



Recherche de partenaires potentiels de la protéine Damaged-DNA Binding 2 dans la régulation de l'expression génique : le cas des heterogeneous ribonucleoprotein K et J dans la régulation du gène NFKBIA

Guillaume Drouot

► To cite this version:

Guillaume Drouot. Recherche de partenaires potentiels de la protéine Damaged-DNA Binding 2 dans la régulation de l'expression génique : le cas des heterogeneous ribonucleoprotein K et J dans la régulation du gène NFKBIA. Cancer. Université de Lorraine, 2018. Français. NNT : 2018LORR0152 . tel-01946561

HAL Id: tel-01946561

<https://theses.hal.science/tel-01946561>

Submitted on 6 Dec 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

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 Guillaume DROUOT

Recherche de partenaires potentiels de la protéine Damaged-DNA Binding 2 dans la régulation de l'expression génique : le cas des heterogeneous ribonucleoprotein K et J dans la régulation du gène *NFKB1A*

Le 16 Novembre 2018

Membres du jury :

Rapporteurs :	Mme Véronique BAUD	DR, EA7324 Unité NF- κ B, Différenciation et Cancer, Paris
	M. Alain JUNG	Chercheur, EA3430 Centre Paul Strauss, Strasbourg
Examineurs :	Mme Xuefen LE BOURHIS	Prof., INSERM U908 Plasticité Cellulaire et Cancer, Lille
	M. Philippe BECUWE	Prof., UMR7039 CNRS-UL CRAN, Nancy, directeur de thèse
	Mme Nadège TOUCHE	Dr., UMR7039 CNRS-UL CRAN, Nancy, co-directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude à Mme Véronique Baud, Directrice de Recherche INSERM (Paris) et à M. Alain Jung, Chercheur au Centre Paul Strauss (Strasbourg) d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et d'y avoir consacré du temps. Je remercie également Mme Xuefen Le Bourhis, Professeur à l'Université de Lille, d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineur et d'avoir accepté de participer à mon comité de suivi de thèse.

Cela fait maintenant plusieurs années que je suis dans ce laboratoire, à pratiquer la recherche à vos côtés. En m'enseignant, en m'encadrant, en me conseillant, en me soutenant ou en m'encourageant, vous avez tous été d'une aide précieuse. Merci à tous !

Je tiens à remercier particulièrement le Professeur Philippe Becuwe et le Docteur Nadège Touche de m'avoir donné la chance de pouvoir réaliser une thèse. Je vous remercie également pour la confiance que vous m'avez accordée en acceptant d'encadrer ce long travail. Vos conseils ont toujours été instructifs et bénéfiques. Philippe, je vous remercie pour votre grande expertise scientifique tout au long de cette thèse et notamment lors de la rédaction de ce manuscrit. Nadège, je te suis reconnaissant de m'avoir fait confiance dès mes premiers stages au laboratoire. J'ai appris la rigueur à tes côtés. Merci pour ton soutien et pour le temps que tu m'as consacré.

J'ai forcément une pensée pour les « filles ». Vanessa et Emilie, avec qui j'ai travaillé au quotidien durant ces 4 années, vous avez toujours été disponibles, même lorsque j'ai débuté comme jeune stagiaire. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre écoute, vos conseils et vos encouragements. Vanessa, je suis désolé pour les fois où j'ai fait exprès de te faire râler, mais c'était la contrepartie des réponses que tu m'as obligé à faire lors de tes questions si spéciales qui ne comportaient que deux choix possibles... Tes paroles mimées avec bruitages vont beaucoup me manquer. Emilie, ta bonne humeur et ton calme sont très réconfortant. Merci pour ta disponibilité et ton aide. Audrey, tu es arrivée depuis peu au laboratoire, je te remercie pour l'aide que tu m'as apportée sur la fin de ma thèse et je suis ravi d'avoir pu faire ta connaissance.

Je tiens également à remercier Stéphanie. Tu m'as beaucoup aidé lors de cette thèse. Merci pour tous les conseils que tu as pu m'apporter, que ce soit sur le plan professionnel ou personnel, ils ont toujours été bénéfiques pour moi. Je te suis énormément reconnaissant pour l'aide que tu m'as apportée ainsi que pour ton écoute.

Lionel, je te remercie pour ton encadrement durant mon M2. C'est toujours enrichissant d'échanger avec toi et j'ai énormément appris lors de ces longues discussions tardives au laboratoire.

J'ai bien évidemment une pensée toute particulière pour mes jeunes collègues devenus amis : Charlène, Maelle, Claire et bien sûr Florian ! Je suis heureux d'avoir vraiment fait votre connaissance et aujourd'hui, que l'on soit tous amis, c'est dur de tous vous quitter mais c'est ainsi. Par où commencer... Il y a tellement de choses... Je m'excuse d'abord pour toutes les blagues nulles ou osées que j'ai pu faire pendant tout ce temps. Charlène, ce fut un plaisir de te passer régulièrement des mouchoirs pour toutes ces larmes de rire que tu as pu verser, tes rires égayaient ce laboratoire ! Maelle, j'ai trouvé en toi une personne avec les mêmes goûts musicaux que moi, j'ai adoré écouter ta musique lors de tes manips, et grâce à toi j'ai appris pleins de choses sur Queen et Freddie Mercury. Claire, dommage que l'on ne puisse pas avoir d'enregistrement audio dans un manuscrit... J'espère que ton genou va mieux après ta chute (même s'il est renforcé) où tu as sacrifié quelques abricots à mes plus grands regrets. Ton "papa" est fier de toi (tu peux prendre ma P1000). Enfin Florian, je te transmets le flambeau (même si tu t'es déjà et très rapidement approprié mon bureau, ma paillasse et mes pipettes...). Même si je te taquine tous les jours, voire même d'avantage, j'ai adoré travailler avec toi durant cette dernière année et demie. Merci à toi d'avoir été mon confident. J'espère t'avoir un peu aidé durant ton M2 et pour le début de ta thèse. En tout cas, grâce à vous tous, je suis sans doute un peu plus féministe, écolo et ouvert d'esprit qu'auparavant. Votre présence à mes côtés durant cette dernière année de thèse m'a beaucoup aidé et a été grand réconfort. Charlène, Claire et Florian, bon courage à vous pour la suite de votre thèse (le bureau de rédaction est libre à présent) et bonne chance à toi Maelle pour ta nouvelle vie bretonne ! De toute façon, on se retrouve tous pour notre potentielle ferme pédago-éclo-gastronomique.

Alexis ou Jie, tu es arrivé de Wuhan en Chine, nous avons démarré notre thèse ensemble, et nous la finissons ensemble. Tu as été mon collègue de bureau pendant ces quatre années. Grâce à ta bonne humeur, nous avons souvent ris ensemble. Tu m'as appris quelques mots et quelques phrases chinoises plus ou moins scientifiques... Je te souhaite bonne chance pour ta carrière qui t'attends en Chine et j'espère avoir l'occasion de venir te rendre visite un jour.

J'ai aussi une pensée pour les anciens étudiants devenus docteurs et partis explorer d'autres laboratoires. Claire, tu m'as montré beaucoup de choses et j'ai apprécié les English et Chinese day. Rémi, tu as quitté le labo quand j'ai débuté ma thèse mais les quelques mois passés avec toi lors de mon M2 resteront dans ma mémoire. J'ai appris beaucoup également à tes côtés, surtout avec toutes ces expériences à base de carboglace.

La thèse peut être également l'occasion d'enseigner. Dans un premier temps, c'est difficile de passer de l'autre côté mais j'ai vraiment adoré enseigner. Je remercie les personnes qui m'ont fait confiance pour les enseignements, notamment Nadège, Stéphanie, Philippe et Lionel.

J'ai une pensée pour toutes les autres personnes du 9^{ème} étage. Vos sourires au quotidien ont facilité la réalisation de ce travail.

Il y a également toutes les personnes qui n'étaient pas au laboratoire, avec qui je n'ai pas travaillé mais qui ont égayé toutes ces années et qui les ont rendues beaucoup plus agréables.

Je pense forcément au petit groupe d'amis Nancéens : Guillaume et Lisa (et leur bébé qui arrive !), Stéphane et Pauline, François et Léa, Florent et Alexia, Fred et Mélanie et Antoine et Fanny ! Il me faudrait écrire une seconde thèse pour recenser tous les bons moments passés à vos côtés. Merci à vous tous d'avoir pris soin de moi durant ces quatre années et surtout de s'être intéressé à mon travail qui pourtant pourrait paraître un peu abstrait pour vous. Je pense me souvenir longtemps de la question que vous me posiez régulièrement : « Alors, comment vont tes cellules ? ». J'ai adoré avec vous les discussions plus ou moins scientifiques, sur la recherche et le monde de la fac que certains connaissent bien ! Vous avez tous participé à votre manière à l'accomplissement de ce travail.

Enfin, j'ai une énorme pensée à ma famille proche et tout d'abord à mes parents sans qui je n'aurais jamais pu arriver jusque-là. Maman et Papa, vous m'avez toujours aidé et soutenu durant ces longues études et il n'y aura jamais de mots assez fort pour vous remercier. Sans forcément le dire, je sais que vous avez beaucoup stressé, mais cela se termine enfin et je suis certain que vous êtes fier d'être là aujourd'hui à ma soutenance.

Je fini par remercier ma fiancée, Amélie. Cela fait quatre années que tu me supportes au quotidien (et ça ne doit pas être facile tous les jours !). Tu as été une épaule pour moi et tu as toujours été là, même dans les moments les plus difficiles. Tu m'as toujours soutenue, je te remercie d'avoir été patiente et à l'écoute. Nous avons à présent plein de projets à réaliser ensemble et le premier démarre le 06 juillet 2019...

A mes grands-parents...

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	9
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	13
INTRODUCTION	19
I. Contexte scientifique.....	20
II. Le cancer du sein.....	21
II.1. Epidémiologie et facteurs de risque	21
II.1.1. Données épidémiologiques	21
II.1.2. Les facteurs de risque.....	21
II.2. La carcinogenèse mammaire.....	22
II.3. Stratégies thérapeutiques.....	23
II.3.1. Les thérapies locales	23
II.3.2. La chimiothérapie	24
II.3.3. Les thérapies personnalisées	24
II.4. Classification des tumeurs mammaires.....	25
II.4.1. Les différents types de tumeurs mammaires.....	25
II.4.2. Classification anatomopathologique et grades des tumeurs.....	26
II.4.3. Classification moléculaire.....	26
III. La protéine DDB2	28
III.1. Structure du gène et de la protéine.....	28
III.2. Fonctions biologiques impliquant la protéine DDB2	30
III.2.1. La réparation de l'ADN	30
III.2.1.1. La réparation par excision de nucléotides (NER)	30
III.2.1.2. Le complexe UV-DDB	31
III.2.1.3. Remodelage de la chromatine.....	32
III.2.1.4. Régulation de l'activité de DDB2.....	33
III.2.2. Dans la dégradation de protéines	34
III.2.3. Dans la transcription génique.....	35
III.2.4. Rôle de DDB2 dans les cancers	37
III.2.4.1. Rôle de DDB2 comme suppresseur de tumeur	37
III.2.4.2. Rôle de DDB2 dans la prolifération des cellules tumorales.....	38

III.2.4.3. Rôle de DDB2 dans l'apoptose.....	40
III.2.4.4. Rôle de DDB2 dans la migration et l'invasion des cellules tumorales.....	41
III.3. Rôle de DDB2 dans les cancers du sein.....	42
IV. Le facteur de transcription NF-κB.....	45
IV.1. Généralités	45
IV.2. Structure du complexe NF- κ B	45
IV.3. Les voies d'activation du complexe NF- κ B.....	46
IV.3.1. L'activation par la voie classique ou voie canonique	47
IV.3.2. L'activation par la voie alternative ou voie non-canonique.....	47
IV.3.3. L'activation par la voie atypique	48
IV.4. Régulation de l'activité du facteur de transcription NF- κ B.....	48
IV.4.1. Régulation par les inhibiteurs I κ B	48
IV.4.2. Le cas particulier de la protéine I κ B α	49
IV.4.2.1. Relation structure – fonction de la protéine I κ B α	49
IV.4.2.2. Régulation de l'expression du gène codant la protéine I κ B α	50
IV.4.3. Régulation par modifications post-traductionnelles.....	51
IV.4.3.1. Régulation par phosphorylation	51
IV.4.3.2. Régulation par acétylation	52
IV.4.3.3. Régulation par ubiquitinylation.....	52
IV.4.4. Régulation par les micro-ARN	53
IV.5. Les rôles biologiques du facteur de transcription NF- κ B	54
IV.5.1. Généralités	54
IV.5.2. Dans la réponse immunitaire et inflammatoire	54
IV.5.3. Dans le développement embryonnaire	55
IV.5.4. Dans la réponse adaptative à un stress	55
IV.5.5. Dans les cancers	56
IV.5.5.1. Activation constitutive de NF- κ B dans les cancers.....	56
IV.5.5.2. Dans la prolifération des cellules tumorales	57
IV.5.5.3. Dans l'angiogenèse tumorale.....	58
IV.5.5.4. Dans la migration et l'invasion des cellules tumorales.....	59
IV.5.5.5. Dans la résistance aux thérapies	60
IV.6. Rôle de NF- κ B dans le cancer du sein	62
IV.6.1. Activation constitutive de NF- κ B	62
IV.6.2. Dans la prolifération des cellules tumorales mammaires.....	64
IV.6.3. Dans l'expansion des cellules souches cancéreuses mammaires.....	65
IV.6.4. Dans les capacités migratrices et invasives des cellules tumorales mammaires..	65
IV.6.5. Dans la résistance des cellules cancéreuses mammaires aux thérapies	66

HYPOTHESES & OBJECTIFS	69
MATERIEL & METHODES.....	72
I. Culture cellulaire.....	73
I.1. Lignées cellulaires.....	73
I.2. Conditions de culture	73
II. Etude de l'expression génique.....	74
II.1. Au niveau transcriptionnel.....	74
II.1.1. Extraction des ARN totaux	74
II.1.2. RT-PCR quantitative en temps réel	74
II.1.2.1. <i>Transcription inverse des ARN (RT)</i>	74
II.1.2.2. <i>Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (qPCR)</i>	74
II.2. Au niveau traductionnel	75
II.2.1. Extraction de protéines totales	75
II.2.2. Extraction de protéines cytoplasmiques et nucléaires.....	76
II.2.3. Extraction de protéines liées à la chromatine.....	76
II.2.4. Dosage des protéines.....	77
II.2.5. Electrophorèse et transfert sur membrane.....	77
II.2.6. Détection immunologique.....	78
III. Analyse d'interactions protéiques par co-immunoprécipitation.....	78
IV. Analyse de l'interaction et de l'activité des protéines sur l'ADN.....	79
IV.1. Analyse par DNA « pull-down »	79
IV.1.1. Fixation des sondes oligonucléotidiques et saturation.....	79
IV.1.2. Obtention et analyse des protéines retenues sur les sondes oligonucléotidiques .	80
IV.2. Analyse par retardement sur gel.....	81
IV.2.1. Marquage des sondes oligonucléotidiques.....	81
IV.2.2. Electrophorèse et autoradiographie.....	81
IV.3. Analyse par immunoprécipitation de chromatine	82
IV.3.1. Extraction et digestion de la chromatine.....	82
IV.3.2. Immunoprécipitation de la chromatine	83
IV.3.3. Analyse par PCR quantitative en temps réel.....	83
IV.4. Analyse de l'activité transcriptionnelle des protéines nucléaires par gène rapporteur	84
IV.4.1. Présentation des plasmides.....	84
IV.4.2. Mutagenèse dirigée du promoteur du gène codant la protéine IκBα	84

IV.4.2.1. Mutagenèse dirigée par PCR.....	84
IV.4.2.2. Transformation bactérienne	85
IV.4.2.3. Vérification et préparation de l'ADN plasmidique.....	85
IV.4.2.4. Séquençage.....	86
IV.4.3. Transfection transitoire à l'aide d'un agent polycationique.....	86
IV.4.4. Mesure des activités luciférase	86
V. Effet de la surexpression de protéines d'intérêt sur l'expression génique .	87
V.1. Les vecteurs d'expression	87
V.1.1. Construction du plasmide pCDNA 3.1(+)-MycHis B contenant l'ADNc de DDB2	87
V.1.2. Construction du plasmide pCDNA 3.1(+)-MycHis B contenant l'ADNc de Sp1	88
V.2. Surexpression transitoire des protéines d'intérêt et conséquence sur l'expression génique	88
VI. Analyse des bases de données.....	89
VI.1. Analyse de la base de données TCGA	89
VI.2. Alignement de séquences.....	89
VII. Analyse statistique.....	90
RESULTATS	91
I. Recherche et identification de partenaires protéiques de DDB2 dans la régulation génique.....	92
I.1. Mise au point de la technique de « DNA pull-down ».....	92
I.2. Mise en évidence des protéines du complexe UV-DDB et p300.....	94
I.3. Confirmation de la présence des protéines du complexe UV-DDB et de la protéine p300 sur les promoteurs des gènes cibles de DDB2	95
II. Identification d'autres partenaires protéiques potentiels de DDB2.....	96
II.1. Analyse par « DNA pull-down » sur la séquence de fixation de DDB2 suivie de la spectrométrie de masse	96
II.2. Identification de la protéine hnRNP K comme partenaire potentiel de DDB2...	97
II.3. Etude de l'expression et de la localisation des protéines hnRNP K et J dans les cellules tumorales mammaires	99
III. Importance des protéines hnRNP K et J, partenaires de DDB2, dans la régulation d'expression du gène <i>NFKB1A</i>	101

III.1. Etude du niveau d'expression du gène <i>NFKBIA</i> dans les cellules et les tumeurs mammaires	101
III.2. Effet des protéines hnRNP K et J sur l'expression transcriptionnelle du gène <i>NFKBIA</i>	103
III.2.1. Influence d'une surexpression des protéines hnRNP K et J	103
III.2.2. Activité des protéines hnRNP K et J en présence d'une surexpression de Sp1 .	104
III.2.3. Activité des protéines hnRNP K et J en présence d'une surexpression de DDB2	104
DISCUSSION GENERALE	106
I. DDB2 au sein du complexe UV-DDB dans la régulation de l'expression génique	108
II. DDB2, remodelage de la chromatine et régulation des gènes	110
III. Les autres partenaires potentiels de DDB2	112
IV. Les protéines hnRNP K et J : des partenaires potentiels intéressants de DDB2 dans la régulation génique	113
V. Relation entre DDB2, Sp1 et hnRNP K et J dans la régulation de l'expression du gène <i>NFKBIA</i>	116
VI. Les hnRNPK et J dans la régulation de l'activité constitutive de NF-κB et dans la tumorigenèse.....	117
VII. Les partenaires potentiels de DDB2 comme marqueurs cliniques.....	120
CONCLUSION & PERSPECTIVES	123
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	126
ANNEXES	153
CURRICULUM VITAE	154
Liste des productions scientifiques.....	157

TABLE DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION

Figure 1 : Répartition géographique mondiale du taux d'incidence du cancer du sein en 2012.

Figure 2 : Evolution des taux d'incidence et de mortalité par cancer du sein de 1980 à 2012 en France métropolitaine.

Figure 3 : Représentation schématique des différentes étapes de la carcinogenèse mammaire.

Figure 4 : Classification moléculaire des tumeurs mammaires.

Figure 5 : Représentation schématique des différents variants d'épissage de DDB2.

Figure 6 : Représentation schématique de la régulation du gène codant la protéine DDB2.

Figure 7 : Représentation schématique de l'ARNm codant la protéine DDB2.

Figure 8 : Structure cristallographique de la protéine DDB2.

Figure 9 : Séquence et structure cristallographique d'un domaine WD40.

Figure 10 : Structure cristallographique du complexe UV-DDB.

Figure 11 : Représentation schématique des deux types de lésions de l'ADN induites par les UV : les dimères cyclobutaniques de pyrimidine (CPD) et les pyrimidines (6-4) pyrimidones (6-4PP).

Figure 12 : Représentation schématique de la réparation de l'ADN par excision de nucléotides (NER).

Figure 13 : Représentation schématique de l'implication de la protéine DDB2 dans le remodelage de la chromatine lors de la réparation NER.

Figure 14 : Représentation schématique de la protéine DDB2 jouant le rôle de DCAF (DDB1 and Cullin 4A Associated Factor) lors de la dégradation de protéines.

Figure 15 : Représentation schématique du rôle de la protéine DDB2 dans la régulation de la transcription génique.

Figure 16 : Représentation schématique des événements cellulaires et moléculaires caractérisant la transition épithélio-mésenchymateuse.

Figure 17 : Représentation schématique de l'implication de la protéine DDB2 dans les cellules cancéreuses mammaires.

Figure 18 : Liste des différentes associations possibles des sous-unités formant le facteur de transcription NF- κ B.

Figure 19 : Représentation schématique de la structure des protéines de la famille Rel.

Figure 20 : Représentation schématique des différentes voies d'activation du facteur de transcription NF- κ B.

Figure 21 : Représentation schématique de la structure des protéines de la famille I κ B.

Figure 22 : Structure cristallographique de la protéine I κ B α .

Figure 23 : Représentation schématique des domaines d'interaction entre les protéines IκBa et p65/RelA.

Figure 24 : Représentation schématique de l'inhibition du dimère NF-κB par la protéine IκBa sur l'ADN.

Figure 25 : Représentation schématique du promoteur proximal du gène codant la protéine IκBa.

Figure 26 : Rôle de NF-κB dans différentes fonctions biologiques cellulaires normales.

Figure 27 : Liste des cancers humains présentant une activation constitutive du facteur de transcription NF-κB.

Figure 28 : Implication du facteur de transcription NF-κB dans l'angiogenèse tumorale.

Figure 29 : Représentation schématique des différentes stratégies utilisées pour inhiber la voie NF-κB.

Figure 30 : Représentation schématique du rôle de NF-κB dans la résistance aux thérapies anticancéreuses des cellules tumorales mammaires.

MATERIEL & METHODES

Tableau 1 : Caractéristiques des lignées de cellules cancéreuses mammaires utilisées.

Figure 31 : Représentation schématique des différents sous-types des lignées cellulaires cancéreuses mammaires utilisée.

Tableau 2 : Liste répertoriant l'ensemble des amorces utilisées pour la technique de RT-qPCR.

Figure 32 : Représentation schématique des différentes étapes d'extraction de protéines liées à la chromatine.

Tableau 3 : Liste répertoriant l'ensemble des anticorps utilisés pour les techniques de Western blotting, d'immunoprécipitation de chromatine et de co-immunoprécipitation de protéines.

Tableau 4 : Liste des sondes oligonucléotidiques utilisées pour la technique de « DNA pull-down ».

Tableau 5 : Liste des sondes oligonucléotidiques utilisées pour la technique du retardement sur gel.

Figure 33 : Représentation schématique de la localisation des différentes régions amplifiées par PCR pour la ChIP sur le promoteur du gène codant la protéine IκBa.

Tableau 6 : Liste répertoriant l'ensemble des amorces utilisées pour la technique de ChIP.

Tableau 7 : Liste des plasmides utilisés pour les expériences de gène rapporteur.

Figure 34 : Représentation schématique des plasmides pGL3 basic et pRL-SV40 utilisés pour les expériences de gène rapporteur.

Tableau 8 : Liste des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée du promoteur du gène codant la protéine IκBa.

Figure 35 : Représentation schématique du plasmide pGL3 basic contenant le promoteur proximal du gène NFKBIA.

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des différentes conditions expérimentales utilisées pour la technique de gène rapporteur selon les lignées cellulaires.

Tableau 10 : Liste des vecteurs d'expression utilisés pour surexprimer une protéine d'intérêt.

Figure 36 : Représentation schématique des vecteurs d'expression pCDNA DDB2 MycHis et RSV Sp1.

Tableau 11 : Liste des amorces utilisées pour le sous-clonage des ADNc codant DDB2 et Sp1 et pour la mutagenèse dirigée de l'ADNc codant DDB2.

RESULTATS

Figure 37 : Analyse de l'expression du gène DDB2 dans différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires.

Figure 38 : Evaluation de la fixation aspécifique de DDB2 sur les billes magnétiques par « DNA pull-down ».

Figure 39 : Détermination de la quantité optimale de protéines nucléaires pour la technique de « DNA pull-down ».

Figure 40 : Détermination de la quantité optimale de protéines nucléaires pour la technique de « DNA pull-down » après un blocage avec 1% de BSA des billes couplées à une sonde ADN.

Figure 41 : Mise en évidence de protéines du complexe UV-DDB et de la protéine p300 par « DNA pull-down » sur des séquences du promoteur des gènes NFKBIA et SOD2 fixant DDB2.

Figure 42 : Analyse par retard sur gel de la présence des protéines du complexe UV-DDB sur les séquences de fixation de DDB2 au sein du promoteur des gènes NFKBIA et SOD2.

Figure 43 : Analyse de l'interaction des protéines du complexe UV-DDB et de p300 sur le promoteur des gènes NFKBIA et SOD2 par immunoprécipitation de chromatine.

Figure 44 : Analyse de l'expression des gènes codant les protéines DDB1 et Cul4A au niveau transcriptionnel dans différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires.

Tableau 12 : Liste non exhaustive des protéines retenues par « DNA pull-down » sur les sondes ADN correspondantes aux séquences cibles de DDB2 dans les promoteurs de gènes NFKBIA et SOD2.

Figure 45 : Mise en évidence des protéines hnRNP K et J par « DNA pull-down » réalisées sur la séquence cible de DDB2 dans le promoteur du gène NFKBIA (sonde NFKBIA).

Figure 46 : Analyse de l'interaction des protéines hnRNP K et J sur le promoteur du gène NFKBIA dans les cellules MCF-7 par immunoprécipitation de chromatine.

Figure 47 : Analyse de l'interaction entre les protéines DDB2, hnRNP K et J par co-immunoprécipitation de protéines.

Figure 48 : Analyse du niveau d'expression des protéines hnRNP K et J dans les lignées de cellules cancéreuses mammaires.

Figure 49 : Etude de la localisation cellulaire des protéines hnRNP K et J.

Figure 50 : Mise en évidence de l'association des protéines hnRNP K et J à la chromatine.

Figure 51 : Analyse du niveau d'expression de la protéine IκBα dans les différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires.

Figure 52 : Etude rétrospective montrant l'influence de l'expression du gène NFKBIA sur la survie globale de patientes atteintes d'un cancer du sein.

Figure 53 : Analyse comparative des séquences des différents sites de fixation des protéines sur le promoteur proximal du gène NFKBIA dans différentes espèces animales.

Figure 54 : Etude de la fonctionnalité des sites de fixation pour les protéines DDB2, AP2α, Sp1 et Ets-1 sur le promoteur proximal du gène NFKBIA.

Figure 55 : Analyse de l'expression du gène Sp1 dans différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires.

Figure 56 : Etude rétrospective du niveau d'expression du gène NFKBIA dans les tumeurs mammaires de patientes atteintes d'un cancer du sein.

Figure 57 : Analyse par « DNA pull-down » de la fixation de la protéine Sp1 sur la séquence cible du promoteur du gène NFKBIA.

Figure 58 : Effet d'une surexpression des protéines hnRNP K et J sur l'activité du promoteur du gène NFKBIA dans les cellules HEK 293.

Figure 59 : Effet d'une surexpression des protéines hnRNP K et J sur l'expression du gène NFKBIA dans les cellules T47D.

Figure 60 : Effet d'une surexpression des protéines hnRNP K et J sur l'expression du gène NFKBIA dans les cellules MDA-MB231.

Figure 61 : Effet d'une surexpression de la protéine Sp1 sur l'activité du promoteur du gène NFKBIA dans les cellules T47D.

Figure 62 : Effet d'une surexpression de la protéine Sp1 sur l'expression du gène NFKBIA dans les cellules MDA-MB231.

Figure 63 : Effet de la surexpression simultanée des protéines hnRNP J et J et Sp1 sur l'activité du promoteur du gène NFKBIA dans les cellules tumorales mammaires T47D.

Figure 64 : Effet de la surexpression de la protéine DDB2 sur l'activité des promoteurs des gènes SOD2, BCL-2 et NFKBIA dans les cellules HEK 293.

Figure 65 : Effet de la surexpression simultanée des protéines hnRNP K et J et DD2 sur l'activité du promoteur du gène NFKBIA dans les cellules HEK 293.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Figure 66 : Modèle proposé de la régulation transcriptionnelle du gène NFKBIA dans les cellules tumorales mammaires ER⁺ et ER⁻.

LISTE DES ABBREVIATIONS

6, β

5-FU	F-Fluorouracile
6-4PP	Pyrimidine (6-4) Pyrimidone
β -TrCP	Beta-Transducin repeat Containing Protein

A

ADN	Acide Désoxyriboucléique
ADNc	Acide Désoxyriboucléique complémentaire
ADP	Adénosine Diphosphate
Akt	Protein kinase B
ALDH1A1	Aldehyde Dehydrogenase 1 family member A1
AP-2 α	Activator Protein 2 alpha
AR	Androgen Receptor
ARD	Domaine de répétitions ankyrine
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adénosine Triphosphate
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3 related

B

BAFF	B cell Activating Factor
BCIP	Breast Cancer Integrative Platform
BCR	B-Cell Receptor
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
Bcl-2, 3	B-cell lymphoma 2, 3
BRCA1, 2	Breast Cancer Associated 1, 2
BSA	Bovine Serum Albumin

C

C ₂ H ₃ NaO ₂	Acétate de sodium
c-FLIP	Cellular FLICE-like Inhibitory Protein
CAF-1	Chromatine Assembly Factor 1
CBP	CREB-Binding Protein
CD44, 47	Cluster Differentiation 44, 47
CDK	Cycline-Dependent Kinase
CHDL1	Chromodomain-Helicase-DNA-binding protein 1-Like
ChIP	Chromatine Immunoprecipitation
Chk1, 2	Checkpoint kinase 1, 2
CK2	Caséine Kinase 2

CO ₂	Dioxyde de carbone
CMV	CytomégaloVirus
CPD	Dimère Cyclobutanique de Pyrimidine
CRM1	Chromosome Region Maintenance 1
CS	Syndrome de Cockayne
CSC	Cancer Stem Cell
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
Cul4A	Culline 4A
CXCL12	Ligand du récepteur CXCR4
CXCR4	C-X-C motif chemokine Receptor 4
CYLD	Cylindromatosis

D, E

DCAF	DDB1 and Cul4A Associated Factor
DDB1, 2	Damaged-DNA Binding 1, 2
DHFR	Dihydrofolate Reductase
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
DWD	DDB1-binding WD40

E

EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylène Glycol Tétra-Acétique
eIF4E	eucaryotic translation Initiation Factor 4E
enChIP	engineered DNA-binding molecule-mediated Chromatin Immunoprecipitation
ER	Estrogen Receptor
ERCC1, 2	Excision Repair Cross-Complementation group 1, 2
ERO	Espèce Réactive de l'Oxygène
Ets-1	E twenty six 1
EZH2	Enhancer of Zest Homolog 2

F, G, H

FasL	Ligand du récepteur Fas
FUSE1, 3	Far Upstream element binding protein 1, 3
FZD5	Frizzled 5
GG-NER	Global Genome Nucleotide Excision Repair
H2AX	H2A histone family member X
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
H ₃ PO ₄	Acide phosphorique
HAT	Histone Acetyltransferase
HCl	Acide chloridrique
HDAC 1	Histone Deacetylase 1
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF-1 α	Hypoxia Inducible Factor 1 alpha

HMGB1	High Mobility Groupe B protein 1
hnRNP K, J	heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein K, J

I, K, L

I-CAM	Intercellular Adhesion Molecule
IAP-1, -2	Inhibitor of Apoptosis Protein 1, 2
IκB	Inhibitor of NF-κB
IgG	Immunoglobuline G
IKK	IκB kinase
IL-1, 17	Interleukine 1, 17
INCa	Institut National du Cancer
IRES	Internal Ribosome Entry Site
KCl	Chlorure de Potassium
KH	hnRNP K Homology domain
KO	Knock Out
LDLR	Low Density Liporeceptor
LPS	Lipopolysaccharide
LT-β	Lymphotoxine β

M

M-MLV	Virus de la leucémie murine de Moloney
MgCl ₂	Chlorure de Magnésium
Na ₃ VO ₄	Orthovanadate de Sodium
NaCl	Chlorure de Sodium
MALT1	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue 1
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCP-1	Monocyte Chimioattractant Protein 1
MDR-1	Multi-Drug Resistance 1
MEFs	Mouse Embryonic Fibroblast
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
miR	Micro-ARN
MMP-2, -3, -9, -10	Métalloprotéase Matricielle 2, 3, 9, 10
MRP-1	Multi-drug Resistance Protein 1
MSH2, 3	MutS protein Homolog 2, 3
MZF1	Myeloid Zinc Finger 1

N, O

NAK	NF-κB Activating Kinase
NEDD4L	Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated 4-Like
NEMO	NF-κB Essential Modulator
NES	Nuclear Export Signal
NER	Nucleotide Excision Repair
NF-1	Nuclear Factor 1
NF-κB	Nuclear Factor kappa B

NFKBIA	Nuclear Factor Kappa B Inhibitor Alpha
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfate d'Ammonium
NIK	NF-κB Inducing Kinase
NKRF	NF-κB Repressing Factor
NLS	Nuclear Localization Signal
NP-40	Nonidet P-40
NRMT	N-terminal RCC1 Méthyl-Transfêrase
O ₂ ^{•-}	Anion superoxyde

P, Q

PAF	Paraformaldéhyde
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PAQR3	Progestin and AdipoQ Receptor family member 3
PARP1	Poly(ADP-Ribose) Polymêrase 1
PBS	Tampon phosphate salin
PCBP	Poly(C)-Binding Protein
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEI	Poly-éthylèneimine
PEST	Proline (P) Acide glutamique (E) Sérine (S) Thréonine (T)
pH	Potentiel Hydrogène
PI3K	PhosphoInositide 3-Kinase
PIC	Proteases Inhibitor Cocktail
PIP	PCNA Interacting Protein
PKC	Protein Kinase C
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyde
PolB	DNA Polymerase Beta
Poly(dI-dC)	Acide poly(désoxyinosinique-désoxycytidylique)
PR	Progesterone Receptor
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PVDF	Polyvinylidifluoride
qPCR	Real-time PCR

R

RANK	Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B
RANKL	Ligand du récepteur RANK
RHD	Rel Homology Domain
RIME	Rapid Immunoprecipitation Mass spectrometry of Endogenous proteins
RIP	Receptor-Interacting Protein kinase
RNF43	Ring Finger protein 43
RPA	Replication Protein A
RPLP0	Ribosomal Protein Large P0
Rpm	Rotations par minute
RT	Rétrotranscriptase

S

SBR	Scarff Bloom et Richardson
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SEM	Erreur Standard à la Moyenne
SEMA3A	Semaphorine 3A
SERD	Selective Estrogen Receptor Degradation
SERM	Selective Estrogen Receptor Modulator
SOCS-1	Suppressor Of Cytokine Signaling protein 1
SODMn	Superoxyde Dismutase à Manganèse
Sp1	Specificity Protein 1
STAGA	SPT3-TAF(II)31-GCN5L acetyltransferase complex
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable

T

TAD	Transactivation Domain
TAK1	Transforming growth factor beta Activated Kinase 1
TAp63 γ	Tumor protein 63 gamma
TBS	Tampon Tris Salin
TBP	TATA-box binding protein
TC-NER	Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TCR	T Cell Receptor
TEM	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TEMED	Tetraméthyléthylènediamine
TFIIH	Transcription Factor II Human
TGF β 1	Transforming Growth Factor beta 1
TH	Tyrosine Hydroxylase
TIMP1	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1
TLR	Toll-Like Receptor
TNBC	Triple-Negative Breast Cancer cells
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
TRADD	TNF Receptor Associated Death Domain
TRAF2, 5, 6	TNF Receptor Associated Factor 2, 5, 6
TRIM32	TRIPartite Motif 32

U, V, X, Z

UBB	Ubiquitine B
uPa	urokinase Plasminogen Activator
UV	Ultra-Violet
UTR	Non traduit
V-CAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGI	Vascular Endothelial Growth factor Inhibitor
XP	Xeroderma Pigmentosum
XPA – G	Xeroderma Pigmentosum complementation group A – G
Zeb1, 2	Zinc finger E-box Binding homeobox 1

Zik1
ZO1

Zinc finger protein Interacting with ribonucleoprotein K
Zonula Occludens 1

INTRODUCTION

I. Contexte scientifique

A ce jour, le cancer du sein est la pathologie cancéreuse la plus fréquente chez la femme dans le monde, avec 1,67 millions de nouveaux cas recensés en 2012 pour 521 907 décès. Malgré des nombreuses avancées dans le diagnostic et le traitement de cette maladie, il reste difficile de prédire sa progression. Les mécanismes moléculaires de la carcinogenèse mammaire, en particulier ceux conduisant à l'acquisition de propriétés métastatiques et à l'échappement aux thérapies, sont encore mal compris. A l'heure actuelle, les marqueurs moléculaires identifiés, malgré de nombreuses recherches dans le monde, ne permettent pas d'expliquer entièrement la progression des cellules tumorales mammaires vers un état prolifératif, invasif et vers la résistance aux thérapies.

Dans ce contexte, un des thèmes de recherche du laboratoire consiste à identifier de nouveaux marqueurs moléculaires responsables du développement, de la progression et de la résistance aux thérapies des tumeurs mammaires. C'est ainsi que le laboratoire a identifié la protéine DDB2 (Damaged DNA-Binding 2) comme nouveau marqueur moléculaire de la carcinogenèse mammaire. Initialement connue pour son rôle dans la réparation de l'ADN, le laboratoire a montré que cette protéine est impliquée dans le contrôle de la prolifération et de l'invasion des cellules tumorales mammaires. Cette nouvelle fonction biologique dépend de sa capacité à réguler, selon un mécanisme restant à identifier, l'expression des gènes codant les protéines SODMn (Superoxyde Dismutase à Manganèse), une enzyme anti-oxydante et IkappaB alpha ou IkB α (Inhibitor of NF- κ B alpha), l'inhibiteur cytoplasmique du facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor kappa B). Ce facteur de transcription, *via* son activation constitutive, joue un rôle fondamental dans le développement, la progression et la résistance aux thérapies des cellules cancéreuses mammaires. Ainsi, l'étude du mécanisme impliquant la protéine DDB2 dans la régulation transcriptionnelle de ces deux gènes cibles impliqués dans la tumorigenèse mammaire présente un intérêt en cancérologie mammaire. De plus, la découverte de partenaires protéiques potentiels de DDB2 dans la régulation du gène *NFKB1A* peut également permettre une meilleure compréhension de la régulation de l'activité NF- κ B dans les cellules tumorales mammaires.

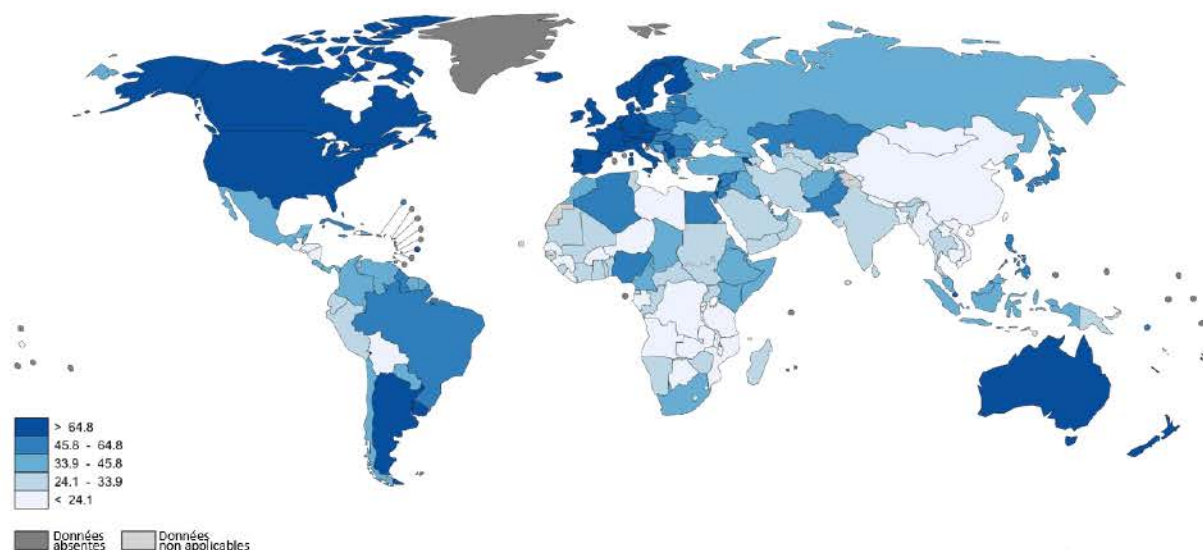


Figure 1 : Répartition géographique mondiale du taux d'incidence du cancer du sein en 2012. Les taux d'incidence standardisés les plus élevés sont représentés en bleu foncé et sont retrouvés dans les pays les plus industrialisés d'Amérique du Nord et d'Europe, ainsi que l'Australie (GLOBOCAN, 2012).

