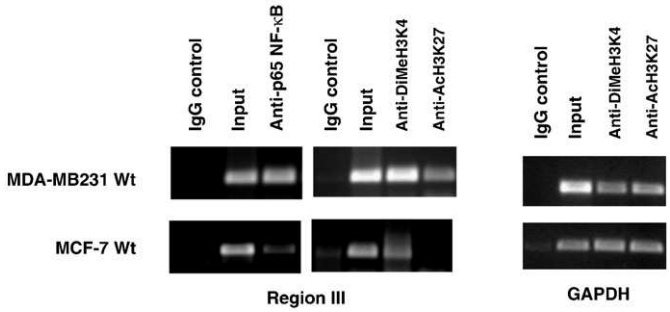


Fig. 7. Association of NF-κB with the enhancer element of the second intron of MnSOD gene in MDA-MB231 cells. The binding of the transcription factor to the enhancer element of the MnSOD gene was evaluated in vivo by ChIP assay in MDA-MB231 and MCF-7 cells, as described under Material and methods. Chromatin was immunoprecipitated by p65 NF-κB, dimeH3K4, AcH3K27, or control IgG antibodies. The immunoprecipitated chromatin was analyzed by PCR using primers targeting the NF-κB binding site in the enhancer element of intron 2 (region III in Fig. 3A). Primers of the GAPDH promoter were used as a positive control. Input represents a portion of the enzymatically sheared chromatin before immunoprecipitation. Each result shown is representative of three separate experiments.

Discussion

Altered expression of MnSOD, compared to normal cells, has been found in many cancer cells, including breast cancer cell lines [21]. We described previously a distinct basal expression of the MnSOD gene between nonaggressive and aggressive breast cancer cells. Nonaggressive breast cancer cells had a low basal expression of MnSOD, which was associated with a high proliferation rate. Aggressive cells had a high basal expression of MnSOD, which was involved in the invasive ability and metastatic properties of aggressive breast cancer cells [6]. It has been reported by us and by others that the low level of MnSOD in breast cancer cells could be attributed to either epigenetic mechanisms [22] or the binding of negative regulators such as DDB2 and AP-2α to the proximal promoter of the gene [8]. However, the

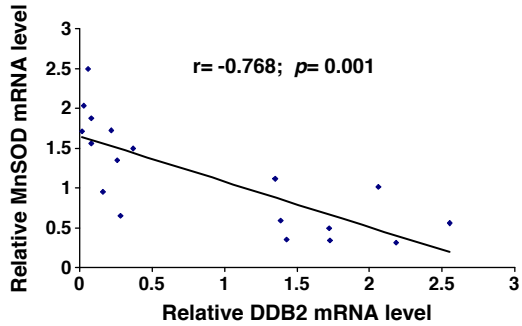


Fig. 8. MnSOD and DDB2 expression in human breast tumors from patients. Total RNA was extracted from 18 breast cancer samples and then subjected to semiquantitative RT-PCR analysis. The relative levels of MnSOD and DDB2 mRNAs were normalized to those of β-actin mRNA. Correlation between relative MnSOD and DDB2 mRNA levels was performed with the Pearson correlation coefficient method. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.

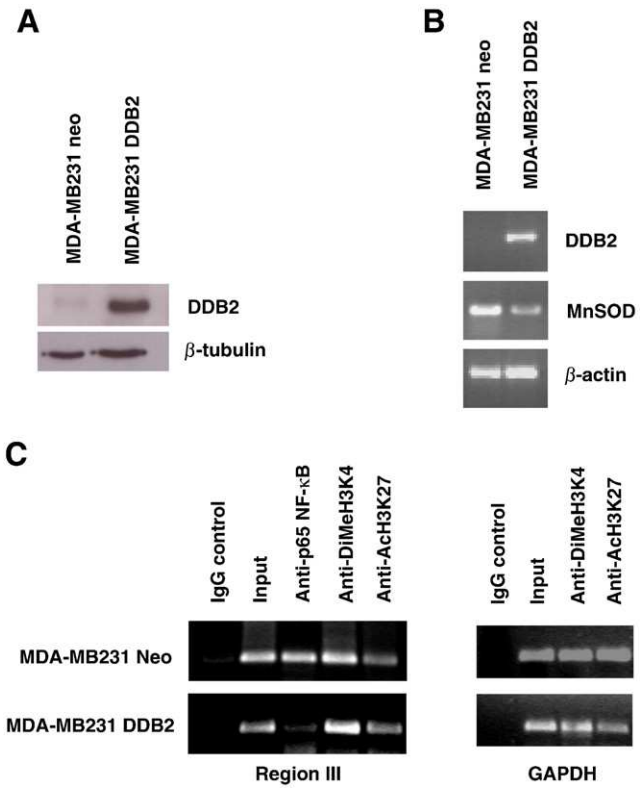


Fig. 9. Influence of DDB2 on NF-κB binding and modifications of H3 histones to the enhancer element of the MnSOD intron 2. (A) MDA-MB231 cells were transfected stably with a vector driving the overexpression of DDB2 (MDA-MB231 DDB2) or with the empty vector only (MDA-MB231 Neo). Overexpression of DDB2 was verified by Western blot analysis. (B) Expression of MnSOD was verified by RT-PCR analysis in DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells. (C) Chromatin from MDA-MB231 Neo and DDB2 cells was immunoprecipitated by p65 NF-κB, dimeH3K4, AcH3K27, or control IgG antibodies. The immunoprecipitated chromatin was analyzed by PCR using primers targeting the NF-κB binding site in the enhancer element of intron 2 and primers of the GAPDH promoter as a positive control. Input represents a portion of the enzymatically sheared chromatin before immunoprecipitation. Each result shown is representative of three separate experiments.

mechanism leading to the high basal expression of MnSOD in aggressive breast cancer cells remains largely unknown as yet.

This study reports the involvement of Sp1 transcription factor in the high basal transcription of MnSOD. Others have already demonstrated that Sp1 is essential for basal and inducible transcription of the MnSOD gene by interacting with its specific binding sites in the 5′ flanking region [10]. In the present study, inhibition of Sp1 expression using siRNA led to a decrease in the basal transcription of MnSOD. The same results were obtained with okadaic acid, which inhibits Sp1 transcriptional activity by inhibiting the protein phosphatase 2A. It has been shown that this up-regulates Sp1 transcriptional activity by maintaining the transcription factor in a dephosphorylated form [23]. We could identify that only the binding site of Sp1 close to the start site of transcription was sufficient for the activity of the MnSOD proximal promoter. This is related to previous work showing that Sp1 activated transcription of its target genes by directly interacting with RNA polymerase II [24].

We demonstrated that the high basal transcription of the MnSOD gene was dependent also on an active NF-κB complex. This is activated constitutively in MDA-MB231 cells, as well as other aggressive breast cancer cell lines, by an unknown mechanism. Moreover, this transcription factor is thought to be involved in invasion and metastasis in breast cancers [13]. The involvement of the p50/p65 NF-κB complex in the high basal level of MnSOD was dependent on binding to its enhancer element located on intron 2. This element has been well characterized previously and is known to be essential for induction of the MnSOD gene by inflammatory cytokines [25]. Several other putative NF-κB-binding sites have been identified in the 5′ flanking region of the MnSOD gene [26]. However, deletions of these binding sites by our functional analysis of the 5′ flanking region did not change MnSOD promoter activity. This result suggests that the basal expression of MnSOD is not mediated by the putative NF-κB binding sites located in the 5′ flanking region of the MnSOD gene in MDA-MB231 cells.

Posttranslational modification of histones such as acetylation has been associated with the transcription of genes. Hyperacetylation of H3 histones correlates with gene transcription, whereas their hypoacetylation is associated with gene silencing and heterochromatin structures. Previously, we reported that H3 histones were hyperacetylated and hypermethylated when Sp1 was bound to its sequence close to the start site of transcription in MDA-MB231 cells [8]. Binding of NF-κB to its intronic enhancer element was associated with hyperacetylation of H3 histones. This is in accordance with a previous study showing that NF-κB binding was required for H3 histone acetylation during the induction of the MnSOD gene in response to TNF-α [27].

In addition to the involvement of Sp1 and NF-κB in the high basal expression of the MnSOD gene in MDA-MB231 cells, the lack of expression of negative regulators such as DDB2 and AP-2α may contribute to the high basal gene transcription of the antioxidant enzyme. AP-2α has been involved in the decrease in constitutive transcription of the MnSOD gene as well, in normal and some cancer cell lines [7]. In addition, we identified the importance of DDB2 in the regulation of constitutive MnSOD expression between nonmetastatic and metastatic breast cancer cells. We demonstrated that the low basal expression of MnSOD in MCF-7 cells was dependent on the binding of the DDB2 protein to a specific and well-characterized DNA sequence, which was associated with the recruitment of the repressor AP-2α but not Sp1 transcription factor and with a hypoacetylation of H3 histones at the proximal promoter of the MnSOD gene. The absence of DDB2 as well as AP-2α expression in MDA-MB231 cells allowed the binding of Sp1 and an increase in the acetylation of H3 histones to the proximal MnSOD promoter [8]. Moreover, overexpression of DDB2 in transfected MDA-MB231 cells decreased NF-κB binding but not acetylation of H3 histones to the intronic enhancer element. In contrast, overexpression of DDB2 in MCF-7 cells was associated with low constitutive activity of NF-κB as well as hypoacetylation of H3 histones at the intronic enhancer element, as already shown by others [28]. It cannot be excluded that DDB2 may influence the binding of NF-κB by preventing the binding of Sp1. It has been described recently that the interaction between Sp1 and the NF-κB complex involves an RNA-binding protein to regulate MnSOD expression [29].

An inverse correlation between DDB2 and MnSOD expression has been observed in breast cancer cell lines as well as in tumor samples from patients. Even if DDB2 has been shown to be involved in the low basal expression of MnSOD gene, we did not exclude the possibility that the high level of this antioxidant enzyme may influence the DDB2 expression. However, we did not observe a change in the DDB2 expression in MnSOD-overexpressing MCF-7 cells (see Supplementary Fig. S3), suggesting the existence of another mechanism explaining the absence of DDB2 expression in MDA-MB231 cells and which will need to be defined precisely.

Our results suggest that in the absence of DDB2 expression, constitutive NF-κB and Sp1 activities are required for high basal MnSOD expression. Taken together, these results help us to understand better how breast cancer cells may express MnSOD differently and what the associated biological consequences are. It has been reported that the low MnSOD levels in nonaggressive breast cancer cells lead to an accumulation of intracellular $O_2^{\bullet-}$ radicals, which act as second-messenger molecules promoting cancer cell proliferation [5]. In contrast, high MnSOD levels in aggressive breast cancer cells lead to an accumulation of hydrogen peroxide, which plays a role in the invasive abilities of tumor cells, by activating matrix metalloprotease 9

in particular [6]. Furthermore, the distinct constitutive expression of MnSOD as well as DDB2, and understanding of the molecular mechanisms involved in the up-regulation of the MnSOD gene, may very well be of important clinical interest in predicting tumor progression and treatment in breast cancer.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.013.

Acknowledgments

The authors are grateful to Professor C. Abbadie for the gift of pGL3/TNFRE-Luc plasmid and to Professor S. Thornton for critical reading of the manuscript and to A.S. Chretien for statistical analyses. This work was supported by grants from the Ligue contre le Cancer (Comités Meuse and Meurthe et Moselle), the Université Henri Poincaré–Nancy Université, and Région Lorraine. M. Ennen and V. Minig have fellowships from the French Research Ministry and the Ligue contre le Cancer (Comité de Meurthe et Moselle), respectively.

References

[1] Matés, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* **153:**83–104; 2000.
[2] Miao, L.; St Clair, D. K. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic. Biol. Med.* **47:**344–356; 2009.
[3] Nelson, K. K.; Ranganathan, A. C.; Mansouri, J.; Rodriguez, A. M.; Providence, K. M.; Rutter, J. L.; Pumiglia, K.; Bennett, J. A.; Melendez, J. A. Elevated sod2 activity augments matrix metalloproteinase expression: evidence for the involvement of endogenous hydrogen peroxide in regulating metastasis. *Clin. Cancer Res.* **9:** 424–432; 2003.
[4] Kiningham, K. K.; St Clair, D. K. Overexpression of manganese superoxide dismutase selectively modulates the activity of Jun-associated transcription factors in fibrosarcoma cells. *Cancer Res.* **57:**5265–5271; 1997.
[5] Ridnour, L. A.; Oberley, T. D.; Oberley, L. W. Tumor suppressive effects of MnSOD overexpression may involve imbalance in peroxide generation versus peroxide removal. *Antioxid. Redox Signal.* **6:**501–512; 2004.
[6] Kattan, Z.; Minig, V.; Leroy, P.; Dauça, M.; Becuwe, P. Role of manganese superoxide dismutase on growth and invasive properties of human estrogen-independent breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **108:**203–215; 2008.
[7] Zhu, C.; Huang, Y.; Weydert, C. J.; Oberley, L. W.; Domann, F. E. Constitutive activation of transcription factor AP-2 is associated with decreased MnSOD expression in transformed human lung fibroblasts. *Antioxid. Redox Signal.* **3:** 387–395; 2001.
[8] Minig, V.; Kattan, Z.; van Beeumen, J.; Brunner, E.; Becuwe, P. Identification of DDB2 protein as a transcriptional regulator of constitutive SOD2 gene expression in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **284:**14165–14176; 2009.
[9] Tang, J.; Chu, G. Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein. *DNA Repair* **1:**601–616; 2002.
[10] Xu, Y.; Porntadavity, S.; St Clair, D. K. Transcriptional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene: the role of the specificity protein 1 (Sp1) and activating protein-2 (AP-2). *Biochem. J.* **362:**401–412; 2002.
[11] Jones, P. L.; Ping, D.; Boss, J. M. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1b regulate the murine manganese superoxide dismutase gene through a complex intronic enhancer involving C/EBP-β and NF-κB. *Mol. Cell. Biol.* **17:**6970–6981; 1997.
[12] Hirano, F.; Tanaka, H.; Hirano, Y.; Hiramoto, M.; Handa, H.; Makino, I.; Scheidereit, C. Functional interference of Sp1 and NF-kappaB through the same DNA binding site. *Mol. Cell. Biol.* **18:**1266–1274; 1998.
[13] Yamaguchi, N.; Ito, T.; Azuma, S.; Ito, E.; Honma, R.; Yanagisawa, Y.; Nishikawa, A.; Kawamura, M.; Imai, J.; Watanabe, S.; Semba, K.; Inoue, J. Constitutive activation of nuclear factor-kappaB is preferentially involved in the proliferation of basal-like subtype breast cancer cell lines. *Cancer Sci.* **100:**1668–1674; 2009.
[14] Kattan, Z.; Marchal, S.; Brunner, E.; Ramacci, C.; Leroux, A.; Merlin, J. L.; Domenjoud, L.; Dauça, M.; Becuwe, P. Damaged DNA binding protein 2 plays a role in breast cancer cell growth. *PLoS ONE* **3:**e2002; 2008.
[15] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227:**680–685; 1970.
[16] Olnes, M. I.; Kurl, R. N. Isolation of nuclear extracts from fragile cells: a simplified procedure applied to thymocytes. *Biotechniques* **17:**828–829; 1994.
[17] Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193:**265–275; 1951.
[18] Kim, H. P.; Roe, J. H.; Chock, P. B.; Yim, M. B. Transcriptional activation of the human manganese superoxide dismutase gene mediated by tetradecanoylphorbol acetate. *J. Biol. Chem.* **274:**37455–37460; 1999.
[19] Bernard, D.; Quatannens, B.; Begue, A.; Vandenbunder, B.; Abbadie, C. Anti-proliferative and antiapoptotic effects of c-rel may occur within the same cells via the up-regulation of manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* **61:** 2656–2664; 2001.
[20] Lin, Y. Z.; Yao, S.; Veach, R. A.; Torgerson, T. R.; Hawiger, J. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-κB by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J. Biol. Chem.* **270:** 14255–14258; 1995.
[21] Nelson, K. K.; Melendez, J. A. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic. Biol. Med.* **37:**768–784; 2004.
[22] Hitchler, M. J.; Wikainapakul, K.; Yu, L.; Powers, K.; Attatippaholkun, W.; Domann, F. E. Epigenetic regulation of manganese superoxide dismutase expression in human breast cancer cells. *Epigenetics* **1:**163–171; 2006.
[23] Lacroix, I.; Lipcey, C.; Imbert, J.; Kahn-Perlès, B. Sp1 transcriptional activity is up-regulated by phosphatase 2A in dividing T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **277:** 9598–9605; 2002.
[24] Dynan, W. S.; Tjian, R. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* **35:**79–87; 1983.
[25] Xu, Y.; Kiningham, K. K.; Devalaraja, M. N.; Yeh, C. C.; Majima, H.; Kasarskis, E. J.; St Clair, D. K. An intronic NF-kappaB element is essential for induction of the human manganese superoxide dismutase gene by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. *DNA Cell Biol.* **18:**709–722; 1999.
[26] Wan, X. S.; Devalaraja, M. N.; St Clair, D. K. Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol.* **13:**1127–1136; 1994.
[27] Guo, Z.; Boekhoudt, G. H.; Boss, J. M. Role of the intronic enhancer in tumor necrosis factor-mediated induction of manganous superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **278:**23570–23578; 2003.
[28] Hitchler, M. J.; Oberley, L. W.; Domann, F. E. Epigenetic silencing of SOD2 by histone modifications in human breast cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* **45:** 1573–1580; 2008.
[29] Xu, Y.; Fang, F.; Dhar, S. K.; St Clair, W. H.; Kasarskis, E. J.; St Clair, D. K. The role of a single-stranded nucleotide loop in transcriptional regulation of the human *sod2* gene. *J. Biol. Chem.* **282:**15981–15994; 2007.

3. Conclusions

L'ensemble de ces résultats permettent de mieux comprendre comment est régulé le gène codant la SOD Mn dans les cellules tumorales mammaires hautement invasives. Il souligne l'importance de DDB2 dans cette régulation. En son absence, les activités de NF-κB et Sp1, agissent conjointement sur leur séquence régulatrice de fixation respective pour induire l'expression du gène de la SOD Mn. Par contre, la présence de DDB2 diminue l'expression de la SOD Mn, non seulement, en empêchant la fixation de Sp1 sur son élément de réponse au niveau du promoteur proximal du gène codant cette enzyme anti-oxydante, mais aussi en diminuant l'activité de NF-κB, comme nous l'avons décrit dans la partie I des résultats. La caractérisation des mécanismes de régulation de l'expression constitutive de la SOD Mn permet ainsi de mieux comprendre l'implication de cette enzyme anti-oxydante dans la croissance des cellules tumorales mammaires.