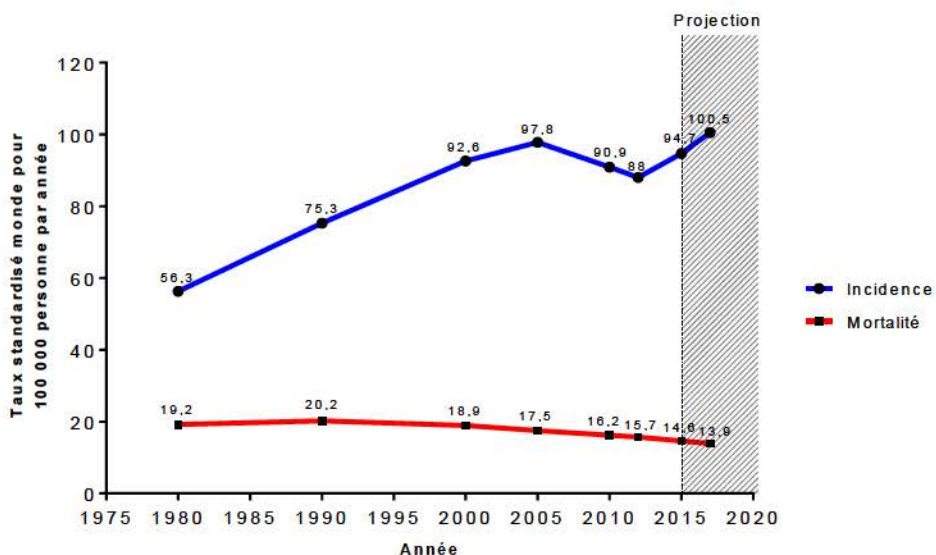


Figure 2 : Evolution des taux d'incidence et de mortalité par cancer du sein de 1980 à 2012 en France métropolitaine. Les valeurs d'incidence et de mortalité, représentées respectivement en bleu et en orange, correspondent aux taux standardisés pour 100 000 personnes et par an. Une évolution drastique de l'incidence est remarquée jusqu'aux années 2000 suivie d'une baisse régulière avant une nouvelle augmentation depuis 2012. Le taux de mortalité, stable entre 1980 et 2000, diminue faiblement de manière régulière entre 2000 et 2012 (INCa, 2017).

II. Le cancer du sein

II.1. Épidémiologie et facteurs de risque

II.1.1. Données épidémiologiques

En représentant 25,1% de l'ensemble des cancers dans le monde, le cancer du sein est placé au premier rang des cancers chez la femme avec 1,67 millions de nouveaux cas recensés en 2012 pour 521 907 décès. Ces données font de cette maladie la seconde cause de mortalité par cancer après celui du poumon dans le monde (GLOBOCAN, 2012). D'après les données géographiques de l'incidence, les pays les plus industrialisés (Amérique du Nord, Europe et Australie) sont les plus touchés (*Figure 1*).

Au niveau national, selon une projection de l'INCa, 58 968 nouveaux cas sont estimés en 2017, pour 11 883 décès, plaçant ainsi le cancer du sein en tête des cancers les plus meurtriers chez la femme. Toutefois, c'est un cancer présentant un bon pronostic puisque 76% des femmes diagnostiquées avec un cancer du sein entre 1989 et 2004 ont une survie nette à 10 ans (INCa, 2017).

Malgré une augmentation drastique du nombre de cancers du sein en France durant 20 ans, le taux d'incidence diminue d'environ 1,5% par an depuis le début des années 2000. Cette baisse peut s'expliquer, en partie, par la diminution de prescription de traitements hormonaux au cours de la ménopause. Cependant, une hausse du nombre de cancer est observée ces dernières années. Cette augmentation semble se confirmer d'après les projections de l'INCa. Le taux de mortalité, quant à lui, diminue de façon régulière depuis les années 2000 (*Figure 2*). Cette diminution peut s'expliquer par une meilleure prévention, un dépistage systématique précoce, l'évolution des thérapies et l'apparition des thérapies personnalisées.

II.1.2. Les facteurs de risque

Le facteur de risque le plus évident est le sexe du patient puisque 99% des personnes concernées par le cancer du sein sont des femmes. L'âge est également un facteur de risque important. Dans la moitié des cas, le cancer du sein est détecté chez des femmes âgées de 50 à 69 ans. C'est pourquoi cette tranche d'âge est ciblée par des campagnes de dépistage automatique par le biais d'une mammographie réalisée tous les deux ans (INCa 2012). L'âge de la première grossesse est également à prendre en compte puisque les femmes ayant eu une

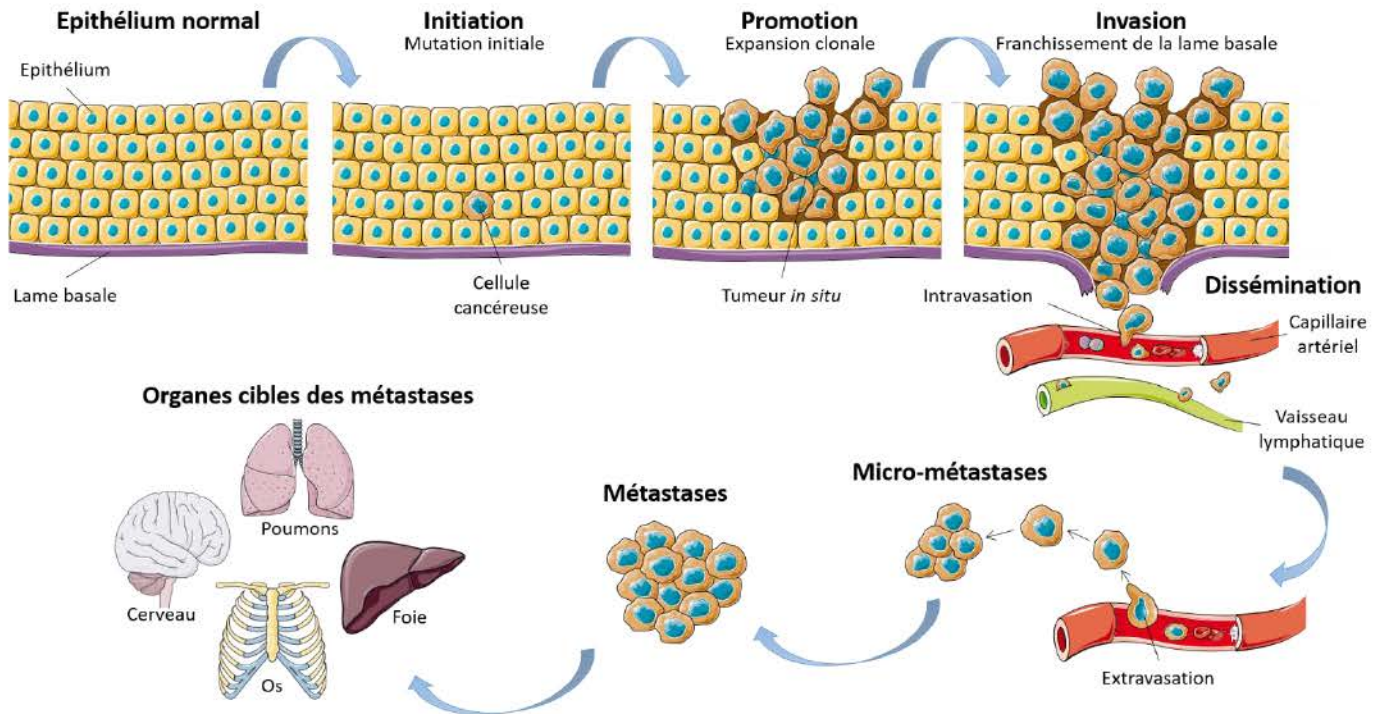


Figure 3 : Représentation schématique des différentes étapes de la carcinogenèse mammaire. Une mutation génétique apparaît au sein d'une cellule épithéliale de la glande mammaire et procure à la cellule la capacité de proliférer de façon anarchique. C'est l'étape d'initiation. Lors de l'étape de promotion, les cellules cancéreuses prolifèrent localement, changent de morphologie et forme un carcinome in situ. Ensuite, d'autres modifications vont conduire les cellules à envahir le tissu environnant, à franchir la lame basale et se disséminer par l'intermédiaire des vaisseaux sanguins et lymphatiques (intravasation). Les cellules cancéreuses sont ensuite capables de sortir du système vasculaire et lymphatique (extravasation), de former des micro-métastases puis des métastases. Les organes cibles des cellules cancéreuses mammaires sont principalement les poumons, le foie, le cerveau et les os.

grossesse menée à terme avant l'âge de 30 ans développent, en moyenne, moins de cancer du sein.

Les antécédents personnels et familiaux constituent des facteurs de risque important. Une patiente ayant déjà contracté un cancer du sein ou ayant déjà subi une radiothérapie au niveau de la poitrine possède un risque plus élevé de développer un cancer du sein. Le risque de développer un cancer du sein est deux à cinq fois plus important, par rapport à la moyenne, chez une femme possédant des antécédents familiaux. Pour ces dernières, il peut s'agir de formes héréditaires ou familiales de cancer du sein provoquées par des mutations au niveau des gènes *BRCA1* et *BRCA2* (Breast Cancer Associated 1 et 2). Même si seulement 5 à 10% des tumeurs mammaires présentent des mutations génétiques, une femme porteuse d'une mutation sur l'un de ces deux gènes, possède un risque nettement plus élevé de développer un cancer du sein (40 à 88%). D'autres mutations peuvent être impliquées mais elles ne permettent pas d'expliquer l'ensemble des cancers mammaires.

Enfin, d'autres facteurs peuvent également intervenir comme l'âge d'apparition de la ménopause, la prescription de traitements hormonaux notamment durant la ménopause, la prise de contraceptifs oraux (pilule contraceptive), la prise de drogue ou encore d'alcool.

II.2. La carcinogenèse mammaire

De manière classique, la carcinogenèse mammaire se décompose en 3 étapes : l'initiation, la promotion et la dissémination. L'étape d'initiation correspond à la première mutation, la promotion à la formation et au développement de la tumeur et la dissémination à l'invasion des cellules cancéreuses (*Figure 3*).

L'étape d'initiation, c'est-à-dire l'apparition de mutations génétiques, peut avoir une origine multifactorielle (âge, mode de vie, hérédité, facteurs environnementaux, ...). Les mutations génétiques somatiques, présentes uniquement dans les cellules tumorales, peuvent toucher de nombreux gènes. Parfois, ces mutations ont pour conséquence l'activation d'oncogènes ou proto-oncogènes, comme par exemple l'amplification du co-récepteur à l'EGF (Facteur de Croissance Epidermal) HER2, ou à l'inverse, l'inactivation de suppresseurs de tumeurs comme la protéine p53 par exemple (Baldwin, 2001; Lacroix *et al.*, 2006). Lorsque ces mutations touchent ce type de gènes, les propriétés prolifératives, invasives et de résistance à l'apoptose des cellules sont altérées et souvent augmentées dans le cas de cancers. En effet, une surexpression ou une activité constitutive du récepteur HER2 est retrouvée dans certains

cancers mammaires, entraînant une prolifération et un échappement à l'apoptose accru (Baldwin, 2001; Lewis Phillips *et al.*, 2008). De même, des mutations de la protéine p53 sont identifiées dans certains cancers. La présence d'une protéine p53 non fonctionnelle diminue la capacité des cellules à entrer en apoptose (Lacroix *et al.*, 2006; Olivier *et al.*, 2004).

Certaines mutations constitutionnelles, présentes sur l'ensemble des cellules de l'organisme, peuvent se transmettre à la descendance. La présence de ces mutations prédispose les femmes à un cancer du sein. Ces altérations génétiques sont à l'origine de 5 à 10% des cancers du sein. Les gènes touchés les plus connus sont les gènes *BRCA1* et *BRCA2*. Une mutation d'un de ces gènes augmente de façon drastique le risque de développer un cancer du sein ou de l'ovaire (Peto *et al.*, 1999).

Au cours de la progression de la maladie, les cellules cancéreuses peuvent subir une dédifférenciation qui leur permet d'acquérir des propriétés invasives et migratrices. L'acquisition de ces nouvelles propriétés correspond à l'étape de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Brièvement, cette étape est caractérisée par la transformation d'une cellule exprimant des marqueurs épithéliaux en une cellule exprimant des marqueurs mésenchymateux. Ces modifications s'accompagnent de la dégradation et d'un remodelage de la matrice extracellulaire et de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins pour alimenter la tumeur. Cette étape de TEM sera plus amplement décrite dans la suite de l'étude bibliographique. De manière générale, ce changement est corrélé à l'augmentation de la résistance aux thérapies des cellules cancéreuses mammaires (Singh et Settleman, 2010).

II.3. Stratégies thérapeutiques

II.3.1. Les thérapies locales

A l'heure actuelle, la thérapie la plus efficace est la chirurgie. La tumorectomie est une chirurgie conservatrice qui vise à ôter le tissu tumoral et une partie du tissu sain environnant. Elle est utilisée dans le cas de petites tumeurs. A l'inverse, la mastectomie est utilisée dans le cas de tumeurs de taille plus importante et invasives, et correspond à l'ablation complète du sein. Dans certains cas, les ganglions lymphatiques axillaires sont également retirés. Une thérapie complémentaire est indiquée suite à une chirurgie. Le plus souvent, il s'agit d'une radiothérapie.

La radiothérapie est un traitement local qui consiste à infliger des radiations ionisantes aux cellules cancéreuses mammaires tout en préservant les tissus sains. L'objectif est d'endommager les cellules en créant des espèces réactives de l'oxygène (EROs) par radiolyse de l'eau, et de bloquer leur prolifération.

II.3.2. La chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement systémique. Ce traitement est généralement administré chez des patientes possédant des cancers infiltrants et métastatiques. Une chimiothérapie adjuvante est généralement prescrite après une chirurgie dans le but d'éliminer les cellules cancéreuses résiduelles et de diminuer le risque de récidives. Dans le cas de tumeurs plus grosses, la chimiothérapie peut être prescrite avant la chirurgie. On parle alors de chimiothérapie néo-adjuvante.

Pour ce type de cancer, quatre grandes familles d'agents de chimiothérapie sont utilisées : les agents alkylants (cyclophosphamide), les taxanes (paclitaxel, docetaxel), les anthracyclines (doxorubicine, épirubicine) et les anti-métabolites (méthotrexate, 5-Fluorouracile). Malgré leur mode d'action différent, ces agents ont tous pour objectif de bloquer la réplication de l'ADN et la division cellulaire. Afin d'augmenter leurs efficacités, ces agents ne sont généralement pas prescrits seuls mais en combinaison.

II.3.3. Les thérapies personnalisées

L'utilisation de ce type de thérapie dépend de la classification moléculaire de la tumeur et notamment de l'expression de certains récepteurs comme le récepteur aux œstrogènes (ER) ou le co-récepteur à l'EGF (HER2) par exemple.

Une hormonothérapie peut être prescrite chez des patientes dont la tumeur est hormonosensible, c'est-à-dire lorsque les cellules tumorales expriment le récepteur aux œstrogènes (ER) et à la progestérone (PR). Cette thérapie a pour objectif de supprimer l'effet des hormones féminines sur la prolifération des cellules tumorales mammaires. L'hormonothérapie ciblant le récepteur aux œstrogènes comporte deux classes de molécules : les SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator) ou les SERD (Selective Estrogen Receptor Degradation). Les SERM sont des antagonistes du récepteur ER, comme le tamoxifène, alors que les SERD induisent la dégradation de celui-ci. Dans certains cas l'hormonothérapie vise à

inhiber la synthèse des hormones féminines. C'est le cas des anti-aromatases comme l'anastrozole par exemple.

Depuis quelques années, des thérapies ciblées ont fait leur apparition et permettent de personnaliser d'avantage la thérapie pour chaque patiente. Les thérapies ciblées se basent sur l'étude de l'expression génique de la tumeur, spécifique de chaque patiente et sur certaines anomalies retrouvées uniquement dans les cellules tumorales. Par exemple, certaines de ces cellules tumorales présentent une amplification du gène codant HER2, le co-récepteur à l'EGF. Dans ce cas précis, un anticorps monoclonal humanisé, le trastuzumab (commercialisé sous le nom d'herceptine), peut être utilisé. En se fixant sur le récepteur HER2, il est capable d'empêcher la fixation de l'EGF et l'induction de sa voie de signalisation impliquée dans la prolifération. Le récepteur HER2 peut également être inhibé au niveau intracellulaire, par une molécule appelée lapatinib. C'est un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase du récepteur HER2 (Xu *et al.*, 2017).

Ainsi, les cellules cancéreuses mammaires dites triples négatives (TNBC), n'exprimant ni les récepteurs ER et PR, ni le co-récepteur HER2, ne peuvent être traitées par hormonothérapie ou thérapies ciblées. C'est pourquoi de nombreuses équipes travaillent sur le développement de nouvelles molécules thérapeutiques à activité anti-cancéreuse dans le but de traiter ces cellules.

II.4. Classification des tumeurs mammaires

II.4.1. Les différents types de tumeurs mammaires

Dans la plupart des cas, le cancer du sein se développe à partir de cellules épithéliales de la glande mammaire, pour donner un adénocarcinome mammaire. La glande mammaire étant constituée de lobules et de canaux permettant la lactation, il existe des adénocarcinomes lobulaires et canalaire. Les formes canalaire sont les plus fréquentes.

Les cancers du sein peuvent être classés en deux groupes en fonction de l'agressivité de la tumeur : les cancers du sein non invasifs ou *in situ* et les cancers du sein invasifs ou infiltrants.

Les cancers du sein *in situ* sont des formes précoces de cancer. Ils sont caractérisés par une tumeur bien localisée et souvent bien délimitée. Les cellules cancéreuses n'ont pas franchi la lame basale et elles n'envahissent pas le tissu voisin. Ces cancers présentent un bon taux de survie. Cependant, sans prise en charge thérapeutique, ce cancer peut progresser et devenir

infiltrant. En effet, il est caractérisé par la capacité des cellules cancéreuses à infiltrer le tissu voisin. Les cellules cancéreuses ont franchi la lame basale et peuvent, dans certains cas, se propager vers les ganglions axillaires ou vers d'autres organes et former des métastases.

II.4.2. Classification anatomopathologique et grades des tumeurs

Après diagnostic, un cancer du sein est classé selon plusieurs critères anatomiques dont l'objectif est de mesurer l'état d'avancement de la maladie, le pronostic et la thérapie adéquate à mettre en place. Ainsi, plusieurs classifications peuvent être utilisées.

La classification selon l'indice TNM classe les cancers du sein en fonction de la taille de la tumeur (lettre T), de la présence de cellules cancéreuses dans les ganglions axillaires (N) et de la présence de métastases (M).

La classification des tumeurs selon le grade SBR (de Scarff Bloom et Richardson) prend en compte l'architecture tissulaire et cellulaire des tumeurs. Les tumeurs sont classées selon trois grades : le grade SBR I correspond aux tumeurs les moins agressives alors que le grade SBR III correspond aux tumeurs les plus agressives. Le grade SBR II est un grade intermédiaire. Cette classification repose sur l'observation de coupes histologiques réalisées à partir de biopsies. Elle prend notamment en compte le niveau d'organisation des canaux, les atypies cytonucléaires (forme et taille des noyaux) ou encore le nombre de mitoses par champs observé (Bloom et Richardson, 1957).

Ce type de classification anatomopathologique est essentiel dans la prise en charge thérapeutique, cependant elle ne permet pas de prédire l'évolution de la maladie durant le traitement. Ces classifications ont depuis été améliorées par le développement de nouvelles techniques permettant de caractériser au niveau biologique chaque tumeur individuellement.

II.4.3. Classification moléculaire

A la fin des années 90 et au début des années 2000, le développement de nouvelles techniques de biologie moléculaire permettant l'étude du génome et du transcriptome a permis de mettre en évidence une hétérogénéité des tumeurs à l'échelle moléculaire. Ces travaux ont permis la mise en place d'une classification basée sur le profil d'expression génique de chaque tumeur. L'équipe de Perou, pour la première fois, propose une classification moléculaire basée sur le profil d'expression de 8102 gènes chez 42 patientes (Perou *et al.*, 2000). Ces travaux ont

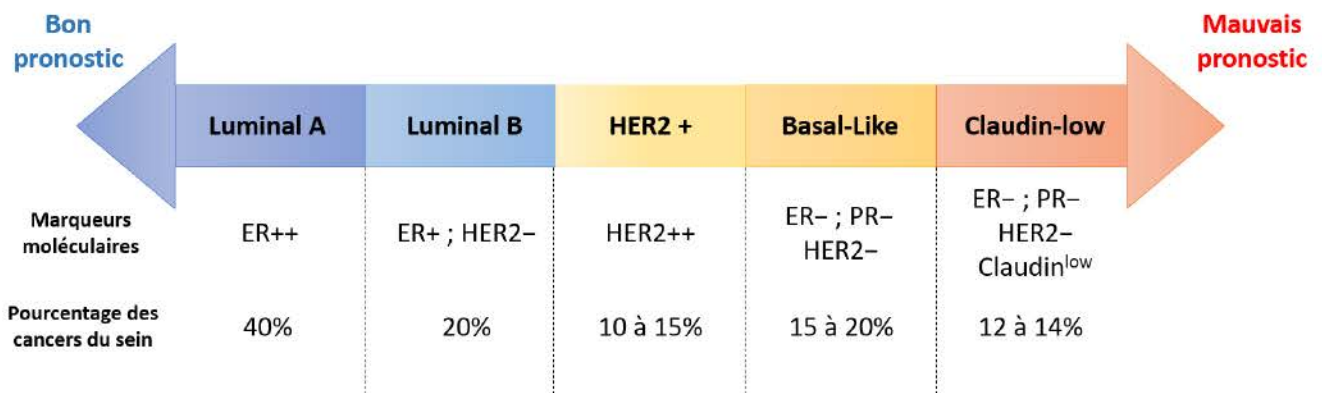


Figure 4 : Classification moléculaire des tumeurs mammaires. Les tumeurs de sous-type Luminal A et B sont les plus rencontrées et sont plutôt de bon pronostic. A l'inverse, les tumeurs triples négatives (ER-, PR-, HER2-) composant les sous-types Basal-Like et Claudin-low ont un mauvais pronostic.

été complétés quelques années plus tard et une classification moléculaire en 5 sous-groupes a été établie (Sorlie *et al.*, 2003). Aujourd'hui, cette classification a légèrement évolué puisque 7 sous-groupes sont aujourd'hui identifiés : Luminal A, Luminal B, Luminal C, HER2 positif, Basal-Like, Normal-Like et Claudin-low (Dvorkin-Gheva et Hassell, 2014; Yersal et Barutca, 2014). L'appartenance des tumeurs mammaires à ces différents sous-groupes repose principalement sur l'expression de récepteurs : le récepteur aux œstrogènes (ER), le récepteur à la progestérone (PR) et le co-récepteur à l'EGF (HER2). A l'exception des sous-groupes Luminal C et Normal-Like, les différentes caractéristiques des sous-groupes sont représentées sur la **figure 4**. En effet, puisque récemment identifiée, la signature moléculaire du sous-groupe Luminal C n'est pas clairement définie (Dvorkin-Gheva et Hassell, 2014). Les cellules du sous-groupe Normal-Like présentent une signature moléculaire se rapprochant des cellules adipeuses (Yersal et Barutca, 2014).

La caractérisation, de chaque tumeur individuellement, au niveau moléculaire, a permis de nombreuses avancées dans la prise en charge thérapeutique des patientes. Cependant, les marqueurs utilisés à ce jour ne sont pas suffisant pour prédire de façon certaine la progression de la maladie, en absence de traitement et pendant la thérapie. C'est pourquoi, de nombreuses équipes de recherche, dont celle du laboratoire d'accueil, travaillent dans le but d'identifier de nouveaux marqueurs moléculaires de la carcinogenèse mammaire. C'est ainsi que le laboratoire a identifié la protéine DDB2 comme étant impliquée dans le contrôle de la prolifération, de l'invasion et de la résistance aux chimiothérapies des cellules cancéreuses mammaires.

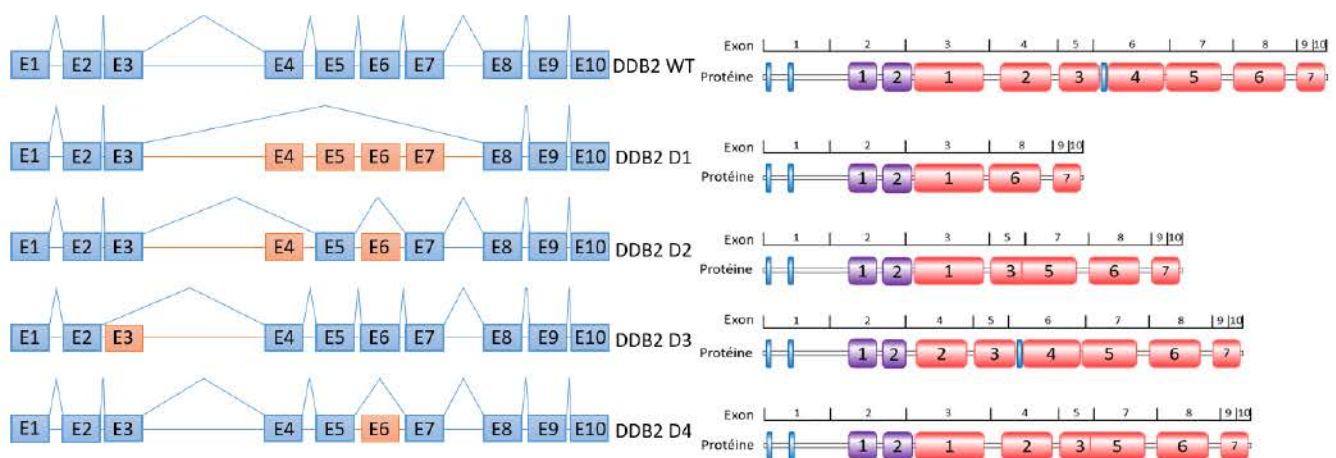


Figure 5 : Représentation schématique des différents variants d'épissage de DDB2. Le gène codant la protéine DDB2 est composé de 10 exons. Un épissage alternatif des exons 3 à 7 permet la production de 5 isoformes. A gauche, les exons épissés sont représentés en orange. Les protéines issues de ces épissages sont représentées à droite. La protéine DDB2 est composée de deux hélices α (représentées en violet), de 7 répétitions de motifs WD40 (en rouge) et de trois séquences NLS (en bleues) (d'après Inoki et al., 2004; Takedachi et al., 2010).

III. La protéine DDB2

III.1. Structure du gène et de la protéine

Le gène codant la protéine DDB2 (Damaged DNA-binding protein 2), aussi appelée p48, est situé sur le bras court du chromosome 11 chez l'Homme (11p11.2). Son homologue est retrouvé uniquement chez les mammifères (Dualan *et al.*, 1995; Tang et Chu, 2002). La séquence codante de ce gène est composée de 1284 paires de bases, décomposées en 10 exons. Ces exons peuvent être épissés de façon alternative et ainsi produire différentes isoformes, connues au nombre de 5 : la forme sauvage étant la plus longue et 4 variants d'épissage plus courts appelés D1 à D4 (**Figure 5**) (Inoki *et al.*, 2004). La forme sauvage est exprimée de façon ubiquitaire dans les différents organes du corps humain à l'exception du cerveau. A l'inverse, le variant D1 est, quant à lui, plus fortement exprimé dans le cerveau et dans le cœur. Les autres variants D2, D3 et D4 sont très peu exprimés, quelque-soit le type cellulaire étudié (Inoki *et al.*, 2004).

La régulation de l'expression du gène codant la protéine DDB2 est encore aujourd'hui mal comprise. Les premières études réalisées ont montré que, dans des cellules normales, l'expression du gène *DDB2* est augmentée de façon transitoire après une exposition à des rayonnements ultra-violets (UV) et que cette augmentation est dépendante du niveau d'expression de la protéine p53 (Hwang *et al.*, 1999). La protéine p53, en association avec la protéine BRCA1 (Breast Cancer Associated 1), est capable d'activer l'expression du gène codant la protéine DDB2 en se fixant sur son élément de réponse présent dans la partie non traduite du premier exon, en aval du site d'initiation de la transcription (Takimoto *et al.*, 2002; Tan et Chu, 2002). Plus récemment, une autre équipe a montré que l'isoforme TAp63 γ de la protéine p63, possédant une structure très similaire à celle de la protéine p53, est capable aussi de se fixer sur cette même séquence et d'activer l'expression du gène *DDB2* (Liu *et al.*, 2012). D'autre part, une étude a révélé la présence de plusieurs sites de fixation pour le facteur de transcription Sp1. Le site le plus proximal semble être un élément majeur de la régulation de l'expression de ce gène puisqu'une mutation de ce site diminue de plus de 80% l'activité du promoteur dans des cellules HeLa (Nichols *et al.*, 2003). De plus, le gène *DDB2* ne possédant pas de boîte TATA, il est probable que le facteur de transcription Sp1 permette l'expression basale de ce gène (Schmidt *et al.*, 1989). Des éléments de réponse fonctionnels pour les facteurs de transcription NF-1 (Nuclear Factor 1) et E2F, respectivement dans la partie proximale du promoteur et la partie non codante du premier exon du gène, ont également été identifiés, mais

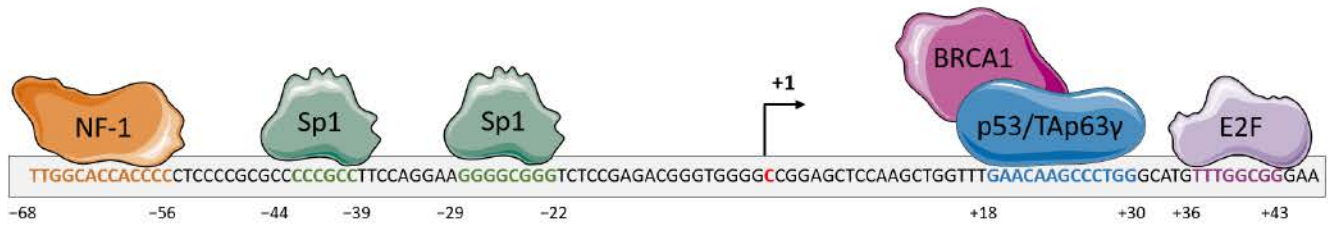
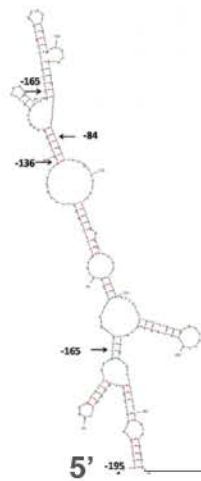


Figure 6 : Représentation schématique de la régulation du gène codant la protéine DDB2. La région proximale du promoteur de ce gène contient des éléments de réponse pour les facteurs de transcriptions NF-1 (en orange) et Sp1 (en vert) en amont du site d'initiation de la transcription. En aval du site d'initiation de la transcription, des éléments de réponse pour p53 ou TAp63γ (en bleu) et E2F (en violet) ont été identifiés. La protéine p53 intervient en association avec la protéine BRCA1. La fixation de ces différentes protéines entraînent la transcription du gène codant DDB2 (d'après Liu et al., 2012; Takimoto et al., 2002; Tan et Chu, 2002).



Structure de l'ARNm de DDB2

5'UTR : IRES

**3'UTR : Région
riche en U**

Figure 7 : Représentation schématique de l'ARNm codant la protéine DDB2. L'ARNm de DDB2 possède un élément IRES dans sa partie 5'-UTR et une région riche en U dans sa partie 3'-UTR (d'après Dai et al., 2015; Melanson et al., 2013).

leur importance dans la régulation de l'expression semble plus modérée (**Figure 6**) (Nichols *et al.*, 2003). Deux études menées plus récemment ont montré que le gène *DDB2* peut être régulé au niveau post-transcriptionnel en condition de stress, aux niveaux des régions 5' et 3'-UTR de l'ARNm codant la protéine. En effet, un élément IRES (Internal Ribosome Entry Site) a été identifié dans la partie 5'-UTR de l'ARNm. Lors d'un stress généré par un sevrage en sérum ou après un traitement à la doxorubicine par exemple, cet élément permet l'initiation de la traduction indépendamment du mécanisme traductionnel impliquant la coiffe 7-méthylguanosine de l'ARNm. Ainsi, une augmentation du niveau protéique de DDB2 est observée dans des cellules soumises à un stress, alors que le taux du transcrit ne varie pas (Dai *et al.*, 2015). La région 3'-UTR de l'ARNm contient quant à elle une région de 25 nucléotides riche en Uracile. Cette région favorise et accélère l'export de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme, ainsi que sa traduction pour augmenter rapidement le niveau de la protéine DDB2 (**Figure 7**). Cette région permet également de diminuer le temps de demi-vie de l'ARNm, en accélérant sa dégradation (Melanson *et al.*, 2013).

La protéine DDB2, sous forme sauvage, est composée de 428 acides aminés pour un poids moléculaire de 48 kDa. Sa localisation exclusivement nucléaire s'explique par la présence de 3 séquences NLS (Nuclear Localization Signal) : deux positionnées du côté N-terminal et une située au centre de la séquence protéique (Tang et Chu, 2002). Au niveau structural, la protéine DDB2 est organisée en un motif hélice-boucle-hélice à son extrémité N-terminale, suivie d'un domaine WD40. L'hélice-boucle-hélice de DDB2 permet l'interaction avec une autre protéine à domaine WD40, appelée DDB1 (Damaged DNA-binding protein 1) (**Figure 8**) (Feldes et Bonatto, 2015). De façon générale, ce domaine WD40 est formé de 7 répétitions de motifs WD40, chacune composée d'une séquence de 44 à 66 acides aminés contenant une région variable de 11 à 24 acides aminés suivie d'un dipeptide glycine-histidine (GH) à l'extrémité N-terminale et se terminant par un dipeptide tryptophane-acide aspartique (WD) (**Figure 9A**). Ces répétitions sont organisées en feuillets β anti-parallèles (**Figure 9B**). Les domaines WD40 sont décrits pour leur capacité à interagir avec des protéines mais également avec des peptides ou encore des acides nucléiques. Au sein de son domaine WD40, la protéine DDB2 présente une séquence appelée boîte DWD (DDB1-binding WD40 protein), qui participe également à l'interaction entre les protéines DDB2 et DDB1 (**Figure 8**) (Fischer *et al.*, 2011; Migliori *et al.*, 2012; Scrima *et al.*, 2008). Une mutation au sein de cette séquence rend impossible l'interaction entre ces deux protéines (He *et al.*, 2006).

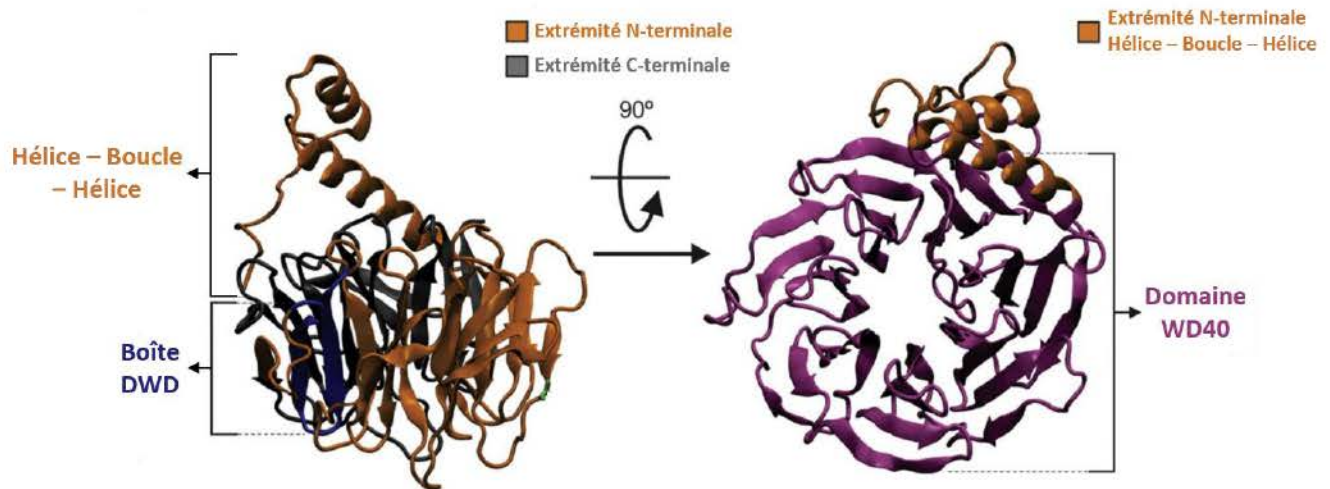


Figure 8 : Structure cristallographique de la protéine DDB2. La protéine DDB2 est constituée d'un domaine hélice – boucle – hélice à son extrémité NH2 terminale suivi d'un domaine WD40 contenant 7 motifs WD40. La face inférieure de ce domaine WD40 est capable d'interagir avec l'ADN. Le domaine WD40 contient également un motif appelé boîte DWD (DDB1-binding WD40 protein) permettant à DDB2 de se lier à la protéine Culline 4A par l'intermédiaire de la protéine DDB1 lors de la réparation de l'ADN (d'après Feltes et Bonatto, 2015).

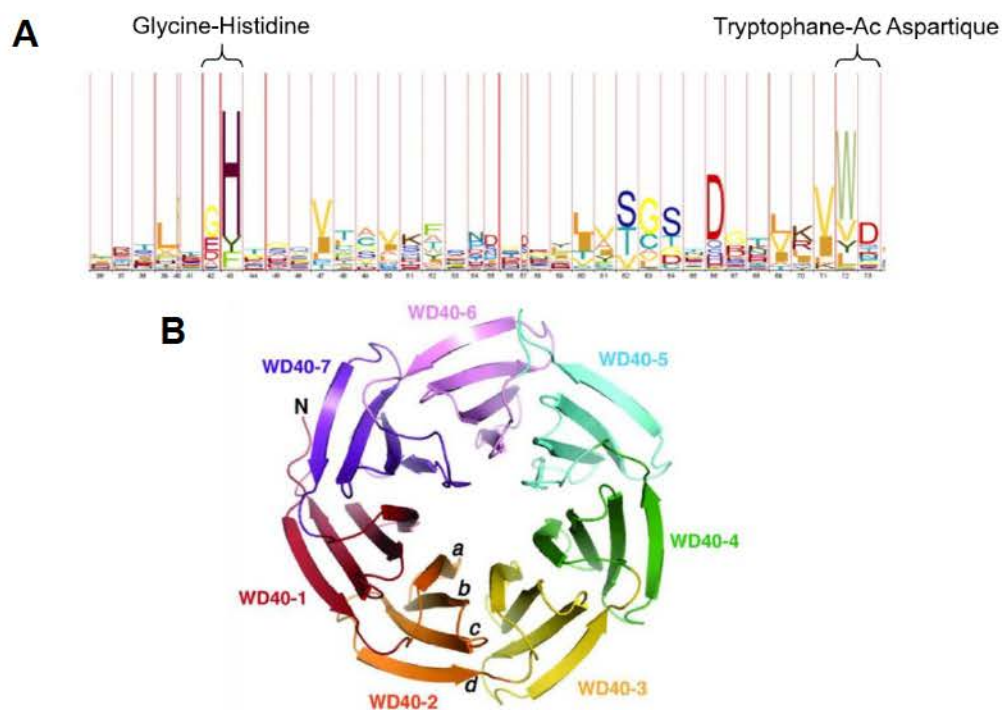


Figure 9 : Séquence et structure cristallographique d'un domaine WD40. (A) Séquence d'une répétition WD40. Les lettres correspondent aux acides aminés conservés à chaque position. Chaque répétition est constituée d'une région variable de 11 à 24 acides aminés, suivie d'un dipeptide Glycine-Histidine et terminée par un dipeptide Tryptophane-Acide Aspartique (d'après Stirnimann et al., 2010). (B) Les domaines WD40 ont des structures en forme de cylindre ou de tonneau. Ces structures offrent de nombreuses surfaces d'interactions possibles au niveau de la face supérieure, inférieure et latérale (d'après Migliori et al., 2012).

De par leur capacité à interagir avec de nombreuses protéines et acides nucléiques, les protéines à domaine WD40 interviennent dans de nombreuses fonctions cellulaires fondamentales, telles que la transduction du signal, la division cellulaire, l'assemblage du cytosquelette, la synthèse d'ARN, la réparation de l'ADN, la transcription génique ou encore le chimiotactisme, et sont reliées à différentes pathologies, comme le cancer, certaines maladies neurologiques et maladies métaboliques. C'est pourquoi, à l'heure actuelle, de nombreuses études tentent de développer de nouvelles thérapies ayant pour cible ces protéines à domaine WD40 (Schapira *et al.*, 2017; Stirnimann *et al.*, 2010).

III.2. Fonctions biologiques impliquant la protéine DDB2

III.2.1. La réparation de l'ADN

III.2.1.1. La réparation par excision de nucléotides (NER)

La protéine DDB2 est une protéine connue initialement pour son implication dans les mécanismes de réparation de l'ADN par excision de nucléotides (NER) suite à une exposition aux rayonnements ultra-violet (UV) (Tang et Chu, 2002). Ce mécanisme de réparation consiste à exciser les nucléotides endommagés, les remplacer grâce à l'action de l'ADN polymérase, puis à joindre les deux extrémités du brin lésé par l'intermédiaire d'une ADN ligase. Le système de réparation NER est impliqué dans deux types de mécanismes. Le premier, la réparation par excision de nucléotides couplée à la transcription (TC-NER), consiste à réparer les lésions uniquement présentes sur un fragment d'ADN transcrit, c'est-à-dire les lésions bloquant la transcription. Le second est la réparation par excision de nucléotides génomique globale (GG-NER) qui consiste à réparer les lésions présentes sur tout le génome. Ces deux mécanismes font intervenir des complexes protéiques spécifiques différents (de Boer et Hoeijmakers, 2000). La protéine DDB2 intervient uniquement dans le mécanisme de réparation GG-NER (Hwang *et al.*, 1999; Tang et Chu, 2002). Une déficience au niveau du mécanisme de réparation NER est associée à trois maladies autosomiques récessives : le *Xeroderma Pigmentosum* (XP), le syndrome de Cockayne (CS) et la Trichothiodystrophie. La maladie *Xeroderma Pigmentosum* est caractérisée par une extrême sensibilité aux rayonnements UV et un risque élevé de développer des cancers de la peau. Des travaux ont permis de mettre en évidence 7 groupes de complémentation (notés XPA à XPG). Le groupe E (XPE) fait référence à des mutations portées par la partie codante du gène *DDB2* (Tang et Chu, 2002).

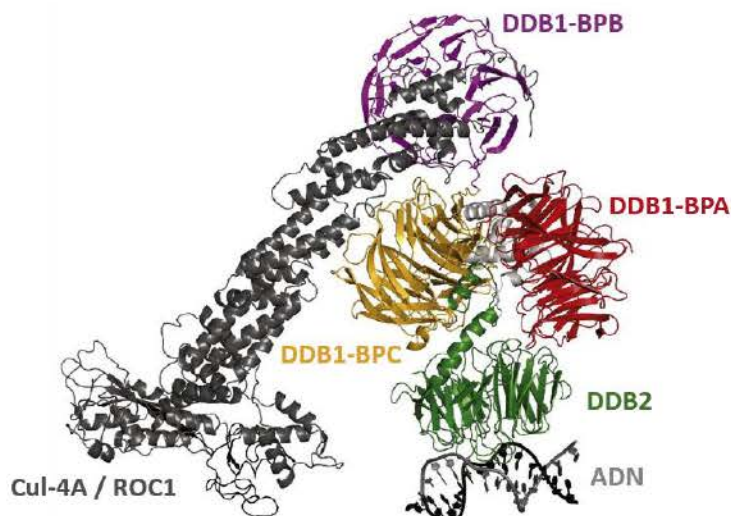


Figure 10 : Structure cristallographique du complexe UV-DDB. Le complexe UV-DDB est composé des protéines DDB2, DDB1, Culline 4A et ROC1. La reconnaissance des lésions sur l'ADN se fait par l'intermédiaire de la protéine DDB2. Le domaine hélice-boucle-hélice de DDB2 interagit avec la partie située entre les domaines BPA et BPC de la protéine DDB1. La Culline 4A possède une activité E3 ubiquitine ligase (d'après Fischer et al., 2011).

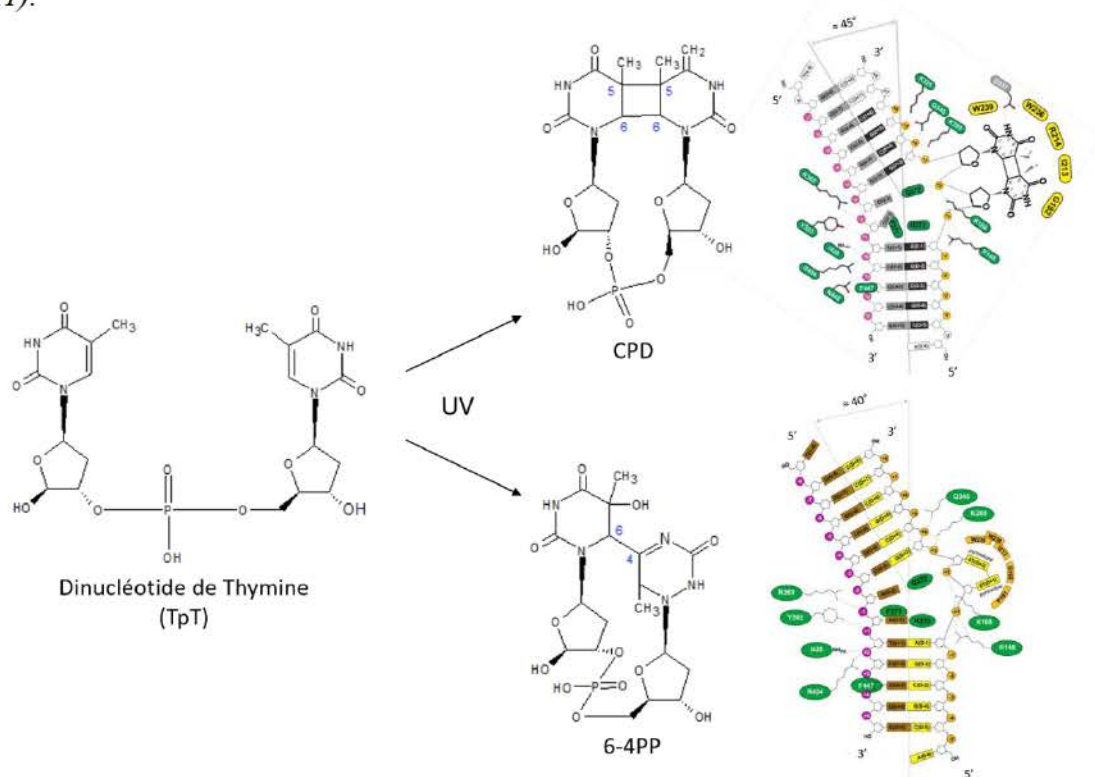


Figure 11 : Représentation schématique des deux types de lésions de l'ADN induites par les UV : les dimères cyclobutaniques de pyrimidine (CPD) et les pyrimidine (6-4) pyrimidones (6-4PP). Une exposition aux UV peut former à partir d'un dimère de thymine des lésions de type CPD ou 6-4PP. Ces lésions créent une distorsion de l'ADN reconnue par la protéine DDB2, respectivement de 45° et 40° pour les CPD et 6-4PP. Les acides aminés de la protéine DDB2 qui interagissent avec le squelette de la molécule d'ADN sont représentés en vert et ceux interagissant avec les pyrimidines modifiées en jaune (d'après Fischer et al., 2011; Scrima et al., 2008).

III.2.1.2. Le complexe UV-DDB

Dans le système de réparation NER, DDB2 forme, avec les protéines DDB1, Cul4A (Culline 4A) et ROC1, le complexe UV-DDB (**Figure 10**) (Fischer *et al.*, 2011; Nag *et al.*, 2001; Tang et Chu, 2002). La protéine DDB1 joue le rôle d'adaptateur entre les protéines DDB2 et Cul4A (Fischer *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2006). En venant se loger entre deux des trois domaines WD40 de la protéine DDB1 (les domaines BPA et BPC), le domaine hélice-boucle-hélice de la protéine DDB2 situé en N-terminal permet l'interaction entre ces deux protéines (**Figure 10**). Ce complexe est le premier à intervenir au cours de la réparation GG-NER en reconnaissant spécifiquement les lésions UV-induites, et en particulier les dimères cyclobutaniques de pyrimidines (CPD) et les pyrimidines (6-4) pyrimidones (6-4PP). Ces dimères de pyrimidines peuvent être reconnus par le complexe UV-DDB, *via* la protéine DDB2, mais également par les protéines XPC, XPA et RPA (Replication Protein A). Contrairement aux 6-4PP, la présence du complexe UV-DDB est essentielle à la réparation des CPD. En effet, la réparation des CPD est fortement altérée dans des cellules n'exprimant pas la protéine DDB2 ou exprimant une protéine DDB2 mutée non fonctionnelle (Fischer *et al.*, 2011; Scrima *et al.*, 2011). De plus, le photoproduit CPD possède une conformation dynamiquement plus stable que le 6-4PP, ce qui pourrait expliquer une meilleure reconnaissance de la lésion par DDB2 et une meilleure efficacité de la réparation (Dehez *et al.*, 2017). La protéine DDB2, au sein du complexe UV-DDB, a pour fonction la reconnaissance de la lésion UV-induite. De manière plus précise, DDB2 reconnaît une distorsion de l'ADN créée par la lésion formant un angle de 45° dans le cas de CPD et de 40° dans le cas de 6-4PP (**Figure 11**) (Fischer *et al.*, 2011; Scrima *et al.*, 2011).

Au sein du domaine WD40 de la protéine DDB2, il existe une structure en épingle à cheveux composée de trois résidus arginine (Arg148, Arg369 et Arg404) et deux résidus lysine (Lys168 et Lys280), capable de s'insérer dans le petit sillon de l'ADN double brin, provoquant son élargissement et le déroulement de l'ADN localement. Ce mécanisme entraîne l'éjection du dimère lésé vers l'extérieur, le rendant accessible à la machinerie de réparation (Fischer *et al.*, 2011; Scrima *et al.*, 2008). DDB2 recrute alors, le complexe protéique XPC-hHR23B, au niveau de la lésion, indispensable au recrutement d'autres facteurs de la réparation comme les protéines XPA et le facteur de réplication A (RPA) (Lans *et al.*, 2012; Marteijn *et al.*, 2014). La fonction ubiquitine ligase E3 portée par la Cul4A permet alors l'ubiquitinylation de la protéine DDB2 et du complexe XPC. La poly-ubiquitinylation de la protéine DDB2 entraîne sa dégradation par le protéasome 26S, alors qu'elle stabilise la liaison entre l'ADN lésé et le

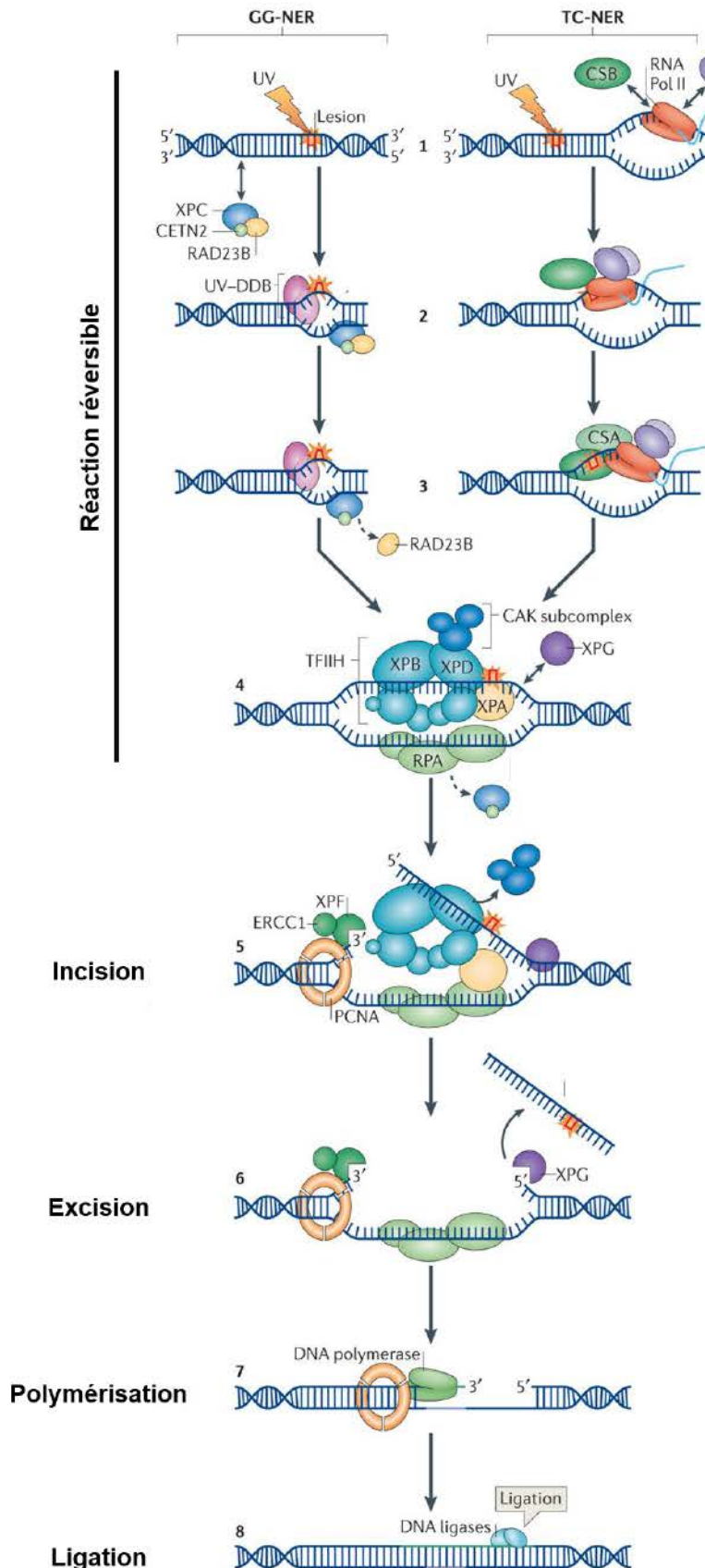


Figure 12 : Représentation schématique de la réparation de l'ADN par excision de nucléotides (NER). Ce type de réparation implique deux systèmes différents : la réparation NER génomique globale (GG-NER) intervenant sur l'ensemble du génome ou la réparation NER couplée à la transcription (TC-NER) intervenant sur l'ADN transcrit uniquement. A l'exception de la phase de reconnaissance de la lésion, le mécanisme de réparation est identique. Les protéines XPC et DDB2, au sein du complexe UV-DDB, reconnaissent la lésion et interviennent uniquement dans le système GG-NER (1 à 3). Le complexe TFIIH est ensuite recruté ainsi que les protéines RPA et XPA qui permettent le déroulement de l'ADN (4). L'incision du brin endommagé est réalisée du côté 3' par l'endonuclease XPF (5) et l'intervention de XPG du côté 5' permet l'excision (6). L'ADN polymérase δ permet la synthèse de novo du brin excisé (7) et des ADN ligases permettent de combler la brèche (8) (d'après Marteijn et al., 2014).

complexe protéique XPC (Rapić-Otrin *et al.*, 2003; Takedachi *et al.*, 2010). La dégradation de DDB2 dépend de sa liaison directe avec la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) par l'intermédiaire de la boîte PIP (PCNA Interacting Protein) située dans son extrémité N-terminale (Cazzalini *et al.*, 2014). Une mutation de la protéine DDB2 empêchant son interaction avec la protéine PCNA affecte l'efficacité de la réparation de l'ADN et favorise la prolifération des cellules (Perucca *et al.*, 2018). Le complexe TFIIH (Transcription Factor IIH) est ensuite recruté par le complexe XPC. Ce complexe, impliqué dans l'initiation de la transcription et dans la réparation de l'ADN, est composé de dix sous-unités. Les fonctions hélicases des deux sous-unités XPB et XPD permettent de dérouler l'ADN autour de la lésion et de rendre accessible le site lésé aux deux endonucléases XPG et XPF-ERCC1. Ces deux protéines vont permettre l'excision d'un fragment de 22 à 30 nucléotides du brin lésé. Le brin excisé sera reformé grâce à l'intervention de l'ADN polymérase δ et des ligases I et III (**Figure 12**) (Lans *et al.*, 2012; Marteijn *et al.*, 2014).

De par son rôle dans la réparation de l'ADN, la protéine DDB2 est également impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire. En effet, elle recrute, au niveau du site lésé, les protéines kinases ATM/ATR (Ataxia Telangiectasia Mutated/Ataxia Telangiectasia and Rad3 related). Ces dernières vont alors être activées et vont phosphoryler leurs substrats comme les protéines Chk1 (Checkpoint kinase 1), Chk2, H2AX (H2A histone family member X) et BRCA1. Ces protéines permettent le maintien de l'intégrité du génome et le blocage du cycle cellulaire dans l'attente de la réparation de l'ADN (Ray *et al.*, 2013).

III.2.1.3. Remodelage de la chromatine

Dans le cadre de la réparation GG-NER, plusieurs études ont mis en évidence l'importance de la protéine DDB2 dans le remodelage de la chromatine.

Il a été montré que la décondensation de la chromatine aux alentours des sites lésés est dépendante de la présence de la protéine DDB2 fonctionnelle sur la lésion, de l'activité de la protéine PARP1 (Poly-ADP Ribose Protein 1) et d'hydrolyse d'ATP. L'activation de PARP1 conduit à l'ajout de chaînes de poly-ADP ribose au niveau des histones et de la protéine DDB2 elle-même. Ceci a pour conséquence la dissociation de l'octamère d'histones, la décondensation de la chromatine mais également la stabilisation de DDB2 sur la lésion. L'ajout d'ADP riboses sur la protéine DDB2 empêcherait temporairement son ubiquitinylation par la Cul4A (Luijsterburg *et al.*, 2012; Pines *et al.*, 2012).

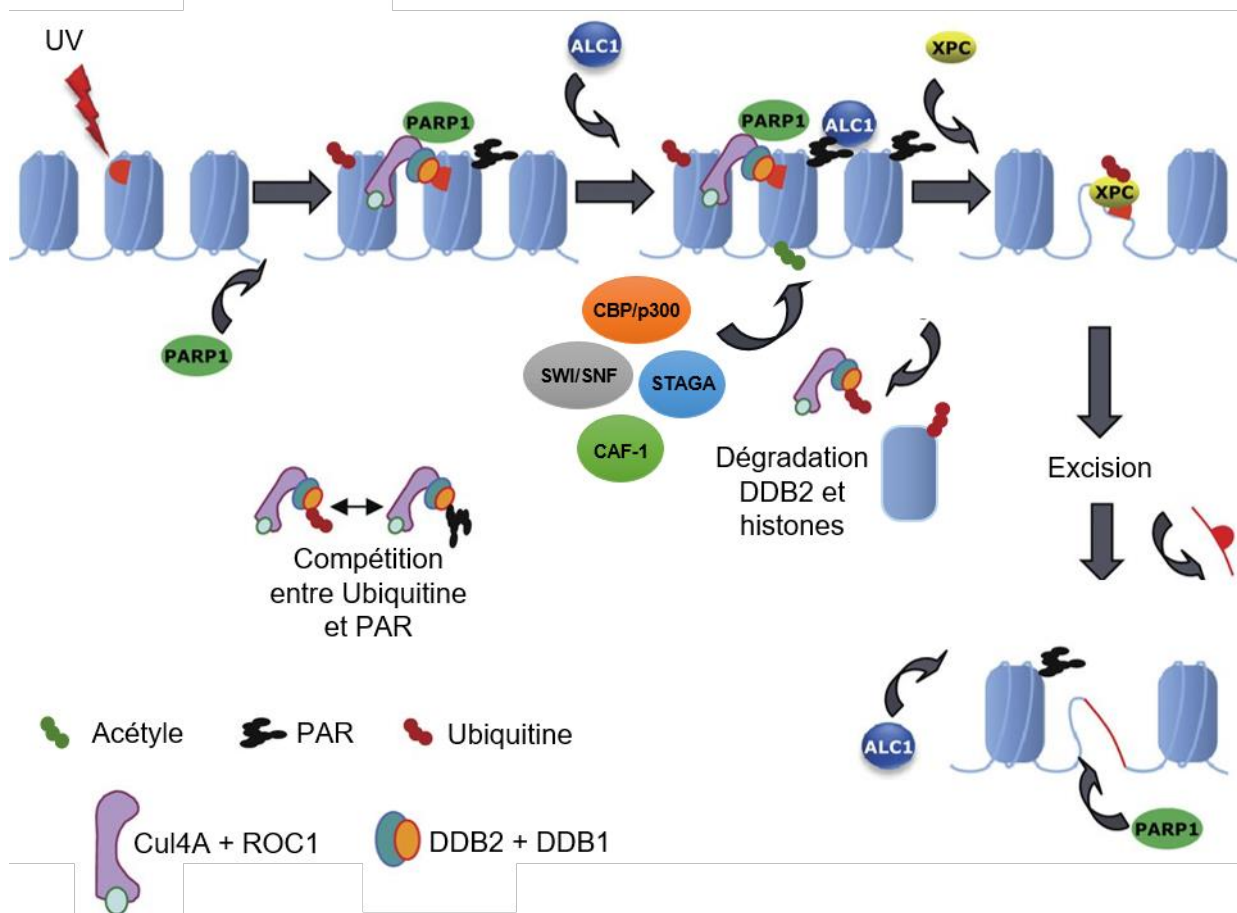


Figure 13 : Représentation schématique du rôle de la protéine DDB2 dans le remodelage de la chromatine lors de la réparation NER. Lors de la réparation NER, la protéine DDB2 recrute différents complexes protéiques intervenant dans le remodelage de la chromatine. Dans les premières étapes, la protéine PARP1 permet la stabilisation de DDB2 sur la lésion après PARylation de celle-ci et des histones. La décondensation de la chromatine dépend de l'intervention de l'hélicase ALC1 ainsi que l'acétylation des histones par les protéines CBP/p300, SWI/SNF et STAGA. La Cul4A, au sein du complexe UV-DDB, intervient dans l'ubiquitinylation des histones, de DDB2 et de XPC (d'après Pines et al., 2012).

D'autre part, l'interaction entre la protéine DDB2 et l'ADN favorise l'ubiquitinylation des histones H2A, H3 et H4 par la protéine Cul4A. Cette modification des histones est suivie de leur dégradation par la voie du protéasome et favorise ainsi la décondensation de la chromatine, nécessaire à la réparation des lésions de l'ADN (Lan *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2006).

Enfin, il a été montré que la protéine DDB2 était capable d'interagir directement avec des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine, comme les complexes protéiques CBP/p300 (CREB-Binding Protein/p300) et STAGA (SPT3-TAF(II)31-GCN5L Acetylase), tous deux possédant des activités histone acétyl transférase (HAT), ou encore des protéines de la famille SWI/SNF (SWItch/Sucose NonFermentable) (Datta *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2009). DDB2 permet également le recrutement de l'enzyme CHDL1 (Chromatine Helicase DNA binding protein 1 Like) ou ALC1, appartenant également à la famille SWI/SNF (Pines *et al.*, 2012). Une étude très récemment publiée montre l'importance de DDB2 dans l'acétylation des histones pendant et après la réparation de l'ADN. Au sein du complexe UV-DDB, DDB2 est ainsi capable de réguler le niveau d'acétylation de la lysine 56 de l'histone H3 (H3K56Ac). A l'endroit du site lésé, le niveau de H3K56Ac diminue au cours de la réparation de l'ADN et augmente par la suite. Ce phénomène est permis grâce à l'interaction entre les protéines DDB2 et PCNA, et grâce au recrutement, par le complexe UV-DDB, de la protéine chaperonne des histones CAF-1 (Chromatine Assembly Factor 1) et du complexe CBP/p300 (Zhu *et al.*, 2017).

Tous ces mécanismes, résumés sur la **figure 13**, permettent le relâchement de la chromatine et facilitent l'accès de la machinerie de réparation à l'ADN endommagé.

III.2.1.4. Régulation de l'activité de DDB2

Comme décrit précédemment, l'expression de la protéine DDB2 est induite par la formation de lésions sur l'ADN. Cette induction est dépendante de certaines kinases. En effet, en cas de stress génotoxique, les kinases ATM et ATR sont capables de phosphoryler et d'activer la protéine p53, qui elle-même, est responsable de l'augmentation de l'expression du gène codant la protéine DDB2 (Christmann et Kaina, 2013; Hwang *et al.*, 1999).

En dehors de la modulation de l'expression de son gène, l'activité de la protéine DDB2 peut être modulée par modifications post-traductionnelles. L'ubiquitinylation de la protéine DDB2 par la protéine Cul4A en vue de sa dégradation est le principal mode de régulation de

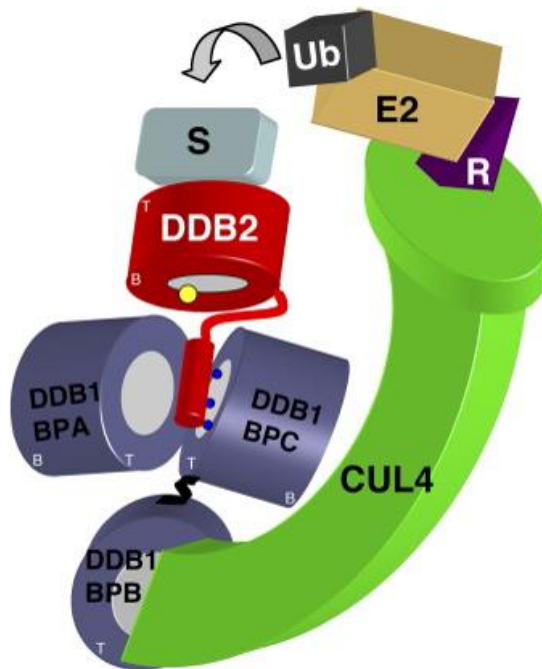


Figure 14 : Représentation schématique de la protéine DDB2 jouant le rôle de DCAF (DDB1 and Culline 4A Associated Factor) lors de la dégradation de protéines. La protéine DDB2 fait le lien et permet le rapprochement entre la fonction E3 ubiquitine ligase portée par la Cul4A et la protéine substrat qui sera dégradée (d'après Lee et Zhou, 2007).

son activité et elle est essentielle au bon déroulement de la réparation de l'ADN (Rüthemann *et al.*, 2016). Le complexe protéique p97 ségrégase, par l'intermédiaire de protéines adaptatrices, interagit avec la protéine DDB2 ubiquitinylée et permet son extraction de la chromatine avant sa dégradation (Puumalainen *et al.*, 2014). La dégradation de DDB2 en réponse à son ubiquitylation semble être dépendante de l'activation des protéines kinases p38/MAPK (Mitogen Associated Protein Kinase) (Zhao *et al.*, 2008).

Dans les premières étapes de la réparation de l'ADN après expositions aux UV, la protéine DDB2 subit une modification post-traductionnelle récemment identifiée, de type SUMOylation par l'enzyme SUMO E3 ligase PIAS γ sur la lysine 309 (Han *et al.*, 2017; Tsuge *et al.*, 2013). Dans les cellules HeLa, cette modification post-traductionnelle semble favoriser uniquement la réparation des lésions de type CPD. L'ajout de groupements SUMO sur la protéine DDB2 diminue son temps de demi-vie (Tsuge *et al.*, 2013). Comme décrit dans le paragraphe précédent, la protéine DDB2 peut être la cible de la protéine PARP1. En effet, la PARylation de DDB2 semble stabiliser la protéine sur l'ADN lésé et empêcher son ubiquitylation lors de l'initiation de la réparation de l'ADN (Pines *et al.*, 2012). De plus, il a été montré que la localisation de la protéine DDB2 dans le noyau et sur l'ADN lésé était dépendante d'une α -N-méthylation de son extrémité N-terminale par l'enzyme NRMT (N-terminale RCC1 Méthyl-Transférase). Cette modification est essentielle à l'initiation de la réparation de l'ADN, notamment des CPD (Cai *et al.*, 2014).

Enfin, la formation du complexe UV-DDB peut être régulée par la présence des variants D1 et D2 formés après épissage alternatif du gène DDB2. Ces deux variants jouent le rôle de dominant négatif. Ils séquestrent la protéine DDB1 dans le cytoplasme, empêchent son import nucléaire et par conséquent la formation du complexe UV-DDB (Inoki *et al.*, 2004).

III.2.2. Dans la dégradation de protéines

De par sa proximité avec la fonction E3 ubiquitine ligase de la protéine Cul4A au sein du complexe UV-DDB, la protéine DDB2 est impliquée dans la dégradation de protéines, en jouant le rôle de protéine appelée DCAF (DDB1 and Cul4A Associated Factor). Dans ce contexte, la protéine DDB2 fait le lien entre la protéine substrat qui sera ubiquitinylée et les protéines DDB1 et Cul4A (**Figure 14**) (Lee et Zhou, 2007). C'est par ce mécanisme que la protéine DDB2 participe à la dégradation du récepteur aux androgènes (AR), de la protéine PAQR3 (Progestin and AdipoQ Receptor family member III) ou encore des protéines p27 et

p53. En régulant la dégradation de ces protéines, DDB2 intervient dans le contrôle du cycle cellulaire et dans l'invasion tumorale (Chang *et al.*, 2012; Qiao *et al.*, 2015; Stoyanova *et al.*, 2008, 2009; Yan *et al.*, 2011).

III.2.3. Dans la transcription génique

L'implication de la protéine DDB2 dans le remodelage de la chromatine laisse suggérer un rôle de cette protéine dans la régulation de l'expression de gènes cibles au niveau transcriptionnel. De plus, les interactions décrites dans la littérature entre DDB2 et des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine comme CBP/p300, SWI/SNF ou encore STAGA permettent un relâchement de la chromatine favorable au recrutement de l'ARN polymérase et à l'expression de gènes.

C'est en 1998 qu'une équipe montre pour la première fois l'implication de la protéine DDB2 dans la régulation transcriptionnelle, par son domaine WD40, qui la rend capable d'interagir avec le facteur de transcription E2F1. Cette interaction augmente l'activité transcriptionnelle de E2F1 et ainsi l'expression des gènes cibles de ce dernier (Hayes *et al.*, 1998). Depuis, de nombreuses autres études ont montré l'implication de la protéine DDB2 dans la transcription génique.

Le laboratoire d'accueil a montré, pour la première fois, que la protéine DDB2 était capable de diminuer le niveau d'expression du gène *SOD2* codant la SODMn (Superoxyde Dismutase à Manganèse) dans des cellules tumorales mammaires. En effet, DDB2 est capable de se fixer sur une séquence cible sur le promoteur du gène *SOD2* (5'-AGCCTGCAGCCT-3'), de favoriser la désacétylation des histones et de recruter un répresseur transcriptionnel, le facteur de transcription AP-2 α (Activator Protein 2 α) (Minig *et al.*, 2009). Ces résultats ont conduit le laboratoire à rechercher d'autres gènes cibles de la protéine DDB2. C'est ainsi qu'un second gène cible, le gène *NFKBIA*, codant la protéine I κ B α , l'inhibiteur cytoplasmique du facteur de transcription NF- κ B a été identifié. La protéine DDB2 est capable de se fixer sur une séquence cible (5'-TCCCCTA-3') située sur le promoteur du gène *NFKBIA* dans des cellules cancéreuses mammaires et d'augmenter son expression, en favorisant le recrutement de CBP/p300 (Ennen *et al.*, 2013).

D'autres équipes ont également identifié des gènes cibles de la protéine DDB2. Ainsi, dans des cellules cancéreuses ovariennes, la protéine DDB2 est capable de se fixer sur le promoteur du gène codant Bcl-2, sur une séquence située à 3814 paire de bases en amont du

site d'initiation de la transcription (5'-AGCTTGAAGCCT-3'). La fixation de DDB2 sur cette séquence entraîne le recrutement de la protéine HDAC1 (Histone Deacetylase 1) par l'intermédiaire de DDB1 et la diminution de l'expression du gène *BCL2* (Zhao *et al.*, 2014). L'activité de DDB2 sur la répression du gène *BCL2* a d'ailleurs été confirmée par le laboratoire dans des modèles de cellules cancéreuses mammaires, mais par l'intermédiaire d'un second site de fixation pour DDB2, identifié dans la partie proximale du gène et dont la séquence n'est pas encore clairement élucidée. L'équipe de Zhao a identifié un autre gène cible de la protéine DDB2. En se fixant sur une séquence similaire à celle du gène *NFKBIA* (5'-TCCCCTT-3') et en recrutant l'histone méthyl-transférase EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2), DDB2 réprime le gène codant la protéine NEDD4L (Neural precursor cell Expressed Developmentally Downregulated 4-Like) (Zhao *et al.*, 2015). De la même manière, cette équipe a montré que DDB2 était capable de se fixer sur deux séquences (5'-AGCCAGTCACCT-3' et 5'-AGCCTGTACTCT-3') sur le promoteur du gène *ALDH1A1* (Aldehyde Dehydrogenase 1 family member A1) et de réprimer son expression en recrutant également la protéine EZH2 (Cui *et al.*, 2018).

Dans des modèles de cellules cancéreuses coliques, une autre équipe a montré que la protéine DDB2 pouvait réguler l'expression de trois gènes cibles, codant les protéines Snail et Zeb1 (Zinc finger E-box Binding homeobox 1) impliquées dans la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM) et le facteur de croissance pro-angiogénique VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). La régulation de ces gènes passe par la fixation de la protéine DDB2 sur leur promoteur et par le recrutement de la tri-méthyl-transférase Suv39h (Roy *et al.*, 2013). Les séquences reconnues par DDB2 sur ces trois promoteurs n'ont pas été identifiées. Par ailleurs, cette même équipe a montré dans les cellules cancéreuses coliques, que la protéine DDB2 active l'expression du gène *SEMA3A* codant la Sémaphorine 3A, en se fixant sur une séquence similaire à celle identifiée sur le promoteur du gène *NFKBIA* (5'-TCCCCTA-3') et en s'associant avec les protéines XRCC5/6 connues pour leur rôle dans la réparation de l'ADN (Fantini *et al.*, 2017). Dans ces cellules cancéreuses coliques, DDB2 est également capable de diminuer l'activation de la voie de transduction Wnt, connue pour son rôle dans la carcinogenèse colorectale, en augmentant l'expression du gène codant la protéine RNF43 (Ring Finger protein 43), une E3 ubiquitine ligase ayant pour cible le récepteur de la voie Wnt appelé Frizzled. Plus précisément, la protéine DDB2 recrute la protéine β -caténine, un des acteurs de la voie de signalisation dépendante de Wnt, par l'intermédiaire de l'enzyme EZH2 sur le promoteur du gène *RNF43* (5'-TCCCCTAA-3') (Huang *et al.*, 2017).

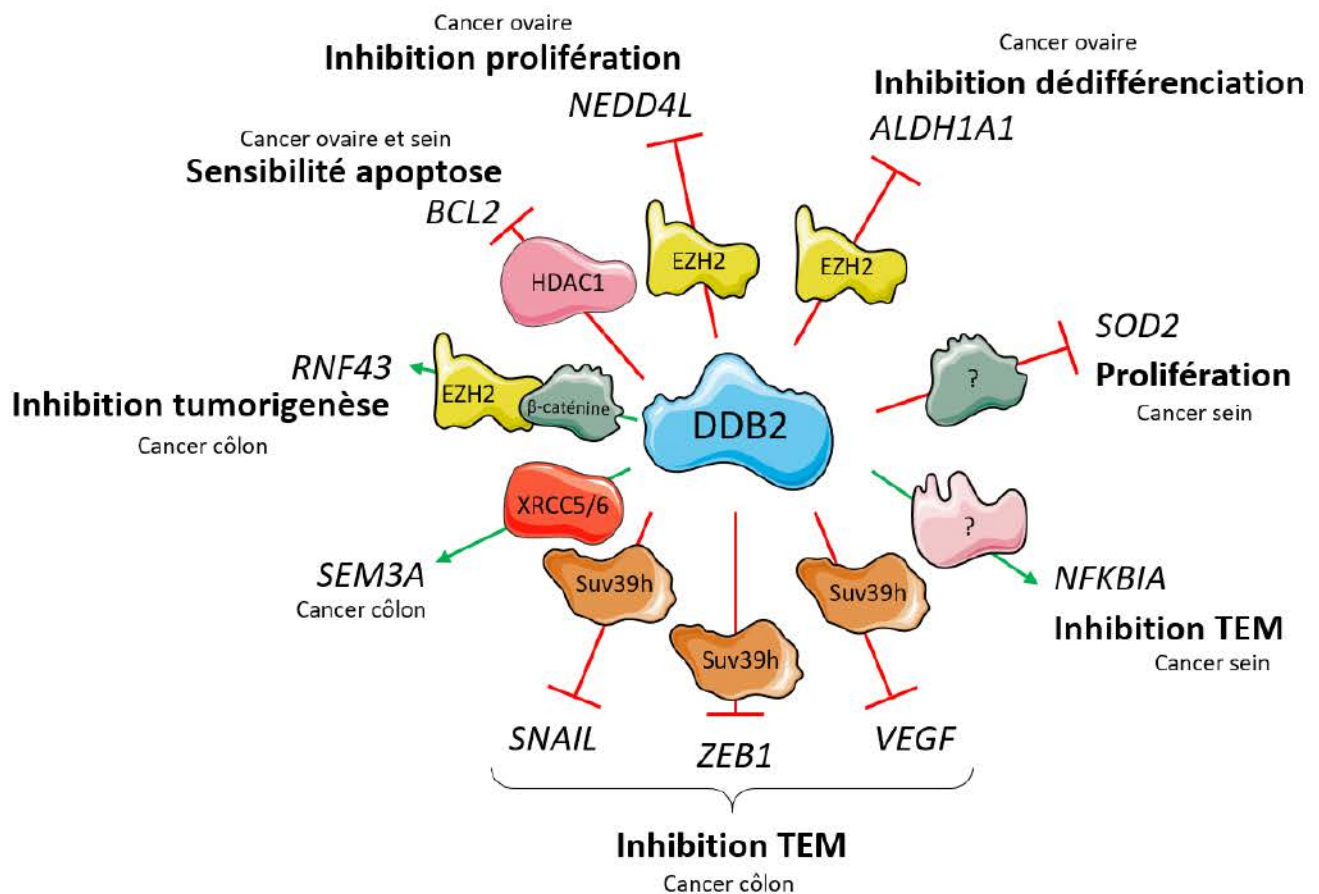


Figure 15 : Représentation schématique du rôle de la protéine DDB2 dans la régulation de la transcription génique. Les traits rouges indiquent la répression du gène par la protéine DDB2 alors que les flèches vertes indiquent une activation. Les partenaires protéiques de DDB2 intervenant dans la régulation de l'expression génique sont indiqués sur les traits/flèches. La conséquence biologique de la modulation de l'expression de chaque gène est indiquée dans chaque type de cancer.

L'ensemble des gènes régulés par la protéine DDB2 et ses partenaires protéiques impliqués est résumé dans la *figure 15*.

III.2.4. Rôle de DDB2 dans les cancers

III.2.4.1. Rôle de DDB2 comme suppresseur de tumeur

Comme décrit dans les paragraphes précédents, la protéine DDB2 est connue initialement pour son rôle dans la réparation globale du génome par excision de nucléotides. Elle a été identifiée pour la première fois chez l'Homme chez des patients présentant une déficience dans le système de réparation NER. Une altération du mécanisme de réparation NER est associée à trois maladies autosomales récessives : le *Xeroderma Pigmentosum* (XP), le syndrome de Cockayne (CS) et la Trichothiodystrophie. Les patients atteints de *Xeroderma Pigmentosum* souffrent d'une sensibilité accrue aux rayonnements UV et possèdent un risque augmenté de développer un cancer de la peau (Tang et Chu, 2002).

Sept groupes de complémentation ont été identifiés pour la maladie *Xeroderma Pigmentosum*, appelés XPA à XPG. Chaque groupe possède une déficience pour le système NER provenant d'une protéine non fonctionnelle. Les mutations de la protéine DDB2 la rendant non fonctionnelle correspondent au groupe XPE. Généralement, ces mutations sont de type faux sens et affectent un nucléotide. Elles altèrent l'interaction entre la protéine DDB2 et l'ADN comme la substitution K244E, ou l'interaction entre les protéines DDB2 et DDB1 comme la substitution D307Y (Nichols *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2011; Tang et Chu, 2002).

Chez des souris homozygotes invalidées pour le gène codant la protéine DDB2, une exposition aux UV entraîne un développement de tumeurs de la peau. Cependant, il est également observé un développement spontané de tumeurs dans plusieurs tissus en absence d'exposition des souris aux rayonnements UV, en relation avec une accumulation de lésions sur l'ADN non réparées et à l'origine de mutations géniques (Itoh *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2005).

Une autre équipe a mis en évidence l'influence de la protéine DDB2 comme suppresseur de tumeur dans le cancer ovarien. En effet, un faible taux de protéine DDB2 est détecté dans des cellules cancéreuses ovariennes. Lorsque ces cellules surexpriment DDB2 après introduction de son gène, elles diminuent leur capacité à former une tumeur chez des souris *nude*. D'après les auteurs de cette étude, DDB2 joue cet effet protecteur en limitant la population de cellules souches cancéreuses (CSC) et en s'opposant à la dédifférenciation des

cellules cancéreuses ovariennes, par la répression qu'elle exerce sur l'expression du gène *ALDH1A1* (Cui *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2014).

Dans les cellules cancéreuses coliques, DDB2 s'oppose à l'effet pro-tumorigénique de la voie Wnt en augmentant l'expression du gène codant la protéine RNF43. Cette protéine est capable d'ubiquitinyler le récepteur de Wnt appelé FZD5 (Frizzled 5) et d'entraîner sa dégradation par la voie du protéasome. Par ce mécanisme, DDB2 s'oppose ainsi à l'émergence et à la progression des cellules tumorales coliques dépendantes de la voie Wnt (Huang *et al.*, 2017; Schatoff *et al.*, 2017). Ces résultats sont renforcés par une étude très récente qui montre qu'une forte expression de la protéine DDB2 est associée à un taux de survie global favorable de patients atteints de cancers colorectaux par opposition à ceux présentant un niveau d'expression de DDB2 faible (Yang *et al.*, 2018).

III.2.4.2. Rôle de DDB2 dans la prolifération des cellules tumorales

Plusieurs études ont mis en évidence une variabilité dans l'expression de la protéine DDB2 au cours du cycle cellulaire dans des cellules normales. En effet, dans des fibroblastes humains, la protéine DDB2 est détectée en fin de phase G1 et son niveau d'expression décline au cours de la phase S. Ces résultats sont confirmés dans cette même étude sur des cellules cancéreuses de la lignée HeLa (Nag *et al.*, 2001). Il a été montré que la protéine DDB2 était capable d'interagir avec le facteur de transcription E2F1, d'augmenter son activité et en conséquence le niveau d'expression de ses gènes cibles (Hayes *et al.*, 1998). E2F1 est connu pour jouer un rôle majeur dans la transcription de gènes impliqués dans la réplication de l'ADN et l'entrée en phase S du cycle cellulaire (DeGregori *et al.*, 1995). De plus, un élément de réponse pour ce facteur de transcription est présent sur le promoteur du gène DDB2, en aval du codon d'initiation de la transcription (Nichols *et al.*, 2003). Ces données sont des preuves de l'implication de la protéine DDB2 dans le contrôle du cycle cellulaire notamment dans le passage de la phase G1 à la phase S.