CHAPITRE 4

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION

Il avait été observé antérieurement que DDB2 est très faiblement, voire pas exprimée dans les cellules tumorales mammaires hautement métastatiques (Kattan *et al*., 2008a). De plus, elle exerce une régulation négative sur l'expression du gène codant la SOD Mn, que le laboratoire avait décrit précédemment pour son rôle dans les capacités invasives de ces cellules (Kattan *et al.*, 2008b). De ces observations préliminaires, nous avons entrepris de montrer clairement et pour la 1ère fois si la protéine DDB2 joue un rôle dans les capacités invasives et migratrices des cellules tumorales mammaires et par quel mécanisme moléculaire.

I. DDB2, INVASION TUMORALE MAMMAIRE ET REGULATION DE GENES CIBLES

1. DDB2 et invasion tumorale mammaire

Notre travail a montré pour la 1ère fois que DDB2 réduit fortement les capacités migratrices et invasives des cellules tumorales mammaires hautement métastatiques (MDA-MB231 et SKBR3), lorsqu'elles surexpriment cette protéine. Les cellules MDA-MB231 et SKBR3 parentales sont décrites pour exprimer très faiblement la protéine DDB2, sont ER négatives, prolifèrent lentement *in vitro*, mais ont des propriétés invasives élevées. Les cellules SKBR3 se distinguent des MDA-MB231 par leur expression de HER2, le co-récepteur de l'EGF-R, qui participent tous deux aux propriétés invasives par la voie de signalisation intracellulaire correspondante qu'ils déclenchent en présence de l'EGF. Nous avons observé que la surexpression de DDB2 réduit plus fortement les capacités invasives *in vitro* des cellules SKBR3 que les MDA-MB231, lorsque l'EGF est ajouté dans leur milieu de culture. Ces observations suggèrent que DDB2 interfèrerait avec la voie de signalisation intracellulaire, déclenchée par l'EGF sur ces récepteurs, se traduisant par une influence plus prononcée sur les capacités migratrices et invasives.

Nos résultats montrent également que la surexpression de DDB2 entraîne une diminution des capacités des cellules tumorales métastatiques qui la surexpriment, à envahir de façon privilégiée, le parenchyme pulmonaire chez les souris xénogreffées et d'y développer des métastases, comme il est décrit dans la littérature (Muller *et al*., 2001). Cette réduction des capacités des cellules tumorales surexprimant DDB2, à envahir le tissu pulmonaire s'accentue après 3 xénogreffes successives chez la souris, démontrant ainsi la stabilité de l'effet négatif de DDB2 dans le temps.

Dans ce travail, nous avons montré que l'effet négatif de DDB2 sur les capacités invasives des cellules tumorales mammaires hautement métastatiques (MDA-MB231 et SKBR3) est associé à une réduction très significative de la sécrétion de MMP-9, mais pas de la MMP-2, dans le milieu extracellulaire. La MMP-9 est une gélatinase qui intervient très tôt dans les capacités invasives des cellules tumorales qui la sécrètent, en digérant le collagène de type IV de la lame basale pour favoriser l'envahissement du stroma. Par la suite, cette MMP intervient dans le remaniement de la matrice extracellulaire du stroma, nécessaire à la migration des cellules tumorales mammaires, puis dans le développement des métastases (Wyatt *et al*., 2005 ; Rose et Siegel., 2006 ; Min *et al*., 2008). Dans des échantillons cliniques, son expression est d'ailleurs souvent corrélée à un grade avancé des tumeurs mammaires provenant de patientes (Vizoso *et al*., 2007). En parallèle, l'analyse d'un second marqueur d'origine mésenchymateuse, tel que la vimentine, dont l'expression est diminuée lorsque la protéine DDB2 est surexprimée, témoigne également des modifications des propriétés invasives des cellules. Comme la MMP-9, la vimentine est une protéine du cytosquelette, qui est exprimée dans les cellules d'origine épithéliale subissant la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Cette dernière correspond à une dédifférenciation plus importante que subissent les cellules tumorales mammaires pour leur permettre d'acquérir des propriétés migratrices et invasives des tissus environnants de la glande mammaire (McSherry *et al*., 2007). Dans la TEM, le rôle de la vimentine est de participer au remaniement du cytosquelette qui favorise les capacités migratrices des cellules tumorales (Gilles *et al*., 2003). Afin de connaître s'il existe une relation entre l'expression de DDB2 et la TEM, l'expression d'autres marqueurs de la TEM sont en cours d'étude dans le laboratoire d'accueil, selon la présence ou non de DDB2.

II. RELATION ENTRE DDB2, SES GENES CIBLES ET L'INVASION TUMORALE MAMMAIRE

L'influence négative de la surexpression de DDB2 sur les capacités migratrices et invasives des cellules tumorales mammaires hautement métastatiques, corrélée à une diminution de la sécrétion de MMP-9, est à relier à l'expression basale de la SOD Mn. En effet, le laboratoire d'accueil a montré dans un travail publié récemment, que la SOD Mn, lorsque son expression est élevée, participe à l'activation des capacités invasives des cellules tumorales mammaires, en activant la MMP-9, et ce par l'intermédiaire du peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est le produit de la dismutation de l'anion superoxyde, substrat de la SOD Mn (Kattan *et al*., 2008b). Nous n'avons cependant pas observé d'activation de la MMP-2, comme cela a été démontré dans les cellules tumorales mammaires MCF-7, qui surexpriment la SOD Mn après introduction de son gène, et qui peut activer leurs capacités invasives (Zhang *et al*., 2002). Dans ce travail, nous avons observé une corrélation inverse entre l'expression de la SOD Mn et DDB2, à la fois dans des lignées de cellules tumorales et dans des échantillons cliniques de tumeurs mammaires (Article 2, Ennen *et al*., 2011). Cette corrélation inverse s'explique par les résultats obtenus lors d'un travail précédent de l'équipe d'accueil, qui ont démontré que DDB2 exerce un effet négatif sur la transcription du gène codant la SOD Mn, en agissant sur la région proximale du promoteur (Minig *et al*., 2009). De plus, dans des échantillons cliniques, le niveau d'expression de la SOD Mn est corrélée avec la malignité et le pouvoir métastatique des carcinomes mammaires (Mukhopadhyay *et al*., 2004 ; Tsanou *et al*., 2004). Par contre dans le cas de DDB2, nous avons montré que son niveau d'expression est inversement corrélé avec la malignité des tumeurs, exprimée par le haut grade SBR≥3 (Article 1). L'ensemble de ces données suggère donc que la protéine DDB2 empêcherait les cellules tumorales mammaires qui la surexpriment à acquérir des capacités invasives, en maintenant une expression faible de la SOD Mn.

L'identification de la nouvelle activité de DDB2 dans la transcription génique a conduit le laboratoire d'accueil à entreprendre la recherche d'autres gènes, dont l'expression serait modulée par cette protéine et qui pourrait rendre compte de son influence négative sur les capacités invasives des cellules tumorales mammaires. L'analyse transcriptomique globale des 27000 gènes exprimés par une cellule, réalisée de manière comparative entre des cellules tumorales mammaires MCF-7 parentales ayant l'expression naturellement élevée de DDB2, et celles dont cette expression est inhibée par ARN interférence, a permis d'identifier plus de

600 gènes cibles potentiels. Parmi ces gènes, celui codant IκBα a retenu notre attention, d'une part pour son rôle biologique connu, d'autre part pour son niveau d'expression fortement diminué avec celui de DDB2 dans l'analyse transcriptomique. Les résultats obtenus, montrent une restauration des capacités invasives des cellules tumorales mammaires surexprimant DDB2, dans lesquelles l'expression induite d'IκBα est inhibée par ARN interférence, et suggèrent une seconde fois que notre protéine d'intérêt possède des activités biologiques qui dépendent de son rôle dans la transcription des gènes.

III. IMPORTANCE DE DDB2 DANS LA TRANSCRIPTION DE GENES

Plusieurs études ont conduit à émettre l'hypothèse que DDB2 joue un rôle dans la transcription des gènes. Grâce à ces domaines WD40, elle est capable d'interagir d'une part avec le facteur de transcription E2F1 et augmenter ainsi l'expression de gènes impliqués dans la réplication de l'ADN (Hayes *et al*., 1998), d'autre part avec des protéines de remodelage de la chromatine qui favorisent la transcription et la réparation de l'ADN (Datta *et al*., 2001 ; Martinez *et al*., 2001 ; Otrin *et al*., 1997 ; Zhao *et al*., 2009).

1. Le cas du gène *IκBα*

Ce travail a conduit à l'identification d'un second gène, dont l'expression est modulée par DDB2. Cependant, le mécanisme par lequel DDB2 augmente l'expression d'IκBα n'est pas clairement défini. L'analyse systématique de la région proximale du promoteur du gène a permis d'identifier un site de fixation de DDB2, qui diffère de celui précédemment caractérisé pour le gène codant la SOD Mn. Le site de fixation de DDB2 ne présente aucune répétition de séquences au niveau de la région promotrice du gène *IκBα*, contrairement à ce qui a été caractérisé pour celle en amont du gène de la SOD Mn. Cependant, il est difficile de considérer que cette différence de séquence du site de fixation de DDB2 soit suffisante pour expliquer le rôle distinct de cette protéine sur l'expression des gènes *IκBα* et *SOD Mn*.

Nous avons examiné si l'augmentation de l'expression du gène *IκBα*, suite à la fixation de DDB2 sur sa région promotrice, est associée à des mécanismes épigénétiques tels

que des modifications des histones H3, comme cela a été démontré pour la SOD Mn (Minig *et al*., 2009). En effet, la déméthylation et l'acétylation des histones H3, respectivement sur les résidus lysine 4 et 27, reflètent une transcription active du gène. Cependant, aucune différence dans ces modifications post-traductionnelles des histones H3 n'est observée dans le cas du gène *IκBα*, en présence ou non de DDB2. Ceci peut s'expliquer par la localisation du gène *IκBα* dans une région où la chromatine est continuellement ouverte, par une modification post-traductionnelle basale des histones (http://genome.ucsc.edu). Dans ce sens, la structure ouverte de cette région de la chromatine explique également la présence permanente de p65 NF-κB sur le site de fixation -κB1 du promoteur proximal du gène IκBα (Voir Figure 22), qui reflète une transcription basale de ce gène en absence de DDB2 (Algarte *et al*., 1999).

Même si DDB2 n'induit aucune variation dans les modifications post-traductionnelles des histones H3, connues pour activer la transcription génique, nous avons montré qu'elle augmente le recrutement de p300 au site d'initiation de la transcription. Cette protéine p300 appartient à la famille CBP (CREB Binding protein), qui modifie la structure de la chromatine par son activité histone acétyltransférase, et favorise également l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription (Kalkhoven., 2004). Il n'est pas exclu que DDB2 interagisse avec p300 sur la région proximale du promoteur du gène *IκBα*. Cette interaction entre ces deux protéines a déjà été rapportée précédemment et dépend de la présence des domaines WD40 de DDB2 (Datta *et al*., 2001). Nous n'avons pas vérifié si DDB2 favorise au niveau de la région proximale du promoteur du gène *IκBα*, le recrutement des complexes de remodelage de la chromatine STAGA et SWI/SNF, avec qui elle peut interagir également (Martinez *et al*., 2001 ; Zhao *et al*., 2009). La présence de ces complexes pourrait également rendre compte d'une augmentation de la transcription de ce gène par un relâchement plus important de la chromatine, en présence de DDB2.

Nos résultats ont permis d'identifier DDB2 comme une nouvelle protéine impliquée dans la régulation du gène *IκBα*, qui est encore mal connue. Un seul travail rapporte l'identification de 3 motifs -κB et un fixant Sp1 dans la région proximale du promoteur du gène IκBα, dont leur implication réelle dans l'expression constitutive du gène n'est pas décrite. Il a été seulement montré qu'un des motifs -κB, le -κB1, ainsi que celui fixant Sp1 interviennent dans l'induction du gène *IκBα* dans des cellules Jurkat T, après leur exposition au TNFα, et qui représente une boucle d'autorégulation du complexe NF-κB activé par cette cytokine (Algarte *et al*., 1999). Dans nos cellules, nous n'avons pas mis en évidence de

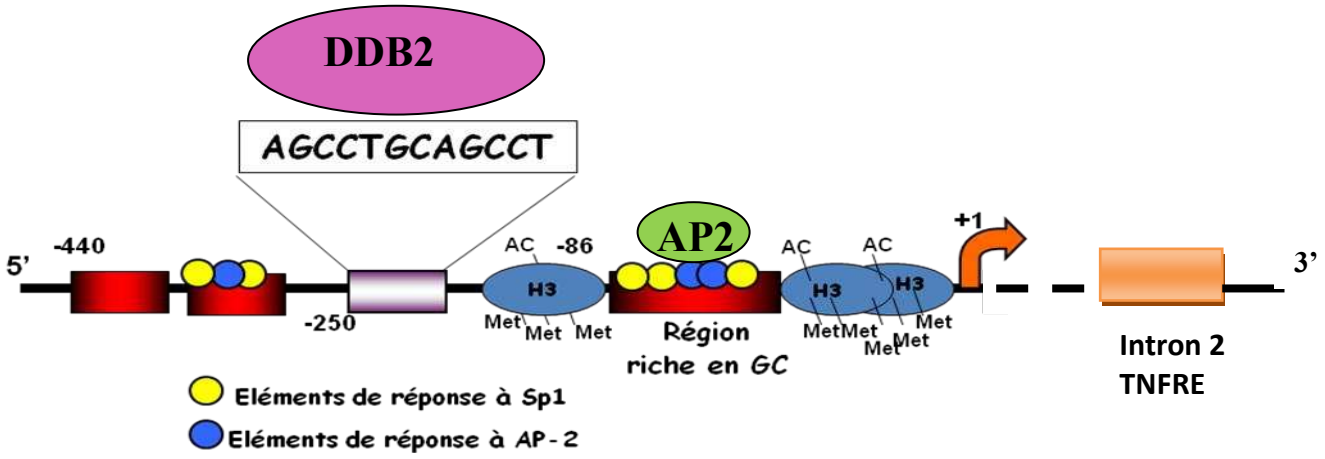
liaison du facteur de transcription Sp1 sur son site de fixation (résultat non montré) lors d'expériences d'immunoprécipitation de la chromatine. Cependant, nous avons observé une liaison constitutive de p65 sur son site -κB1 dans les cellules témoins, qui est fortement diminuée dans les cellules surexprimant DDB2. En effet, dans ces cellules, l'expression augmentée d'IκBα en présence de DDB2, a pour conséquence d'entraîner une diminution de la translocation nucléaire de p65 et de l'activité du NF-κB. Cette observation suggère donc que NF-κB n'est pas impliqué dans l'augmentation de l'expression du gène *IκBα* dans les cellules tumorales mammaires qui surexpriment DDB2.

2. Le cas du gène *SOD Mn*

Contrairement au gène *IkBa*, DDB2 intervient différemment sur l'expression du gène codant la SOD Mn. Il a été montré précédemment que la protéine DDB2, dans les cellules tumorales mammaires qui la surexpriment, maintient une transcription constitutive faible du gène *SOD2*, lorsqu'elle est fixée sur sa séquence dans la région promotrice. De plus, contrairement à ce qui est observé pour le gène *IκBα*, l'activité de DDB2 sur l'expression de l'enzyme antioxydante, dépend d'une hypoacétylation des histones H3 à proximité du site d'initiation de la transcription, mais également du recrutement d'un facteur de transcription, tel que l'activator protein-2 alpha (AP-2α), connu pour réguler négativement le gène de la SOD Mn (Minig *et al*., 2009 ; Zhu *et al*., 2001). Cependant, il n'a pas été clairement montré si l'hypoacétylation des histones H3 dépendait de DDB2 dans nos modèles de cellules tumorales mammaires. Dans le même sens, une étude récente a confirmé l'action négative de DDB2 sur l'expression de la SOD Mn, associée à une augmentation des histones H3 triméthylées et au recrutement d'une histone méthyltransférase telle que Suv39h2, dans des cellules tumorales colorectales et dans des fibroblastes embryonnaires de souris (Roy *et al*., 2010).

Contrairement au gène *IκBα*, celui de la SOD Mn est localisé dans une région du génome où la chromatine est peu ouverte et soumise à des régulations épigénétiques possibles, telles que des méthylations sur plusieurs ilôts CpG dans la partie proximale du promoteur et sur des histones, en particulier dans les cellules tumorales mammaires (Hitchler *et al*., 2006 ; 2008). De plus, le gène codant la SOD Mn ne possède pas de boîte TATA au niveau du site d'initiation de la transcription, qui favorise le recrutement des protéines telles

A



B

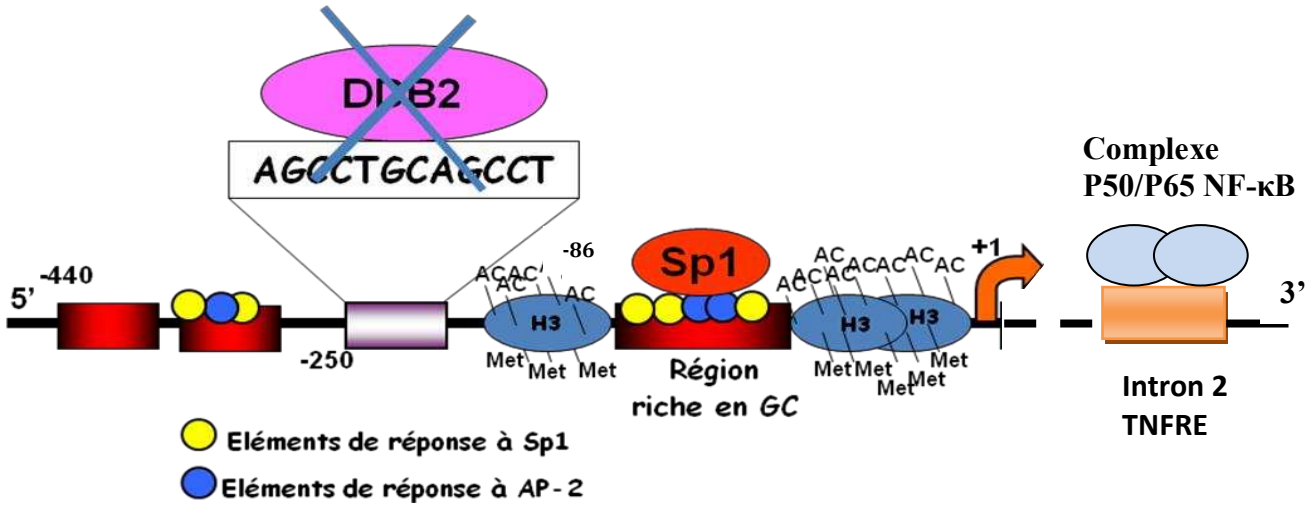


Figure 35 : Représentation schématique montrant l'importance de DDB2 dans la régulation de l'expression basale du gène codant la SOD Mn dans les cellules tumorales mammaires. (A) Dans les cellules non métastatiques MCF-7, qui surexpriment naturellement DDB2, la fixation de cette dernière sur sa séquence cible dans la région proximale du promoteur du gène de la SOD Mn, favorise le recrutement du répresseur AP-2α, qui entraîne une hypoacétylation des histones H3. Il en résulte une faible expression du gène de la SOD Mn. (B) Dans les cellules métastatiques MDA-MB231, l'absence d'expression de DDB2, favorise au contraire la fixation des facteurs de transcription Sp1 et NF-κB, qui interagissent entre eux et entraînent l'hyperacétylation des histones H3 pour maintenir une expression basale élevée du gène de la SOD Mn.

que CBP/p300, contrairement au gène *IκBα*. Toutes ces différences contribuent certainement à expliquer en partie l'activité distincte de DDB2 sur l'expression des gènes *IκBα* et *SOD Mn*.