D'autres travaux ont également montré l'implication de la protéine DDB2 dans le contrôle du cycle cellulaire, notamment en régulant négativement le niveau des protéines p21^{Waf1/Cip1} et p27, deux protéines clefs dans le contrôle négatif de la prolifération et la transformation maligne. Ces protéines sont des inhibiteurs des cyclines dépendantes des kinases (CDK). Leur expression entraîne un arrêt du cycle cellulaire suite à des dommages à l'ADN. L'expression de la protéine p21^{Waf1/Cip1} est régulée positivement par la protéine p53. Lors de

l'irradiation avec des UV de fibroblastes murins embryonnaires (MEFs), DDB1 recrutée par DDB2, se lie à la protéine p53 phosphorylée au niveau de la sérine 18 (p53^{S18P}) pour entraîner sa dégradation et permettre ainsi de maintenir un niveau faible d'expression de p21^{Waf1/Cip1}. Ce mécanisme permet la poursuite du cycle cellulaire après réparation des lésions (Sharma et Nag, 2014; Stoyanova *et al.*, 2009).

Dans le cas de p27, une étude réalisée dans des cellules HEK 293 montre que la protéine DDB2 régule négativement son niveau d'expression en induisant sa dégradation par le protéasome. Dans ce cas précis, la protéine DDB2 interagit avec la protéine Artemis, connue pour intervenir dans la recombinaison V(D)J, la réparation des cassures doubles brins et dans le passage des différents points de contrôle du cycle cellulaire. Artemis interagit avec le complexe UV-DDB par l'intermédiaire de DDB2 et recrute la protéine p27 qui sera ubiquitinylée par la fonction E3 ubiquitine ligase de la Cul4A et dégradée par le protéasome. Ainsi, les protéines DDB2 et Artemis jouent un rôle de médiateur de la dégradation de la protéine p27, ce qui permet l'entrée en phase S du cycle cellulaire (Yan *et al.*, 2011).

DDB2 a également été montrée par le laboratoire comme participant activement à la prolifération des cellules tumorales mammaires (paragraphe III.3). A l'inverse, dans des cellules cancéreuses ovariennes, l'expression de DDB2 est associée à une diminution de leurs capacités prolifératives. Lorsque la protéine DDB2 est exprimée, les cellules sont plus sensibles à l'effet antiprolifératif induit par le TGF β (Transforming Growth Factor β). Dans ces cellules, la protéine DDB2 présente cette activité en réprimant l'expression du gène *NEDD4L* par l'intermédiaire d'un site de fixation similaire à celui identifié par le laboratoire dans le promoteur du gène *NFKB1A* (Zhao *et al.*, 2015). Ce gène *NEDD4L* code une protéine identifiée comme limitant l'activation de la voie du TGF β en ubiquitinylant les protéines effectrices activées Smad 2/3 grâce à sa fonction E3 ubiquitine ligase (Gao *et al.*, 2009). Enfin, la protéine DDB2 est également capable de diminuer les propriétés prolifératives des cellules cancéreuses prostatiques, en jouant le rôle de protéine DCAF, qui favorise l'ubiquitinylation du récepteur aux androgènes par la Cul4A. Le récepteur aux androgènes, dont dépendent les cellules cancéreuses prostatiques pour proliférer, est alors dégradé par la voie du protéasome (Chang *et al.*, 2012).

III.2.4.3. Rôle de DDB2 dans l'apoptose

En plus de son rôle dans le contrôle du cycle cellulaire et la prolifération des cellules cancéreuses, la protéine DDB2 joue un rôle dans la mort cellulaire par apoptose.

En se focalisant sur le rôle initial de la protéine DDB2 dans la réparation NER, une équipe a montré que les MEFs (Mouse Embryonic Fibroblast) KO pour le gène *DDB2*, sont incapables d'entrer en apoptose, provoquant ainsi l'apparition de tumeurs après exposition aux UV (Itoh *et al.*, 2004). De même, au cours du développement embryonnaire, les souris KO pour le gène *DDB2* développent une rate et des testicules de taille plus importante que les souris sauvages. L'absence de DDB2 diminue l'entrée en apoptose des cellules lymphoïdes dans la rate et des cellules souches des testicules (Itoh *et al.*, 2007). Ce défaut d'entrée en apoptose s'explique, en partie, par une baisse de l'activité de la protéine p53 dans les cellules *ddb2*^{-/-} (Itoh *et al.*, 2004). Dans la continuité de ces travaux, une étude a montré que les cellules MEFs *ddb2*^{-/-}, contrairement aux cellules sauvages, étaient également incapables d'entrer en apoptose après traitement avec des agents de chimiothérapie comme le cisplatine ou l'aclarubicine. Les auteurs de cette étude montrent l'implication de la protéine p21^{Waf1/Cip1}, qui est dégradée dans les cellules exprimant DDB2 par l'intermédiaire du complexe UV-DDB après exposition aux UV ou aux agents de chimiothérapie, pour faciliter l'entrée en apoptose. Ainsi, dans les cellules déficientes en protéine DDB2, la dégradation de la protéine p21^{Waf1/Cip1} est bloquée, empêchant l'entrée des cellules en apoptose. Dans cette même étude, ces résultats sont confirmés sur des cellules humaines de la lignée HeLa (Bagchi et Raychaudhuri, 2010; Stoyanova *et al.*, 2009). De plus, des cellules HeLa rendues résistantes au cisplatine présentent également une résistance à l'apoptose induite par les UV. Cette résistance est la conséquence d'une augmentation de l'expression de la protéine DDB2 et d'une augmentation de l'expression de la protéine c-Flip (Cellular FLICE-like inhibitory protein) induite par cette dernière (Sun *et al.*, 2010).

La protéine DDB2 est également impliquée dans la sensibilité des cellules cancéreuses aux agents de chimiothérapie. Une étude menée sur des cellules cancéreuses ovariennes montre que la protéine DDB2 est essentielle à l'entrée de ces cellules en apoptose après traitement au cisplatine, ceci en dehors de toute implication de la protéine dans la réparation des lésions induites par l'agent de chimiothérapie. Le mécanisme moléculaire fait intervenir l'activité de DDB2 sur la répression qu'elle exerce sur l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 en se fixant sur le promoteur du gène (Barakat *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2014). Une étude menée au laboratoire et non publiée, confirme l'ensemble de ces résultats dans les cellules cancéreuses mammaires (Thèse de R. Klotz, 2014).

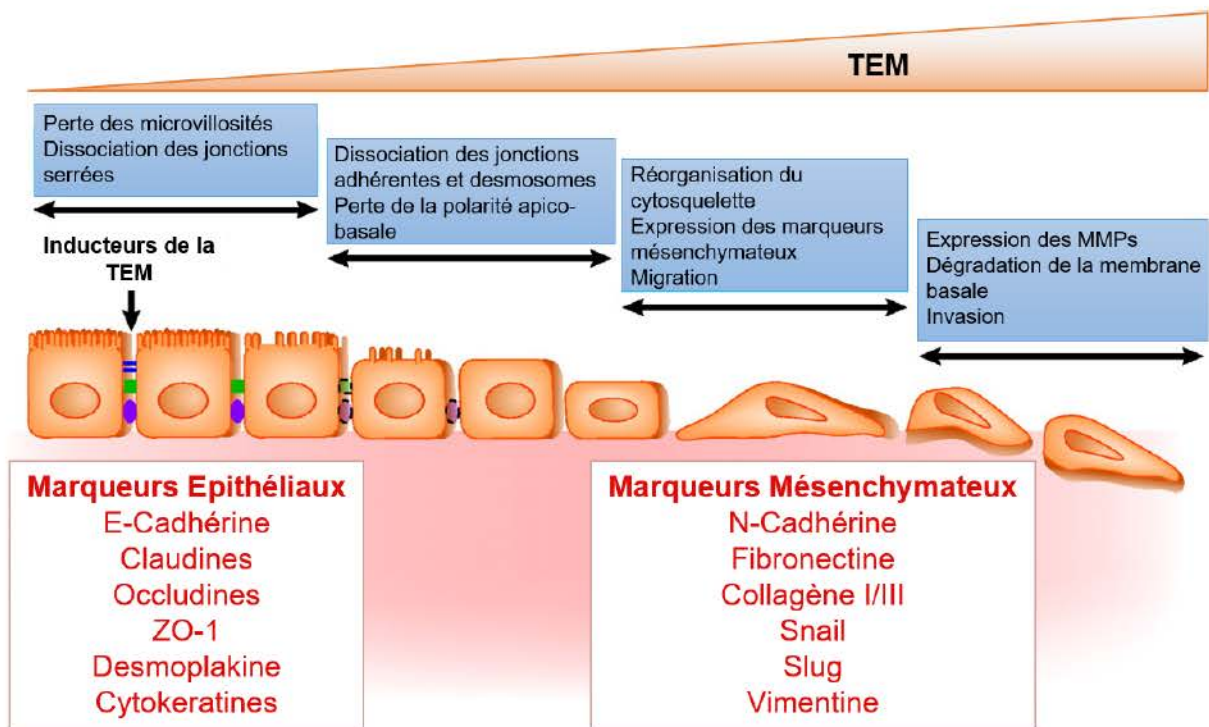


Figure 16 : Représentation schématique des événements cellulaires et moléculaires caractérisant la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Ce schéma indique les différentes étapes essentielles de la TEM avec les marqueurs épithéliaux et mésenchymateux dont l'expression est modulée (d'après Aroeira et al., 2007).

III.2.4.4. Rôle de DDB2 dans la migration et l'invasion des cellules tumorales

Des études récentes menées au laboratoire et par d'autres équipes ont montré l'importance de la protéine DDB2 dans la progression tumorale.

Tandis que notre équipe a montré le rôle de DDB2 dans le contrôle des capacités invasives et migratrices des cellules tumorales mammaires (paragraphe III.3), une équipe américaine a révélé le rôle de cette protéine dans l'acquisition du phénotype invasif des cellules cancéreuses coliques. Une diminution du niveau d'expression de la protéine DDB2 dans des cellules cancéreuses coliques augmente leurs capacités invasives *in vitro* et à développer des métastases *in vivo*. Ces données sont confirmées par une analyse rétrospective sur plus de 200 échantillons tumoraux indiquant une corrélation inverse entre le niveau d'expression de la protéine DDB2 et le grade des tumeurs. Au niveau cellulaire, DDB2 diminue les capacités invasives des cellules cancéreuses coliques en bloquant la transition épithélio-mésenchymateuse ou TEM. Cette dernière est particulièrement importante au cours du développement embryonnaire de certains organes et glandes (Kalluri et Weinberg, 2009). Au cours de cette étape, les cellules tumorales perdent leur caractère épithélial original avec une diminution de l'expression de certains marqueurs épithéliaux comme la E-cadhérine ou les cytokératines, en faveur de marqueurs mésenchymateux comme la N-cadhérine ou la vimentine, un changement morphologique et un remaniement du cytosquelette (**Figure 16**) (Aroeira *et al.*, 2007).

De façon plus précise, au niveau moléculaire, la protéine DDB2, au sein du complexe UV-DDB, réprime l'expression des gènes codant les facteurs de transcription Snail et Zeb1, en recrutant la tri-méthyl-transférase Suv39h au niveau des promoteurs de ces gènes, ce qui induit une augmentation de la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3), et donc une compaction de la chromatine responsable d'une diminution de la transcription. Ce mécanisme est également observé au niveau du promoteur du gène codant la protéine VEGF impliquée dans l'angiogenèse tumorale et l'échappement métastatique des cellules cancéreuses. L'ensemble de ces travaux montre la capacité de la protéine DDB2 à s'opposer à l'acquisition d'un phénotype invasif des cellules cancéreuses coliques et que la diminution de son expression représente un événement potentiellement prédictif de la progression métastatique des tumeurs (Roy *et al.*, 2013).

Cependant, une étude plus récente montre que la protéine DDB2 est capable, à l'inverse, de favoriser la migration des cellules cancéreuses gastriques, en interagissant avec la protéine PAQR3 (Progestin and AdipoQ receptor family member III). Cette interaction entraîne l'ubiquitinylation de PAQR3 par la fonction E3 ubiquitine ligase de la Cul4A du complexe UV-DDB, puis sa dégradation par le protéasome. PAQR3 est un suppresseur de tumeur connu comme étant impliqué dans l'induction de l'apoptose, l'inhibition de la prolifération et de l'invasion de cellules cancéreuses (Yu *et al.*, 2015).

III.3. Rôle de DDB2 dans les cancers du sein

L'ensemble des travaux du laboratoire a porté sur le rôle de DDB2 dans la tumorigenèse mammaire et a contribué à révéler l'intérêt clinique de cette protéine en cancérologie mammaire. Son gène est exprimé différemment selon le type de cancer du sein. En effet, les cellules cancéreuses mammaires non invasives et exprimant le récepteur aux œstrogènes α (ER α +) comme les cellules MCF-7 et T47D présentent un niveau d'expression élevé de la protéine DDB2. A l'inverse, dans les cellules tumorales invasives et métastatiques, n'exprimant pas le récepteur ER α (ER α -), comme les cellules SKBR3 et MDA-MB231, le niveau d'expression de la protéine DDB2 est très faible (Kattan *et al.*, 2008a). Une étude rétrospective réalisée sur 92 tumeurs mammaires confirme ces résultats et montre une corrélation inverse entre le taux de transcrits codant la protéine DDB2 et le grade histologique SBR des tumeurs : le niveau d'expression des transcrits codant DDB2 est plus élevé dans les tumeurs de bas grade SBR I et SBR II que dans les tumeurs de haut grade SBR III (Ennen *et al.*, 2013). Bien qu'il semble exister une corrélation entre le niveau d'expression du gène *DDB2*, le niveau d'agressivité tumorale et l'expression d'ER α dans les cellules tumorales mammaires, les mécanismes à l'origine de la régulation de l'expression de la protéine DDB2 dans les cancers du sein sont très peu connus et font actuellement l'objet d'une recherche approfondie au sein du laboratoire d'accueil.

L'importance de la protéine DDB2 dans la prolifération des cellules tumorales mammaires ER α +, qui la surexpriment naturellement a été mise en évidence au sein du laboratoire. Il a été montré que cette protéine active la prolifération de ces cellules tumorales en favorisant leur passage en phase de transition G1/S du cycle cellulaire, et qu'elle exerce en partie cette activité en maintenant une expression faible de la superoxyde dismutase mitochondriale (SODMn) (Minig *et al.*, 2009). Cette dernière est une enzyme antioxydante,

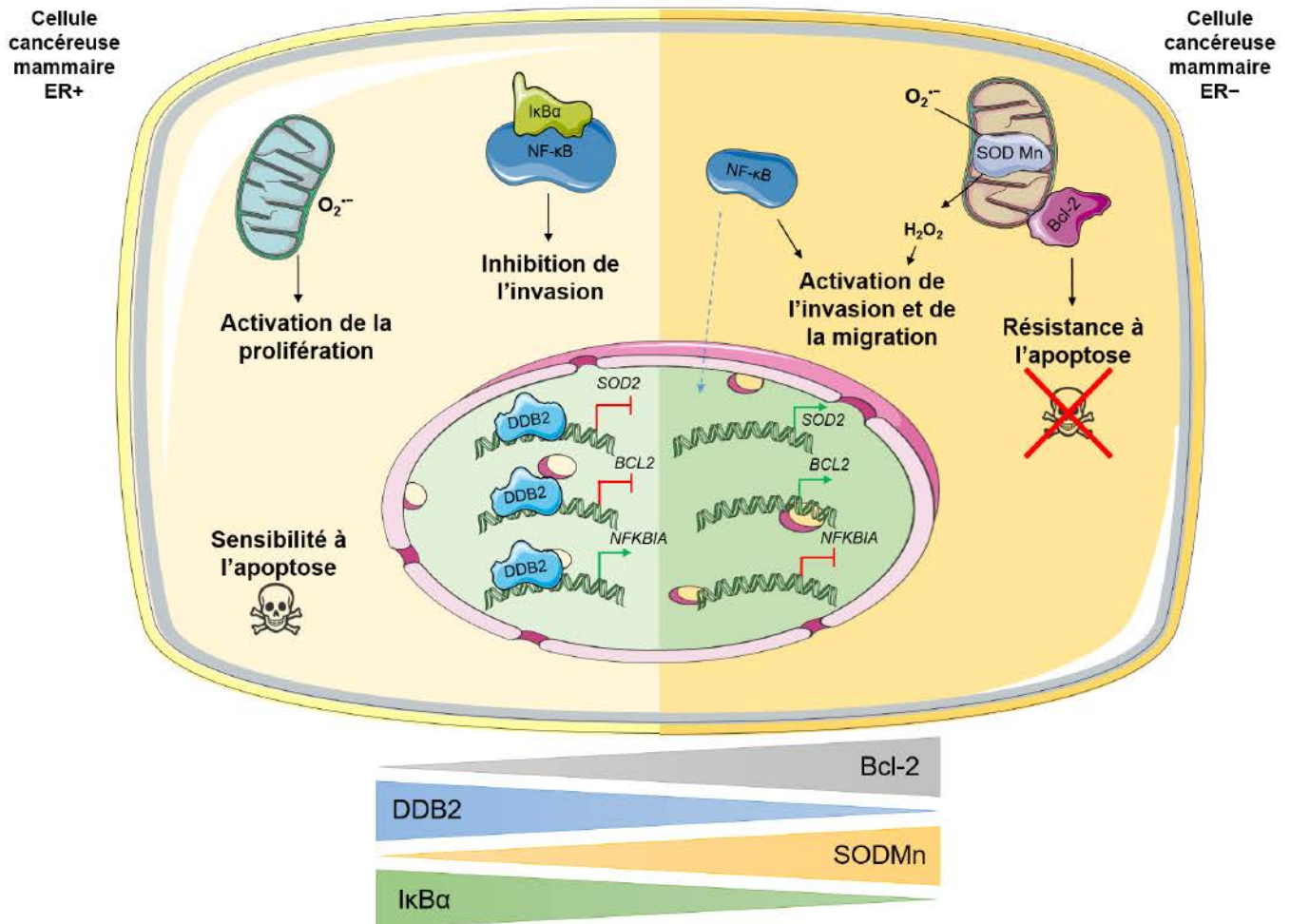


Figure 17 : Représentation schématique de l'implication de la protéine DDB2 dans les cellules cancéreuses mammaires. Les cellules cancéreuses mammaires sensibles aux œstrogènes (ER+) expriment la protéine DDB2. Cette dernière, en réprimant l'expression de la SOD Mn provoque l'accumulation de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ et active ainsi la prolifération des cellules tumorales. De plus, en réprimant l'expression de Bcl-2 mais en augmentant celle d'I κ B α , DDB2 rend les cellules tumorales ER+, respectivement plus sensibles à l'apoptose, et moins invasives par la séquestration de NF- κ B. A l'inverse, dans les cellules ER-, la présence faible de DDB2 entraîne une expression élevée de la SOD Mn et par conséquent une accumulation d' H_2O_2 , ainsi qu'une activation constitutive de NF- κ B, qui contribuent ensemble à augmenter les capacités migratrices et invasives de ces cellules. De plus, l'expression élevée de Bcl-2 conduit à une résistance à l'apoptose.

qui, en éliminant des espèces actives de l'oxygène telles que les anions superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), est connue pour son rôle dans le développement des tumeurs. En présence d'une expression élevée de DDB2, un faible niveau d'expression de la SODMn entraîne une accumulation d'anions superoxyde, connu pour activer de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses mammaires (Becuwe *et al.*, 2014; López-Lázaro, 2007)

Le laboratoire a également montré que la protéine DDB2 était capable de s'opposer à l'induction des capacités invasives et migratrices des cellules cancéreuses mammaires. En effet, une surexpression de la protéine DDB2 dans des cellules tumorales métastatiques, comme les lignées cellulaires MDA-MB231 et SKBR3, entraîne une diminution de leurs capacités invasives *in vitro* et à développer des métastases pulmonaires *in vivo*. Cette activité de DDB2 consistant à diminuer les propriétés invasives des cellules cancéreuses mammaires est dépendante de sa capacité à réguler l'expression des gènes cibles codant la SODMn et la protéine I κ B α . En maintenant une expression faible de la SODMn, la protéine DDB2 favorise plutôt l'accumulation de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et un niveau faible de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans les cellules tumorales mammaires non invasives. En effet, le peroxyde d'hydrogène est connue pour jouer le rôle de second messager en activant de nombreuses voies de signalisation impliquées dans les capacités invasives des cellules tumorales (Nelson *et al.*, 2003). Ces résultats expliquent en partie ceux obtenus antérieurement par le laboratoire, qui montraient, qu'en absence d'expression de DDB2, une expression basale élevée de la SODMn dans les cellules tumorales mammaires métastatiques favorisait leurs capacités invasives, en activant en particulier la métalloprotéase matricielle 9 (MMP-9) (Becuwe *et al.*, 2014; Kattan *et al.*, 2008b). L'autre mécanisme par lequel DDB2 a été montrée s'opposer aux capacités invasives des cellules tumorales mammaires, est son influence sur l'expression du gène codant la protéine I κ B α , l'inhibiteur cytoplasmique du facteur de transcription NF- κ B. Ainsi, dans les cellules tumorales mammaires non invasives, la surexpression constitutive de DDB2 maintient une expression élevée de la protéine I κ B α , avec pour conséquence une activité basale faible du facteur de transcription NF- κ B (**Figure 17**) (Ennen *et al.*, 2013). En effet, le facteur de transcription NF- κ B est connu pour activer l'expression de nombreux gènes cibles impliqués dans l'invasion tumorale des cellules cancéreuses mammaires comme les métalloprotéases matricielles (MMP) et des protéines caractéristiques de la TEM (Nguyen *et al.*, 2015).

Néanmoins, une étude plus récente menée au laboratoire met en évidence que DDB2 intervient dans le contrôle des capacités d'adhérence des cellules tumorales mammaires. En

effet, il est connu que les cellules tumorales acquièrent des propriétés invasives et métastatiques, en modulant en profondeur leurs capacités d'adhérence, lors de la TEM. Cette étude visait à mieux comprendre l'implication réelle de DDB2 dans ces événements précoces que représente la modulation des capacités d'adhérence lors de la TEM subite par des cellules tumorales mammaires, avant leur dissémination dans les tissus environnants. Elle a révélé en particulier, que l'expression de DDB2 s'oppose à la migration des cellules tumorales mammaires en influençant significativement les propriétés nanomécaniques et en augmentant l'élasticité de la membrane plasmique, en relation avec des modifications dans les capacités d'adhérence et une diminution du réseau d'actine corticale. Ces observations sont soutenues par une approche transcriptomique qui révèle une modulation de l'expression de gènes régulant l'adhérence cellulaire selon l'expression de DDB2. Une analyse bioinformatique, réalisée sur cette approche transcriptomique, indique que plusieurs des gènes modulés selon l'expression de DDB2 sont la cible de la voie de signalisation du TGF β 1, un inducteur bien connu de la TEM. Cette analyse bioinformatique a été confortée en montrant en particulier que l'induction des gènes, tels que *PAIL*, *SNAIL* et *CTGF*, par la voie du TGF β 1 est inhibée lorsque les cellules tumorales mammaires surexpriment expérimentalement DDB2 (Barbieux *et al.*, 2016).

Enfin, comme ce qui a été montré pour les cellules cancéreuses ovariennes (Barakat *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2014), la protéine DDB2 est associée à une sensibilité augmentée vis-à-vis de certains agents de chimiothérapie couramment utilisés dans le traitement des cancers du sein. Une étude menée au laboratoire et non publiée, révèle que les cellules cancéreuses mammaires, lorsqu'elles expriment fortement la protéine DDB2, présentent une sensibilité accrue à la doxorubicine et au 5-fluorouracile (5-FU). Cette chimiosensibilité augmentée des cellules tumorales dépend à la fois de l'influence négative qu'exerce DDB2 sur l'activité de NF- κ B et sur l'expression du gène codant la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (**Figure 17**) (Thèse de R. Klotz, 2014).

La protéine DDB2 présente donc un fort intérêt clinique en cancérologie en tant que facteur prédictif de la progression et de la réponse thérapeutique des cellules tumorales, en régulant l'expression de gènes cibles, dont un certain nombre reste encore à identifier. Parmi ces gènes cibles, NFKBIA, identifié au laboratoire, et codant la protéine I κ B α , est particulièrement intéressant car il est l'inhibiteur cytoplasmique du facteur de transcription NF- κ B. En effet, ce dernier est connu pour jouer un rôle fondamental dans le développement embryonnaire, la progression et la résistance aux thérapies des cellules tumorales, en particulier d'origine mammaire.

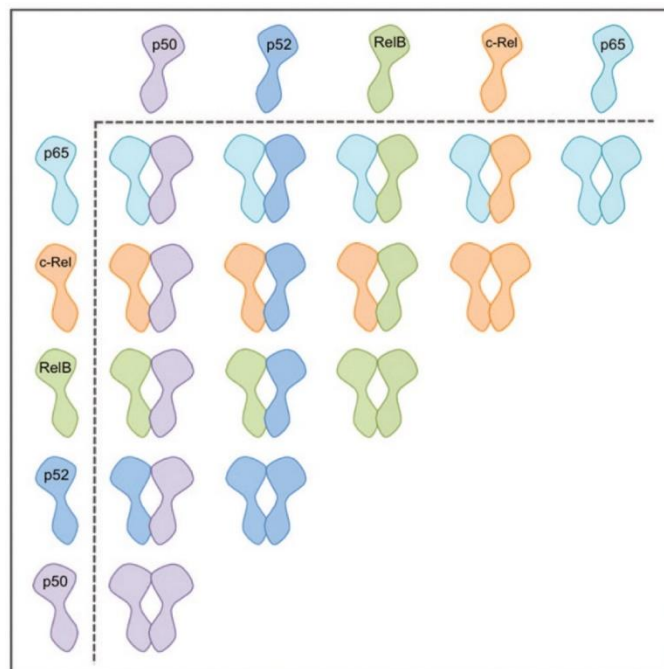


Figure 18 : Liste des différentes associations possibles des sous-unités formant le facteur de transcription NF- κ B. Le facteur de transcription NF- κ B est un homo- ou hétérodimère formé des sous-unités p50, p65/RelA, p52, RelB et c-Rel. L'association de ces sous-unités deux à deux permet de former 15 complexes NF- κ B différents (d'après Herrington et al., 2016).

IV. Le facteur de transcription NF- κ B

IV.1. Généralités

Ce facteur de transcription a été initialement découvert comme étant impliqué dans la polarisation dorso-ventrale lors des premières étapes de développement de la *Drosophile*. Cette protéine, appelée dorsal, est décrite comme une protéine cytoplasmique et nucléaire capable de se lier à l'ADN (Steward, 1989). L'orthologue de dorsal chez les vertébrés correspond à la famille des facteurs de transcription NF- κ B ou Nuclear Factor kappa B (Pires *et al.*, 2018).

Chez l'Homme, le facteur de transcription NF- κ B a été identifié comme étant une protéine nucléaire capable de réguler l'expression de la chaîne kappa des immunoglobulines dans des lymphocytes B humain stimulés par du lipopolysaccharide bactérien ou LPS. Cette étude a également montré que l'activation de ce facteur de transcription était possible à la fois dans des cellules T (Jurkat) mais aussi dans des cellules d'origine non-lymphoïde comme des cellules HeLa (Sen et Baltimore, 1986).

Depuis, de nombreux travaux ont permis de montrer l'implication de ce facteur de transcription dans différents processus biologiques normaux comme lors de la réponse immunitaire innée, l'inflammation, le développement embryonnaire, la mort cellulaire par apoptose, la croissance et la survie cellulaire (Espinosa *et al.*, 2014; Espín-Palazón et Traver, 2016; Hayden et Ghosh, 2004). A l'inverse, une dérégulation de l'activité de ce facteur de transcription est retrouvée dans certaines pathologies comme les maladies inflammatoires chroniques telle que la polyarthrite, les maladies neurodégénératives, l'obésité ou encore les cancers (Courtois et Gilmore, 2006; Shoelson *et al.*, 2003).

IV.2. Structure du complexe NF- κ B

Les facteurs de transcription NF- κ B sont composés de cinq protéines appartenant toutes à la famille des protéines Rel. Cette famille comporte la protéine p50 et son précurseur p105 (NF- κ B1), p52 et son précurseur p100 (NF- κ B2), p65 (RelA), RelB et c-Rel, codées respectivement par les gènes *NFKB1*, *NFKB2*, *RELA*, *RELB* et *REL* (Pires *et al.*, 2018). Le facteur de transcription NF- κ B est un complexe protéique généralement homo- ou hétérodimérique, composé de l'assemblage de deux des cinq protéines citées précédemment (**Figure 18**) (Herrington *et al.*, 2016). Même si l'assemblage des différents membres des

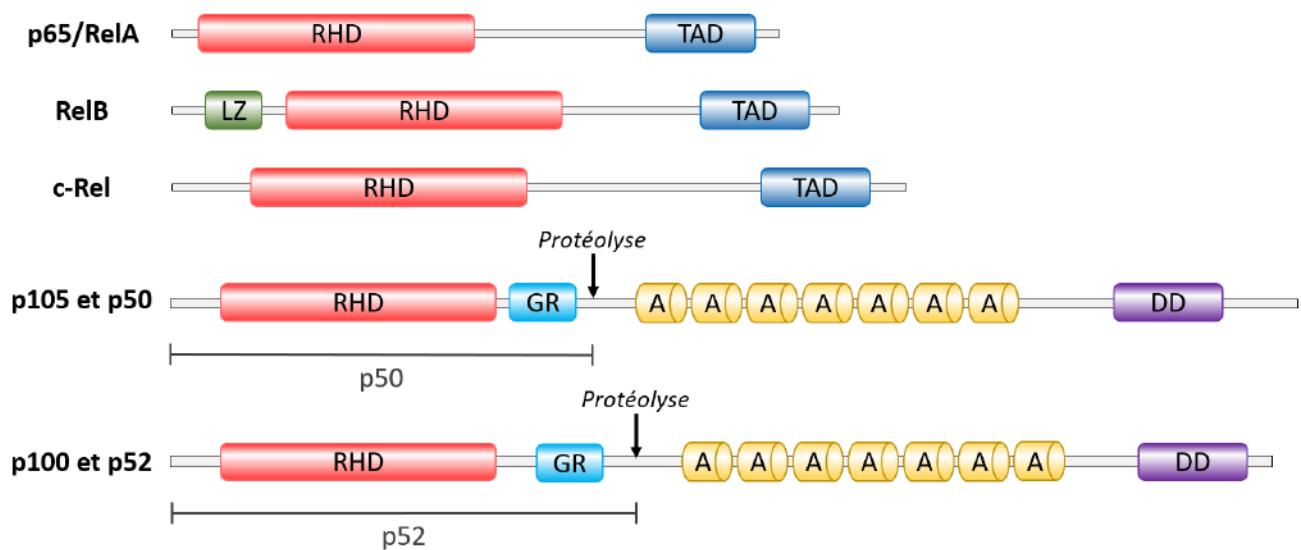


Figure 19 : Représentation schématique de la structure des protéines de la famille Rel. Les protéines de la famille Rel sont constituées d'un domaine RHD (Rel Homology Domain) à leur extrémité N-terminale. Ce domaine permet la dimérisation, la liaison à l'ADN ainsi que la liaison avec les domaines ankyrine de l'inhibiteur I κ B. RelB possède à son extrémité NH2 terminale un domaine leucine zipper (noté LZ). Les protéines RelA, RelB et c-Rel possèdent à leur extrémité C-terminale un domaine de transactivation (noté TAD) alors que les protéines p105 et p100 possèdent un domaine riche en glycine (noté GR), des répétitions de motif ankyrine (notés A) ainsi qu'un domaine de mort ou Death Domain (noté DD). Les répétitions de motif ankyrine ainsi que les domaines de mort sont éliminés après maturation par protéolyse (d'après Hinz et al., 2012).

protéines de la famille Rel est possible, les dimères p50/p50, p50/p65 et p52/RelB semblent, de par leurs structures, les plus stables (Huang *et al.*, 1997, 2005).

Les différentes protéines composant la famille des facteurs de transcription NF- κ B possèdent à leur extrémité N-terminale un domaine très conservé (présent également chez la protéine dorsal), d'environ 30 acides aminés, appelé domaine RHD (Rel Homology Domain) (Gilmore, 2006). Le domaine RHD est essentiel pour l'homo- ou l'hétérodimérisation, la translocation nucléaire grâce à la présence d'un signal de localisation nucléaire (NLS), la fixation à l'ADN et enfin l'interaction avec une protéine I κ B (Inhibitor of NF- κ B). La partie C-terminale possède, quant à elle, le domaine de transactivation ou TAD. Ce domaine, moins conservé, est retrouvé uniquement chez les protéines p50 et p52 (Gupta *et al.*, 2010; Jost et Ruland, 2007; Pires *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2011). Les protéines p105 et p100 se distinguent par une longue partie C-terminale contenant de multiples répétitions de domaines ankyrine ou domaines I κ B-like qui ont pour particularité d'interagir avec les domaines RHD. Par cette interaction, les protéines p105 et p100 peuvent interagir avec leur propre domaine RHD, masquer la NLS, conduisant ainsi à leur séquestration dans le cytoplasme (**Figure 19**) (Gilmore, 2006; Zheng *et al.*, 2011).

Dans le noyau, le complexe NF- κ B est capable de se lier, de façon spécifique, sur des séquences cibles appelées sites κ B dont la séquence consensus est : 5' – GGGRNYYYCC – 3' (R correspond à une base purique, Y a une base pyrimidique et N à une base quelconque). De manière plus précise, les sites κ B sont composés de deux demi-sites, et les différentes sous-unités du complexe NF- κ B n'ont pas la même affinité pour les mêmes demi-sites. Par exemple, la sous-unité p50 reconnaît un demi-site composé de cinq paires de bases et p65 reconnaît un demi-site de quatre paires de bases (Chen et Ghosh, 1999). Dans certains cas, un seul demi-site est suffisant pour le recrutement d'un dimère NF- κ B (Chen *et al.*, 1998a). En association avec la machinerie de transcription, d'autres facteurs de transcription ou encore de protéines de remodelage de la chromatine, la présence du complexe NF- κ B sur ces séquences au niveau des promoteurs entraîne l'expression de gènes cibles impliqués dans différentes fonctions biologiques normales et pathologiques (Pires *et al.*, 2018).

IV.3. Les voies d'activation du complexe NF- κ B

Dans la plupart des cellules, le facteur de transcription est séquestré dans le cytoplasme par une protéine I κ B. Les protéines du complexe NF- κ B sont exprimées de façon ubiquitaire

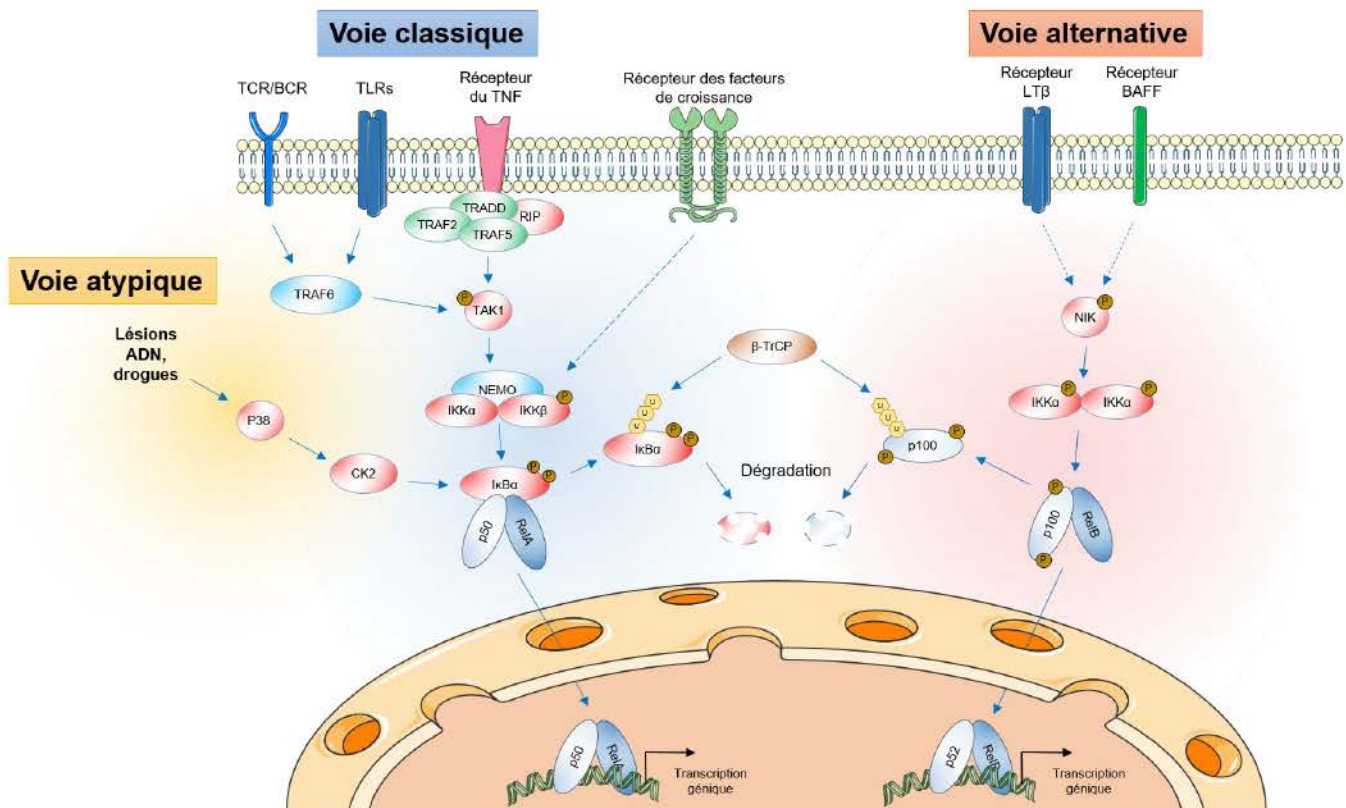


Figure 20 : Représentation schématique des différentes voies d'activation du facteur de transcription NF-κB. La voie classique d'activation est dépendante de la dégradation de la protéine IκBα induite par les protéines IKK. La voie atypique est également dépendante de la dégradation de la protéine IκBα mais qui n'est pas induite par les kinases IKK. La voie alternative est dépendante de la protéolyse du précurseur p100 induite par la kinase IKKα.

mais leur action dépend du stimulus extérieur spécifique (Gilmore, 2006). L'activation du complexe se réalise en réponse à une longue liste de différents stimuli extérieurs qui vont entraîner des cascades de phosphorylations intracellulaires. Cette signalisation comprend la voie classique ou canonique, la voie alternative ou non canonique et la voie atypique (Chen *et al.*, 1998a; Espinosa *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2010; Jost et Ruland, 2007; Pires *et al.*, 2018).

IV.3.1. L'activation par la voie classique ou voie canonique

La fixation de certains ligands, comme les cytokines pro-inflammatoires de la famille du TNF α (récepteur du TNF), les produits bactériens ou viraux comme le LPS (récepteur Toll-like ou TLR), certains antigènes (récepteurs TCR et BCR) ou encore certains facteurs de croissance, sur leur récepteur respectif, entraîne l'activation du facteur de transcription NF- κ B par la voie classique (Bonizzi et Karin, 2004; Oeckinghaus et Ghosh, 2009). Cette fixation va entraîner le recrutement de protéines adaptatrices. Par exemple, la fixation du TNF α sur son récepteur entraîne le recrutement des protéines adaptatrices TRADD, RIP, TRAF2 et TRAF5, qui ont pour rôle d'activer la kinase associée au récepteur du TNF α ou TAK1, qui activera à son tour par phosphorylation un complexe appelé IKK (I κ B kinase). Ce complexe IKK est composé de trois sous-unités : deux sous-unités catalytiques sérine kinase IKK α , IKK β et une sous-unité régulatrice IKK γ aussi appelé NEMO (NF- κ B Essential Modulator). Une fois activé, le complexe IKK, par l'intermédiaire de sa sous-unité IKK β , phosphoryle la protéine I κ B α au niveau des résidus 32 et 36 situés à son extrémité N-terminale (Chen *et al.*, 1995; Kanarek *et al.*, 2010; Yaron *et al.*, 1997). La phosphorylation d'I κ B α entraîne son ubiquitinylation par la protéine β -TrCP (Beta-Transducin repeat Containing Protein), puis sa dégradation par la voie du protéasome (Fuchs *et al.*, 2004; Kanarek *et al.*, 2010). La libération d'I κ B α démasque la séquence NLS des sous-unités du complexe NF- κ B et par conséquent la translocation du facteur de transcription dans le noyau. Après le passage des pores nucléaires, le dimère NF- κ B se fixe sur ses séquences spécifiques d'ADN situées en amont de ses gènes cibles dont il régule l'expression. Cette voie concerne majoritairement les complexes RelA/p50 et c-Rel/p50 (**Figure 20**) (Morais *et al.*, 2011; Oeckinghaus et Ghosh, 2009; Pires *et al.*, 2018).

IV.3.2. L'activation par la voie alternative ou voie non-canonique

La voie d'activation alternative est induite par différents stimuli tels que la lymphotoxine β (LT- β) ou encore le facteur B cell Activating Factor (BAFF) (Claudio *et al.*,

2002; Saito *et al.*, 2003; Sun, 2011). En se fixant sur leurs récepteurs respectifs, ces molécules induisent l'activation par phosphorylation d'une sérine kinase appelée NIK (NF- κ B Inducing Kinase). Cette kinase a pour rôle de phosphoryler la protéine IKK α , qui, une fois phosphorylée, peut interagir avec le précurseur p100 dans le but de le phosphoryler à son tour au niveau de différentes sérines présentes sur son extrémité C-terminale. Ces phosphorylations entraînent l'ubiquitinylation de p100 par la protéine E3 ubiquitine ligase β -TrCP, avant une dégradation partielle du côté C-terminal qui libère ainsi sa forme mature p52 (Kanarek *et al.*, 2010). La protéine p52 s'associe ensuite avec la protéine RelB pour former l'hétérodimère p52/RelB. Ce dimère est alors transloqué vers le noyau pour réguler l'expression de ses gènes cibles (**Figure 20**) (Claudio *et al.*, 2002; Morais *et al.*, 2011; Sun, 2011).