Il existe une relation entre les deux gènes cibles de DDB2, qui apporte également une explication quant à l'action différente de DDB2 sur ces deux gènes. En effet, l'augmentation induite de l'expression d'IκBα par DDB2, qui entraîne une diminution de l'activité constitutive de NF-κB, traduit également la diminution observée de la fixation de ce facteur de transcription sur sa séquence d'ADN cible, localisée dans l'intron 2 du gène codant la SOD Mn et appelée TNF-RE pour « Tumor Necrosis Factor Response Element » (Bernard *et al*. 2001). NF-κB est connu pour participer à l'induction du gène SOD Mn, en présence de cytokines proinflammatoires, en se fixant sur sa séquence cible de l'intron 2 (Josson *et al*., 2006). La diminution forte de liaison de NF-κB sur le TNF-RE peut rendre compte, non seulement d'une hypoacétylation des histones H3 (Hodge *et al*., 2005 ; Minig *et al*., 2009), mais surtout de l'absence de fixation de Sp1 à proximité du site d'initiation de la transcription, dans la région proximale du promoteur du gène codant la SOD Mn, comme décrit précédemment (Minig *et al*., 2009). En effet, la fixation de Sp1 sur la région promotrice du gène codant la SOD Mn est dépendante de son interaction avec NF-κB, par l'intermédiaire d'une protéine appelée la nucléophosmine, une protéine nucléolaire, connue pour son rôle dans le transport nucléo-cytoplasmique des ARN (Dhar *et al*., 2004, Xu *et al*., 2007).

En résumé, DDB2 maintient une expression basale faible du gène codant la SOD Mn dans les cellules tumorales mammaires non métastatiques, d'une part en contrôlant négativement l'activité de NF-κB, d'autre part en se fixant sur sa séquence cible caractérisée qui favorise ainsi le recrutement du répresseur AP2α (Figure 35).

IV. RELATION ENTRE DDB2 ET NF-κB DANS LES CAPACITES INVASIVES DES CELLULES TUMORALES MAMMAIRES

1. DDB2 et l'activité constitutive de NF-κB

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine d'une activité constitutive de NF-κB dans les cellules tumorales, comme nous l'avons détaillé en page 46. Dans le cas des cellules tumorales mammaires, il a été montré qu'une expression aberrante des IKK et de la caséine kinase II peut être responsable de l'activation constitutive de NF-κB, en contrôlant la stabilité de l'inhibiteur cytoplasmique IκBα (Romieu-Mourez *et al*., 2001). Dans les cellules tumorales mammaires « basal like » et triple-négatives, c'est une forte expression de NIK (NF-κB-inducing kinase), une kinase impliquée dans l'activation des kinases IKK qui est à l'origine d'une activité constitutive de NF-κB. Cette expression aberrante de NIK provient de modifications épigénétiques, telles qu'une acétylation des histones H3, au niveau de son gène (Yamamoto *et al*., 2010).

En dehors de ces mécanismes qui dépendent de l'activité de kinases à l'origine d'une activité constitutive de NF-κB, celui identifié par notre travail est original, car il concerne directement la régulation du niveau d'expression du gène codant IκBα et non la stabilité de la protéine correspondante. Seuls certains polymorphismes dans la région promotrice de son gène, identifiés seulement dans des cancers colorectaux et gastriques, entraînent une expression faible d'IκBα, et donc une activité constitutive élevée de NF-κB dans les tumeurs (Wang *et al*., 2010 ; Song *et al*., 2011). Dans les cellules tumorales mammaires, une étude récente a seulement montré que la seule variation du niveau protéique d'IκBα, en dehors d'activités kinases, est suffisante pour conduire à une activité constitutive élevée de NF-κB. Cette étude montre que les cellules MCF-7, lorsqu'elles surexpriment la transglutaminase 2 après introduction de son gène, présentent une activité constitutive de NF-κB. La transglutaminase 2 est responsable de la diminution d'IκBα, en catalysant le pontage d'un peptide entre une glutamine et une lysine intrachaînes ou interchaînes au niveau de la protéine qui entraîne ainsi sa polymérisation (Kim *et al*., 2008).

Dans nos modèles cellulaires, il n'est cependant pas exclu que le déséquilibre observé dans l'expression d'enzymes anti-oxydantes, conduisant à un niveau élevé d'H_2O_2, soit impliqué

dans l'activité constitutive de NF-κB (Nakshatri *et al*., 1997 ; Kattan *et al*., 2008b). Ce dernier est bien décrit pour sa sensibilité au statut oxydo-réducteur dans les cellules (Bowie et O'Neill., 2000). De même, l'activité autocrine de facteurs de croissance comme l'EGF sur des cellules tumorales mammaires, particulièrement les SKBR3 HER-2 positives, peut conduire, par la voie de signalisation dépendante de PI3K/Akt qu'elle déclenche, à l'activité constitutive de NF-κB (Sliva *et al*., 2002, Pianetti *et al*., 2001).

2. Importance du contrôle de DDB2 sur NF-κB dans la croissance tumorale

Selon la littérature, l'activité constitutive de NF-κB est très souvent corrélée avec les capacités invasives et métastatiques des tumeurs provenant de certains carcinomes pulmonaires, pancréatiques, prostatiques, ovariens et mammaires (Chen *et al*., 2011 ; Melisi *et al*., 2009 ; Min *et al*., 2010 ; Yang *et al*., 2012 ; Merkofer *et al*., 2010 ; Nakshatri *et al*., 1997). Ces capacités invasives sont le résultat du phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) que subissent les cellules tumorales (Mc Sherry *et al*., 2007). Certains gènes, dont les protéines correspondantes jouent un rôle important dans la TEM, sont régulés par NF-κB (Chua *et al*., 2007 ; Wu *et al*., 2010 ; Min *et al*., 2008).

Les cellules tumorales mammaires, dont nous avons disposé pour réaliser ce travail, présentent des activités constitutives de NF-κB, très distinctes entre-elles, selon leurs caractéristiques moléculaires et biologiques. Tandis que les cellules MDA-MB231 et SKBR3 présentent une activité constitutive de NF-κB élevée, associée à de fortes capacités invasives et un haut pouvoir métastatique, les cellules MCF-7 et T47D non invasives ont une activité très faible de ce facteur de transcription (Ennen *et al*., 2011 Article 2). Ces résultats sont également à associer à l'expression ou non d'ERα. Tandis que les cellules MDA-MB231 et SKBR3 sont ER négatives, les MCF-7 et T47D sont ER positives. Dans le sens de cette corrélation, une étude récente suggère qu'ERα inhiberait la néosynthèse de NF-κB dans les cellules cancéreuses mammaires ER positives selon un mécanisme encore mal défini, pouvant expliquer l'observation très fréquente d'un complexe actif NF-κB dans les tumeurs ER négatives (Nakshatri *et al*., 1997 ; Belguise *et al*., 2007).

Le complexe NF-κB joue un rôle important dans l'acquisition des capacités invasives des cellules tumorales mammaires. Son inhibition ou celle des voies de signalisation

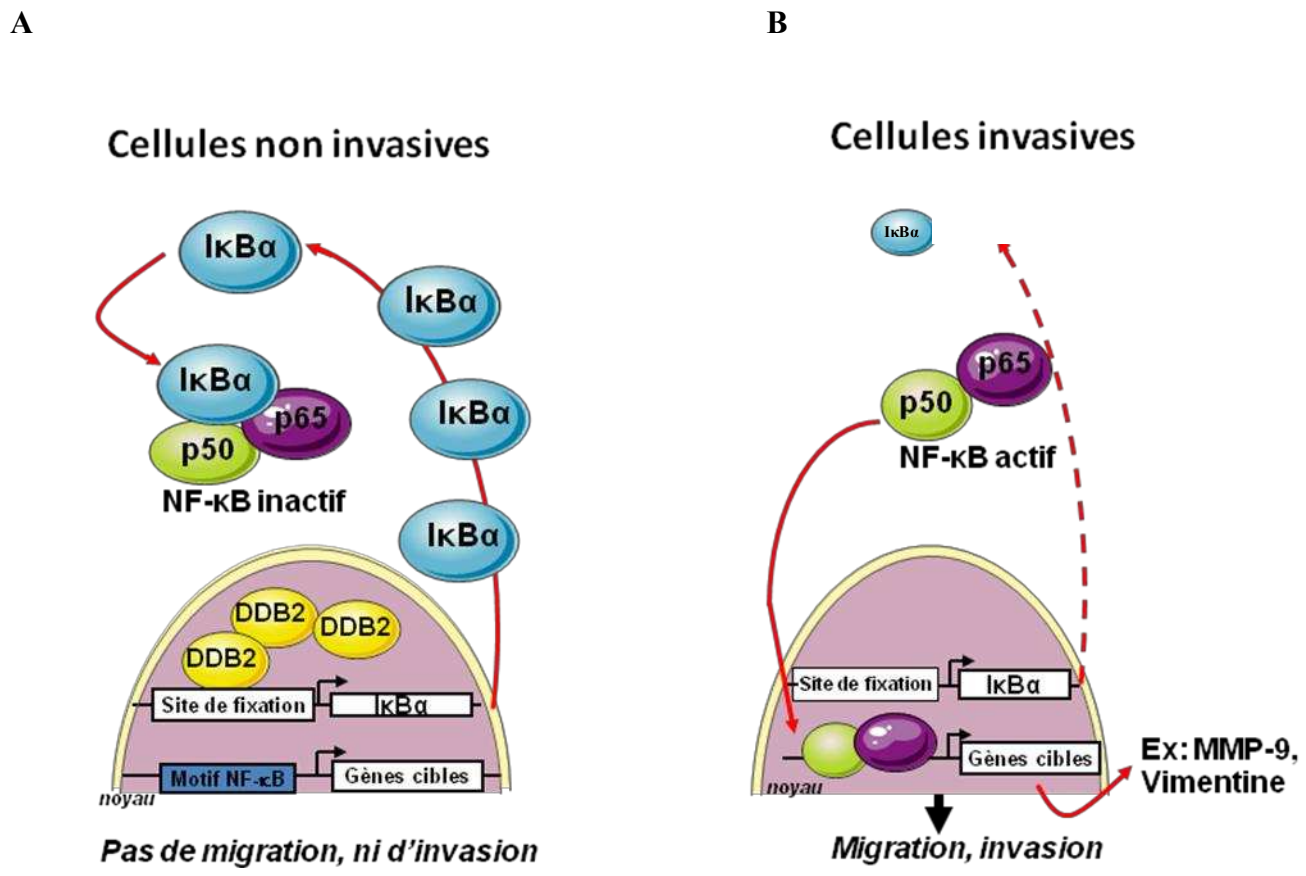


Figure 36 : Relation entre DDB2 et NF-κB dans les capacités migratrices et invasives des cellules tumorales mammaires. (A) Dans les cellules non invasives, l'expression constitutivement élevée de DDB2 maintient un niveau élevée d'expression d'IκBα, qui empêche l'activation de NF-κB en le séquestrant dans le cytoplasme. (B) Dans les cellules invasives, l'absence d'expression de DDB2 conduit à un niveau faible d'IκBα, ce qui contribue à une activation constitutive de NF-κB. Ce dernier régule l'expression de gènes cibles, tels que ceux codant la MMP-9 et la vimentine impliquées dans les propriétés invasives des cellules tumorales mammaires.

conduisant à son activation, entraîne une perte des capacités invasives *in vitro* et prévient la formation de métastases *in vivo* des cellules tumorales mammaires (Huber *et al*., 2004). De même, la surexpression de la protéine p65 du complexe NF-κB pousse les cellules immortalisées MCF-10A, dérivant de cellules épithéliales mammaires normales, à acquérir des propriétés invasives (Wu *et al*., 2010, Chua *et al*., 2007). En accord avec ces résultats, nous avons montré, que l'inhibition de NF-κB dans les cellules MDA-MB231 et SKBR3 à l'aide du peptide SN50 diminue fortement leurs propriétés migratrices et invasives. Cet inhibiteur spécifique a pour mode d'action de bloquer la translocation nucléaire des protéines du complexe NF-κB (Lin *et al*., 1995).

Cet effet de NF-κB sur les capacités invasives est médié par ses gènes cibles. C'est probablement le cas du gène codant la MMP-9 dans les cellules tumorales mammaires (Figure 36). Cette gélatinase joue un rôle central dans les processus invasifs et métastatiques de ces cellules (Min *et al*., 2008) et dont l'expression élevée est souvent associée à une forte agressivité des tumeurs mammaires (Vizoso *et al*., 2007). Son expression est fortement diminuée dans ces cellules tumorales lorsqu'elles surexpriment DDB2. Ceci s'explique, non seulement par la régulation négative qu'exerce DDB2 sur l'expression basale de la SOD Mn, mais également sur l'activité transcriptionnelle de NF-κB. Ce dernier est connu pour réguler le gène de la MMP-9 en se fixant sur un motif -κB fonctionnel, localisé à -599 pb du site d'initiation de la transcription, dans la région promotrice (Himelstein *et al*., 1997). En relation avec ces données, la surexpression de DDB2 entraîne également une diminution sur l'expression au niveau transcriptionnel du gène de la MMP-9. Par contre, nous n'observons aucune diminution de l'expression de MMP-2, dont le gène n'est pas directement régulé par NF-κB. Ce dernier intervient sur l'expression d'une MMP membranaire, qui est responsable de l'activation de la MMP-2 en clivant son précurseur (Han *et al*., 2001 ; Min *et al*., 2008 ; Miao *et al*., 2003). Cependant, nous n'avons pas vérifié cette possibilité au cours de notre travail. L'effet de NF-κB sur les capacités invasives peut être également médié par la vimentine. Cette protéine du cytosquelette d'origine mésenchymateuse et largement exprimée dans les cellules migrantes, a une expression fortement diminuée, lorsque DDB2 est surexprimée dans les cellules tumorales mammaires hautement métastatiques. Ceci explique en partie les changements morphologiques observés. Contrairement aux cellules parentales hautement métastatiques et ayant une morphologie plus allongée, celles surexprimant DDB2 et ayant des capacités invasives fortement diminuées présentent une forme plutôt ovoïde. De

plus, le gène codant la vimentine est également régulé par le complexe NF-κB (Lilienbaum *et al*., 1993).

De nombreux autres gènes sont régulés par NF-κB, qui codent d'une part pour des marqueurs épithéliaux dont l'expression est diminuée, d'autre part des marqueurs d'origine mésenchymateuse, dont l'expression est augmentée. L'ensemble de ces gènes connus intervient dans les capacités invasives des cellules tumorales mammaires et décrit les événements se produisant au cours de la TEM. Les cellules tumorales mammaires MDA-MB231 et SKBR3 sont décrites pour exprimer de nombreux caractères mésenchymateux typiques de la TEM. Cependant, dans l'état actuel de nos résultats, il est difficile de conclure si DDB2 influence les capacités invasives des cellules tumorales mammaires, en provoquant une réversibilité de la TEM. Cette réversibilité reste souvent partielle, comme le rapportent certaines études (Huber *et al*., 2004 ; Chodosh., 2011, Drasin *et al*., 2011). Néanmoins, dans les cellules tumorales surexprimant ou non DDB2, des analyses de l'expression par RT-PCR quantitative à grande échelle d'autres gènes cibles de NF-κB, impliqués dans la TEM, seront prochainement réalisés au sein de l'équipe d'accueil. L'identification de ces gènes doit permettre de mieux comprendre comment DDB2 s'oppose au développement des métastases. Certains gènes cibles de NF-κB, tels que ceux codant certaines intégrines et protéines matricielles, ou encore le TGFβ1, sont connus pour leur rôle dans le maintien des caractères mésenchymateux acquis par les cellules tumorales invasives d'origine mammaire, qui leur permettent de coloniser des tissus cibles comme les poumons (Muller *et al*., 2001 ; Helbig *et al*., 2003 ; Bendinelli *et al*., 2009). Certains de ces gènes nous conduiront à mesurer l'influence éventuelle de DDB2 sur le développement de métastases osseuses (McSherry *et al*., 2007 ; Medici *et al*., 2009 ; Drabsch *et al*., 2011). L'identification des gènes cibles de NF-κB, dont l'expression est diminuée ou augmentée selon la présence ou non de DDB2, permettra également dans l'avenir de montrer l'importance de cette dernière dans les capacités d'adhérence des cellules tumorales et dans l'angiogenèse.

En dehors de son rôle dans les capacités invasives et métastatiques, qui est majoritairement décrit dans la littérature, NF-κB intervient également dans la prolifération des cellules tumorales, en induisant l'expression de certains gènes (Biswas *et al*., 2004 ; Connelly *et al*., 2011). Les protéines correspondantes participent activement à ce processus biologique, comme la cycline D1, c-Myc et CDK2 (Naugler et Karin., 2008). Cependant, cette activité de NF-κB semble être peu importante dans nos modèles cellulaires, car DDB2 active elle-même la prolifération des cellules tumorales mammaires ER-positives, qui la surexpriment

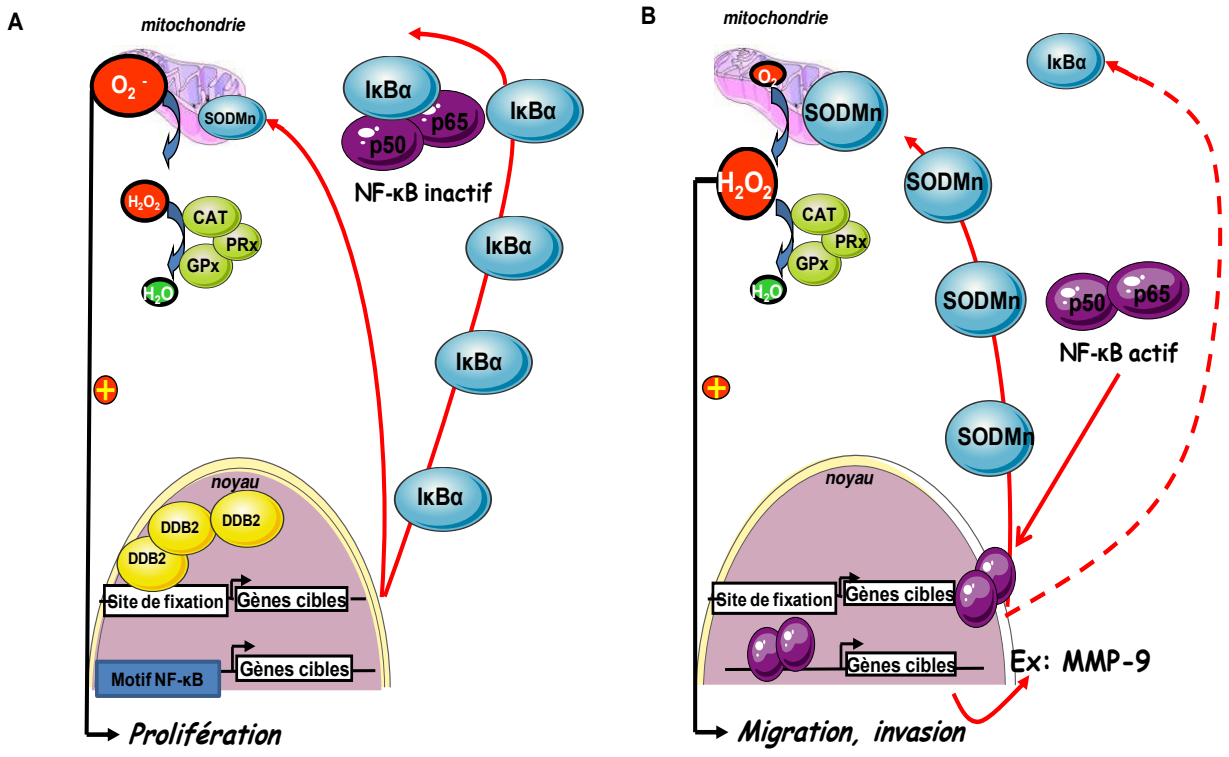


Figure 37 : Relation entre DDB2, SOD Mn et NF-κB dans la croissance tumorale mammaire. (A) Dans les cellules non invasives, l'expression constitutivement élevée de DDB2, maintient un niveau faible d'expression de la SOD Mn, d'une part en agissant directement sur la région promotrice de son gène, d'autre part en maintenant un niveau élevée d'expression d'IκBα, qui empêche l'activation de NF-κB. Ces deux mécanismes moléculaires expliquent en partie le rôle de DDB2 dans la prolifération de ces cellules. (B) Dans les cellules invasives, l'absence d'expression de DDB2 contribue ainsi à un niveau élevé d'expression de la SOD Mn et à une activation constitutive forte de NF-κB, à l'origine d'une expression élevée de la MMP-9. Ces deux mécanismes moléculaires expliquent en partie comment l'absence d'expression de DDB2 favorise la migration et le pouvoir invasif de ces cellules.

naturellement. De plus, ces cellules tumorales ER-positives ont une activité constitutive faible de NF-κB, comparativement aux cellules ER-négatives (Nakshatri *et al*., 1997 ; Article 2 Ennen *et al*., 2011).

V. RELATION ENTRE DDB2, NF-κB ET LA SOD Mn DANS LA CROISSANCE TUMORALE MAMMAIRE

Les données obtenues au cours de ce travail, associées à celles déjà publiées précédemment par l'équipe d'accueil, permettent d'avoir une vision plus précise quant au rôle de DDB2 dans la croissance tumorale. Elles permettent également de mieux comprendre comment les cellules tumorales mammaires acquièrent des propriétés invasives. En relation avec les résultats précédents (Kattan *et al*., 2008b ; Minig *et al*., 2009), les cellules tumorales mammaires invasives n'exprimant pas ou peu DDB2 présentent un temps de doublement plus long, lié à une prolifération plus lente que les cellules non invasives qui la surexpriment naturellement. L'introduction du gène codant la DDB2 dans les cellules invasives, non seulement accélère leur prolifération (Kattan *et al*., 2008a), mais en même temps diminue leurs capacités invasives. L'ensemble de ces résultats conduit à émettre l'hypothèse que la perte d'expression du gène codant DDB2 représente un événement précoce favorisant la progression des tumeurs vers un comportement plus invasif.

La protéine DDB2 est impliquée dans la prolifération des cellules tumorales mammaires non invasives, en activant leur entrée dans la phase G1/S et en favorisant leur progression à travers la phase S du cycle cellulaire (Kattan *et al*., 2008a). Ces résultats sont corrélés avec l'expression de marqueurs de la prolifération impliqués dans la réplication de l'ADN et l'entrée en phase S, tels que la cycline E, le PCNA et la DHFR. Ces gènes sont régulés par E2F1, dont l'activité transcriptionnelle peut être augmentée en interagissant avec DDB2 (Nag *et al*., 2001). Dans nos modèles cellulaires, il a été montré que DDB2 exerce en partie cette activité biologique, en participant à la régulation négative de l'expression de la SOD Mn par le mécanisme décrit en Figure 35 (Minig *et al*., 2009). En effet, le rôle de la SOD Mn dans la croissance tumorale dépend de son expression basale (Nelson *et al*., 2003) et de la production d'EAO (Ridnour *et al*., 2004). Une expression constitutive faible de la SOD Mn entraîne l'accumulation d'O_2°- intracellulaire, qui stimule la prolifération cellulaire, en activant préférentiellement la voie de signalisation dépendante de la protéine Ras (Yang *et al*.,

1999), comme cela a été montré dans les cellules tumorales mammaires MCF-7 (Li *et al*. 1995 ; Kattan *et al*., 2008b). Les résultats de notre travail suggèrent également que DDB2 exerce son rôle dans la prolifération des cellules tumorales mammaires non invasives, en participant à l'augmentation de l'expression d'IκBα. Par cette activité, DDB2 maintient ainsi une activité constitutive faible de NF-κB dans ces cellules tumorales, qui contribue également à l'expression basale faible de la SOD Mn.

Dans l'état actuel de nos connaissances, le rôle de DDB2 dans les capacités invasives des cellules tumorales mammaires dépend principalement de sa participation dans la régulation de l'expression de ses gènes cibles. En effet, l'absence ou l'expression faible de DDB2 contribue à une expression élevée de la SOD Mn, dont nous avons rappelé l'implication dans les capacités invasives des cellules tumorales mammaires hautement métastatiques, par l'intermédiaire de l'action activatrice d'H_2O_2 sur la sécrétion de MMP-9 et par l'expression déficiente des enzymes anti-oxydantes éliminant ces EAO (Kattan *et al*., 2008b ; Minig *et al*., 2009). Ces altérations dans l'expression des enzymes anti-oxydantes, largement décrites dans de nombreux types de tumeurs, en particulier celles d'origine mammaire (livre breast cancer, édition INtech., 2011), peuvent ainsi dépendre en partie de la présence ou non de DDB2. Une équipe américaine a montré récemment que l'altération dans l'expression des enzymes anti-oxydantes, en conséquence de l'expression de DDB2, entraîne une accumulation d'EAO à l'origine de la sénescence des cellules normales, telles que des fibroblastes embryonnaires murins (Roy *et al*., 2010). L'absence de DDB2 contribue également à une activité constitutive élevée de NF-κB, dont nous avons largement détaillé le rôle dans les capacités invasives des cellules tumorales mammaires, entre autre par l'intermédiaire de son gène cible MMP-9 (Himelstein *et al*., 1997). Cette activité constitutive de NF-κB doit dépendre également de l'accumulation d'H_2O_2 issue de l'expression élevée de la SOD Mn et de l'absence de DDB2 dans les cellules tumorales invasives (Bowie et O'Neill., 2000). Le rôle de DDB2 dans la croissance tumorale est résumé dans la Figure 37. Il n'est pas exclu que notre protéine d'intérêt participe à la régulation de l'expression d'autres gènes cibles, impliqués dans la croissance des cellules tumorales mammaires.

VI. INTERET CLINIQUE DE DDB2

La vision plus précise du rôle de DDB2 dans la croissance tumorale mammaire nous permet aujourd'hui d'entrevoir l'intérêt clinique de cette protéine.

Le 1er intérêt clinique potentiel de DDB2 serait en tant que marqueur de la prolifération. Cette suggestion vient du rôle de cette protéine dans les capacités proliferatives des cellules tumorales mammaires non invasives, ainsi que la corrélation entre son expression et celles de PCNA, cycline E, DHFR et ERα. Certains de ces marqueurs sont déjà proposés en clinique, tels que la cycline E, le PCNA (Malkas *et al*., 2006 ; Mittendorf *et al*., 2010). Dans le cas d'ERα, il est couramment utilisé en clinique, depuis de nombreuses années et permet de discriminer les tumeurs qui seront sensibles à l'hormonothérapie (Wittliff *et al*., 1984). Notre travail confirme dans des échantillons cliniques, qu'il existe une très forte corrélation entre l'expression au niveau transcriptionnel de DDB2 et ERα, sur près d'une centaine de tumeurs. Il n'est d'ailleurs pas exclu une implication d'ERα dans la régulation du gène codant DDB2. L'équipe d'accueil espère renforcer ces résultats dans l'avenir par une analyse sur un plus grand nombre d'échantillons cliniques provenant de patientes atteintes d'un cancer du sein, en intégrant l'analyse du niveau d'expression de la SOD Mn et d'IκBα.

Le 2ème intérêt clinique potentiel de DDB2 vient de son contrôle négatif sur les capacités invasives des cellules tumorales mammaires, en exerçant une régulation inhibitrice sur l'activité constitutive de NF-κB. Ces résultats précliniques sont renforcés par une corrélation inverse très significative entre l'expression de DDB2 et le grade SBR≥3 très forte agressivité tumorale, dans les échantillons cliniques. Ces données soutiennent l'idée que DDB2 présente les caractéristiques d'un marqueur clinique potentiel, prédictif de la progression des tumeurs mammaires vers un pouvoir invasif et métastatique. Il pourra être intéressant de vérifier par une analyse immunohistochimique sur des échantillons cliniques, la corrélation entre le niveau d'expression de la protéine DDB2 et la localisation nucléaire des constituants du complexe NF-κB. Ce 2ème intérêt clinique est très pertinent en cancérologie mammaire, car il reste difficile aujourd'hui de prédire avec certitude la progression des tumeurs mammaires vers un statut métastatique, à cause de l'absence de marqueurs biologiques prédictifs suffisamment fiables.

Le contrôle négatif de DDB2 sur l'activité constitutive de NF-κB suscite un 3ème intérêt clinique potentiel de notre protéine d'intérêt. NF-κB contribue à l'échappement des

cellules tumorales aux traitements anticancéreux, probablement en induisant l'expression de gènes cibles anti-apoptotiques (Lin *et al*., 2010). Dans ce cas, il n'est pas exclu que DDB2 puisse jouer le rôle de facteur prédictif de la réponse aux agents anticancéreux. Des travaux dans ce sens sont actuellement en cours au sein de l'équipe d'accueil. Il n'est pas exclu également que la relation entre DDB2 et NF-κB représente une piste intéressante pour le développement de nouvelles thérapies anticancéreuses. Actuellement, NF-κB représente déjà une stratégie thérapeutique possible.

CHAPITRE 5

CONCLUSION
&
PERSPECTIVES

CONCLUSION

Notre travail met en évidence pour la 1ère fois l'importance de DDB2 dans le contrôle des capacités invasives des cellules tumorales mammaires, en contrôlant négativement l'activité du facteur de transcription NF-κB, et en conséquence l'expression de la MMP-9. Cette activité de DDB2 peut également dépendre de son contrôle négatif exercé sur l'expression de la SOD Mn. Ces données fondamentales sont confirmées lors d'une étude clinique rétrospective, qui révèle une corrélation inverse entre l'expression de DDB2 et le grade SBR≥3 des tumeurs mammaires provenant de patientes. Associé aux résultats obtenus également au sein de l'équipe, montrant l'importance de DDB2 dans la prolifération cellulaire, ce travail permet de mieux définir le rôle de cette protéine dans la croissance des cellules tumorales mammaires ER négatives métastatiques et ER positives non métastatiques. Il permet également de mieux comprendre comment les cellules tumorales mammaires acquièrent des propriétés invasives, en suggérant entre autre que la perte d'expression de DDB2 représenterait un événement précoce dans cette acquisition.

L'ensemble de ce travail représente une avancée intéressante en cancérologie mammaire et laisse entrevoir un intérêt clinique potentiel de DDB2, associée à ses gènes cibles, IκBα et SOD Mn, comme facteurs prédictifs de la progression des tumeurs mammaires vers un statut métastatique.

PERSPECTIVES

Les perspectives qu'offre ce travail de thèse sont nombreuses à la fois sur le plan fondamental et clinique.

Il conviendra d'identifier d'autres gènes cibles connus de NF-κB, susceptibles d'avoir une expression modulée par DDB2, afin de compléter les données du présent travail et de renforcer l'importance de notre protéine d'intérêt dans le processus métastatique et dans la TEM. Il sera intéressant en particulier d'analyser l'expression des gènes codant des facteurs de transcription (Snail, ZEB1, ZEB2 et Twist), d'autres marqueurs d'origine mésenchymateuses (cadhérine N, MMP1, activateur du plasminogène ou uPA), et des protéines et médiateurs extracellulaires impliqués dans l'adhérence.

Il conviendra également d'étudier l'importance de DDB2 dans les capacités d'adhérence, dans l'angiogenèse et l'hypoxie tumorales, ainsi que dans la réponse aux agents anticancéreux, sur la base du contrôle négatif que cette protéine exerce sur NF-κB.

Le rôle de la protéine DDB2 comme régulateur de la transcription génique laisse entrevoir l'existence d'autres gènes cibles, que l'équipe d'accueil cherche actuellement à identifier par une approche d'immunoprécipitation sur chromatine suivie d'un séquençage à haut débit. De plus, afin de comprendre pourquoi DDB2 est capable à la fois de participer à la réparation de l'ADN, et de réguler l'expression de gènes cibles, il sera intéressant de rechercher en particulier le(s) domaine(s) structuraux de la protéine qui est ou sont impliqué(s) dans ces activités biologiques très différentes. Dans le même sens, il conviendra également de rechercher la ou les voies de signalisation, ainsi que d'éventuels partenaires protéiques, qui régule(nt) l'activité de DDB2 dans la transcription génique.

L'importance de DDB2 dans la croissance tumorale mammaire dépend de son expression. Ceci doit nous conduire dans l'avenir à nous pencher sur l'étude du mécanisme de

régulation de son gène, lorsqu'il est surexprimé ou au contraire réprimé selon que les cellules tumorales mammaires soient invasives ou non. Il s'agira d'apporter ces réponses scientifiques avant de proposer l'intérêt clinique de cette protéine.

Aux vues des résultats obtenus au cours de ce travail et ceux précédemment publiés par l'équipe d'accueil, DDB2 présente un intérêt clinique potentiel intéressant. Afin de valider la pertinence de DDB2 et certains de ses gènes cibles comme marqueurs en situation clinique, il conviendra d'analyser leur expression aux niveaux transcriptionnel et traductionnel sur un échantillon rétrospectif et prospectif plus important de tumeurs mammaires, et de corréler les résultats obtenus à la survie sans progression des patientes dans leur maladie.

Enfin, dans le cadre d'une perspective plus lointaine, l'importance de DDB2 dans la croissance tumorale pourra être étendue à d'autres types de cancers.

CHAPITRE 6

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A,

Abdel-Ghany M., Cheng HC., Elble RC., Pauli BU. (2001). The breast cancer beta 4 integrin and endothelial human CLCA2 mediate lung metastasis. J Biol Chem. 6; 276(27):25438-46.

Aggarwal BB. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat Rev Immunol; 3(9):745-56.

Agnoletto M.H., Guecheva T.N., Donde F., de Oliveira A.F., Franke F., Cassini C., Salvador M., Henriques J.A., and Saffi J. (2007). Association of low repair efficiency with high hormone receptors expression and SOD activity in breast cancer patients. Clin Biochem 40, 1252-1258.

Ahmed K.M., Li J.J. (2008). NF-κB-mediated adaptative resistance to ionizing radiation. Free Radic boil Led. 44(1):1-13.

Akman SA., Forrest G., Chu FF., Esworthy RS., and Doroshow JH. (1990). Antioxidant and xenobiotic-metabolizing enzyme gene expression in doxorubicin-resistant MCF-7 breast cancer cells. Cancer Res 50, 1397-1402.

Albrektsen G., Heuch I., Hansen S., Dvale G. (2005). Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births : exploring interaction effects. Brit J Cancer 92: 167-75.

Alekseev S., Kool H., Rebel H., Fousteri M., Moser J., Backendorf C., de Gruijl F.R., Vrieling H., and Mullenders L.H. (2005). Enhanced DDB2 expression protects mice from carcinogenic effects of chronic UV-B irradiation. Cancer Res 65, 10298-10306.

Ashitkawa K. (2004). Evidence that activation of nuclear factor kappa B is essential for the cytotoxic effects of doxorubicin and its analogues. Biochem. Pharmacol. 67: 353-364.

Algarté M., Kwon H., Génin P., and Hiscott J. (1999). Identification by in vivo genomic footprinting of a transcriptional switch containing NF-kappaB and Sp1 that regulates the IkappaB alpha promoter. Molecular and cellular Biology, 6140-6153.

Andela VB., Schwarz EM., Puzas JE., O'Keefe RJ., Rosier RN. (2000). Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear factor kappaB. Cancer Res ;60(23):6557–62.

B,

Baay M., Brouwer A., Pauwels P., Peeters M., Lardon F. (2011). Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. Clin Dev Immunol : 565187.Review.

Bachelder RE., Yoon SQ., Franci C., de Herreros AG., Mercurio AM. (2005). Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription implications for the epithelial-mesenchymal transition. J Cell Biol 168: 29-33.

Bagchi S., Raychaudhuri P. (2010). Damaged-DNA Binding Protein-2 Drives Apoptosis Following DNA Damage. Cell Div. 19; 5:3.

Balkwill F., Mantovani A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet; 357(9255):539-545.