IV.3.3. L'activation par la voie atypique

Cette voie dite « atypique » est dépendante de la dégradation de l'inhibiteur cytoplasmique IkB α mais qui, contrairement à la voie classique, n'est pas induite par les kinases IKK. Cette voie est activée suite à des dommages ou lésions sur l'ADN (Hoesel et Schmid, 2013; Kriete et Mayo, 2009; Morais *et al.*, 2011; Viatour *et al.*, 2005). En cas de stress cellulaire (radiations UV, espèces réactives de l'oxygène ou ERO) et de lésions sur l'ADN, la protéine p38 MAP Kinase est activée. Elle a pour cible la kinase CK2 (Caséine Kinase 2) qui, à son tour, phosphoryle la protéine IkB α sur son extrémité C-terminale. De la même manière que lors de l'activation classique, IkB α est alors dégradée par le protéasome, permettant ainsi la libération et la translocation nucléaire du dimère NF- κ B (**Figure 20**) (Kriete et Mayo, 2009; Morais *et al.*, 2011; Viatour *et al.*, 2005).

IV.4. Régulation de l'activité du facteur de transcription NF- κ B

IV.4.1. Régulation par les inhibiteurs IkB

Les protéines IkB forment une famille de protéines à laquelle appartiennent les protéines IkB dites typiques IkB α , IkB β , IkB ϵ , et les IkB atypiques Bcl-3, IkB ζ , IkBNS, IkB η et les précurseurs p105 et p100 (Ferreiro et Komives, 2010; Gilmore et Morin, 1993; Hinz *et al.*, 2012; Huxford *et al.*, 1998; Whiteside *et al.*, 1997).

Les protéines IkB typiques ainsi que les précurseurs p105 et p100 ont pour rôle de séquestrer le facteur de transcription NF- κ B dans le cytoplasme. Les protéines IkB atypiques,

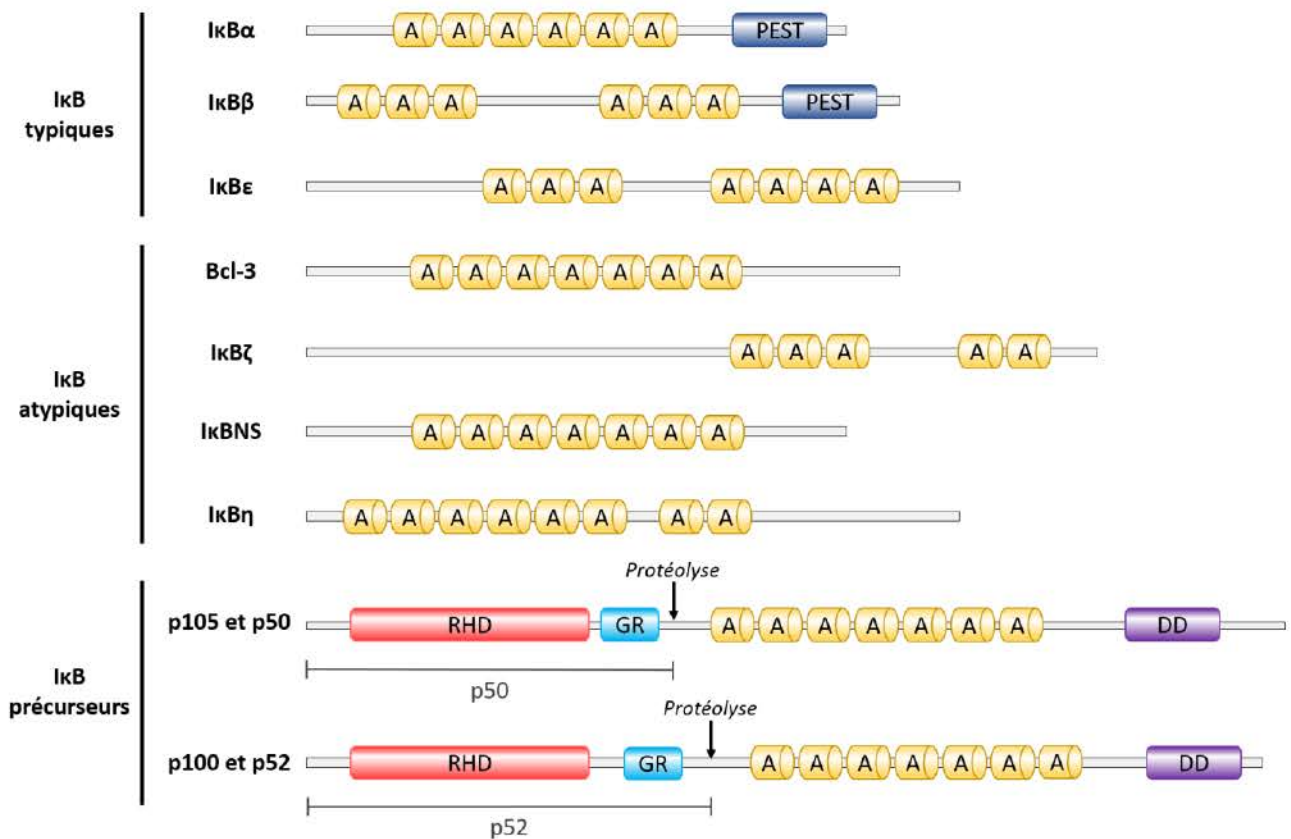


Figure 21 : Représentation schématique de la structure des protéines de la famille IκB. Les protéines IκBα, IκBβ et IκBε appartiennent à la famille des IκB typiques. Elles présentent des répétitions de motif ankyrine et une séquence PEST pour les deux premières. Les protéines IκB atypiques Bcl-3, IκBζ, IκBNS et IκBη sont composées seulement de répétitions de motif ankyrine. Les protéines IκB précurseurs p105 et p100 ont été décrits précédemment dans la figure 17 (d'après Hinz et al., 2012).

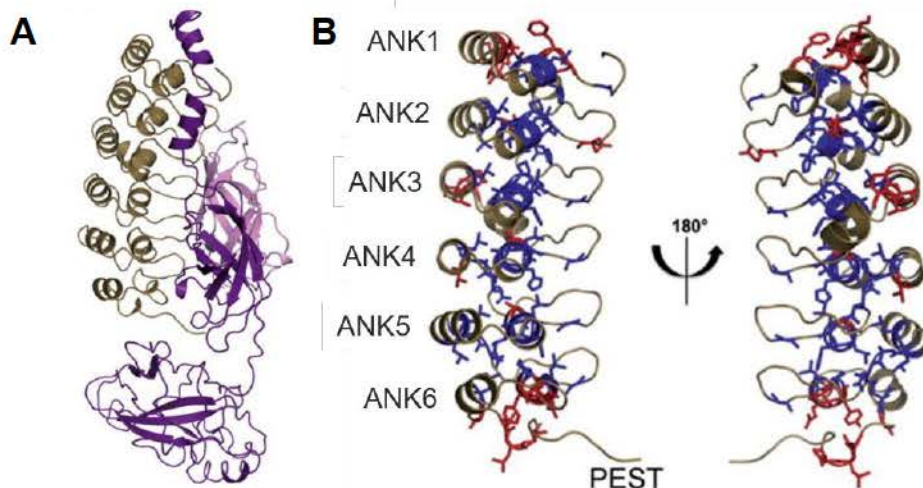


Figure 22 : Structure cristallographique de la protéine IκBα. (A) Structure cristallographique de la protéine IκBα liée au complexe p50/RelA. La protéine IκBα se lie à NF-κB par ses répétitions de motif ankyrine. La protéine IκBα est représentée en marron, p50 en rose et RelA en violet. (B) Structure cristallographique de la protéine IκBα seule représentant les six répétitions de motif ankyrine (ANK) et la séquence PEST en C-terminal (d'après Cervantes et al., 2013).

en se fixant à l'ADN, interviennent dans la régulation de la transcription de gènes cibles de NF- κ B après stimulation avec différents stimuli, comme les cytokines pro-inflammatoires (Hinz *et al.*, 2012; Yamauchi *et al.*, 2010; Yamazaki *et al.*, 2001).

Toutes ces protéines possèdent, au niveau de leur structure, plusieurs copies d'un motif de 33 acides aminés appelé domaine de répétition ankyrine ou ARD. Ce domaine ARD, identifié pour la première fois sur la protéine ankyrine de l'érythrocyte humain, est retrouvé dans de nombreuses protéines exerçant différentes fonctions cellulaires (**Figure 21**) (Huxford *et al.*, 1998). Les domaines ARD des protéines I κ B typiques, connus pour intervenir dans des interactions protéine-protéine, interagissent avec les domaines RHD des sous-unités des dimères NF- κ B. Cette interaction masque la séquence NLS de la sous-unité de NF- κ B, et empêche ainsi la translocation nucléaire du complexe qui est séquestré dans le cytoplasme. Les protéines I κ B présentent des affinités différentes selon les combinaisons de dimère NF- κ B. Par exemple, les protéines I κ B α et I κ B β ont une affinité plus importante pour les protéines c-Rel et p65 (Hinz *et al.*, 2012).

IV.4.2. Le cas particulier de la protéine I κ B α

La protéine I κ B α est la première des protéines de la famille I κ B identifiée et ainsi la plus connue (Hinz *et al.*, 2012). Sa structure permet de comprendre comment, par plusieurs mécanismes, la protéine I κ B α exerce son rôle d'inhibiteur sur le dimère NF- κ B p50/RelA (Mukherjee *et al.*, 2016).

IV.4.2.1. Relation structure – fonction de la protéine I κ B α

La protéine I κ B α contient dans sa séquence un domaine ARD composé de 6 répétitions de motifs ankyrine (**Figure 22**). Dans un premier temps, les quatre premières répétitions interagissent avec la NLS présente dans le domaine RHD de la protéine RelA. Dans un second temps, les deux dernières répétitions ankyrines interagissent avec le reste de la protéine RelA. Cette 2^{ème} interaction permet la stabilisation du complexe et le rapprochement de la région C-terminale de la protéine I κ B α sur le domaine de liaison à l'ADN de la protéine RelA. En effet, l'extrémité C-terminale de la protéine I κ B α possède une séquence riche en acides aminés proline, acide glutamique, sérine et thréonine appelée séquence PEST qui interagit avec le site de liaison à l'ADN de NF- κ B et contribue ainsi à sa séquestration dans le cytoplasme

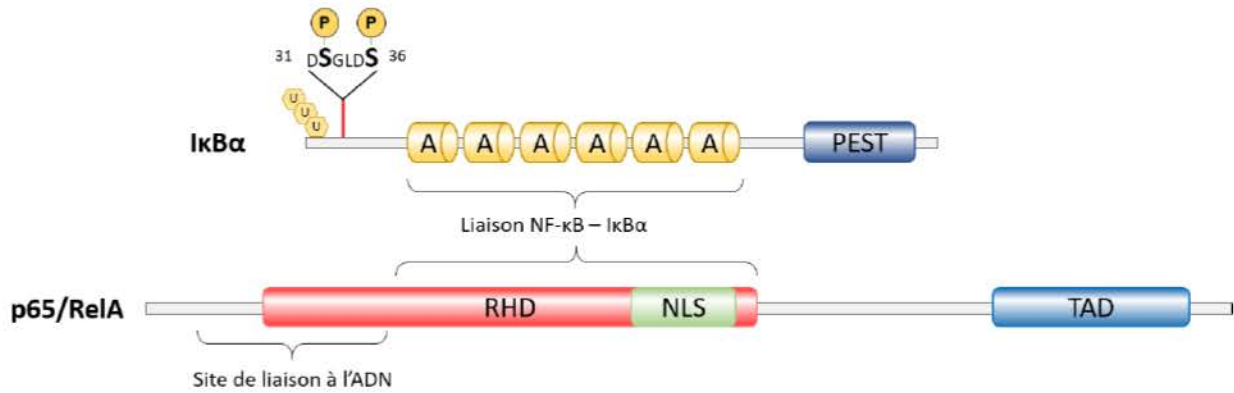


Figure 23 : Représentation schématique des domaines d'interaction entre les protéines *IκBα* et *p65/RelA*. La protéine *IκBα* possède à son extrémité N-terminale un domaine SRD (Signal Response Domain) qui est la cible d'ubiquitylations par la protéine ubiquitine ligase β -TrCP et de phosphorylations par la protéine *IKKα* au niveau des sérines 32 et 36. Elle présente également six répétitions de motif ankyrine (ANK1 à 6) et une séquence PEST en C-terminal qui assurent l'interaction avec la protéine *p65/RelA*, respectivement avec le domaine RHD contenant la NLS et le site de liaison à l'ADN (d'après Ferreiro et Komives, 2010).

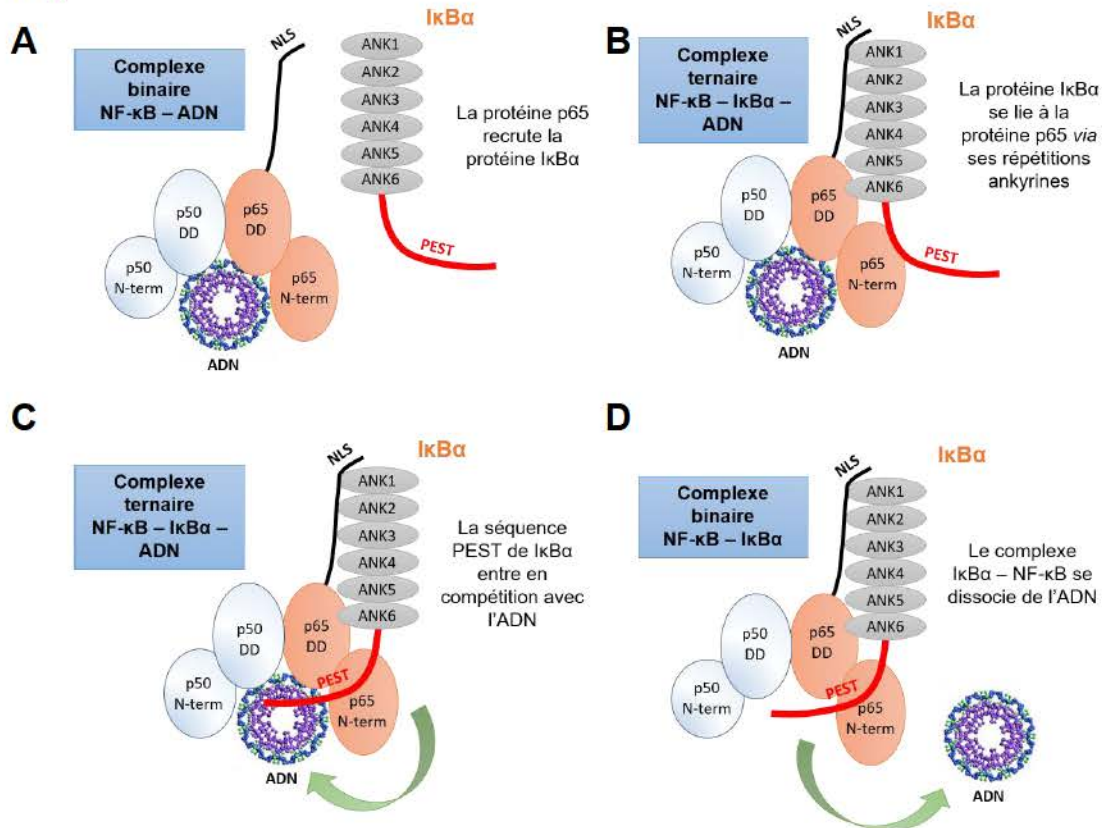


Figure 24 : Représentation schématique de l'inhibition du dimère NF- κ B par la protéine *IκBα* sur l'ADN. Les protéines *p50* et *p65* sont liées à l'ADN et interagissent entre elles grâce à leurs domaines de dimérisation (DD). La protéine *p65/RelA* au niveau de sa NLS recrute la protéine *IκBα* (A) au niveau de ses quatre premières répétitions de motif ankyrine (B). La séquence PEST située à l'extrémité C-terminale de la protéine *IκBα* entre en compétition avec l'ADN (C) et interagit avec le domaine de liaison à l'ADN de la protéine *p65/RelA*. L'interaction entre l'ADN et le dimère NF- κ B est rompue et le complexe *IκBα* – NF- κ B se dissocie de l'ADN (D) (d'après Mukherjee et al., 2016).

(**Figure 23**) (Ferreiro et Komives, 2010; Hinz *et al.*, 2012; Huxford *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 1995; Mukherjee *et al.*, 2016).

Comme vu précédemment, l'activation de la voie NF- κ B entraîne une dégradation de la protéine I κ B α et la translocation du dimère p50/RelA dans le noyau. Ce signal aboutit à la transcription de gènes cibles, dont celui, appelé *NFKB1A*, qui code la protéine I κ B α . Ce gène est fortement induit après activation du facteur de transcription NF- κ B et représente un rétrocontrôle négatif sur l'activation de la voie NF- κ B. De façon plus précise, les protéines I κ B α nouvellement synthétisées sont capables d'entrer dans le noyau et d'interagir avec le complexe p50/RelA (Hinz *et al.*, 2012). Le mécanisme par lequel I κ B α entre dans le noyau n'est pas encore clairement défini et reste controversé. Certains auteurs suggèrent l'utilisation du second motif ankyrine de la protéine I κ B α comme séquence « NLS-like », alors que d'autres pensent à l'association entre I κ B α et une protéine encore non identifiée qui porte une séquence NLS (Sachdev *et al.*, 1998; Turpin *et al.*, 1999). Néanmoins, une fois dans le noyau, l'interaction entre la protéine I κ B α et le dimère p50/RelA se fait de la même manière que décrit précédemment dans le cytoplasme. C'est par la séquence PEST que la protéine I κ B α entraîne la dissociation du complexe NF- κ B de l'ADN en se liant avec le domaine d'interaction à l'ADN de la protéine RelA (**Figure 24**) (Bergqvist *et al.*, 2009; Mukherjee *et al.*, 2016). Le complexe composé du dimère p50/RelA et de la protéine I κ B α est ensuite exporté du noyau vers le cytoplasme. Cette exportation est possible grâce à la présence d'une séquence d'exportation nucléaire (NES) présente entre les résidus 45 et 54 de l'extrémité N-terminale de la protéine I κ B α , qui est reconnue par le récepteur d'export nucléaire CRM1 (Chromosome Region Maintenance 1) ou exportine 1 (Huang *et al.*, 2000; Tam *et al.*, 2000).

IV.4.2.2. Régulation de l'expression du gène codant la protéine I κ B α

Malgré de nombreuses études sur la structure et le mécanisme d'action de la protéine I κ B α , qui révèlent son importance dans la régulation de l'activité du facteur de transcription NF- κ B, très peu de données ont été publiées quant à la régulation de l'expression de son gène.

Le gène *NFKB1A*, codant la protéine I κ B α , possède six exons séparés par cinq introns pour une taille totale d'environ 3,5 kb. Au niveau du promoteur proximal de ce gène, plusieurs sites de fixation pour des facteurs de transcription ont été identifiés. Il s'agit tout d'abord de trois sites de fixation pour le facteur de transcription NF- κ B appelés κ B1, κ B2 et κ B3. Une stimulation de cellules HeLa avec du TNF- α induit la fixation de NF- κ B sur ces trois sites *in*



Figure 25 : Représentation schématique du promoteur proximal du gène codant la protéine *IκBα*. Trois sites de fixation pour le facteur de transcription NF- κ B, nommés κ B1 à κ B3, ont été identifiés. La fixation de NF- κ B sur ces sites permet l'expression du gène *NFKB1A* dans le cadre d'une boucle de rétrocontrôle négatif. Des sites de fixation pour AP-2 α , Sp1 et Ets-1 ont également été identifiés. Le laboratoire a récemment identifié un site de fixation pour la protéine DDB2 en position -488 en amont du site d'initiation de la traduction (d'après Algarté et al., 1999; Ennen et al., 2013; Ito et al., 1995).

vitro et *in cellulo* (Ito *et al.*, 1995). En s'associant avec des co-activateurs de la transcription, tels que les protéines SRC1 et SRC2, NF- κ B active l'expression du gène *NFKB1A* permettant un rétrocontrôle négatif sur sa propre activation (Gao *et al.*, 2005).

Trois autres sites pour des facteurs de transcription ont été décrits par la technique d'empreinte à la DNase. Il s'agit des sites pour les facteurs de transcription Sp1, AP-2 α et Ets-1 (Algarté *et al.*, 1999).

Plus récemment, le laboratoire d'accueil a montré que la protéine DDB2 était capable de se fixer sur une séquence cible du promoteur du gène codant I κ B α dans des cellules cancéreuses mammaires. Cette fixation permet l'augmentation de l'expression de ce gène (**Figure 25**) (Ennen *et al.*, 2013).

IV.4.3. Régulation par modifications post-traductionnelles

Nous avons détaillé précédemment l'importance de modifications post-traductionnelles dans l'activation de la voie NF- κ B, notamment les phosphorylations des protéines IKK et I κ B α . Les sous-unités composant le dimère NF- κ B peuvent elles aussi être sujettes à différentes modifications post-traductionnelles, en dehors du clivage protéolytique des précurseurs p100 et p105, qui permettent ainsi une régulation fine de l'activité de ce facteur de transcription.

IV.4.3.1. Régulation par phosphorylation

Ce sont les phosphorylations de la protéine RelA qui sont les plus décrites et les mieux connues aujourd'hui. La phosphorylation des sérines Ser529 et Ser536, au sein du domaine de transactivation de RelA, induite par des stimuli d'origine inflammatoire, entraîne la transactivation de NF- κ B. La Ser529 est phosphorylée uniquement par la caséine protéine kinase (CK2), alors que la Ser536 est la cible de nombreuses kinases telles que IKK α , IKK β ou encore la protéine NAK (NF- κ B Activating Kinase). La phosphorylation de sérines situées en dehors du domaine de transactivation augmente également l'activation de NF- κ B. C'est le cas des Ser311, Ser276 et Ser281, phosphorylées après stimulation avec le TNF- α . La phosphorylation de ces dernières est également possible sur toutes les sous-unités composant le dimère NF- κ B, à l'exception de la sous-unité p52.

Les Ser471, Ser454 et Ser460 du domaine de transactivation de la protéine c-Rel ou encore les Ser368 et Ser337 de la protéine RelB sont également la cible de phosphorylations.

Enfin, la protéine Bcl-3 peut être hautement phosphorylée mais les résidus cibles ne sont pas connus, à l'exception des Ser394 et Ser398 (Chen *et al.*, 2005; Christian *et al.*, 2016).

Toutes ces phosphorylations sont la conséquence d'un stimulus et permettent de moduler le temps d'activation du dimère NF- κ B ainsi que la spécificité des gènes cibles.

IV.4.3.2. Régulation par acétylation

La protéine RelA peut être la cible d'acétylation sur ses lysines Lys218, Lys221, Lys310, Lys122 et Lys123 par le complexe de co-activateurs de la transcription CBP/p300. L'acétylation de la Lys218 augmente l'affinité de la protéine RelA pour l'ADN et dans le même temps, celle de la Lys221 inhibe l'interaction entre RelA et l'inhibiteur I κ B α nouvellement synthétisé pour empêcher ainsi la relocalisation de NF- κ B dans le cytoplasme. L'acétylation de la Lys310 a, quant à elle, pour effet d'augmenter la transactivation de RelA. A l'inverse, l'acétylation des Lys122 et Lys123 par CBP/p300 a un effet inhibiteur car elle diminue l'affinité de RelA pour l'ADN. Ainsi, le complexe CBP/p300 joue un rôle à la fois dans l'activation et dans l'inactivation du complexe NF- κ B (Perkins, 2006). Un lien peut être établi entre l'acétylation et la phosphorylation de la protéine RelA. Il a été montré que la phosphorylation des Ser276 et Ser536 favorise l'interaction entre la protéine RelA et la protéine p300, avec pour conséquence une augmentation de l'acétylation de Lys310 (Chen *et al.*, 1998a; Perkins, 2006).

IV.4.3.3. Régulation par ubiquitinylation

L'activité du facteur de transcription peut également être modulée par l'ubiquitinylation, puis la dégradation des sous-unités du complexe NF- κ B. En effet, dans le compartiment cytoplasmique, la protéine RelA est la cible de la protéine SOCS-1 (Suppressor Of Cytokine Signaling protein 1), jouant le rôle ici d'ubiquitine ligase, entre les résidus 220 et 335 (Perkins, 2006; Ryo *et al.*, 2003).

Même si les résidus modifiés ne sont pas identifiés, la localisation de la protéine Bcl-3 est dépendante de son ubiquitinylation. En effet, une inhibition de la protéine suppresseur de tumeur CYLD Lys63 dé-ubiquitinase (Cylindromatosis Lys63 Dé-ubiquitinase) favorise la localisation nucléaire de la protéine Bcl-3 (Massoumi *et al.*, 2006; Perkins, 2006).

IV.4.4. Régulation par les micro-ARN

Les micro-ARN ou miR appartiennent à une classe d'ARN simple brin d'une longueur de 20 à 23 nucléotides. Ils ont pour fonction de réguler l'expression génique.

Plusieurs études ont montré l'importance des micro-ARN dans la régulation de l'activité du facteur de transcription NF- κ B. Le premier identifié est le miR-146. Il est exprimé en réponse à un stimulus comme le LPS ou l'IL-1 par exemple, et est capable d'inhiber l'expression des protéines adaptatrices des récepteurs TLR comme TRAF6. Cette synthèse de miR-146 constitue alors une boucle de rétrocontrôle négatif sur l'activité de NF- κ B (Ma *et al.*, 2011). De la même manière, le miR-155 est exprimé après activation du facteur de transcription NF- κ B et a pour fonction d'inhiber l'expression des kinases IKK, entraînant également une boucle de rétrocontrôle négatif. A l'inverse, d'autres micro-ARN sont capables d'augmenter l'activité du facteur NF- κ B, comme par exemple le miR-21 ou encore le miR-301a (Ma *et al.*, 2011). En effet, le miR-21 a pour cible connue l'ARNm codant la protéine PTEN (Phosphatase and Tensin homolog). Cette dernière est un inhibiteur de la phosphorylation de la protéine Akt (Protein kinase B), connue pour activer le facteur de transcription NF- κ B. Par ce mécanisme, le miR-21 entraîne une activation de NF- κ B (Ma *et al.*, 2011). Le miR-301a, quant à lui, est capable de diminuer l'expression de la protéine NKRF (NF- κ B Repressing Factor), un inhibiteur de la voie NF- κ B, et ainsi d'augmenter l'activité de ce dernier. De plus, un site de fixation κ B pour le facteur de transcription NF- κ B a été identifié sur le promoteur du gène codant le miR-301a. Ces résultats suggèrent la présence d'une boucle de rétrocontrôle positif. Ce mécanisme est décrit comme responsable, en partie, d'une activation constitutive de NF- κ B dans certains cancers de la prostate (Lu *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2011). Une étude a montré l'implication d'un 3^{ème} micro-ARN dans l'activation de NF- κ B. Il s'agit du miR-30e*, qui est surexprimé notamment dans le glioblastome et qui a pour cible la partie 3'-UTR de l'ARNm codant la protéine I κ B α , avec pour conséquence sa dégradation. La surexpression de ce miR est associée à l'agressivité des glioblastomes, puisque sa surexpression expérimentale induit les capacités migratrices et invasives *in vitro* et *in vivo* des cellules cancéreuses d'origine gliale en activant NF- κ B (Jiang *et al.*, 2012). Ce même miR joue également un rôle dans la prolifération des cellules cancéreuses de prostate, lorsqu'il est surexprimé et sensibilise ces cellules à l'agent anticancéreux appartenant aux taxanes, le docétaxel, lorsque son expression est inhibée (Egan et Gollnick, 2016).

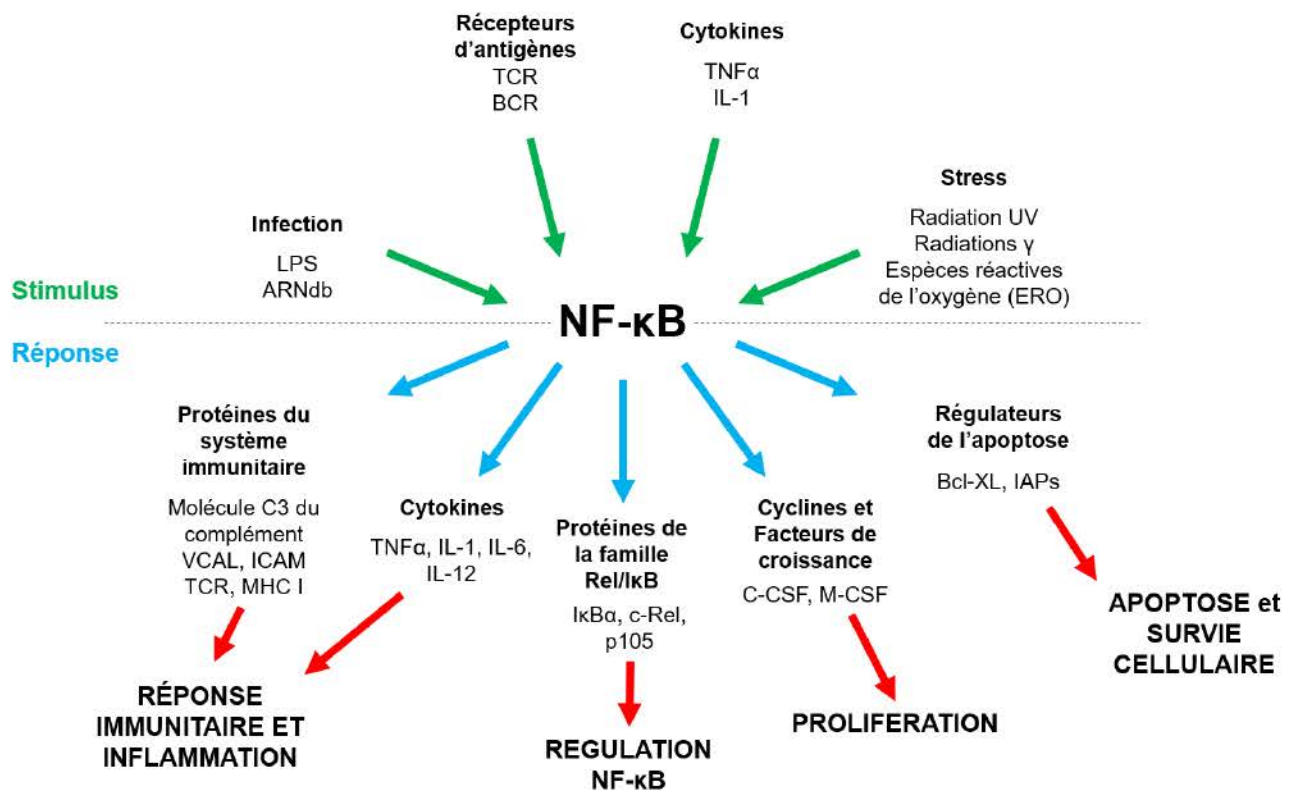


Figure 26 : Rôle de NF- κ B dans différentes fonctions biologiques cellulaires normales. La réponse biologique induite par l'activation du facteur de transcription NF- κ B est dépendante du stimulus et du type cellulaire étudié (d'après Oeckinghaus et Ghosh, 2009).

IV.5. Les rôles biologiques du facteur de transcription NF- κ B

IV.5.1. Généralités

Le facteur de transcription NF- κ B, une fois activé en réponse à une grande diversité de stimuli extérieurs, joue un rôle crucial dans la cellule. La réponse biologique, par l'expression de ses gènes cibles, est dépendante du type cellulaire concerné et du stimulus extérieur. Une multitude de gènes cibles a été identifiée, tels que ceux codant des cytokines (interleukines, interféron β , ...), des récepteur impliqués dans la réponse immune (récepteur de la cellule T ou TCR, récepteur du TNF, ...), des protéines impliquées dans la présentation de l'antigène (récepteurs du complément), des protéines d'adhérence cellulaire (molécule d'adhérence intercellulaire ou I-CAM, fibronectine, ...), des régulateurs de l'apoptose (protéines de la famille Bcl-2, c-Flip, ...), des facteurs de transcription (c-Rel, Rel B, c-myc, ...), des facteurs de croissance (activine A, facteur de croissance hépatocytaire ou HGF) ou encore des enzymes (PI3K, aromatasé, ...). La liste des gènes est référencée par le laboratoire du docteur Gilmore de l'Université de Boston (<http://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/>).

Ainsi, de par sa capacité à réguler l'expression de nombreux gènes cibles, NF- κ B est au centre de plusieurs processus biologiques essentiels pour la cellule. Une dérégulation de son activité est impliquée dans une large variété de pathologies et plus particulièrement dans les cancers. De ce fait, il fait l'objet de nombreux travaux de recherche depuis ces vingt dernières années (Oeckinghaus et Ghosh, 2009).

IV.5.2. Dans la réponse immunitaire et inflammatoire

Divers stimuli extérieurs conduisent à l'activation de NF- κ B, dont les nombreux gènes cibles sont impliqués dans différentes fonctions biologiques représentées principalement dans la *figure 26*.

Par l'intermédiaire des récepteurs de reconnaissance des produits microbiens tels que les récepteurs TLRs, une infection bactérienne ou virale conduit à l'activation de NF- κ B. De même une stimulation des récepteurs aux antigènes (TCR ou BCR) ou par des cytokines pro-inflammatoires entraîne l'activation du facteur de transcription. Ainsi, NF- κ B est un élément majeur de la réponse immunitaire innée et adaptative (Hayden et Ghosh, 2004; Oeckinghaus et Ghosh, 2009; Pires *et al.*, 2018). Par exemple, dans les cellules impliquées dans l'immunité innée, comme les macrophages et les cellules dendritiques, une stimulation des récepteurs de

type TLR entraîne une activation du facteur NF- κ B et une synthèse de cytokines pro-inflammatoires. De même, dans les cellules impliquées dans la réponse immunitaire adaptative, NF- κ B permet la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, la différenciation des cellules B et T ainsi que l'activation des différents types de cellules T (Pires *et al.*, 2018).

Une dérégulation dans l'activité du facteur de transcription NF- κ B est retrouvée dans de nombreuses pathologies inflammatoires et touchant le système immunitaire. NF- κ B est impliqué dans le développement de maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaque, le diabète de type 1 et les maladies auto-immunes de la thyroïde et dans certaines maladies inflammatoires comme l'asthme et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique) (Serasanambati et Chilakapati, 2016).

IV.5.3. Dans le développement embryonnaire

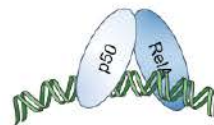
D'autres études ont également montré l'importance du facteur de transcription NF- κ B dans le développement embryonnaire. En effet, une sévère létalité est observée dans les premiers stades du développement embryonnaire chez des souris KO pour des gènes codant les protéines impliquées dans la voie NF- κ B comme RelA, I κ B α , IKK α , IKK β ou encore NEMO. Il a été montré que NF- κ B joue un rôle majeur dans l'acquisition de la polarité dorso-ventrale de l'embryon, au cours de l'organogenèse des poumons, du foie ou encore l'hématopoïèse (Espín-Palazón et Traver, 2016). Il agit également dans le développement de glandes présentant des ramifications, comme les glandes mammaires. Ce sont les cellules épithéliales qui, en subissant la TEM, créent de nouveaux espaces nécessaires pour la mise en place des ramifications. NF- κ B est impliqué dans l'induction de la TEM, en induisant l'expression de gènes cibles qui permettent aux cellules épithéliales d'acquérir des caractères mésenchymateux et migratoires. L'importance de NF- κ B dans la TEM est détaillée dans le paragraphe IV.5.5.4.

IV.5.4. Dans la réponse adaptative à un stress

Certains gènes cibles de NF- κ B codent des protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose cellulaire. La nature pro- ou anti-apoptotique de la réponse induite par l'activation de NF- κ B est déterminée par la nature du stimulus (Kaltschmidt *et al.*, 2000). NF- κ B, lorsqu'il est activé, joue ainsi un rôle dans la survie des cellules exposées à un stress (radiations ionisantes et UV, espèces actives de l'oxygène) ou à une cytokine pro-inflammatoire telle que

Cancers hématologiques

Myélome multiple
Lymphome à cellule du manteau
Lymphome de MALT
Lymphome diffus à large cellules B
Lymphome de Hodgkin
Syndrome myélodysplasique
Leucémie adulte à cellules T
Leucémie aigüe lymphoblastique
Leucémie myéloïde aigüe
Leucémie chronique lymphoblastique
Leucémie myéloïde chronique



NF-κB

Tumeurs solides

Sein
Col de l'utérus
Prostate
Rein
Poumons
Côlon
Foie
Pancréas
Œsophage
Estomac
Larynx
Thyroïde
Parathyroïde
Peau
Vessie
Cavité buccale
Endomètre
Cerveau
Ovaire
Rétine

Figure 27 : Liste des cancers humains présentant une activation constitutive du facteur de transcription NF-κB. Une activité constitutive de NF-κB est retrouvée dans de nombreux cancers hématologiques et dans de nombreuses tumeurs solides (d'après Baud et Karin, 2009).

le TNF α (Van Antwerp *et al.*, 1998). Cette adaptation nécessite l'expression de certains gènes cibles de NF- κ B, comme ceux codant des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, comme les protéines Bcl-XL, A1/Bfl1 ou encore Nr13, mais également des protéines inhibitrices de l'apoptose comme IAP1 et IAP2 (Inhibitor of Apoptosis Protein 1 et 2) ou encore des enzymes antioxydantes, comme la SODMn (Magné *et al.*, 2006).

A l'inverse, NF- κ B peut jouer un rôle de facteur pro-apoptotique, en induisant l'expression de gènes codant le récepteur de mort Fas ou son ligand FasL. Ce mécanisme est retrouvé lors de l'élimination des cellules T activées dans la réponse immunitaire (Serasanambati et Chilakapati, 2016). De plus, en réponse à un stress entraînant des lésions de l'ADN (radiations UV et γ , espèces réactives de l'oxygène), il est capable d'activer l'expression du suppresseur de tumeur p53, qui à son tour peut entraîner les cellules vers l'apoptose (Barkett et Gilmore, 1999; Ferreiro et Komives, 2010; Oeckinghaus et Ghosh, 2009).

IV.5.5. Dans les cancers

IV.5.5.1. Activation constitutive de NF- κ B dans les cancers

De nombreuses études mettent en évidence l'importance du facteur de transcription NF- κ B, ainsi que ses gènes cibles dans le développement et la progression des tumeurs (Godwin *et al.*, 2013). Cette importance résulte d'une activation constitutive du dimère NF- κ B observée dans de nombreuses cellules cancéreuses ayant des capacités invasives et un pouvoir métastatique, et provenant de nombreuses tumeurs solides (cancer du poumon, du sein, de l'ovaire, ...) et hématologiques (lymphomes, certaines leucémies) (**Figure 27**) (Baud et Karin, 2009). Cette activité constitutive de NF- κ B est généralement associée à un mauvais pronostic et dépend de dérégulations touchant différents niveaux de la voie d'activation (Godwin *et al.*, 2013). Elle peut s'expliquer par une expression et/ou une activité aberrante des différents acteurs des voies d'activation. C'est le cas des kinases IKK dans le glioblastome et l'hépatocarcinome, ou encore de la kinase NIK dans le mélanome (Dhawan *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2010; Politi *et al.*, 2008). Elle peut dépendre également de réarrangements chromosomiques, comme ce qui est observé dans certains lymphomes comme le lymphome de MALT. En effet, plusieurs translocations ont été identifiées comme responsables de l'apparition de ce cancer. Par exemple, la translocation t(11;18)(q21;q21) entraîne la fusion de la protéine IAP2 et MALT1 (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue 1). Cette protéine de fusion entraîne une activation constitutive du facteur de transcription NF- κ B en empêchant l'ubiquitinylation

de certaines protéines du complexe IKK et donc leur dégradation (Jost et Ruland, 2007). Dans certains cancers, l'activité constitutive de NF- κ B est liée à une mutation ou à une amplification du gène codant certains récepteurs comme celui à l'EGF ou à l'HGF, qui entraînent respectivement, la production d'un récepteur activé constitutivement ou à sa surexpression (Fan *et al.*, 2005; Sethi *et al.*, 2011). Dans tous les cas, l'activation exacerbée de la voie de signalisation depuis ces récepteurs conduit à l'activation de NF- κ B.

Il existe un lien entre l'inflammation et le cancer, dans lequel NF- κ B peut jouer un rôle important par son activation constitutive dépendante de la présence de cytokines pro-inflammatoires. En effet, une inflammation chronique et l'accumulation de cytokines pro-inflammatoires localement favorisent l'émergence de cellules tumorales. Par exemple, dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), les cellules immunitaires infiltrant la muqueuse intestinale sécrètent des cytokines comme le TNF- α , l'IL1 et l'IL17, qui sont responsables de l'activation de NF- κ B dans les cellules environnantes et augmentent le risque de développement de tumeurs coliques (Terzić *et al.*, 2010). De même, les cellules inflammatoires infiltrant les tumeurs sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, qui activent la voie NF- κ B dans les cellules cancéreuses du sein, de la tête et du cou, de leucémie myéloïde chronique ou encore de lymphomes, (Taniguchi et Karin, 2018; Xia *et al.*, 2014). Cette activation du facteur de transcription est souvent amplifiée par la sécrétion autocrine de ces cytokines par les cellules tumorales (Chaturvedi *et al.*, 2011).