Banks D., Wu M., Higa L.A., Gavrilova N., Quan J., Ye T., Kobayashi R., Sun H., and Zhang H. (2006). L2DTL/CDT2 and PCNA interact with p53 and regulate p53 polyubiquitination and protein stability through MDM2 and CUL4A/DDB1 complexes. Cell Cycle *5*, 1719-1729.

Baud V., Karin M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. Trends Cell Biol. 2001 (9):372-7. Review.

Barakat BM., Wang QE., Han C., Milum K., Yin DT., Zhao Q., Wani G., Arafa el-SA., El-Mahdy MA., Wani AA. (2010). Overexpression of DDB2 enhances the sensitivity of human ovarian cancer cells to cisplatin by augmenting cellular apoptosis. Int J Cancer.15;127(4):977-88.

Barbera MJ., Puig I., Dominguez D., Grille S., Estteruelas S., Peiro S., Blaudia J., Franci C., Dedhar S., Larue L., Garcia de Herreros A. (2004). Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. Oncogene 23: 7345-7354.

Bargout C., Krappmann D., Bommert K., Mapara MY., et al. (1997). Constitutive NF-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin 's disease tumor cells. J clin Invest. 100, 2961-2969.

Basseres DS., Baldwin AS. (2006).Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. Oncogene; 25(51):6817-6830.

Basu A., Haldar S. (1998). The relationship between BcI2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. Mol Hum Reprod, 4(12):1099-109. Review.

Beg A., Sha A., Bronson RT., Gosh S., Baltimore D. (1995). Embryonic lethality and liver degeneration, in mice lacking the RelA component of NF- κB. Nature 376, 167-170.

Belguise K., Sonenshein GE. (2007). PKC theta promotes c-Rel-driven mammary tumorigenesis in mice and humans by repressing estrogen receptor alpha synthesis. J Clin Invest 117:4009-4021.

Bendinelli P., Matteucci E., Maroni P., Desiderio A. (2009). NF-kappaB activation, dependent on acetylation/deacetylation, contributes to HIF-1 activity and migration of bone metastatic breast cancer cells. Mol cancer Res; 7(8)

Berberich I., Shu GL., and. Clark EA. (1994). Cross-linking CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor-kappa B. J Immunol 153: 4357-66.

Bergqvist S., Ghosh G., Komives EA. (2008). The IkappaBalpha/NF-kappaB complex has two hot spots, one at either end of the interface. Protein Sci. 17(12):2051-8.

Bernard D., Quatannens B., Begue A., Vandenbunder B., Abbadie C. (2001). Antiproliferative and antiapoptotic effects of c-rel may occur within the same cells via the up-regulation of manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* 61**:**2656-2664; 2001.

Bhaumik D., Scott GK., Schokrpur S., Patil CK., Campisi J., Benz CC. (2008). Expression of microRNA-146 suppresses NF-κB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. Oncogene; 27(42):5643-5647.

Bidunova IV., Perez P., Vaden V., Spiegelman VR., Slaga TJ., Jorcano J. (1999). Increased expression of p50-NF-kappaB and constitutive activation of NF-kappaB transcription factors during mouse skin carcinogenesis. Oncogene. 18, 7423-31.

Birbach A., Gold P., Binder BR, Hofer E., de Martin R. and Schmid JA.(2002). Signaling molecules of the NF-kappa B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. J Biol Chem; 277:10842-10851.

Biswas DK., Shi Q., Baily S., Strickland I., Gosh S., Pardee AB., iglehart JD. (2004). NF-κB activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA, 101:10137-10142.

Blancato J., Singh B., Liu A., Liao DJ., and Dickson RB. (2004). Correlation of amplification and overexpression of the c-myc oncogene in high-grade breast cancer: FISH, in situ hybridization and immunohistochemical analyses. Br J Canceer 90: 1612-1619.

Bloom H.J., and Richardson W.W. (1957). Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. Br. J. Cancer *11*, 359-377.

Bohuslav J., Chen L., Kwon H., Mu Y., and Greene W. (2004). p53 Induces NF-κB Activation by an IκB Kinase-independent Mechanism Involving Phosphorylation of p65 by Ribosomal S6 Kinase 1. J. Biol. Chem :*279: 26115-26125.*

Bosco EE and Knudsen ES (2007). RB in breast cancer: at the crossroads of tumorigenesis and treatment. Cell cycle 6: 667-671.

Boudreau N., and Myers C. (2003). Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Res.* 5:140-146.

Bowie A, O'Neill LA. (2000). Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. Biochem Parmacol, 59(1):13-23.

Brantley DM., Chen CL., Muraoka RS., Bushdid PB., Bradberry JL., Kittrell F., Medina D., Matrisian LA., Kerr LD., Yull FE. (2001). NF-κB regulates proliferation and branching in mouse mammary epithelium. Mol Biol cell, 12:1445-1455.

Bratasz A., Weir NM., Parinandi NL., Zweier JL., Sridhar R., Ignarro LJ. (2006). Reversal to cisplatin sensitivity in recurrent human ovarian cancer cells by NCX-4016, a nitro derivative of aspirin. Proc Natl Acad Sci U S A : 103:3914–9.

Brennan M., Wilcken N., French J., Ung O., and Boyages J. (2005). Management of early breast cancer-the current approach. Aust. Fam. Physician 34:755-760.

Brian K. Bednarski, Baldwin A., Kim H. (2009). Addressing Reported Pro-Apoptotic Functions of NF-κB: Targeted Inhibition of Canonical NF-κB enhances the Apoptotic Effects of Doxorubicin. PLoS One. 4(9): e6992.

Brinton L.A., Schairer C., Hoover R.N., and Fraumeni J.F. (1988). Menstrual factors and risk of breast cancer. Cancer Invest 6, 245-254.

Britta W., Johannes L., Peterse J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. Nature Reviews Cancer 5, 591-602.

Bullock N., and Fersht A. (2001). Rescuing the function of mutant p53. Nature Reviews Cancer 1, 68-76.

C,

Cachaço A., Carvalho T., Santos AC., Igreja C., Fragoso R., Osório C., Ferreira M., Serpa J., Correia S., Pinto-do-Ó P., Dias S. (2010). TNF-α Regulates the Effects of Irradiation in the Mouse Bone Marrow Microenvironment. PLoS One ; 5(2): e8980.

Campbell RA., Perkins N. (2004). Reprograming RealA. Cell cycle, 3:7, 869-872.

Cardiff RD. (2005). Epithelial to mesenchymal transition tumors: fallacious or snails pace? Clin Cancer res 11: 8534-8537.

Catz SD., and Johnson JL. (2001). Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. Oncogene 20: 7342-51.

Chan DA., Kawahara TL., Sutphan PD., et al. (2009). Tumor vascular is regulated by PHD2-mediated angiogenesis and bone marrow-derived cell recruitment. Cancer cell; 15(6):527-538.

Chatuverdi MM., Sung B., Yadav VR., Annappan RK ., Aggarwal BB. (2011). NF-κB addiction and its role in cancer : 'one size does not fit all'. Oncogene; 30(14):1615-1630.

Chen F., Castranova V., Shi X. (2001). New insights into role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. AJP, vol 159, no2.

Chen R., Alvero AB., Silasi DA., et al. (2008). Regulation of IKKβ by miR-199a affects NF-κB activity of ovarian cancer cells. Oncogene 27, 4712-4723.

Chen W., Zi L., Lang B., Yong L. (2011). NF-kappaB, a mediator for lung carcinogenesis and a target for lung cancer prevention and therapy. Front Biosci : 16: 1172–1185.

Chen X., Zhang J., Lee J., Lin P.S., Ford J.M., Zheng N., and Zhou P. (2006). A kinase independent function of c-Abl in promoting proteolytic destruction of damaged DNA binding proteins. Mol Cell *22*, 489-499.

Chilov D., Kukk E., Taira S., Jeltsch M., Kaukonen J., Palotie A., Joukov V., and Alitalo K. (1997). Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. J Biol Chem 272: 25176-83.

Chodosh L. (2011). Breast cancer: current state and future promise. Breast Cancer Res ; 13(6): 113.

Chuang MJ., Sun KH., Tang SJ., Deng MW., Wu YH., Sung JS., Cha TL., Sun GH. (2008). Tumor-derived tumor necrosis factor alpha promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells. Cancer Sci 99:905-913.

Chu G., and Chang E. (1988). Xeroderma pigmentosum group E cells lack a nuclear factor that binds to damaged DNA. Science *242*, 564-567.

Chua HL., Bhat-Nakshatri P., Clare SE., Morimiya A., Badve S., Nakshatri H. (2007). NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. Oncogene.1;26(5):711-24.

Claudio E., Brown B., Park S., Wang H., and Siebenlist U. (2002). BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. Nat Immunol 3: 958-65.

Cogswall PC., Guttridge DC., Funkhouser WK., Baldwin AS. (2000). Selective activation of NF-κB submits in human breast cancer : potential roles for NF-κB2/p52 and for BCL3. Oncogene, 19:1123-1131.

Connely L., Robinson-Benion C., Chont M., Saint Jean L., Li HJ., Polosukhin W., Blackwell TS., Yull FE. (2007). A transgenic model reveals important roles for the NF-κB alternative pathway (p100/p52) in mammary development and links to tumorigenesis. J Biol chem., 282:10028-10035.

Cooper MP., Balajee AS., Bohr VA.(1999). The C-terminal domain of p21 inhibits nucleotide excision repair In vitro and In vivo. Mol Biol Cell. 10(7):2119-29.

Courtois and Gilmore. (2006). Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. Oncogene 25: 6831-43.

Cummins EP., Berra E., Comerford KM, et al. (2006). Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IkappaB kinase-beta, giving insight into hypoxia-induiced NFkappaB activity. Proc Natl Acad Sci USA; 103(48):18154-18159.

D,

Datta A., Bagchi S., Nag A., Shiyanov P., Adami G.R., Yoon T., and Raychaudhuri P. (2001). The p48 subunit of the damaged-DNA binding protein DDB associates with the CBP/p300 family of histone acetyltransferase. Mutat Res *486*, 89-97.

Degraffenried LA., Chandrasekar B., Friedrichs WE., DonZIS J., Silva J., Hidalgo M., freeman JW., Weiss GR. (2004). NF-κB inhibition markedly enhances sensivity of resistant breast cancer tumor cells to tamoxifen. Annals of oncology, 2004, 15:885-890.

Delhalle S., Blasius R., Dicato M., Diederich M. (2004). A beginner's guide to NF-κB signaling patways. Ann.NY. Acad. Sci. 1030:1-13.

Dhawan P., Su Y., Thu YM., Yu Y., Baugher P., Ellis DL., Sobolik-Delmaire T., Kelley M., Cheung TC., Ware CF., Richmond A. (2008). The lymphotoxin-beta receptor is an upstream activator of NF-kappaB-mediated transcription in melanoma cells. J Biol Chem : 283(22):15399-408.

DeNardo DG., Kim HT., Hilsenbeck S., Cuba V., Tsimelzon A., and Brown PH. (2005). Global gene expression analysis of estrogen receptor transcription factor cross talk in breast cancer: identification of estrogen-induced/activator protein-1-dependant genes. Mol Endocrinol 19, 362-378.

Deryugina E.I., and Quigley J.P. (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. Cancer Metastasis Rev. *25*, 9-34.

Dhar SK., Lynn BC., Daosukho C., and St Clair DK. (2004). Identification of nucleophosmin as an NF-kappaB co-activator for the induction of the human SOD2 gene. J Biol Chem 279, 28209-28219.

Diego U., and Komives E. (2010). Molecular mechanisms of system control of NF-κB signaling by IκBα. Biochemistry , 49, 1560-1567.

Di Léo A., Biganzoli L., Claudino W. et al. (2008). Topoisomerase II alpha as a marker predicting anthracyclines'activity in early breast cancer patients : ready for the primetimes ? Eur j cancer , 44:2791-8.

Dirat B., Bochet L., Dabek M., Daviaud D., Dauvillier S., Majed B., Wang YY., Meulle A., Salles B., Le Gonidec S., Garrido I., Escourrou G., Valet P., Muller C. (2011). Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. Cancer Res. 2011 Apr 1;71(7):2455-65.

Done S. (2011). Livre "Breast cancer. Recent Advances in Biology, Imaging and therapeutic. Edition INTech, p59-78.

Drabsch Y., Ten Dijke P. (2012). TGF-β signalling and its role in cancer progression and metastasis. Cancer Metastasis Rev. DOI: 10.1007/s10555-012-9375-7.

Drasin DJ., Robin TP., Ford HL. (2011). Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition: examining the functional consequences of plasticity. Breast Cancer Res. ;13 (6):226.

Dumitrescu R.G., and Cotarla I. (2005). Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005 ? J. CellMol.Med. 9:208-221.

Dupont J., Le Roith D. (2001). Insulin-like growth factor 1 and oestradiol promote cell proliferation of MCF-7 breast cancer cells: new insights into their synergistic effects. Mol Pathol. 54(3):149-54. Review.

E,

Easwaran H., Johnstone SE., Van Neste L., Ohm J., Mosbruger T., Wang Q., Aryee MJ., Joyce P., Ahuja N., Weisenberger D., Collisson E., Zhu J., Yegnasubramanian S., Matsui W., Baylin SB. (2012). A DNA hypermethylation module for the stem/progenitor cell signature of cancer. Genome Res.

EBCTCG. (2005).Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. Lancet 365:1987-717.

Egeblad M., Nakasone ES., Werb Z. (2010). Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. Dev Cell, 18(6):884-901. Review.

Egeblad M., Werb Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer, (3):161-74. Review

Ellis LM., Liu W., Ahmad SA., et al. (2001). Overview of angiogenesis : biologic implications for antiangiogenic therapy. Semin oncol, 28:48-104.

Ellis M.J., Jenkis S., Hanfelt J., Redington M.E., Taylor M., Leek R., Siddle K., and Harris A. (1998). Insulin growth factors in human breast cancer. Breast Cancer Res Treat 52, 175-184.

El-Mahdy M.A., Zhu Q., Wang Q.E., Wani G., Praetorius-Ibba M., and Wani A.A. (2006). Cullin 4A-mediated proteolysis of DDB2 protein at DNA damage sites regulates in vivo lesion recognition by XPC. J Biol Chem *281*, 13404-13411.

Espinosa L., Bigas A., Mularo MC. (2011). Alternative nuclear fonctions for NF- κB family members. Am J Cancer res; 1 (4): 446-459. Review.

Erler JT., Bennewith KL., Nicolau M. (2006). Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. Nature ;440:1222–1226.

Radisky ES., and Radisky DC. (2010). Matrix metalloproteinase induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 15(2): 201–212.

F,

Fan W., Wong L,. Johnson R. (2005). EGFR kinase possesses a broad specificity for ErbB phosphorylation sites, and ligand increases catalytic-centre activity without affecting substrate binding affinity Biochem J; 392(Pt 3): 417–423.

Fei J., Kaczmarek N., Luch A., Glas A., Carell T., and Naegeli H. (2011). Regulation of Nucleotide Excision Repair by UV-DDB: Prioritization of Damage Recognition to Internucleosomal DNA. PLoS Biol.; 9(10): e1001183.

Feldberg R.S., and Grossman L. (1976). A DNA binding protein from human placenta specific for ultraviolet damaged DNA. Biochemistry *15*, 2402-2408.

Feldberg R.S., Lucas J.L., and Dannenberg A. (1982). A damage-specific DNA binding protein. Large scale purification from human placenta and characterization. J Biol Chem *257*, 6394-6401.

Fitch M.E., Cross I.V., Turner S.J., Adimoolam S., Lin C.X., Williams K.G., and Ford J.M. (2003). The DDB2 nucleotide excision repair gene product p48 enhances global genomic repair in p53 deficient human fibroblasts. DNA Repair (Amst) *2*, 819-826.

Fitch M.E., Nakajima S., Yasui A., and Ford J.M. (2003). In vivo recruitment of XPC to UV induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product. J Biol Chem *278*, 46906-46910.

Ferrara N. (2009). VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. Eur Cytokine Netw :158-63. Review.

Foekens, J. A. *et al*. The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. Cancer Res. 60, 636–643 (2000).

G, H,

Gao Z., Chiao P., Zhang Xia., Zhang X., Lazar M., Seto E., Young H., Ye J. (2005). Coactivators and corepressors of NF-kappaB in IkappaB alpha gene promoter. JBC as manuscript M500754200.

Gang G., Wang LC., David A., and Ping Chi. (2006). Chromatin remodeling and cancer, part II: ATP-dependent chromatin remodeling. Nat Struct; Mol.Biol. Vol13:p902-907.

Giangrande PH., Pollio G., and McDonnell DP. (1997). Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differenctial activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. J Biol Chem 272, 32889-32900.

Gilles C., Polette M., Mestdagt M., Nawrocki-Raby B., Ruggeri P., Birembaut P., Foidart JM. (2003). Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. Cancer Res: May 15; 63(10):2658-64.

Ginestier C., Korkava H., Dontu G., Birnbaum D., Wicha MS., and Charafe-Jauffret E. (2007). The cancer stem cell: the breast cancer driver. Med Sci. 23:1133-9.

Glück S., Arteaga CL., Osborne CK. (2011). Optimizing chemotherapy-free survival for the ER/HER2-positive metastatic breast cancer patient. Clin Cancer Res ;17(17):5559-61.

Gorlach A., Bonello S. (2008). The cross-talk between NF-κB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. Biochem J:412, e17-e19.

Gospodarowioz D., and Thaknal KK. (1978). Production a corpus luteum angiogenic factor responsible for proliferation of capillaries and neovascularization of the corpus luteum. Proc Natl Acad Sci USA, 75(2): 847-51.

Groisman R., Polanowska J., Kuraoka I., Sawada J., Saijo M., Drapkin R., Kisselev A.F., Tanaka K., and Nakatani Y. (2003). The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. Cell 113, 357-367

Guerrero-Santoro J., Kapetanaki M.G., Hsieh C.L., Gorbachinsky I., Levine A.S., and Rapic-Otrin V. (2008). The cullin 4B-based UV-damaged DNA-binding protein ligase binds to UV-damaged chromatin and ubiquitinates histone H2A. Cancer Res *68*, 5014-5022.

Guinebretiere J.M. (2005).Angiogenesis and breast neoplasms. The pathologist's point of view. Gynecol. Obstet.Fertil. 33:140-146.

Guo S., Liu M., Gonzalez-Perez RR. (2011). Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. Biochim Biophys Acta:1815(2):197-213.

Han SS., Yun H., Son DJ., Tompkins VS., Peng L., Chung ST., Kim JS., Park ES., Janz S. (2010). NF-kappaB/STAT3/PI3K signaling crosstalk in Myc and B lymphoma. Mol Cancer : 30;9:97.

Han YP, Tuan TL, Wu H, Hughes M, Garner WL. (2001). TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. J Cell Sci : 131-139.