IV.5.5.2. Dans la prolifération des cellules tumorales

De nombreuses études ont mis en relation la prolifération des cellules cancéreuses et NF- κ B. La capacité de ce facteur de transcription à contrôler la prolifération des cellules cancéreuses réside dans la nature de certains de ses gènes cibles. En effet, plusieurs de ses gènes cibles sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, en particulier ceux codant les cyclines D1, E et B1 qui régule, respectivement le passage des phases G₁/S et G₂/M (Feng *et al.*, 2004; Guttridge *et al.*, 1999; Hinz *et al.*, 1999; Ozeki *et al.*, 2004). NF- κ B intervient également dans le cycle cellulaire en régulant l'expression de l'oncogène c-myc, qui favorise la prolifération des cellules cancéreuses (Demicco *et al.*, 2005; Duyao *et al.*, 1990).

IV.5.5.3. Dans l'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse est un processus essentiel dans le développement et la progression des tumeurs (Aurora *et al.*, 2010). Son mécanisme se déroule en plusieurs étapes : la dégradation de la lame basale vasculaire, le remodelage de la matrice extracellulaire, la prolifération et la migration des cellules endothéliales et formation du nouveau vaisseau sanguin (Tabruyn et Griffioen, 2007). Toutes ces étapes sont stimulées par les cellules tumorales, qui sécrètent des facteurs angiogéniques, comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), surtout en condition d'hypoxie, mais également des métalloprotéases matricielles (MMPs) impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire comme les MMP-2, -3 et -9 ou encore l'activateur urokinase du plasminogène (uPa) (Ko *et al.*, 2005; Popov *et al.*, 2006; Tabruyn et Griffioen, 2007; Wilczynska *et al.*, 2006). L'ensemble de ces gènes exprimés, excepté celui codant le VEGF, est la cible de NF- κ B, dont l'activation constitutive, selon le mécanisme, dans les cellules tumorales, favorise ainsi cette angiogenèse (Baay *et al.*, 2011; Chaturvedi *et al.*, 2011). Dans le cas du VEGF, c'est l'induction de l'expression de la sous-unité HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor 1 α) par NF- κ B, qui conduit à l'activation du complexe HIF en condition hypoxique, dont le gène codant le facteur angiogénique est la cible (Görlach et Bonello, 2008; Tong *et al.*, 2006; Van Uden *et al.*, 2008).

Cependant, l'activation du facteur de transcription NF- κ B dans les cellules endothéliales est plutôt responsable d'une inhibition de l'angiogenèse. Une étude *in vitro* et *in vivo* a montré que l'activation de la voie NF- κ B dans des cellules endothéliales diminue la formation de tubes dans du matrigel, une substance mimant la matrice extracellulaire (Chng *et al.*, 2006). Dans ces cellules, NF- κ B est capable de stimuler la synthèse de la protéine PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor), l'inhibiteur de la protéine uPa (Swiatkowska *et al.*, 2005). Cette activité anti-angiogénique s'accompagne également d'une diminution de l'expression des MMP-1 et -9 et d'une augmentation de celle de la protéine TIMP1 (Tissue Inhibitor of Metalloprotease 1), un inhibiteur des MMPs (Gu *et al.*, 2017), ainsi que du VEGI (Vascular Endothelial Growth Inhibitor), l'inhibiteur du facteur VEGF (Xiao *et al.*, 2005). Aujourd'hui, peu d'études ont clairement démontré l'implication du facteur de transcription dans la prolifération des cellules endothéliales. Seule une étude a montré que l'activation du facteur de transcription NF- κ B dans les cellules contractiles des vaisseaux sanguins (péricytes) augmentait la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* et la sécrétion de cytokines pro-angiogéniques comme l'IL-8 et MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) (LaBarbera *et al.*, 2015).

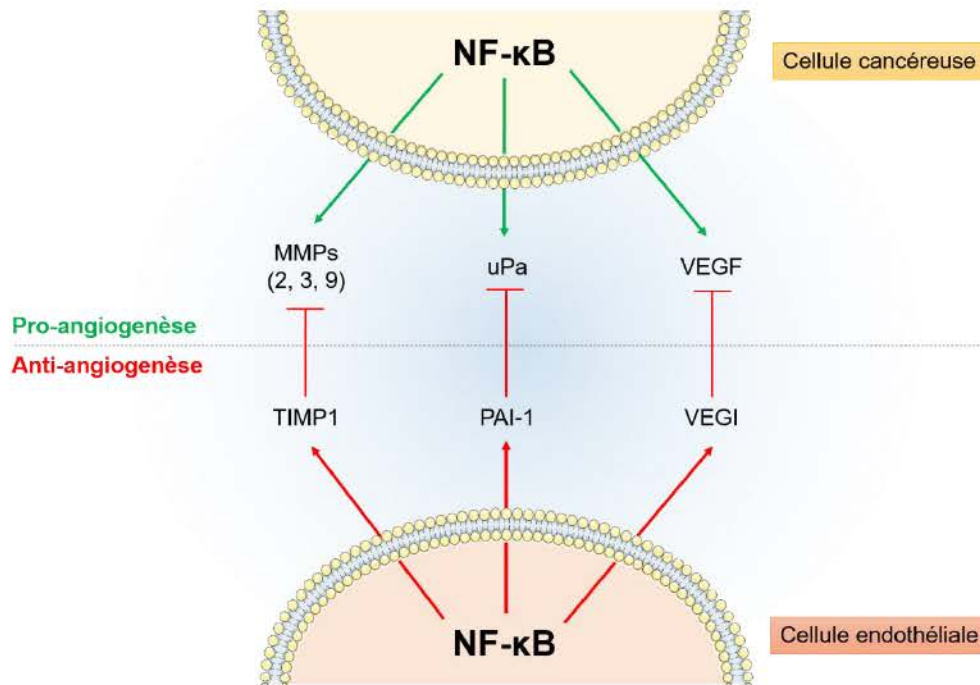


Figure 28 : Implication du facteur de transcription NF-κB dans l'angiogenèse tumorale. L'activation de NF-κB dans les cellules cancéreuses favorise la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, en augmentant l'expression des gènes codant les MMP-2, -3 et -9, l'uPa et la protéine VEGF. A l'inverse, l'activation de NF-κB dans les cellules endothéliales s'oppose à l'angiogenèse, en augmentant respectivement, l'expression des protéines TIMP1, PAI-1 et VEGI, des inhibiteurs physiologiques, respectivement des MMP-2, -3 et -9, uPa et VEGF.

L'activité pro-ou anti-angiogénique de NF- κ B, respectivement, dans les cellules tumorales et les cellules endothéliales, est résumée dans la **figure 28**. Actuellement, il est donc difficile de prédire l'effet seul de l'activité NF- κ B sur la formation de nouveau vaisseaux sanguins alimentant la tumeur (Tabruyn et Griffioen, 2007).

IV.5.5.4. Dans la migration et l'invasion des cellules tumorales

Le complexe NF- κ B contribue également à la progression des tumeurs, par l'acquisition de propriétés migratrices et invasives des cellules tumorales, pouvant conduire au développement de métastases. D'ailleurs, une activité élevée de NF- κ B est souvent corrélée à l'agressivité des cellules tumorales ayant de fortes capacités invasives et migratrices, comme celles du sein, du poumon, du pancréas, de la prostate, de l'ovaire ainsi que de la tête et du cou (Annunziata *et al.*, 2010; Melisi *et al.*, 2009; Min *et al.*, 2010; Nakshatri *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011). L'acquisition de ces nouvelles propriétés correspondant à une dédifférenciation approfondie nécessite des modifications phénotypiques des cellules tumorales, qui se traduisent par des modifications dans l'expression génique et dont l'étape initiale est résumée sous le terme de transition épithélio-mésenchymateuse ou TEM (décrite dans le paragraphe III.2.4.4).

NF- κ B joue un rôle majeur dans la TEM en raison de la nature et de la fonction des protéines codées par ses gènes cibles. Certaines d'entre-elles sont des facteurs de transcription exprimés au cours de la TEM : Snail, Slug, Zeb1, Zeb2 et Twist-1 (Chua *et al.*, 2007; Comijn *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2012; Min *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2004). Ces facteurs de transcription sont connus pour réprimer l'expression de marqueurs épithéliaux comme la E-cadhérine, les claudines, les occludines, les desmoplakines ou encore la protéine zonula occludens 1 ou ZO1 (Min *et al.*, 2008). Ainsi, la répression de l'expression de ces gènes conduit à la perte des jonctions des cellules épithéliales entre-elles et sur la lame basale. En dehors de la perte des marqueurs épithéliaux, NF- κ B est également impliqué dans l'acquisition de marqueurs mésenchymateux. De manière directe ou par l'intermédiaire des facteurs de transcription Snail, Slug, Zeb ou Twist-1, NF- κ B induit l'expression de gènes codant des protéines caractéristiques des cellules mésenchymateuses, comme la vimentine et la N-cadhérine (Ng *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2009). Comme nous avons déjà mentionné plus haut, NF- κ B, en induisant l'expression des protéines MMP-2, -3 et -9 ainsi que uPa, impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire et dans la dégradation de la lame basale, favorise ainsi la mise en place des

capacités migratrices et invasives des cellules tumorales subissant la TEM (Ko *et al.*, 2005; Min *et al.*, 2008; Popov *et al.*, 2006; Tabruyn et Griffioen, 2007; Wilczynska *et al.*, 2006).

Au cours de la migration des cellules tumorales, NF- κ B contribue au remaniement de la matrice extracellulaire propice au déplacement cellulaire, en induisant la synthèse de protéines comme la fibronectine, la tenascine C, le collagène $\alpha 2$ du type I (Lee *et al.*, 2002; Medici et Nawshad, 2010; Mettouchi *et al.*, 1997; Novitskiy *et al.*, 2004). Enfin, NF- κ B contribue également à maintenir les capacités migratrices et invasives des cellules tumorales en induisant l'expression de gènes cibles comme ceux codant des membres de la famille du TGF β , tels que l'activine A et le TGF β , dont le rôle d'inducteur de la TEM est bien décrit (Alexander *et al.*, 2007; Bashir *et al.*, 2015; Massagué, 2008; Tobar *et al.*, 2010).

Certaines cellules tumorales migratrices et invasives ont la capacité de développer des métastases en colonisant d'autres organes. Pour cela, ces cellules se retrouvent dans la circulation sanguine en pénétrant dans les vaisseaux sanguins (intravasation). Cette intravasation nécessite l'adhérence transitoire des cellules tumorales sur les cellules endothéliales, pour laquelle NF- κ B joue un rôle important en induisant l'expression de protéines d'adhérence telles que I-CAM (Intercellular Adhesion Molecule) et V-CAM (Vascular Adhesion Molecule) (Lin *et al.*, 2010).

IV.5.5.5. Dans la résistance aux thérapies

NF- κ B a été montré comme un facteur clé dans l'échappement thérapeutique des tumeurs. En effet, les cellules tumorales, exposées à différents stimuli, ainsi que des traitements anticancéreux, tels que les radiations ionisantes en radiothérapie ou les agents couramment utilisés en chimiothérapie ont une activation de NF- κ B qui entraîne leur résistance aux thérapies. Certaines cellules tumorales ayant une activation constitutive sont souvent d'emblée résistantes aux traitements anticancéreux (Godwin *et al.*, 2013).

Les mécanismes par lesquels NF- κ B participe à la résistance des cellules tumorales aux thérapies ne sont pas encore clairement élucidés. Néanmoins, l'implication de ce facteur de transcription dans la résistance aux thérapies réside dans sa capacité à induire l'expression de gènes codant des protéines ayant des fonctions anti-apoptotiques, comme celles de la famille Bcl-2 incluant Bcl-2, Bcl-X_L et Bfl1/A1, les protéines de la famille IAP ou encore les protéines impliquées dans la régulation de l'activité des caspases comme c-FLIP (Catz et Johnson, 2001; Chen *et al.*, 2000; Kreuz *et al.*, 2001; Stehlik *et al.*, 1998; Zong *et al.*, 1999). C'est le cas de

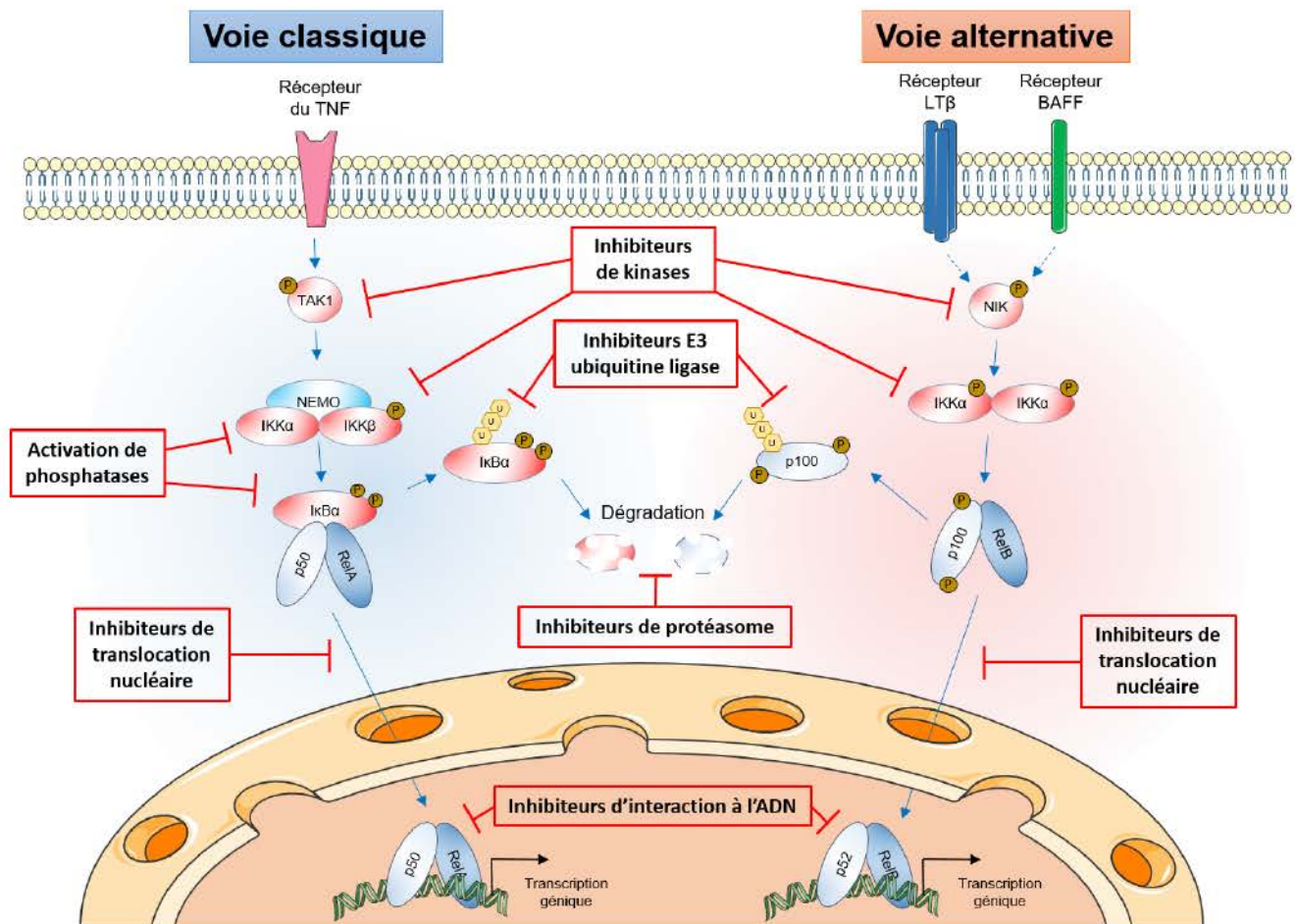


Figure 29 : Représentation schématique des différentes stratégies utilisées pour inhiber l'activation de la voie NF-κB. De nombreuses molécules ont été développées afin d'abroger l'activation de la voie NF-κB. Il existe des inhibiteurs de kinases, d'ubiquitine ligases et de protéasome. Certaines molécules permettent de bloquer la translocation nucléaire ou encore l'interaction avec l'ADN, alors que d'autres visent à activer des phosphatases.

cellules de lymphome capables de survivre à des agents de chimiothérapie et à la radiothérapie en ayant une expression plus élevée des gènes cibles NF- κ B qui codent les protéines Bcl-X_L, IAP-1 et -2, c-FLIP et la survivine (Bernal-Mizrachi *et al.*, 2006). De même, des cellules d'ostéosarcome ou de carcinome ovarien présentent une moins grande sensibilité au cisplatine et à certains taxanes comme le paclitaxel, lorsque NF- κ B est activé de façon constitutive (Staudt, 2010; Yang *et al.*, 2011). L'observation est identique dans des cellules cancéreuses de la prostate ou des poumons soumises à des radiations ionisantes (Bai *et al.*, 2015).

Certaines études, comme dans le cas de cellules cancéreuses coliques, ont montré que NF- κ B a pour gène cible *MDR1* (Multi-Drug Resistance 1), qui code la glycoprotéine P (Bentires-Alj *et al.*, 2003), une protéine qui favorise l'extrusion des composés cytotoxiques de la cellule, de façon ATP-dépendante (Abraham *et al.*, 1993).

Certains agents cytotoxiques utilisés en chimiothérapie génèrent des espèces réactives de l'oxygène (ERO) lors de leur métabolisation. De même, les radiations ionisantes, par l'intermédiaire de la radiolyse de l'eau, libèrent ces ERO. Ces dernières, par leur action oxydante sur les molécules biologiques, induisent la mort des cellules. Cependant, lorsqu'elles sont responsables de l'activation de NF- κ B par la voie de signalisation impliquant les protéines TRAF ou par la voie atypique (**Figure 20**) (Ahmed et Li, 2008), elles conduisent à une réponse adaptative passant par l'induction du gène cible codant la SODMn, une enzyme antioxydante (Holley *et al.*, 2010).

En plus de son rôle dans la progression des cellules tumorales vers un état invasif et métastatique, NF- κ B contribue aux mécanismes d'échappement de ces cellules aux thérapies anticancéreuses, qui le place actuellement comme une cible thérapeutique pertinente et prometteuse. De nombreuses molécules ont donc été développées et qui ont pour objectif principal, de diminuer l'activité constitutive ou induite de NF- κ B, afin de rendre sensible ou resensibiliser les cellules cancéreuses aux thérapies classiques. Aujourd'hui, environ 780 molécules inhibitrices de l'activité de NF- κ B ont été identifiées (Gilmore et Herscovitch, 2006). Certaines de ces molécules ont pour rôle d'inhiber les kinases IKK, TAK1 ou encore NIK, d'autres sont développées dans le but d'activer des protéines phosphatases, comme la protéine PTEN, afin de maintenir la protéine I κ B α dans un état non phosphorylé. Certaines molécules sont capables d'inhiber le protéasome ou de bloquer l'ubiquitinylation des protéines I κ B et ainsi empêcher leur dégradation. Enfin, certains composés ont été développés afin d'empêcher la translocation nucléaire de NF- κ B ou son interaction avec l'ADN (**Figure 29**) (Gupta *et al.*, 2010).

IV.6. Rôle de NF- κ B dans le cancer du sein

IV.6.1. Activation constitutive de NF- κ B

De nombreuses études ont mis en évidence l'importance de NF- κ B dans le développement et la progression des cancers du sein. Dans de nombreux cas, une activation constitutive de la voie classique du facteur de transcription NF- κ B est détectée.

Plusieurs études ont montré que le complexe p50/RelA était constitutivement activé dans des lignées de cellules tumorales mammaires n'exprimant pas le récepteur aux œstrogènes (ER $^-$) ainsi que dans des tumeurs mammaires ER $^-$ (Ahmed *et al.*, 2006; Nakshatri *et al.*, 1997; Sovak *et al.*, 1997). Ce constat est le même dans des cellules ER $^-$ exprimant le récepteur HER2 (HER2 $^+$) (Biswas *et al.*, 2004). D'autres études mentionnent l'implication de la voie alternative de NF- κ B dans la tumorigenèse mammaire et montrent une surexpression du complexe p100/p52 dans certaines tumeurs (Cogswell *et al.*, 2000; Dejardin *et al.*, 1995). L'activité de ce complexe p100/p52 est également augmentée chez la souris dans des tumeurs mammaires chimiquement induites (Demicco *et al.*, 2005). D'autre part, NF- κ B peut également être activé dans les cellules cancéreuses mammaires par la voie de signalisation déclenchée lors de la fixation du facteur de croissance EGF sur son récepteur. Ce mécanisme contribue à augmenter l'activité de NF- κ B dans les cellules ER α^- (Biswas *et al.*, 2000; Van Laere *et al.*, 2007). A l'inverse, une faible activation de NF- κ B est retrouvée dans des cellules cancéreuses mammaires ER $^+$, telles que les cellules MCF-7 et T47D (Nakshatri *et al.*, 1997). Sans déterminer clairement les acteurs protéiques impliqués, une étude montre qu'en présence d'œstrogènes, le récepteur ER α réprime l'expression des sous-unités du facteur de transcription NF- κ B dans les cellules cancéreuses mammaires ER $^+$ (Belguise et Sonenshein, 2007).

Les mécanismes moléculaires conduisant à l'activation constitutive de NF- κ B dans les cellules tumorales mammaires ER $^-$ sont encore mal compris. Actuellement, 3 mécanismes moléculaires distincts ont été identifiés : soit ceux dépendants d'une voie de signalisation provenant de signaux extérieurs, soit de dérégulation dans l'expression d'acteurs protéiques de la voie d'activation de NF- κ B, soit l'implication de micro ARNs qui agissent sur les inhibiteurs du facteur de transcription. L'étude menée par l'équipe de Belguise suggère l'implication des protéines kinases PKC θ (Protéine Kinase C θ) et Akt. L'activation de ces protéines conduirait à diminuer le niveau d'expression de ER α et ainsi augmenter la synthèse de NF- κ B et son activité (Belguise et Sonenshein, 2007). Dans des cellules cancéreuses mammaires ER α^- et HER2 $^+$, l'activation de NF- κ B dépend en partie de la voie de signalisation PI3K/Akt (PhosphoInositide

3-Kinase). En effet, l'EGF sur son récepteur entraîne l'activation de la voie PI3K/Akt, qui phosphoryle entre autre l'inhibiteur I κ B α pour favoriser sa dégradation. Dans ce cas précis, la phosphorylation de la protéine I κ B α est indépendante de l'activité du complexe IKK (Pianetti *et al.*, 2001). L'équipe de Briassouli a, quant à elle, montré une corrélation entre l'activité de NF- κ B et le niveau d'expression de la kinase Aurora-A, impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire. Parmi des échantillons de tumeur présentant une activité constitutive de NF- κ B, 13,6% présentent une amplification du gène codant la protéine Aurora-A. Dans ces cellules, cette protéine est capable de phosphoryler la protéine I κ B α au niveau des sérines 32 et 36 (Ser32 et Ser36), de façon indépendante des complexes IKK, induisant par la suite sa dégradation et l'activation du complexe NF- κ B (Briassouli *et al.*, 2007).

D'autres études suggèrent l'implication d'une dérégulation dans l'expression de certaines protéines impliquées dans les voies d'activation de NF- κ B. Ainsi, une étude menée sur des cellules tumorales triples négatives (TNBC), de sous-type « basal-like », montre un niveau d'expression élevé du gène codant la protéine NIK (NF- κ B Inducible Kinase) provoqué par une acétylation de l'histone H3 au niveau de son promoteur (Yamaguchi *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2010). Cette protéine est impliquée dans la phosphorylation et l'activation du complexe IKK de la voie alternative d'activation de NF- κ B (**Figure 20**). De même, une expression aberrante des protéines IKK α , IKK β et de la kinase CK2 (Casein Kinase II) des complexes IKK est également observée dans certaines lignées de cellules cancéreuses mammaires qui entraîne une activité constitutive de NF- κ B (Romieu-Mourez *et al.*, 2001, 2002). L'une des protéines clefs dans la régulation de l'activité de NF- κ B est I κ B α . Ainsi, une dérégulation de l'expression ou de l'activité de la protéine I κ B α peut être responsable de l'activation constitutive de NF- κ B dans les tumeurs mammaires. Dans ce sens, une étude rétrospective récente, réalisée sur plus de 5000 tumeurs mammaires humaines a révélé que le gène *NFKB1A* codant I κ B α , qui présente une faible fréquence de mutation, est retrouvé délété dans 10,8% des tumeurs mammaires les plus agressives et d'emblée métastatiques, dont 32,8% d'entre-elles sont des tumeurs triples négatives (TNBC). Ces délétions entraînent une absence d'expression de la protéine I κ B α , pouvant entraîner une activité constitutive de NF- κ B (Bredel *et al.*, 2013). De même, l'absence d'expression d'un régulateur du gène *NFKB1A* peut contribuer également à l'activité constitutive de NF- κ B. C'est le cas de DDB2, qui, comme nous l'avons décrit en paragraphe III.2.3, a été identifiée pour la 1^{ère} fois dans le laboratoire, comme un régulateur positif de l'expression d'I κ B α . Dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB231 et SKBR3, invasives et métastatiques, présentant une activité constitutive de NF- κ B, DDB2 est faiblement,

voire pas exprimée (Ennen *et al.*, 2013). Encore plus récemment, il a été identifiée un nouveau mécanisme moléculaire montrant que la dégradation de la protéine I κ B α peut être empêchée dans les cellules tumorales mammaires non invasives et maintenir ainsi le complexe NF- κ B dans le compartiment cytoplasmique. Ce mécanisme fait intervenir une interaction entre I κ B α et la protéine α -caténine sous forme SUMOylée. La protéine α -caténine est connue pour son rôle dans la structure des jonctions cellulaires et dans la polarité des cellules. Une fois SUMOylée, elle est capable d'interagir avec la protéine I κ B α , d'empêcher sa phosphorylation par le complexe IKK et par conséquent sa dégradation (Chen *et al.*, 2018).

Enfin, certains micro-ARNs sont impliqués dans l'activation constitutive de NF- κ B dans les cellules cancéreuses mammaires. C'est le cas du miR-221/222, qui est surexprimé dans les cellules tumorales mammaires souches ou triples négatives (TNBC), de sous-type « basal-like », et qui a pour cible PTEN. Il en résulte une activation constitutive de la voie PI3K/Akt, responsable de l'activation de NF- κ B (Li *et al.*, 2017). Au contraire, l'absence d'expression du miR-829b par hyperméthylation de son promoteur, dans certaines cellules tumorales mammaires est à l'origine de l'activation de NF- κ B. Ce miR-829b a pour cible plusieurs effecteurs de la voie d'activation du facteur de transcription, comme TRAF2 ou TAK1 (Jiang *et al.*, 2016).

IV.6.2. Dans la prolifération des cellules tumorales mammaires

La prolifération des cellules tumorales mammaires peut être favorisée par l'expression de certains gènes cibles de NF- κ B. Ainsi, une activité constitutive de NF- κ B entraîne une surexpression de la cycline D1 et c-myc, toutes deux impliquées dans la progression du cycle cellulaire (Demicco *et al.*, 2005). Une étude menée en 2014 par l'équipe de Smith, a montré que le facteur de transcription NF- κ B était capable d'augmenter la prolifération des cellules cancéreuses mammaires triples négatives (TNBC), comme les MDA-MB231, en augmentant le niveau d'expression du gène codant la protéine CD44 (Cluster Differentiation 44) (Smith *et al.*, 2014). Cette protéine est un marqueur des cellules souches cancéreuses mammaires (Yang *et al.*, 2016). Enfin, une étude récente montre que le facteur de transcription NF- κ B est capable de stimuler la prolifération de cellules cancéreuses mammaires en contrôlant l'expression d'une protéine à activité E3 ubiquitine ligase, la protéine TRIM32 (TRiPartite Motif 32) (Zhao *et al.*, 2018). Cette dernière est connue pour son rôle dans la régulation du cycle cellulaire (Lazzari et Meroni, 2016).

IV.6.3. Dans l'expansion des cellules souches cancéreuses mammaires

Plus haut, nous avons rapporté l'étude montrant l'expression élevée et dépendante de NF- κ B, du marqueur des cellules souches cancéreuses mammaires, CD44. NF- κ B régule également l'expression d'autres marqueurs des cellules souches, tels que l'aldéhyde déshydrogénase 1, Nanog et Sox2. Ces deux derniers sont des régulateurs transcriptionnels des gènes codant d'autres marqueurs des cellules souches (Liu *et al.*, 2011; Vazquez-Santillan *et al.*, 2016).

IV.6.4. Dans les capacités migratrices et invasives des cellules tumorales mammaires

De manière générale, les différentes voies d'activation du facteur de transcription NF- κ B induisent, puis maintiennent les capacités migratrices et invasives des cellules cancéreuses mammaires. C'est le cas des cellules tumorales mammaires ER- qui surexpriment HER2 et dont l'activation de NF- κ B est dépendante de la voie PI3K/Akt (Merkhofer *et al.*, 2010). Dans d'autres types cellulaires, comme les triples négatives MDA-MB231, c'est l'expression et l'activation du récepteur TLR2 (Toll-like Receptor 2) qui entraîne l'activation du facteur de transcription à l'origine de leurs capacités invasives (Xie *et al.*, 2009). Dans ces cellules, le couple RANKL/RANK (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand), qui est surexprimé, conduit également à l'activation de NF- κ B et entraîne les cellules vers un phénotype invasif, voire métastatique vers un tissu cible comme l'os (Tsubaki *et al.*, 2013). Ceci est également observé cliniquement, chez des femmes dont la surexpression aberrante de RANKL augmente fortement le risque de développer un cancer du sein souvent invasif (Kiechl *et al.*, 2016).

Ces capacités migratrices et invasives dépendent des événements initiaux et caractéristiques de la TEM (décrite dans le paragraphe III.2.4.4), avec l'activation de facteurs de transcription tels que Twist, Snail, Slug, Zeb1 et 2 qui dépend de l'activité NF- κ B (Huber *et al.*, 2004). L'expression de ces protéines, ainsi que l'activation de NF- κ B, est généralement associée à l'agressivité des cellules tumorales mammaires et à leur pouvoir métastatique (Sethi *et al.*, 2011). Ainsi, l'inhibition de l'activité de NF- κ B diminue le niveau d'expression des facteurs de transcription impliqués dans la TEM, et en conséquence les capacités invasives et métastatiques des cellules tumorales mammaires MDA-MB231, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Li *et al.*, 2012; Pires *et al.*, 2017). De même, les cellules épithéliales mammaires non cancéreuses

et immortalisées (MCF-10A) subissent la TEM lorsque la sous-unité RelA du facteur de transcription NF- κ B est surexprimée. On observe alors dans ces cellules un changement de phénotype caractérisé à la fois par la diminution de l'expression des marqueurs épithéliaux comme la E-cadhérine et la desmoplakine, et par l'augmentation de l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine, la N-cadhérine et la MMP-9, en passant par l'activation des facteurs de transcription Snail, Zeb1 et 2 (Chua *et al.*, 2007; Himmelstein *et al.*, 1997; Kalluri et Weinberg, 2009; Shostak et Chariot, 2011; Wu et Zhou, 2010). L'expression de ces marqueurs mésenchymateux est d'ailleurs corrélée avec le haut grade SBR des tumeurs mammaires et sont des facteurs de mauvais pronostic (McGowan et Duffy, 2008; Hemalatha *et al.*, 2013; Merdad *et al.*, 2014).

Le rôle de NF- κ B dans l'acquisition des propriétés migratrices et invasives des cellules tumorales mammaires passe également par l'expression d'autres gènes cibles. C'est le cas de l'activateur du plasminogène ou uPa, qui est une sérine protéase sécrétée transformant le plasminogène en plasmine, et fortement impliquée dans le remodelage nécessaire de la matrice extracellulaire lors de la migration des cellules tumorales particulièrement ER- (Duffy *et al.*, 2014; Long et Rose, 1996). Un dernier gène cible de NF- κ B jouant un rôle important dans l'agressivité des cellules tumorales mammaires est celui codant le récepteur aux chimiokines CXCR4 (C-X-C Motif Chemokine Receptor 4) (Helbig *et al.*, 2003). Ce gène cible joue un rôle important, en particulier dans le développement de métastases osseuses par les cellules tumorales d'origine mammaire. Ces dernières, ayant une activité constitutive de NF- κ B, induisent l'expression de CXCR4, qui leur permet de recevoir le signal émis par les ostéoblastes et correspondant au ligand CXCL12. Cette communication cellulaire favorise la colonisation du tissu osseux par les cellules tumorales mammaires. Au niveau de ces dernières, la voie de signalisation déclenchée par la fixation de CXCL12 sur CXCR4 se traduit par un remaniement du cytosquelette d'actine favorable à la formation de pseudopodes, et donc à l'invasion du tissu cible (Arya *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2001).

IV.6.5. Dans la résistance des cellules cancéreuses mammaires aux thérapies

Le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle prépondérant dans la résistance des cellules cancéreuses mammaires aux traitements anticancéreux, utilisant des agents de chimiothérapie ou les radiations ionisantes. Une étude rétrospective montre en effet que seulement 20% des patientes ayant une tumeur mammaire qui présente une activité constitutive

de NF- κ B répondent favorablement à une chimiothérapie néo-adjuvante, contre 91% des patientes avec une tumeur sans activité NF- κ B (Montagut *et al.*, 2006). Néanmoins, les mécanismes impliquant NF- κ B dans cette résistance aux traitements anticancéreux ne sont pas clairement définis. De plus, des cellules tumorales mammaires *in vitro*, présentant une activité constitutive de NF- κ B selon les mécanismes décrits dans le paragraphe IV.6.1., sont souvent d'emblée résistantes aux traitements anticancéreux, comme le paclitaxel, le cisplatine ou encore le 5-fluorouracile (Staud et Pavék, 2005; Zhang *et al.*, 2011).

Certains agents utilisés en chimiothérapie sont capable d'activer la voie NF- κ B (Lin *et al.*, 2010). C'est le cas du paclitaxel, un agent cytotoxique appartenant à la famille des taxanes, qui bloque la mitose en empêchant la dépolymérisation des microtubules du fuseau de division (Perez, 1998). L'activation de NF- κ B rend les cellules tumorales mammaires moins sensibles, voire résistantes, comme les MDA-MB231, vis-à-vis du paclitaxel. Cette résistance s'explique, en partie, par l'expression des gènes cibles de NF- κ B qui codent les protéines SODMn et cIAP2 (Manna *et al.*, 1998; Patel *et al.*, 2000). La protéine cIAP2 est connue pour son action anti-apoptotique en inhibant l'activité des caspases 7 et 9 (Deveraux et Reed, 1999). L'inhibition pharmacologique de la voie NF- κ B ou l'expression de la protéine I κ B α permet d'inverser la résistance des cellules MDA-MB231 vis-à-vis du paclitaxel (Patel *et al.*, 2000). NF- κ B confère également une résistance aux cellules cancéreuses mammaires exposées au cisplatine, en induisant également l'expression des gènes codant les protéines cIAP1 et cIAP2 (Zhao *et al.*, 2018). En dehors de son activité qu'il exerce sur l'expression de gènes anti-apoptotiques dans la résistance aux traitements, NF- κ B peut directement induire l'expression d'autres gènes cibles, codant en particulier pour des transporteurs protéiques possédant des cassettes à ATP (Transporteurs ABC) impliquées dans l'expulsion de composés cytotoxiques hors de la cellule. C'est le cas des gènes codants MDR-1, MRP-1 (Multi drug Resistance Protein1) et BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) (Lin *et al.*, 2012; Staud et Pavék, 2005; Velaei *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2011).

Dans les cancers hormono-dépendants, une activation aberrante de la voie PI3K/Akt, entraînant l'activation de NF- κ B, est responsable de la résistance vis-à-vis du tamoxifène, un agent utilisé en hormonothérapie, qui est un antagoniste de l'œstrogène sur son récepteur nucléaire (deGraffenried *et al.*, 2004).

Récemment, il a été montré que NF- κ B joue également un rôle dans la résistance des cellules cancéreuses mammaires vis-à-vis des thérapies ciblées utilisées dans le traitement des tumeurs mammaires HER2 positives. Il s'agit du trastuzumab, un anticorps monoclonal ciblant

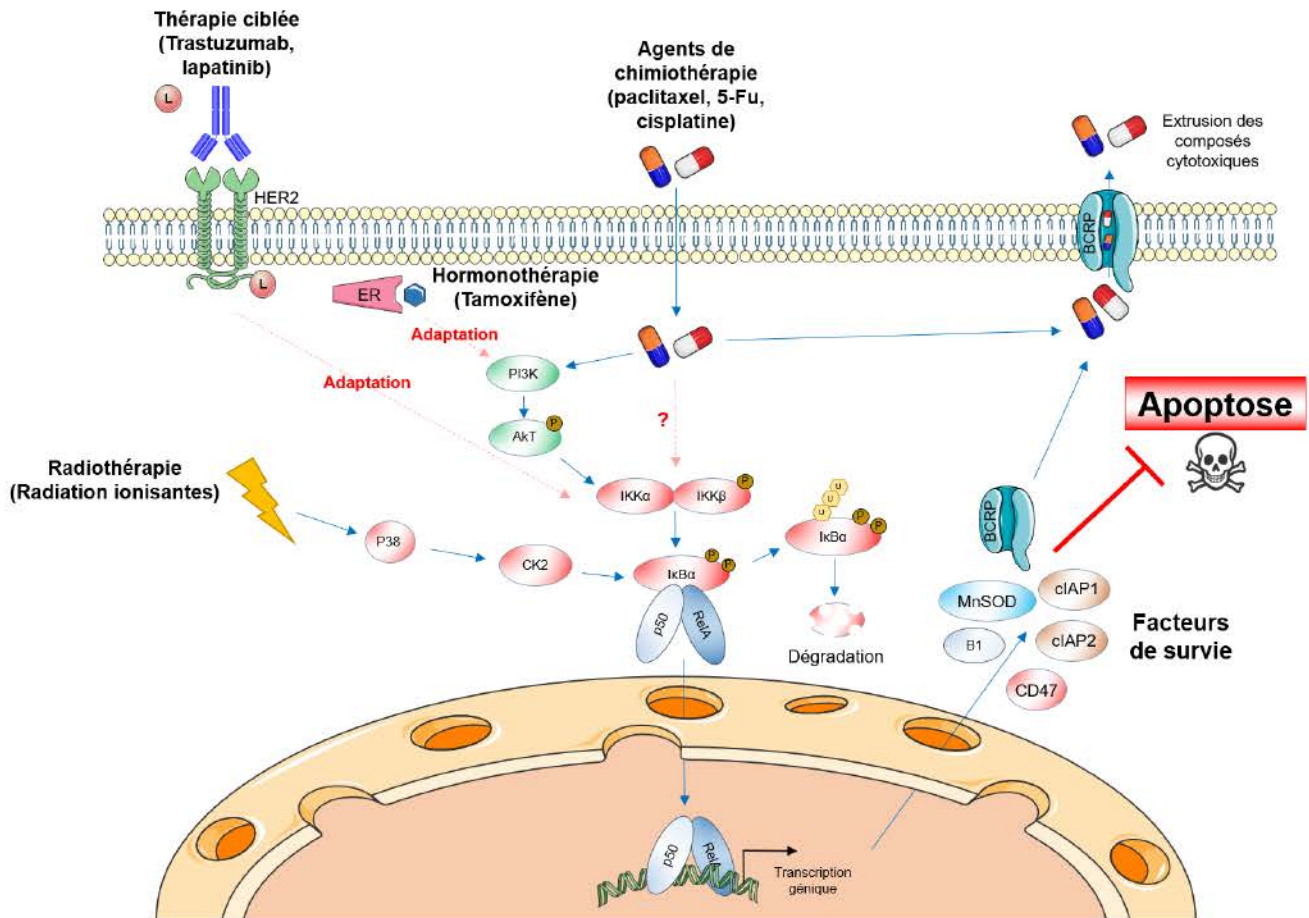


Figure 30 : Représentation schématique du rôle de NF-κB dans la résistance aux thérapies anticancéreuses des cellules tumorales mammaires. Les agents thérapeutiques utilisés en chimiothérapie, en thérapie ciblée et en hormonothérapie peuvent entraîner une diminution de la sensibilité, voire une résistance des cellules tumorales en activant la voie NF-κB. De même, les radiations ionisantes activent directement la voie atypique de NF-κB. En retour, cette activation du facteur de transcription induit l'expression de facteurs de survie cellulaire et de transporteurs membranaires, comme la glycoprotéine P, MRP1 ou BCRP qui favorisent la sortie des médicaments anticancéreux hors de la cellule.

le récepteur HER2 et le lapatinib, un inhibiteur de la tyrosine kinase du récepteur HER2, qui empêchent ainsi le déclenchement des voies de signalisation dépendante de l'EGF. A partir de cellules SKBR3 (HER2+) résistantes au lapatinib, et ayant une activité constitutive de NF- κ B, une analyse transcriptomique révèle que principalement les gènes cibles du facteur de transcription, codant des protéines anti-apoptotiques sont responsables de la résistance vis-à-vis de cette thérapie ciblée. Ces résultats ont été confortés lors d'une étude clinique à partir d'une analyse transcriptomique réalisée sur des biopsies de tumeurs mammaires HER2 positives de patientes ayant reçu cette thérapie ciblée et dont la survie est réduite (Bailey *et al.*, 2014).