Hanahan D., and Weinberg R.A. (2000). The hallmarks of cancer. Cell 100:57-70.

Hanahan D., Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144:646-674.

Hanno E., Vangelis K., Heinrichsdorff J., Ochoa-Callejero L., Roskams T., Pasparakis P. (2011). Hepatocyte IKK2 Protects Mdr2$^{-/-}$ Mice from Chronic Liver Failure.PLoS One: e25942.

Hartman A.R., and Ford J.M. (2003). BRCA1 and p53: compensatory roles in DNA repair. J Mol Med *81*, 700-707.

Hayden MS., Ghosh S. (2008). Shared principles in NF-κB signaling. Cell, 132:344-362.

Hayes S., Shiyanov P., Chen X., and Raychaudhuri P. (1998). DDB, a putative DNA repair protein, can function as a transcriptional partner of E2F1. Mol Cell Biol *18*, 240-249.

Heimann R., and Hellman,S. (2000). Individual characterisation of the metastatic capacity of human breast carcinoma. Eur. J. Cancer 36:1631-1639.

Helbig G., Christopherson KW 2nd., Bhat-Nakshatri P., Kumar S, Kishimoto H., Miller KD., Broxmeyer HE., Nakshatri H. (2003). NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4.J Biol Chem; 278(24):21631-8.

Higa, L.A., Wu, M., Ye, T., Kobayashi, R., Sun, H., and Zhang, H. (2006). CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation. Nat Cell Biol *8*, 1277-1283.

Himelstein BP, Lee EJ, Sato H, Seiki M, Muschel RJ. (1997). Transcriptional activation of the matrix metalloproteinase-9 gene in an H-ras and v-myc transformed rat embryo cell line. Oncogene ;14(16):1995-8.

Hitchler M.J., Oberley L.W., and Domann F.E. (2008). Epigenetic silencing of SOD2 by histone modifications in human breast cancer cells. Free Radic Biol Med *45*, 1573-1580.

Hitchler M.J., Wikainapakul K., Yu L., Powers K., Attatippaholkun W., and Domann, F.E. (2006). Epigenetic regulation of manganese superoxide dismutase expression in human breast cancer cells. Epigenetics *1*, 163-171.

Hendrix MJ., Muschel RJ., Padarathsingh M. (1997). Recent advances in breast cancer research: from genes to management. Am J Pathol: 151(3):883-8.

Ho FM., Lin WW., Chen BC. (2006). High glucose-induced apoptosis in human vascular endothelial cells is mediated through NF-kappaB and c-jun NH2 terminal kinase pathways and prevented by PI3K/akt/eNOS pathway. Cell signal 18:391-399.

Hodge DR., Peng B., Pompeia C., Thomas S., Cho E., Clausen PA., Marquez VE., and Farrar WL. (2005). Cancer Biol Ther 4, 585-582.

Holley AK., XuY., St. Clair D., St. Clair W. (2011). RelB regulates manganese superoxide dismutase gene and resistance to ionizing radiation of prostate cancer cells. Ann N Y Acad Sci. 1201: 129–136.

Horiuchi D., Kusdra L., Huskey NE., Chandriani S., Lenburg ME., Gonzalez-Angulo AM., Creasman KJ., Bazarov A., Smyth JW., Davis SE., Yaswen P., Mills GB.., Esserman LJ, Goga A. (2012). MYC pathway activation in triple-negative breast cancer is synthetic lethal with CDK inhibition. J Exp Med:209(4):679-96. Epub 2012 Mar 19

Houssami N., Cuzick J., and Dixon J.M. (2006). The prevention, detection, and management of breast cancer. Med. J.Aust. 184:230-234.

Huber MA., Azoitei N., Baumann B., Grunert S., Sommer A., Pehamberger H., kraut N., Beug H., Wirth T. (2004). NF-κB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. J Clin Invest, 114:569-581.

Hu Z., Shao M., Yuan J., Xu L., Wang F., Wang Y., Yuan W., Qian J., Ma H., Liu H. (2006). Polymorphisms in DNA damage binding protein 2 (DDB2) and susceptibility of primary lung cancer in the Chinese: a case-control study. Carcinogenesis *27*, 1475-1480.

Hubert MA., Beug J., Wirth T. (2004). Epithelial-mesenchymal transition : NF-κB takes center stage. Cell cycle; 3(12): 1477-88.

Hwang B.J., Ford J.M., Hanawalt P.C., and Chu G. (1999). Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 424-428.

I, J,

IARC, Academie de Medecine, Académie des Sciences, Fédération des centres de Lutte contre le cancer (2007). Attribuable causes of cancer in France in the year 2000. IARC working group reports Vol 3 IARC, Lyon.

Inoki T., Yamagami S., Inoki Y., Tsuru T., Hamamoto T., Kagawa Y., Mori T., and Endo H. (2004). Human DDB2 splicing variants are dominant negative inhibitors of UV-damaged DNA repair. Biochem Biophys Res Commun *314*, 1036-1043.

Inoue J., Gohda J., Akiyama T., and Semba K. (2007). NF-kappa B activation in developemnt and progression of cancer. Cancer Science: 98: 268-274.

Itoh T. (2006). Xeroderma pigmentosum group E and DDB2, a smaller subunit of damage-specific DNA binding protein: proposed classification of xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and ultraviolet sensitive syndrome. J Dermatol Sci *41*, 87-96.

Itoh T., Cado D., Kamide R., and Linn S. (2004). DDB2 gene disruption leads to skin tumors and resistance to apoptosis after exposure to ultraviolet light but not a chemical carcinogen. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 2052-2057.

Itoh T., Iwashita S., Cohen M.B., Meyerholz D.K., and Linn S. (2007). Ddb2 is a haploinsufficient tumor suppressor and controls spontaneous germ cell apoptosis. Hum Mol Genet *16*, 1578-1586.

Ito T., kitamura H., Uwatoko C., Azumano M., Itoh K. and Kuwahara J. (2010). Interaction of Sp1 zinc finger with transport factor in the nuclear localization of transcription factor Sp1. Biochemical and biophysical research communications , 403, 161-166.

Itoh T., Mori T., Ohkubo H., and Yamaizumi M. (1999). A newly identified patient with clinical xeroderma pigmentosum phenotype has a non-sense mutation in the DDB2 gene and incomplete repair in (6-4) photoproducts. J Invest Dermatol 113, 251-257.

Itoh T., O'Shea C, Linn S. (2003). Impaired regulation of tumor suppressor p53 caused by mutations in the xeroderma pigmentosum DDB2 gene: mutual regulatory interactions between p48 (DDB2) and p53. Mol cell Biol, 23:7540-7553.

Israel A. (2000). The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? Trends Cell Biol 10: 129-33.

Ivanov V., Ronai Z. (2000). P38 protects human melanoma cells from UV-induced apoptosis through down-regulation of NF-kappa B activity and Fas expression. Oncogene 19, 3003-12.

Iwanaga R., Ozono E., Fujisawa J., Ikeda MA., Okamura N., Huang Y., and Ohtani K. (2008) Activation of the cyclin D2 and cdk6 genes through NF-kappaB is critical for cell-cycle progression induced by HTLV-I Tax. *Oncogene*; 27(42):5635-42.

Jacobsen B.M., Richer J.K., Schittone S.A., and Horwitz K.B. (2002). New human breast cancer cells to study progesterone receptor isoform ratio effects and ligand-independent gene regulation. J Biol Chem *277*, 27793-27800.

Jeyakumar A, Younis T. (2012). Trastuzumab for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer: Clinical and Economic Considerations. Clin Med Insights Oncol. 2012; 6:179-87.

Jiang L., Lin C., Song L., Wu J., Chen B., Ying Z., Fang L., Yan X., He M., Li J., and Li M. (2012). MicroRNA-30e* promotes human glioma cell invasiveness in an orthotopic xenotransplantation model by disrupting the NF-kappaB/IkappaB-alpha negative feedback loop. The journal of clinical Investigation; 122(1):33-47.

Jiang AR., Gao CM., Ding JH., Li SP., Liu YT., Cao HX., Wu JZ., Tang JH., Qian ., Tajima K. (2012). Abortions and breast cancer risk in premenopausal and postmenopausal women in Jiangsu Province of China. Asian Pac J Cancer ;13(1):33-5.

Jing Y., Han Z., Zhang S., Liu Y., Wei L. (2011). Epithelial-mesenchymal transition in tumor microenvironment. Cell and bioscience, 1:29.

Josson S., Xu Y., Fang F., Dhar SK., St Clair DK., and St Clair WH. (2006). RelB regulates manganese superoxide dismutase gene and resistance to ionizing radiation of prostate cancer cells. Oncogene 25, 1554-1559.

Jost PJ., Ruland J. (2007). Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. Blood:109(7):2700-7. Review.

Jung YJ., Isaacs JS., Lee S., Trepel J., Necker L. (2003). IL-1β-mediated up-regulation of HIF-1 alpha via an NF-κB/COX2 pathway identifies HIF-1 alpha as a critical link between inflammation and oncogenesis. Faseb J 17:2115-2117.

K, L,

Kaaks R., Bellati C., Venturelli E., Rimaldi S., Secreto G., Biessy C., Pala V., Sieri S., and Berrino F. (2003). Effects of dietary intervention on IGF-binding proteins, and related alterations in sex steroid metabolism: the diet and Androgens (DIANA) Randomised Trial. Eur J Clin Nutr 57, 1079-1088.

Kakonen SM., Selander KS., Chirgwin JM., Yin JJ., Burns S., Rankin WA. (2002). Transforming growth factor-beta stimulates parathyroid hormone-related protein and osteolytic metastases via Smad and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. J Biol Chem ;277(27):24571–24578.

Kalkhoven E. (2004). CBP and p300: HATs for different occasions. Biochem. Pharmacol. *68*, 1145-1155.

Kalluri R., Weinberg RA. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest : 119(6):1420-8. Review.

Kaltschmidt B., Kaltschmidt C., Hehner SP., Droge W., Schmitz ML. (1999).Repression of NF-κB impairs HeLa cell proliferation by functional interference with cell cycle checkpoint regulators. Oncogene : 18:3213-3225.

Kapetanaki M.G., Guerrero-Santoro J., Bisi D.C., Hsieh C.L., Rapic-Otrin V., and Levine A.S. (2006). The DDB1-CUL4ADDB2 ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 2588-2593.

Karihtala P., Winqvist R., Syvaoja J.E., Kinnula V.L., and Soini Y. (2006). Increasing oxidative damage and loss of mismatch repair enzymes during breast carcinogenesis. Eur J Cancer *42*, 2653-2659.

Karin M., and Ben-Neriah M. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. Annu Rev Immunol 18: 621-63.

Kastmann A., Umezawa K., Bonavida B. (2009). Chemosensitization and immunosensitizization of resistant cancer cells to apoptosis and inhibition of metastasis by the specific NF-κB inhibitor DHMEQ. Curr. Pharm. Des 15: 792-808.

Kattan Z., Marchal S., Brunner E., Ramacci C., Leroux A., Merlin J.L., Domenjoud L., Dauca M., and Becuwe P. (2008a). Damaged DNA binding protein 2 plays a role in breast cancer cell growth. PLoS ONE *3*, e2002.

Kattan Z., Minig V., Leroy P., Dauca M., and Becuwe P. (2008b). Role of manganese superoxide dismutase on growth and invasive proprieties of human estrogen-independant breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat 108, 203-215.

Kaur N., Ranjan A., Tiwari V., Aneja R., Tandon V. (2012). DMA, a Bisbenzimidazole, Offers Radioprotection by Promoting NFκB Transactivation through NIK/IKK in Human Glioma Cells. PLoS One ;7(6):e39426.

Keane M., Rubinstein Y., Cuello M., Ettenberg S., et al. (2001). Inhibition of NF-kappaB activity enhances TRAIL mediated apoptosis in breast cancer cell lines. Breast cancer res treat 64, 211-9.

Keeney S., Chang G.J., and Linn S. (1993). Characterization of a human DNA damage binding protein implicated in xeroderma pigmentosum E. J Biol Chem *268*, 21293-21300.

Keeney S., Eker A.P., Brody T., Vermeulen W., Bootsma D., Hoeijmakers J.H., and Linn S. (1994). Correction of the DNA repair defect in xeroderma pigmentosum group E by injection of a DNA damagebinding protein. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 4053-4056.

Key TJ., Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, Appleby PN, Reeves GK, Roddam AW.(2010). Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies. Lancet Oncol: (6):530-42.

Kim A., Kim MJ., yang Y., et al. (2009). Suppression of NF-κB activity by NDRG2 expression attenuates the invasive potential of highly malignant tumor cells. Carcinogenesis; 30(6): 927-936.

Kim I., Moon S.O., Kim S.H., Kim H.J., Koh Y.S., and Koh G.Y. (2001). Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. J Biol Chem *276*, 7614-7620.

Kim JM., Voll RE., Ko C., Kim DS., Park KS,. Kim SY. (2008). A new regulatory mechanism of NF-kappaB activation by I-kappaBbeta in cancer cells. J Mol Biol ;384(4):756-65.

Kim Y., and Kipreos E.T. (2007). Cdt1 degradation to prevent DNA re-replication: conserved and non-conserved pathways. Cell Div *2*, 18.

Kiriakidis S., Andreakos E., Monaco C., Foxwell B., Feldmann M., Paleolog E. (2003). VEGF expression in human macrophages is NF-kappaB-dependent: studies using adenoviruses expressing the endogenous NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha and a kinase-defective form of the IkappaB kinase 2. J Cell Sci ; 116 (Pt 4):665-74.

Khramtsov AI., Khramtsova GF., Tretiakova M., Huo D., Olopade OI., Goss KH.(2010). Wnt/beta-catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome. Am J Pathol: (6):2911-20.

Korsching E, Packeisen J, Liedtke C, Hungermann D, Wülfing P, van Diest PJ, Brandt B, Boecker W, Buerger H. The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? J Pathol. 206(4):451-7.

Kucharczak J., Simmons MJ., Fan Y., and Gelinas C. (2003). To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. Oncogene 22: 8961-82.

Kunigal S, Lakka SS, Joseph P, Estes N, Rao JS. (2008). Matrix metalloproteinase-9 inhibition down-regulates radiation-induced nuclear factor-kappa B activity leading to apoptosis in breast tumors. Clin Cancer Res ;14(11):3617-26.

Kwon HC., Kim SH., Oh SY., Lee S., Kwon KA., Lee JH., Choi HJ., Park KJ., Lee H.S., Roh MS., Kim HJ. (2010). Clinicopathological significance of nuclear factor-kB, HIF-1a, and vascular endothelial growth factor.Expression in stage III colorectal cancer. Cancer Sci 101: 1557–1561.

Lee SH., Hannink M. (2001). The N-terminal Nuclear Export Sequence of IkappaB alpha is required for RanGTP-dependent binding to CRM1. The journal of biological chemistry:276, 23599-23606.

Liao DJ and Dickson RB. (2000). C-Myc in breast cancer. Endocr Relat Cancer 7: 143-164.

Lilienbaum A., Paulin D. (1993). Activation of the human vimentin gene by the Tax human T-cell leukemia virus. I. Mechanisms of regulation by the NF-kappa B transcription factor. J Biol Chem ;268(3):2180-8.

Lechertier T., Berard M., Vassy R., Herve MA., Crepin M. (2004). Transendothelial Migration of Two Metastatic Breast Carcinoma Cells Depend on the SDF-1·-CXCR4 Complexes. Anticancer research 24: 4011-4018.

Le Romancer M., Poulard C., Chen P., Sentis S., Rnoir J., Corbo L. (2011). Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. Endocrine Reviews, 32(5) : 597-622.

Lilienbaum A., Duc D., Alexandre C., Gazzolo L., Paulin D. (1990). Effect of human T-cell leukemia virus type I tax protein on activation of the human vimentin gene. J. Virol 64:256-263.

Li JJ., Oberley LW., St Clair DK., Ridnour LA., and Oberley TD. Phenotypic changes induced in human breast cancer cells by overexpression of manganese-containing superoxide dismutase. Oncogene 10, 1989-2000.

Li L., Nakajima M., Kapetanaki MG., Hsieh CH., Fagerburg M., Thickman K., Rodriguez-Collazo P.,. Leuba S., Levine A.S., Rapić-Otrin V. (2012). J Biol Chem ; 287(15): 12036–12049.

Li QQ., Chen ZG., Cao CC., Xu JD., Chen Y., Wang WJ., Chen Q., Tang F., Liu XP., Xu ZD. (2011). Involvement of NF-κB/miR-448 regulatory feedback loop in chemotherapy induced epithelial mesenchymal transition of breast cancer cells. Cell Death and Differenciation 18, 16-25.

Lin YZ, Yao S, Veach RA, Torgerson TR, Hawiger J. (1995). Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-κB by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. J Biol Chem;270:14255-8.

Lin Y., Bai L, Chen W., and Xu S. (2010). The NF-kappaB activation pathways, emerging mo.lecular targets for cancer prevention and therapy. Expert Opin Ther Targets 14: 45-55.

Lin X., Zhang X., Wang Q., Li J., Zhang P., Zhao M., Li X. (2012). Perifosine downregulates MDR1 gene expression and reverses multidrug-resistant phenotype by inhibiting PI3K/Akt/NF-κB signaling pathway in a human breast cancer cell line. Neoplasma ;5 9(3):248-56.

Liu W., Nichols A.F., Graham J.A., Dualan R., Abbas A., and Linn, S. (2000). Nuclear transport of human DDB protein induced by ultraviolet light. J Biol Chem *275*, 21429-21434.

Lodygin D., Epanchintsev A., Menssen A., Diebold J., and Hermeking H. (2005). Functional Epigenomics identifies genes frequently silenced in prostate cancer. Cancer Res; 65:4218-4227.

Liu Z., Goeddel V., Karin M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions : JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. Cell, 87, 565-576.Lu Y., Zi X., Pollak M. (2004). Molecular mechanism underlying IGF-I-induced attenuation of the growth inhibitory activity of trastuzumab on SKBR3 breast cancer cells. Int J Cancer; 108: 334-41.

López-Otín C, Hunter T. (2010). The regulatory crosstalk between kinases and proteases in cancer. Nat Rev Cancer: 10(4):278-92. Epub 2010 Mar 19.

Lu X., Mu E., Wei Y., Riethdorf S., Yang Q., Yuan M., Yan J., Hua Y., Tiede BJ., Lu X., Haffty BG., Pantel K, Massagué J, Kang Y. (2011). VCAM-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging α4β1-positive osteoclast progenitors. Cancer Cell ;20(6):701-14.

Lu Z., Li Y., Takwi A.(2011). MiR-301a as an NF-κB activator in pancreactic cancer cells. EMBO J. 30, 57-67.