Les radiations ionisantes peuvent activer NF- κ B par la voie alternative, avec pour conséquence, que les gènes cibles, dont l'expression est induite, sont responsables de l'apparition de résistance vis-à-vis de la radiothérapie. Il semble que ce soit l'expression induite des gènes cibles de NF- κ B, comme ceux codant la MMP-9, la SODMn, le récepteur CD47, la cycline B1 ou encore plus récemment l'intégrine β 1, qui entraîne cette résistance vis-à-vis des radiations ionisantes (**Figure 30**) (Ahmed *et al.*, 2013; Azghadi *et al.*, 2015; Ozeki *et al.*, 2004).

HYPOTHESES & OBJECTIFS

Malgré de nombreux progrès dans son diagnostic et son traitement, le cancer du sein reste le cancer féminin le plus meurtrier en France et dans le monde. Les mécanismes à l'origine de la progression tumorale et de l'échappement des cellules cancéreuses mammaires aux thérapies sont encore mal connus. La compréhension de ces mécanismes est au cœur de nombreux travaux de recherche dans le monde et présente, aujourd'hui, un enjeu majeur en cancérologie. Les recherches menées au laboratoire d'accueil s'inscrivent dans ce contexte et ont permis l'identification de nouvelles activités biologiques de la protéine DDB2 dans les cellules cancéreuses mammaires.

En activant l'expression du gène *NFKBIA*, codant la protéine I κ B α , DDB2 contrôle l'activité de NF- κ B (Ennen *et al.*, 2013). De nombreuses études ont mis en évidence l'importance de ce facteur de transcription dans la survenue, le développement et la progression des cancers mammaires ainsi que dans la résistance des cellules tumorales mammaires aux thérapies (Park, 2017). Ainsi, en se fixant sur le promoteur du gène *NFKBIA*, DDB2 active son expression et empêche ainsi les cellules cancéreuses mammaires d'acquérir des propriétés migratrices et invasives (Ennen *et al.*, 2013). En dehors du gène *NFKBIA*, le laboratoire avait déjà identifié le gène *SOD2* codant la SODMn comme cible de DDB2, dont elle réprime l'expression et favorise ainsi la prolifération des cellules tumorales (Minig *et al.*, 2009).

Cependant, en dehors de sa capacité à se fixer sur des séquences cibles d'ADN au sein du promoteur de ces gènes, l'activité réelle de DDB2 dans la transcription génique reste à définir. En dehors des 7 domaines WD40 et du domaine hélice-boucle-hélice composant la structure de DDB2, la protéine ne contient pas réellement de domaine permettant d'expliquer son influence sur l'expression de ses gènes cibles *NFKBIA* et *SOD2*. Ainsi, notre hypothèse de travail a été que DDB2 doit s'associer ou modifier le recrutement soit d'activateurs, soit d'inhibiteurs de la transcription. Le laboratoire a pu montrer en particulier que DDB2 favorisait le recrutement du facteur de transcription AP2 α dans la régulation du gène codant la SODMn (Ennen *et al.*, 2011; Minig *et al.*, 2009). Afin de rendre compte de son activité transcriptionnelle, il n'est pas exclu que DDB2 interagisse également avec des partenaires protéiques de nature différente qui restent à identifier, comme des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. C'est le cas de certains de ces partenaires récemment identifiés par d'autres laboratoires, qui appartiennent à la famille des histones désacétylases (HDAC), des méthyl transférase ou encore des protéines de réparation (Fantini *et al.*, 2017; Roy *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014, 2015), dont l'implication dans l'activité transcriptionnelle de DDB2 n'a pas été démontrée dans les cellules cancéreuses mammaires.

Les objectifs de ce travail de thèse ont donc été :

- De rechercher et identifier des partenaires protéiques de DDB2 dans la régulation de ses gènes cibles *NFKBIA* et *SOD2* impliqués dans la tumorigenèse mammaire et la résistance aux thérapies ;
- D'étudier l'importance d'un de ses partenaires potentiels nouvellement identifiés dans la régulation de l'expression des gènes cibles *NFKBIA* et *SOD2*, en précisant si son rôle dépend de son interaction avec DDB2.

Le 1^{er} objectif repose sur la mise au point d'une approche de « DNA pull-down », qui consiste à piéger des complexes protéiques au niveau de séquences oligonucléotidiques portant le site de fixation de DDB2 identifié précédemment dans le promoteur des gènes *NFKBIA* et *SOD2* (Ennen *et al.*, 2013; Minig *et al.*, 2009).

Le 2^{ème} objectif a nécessité de moduler l'expression des partenaires protéiques précédemment identifiés et d'évaluer son importance dans l'expression du gène *NFKBIA* en particulier, dans des modèles de cellules tumorales mammaires mais également dans des cellules normales comme les HEK 293, et ceci en présence ou non de DDB2 et d'autres régulateurs déjà connus comme Sp1. Le choix du gène *NFKBIA* vient du rôle de la protéine qu'il code dans le contrôle de l'activité de NF- κ B, et parce que la régulation de son expression différentielle selon l'agressivité des tumeurs mammaires n'est pas clairement élucidée.

MATERIEL & METHODES

Tableau 1 : Caractéristiques des lignées de cellules cancéreuses mammaires utilisées. Chaque lignée cellulaire est caractérisée par l'expression des récepteurs hormonaux à l'œstrogène (ER) et à la progestérone (PR) ainsi que celle du co-récepteur à l'EGF (HER2).

Lignée	Origine	Statut ER	Statut PR	Statut HER2	Sous-Types
MCF-7	Adénocarcinome mammaire	+	+	—	Luminal A
T47D	Carcinome ductal mammaire	+	+	—	Luminal A
SKBR3	Adénocarcinome mammaire	—	—	+	HER2 positive
Hs-578T	Adénocarcinome mammaire	—	—	—	Triple négative, Basale B
MDA-MB231	Adénocarcinome mammaire	—	—	—	Triple négative, Basale B

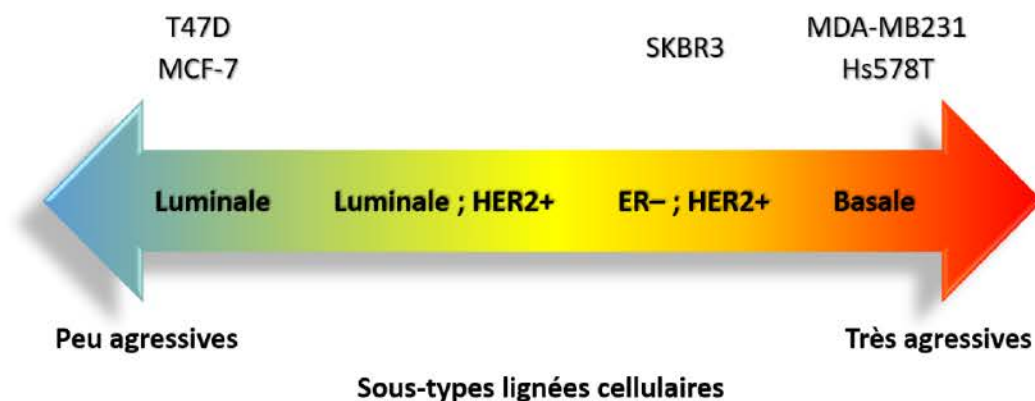


Figure 31 : Représentation schématique des différents sous-types des lignées cellulaires cancéreuses mammaires utilisées. Les cellules MCF-7 et T47D sont peu agressives et appartiennent au sous-type luminal. A l'inverse les cellules MDA-MB231 et Hs578T appartiennent au sous-type basal et sont très agressives. Les cellules SKBR3 appartiennent au sous-type de cellules exprimant HER2, le co-récepteur à l'EGF et sont également agressives (d'après Dai et al., 2017).

I. Culture cellulaire

I.1. Lignées cellulaires

Au cours de ces travaux, plusieurs lignées de cellules cancéreuses mammaires ont été utilisées. L'ensemble de ces lignées, leur origine, leurs statuts ainsi que leur sous-type histologique sont répertoriés dans le **tableau 1**. Les cellules MCF-7 et T47D sont faiblement invasives et expriment les récepteurs hormonaux à l'œstrogène et à la progestérone (ER et PR). A l'inverse, les cellules SKBR3, Hs578T et MDA-MB231 ont subi la transition épithélio-mésenchymateuse et présentent ainsi des propriétés hautement invasives et migratrices. Elles n'expriment pas les récepteurs ER et PR. Les cellules de la lignée SKBR3 expriment quant à elle HER2, le co-récepteur au facteur de croissance épithélial (EGF). Les cellules des lignées Hs578T et MDA-MB231 sont classées comme cellules triples négatives (TNBC) car elles n'expriment aucun de ces trois récepteurs. Les différents sous-types de lignées de cellules cancéreuses mammaires sont représentées dans la **figure 31** (Dai *et al.*, 2017).

Dans ce travail, les cellules de la lignée HEK 293, correspondant à des cellules épithéliales rénales humaines d'origine embryonnaire, sont utilisées comme cellules témoin car elles sont facilement transfectables.

I.2. Conditions de culture

Les cellules tumorales mammaires, ainsi que les cellules de la lignée HEK 293 sont cultivées en monocouche dans un milieu RPMI 1640 ne contenant pas de rouge phénol (Gibco, Invitrogen, UK), supplémenté par 2 mM de L-Glutamine, 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Sigma) préalablement décomplémenté à 56°C durant 30 minutes et d'antibiotiques comme la gentamicine à 0,1 mg/mL ou un mélange de pénicilline à 100 U/mL / streptomycine à 0,1 mg/mL. Les cellules de la lignée MCF-7 et T47D, hormono-dépendantes, sont cultivées en présence de 10 nM d'œstradiol. Les cellules de la lignée Hs578T sont cultivées dans un milieu DMEM High Glucose (Sigma) contenant 2 mM L-Glutamine, 10% de SVF et 0,01 mg/mL d'insuline bovine.

Les différentes lignées de cellules sont cultivées en monocouche, à 37°C sous atmosphère humide et maintenue à 5% de CO₂. Le milieu de culture des cellules est renouvelé tous les deux jours. Après 4 à 5 jours de culture, les cellules à environ 80% de confluence sont

lavées avec du D-PBS (Sigma) puis décollées à l'aide d'une solution de D-PBS contenant 0,05% de trypsine et 0,02% d'EDTA (Sigma). La présence de mycoplasmes est vérifiée tous les mois par un marquage au Hoechst (Invitrogen). Les différentes expériences ont été réalisées sur des cellules ne contenant pas de mycoplasmes et n'excédant pas 80% de confluence.

II. Etude de l'expression génique

II.1. Au niveau transcriptionnel

II.1.1. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux est réalisée grâce au kit commercial ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega). Les cellules sont décollées à la trypsine, puis sédimentées par centrifugation, avant d'être lysées dans le tampon de lyse fourni par le kit commercial. Le lysat est ensuite passé sur colonnes, puis débarrassé de l'ADN par un traitement à la DNase I durant 15 minutes selon les recommandations du fabricant. Les ARNs sont ensuite élués, dosés par spectrophotométrie à l'aide d'un Nanodrop (Thermo Scientific), puis conservés à -80°C.

II.1.2. RT-PCR quantitative en temps réel

II.1.2.1. Transcription inverse des ARN (RT)

Cette étape permet, à partir de 1 µg d'ARN totaux, la synthèse d'ADN complémentaires ou ADNc grâce à l'enzyme M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). La réaction débute par la dénaturation des structures secondaires des ARN à 65°C pendant 5 minutes. Après ajout de l'enzyme, les échantillons sont incubés à 25°C durant 10 minutes (activation de l'enzyme) puis 50 minutes à 37°C (synthèse) et enfin à 70°C pendant 15 minutes (inactivation). Les ADNc sont conservés à -20°C.

II.1.2.2. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (qPCR)

Cette seconde étape est une réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (PCR en temps réel) à partir des ADNc synthétisés lors de l'étape précédente de RT. Une fraction de 1,5 µL d'échantillon dilué au 1/100^{ème} est utilisé pour chaque réaction, ainsi que 7,5 µL du mélange commercial iQ™ SYBR® Green Supermix 2X (Bio-Rad) et 300 nM d'amorces sens et anti-

Tableau 2 : Liste répertoriant l'ensemble des amorces utilisées pour la technique de RT-qPCR. Les séquences des amorces utilisées pour chaque gène sont indiquées dans le sens 5' vers 3'. Les conditions de température d'hybridation et la taille de l'amplicon sont indiquées respectivement dans la colonne « Tm et Taille ».

Gène	Amorce Sens	Amorce Anti-Sens	Tm	Taille
UBB	5' GCTTTGTTGGGTGAGCTTGT 3'	5' CGAAGATCTGCATTTTGACCT 3'	60°C	98 pb
RPLP0	5' GAAGGCTGTGGTGCTGATGG 3'	5' CCGGATATGAGGCAGCAGTT 3'	62°C	103 pb
IκBα	5' ATCAGCCCTCATTTTGTTC 3'	5' ACCACTGGGGTCAGTCACTC 3'	60°C	180pb
DDB2	5' CTCCTCAATGGAGGGAACAA 3'	5' GTGACCACCATTTCGGCTACT 3'	57°C	132 pb
hnRNP K	5' AATGCCAGTGTTTCAGTCCC 3'	5' AGGCCCTCTTCCAAGGTAGG 3'	60°C	119 pb
Sp1	5' CCATACCCCTTAACCCCG 3'	5' GAATTTTCACTAATGTTTCCCACC 3'	57°C	187 pb
Sp3	5' CTGTCCCAACTGTAAAGAAGGTG 3'	5' AGAATGCCAACGCAGATGAG 3'	57°C	136 pb
DDB1	5' CTTTGCTTGTTCTGACCGCC 3'	5' GCCAATGGTGAGGGTGCTAT 3'	62°C	160 pb
Cul4A	5' ACAACTACACGCAGGACACG 3'	5' CCTGGACGTGGTCTTCACAG 3'	62,5°C	180 pb

sens dans un volume final de 15 μ L. Chaque échantillon est réalisé en duplicat. Pour chaque couple d'amorces, une gamme standard est réalisée en utilisant les ADNc dilués en cascade du 1/10^{ème} au 1/100000^{ème}. Cette gamme permet de calculer l'efficacité de l'amplification de la PCR. Les couples d'amorces utilisés ont une efficacité comprise entre 1,85 et 2,05.

A l'aide du thermocycleur CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), le taux d'incorporation du SYBR® Green est évalué après chaque cycle d'un programme généralement composé d'une étape initiale d'activation de l'enzyme à 90°C durant 3 minutes, puis de 40 cycles comprenant une étape à 90°C pendant 15 secondes, une étape de 20 secondes à la température d'hybridation des amorces (**Tableau 2**) et une étape d'élongation à 72°C pendant 15 secondes. La spécificité de l'hybridation ainsi que la formation de dimères sont évaluées par une dernière étape permettant la création d'une courbe de fusion. Une augmentation de 1°C par seconde est réalisée allant de 50°C à 90°C et une mesure de la fluorescence est effectuée toutes les secondes. Le niveau d'expression relatif de chaque transcrit est calculé selon la méthode Pfaffl grâce à la détermination des ΔCq et à la normalisation avec deux gènes de référence que sont UBB (Ubiquitine B) et RPLP0 (Ribosomal Protein Large P0) (Pfaffl, 2001). Brièvement, l'efficacité de la PCR est élevée à la puissance ΔCq , c'est-à-dire la différence entre les Cq de l'échantillon et celui de l'échantillon de référence, du gène d'intérêt divisé par la moyenne des gènes de référence.

$$\frac{(Efficacité_{Gène\ intérêt})^{\Delta Cq}}{[(Efficacité_{UBB})^{\Delta Cq} + (Efficacité_{RPLP0})^{\Delta Cq}]/2}$$

II.2. Au niveau traductionnel

Le niveau de l'expression génique au niveau traductionnel est analysé par Western blotting.

II.2.1. Extraction de protéines totales

Les cellules décollées par l'action de la trypsine ou par grattage sont centrifugées à 200 g, pendant 5 minutes, puis lavées en tampon PBS. Le culot cellulaire est ensuite lysé dans un tampon Tris-HCl à 10 mM pH 7,4 contenant 5 mM EDTA, 1% de Triton X-100 ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche) pendant 30 minutes sur la glace. Après une

centrifugation de 20 minutes à 17000 g et à 4°C, les protéines totales contenues dans le surnageant sont collectées et conservées à -80°C.

II.2.2. Extraction de protéines cytoplasmiques et nucléaires

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de Pétri de 100 mm de diamètre. Après lavage dans une solution de PBS, les cellules sont grattées dans la même solution, puis centrifugées à 18000 g, durant 5 minutes à 4°C. Le culot de cellules est resuspendu dans 300 µL de tampon Hepes à 10 mM pH 7,9 contenant 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,5 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF), 1 mM d'orthovanadate de sodium (Na_3VO_4) et des inhibiteurs de protéases, puis incubées sur glace pendant 15 minutes. Après addition de 20 µL de NP-40 à 10%, soit à 0,6% final, le lysat est agité pendant 10 secondes par vortex, puis centrifugé à 5600 g durant 5 minutes à 4°C. Le surnageant correspondant à la fraction cytoplasmique est récupéré, puis conservé à -80°C. Le culot contenant les noyaux est lavé à deux reprises avec le même tampon de lyse ne contenant pas de NP-40, puis resuspendu dans 50 µL de tampon Hepes à 20 mM pH 7,9 contenant 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM Na_3VO_4 et des inhibiteurs de protéases. La lyse des noyaux est effectuée à 4°C, sous agitation, durant 30 minutes. Après une centrifugation à 15000 g durant 10 minutes à 4°C, le surnageant correspondant à la fraction nucléaire est conservé à -80°C.

II.2.3. Extraction de protéines liées à la chromatine

Les protéines liées à la chromatine sont extraites selon la méthode de Shechter et collaborateurs (Shechter *et al.*, 2007). Brièvement, les cellules sont cultivées dans des boîtes de pétri de 150 mm de diamètre. Après trypsination, les cellules sont comptées, puis resuspendues à raison de 10^7 cellules dans 1 ml de tampon d'extraction Hepes à 10 mM pH 7,9 contenant 10 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,34 M de Sucrose, 10% de Glycérol et 0,2% de NP-40. Les cellules sont incubées durant 10 minutes sur la glace avant d'être centrifugées à 6500 g, durant 5 minutes à 4°C. Le surnageant correspondant à la fraction cytoplasmique est collecté dans un nouveau tube et conservé à -80°C. Le culot est quant à lui lavé à deux reprises dans le même tampon d'extraction ne contenant pas de NP-40, avant d'être resuspendu dans 1 ml d'un tampon de lyse contenant uniquement 3 mM d'EDTA et 0,2 mM d'EGTA. Après agitation par vortex à trois reprises pendant 10 secondes et ceci toutes les 10 secondes, le lysat est incubé sous

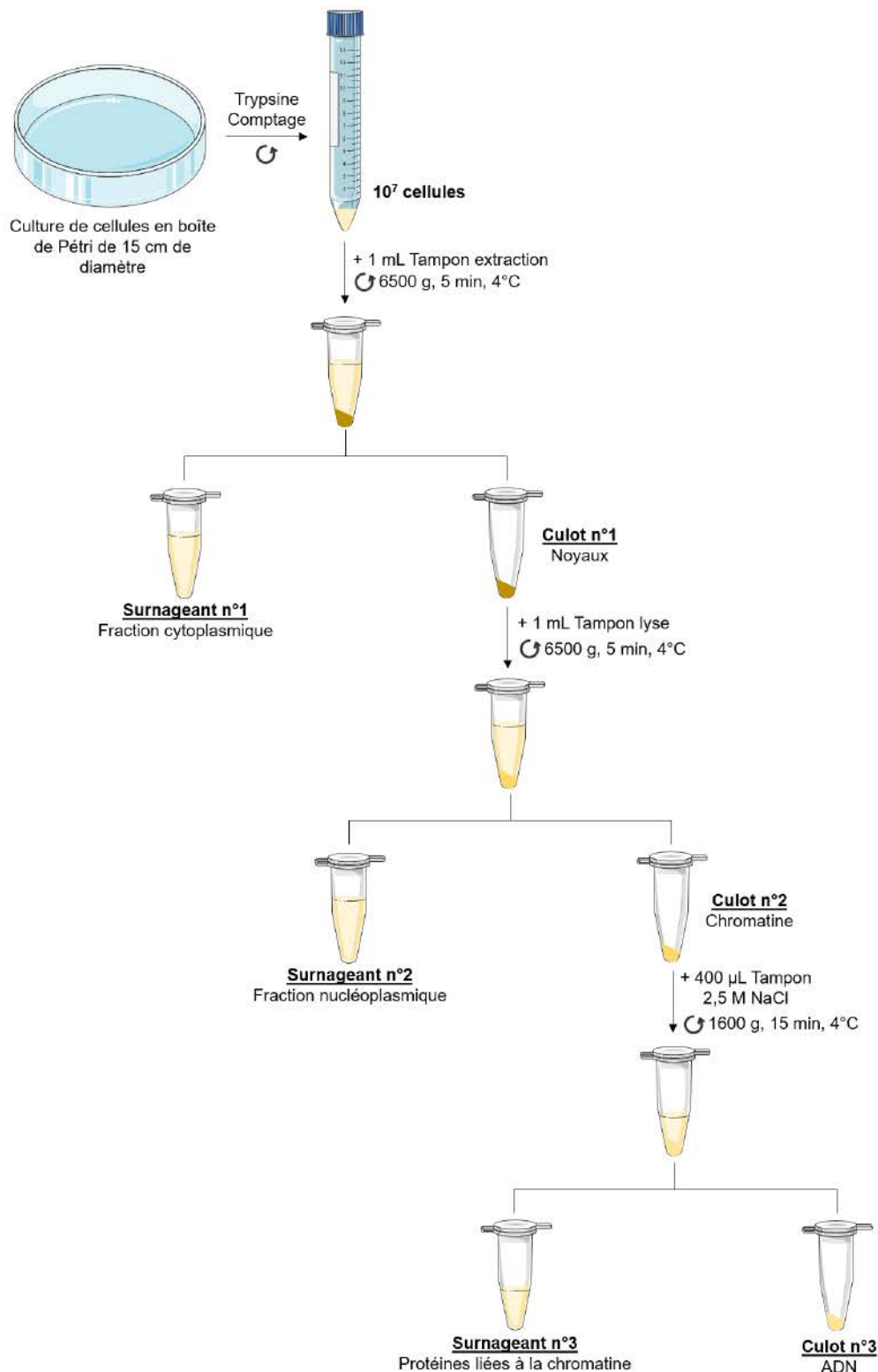


Figure 32 : Représentation schématique des différentes étapes d'extraction de protéines liées à la chromatine. L'extraction des protéines est réalisée grâce à plusieurs centrifugations successives. Les protéines liées à la chromatine sont extraites à l'aide d'un tampon fortement concentré en sel (2,5 M NaCl). Les surnageants 1 à 3 contenant respectivement, les protéines cytoplasmiques, nucléoplasmiques et liées à la chromatine sont conservées à -80°C.

rotation à 4°C pendant 30 minutes. Après une centrifugation à 6500 g, durant 5 minutes et à 4°C, le surnageant correspondant à la fraction nucléoplasmique est collecté et conservé à -80°C, tandis que le culot est repris dans 400 µL d'un tampon Tris-HCl à 50 mM pH 8,0 contenant 2,5 M de NaCl et 0,05% de NP-40. Ce dernier culot est mis sous agitation par vortex durant 2 minutes et incubé sous agitation douce à 4°C durant 30 minutes. Après sa centrifugation à 16000 g, pendant 15 minutes à 4°C, le surnageant obtenu et correspondant aux protéines liées à la chromatine est placé dans un boudin de dialyse ayant un seuil de 3500 kDa (Thermo Scientific). Après une dialyse réalisée durant 2 heures contre une solution de Tris-HCl à 10 mM pH 8,0 contenant 1 M de NaCl, puis à nouveau durant 2 heures contre le même tampon mais cette fois sans NaCl, les protéines liées à la chromatine sont ensuite conservées à -80°C (**Figure 32**).

II.2.4. Dosage des protéines

La concentration protéique est déterminée par spectrophotométrie à 595 nm selon la méthode de Bradford, en utilisant une gamme étalon correspondant à différentes concentrations connues de BSA et grâce à une solution commerciale de dosage (Bradford Protein Assay™, BioRad).

II.2.5. Electrophorèse et transfert sur membrane

Les échantillons protéiques sont dénaturés par chauffage à 100°C durant 5 minutes dans un tampon Tris-HCl pH 6,8 à 62,5 mM contenant de 2% de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), 0,1 M de dithiotréitol (DTT), 20% de saccharose et du bleu de bromophénol, d'après la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970). Les échantillons dénaturés sont déposés dans un gel de concentration 5% de polyacrylamide réalisé dans un tampon Tris-HCl pH 6,8 à 0,25 mM contenant 0,1% de SDS. Les protéines sont ensuite séparées dans un gel de migration contenant 10% de polyacrylamide et 0,1% de SDS dans un tampon Tris-HCl pH 6,8 à 0,375 mM. La migration est réalisée durant 1 heure 45 à 120 V. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de Nylon de polyvinylidifluoride (PVDF) entre deux piles de papier Whatman et deux éponges imbibées par du tampon Tris-HCl à 48 mM pH 7,9 contenant de la Glycine à 38 mM, 0,037% de SDS et 20% d'éthanol. Le transfert est réalisé à 12 V constant durant 16 heures.

Tableau 3 : Liste répertoriant l'ensemble des anticorps utilisés pour les techniques de Western blotting, d'immunoprécipitation de chromatine et de co-immunoprécipitation de protéines. Pour chaque anticorps, le fournisseur, la référence commerciale, l'origine animale dans lequel il a été développé, la dilution optimale utilisée en conditions expérimentales, ainsi que la taille de la protéine mise en évidence lors de la détection immunologique sont renseignés dans ce tableau.

Nom	Fournisseur	Référence	Origine animale	Dilution	Taille
Western Blot					
DDB2	Abcam	ab77765	Lapin	1/1000 ^{ème}	48 kDa
DDB1	Santa-Cruz	sc-25367	Lapin	1/1000 ^{ème}	127 kDa
Cul4A	Abcam	ab72548	Lapin	1/1000 ^{ème}	89 kDa
IκBα	Sigma	I0505	Lapin	1/1000 ^{ème}	37 kDa
Sp1	Active Motif	39058	Lapin	1/1000 ^{ème}	105 kDa
hnRNP K et J	Immuquest	IQ269	Souris	1/2500 ^{ème}	66 kDa
p50	Santa-Cruz	sc-7178	Lapin	1/1000 ^{ème}	50 kDa
p300	Santa-Cruz	sc-585	Lapin	1/1000 ^{ème}	300 kDa
Myc tag	Abcam	ab9106	Lapin	1/1000 ^{ème}	/
Tubuline	Abcam	ab52866	Lapin	1/2500 ^{ème}	50 kDa
Anti-Rabbit IgG Peroxydase	Sigma	A9169	Chèvre	1/10000 ^{ème}	
Anti-Mouse IgG Peroxydase	Sigma	A9044	Lapin	1/10000 ^{ème}	
Anti-Goat IgG Peroxydase	Sigma	A5420	Lapin	1/10000 ^{ème}	
ChIP et co-IP					
DDB2	Santa-Cruz	sc-25386	Lapin		
DDB1	Santa-Cruz	sc-25367	Lapin		
Cul4A	Abcam	ab72548	Lapin		
p300	Santa-Cruz	sc-585	Lapin		
hnRNP K et J	Immuquest	IQ269	Souris		
Sp1	Active Motif	39058	Lapin		
IgG Contrôle	Diagenode	C15400001	Lapin		

II.2.6. Détection immunologique

Après transfert des protéines, la membrane est saturée à l'aide d'un tampon de blocage TBS (50 mM Tris-HCl pH 7,5 contenant 150 mM de NaCl) contenant 5% (p/v) de lait écrémé en poudre, durant 30 minutes à température ambiante et sous agitation. La membrane est ensuite incubée une nuit à 4°C en présence de l'anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt et dilué dans un tampon TBS à 2,5% de lait écrémé en poudre. La membrane est ensuite lavée à 5 reprises durant 5 minutes dans du tampon TBS contenant 1% (v/v) de Tween20. Puis la membrane est incubée en présence d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase durant 45 minutes dans un tampon TBS contenant 2,5% (p/v) de lait écrémé en poudre. La liste des anticorps primaires et secondaires, ainsi que leurs dilutions optimales d'utilisation, sont référencées dans le **tableau 3**. Après 5 lavages de 5 minutes dans un tampon TBS-Tween, le niveau d'expression des protéines est révélé grâce à la détection de l'activité de la peroxydase à l'aide du substrat chimioluminescent (Clarity™ ECL Substrate, BioRad). La révélation est faite à l'aide d'une caméra équipant le ChemiDoc Touch (Biorad). Dans le cas d'une détection immunologique de plusieurs protéines ayant un poids moléculaire relativement proche, les anticorps sont décrochés après la révélation au chemidoc en incubant la membrane dans une solution de « stripping » (Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffet, Thermo Scientific) durant 15 minutes à température ambiante.

III. Analyse d'interactions protéiques par co-immunoprécipitation

Les cellules sont lavées avec du PBS, puis lysées dans un tampon composé de Tris-HCl pH7,3 à 50 mM contenant 5mM d'EDTA pH8, 5mM de Na₃VO₄, 5 mM de NaPP, 5mM de NaF, 150 mM de NaCl, 1% de NP-40 et un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Le lysat est obtenu après 30 minutes d'incubation dans le tampon de lyse et sur la glace, puis après une centrifugation à 16000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant ainsi récupéré est utilisé pour isoler par immunoprécipitation des interactions de protéines. Pour cela, des billes magnétiques tapissées de protéine A/G (BioRad) ou d'anticorps reconnaissant spécifiquement la partie constante, des immunoglobulines de souris (Dynabeads™ M-280 Sheep Anti-Mouse, Invitrogen) sont lavées à 4 reprises dans une solution de PBS contenant 0,1% de Tween20. Afin d'éliminer un grand nombre de protéines non spécifiques, 500 µL de lysat cellulaire sont

Tableau 4 : Liste des sondes oligonucléotidiques utilisées pour la technique de « DNA pull-down ». Une molécule de biotine et de triéthylène glycol (TEG) sont ajoutées à une extrémité 5' de la sonde oligonucléotidique double brin. La molécule TEG est utilisée afin de diminuer l'encombrement stérique qui pourrait être occasionné par la fixation de complexes protéiques sur les sondes. Les séquences oligonucléotidiques sont issues des promoteurs des gènes *NFKBIA* et *SOD2* contenant le site de fixation pour la protéine DDB2. La sonde contrôle possède une séquence ne contenant pas de site de fixation pour des facteurs de transcriptions connus.

Nom sonde	Séquence
<i>NFKBIA</i>	5' Biotine - TEG - TCGTCCTTCCCCTTAGA 3' 3' ACGCAGGAAGGGGAATCT 5'
<i>SOD2</i>	5' Biotine - TEG - GCCGAGGCTAGCCTGCAGCCTCCT 3' 3' CGGCTCCGATCGGACGTCGGAGGA 5'
Neutre (contrôle)	5' Biotine - TEG - CAGGACTTCTGCAATACCG 3' 3' GTCCTGAAGACGTTATGGC 5'

incubés avec 1 mg de billes magnétiques durant 1 heure à 4°C sous agitation. Le surnageant contenant les protéines non retenues par les billes magnétiques (fraction réactive) est ensuite mis en contact durant une nuit sous agitation à 4°C en présence de l'anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt (DDB2, hnRNP K et J ou l'IgG contrôle) (**Tableau 3**). Une partie de la fraction réactive est conservée à -80°C et servira de contrôle positif ou « Input » ou encore fraction non immunoprécipitée. Sur la fraction réactive et immunoprécipitée, 1 mg de billes tapissées de protéine G ou d'anticorps anti-souris est ajouté et incubé durant 1 heure, à 4°C, sous agitation. Après 5 lavages avec 500 µL de tampon de lyse décrit précédemment, les billes magnétiques sont reprises dans 30 µL de tampon de Laemmli et incubées à 100°C durant 15 minutes. Après avoir ôté les billes magnétiques, le surnageant est analysé par Western blotting comme décrit dans la partie II.2.

IV. Analyse de l'interaction et de l'activité des protéines sur l'ADN

IV.1. Analyse par « DNA pull-down »

La technique du DNA pull-down est réalisée en utilisant des billes magnétiques tapissées de Streptavidine (Dynabeads™ M-280 Streptavidin, Invitrogen) et de sondes oligonucléotidiques couplées à de la biotine, synthétisées par la société Eurogentec.

IV.1.1. Fixation des sondes oligonucléotidiques et saturation

Une suspension de 200 µg de billes magnétiques est mélangée volume à volume au tampon de lavage (Tris-HCl à 10 mM pH 7,5, 1 mM EDTA et 2 M NaCl) sous agitation durant 5 minutes à température ambiante. Après élimination du surnageant en présence d'un aimant, ces billes sont ensuite reprises à une concentration finale de 5 µg/µL dans le tampon de lavage et mises en présence, sous agitation et durant 10 minutes à température ambiante, de 1 µg de sondes ADN oligonucléotidiques couplées à une molécule de biotine (**Tableau 4**) préalablement solubilisées dans de l'eau distillée. Après 3 lavages dans le même tampon, les billes tapissées des sondes oligonucléotidiques sont incubées durant 2 heures à température ambiante dans un tampon favorisant la fixation des protéines sur l'ADN, qui est composé de 10 mM Hepes pH 7,9, de 2 mM MgCl₂, de 0,4 mM EDTA, de 40 mM KCl, de 0,4 mM DTT, de 2 µg/ml d'acide poly(désoxyinosinique-désoxycytidylique) (poly dI-dC) (Roche), d'un cocktail

d'inhibiteurs de protéases (Roche), de 1 mM de Na_3VO_4 et de 1 % (p/v) de BSA. Après 3 lavages successifs dans ce même tampon contenant 0,1 % (p/v) de BSA, les billes tapissées des sondes oligonucléotidiques sont prêtes pour l'étape suivante.

IV.1.2. Obtention et analyse des protéines retenues sur les sondes oligonucléotidiques

Les billes tapissées de sondes oligonucléotidiques, resuspendues dans 500 μL du tampon précédemment décrit ci-dessus et contenant 0,1 % BSA sont incubées avec 10, 25, 50, 75 ou 100 μg de protéines nucléaires, durant 2 heures à 4°C et sous agitation. En utilisant un aimant, les billes sont ensuite lavées à trois reprises dans le tampon de fixation contenant 0,1% BSA, puis à nouveau trois fois dans ce même tampon mais contenant cette fois 100 mM de KCl afin d'éliminer les fixations non spécifiques de protéines. L'élution des protéines finalement retenues sur les billes est réalisée en plaçant ces dernières dans du tampon de Laemmli. Les protéines éluées sont ensuite chauffées à 100°C durant 5 minutes, puis séparées dans un gel de polyacrylamide à 10%.

Une 1^{ère} analyse de ces protéines retenues sur les sondes oligonucléotidiques est réalisée en colorant le gel d'acrylamide au bleu de Coomassie colloïdal, qui est suivie de leur identification par spectrométrie de masse. Après fixation durant 2 heures dans une solution contenant 40% d'éthanol absolu et 3% d'acide phosphorique (H_3PO_4), puis 3 lavages successifs pendant 10 minutes dans des bains d'eau distillée, le gel est incubé dans une solution de coloration contenant 20% de méthanol, 10% de H_3PO_4 , 0,75 M de sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) et 0,12% de Bleu de Coomassie G250 (Thermo Scientific). Après développement de la coloration, le gel est lavé à plusieurs reprises avec de l'eau distillée jusqu'à élimination de la couleur bleue présente sur le fond du gel. A l'aide de la caméra équipant le Chemidoc Touch, le gel coloré est ensuite photographié. Il s'en suit une expérience de spectrométrie de masse qui a été réalisée à deux reprises. Une l'a été par le Dr Christine Schaeffer (LSMBO UMR7178 CNRS) à la plateforme de protéomique Strasbourg Grand-Est de l'Institut Pulridisciplinaire Hubert Curien à l'aide d'un spectromètre de masse LC-MS/MS QQQ6490 (Agilent Technologies). Cette analyse donne pour chaque protéine identifiée le nombre de peptides identifiés ainsi que le pourcentage de recouvrement. La seconde analyse a été réalisée par le Dr Jean-Baptiste Vincourt (IMoPA UMR7065 CNRS) au niveau de la plateforme de protéomique IBSLOR située à Vandoeuvre-lès-Nancy à l'aide d'un spectromètre de masse

Tableau 5 : Liste des sondes oligonucléotidiques utilisées pour la technique du retardement sur gel. Les parties complémentaires des amorces sens et anti-sens s'hybrident. Les extrémités simple brin complémentaires sont synthétisées par élongation en utilisant l'ADN polymérase du fragment de Klenow mise en présence des 4 nucléotides dont le [αP^{32}]CTP qui est radioactif. La sonde oligonucléotidique double brin ainsi obtenue est radiomarquée.

Nom sonde	Séquence
<i>NFKB1A</i>	5' CCACAGTGCGTCCTTCCCCTTAG 3' 3' AGGAAGGGGAATCTTCA 3'
<i>SOD2</i>	5' GAGGCTAGCCTGCAGCCTCCTTTC 3' 3' CGATCGGACGTCGGAGGAAAGAGG 3'

MALDI TOF/TOF Autoflex speed IV (Bruker Daltonics). Pour une protéine donnée, les résultats obtenus donnent un score en fonction du nombre de peptides différents, libérés et identifiés.

Une 2^{ème} analyse des protéines retenues sur les sondes oligonucléotidiques est réalisée par Western blotting comme décrit précédemment dans le paragraphe II.2.

IV.2. Analyse par retardement sur gel

IV.2.1. Marquage des sondes oligonucléotidiques

Les sondes oligonucléotidiques utilisées pour la technique de gel retard ont été synthétisées dans le commerce (Eurogentec). Les séquences sont présentées dans le **tableau 5**.

L'hybridation des parties complémentaires de chaque oligonucléotide (10 ng) est réalisée dans le tampon d'incubation de l'ADN polymérase du fragment de Klenow (Promega) pendant 10 minutes sur glace. Les extrémités simples brin sont synthétisées par élongation en présence de 0,5 mM de dATP, de dGTP, de dTTP, de [α P³²]CTP et de 10 unités d'enzyme, à 37°C pendant 30 minutes. La sonde oligonucléotidique double brin radiomarquée est séparée des nucléotides libres par filtration sur une matrice de séphadex G25 (Amersham, UK). La radioactivité émise par chaque sonde est appréciée à l'aide d'un compteur Geiger.

IV.2.2. Electrophorèse et autoradiographie

Une quantité de 1 ng de sonde radiomarquée est incubée sur la glace en présence de 5 µg de protéines nucléaires extraites, comme décrit dans le paragraphe II.2.1.2, dans un tampon Hepes 10 mM pH 7,9 contenant 2 mM de MgCl₂, 0,4 mM d'EDTA, 16 mM de KCl, 0,4 mM de DTT et 1 µg de poly-(dI-dC), l'ensemble complété par de l'eau stérile pour arriver à un volume final de 10 µL. Après 30 minutes d'incubation sur la glace, 2 µL de bleu de dépôt 6X, correspondant au même tampon d'incubation contenant 10% de glycérol et du bleu de bromophénol, sont ajoutés au volume réactionnel. Le complexe ADN-protéine est ensuite analysé par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide à 5% préparé dans du tampon TBE 0,5X (45 mM de Tris, 45 mM de Borate et 1 mM d'EDTA pH 8). Les échantillons déposés suivent une migration constante à 110V durant 30 minutes dans le tampon TBE 0,5X. Le gel est ensuite séché sous vide à 80°C durant 20 minutes, puis exposé sur un film photographique à -80°C (X-Omat, Kodak). La nature du complexe retardé sur gel est également précisée en

incubant durant 1 heure un anticorps spécifique sur la glace après le temps d'incubation des protéines nucléaires avec la sonde radiomarquée (super retard sur gel).

IV.3. Analyse par immunoprécipitation de chromatine

Cette technique est réalisée en utilisant le kit commercial ChIP-IT™ Express Enzymatic (Active Motif).

IV.3.1. Extraction et digestion de la chromatine

Les cellules sont cultivées jusqu'à 70% de confluence dans des boîtes de pétri de 150 cm². Après un lavage au PBS, ces cellules sont fixées pendant 10 minutes à température ambiante dans une solution contenant 1% de formaldéhyde dans du milieu de culture RPMI-1640 en absence de sérum. Après un lavage avec du PBS froid, la fixation des cellules est arrêtée à l'aide d'une solution de PBS contenant 125 mM de Glycine durant 5 minutes à température ambiante. Les cellules fixées sont ensuite récupérées par grattage dans une solution froide de PBS contenant 2 mM de PMSF, puis centrifugées à 720 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot cellulaire est resuspendu dans un tampon de lyse fourni dans le kit commercial contenant 2% d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC) et 2 mM de PMSF ajoutés extemporanément. La lyse des cellules se déroule à 4°C durant 30 minutes, favorisée en utilisant un homogénéiseur de Dounce à 10 reprises. Après une centrifugation à 2400 g, à 4°C durant 10 minutes, le culot correspondant aux noyaux est ensuite incubé dans un tampon de digestion, fourni par le kit, dans lequel sont ajoutés 2% de PIC et 2 mM de PMSF. Après une pré-incubation de 5 minutes à 37°C, le cocktail enzymatique permettant la digestion de la chromatine est ajouté à une concentration de 200 U/ml aux noyaux et laissé en incubation durant 7 minutes. La digestion de la chromatine est arrêtée par l'ajout de 0,5 M d'EDTA froid. Lors d'une centrifugation à 18000 g pendant 10 minutes à 4°C, la chromatine présente dans le surnageant est récupérée et congelée à -80°C jusqu'à son utilisation.