Luijsterburg M., Lindh M., Acs M., Vrouwn M., Pines A., Attikum H., Mullenders L., Dantuma N. (2012). DDB2 promotes chromatin decondensation at UV-induced DNA damage. JCB:201106074.

Luo JL., Maeda S., Hsu LC., Yagita H., Karin M. (2004). Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. Cancer Cell.;6(3):297–305.

M, N,

Ma L., Teruya-Feldstein J., Weinberg RA. (2007). Tumor Invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. Nature; 449:682-688.

Ma X., Becker E., Barker J., Li Y. (2011). MicroRNAs in NF-κB signaling. Journal of Molecular Cell Biology, 3, 159-166.

MacMahon B, Cole P, Lin TM, Lowe CR, Mirra AP, Ravnihar B, Salber EJ, Valaoras VG, Yuasa S. (1970). Bull World Health Organ; 43(2):209-21.

Maity G., Paromita R., Triparna Sen., Kirat K and Hrishikesh Sil. (2009). Culture of human breast cancer cell line (MDA-MB-231) on fibronectin-coated surface induces pro-matrix metalloproteinase-9 expression and activity.Tumor Biology, Volume 32, Number 1, Pages 129-138.

Malkas LH., Herbert BS,. Abdel-Aziz W., Dobrolecki LE., Liu Y, Agarwal B., Hoelz D., Badve S., Schnaper L., Arnold RJ., Mechref Y., Novotny MV., Loehrer P., Goulet RJ., Hickey RJ. (2006). A cancer-associated PCNA expressed in breast cancer has implications as a potential biomarker. Proc Natl Acad Sci U S A. ;103 (51):19472-7.

Manna S., Aggarwal B. (1999). LPS inhibits TNF-induced apoptosis: role of NF-kappa B activation and reactive oxygen intermediates. J. Immunol, 162, 1510-8.

Martin FT., Dwyer RM., Kelly J., Khan S., Murphy JM., Curran C., Miller N., Hennessy E., Dockery P., Barry FP., O'Brien T., Kerin MJ. (2010). Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumor microenvironment: stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT). Breast Cancer Res Treat, 124:317-26.

Martinez E., Palhan V.B., Tjernberg A., Lymar E.S., Gamper A.M., Kundu T.K., Chait B.T., and Roeder R.G. (2001). Human STAGA complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo. Mol Cell Biol *21*, 6782-6795.

Massagué J. (2008). TGF-β in cancer. Cell 134.07.001.

Mauriac L., Durand M., Bonichon F., and Chauvergne J. (1986). Hormonotherapy of metastatic breast cancer with tamoxifen and medroxyprogesterone acetate. Randomized trial comparing alternating sequences with successive applications. Bull cancer 73, 148-154.

McGowan E.M., Saad S., Bendall L.J., Bradstock K.F., and Clarke C.L. (2004). Effect of progesterone receptor a predominance on breast cancer cell migration into bone marrow fibroblasts. Breast Cancer Res Treat *83*, 211-220. 11108.

McSherry E.A., Donatello S., Hopkins A.M., and McDonnell S. (2007). Molecular basis of invasion in breast cancer. Cell Mol Life Sci *64*, 3201-3218.

Medici D., Nawshad A. (2010). Type I collagen promotes epithelial-mesenchymal transition through ILK-dependent activation of NF-kappaB and LEF-1. Matrix Biol (3):161-5.

Melisi D., Jiangong N., Zhe C., Qianghua X., Bailu P., Satoshi I., Douglas B., Paul J. Chiao. (2009). Secreted Interleukin-1α Induces a Metastatic Phenotype in Pancreatic Cancer by Sustaining a Constitutive Activation of Nuclear Factor-κB.Mol Cancer Res ; 7(5): 624–633.

Merkhofer E., Cogswell P., Baldwin A. (2010). Her2 Activates NF-κB and induces invasion through the canonical pathway involving IKKα. Oncogene ; 29(8): 1238–1248.

Miao X., Yu C., Tan W. (2003). A functional polymorphism in the Matrix Metalloproteinases-2 Gene promoter (-1306C/T) is associated with Risk of development but not metastasis of gastric cardia adenocarcinoma. Cancer res; 63:3987-3990.

Midwood K., Gertraud O. (2009). The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. J Cell Commun Signal ; 3(3-4): 287–310.

Min C., Sean F., Sherr D., Sonenshein G. (2008). NF-*κ*B and epithelial to mesenchymal transition of cancer. Journal of Cellular biochemistry 104:733-744.

Min J. , Zaslavsky A., Fedele G., McLaughlin S.K., Reczek E., De Raedt T., Guney I., Strochlic D., Beroukhim., Bronson R., Ryeom S., Hahn W., Loda M., Cichowski K.(2010). An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and NF-κB. Nat Med. 16(3): 286–294.

Minig V., Kattan Z., Van Beeumen J., Brunner E., Becuwe P. (2009). Identification of damaged DNA binding 2 proteine as a transcriptional regulaor of the constitutive SOD2 gene expression in human breast cancer cells. J Biol Chem 22; 284(21):14165-76.

Mittendorf EA., Liu Y., Tucker SL., McKenzie T., Qiao N., Akli S., Biernacka A., Liu Y., Meijer L., Keyomarsi K., Hunt KK. (2010). A novel interaction between HER2/neu and cyclin E in breast cancer. Oncogene ;29(27):3896-907.

Moasser M.M. (2007). The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role inhuman cancer pathogenesis. Oncogene *26*, 6469-6487.

Montesano R., Soulie P., Eble JA., Carrozzino F. (2005). Tumor necrosis factor alpha confers an invasive, transfirmed phenotype on mammary epitthelial cells. J Cell Sci 118:3487-3500.

Morais C., Gobe G., Johnson DW., Healy H.(2011). The emerging role of nuclear factor kappa B in renal cell carcinoma. Int J Biochem Cell Biol :43(11):1537-49. Review.

Morris R. (2006).Trastuzumab and Beyond: New Possibilities for the Treatment of HER2-Positive Breast Cancer by SHANNON Medical Oncology Fellow.

Mukhopadhyay S., Das S.K., and Mukherjee S. (2004). Expression of Mn-Superoxide Dismutase Gene in Nontumorigenic and Tumorigenic Human Mammary Epithelial Cells. J Biomed Biotechnol *2004*, 195-202.

Muller A., Homey B., Soto H. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature; 410:50-6.

Mueller KL., Hunter LA., Ethier SP., Boerner JL. (2008). Met and c-Src cooperate to compensate for loss of epidermal growth factor receptor kinase activity in breast cancer cells. Cancer Res; 68:3314-3322.

Nag A., Bondar T., Shiv S., and Raychaudhuri P. (2001). The xeroderma pigmentosum group E gene product DDB2 is a specific target of cullin 4A in mammalian cells. Mol Cell Biol *21*, 6738-6747.

Narod SA. (2012). A model for breast cancer risk based on stem-cell theory. A Countercurrents Series. Curr Oncol, 19(1):9-11.

Naugler E., and Karin M. (2008). NF-κB and cancer-Identifying targets and mechanisms. Curr opin Genet Dev; 18 (1):19-26.

Nelson KK., Melendez JA. (2004). Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. Free Radic Biol Med.15;37(6):768-84.

Nguyen DX., Bos PD., and Massague J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specificcolonization. Nat Rev Cancer 9, 274-284.

Nichols A.F., Itoh T., Graham J.A., Liu W., Yamaizumi M., and Linn S. (2000). Human damagespecific DNA-binding protein p48. Characterization of XPE mutations and regulation following UV irradiation. J Biol Chem *275*, 21422-21428.

Nichols A.F., Itoh T., Zolezzi F., Hutsell S., and Linn S. (2003). Basal transcriptional regulation of human damage-specific DNA-binding protein genes DDB1 and DDB2 by Sp1, E2F, N-myc and NF1 elements. Nucleic Acids Res *31*, 562-569.

Nichols A.F., Ong P., and Linn S. (1996). Mutations specific to the xeroderma pigmentosum group E Ddb-phenotype. J Biol Chem 271, 24317-24320.

Nicholini A., Carpi A, And Tarro G. (2006). Biomolecular markers of breast cancer. Front Biosci 11, 1818-1843.

Nikolopoulos SN., Blaikie P., Yoshioka T., Guo W., Puri C., Tacchetti C., Giancotti FG. (2005). Targeted deletion of the integrin beta4 signaling domain suppresses laminin-5-dependent nuclear entry of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB, causing defects in epidermal growth and migration. Mol Cell Biol. (14):6090-102.

Nishikawa M., Hyoudou K., Kobayashi Y., Umeyama Y., Takakura Y., and Hashida M. (2005). Inhibition of metastatic tumor growth by targeted delivery of antioxidant enzymes. J Control release 109, 101-107.

Agnès Noël., Ana Gutiérrez-Fernández, Nor Eddine Sounni, Niels Behrendt, Erik Maquoi, Ida K. Lund, Santiago Cal, Gunilla Hoyer-Hansen, and Carlos López-Otín. (2012). New and Paradoxical Roles of Matrix Metalloproteinases in the Tumor Microenvironment. Front Pharmacol ; 3: 140.

O, P,

Osborne C., Wilson P., and Tripathy D. (2004). Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. Oncologist. 9:361-377.

Osborn L., Kunkel S., and Nabel GJ. (1989). Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. Proc Natl Acad Sci U S A 86: 2336-40.

Ossareh-Nazari B., Bachelerie F., Dargemont C. (1997). Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. Science 3; 278(5385):141-4.

Otrin V.R., McLenigan M., Takao M., Levine A.S., and Protic M. (1997). Translocation of a UVdamaged DNA binding protein into a tight association with chromatin after treatment of mammalian cells with UV light. J Cell Sci 110 (Pt 10), 1159-1168.

Padua D., Zhang X., Wang Q., Nadal C., Gerald W., Gomis R., Massagué J. (2008). TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. Cell 133, 66-77.

Patel NM., Nozaki S., Shortle N., nakshatri B., Newton R., Rice S., Gelfanov V., Boswell S., Sledge G., Nakshatri H. (2000). Paclitaxel sensivity of breast cancer cells with constitutively active NF-κB is enhanced by IkappaB alpha super-repressor and parthenolide. Oncogene 19, 4159-4169.

Penault-Lorca F, André F, Sagan C et al. (2009). KI67 expression and docetaxel efficacy in patients with oestrogen receptor-positive breast cancer. J Clin Oncol , 27(17):280915.

Perou CM., Sorlie T., Eisen MB. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. Nature; 406(6797):747-52.

Pianetti S., Arsura M., Romieu-Mourez R., Coffey RJ., Sonenshein GE. (2001). Her-2/neu overexpression induces NF-kappaB via PI3-kinase/akt pathway involving calpain-mediated degradation of IkappaB-alpha that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN. Oncogene; 20:1287-1299.

Platet N., Cathiard A.M., Gleizes M., and Garcia M. (2004). Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. Crit Rev. Oncol. Hematol. 51:55-67.

Polyak K. (2001). On the birth of breast cancer. Biochim. Biophys. Acta 1552:1-13.

Polyak, K. (2007). Breast cancer: origins and evolution. The journal of Clinical Investigation. 117:3155-3163.

Powell E., Shanle E., Brinkman A., Li J., Keles S., Wisinski KB., Huang W., Xu W. (2012). Identification of estrogen receptor dimer selective ligands reveals growth-inhibitory effects on cells that co-express ERα and ERβ. PLoS One : 7(2):e30993.

Praetorius-Ibba M., Wang Q.E., Wani G., El-Mahdy M.A., Zhu Q., Qin S., and Wani A.A. (2007). Role of Claspin in regulation of nucleotide excision repair factor DDB2. DNA Repair (Amst) *6*, 578-587.

Prasad S., Ravindran J., Aggarwal B. (2011). NF-*κ*B and cancer: how intimate is this relationship. Mol Cell Biochem. 336(1-2): 25–37.

Prigent M., Barlat I., Langen H., Dargemont C. (2000). IkappaB alpha and kIappaB alpha /NF-kappaB complexes are retained in the cytoplasm through interaction with a novel partener, RasGAP SH3-binding Protein 2. The journal of biological chemistry: 275, 36441-36449.

Prost S., Lu P., Caldwell H., and Harrison D. (2007). E2F regulates DDB2: consequences for DNA repair in Rb-deficient cells. Oncogene *26*, 3572-3581.

Q, R,

Rae C., Langa S., Tucker SJ., MacEwan DJ. (2007). Elevated NF-kappaB responses and FLIP levels in leukemic but not normal lymphocytes : reduction by salicylate allows TNF-induced apoptosis. Proc natl Acad Sci USA; 104(31): 12790-12795.

Rapic-Otrin V., Navazza V., Nardo T., Botta E., McLenigan M., Bisi D.C., Levine A.S., and Stefanini M. (2003). True XP group E patients have a defective UV-damaged DNA binding protein complex and mutations in DDB2 which reveal the functional domains of its p48 product. Hum Mol Genet *12*, 1507-1522.

Rehman A., Wang CY. (2008). SDF-1 alpha promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma by activating NF-κB. Journal of biological chemistry, vol 283, no 29, 19888-19894.

Ridnour LA., Oberley TD., and Oberley LW. (2004). Tumor suppressive effects of MnSOD overexpression may involve imbalance in peroxide generation versus peroxide removal. Antioxid Redox Signal 6, 501-512.

Rochefort M. (2008). Cancérogénèse hormonale chez la femme: des mécanismes à la prévention. CR Biologie 331 : 104-13.

Romieu-Mourez R., Landesman-Bollag E., Seldin DC., Sonenshein GE. (2002). Protein kinase CK2 promotes aberrant activation of nuclear factor-kappaB, transformed phenotype, and survival of breast cancer cells. Cancer res; 62(22):6770-8.

Rose A.A., and Siegel P.M. (2006). Breast cancer-derived factors facilitate osteolytic bone metastasis. Bull Cancer *93*, 931-943.

Rosette C., Roth R., Oeth P., Braun A., Kammerer S., Ekblom J., Denissenko M. (2005). Role of I-CAM1 in invasion of human breast cancer cells. Carcinogenesis vol.26 no.5, 943-950.

Rudolph D., Yeh WC., Wakkehem A., Rudolph B., et al. (2000). Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. Gnes Dev 14, 854-62.

Roy N., Stoyanova T., Dominguez-Brauer C., Park HJ., Bagchi S., Raychaudhuri P. (2010). DDB2, an essential mediator of premature senescence. Mol Cell Biol , (11):2681-92.

Roy N., Bagchi S., Raychaudhuri P. (2012). Damaged DNA Binding Protein 2 in Reactive Oxygen Species (ROS) Regulation and Premature Senescence. *Int. J. Mol. Sci :* 11012-11026.

S,

Saito N., Courtois G., Chiba A., Yamamoto N., Nitta T., Hironaka N., Rowe M., Yamamoto N., and Yamaoka S. (2003). Two carboxyl-terminal activation regions of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activate NF-kappaB through distinct signaling pathways in fibroblast cell lines. J Biol Chem 278: 46565-75.

Sachdev D., Singh R., Fujita-Yamaguchi Y., Yee D. (2006). Down regulation of insulin growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. Cancer res, 66: 2291-402.

Shiyanov P., Hayes SA., Donepudi M., Nichols AF., Linn S., Slagle BL., Raychaudhuri P.(1999). The naturally occurring mutants of DDB are impaired in stimulating nuclear import of the p125 subunit and E2F1-activated transcription. Mol Cell Biol:19(7):4935-43

Schmidt D., Textor B., Pein OT, et al. (2007). Critical role for NF-κB-induced JunB in VEGF regulation and tumor angiogenesis. Embo J 2007;26(3):710-719.

Schnabel F., Billig J., Cimeno A., Chun J. (2012). Pregnancy-associated breast cancer and increased risk of pregnancy-associated recurrence: a case report. J Med Case Rep : 6(1):144. doi: 10.1186/1752-1947-6-144.

Scrima A., Konícková R., Czyzewski B.K., Kawasaki Y., Jeffrey P.D., Groisman R., Nakatani Y., Iwai S., Pavletich N.P., and Thomä N.H. (2008). Structural basis of UV DNA-damage recognition by the DDB1-DDB2 complex. Cell *135*, 1213–1223.

Scrima A., Fischer E., Lingaraju G., Bohm K., Cavadini S., Thoma N. (2010). Detecting UV-lesions in the genome : the modular CRL4 ubiquitin ligase does it best !.J. Febslet :04.064.

Seigneuric R., Starmans MH., Fung G. (2007). Impact of supervised gene signatures of early hypoxia on patient survival. Radiother Oncol ;83:374–382.

Sen and Baltimore. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. Cell 46: 705-16.

Senga T., Sivaprasad U., Zhu W., Park J.H., Arias E.E., Walter J.C., and Dutta A. (2006). PCNA is a cofactor for Cdt1 degradation by CUL4/DDB1-mediated N-terminal ubiquitination. J Biol Chem *281*, 6246-6252.

Shotak K., and Chariot A. (2011). NF-κB, stem cells and breast cancer : the links get stronger. Breast cancer research, 13:214.

Siemann DW, Mercer E, Lepler S, Rojiani AM. (2002). Vascular targeting agents enhance chemotherapeutic agent activities in solid tumor therapy. Int J Cancer : 1;99(1):1-6.

Slamon D, J. et al. Human breast cancer. (1987). Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 235, 177-182.

Song S., Chen D., Lu J., Liao J., Luo Y., Yang Z., Fu X., Fan X., Wei Y., Yang L., Wang L., Wang J. (2011). NFκB1 and NFκBIA polymorphisms are associated with increased risk for sporadic colorectal cancer in a southern Chinese population. PLoS One ; 6(6):e21726.

Speirs V., Kerin MJ. (2000). Prognostic significance of estrogens receptor beta in breast cancer. Br J Surg, 87:405-409.

Steitz C., Deng S., Hinata K., Lin Q., Khavari P. (2000). Nuclear factor kappaB subnits induce epithelial cell growth arrest. Cancer Res 60, 4085-92.

Stern D.F. (2000). Tyrosine kinase signalling in breast cancer: ErbB family receptor tyrosine kinases.Breast Cancer Res *2*, 176-183.

Stull MA., Rowzee AM., Loladze A., Wood TL. (2004). Growth factor regulation of cell cycle progression in mammary epithelial cells. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 9(1):15-26. Review.

Stoyanova T., Roy N., Kopanja D., Raychaudhuri P., Bagchi S. (2009). DDB2 (damaged-DNA binding protein 2) in nucleotide excision repair and DNA damage response. Cell Cycle. 15;8(24):4067-71.Review.

Stoyanova T., Roy N., Kopanja D., Bagchi S., and Raychaudhuri P. (2009). DDB2 decides cell fate following DNA damage. Proc Natl Acad Sci USA 106: 10690-10695.

Stoyanova T., Yoon T., Kopanja D., Mokyr M.B., and Raychaudhuri P. (2008). The xeroderma pigmentosum group E gene product DDB2 activates nucleotide excision repair by regulating the level of p21Waf1/Cip1. Mol Cell Biol *28*, 177-187.

Sobin L.H., and Fleming I.D. (1997). TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. Cancer *80*, 1803-1804.

Sorlie T., Perou CM., Tibshirani R. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implifications. Proc Natl Acad Sci; 98(19):10869-74.

Sovak MA., Bellas RE., Kim DW., Zanieski GJ., Rogers AE., Traish AM., Sonenshein GE. (1997). Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. J Clin Invest 100:2952-2960.

Sugasawa K., Okuda Y., Saijo M., Nishi R., Matsuda N., Chu G., Mori T., Iwai S., Tanaka K., and Hanaoka F. (2005). UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. Cell *121*, 387-400.

Surmacz E. (2000). Function of the IGF-I receptor in breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia 5, 05-105.

Surmacz E., and Bartucci M. (2004). Role of estrogen receptor alpha in modulating IGF-I receptor signaling and function in breast cancer. J Exp Clin Cancer Res 23, 385-394.

Staudt L. (2010). Oncogenic Activation of NF-κB. Cold Spring Harb Perspect Biol ; 2(6): a000109.

Sun NK., Sun CL., Lin CH., Pai LM., Chao CC. (2010). Damaged DNA-binding protein 2 (DDB2) protects against UV irradiation in human cells and Drosophila. J Biomed Sci.: 17:27.

Sovak MA., Bellas RE., Kim DW., Zanieski GJ., Rogers AE., Traish AM., Sonenshein GE. (1997). Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. J Clin invest 100:2952-2960.

T,

Takimoto R., MacLachlan T.K., Dicker D.T., Niitsu Y., Mori T., and el-Deiry W.S. (2002). BRCA1 transcriptionally regulates damaged DNA binding protein (DDB2) in the DNA repair response following UVirradiation. Cancer Biol Ther *1*, 177-186.

Takedashi A., Saijo M., Tanaka K. (2010). DDB2 complex-mediated ubiquitylation around DNA damage is oppositely regulated by XPC and Ku and contributes to the recruitment of XPA. Mol Cell Biol; 30(11):2708-23.

Tang J., and Chu G. (2002). Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein. DNA Repair (Amst) 1, 601-616.

Tam WF., Lee LH., Davis L., and Sen R. (2000). Cytoplasmic sequestration of rel proteins by ikappaBalpha requires CRM1-dependent nuclear export. Mol Cell Biol; 20:2269-2284.

Tergaonkar V., Pando M., Vafa O., Wahl G., Verma I. (2002). p53 stabilization is decreased upon NFkappaB activation: a role for NFkappaB in acquisition of resistance to chemotherapy. Cancer Cell. ;1(5):493-503.

Thompson EW., Newgreen DF., Tarin D. (2005). Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? Cancer res 65: 5991-5995.

Thorpe S.M., Rose C., Rasmussen B.B., Mouridsen H.T., Bayer T., and Keiding N. (1987). Prognostic value of steroid hormone receptors: multivariate analysis of systemically untreated patients with node negative primary breast cancer. Cancer Res. *47*, 6126-6133.

Thrower DA., Bloom K. (2001). Dicentric chromosome stretching during anaphase reveals roles of Sir/Ku in chromatin compaction in budding yeast. Mol. Biol. Cell 12: 2800-2812.

Tian F., DaCosta Byfield S., Parks WT., Yoo S., Felici A., Tang B. (2003).Reduction in Smad2/3 signaling enhances tumori-genesis but suppresses metastasis of breast cancer cell lines. Cancer Res; 63 (23):8284–8292.

Tiede B., Kang Y. (2011). From milk to malignancy: the role of mammary stem cells in development, pregnancy and breast cancer. Cell Res., 21(2):245-57. Review.

Timens W., Popper H. (2007). Pathology of the Lung . European respiratory Society Monograph. Vol.39.63-84.

Tobar N., Villar V., Santibanez J. (2010). ROS- NF-κB mediates TGF-β1-induced expression of urokinzse-type plasminogen activator, matrix metalloprotease-9 and cell invasion. Mol Cell Biochem 340:195-202.

Toualbi-Abed K., Daniel F., Guller MC., Legrand A., Mauriz JL., Mauviel A., and Bernuau D. (2008). Jun D cooperates with p65 to activate the proximal kappaB site of the cyclin D1 promoter: role of PI3K/PDK-1. Carcinogenesis 29: 536-43.

Trosko J.E. (2005). The role of stem cells and gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. Biomed. Pharmacother. 59 Suppl 2:S326-S331.

Tsanou E., Ioachim E., Briasoulis E., Damala K., Charchanti A., Karavasilis V., Pavlidis N., and Agnantis N.J. (2004). Immunohistochemical expression of superoxide dismutase (MnSOD) anti-oxidant enzyme in invasive breast carcinoma. Histol Histopathol *19*, 807-813.

Turpin P., Hay R., Dargemount C. (1999). Characterization of IkappaBalpha nuclear import patway. J Biol chem. 274, 6804-12.

U, V, W

Van Hoffen A., Balajee AS., Van Zeeland A., Mullenders L. (2003). Nucleotide excision repair and its interplay with transcription. Toxicology; 193: 79-90.

Vargo-Gogola & Jeffrey M. Rosen. (2007). Modelling breast cancer: one size does not fit all Tracy. Nature Reviews Cancer 7, 659-672.

Varna M., Bousquet G., Plassa LF., Bertheau P., Janin A. (2011). TP53 status and response to treatment in breast cancers. J Biomed Biotechnol :284584. Review.

Vermeulen L., De Wilde G.,, Van Damme P., Vanden Berghe W., and Haegeman G. (2003).Transcriptional activation of the NF-κB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). EMBO J ; 22(6): 1313–1324.

Versmessen H., Vinh-Hung ., Van Parijs H., Miedema G., Voordeckers M., Adriaenssens N., Storme G., De Ridder M. (2012). Health-related quality of life in survivors of stage I-II breast cancer: randomized trial of post-operative conventional radiotherapy and hypofractionated tomotherapy. BMC Cance : 495. doi: 10.1186/1471-2407-12-495.

Viale G., Giobbie-hurder A., Regan MM.(2008). Prognostic and predictive value of centrally reviewed ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer : results from breast international grouptrial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozolz. J Clin oncol, 2-(34):5569-75.

Viatour P., Merville MP., Bours V., Chariot A. (2005). Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. Trends Biochem Sci.;30(1):43-52.

Vizoso FJ., González LO., Corte MD., Rodríguez JC., Vázquez J., Lamelas ML., Junquera S., Merino AM., García-Muñiz JL. (2007). Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. Br J Cancer : 26;96(6):903-11.

Wang H., Zhai L., Xu J., Joo H.Y., Jackson S., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Xiong Y., and Zhang Y. (2006). Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. Mol Cell *22*, 383-394.

Wang S, Tian L, Zeng Z, Zhang M, Wu K, Chen M, Fan D, Hu P, Sung JJ, Yu J. (2010). IkappaBalpha polymorphism at promoter region (rs2233408) influences the susceptibility of gastric cancer in Chinese. BMC Gastroenterol ;10:15.

Wazer D.E., and Band V. (1999). Molecular and anatomic considerations in the pathogenesis of breast cancer. Radiat. Oncol. Investig. 7:1-12.

Weigelt B., Peterse JL. and J. van't veer L. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. Review, Nature, volume 5.

Witkiewicz AK., Knudsen ES. (2011). RB pathway and therapeutic sensitivity: new insights in breast cancer and Tamoxifen therapy. Cell Cycle, 10(10):1525.

Wittschieben BO., Iwai S., and Wood RD. (2005). DDB1-DDB2 (xeroderma pigmentosum group E) protein complex recognizes a cyclobutane pyrimidine dimer, mismatches, apurinic/apyrimidinic sites, and compound lesions in DNA. J Biol Chem *280*, 39982-39989.

Wu Y., and Zhou BP. (2010). TNF-α/ NF-κB/Snail pathway in cancer cell migration ans invasion. British Journal of Cancer: 102, 639-644.

Wyatt C.A., Geoghegan J.C., and Brinckerhoff C.E. (2005). Short hairpin RNA-mediated inhibition of matrix metalloproteinase-1 in MDA-231 cells: effects on matrix destruction and tumor growth. Cancer Res *65*, 11101-11110.

X, Y, Z

Yamauchi H, Stearns V, Hates DF. (2001). When is a tumor marker ready for prime time? A case stydy of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. J Clin Oncol, 19(8):2334-56.

Yamauchi S., Ito H., and Miyajima A. (2010). IkappaBeta, a nuclear ikappaB protein, positively regulates the NF-kappaB-mediated expression of proin-flammaatory cytokines. Proc Natl Acad Sci USA 107: 11924-11929.

Yamamoto N., and Takeda T. (2008). Role of nuclear IkappaB proteins in the regulation of host immune responses. J Infect Chemother 14: 265-9.

Yamamoto M., Ito T., Shimizu T., Ishida T., Semba K., Watanabe S., Yamaguci N., Inoue J. (2010). Epigenetic alteration of the NF-kappaB inducing kinase (NIK) gene is involoved in enhanced NIK expression in basal-like breast cancer. Japanese Cancer association: vol10, no.11, 2391-2397.

Yan C., Wang H., Aggarwal B., and Boyd D. (2004). A novel homologous recombination system to study 92 kDa type IV collagenase transcription demonstrates that the NF-kappaB motif drives the transition from a repressed to an activated state of gene expression. Faseb J 18: 540-1.

Yang JQ., Li S., Domann FE., Buettner GR., and Oberley LW. (1999). Superoxide generation in v-Ha-ras-transduced human keratinocyte HaCaT cells. Mol Carcinog 26, 180-188.

Yang G., Xiao X., Rosen DG., Cheng X., Wu X., Chang B., Liu G., Xue ., Mercado-Uribe I., Chiao P., Du X., Liu J. (2011). The biphasic role of NF-kappaB in progression and chemoresistance of ovarian cancer. Clin Cancer Res ;17(8):2181-94. Epub 2011 Feb 21.

Yeh CC., Wan XS., St Clair DK. (1998). Transcriptional regulation of the 5'proximal promoter of the human manganese superoxide dismutase gene. DNA Cell Biol: 17, 921-930.

Zehong Yang, Xiaojun Zhao. (2011). A 3D model of ovarian cancer cell lines on peptide nanofiber scaffold to explore the cell–scaffold interaction and chemotherapeutic resistance of anticancer drugs. Int J Nanomedicine ; 6: 303–310.

Yeh C.B., Hsieh M., Hsieh Y., Hsieh C., Chiou HG., Yang SF. (2012). Antimetastatic effects of norcantharidin on hepatocellular carcinoma by transcriptional inhibition of MMP-9 through modulation of NF-κB activity. Plos one; 7 (2):e31055.

Zhang B., Wang Z., Li T., Tsitsikov EN., Ding HF. (2007). Nf-kappaB2 mutation targets TRAF1 to induce lymphomagenesis. Blood; 110(2):743-751.

Zhang HJ., Zhao W., Venkataraman S., Robbins ME., Biettner GR., Kregel KC., and Oberley LW. (2002). Activation of matrix metalloproteinase-2 by overexpression of manganese superoxide dismutase in human breast cancer MCF-7 cells involves reactive oxygen species. J Biol Chem 277, 20919-20926.

Zhao Q., Barakat B.M., Qin S., Ray A., El-Mahdy M.A., Wani G., Arafa el S., Mir S.N., Wang Q.E., and Wani A.A. (2008). The p38 mitogen-activated protein kinase augments nucleotide excision repair by mediating DDB2 degradation and chromatin relaxation. J Biol Chem *283*, 32553-32561.

Zhao Q., Feng ., Zhu Z., Dimitrov DS. (2011). Human monoclonal antibody fragments binding to insulin-like growth factors I and II with picomolar affinity. Mol Cancer Ther :1677-85. Epub 2011 Jul 12.

Zhou G., Dada LA., Wu M., Kelly A., Trejo H., Zhou Q., Varga J., Sznajder Jl. (2009). Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia-indcible factor 1. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 297:L 1120-30.

Zhu CH., Huang Y., Oberley LW and Domann FE. (2001). A family of AP-2 proteins down-regulate manganese superoxide dismutase expression. J.Biol.Chem 276,14407-14413.

Zinkel S., Gross A., Yang E. (2006). BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. Cell Death Differ. 2006 ;13(8):1351-9. Review.

Xu Y., Fanf F., Dhar SK., St Clair WH., Kasarkis EJ., and St Clair DK. (2007). The role of a single-stranded nucleotide loop in transcriptional regulation of the human sod2 gene. J Biol Chem 282, 15981-15994.

Xu Y., Pantadavity S., and St Clair DK. (2002). Transcriptional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene: the role of specificity protein 1 (Sp1) and activating protein-2 (AP-2). Biochem J. 362, 401-412.

RESUME

La protéine Damaged DNA-Binding 2 (DDB2) est connue pour son rôle dans la réparation de l'ADN lésé par les UV. Cependant, le laboratoire a montré que cette protéine est surexprimée naturellement dans les cellules tumorales mammaires non métastatiques et active leur prolifération, en favorisant leur entrée en phase de transition G1/S du cycle cellulaire. Il a été montré que cette nouvelle activité biologique de DDB2 dépend de sa capacité à intervenir dans la transcription de gènes cibles, comme celui codant l'enzyme anti-oxydante, la superoxyde dismutase à manganèse (SOD Mn). Sur la base que DDB2 est peu ou pas exprimée dans les cellules tumorales mammaires métastatiques, ce travail a consisté à étudier le rôle de cette protéine dans les capacités invasives de ces cellules.

Dans un 1er temps, nous avons montré que les cellules tumorales mammaires hautement métastatiques (MDA-MB231 et SKBR3), lorsqu'elles surexpriment DDB2 après introduction de son gène, ont des capacités migratrices et invasives *in vitro*, ainsi que des propriétés *in vivo* à développer des métastases pulmonaires, fortement réduites, en association avec une diminution importante de l'expression de la métalloprotéase matricielle 9 (MMP-9). De même, lors d'une analyse rétrospective sur 92 échantillons cliniques provenant de patientes, une corrélation inverse entre l'expression de DDB2 et le haut grade (SBR≥3) des tumeurs mammaires est observée. Dans un 2ème temps, nous avons identifié le mécanisme moléculaire par lequel DDB2 agit négativement sur les capacités invasives des cellules tumorales mammaires. Nous avons montré que DDB2 intervient positivement sur l'expression du gène codant I kappa B alpha (IκBα), en se fixant sur une séquence d'ADN localisée dans la région proximale du promoteur, qui entraîne en conséquence une forte diminution de l'activité du facteur de transcription NF-κB. Ce dernier est connu pour son rôle dans les capacités invasives et migratrices des cellules tumorales mammaires métastatiques, en régulant de nombreux gènes cibles comme celui codant la MMP-9. Nous avons montré, que l'inhibition de l'expression d'IκBα, par ARN interférence restaure en partie les propriétés invasives des cellules tumorales mammaires métastatiques surexprimant DDB2, en association avec une réexpression de MMP-9. Dans un 3ème temps, nous avons également montré dans les cellules tumorales mammaires métastatiques, que l'expression constitutivement élevée de la SOD Mn, en l'absence de DDB2, dépend de l'activité conjointe des facteurs de transcription NF-κB et Sp1, révélant ainsi un autre mécanisme moléculaire impliqué dans les propriétés invasives de ces cellules.

L'ensemble de ce travail contribue ainsi à mieux comprendre comment les cellules tumorales mammaires progressent vers un statut invasif et renforce également l'idée que DDB2 présente un intérêt clinique potentiel, comme marqueur prédictif de la progression métastatique des tumeurs mammaires. Enfin, la relation entre la DDB2, NF-κB et la SOD Mn représente une voie intéressante pour le développement de nouvelles thérapies anticancéreuses.

Mots clés: DDB2; NF-κB; superoxyde dismutase à manganèse; cancer du sein; migration; invasion; régulation génique.

ABSTRACT

The Damaged DNA-Binding 2 protein (DDB2) is known to play a role in repair of UV-induced DNA damages. However, the laboratory has shown that this protein is overexpressed in nonmetastatic breast tumor cells and stimulates their proliferation by favouring their entry in G1/S transition phase of cell cycle. This novel biological activity of DDB2 depends on its ability to modulate transcription of target genes, such as that encoding the manganese superoxide dismutase (MnSOD) antioxidant enzyme. The fact that DDB2 is not expressed in metastatic breast tumor cells led us to focuse this work on the role of DDB2 in the invasive abilities of these cells.

In a 1st time, we have shown that highly metastatic breast tumor cells (MDA-MB231 et SKBR3), when they overexpress DDB2 after introduction of its gene, have a strong decrease in their *in vitro* migratory and invasive abilities, and in their properties to develop *in vivo* lung metastasis, associated with a highly reduced expression of matrix metalloprotease 9 (MMP-9). In addition, DDB2 expression was analyzed in a cohort of 92 breast samples from patients. An inverse correlation is observed between DDB2 level and the high-grade (SBR≥3) breast tumors. In a 2nd time, we identified the molecular mechanism by which DDB2 controls negatively the invasive abilities of breast tumor cells. We have shown that DDB2 plays a positive role in the expression of gene encoding I kappa B alpha gene (IκBα), though its binding to a specific DNA sequence localized in the proximal promoter, and which promotes a strong decrease in the NF-κB activity. This transcription factor is well known to play a role in migratory and invasive abilities of metastatic breast tumor cells by regulating many target genes, such as that encoding MMP-9. We have shown that inhibition by RNA interference of IκBα expression restores in part the invasive properties of DDB2-overexpressing metastatic breast tumor cells, associated with an induction of MMP-9 gene expression. In a 3rd time, we have also shown in metastatic breast tumor cells, that the high basal MnSOD expression, when DDB2 is lacking, depends on the related activity of the NF-κB and Sp1 transcription factors, considering that this other molecular mechanism is involved in invasive properties of these cells.

Taken together, this work contributes to a better understanding how breast tumor cells progress toward an invasive phenotype and underlines also the idea that DDB2 has a clinical relevance as a good potential marker for predicting breast tumor progression toward metastasis. Finally, the relationship between DDB2, NF-κB and MnSOD may be considered as an interesting pathway for development of new anticancer therapies.

Key words: DDB2; NF-κB; manganese superoxide dismutase; breast cancer; migration; invasion; transcriptional regulation.