Une fraction de 50 µl de la préparation de chromatine est utilisée dans le but de doser l'ADN. Pour cela, cette fraction est mélangée à 100 µl de phénol basique et 100 µl de chloroforme, puis le mélange est homogénéisé vigoureusement avant d'être centrifugé à 14000 g durant 10 minutes. L'ADN libéré dans la phase aqueuse est récupéré, puis précipité une nuit à -20°C dans 500 µl d'éthanol absolu contenant 120 mM final d'acétate de sodium (C₂H₃NaO₂). Un culot d'ADN est ensuite obtenu après une centrifugation durant 10 minutes à 4000 g et à 4°C. Après un lavage dans 500 µl d'éthanol 70% et une centrifugation à 14000 g, à 4°C pendant

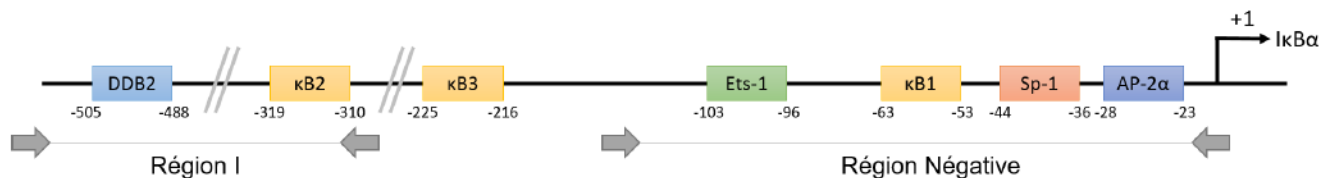


Figure 33 : Représentation schématique de la localisation des différentes régions amplifiées par PCR pour la ChIP sur le promoteur du gène *NFKB1A* codant la protéine *IκBα*.

Tableau 6 : Liste répertoriant l'ensemble des amorces utilisées pour la technique de ChIP. Les séquences des amorces utilisées pour chaque région au sein de chaque promoteur sont indiquées dans le sens 5' vers 3'. Les conditions de température d'hybridation « *T_m* » et la taille de l'amplicon sont indiquées dans leur colonne respective.

Nom	Amorce Sens	Amorce Anti-Sens	T _m	Taille
Promoteur <i>NFKB1A</i>				
Région I	5' AAACCCCAGGGAAAGAAGGCAC 3'	5' GGTCACGGACAGGGAAC TTT 3'	66°C	141 pb
Région Négative	5' GGCTCATCGCAGGGAGTTTC 3'	5' AAACGCTGGCTGGGGATT 5'	66°C	158 pb
Promoteur <i>SOD2</i>				
Région I	5' CCGTACCAACTCCAC 3'	5' CTTGCCGTACACCC 3'	46°C	144 pb

5 minutes, le culot d'ADN est séché et dissout dans 30 µl d'eau stérile, avant d'être dosé par spectrométrie (Nanodrop 2000, LabTech). Cet ADN servira d'Input (contrôle interne) lors de l'analyse par PCR.

IV.3.2. Immunoprécipitation de la chromatine

Chaque immunoprécipitation est réalisée dans un volume final de 100 µl contenant 25 µl de billes magnétiques portant la protéine G, 10 µl d'un tampon d'incubation (ChIP Buffer 1), 14 µg de chromatine, 1 µl de PIC, 2 µg d'anticorps dirigé contre les protéines d'intérêt (**Tableau 3**), et de l'eau distillée. L'échantillon est placé une nuit à 4°C sous agitation. Après élimination du surnageant, les billes sont lavées une fois dans le tampon d'incubation (ChIP Buffer 1) puis trois fois avec le tampon de lavage (ChIP Buffer 2) fourni par le fabricant. Les billes sont ensuite resuspendues dans 50 µl de tampon d'élution (Elution Buffer AM2) et incubées durant 15 minutes à température ambiante sous agitation. La chromatine est ensuite débarrassée des protéines grâce à l'ajout de 50 µl d'un tampon fourni dans le kit commercial (Reverse Cross-link Buffer) et une incubation à 65°C d'une nuit. Les échantillons sont ensuite incubés 1 heure à 37°C après l'ajout de protéinase K. Enfin, l'action de la protéinase K est arrêtée par l'ajout d'une solution contenant des inhibiteurs de celle-ci (Proteinase K Stop Solution). L'ADN de chaque échantillon est ensuite purifié par phénol/chloroforme suivant la même méthode que pour la fraction servant d'Input (partie IV.3.1).

IV.3.3. Analyse par PCR quantitative en temps réel

L'analyse par PCR quantitative en temps réel est réalisée de la même manière que décrite dans le paragraphe II.1.2.2. Les régions amplifiées par qPCR sont représentées sur la **figure 33** ainsi que les amorces sur le **tableau 6**. Une gamme standard est réalisée à partir de l'échantillon Input avec 50 ng, 5 ng, 0,5 ng et 0,05 ng d'ADN. Le produit d'immunoprécipitation de chaque échantillon est amplifié par PCR à partir de 3 µL. Les niveaux d'enrichissement sont exprimés par rapport à ceux mesurés pour les IgG contrôles. La méthode de calcul intègre les valeurs de Cq dans la formule $2^{-\Delta\Delta Cq}$ pour les différents anticorps utilisés et pour les IgG contrôles. Le Δ correspond à la différence de Cq entre l'anticorps d'intérêt et l'IgG contrôle.

Tableau 7 : Liste des plasmides utilisés pour les expériences de gène rapporteur. L'ADNc codant la luciférase Firefly est placé sous le contrôle de différents promoteurs indiqués dans la colonne correspondante. Le plasmide pRL permet une expression constitutive de la luciférase Renilla et sert de témoin interne de transfection.

Nom	Promoteur	Vecteur	Luciferase	Provenance
Prom <i>NFKB1A</i> Luc	<i>NFKB1A</i>	pGL3 basic	Firefly	Laboratoire (Ennen <i>et al.</i> , 2013)
Prom <i>SOD2</i> Luc	<i>SOD2</i>	pGL3 basic	Firefly	Laboratoire (Minig <i>et al.</i> , 2009)
Prom <i>BCL2</i> P1 + P2 Luc	<i>BCL2</i> –3934 à ATG	pBlueScript	Firefly	Addgene #15381
Prom <i>BCL2</i> P2 Luc	<i>BCL2</i> –1281 à ATG	pBlueScript	Firefly	Addgene #15382
pRL-SV40	SV-40	pRL	Renilla	Promega

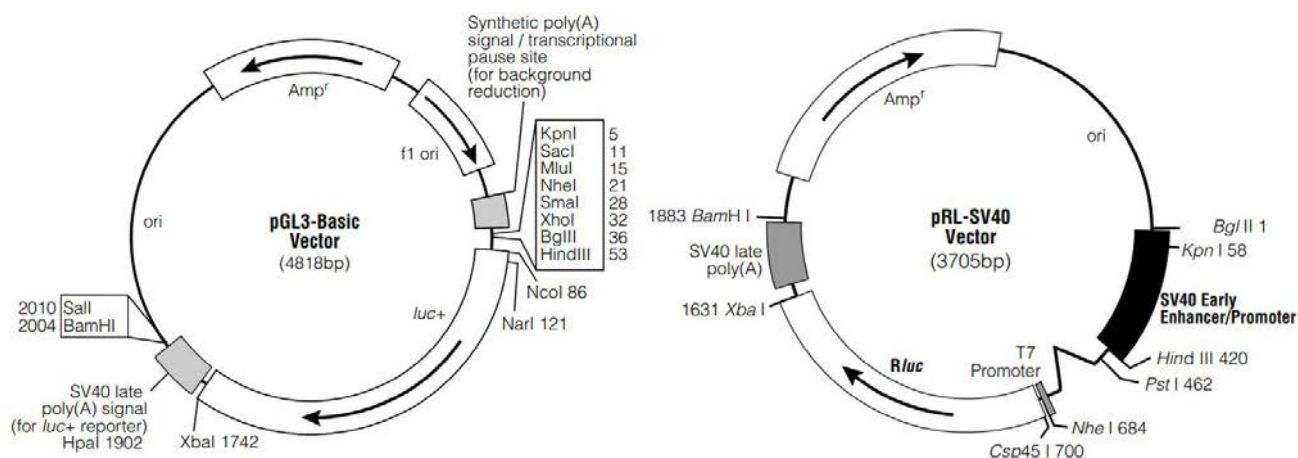


Figure 34 : Représentation schématique des plasmides pGL3 basic et pRL-SV40 utilisés pour les expériences de gène rapporteur.

IV.4. Analyse de l'activité transcriptionnelle des protéines nucléaires par gène rapporteur

IV.4.1. Présentation des plasmides

Afin de déterminer dans les différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires, le niveau d'activité de promoteurs de gènes, différents vecteurs rapporteurs codant la luciférase Firefly sont placés sous le contrôle de ces promoteurs et sont répertoriés dans le **tableau 7**.

Un plasmide contenant l'ADNc du gène codant la luciférase Renilla sous le contrôle du promoteur CMV permettant son expression constitutive est utilisé comme contrôle interne des expériences de transfection (**Figure 34**).

IV.4.2. Mutagenèse dirigée du promoteur du gène codant la protéine *IκBα*

IV.4.2.1. Mutagenèse dirigée par PCR

Des mutations ponctuelles ont été réalisées par mutagenèse dirigée au niveau de différentes séquences connues et capables de fixer des facteurs de transcription, au niveau du site AP-2α en position -25 (mutants MutAP-2), du site Sp1 en -36 (MutSp1), enfin du site Ets-1 en -96 (MutEts1). Le mutant au niveau du site de fixation de DDB2 (MutDDB2) était déjà disponible et analysé au laboratoire. Ces mutants ont été réalisés par mutagenèse dirigée par PCR, en utilisant des amorces mutées qui sont répertoriées dans le **tableau 8**. Un double mutant MutSp1– MutDDB2 a été également réalisé en utilisant comme matrice d'ADN le plasmide MutSp1 et les amorces mutées correspondantes à MutDDB2, respectivement.

Afin d'amplifier tout le vecteur et d'intégrer des mutations sur le promoteur du gène *NFKB1A*, la réaction de PCR est réalisée en présence de 10 ng d'ADN plasmidique, de 0,4 U de polymérase iProof (Bio-Rad), de 200 μM de chaque amorce, de 10 μL de tampon GC 5X (tampon utilisé pour des amplifications de séquences riches en G et C) contenant du MgCl₂ (7,5 mM) et 3% de DMSO. Les réactions d'amplification par PCR sont réalisées dans un thermocycleur (Thermal cycler, Bio-Rad) dans un volume final de 50 μl. Le cycle de PCR comprend une étape de dénaturation initiale à 98°C pendant 3 minutes, suivie de 35 cycles comprenant chacun une étape de dénaturation à 98°C pendant 10 secondes, d'hybridation durant 30 secondes et d'élongation de 1 minute et 30 secondes à 72°C. Une élongation finale est réalisée à 72°C durant 7 minutes.

Tableau 8 : Liste des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée du promoteur du gène codant la protéine *IκBα*. La mutation sur le site de fixation du facteur de transcription est marquée en rouge sur 2 nucléotides dans les colonnes correspondantes. La position de cette mutation, indiquée entre parenthèse, est située par rapport au site d'initiation de la transcription.

Nom	Site muté	Amorce Sens	Amorce Anti-Sens
MutSp1	Sp1 (-36)	5' TGACC AA GCCCCAGAGAATCC 3'	5' GGCTCGGGGAATTTCCTCAAG 3'
MutAP-2	AP-2α (-25)	5' AATC AA CAGCCAGCGTTTATAGG 3'	5' TCTCTGGGGCGGGGTCATG 3'
MutEts-1	Ets-1 (-96)	5' CCCTAGCAGCAG AA ACGAAGCC 3'	5' GGAAAAAGAAGCCTAAACCC 3'
MutDDB2	DDB2 (-505)	5' TCGTCCTTCCC AG TATAAGTCTG 3'	5' ACTGTGGTTAGGGGGCTGC 3'

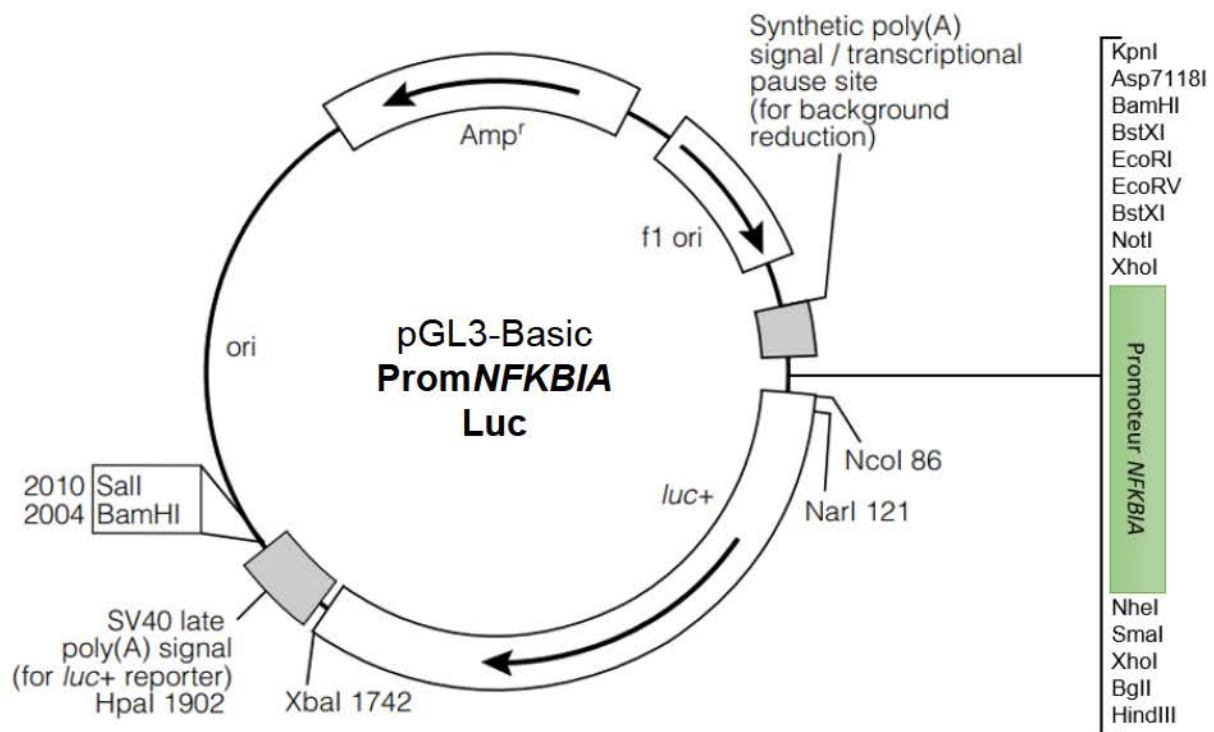


Figure 35 : Représentation schématique du plasmide pGL3 basic contenant le promoteur proximal du gène *NFKBIA*. Le promoteur du gène codant la protéine *IκBα* a été cloné dans le plasmide pGL3 Basic entre les sites de restriction *KpnI* et *XbaI*.

IV.4.2.2. Transformation bactérienne

Afin d'obtenir des quantités importantes des différentes constructions plasmidiques pour transfecter nos lignées cellulaires, des transformations bactériennes sont réalisées. Pour cela, 10 ng d'ADN plasmidique sont mis en présence de 50 µL de bactéries compétentes *Escherichia coli* DH5α, obtenues dans le commerce (Invitrogen). Le mélange est laissé sur glace 10 minutes. Un choc thermique est effectué en plaçant les échantillons 30 secondes à 42°C, puis refroidis sur glace pendant 2 minutes. Une pré-culture de bactéries est incubée 1 heure à 37°C sous agitation dans 1 mL de milieu LB préchauffé à 37°C. Ensuite, 100 µL de bactéries sont étalés sur des boîtes de pétri LB/agar contenant de l'ampicilline (50 µg/mL). Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C.

IV.4.2.3. Vérification et préparation de l'ADN plasmidique

Quelques colonies présentes sur les boîtes sont mises en culture dans du milieu LB/ampicilline (50µg/mL) et préchauffées à 37°C, durant 8 heures (pré-culture). Une fraction correspondant au dixième de la pré-culture est cultivée dans 5 mL de milieu LB/ampicilline (50 µg/mL) durant 16 heures maximum sous agitation. L'ADN plasmidique est ensuite extrait à l'aide du kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega). Brièvement, les bactéries sont lysées et l'ADN est purifié et élué sur colonne, avant d'être dosé par spectrophotométrie.

La présence de l'insert dans le plasmide est vérifiée par digestion enzymatique sur l'ensemble des colonies prélevées. L'ADN plasmidique est digéré par l'enzyme XhoI (10U/µL, Fermentas) qui coupe de part et d'autre de l'insert (**Figure 35**). Pour cela, 1 µg d'ADN est placé en présence de 1µL d'enzyme et de 2µL de tampon 10X FastDigest® (100mM Tris-HCl pH 8,5, 100mM MgCl₂, 1M KCl, 1 mg/mL BSA, Fermentas). Une électrophorèse sur gel d'agarose 1% (p/v) est ensuite réalisée avec les produits de digestion.

Les colonies bactériennes contenant les plasmides ayant intégré l'insert sont remises en culture, en présence de 150 mL de milieu LB contenant de l'ampicilline (50 µg/mL), durant 16 heures à 37°C sous agitation. L'ADN plasmidique est ensuite extrait et purifié à l'aide du kit « HiSpeed Plasmid Purification » (Qiagen). Rapidement, les bactéries sont centrifugées à 6800 g, à 4°C durant 15 minutes. Les culots sont resuspendus dans 6 mL de tampon de suspension contenant de la RNase. Les bactéries sont ensuite lysées avec 6 mL de tampon de lyse puis le lysat est filtré sur colonne Qiafilter afin d'éliminer les débris cellulaires. La lyse est neutralisée en ajoutant 6 mL de tampon de neutralisation et le lysat filtré est placé sur une résine échangeuse

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des différentes conditions expérimentales utilisées pour la technique de gène rapporteur selon les lignées cellulaires.

Lignée cellulaire	Ensemencement (plaque 24 puits)	Temps après ensemencement pour transfection	Durée de transfection
HEK 293	10 ⁵ cellules/puits	24 heures	24 heures
MCF-7	1,5.10 ⁵ cellules/puits	2 heures	24 heures
T47D	1,5.10 ⁵ cellules/puits	2 heures	24 heures
MDA-MB231	2.10 ⁵ cellules/puits	2 heures	24 heures

d'anion sur laquelle l'ADN plasmidique se fixe. L'ADN est élué dans un tampon de forte concentration saline, puis concentré et précipité avec de l'isopropanol, avant d'être dissout dans 500 µL d'eau distillée stérile et dosé par spectrophotométrie.

IV.4.2.4. Séquençage

Les constructions plasmidiques et la présence des mutations ont été vérifiées par séquençage dans le commerce (Eurofins).

IV.4.3. Transfection transitoire à l'aide d'un agent polycationique

Les cellules sontensemencées en plaques 24 puits. L'ensemencement ainsi que le temps de culture avant transfection des différentes cellules sont répertoriés dans le **tableau 9**. La transfection est réalisée à l'aide d'un agent de transfection, le poly-éthylènimine linéaire (JetPEI PolyPlus Transfection), 24 heures après l'ensemencement des cellules dans le cas des HEK 293 et 2 heures pour les cellules cancéreuses mammaires. Les cellules sont co-transfectées avec 800 ng du vecteur pGL3-prom*NFKBIA* contenant le promoteur proximal du gène codant IκBα muté ou non en amont du gène codant la luciférase Firefly et 200 ng du plasmide contrôle pRL contenant le gène codant la luciférase Renilla. Cette quantité d'ADN plasmidique est ajoutée à du NaCl à 150mM pour un volume final de 50µL. Dans un autre tube, 2µL de JetPEI est ajouté à 50µL de NaCl à 150mM. Les deux solutions sont ensuite mélangées et incubées 30 minutes à température ambiante. Dans chaque puits contenant les cellules, le mélange ADN plasmidique et JetPEI est ajouté goutte à goutte.

IV.4.4. Mesure des activités luciférase

La mesure des activités luciférase est réalisée à l'aide du kit commercial Dual-Luciferase Reporter® System Assay (Promega). Après 24 heures, les cellules sont lavées avec du D-PBS puis lysées dans le tampon Passive Lysis Buffer pendant 30 minutes, sous agitation à température ambiante. Le lysat (10 µL) est placé ensuite dans une plaque 96 puits et 50 µL de substrat de l'enzyme luciférase Firefly (LARII) est ajouté. Le niveau de luminescence émise par la luciférase Firefly, en Unité Relative de Lumière, est quantifié à l'aide d'un lecteur de plaque Victor X (Perkin Elmer). Un même volume d'une solution permettant l'arrêt de la réaction et l'activation de la luciférase Renilla (Stop and Glo® Reagent) est ajouté et la mesure

Tableau 10 : Liste des vecteurs d'expression utilisés pour surexprimer une protéine d'intérêt. L'ADNc codant la protéine d'intérêt est placé sous le contrôle du promoteur CMV ou RSV afin d'assurer son expression constitutive.

Nom	Protéine	Promoteur	Vecteur	Provenance
pCDNA DDB2 MycHis	DDB2-MycHis	CMV	pCDNA 3.1 (+) MycHis B	Laboratoire d'accueil
RSV Sp1	Sp1	RSV	pBlueScript	Addgene #12098
pCDNA Sp1	Sp1	CMV	pCDNA 3.1 (+)	Laboratoire d'accueil
pXJ41	hnRNP K et J	CMV	pXJ	Dr. Isabelle Behm-Ansmant (IMoPA UMR7065 CNRS)
Vecteur Vide	/	CMV	pCDNA 3.1 (+)	Laboratoire d'accueil

Tableau 11 : Liste des amorces utilisées pour le sous-clonage des ADNc codant DDB2 et Sp1. Les séquences des amorces sont répertoriées ainsi que leur température d'hybridation (T_m). Pour les couples d'amorces utilisés pour le sous clonage, les séquences des sites de restriction sont indiquées en bleu et la séquence codante des ADNc est soulignée.

Nom	Amorce Sens	Amorce Anti-Sens	T _m
cDNA DDB2 Stop -	5' TAA GGTACC ACAAGGAGGACGCGATGGCT 3'	5' GCA TCTAGA ATCTTCCGTGTCTGGCTTCCTC 3'	65°C
cDNA Sp1	5' TAA GGTACC CCCCCATGGATGAAATGACA 3'	5' GCA TCTAGA AATCAGAAGCCATTGCCACTG 3'	63°C

de la luminescence émise par la luciférase Renilla est réalisée. L'activité relative du promoteur est alors calculée en réalisant le ratio de la luminescence émise par la luciférase Firefly sur celle émise par la Renilla, prenant en compte ainsi l'efficacité de la transfection.

V. Effet de la surexpression de protéines d'intérêt sur l'expression génique

V.1. Les vecteurs d'expression

Les vecteurs plasmidiques d'expression utilisés lors de ces travaux, répertoriés dans le **tableau 10**, permettent la surexpression des protéines Sp1, hnRNP K et J, et DDB2 portant une étiquette MycHis qui correspond à 8 acides aminés représentant un épitope de c-Myc et plusieurs Histidines successives. Le plasmide permettant la surexpression des protéines hnRNP K et J a été gracieusement fourni par le Dr Isabelle Behm-Ansmant (IMoPA, UMR7065 CNRS).

*V.1.1. Construction du plasmide pCDNA 3.1(+)**MycHis B** contenant l'ADNc de DDB2*

Dans le but de réaliser des expériences de mutagenèse dirigée sur l'ADNc codant la protéine DDB2, ce dernier a été sous-cloné dans un plasmide permettant l'expression d'une protéine portant une étiquette MycHis. Pour cela, l'ADNc codant la protéine DDB2 a été amplifié par PCR en utilisant des amorces dont l'anti-sens ne porte pas de codon stop (**Tableau 11**) afin de permettre l'expression de la séquence codant l'étiquette. La PCR est réalisée en présence de 100 ng de plasmide contenant l'ADNc de DDB2, 10 µL de tampon HF iProof 5X, 200 µM de chaque amorce, 200 µM de dNTPs et 0,4 U d'enzyme iProof DNA polymérase. La réaction est réalisée dans un thermocycleur avec une étape initiale à 98°C durant 3 minutes, puis 30 cycles comprenant chacun une étape de dénaturation à 98°C durant 15 secondes, une étape d'hybridation à 65°C durant 30 secondes et une étape d'élongation à 72°C durant 3 minutes et 30 secondes. L'amplification est terminée par une étape d'élongation finale à 72°C durant 10 minutes.

Le produit de PCR est soumis à une migration sur gel d'agarose, dont la bande correspondant à l'ADNc de DDB2 est extraite par la suite à l'aide du kit commercial Wizard®

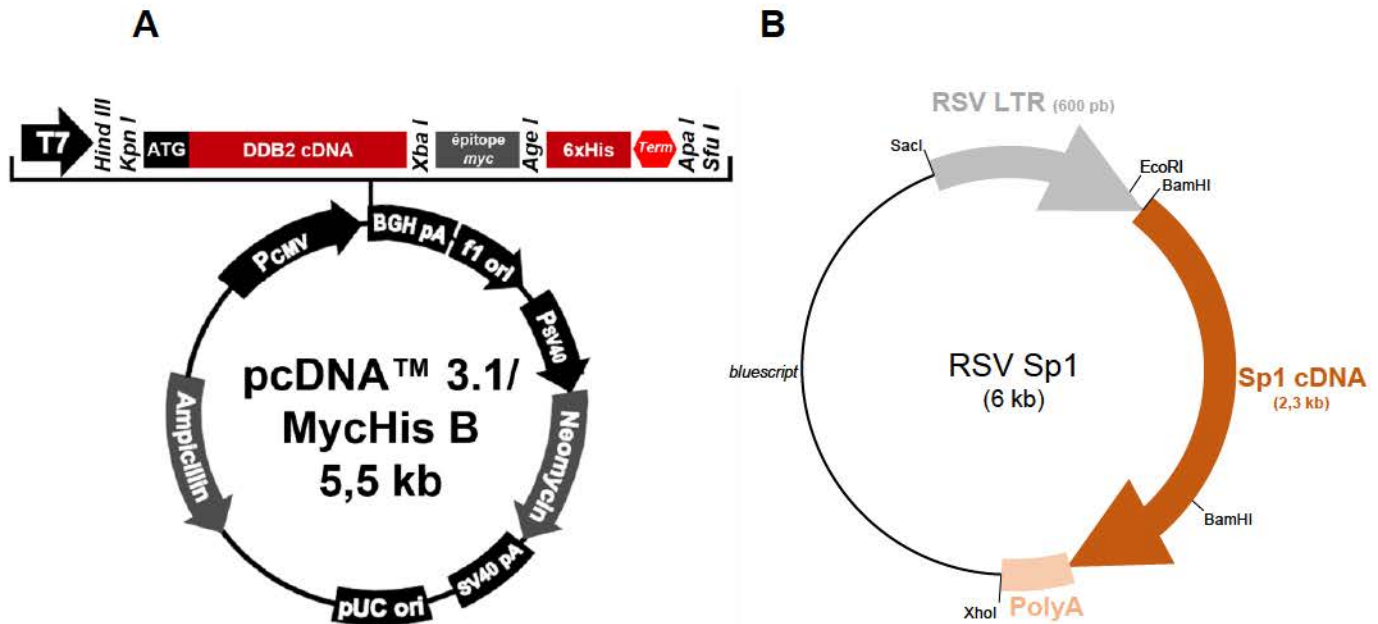


Figure 36 : Représentation schématique des vecteurs d'expression *pCDNA DDB2 MycHis* et *RSV Sp1*. (A) L'ADNc codant la protéine DDB2, ne possédant pas le codon stop, a été inséré dans le plasmide *pCDNA 3.1 (+) MycHis B* entre les sites *KpnI* et *XbaI*, afin de produire la protéine DDB2 portant une étiquette constituée d'une séquence d'acides aminés correspondante à c-Myc et de plusieurs Histidines (His). (B) Le *RSV Sp1* a été obtenu chez le fournisseur Addgene. Le plasmide *pCDNA 3.1 (+)*, dans lequel ont été clonés les ADNc codant les protéines DDB1 et Sp1, est similaire à celui présenté sans l'étiquette MycHis.

SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). L'ADN est dosé au Nanodrop et une quantité de 1 µg d'ADN est digéré avec les enzymes de restriction KpnI et XbaI (FastDigest) comme décrit dans le paragraphe IV.4.2.1. En parallèle, le plasmide pCDNA 3.1(+)*MycHis B* est digéré par les mêmes enzymes de restriction.

Une ligation de l'ADNc codant DDB2 dans le plasmide pCDNA 3.1 (+) *MycHis B* est réalisée à l'aide de 3 U de l'enzyme T4 LigaFast dans un volume final de 10 µL contenant 100 ng de vecteur, 75 ng d'ADNc et 1 µL de tampon 10X LigaFast. L'échantillon est incubé durant 15 minutes à température ambiante.

Suivant le protocole décrit dans la partie IV.4.2.2 à IV.4.2.4, des bactéries compétentes *E. Coli* DH5α sont transformées avec le produit de ligation. La présence de l'insert est vérifiée par digestion enzymatique et l'ADNc codant la protéine DDB2 est séquencé par la société Eurofins. Le plasmide obtenu est présenté dans la **figure 36**.

V.1.2. Construction du plasmide pCDNA 3.1(+) contenant l'ADNc de Sp1

Dans le but d'utiliser des plasmides comparables, l'ADNc codant le facteur de transcription Sp1 présent dans le plasmide RSV est placé dans le plasmide pCDNA 3.1 (+) en utilisant les mêmes conditions utilisées pour l'ADNc codant la protéine DDB2 (paragraphe V.1.1.). Les amorces utilisées sont répertoriées dans le **tableau 11**. Le sous clonage est réalisé selon le même protocole utilisé pour le sous-clonage de l'ADNc de DDB2 (paragraphe III.5.1).

V.2. Surexpression transitoire des protéines d'intérêt et conséquence sur l'expression génique

L'influence de la surexpression de la protéine d'intérêt est analysée sur le niveau d'expression du gène cible à la fois par RT-qPCR et sur l'activité du promoteur à l'aide d'un gène rapporteur, selon les mêmes protocoles décrits respectivement dans les paragraphes II.1.2 et IV.4.

Les cellules sontensemencées dans des boîtes de 3,5 cm de diamètre ou dans des plaques 6 puits à une densité de $5 \cdot 10^5$ cellules/puits. Après 2 heures de culture, les cellules sont transfectées à l'aide du JetPEI (voir paragraphe IV.3.3) avec 3 µg de vecteur d'expression portant l'ADNc qui code soit la protéine DDB2 étiquetée *MycHis*, les hnRNP K et J, et/ou Sp1.

En parallèle, des cellules sont transfectées avec 3 µg de vecteur d'expression vide comme contrôle. Les cellules sont récupérées par décollement à la trypsine après 48 heures de culture et les ARN totaux sont extraits comme décrit précédemment (paragraphe II.1.1). Le niveau d'expression des transcrits codant la protéine d'intérêt est vérifié par RT-qPCR comme décrit précédemment (paragraphe II.1.2).

Seules les conditions de transfection des cellules ont été modifiées pour l'analyse par gène rapporteur comme suit. Les cellules sontensemencées en plaques 24 puits comme décrit dans le **tableau 9**. Dans chaque puits, les cellules sont transfectées avec différents plasmides selon la répartition suivante :

- 100 ng de pRL-SV40 permettant une expression constitutive de la luciférase Renilla
- 400 ng de vecteur rapporteur permettant une expression de la luciférase Firefly sous le contrôle d'un promoteur
- 200 à 600 ng de vecteur d'expression contenant ou non l'ADNc codant une protéine d'intérêt.

L'activité du promoteur, mesurée par les activités luciférases, en présence de la protéine d'intérêt surexprimée, est comparée à celle obtenue lorsque les cellules sont transfectées avec un vecteur d'expression ne contenant pas d'ADNc.

VI. Analyse des bases de données

VI.1. Analyse de la base de données TCGA

A partir de données transcriptomiques disponibles dans la base de données TCGA (The Cancer Genome Atlas), la survie globale de patientes atteintes d'un cancer du sein est mise en relation avec l'expression des gènes *NFKBIA*, *SPI* et selon le statut ER des tumeurs mammaires. Cette analyse a été réalisée à partir de la plateforme BCIP (Breast Cancer Integrative Platform, <http://www.omicsnet.org/bcancer/database>).

VI.2. Alignement de séquences

Un alignement de séquences a été réalisé sur la plateforme du NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) à partir de la séquence du promoteur du gène *NFKBIA* humaine (NG_007571.1) afin de déterminer des sites de fixation de facteurs de transcription conservés

au cours de l'évolution. Les séquences trouvées les plus homologues ont été ensuite alignées avec le logiciel BioEdit, à l'aide de l'outil ClustalW Multiple Alignement.

VII. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont issus d'au moins trois expériences indépendantes. Ils sont représentés par la valeur moyenne $\pm$ l'erreur standard à la moyenne (SEM). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Graph Pad Prism. En fonction des expériences réalisées, un test *t* de Student ou un test ANOVA à un facteur est réalisé. Pour chaque test, la valeur de *p* est calculée et les résultats sont considérés comme significatifs lorsque *p* est inférieur à 0,05 ($p < 0,05$). Les valeurs significatives sont représentées par des étoiles où * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

RESULTATS

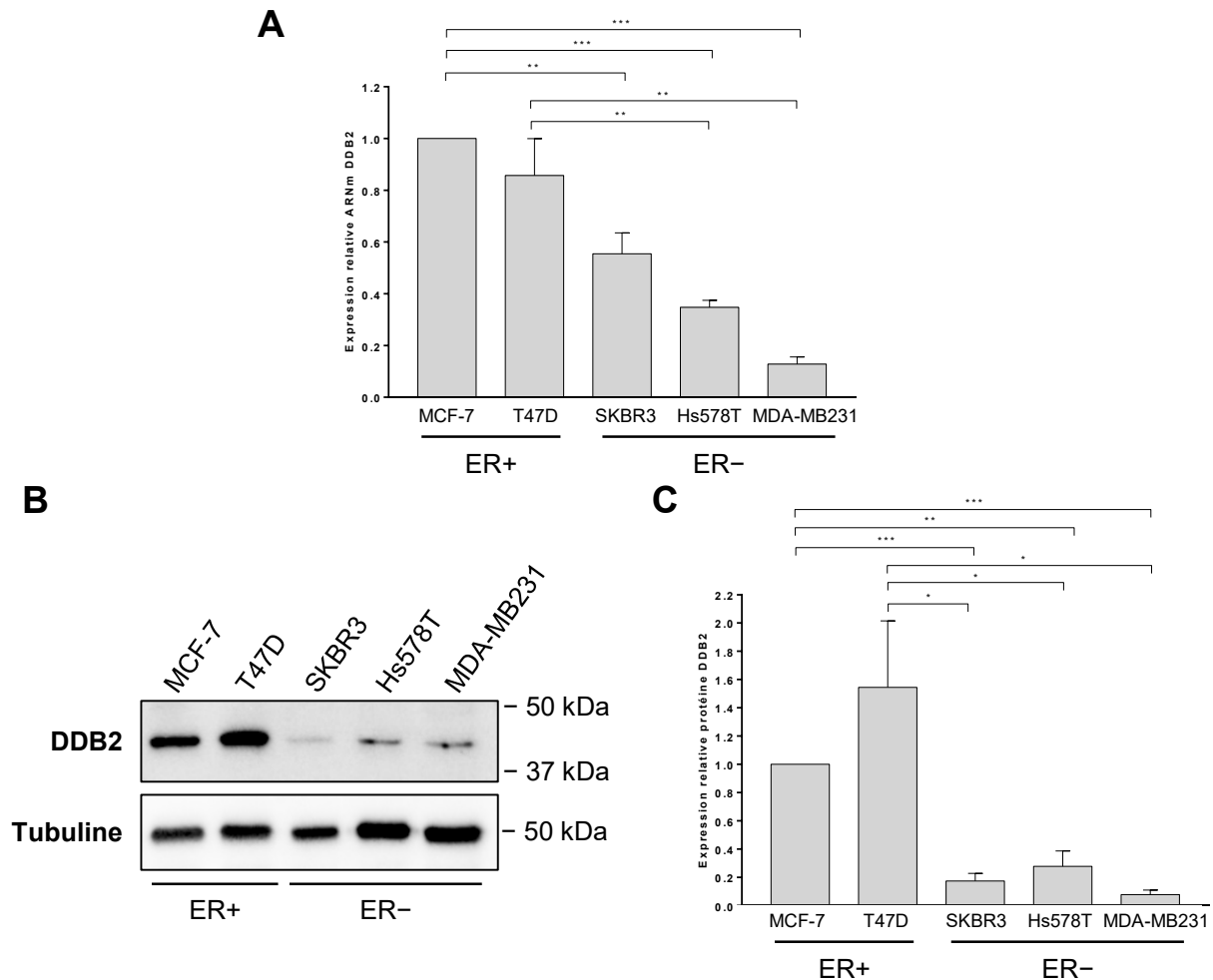


Figure 37 : Analyse de l'expression du gène DDB2 dans différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires. (A) Le niveau de transcrits codant la protéine DDB2 est évaluée par RT-qPCR dans les différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires (n=4). Ce niveau est normalisé par l'expression de deux gènes de référence : UBB et RPLP0. (B) Analyse par Western blotting du niveau d'expression de la protéine DDB2, à partir de protéines totales extraites des différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires. (C) Quantification du niveau d'expression de la protéine DDB2 normalisée par rapport à l'expression de la tubuline (n=3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

I. Recherche et identification de partenaires protéiques de DDB2 dans la régulation génique

Tout d'abord, nous avons vérifié l'expression de DDB2 dans les différentes lignées de cellules tumorales mammaires ER+ (MCF-7 et T47D) non invasives et ER- invasives et métastatiques (SKBR3, Hs578T et MDA-MB231) utilisées au cours de ce travail, à la fois aux niveaux transcriptionnel et traductionnel. Une analyse par RT-qPCR révèle que le niveau de transcrits codant la protéine DDB2 est significativement plus élevé dans les cellules ER+ en comparaison avec les cellules ER-. Tandis qu'il est comparable entre les cellules de la lignée MCF-7 et T47D, il est diminué d'un facteur 2 dans les cellules de la lignée SKBR3 et jusqu'à un facteur 5 dans la lignée MDA-MB231 (**Figure 37A**). De même, l'analyse par Western blotting révèle que le niveau d'expression de la protéine est le plus élevé dans les cellules T47D et le plus faible (jusqu'à 16 fois moins) dans les 3 lignées de cellules ER- (**Figure 37B et 37C**). Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment au laboratoire et nous assurent de l'intérêt d'utiliser ces cellules pour la suite de notre travail (Ennen *et al.*, 2013).

I.1. Mise au point de la technique de « DNA pull-down »

La recherche des partenaires protéiques de DDB2 dans la régulation de transcriptionnelle de ses gènes cibles a été réalisée par une approche de « DNA pull-down ». Cette technique utilise une sonde ADN biotinylée en 5' correspondante à la séquence identifiée sur laquelle DDB2 se fixe, selon la méthode décrite au paragraphe IV.1 de la section Matériel et Méthodes. Cette technique n'étant pas utilisée en routine au laboratoire, sa réalisation a nécessité plusieurs étapes de mise au point, et a été réalisée à l'aide d'une séquence ADN issue du promoteur du gène *NFKBIA*. La liaison de la protéine DDB2 sur le promoteur du gène *NFKBIA* a été montrée au laboratoire par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine et par retardement sur gel (Ennen *et al.*, 2013). Le site de fixation de la protéine DDB2, qui a été identifié dans la région promotrice du gène, correspond à une séquence de 8 nucléotides (TCCCCTTA). La fonctionnalité de ce site de fixation a été déterminée et confirmée par mutagenèse dirigée et par la méthode du gène rapporteur.

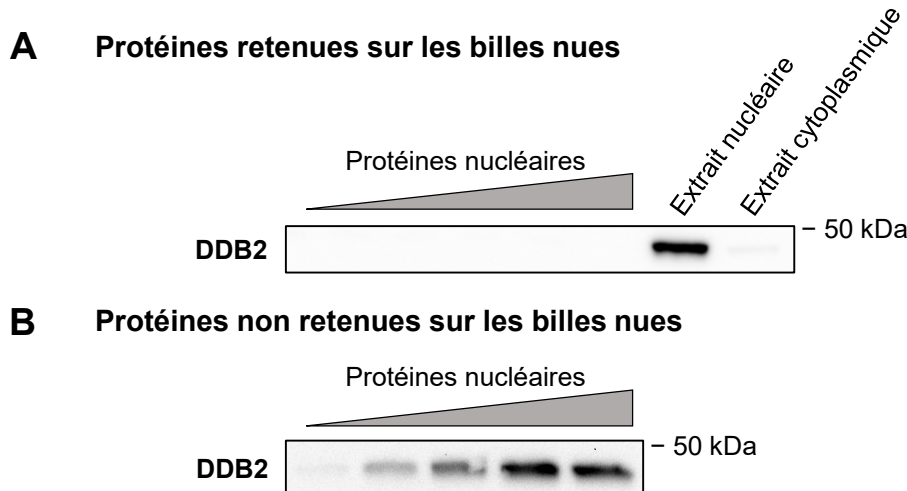


Figure 38 : Evaluation de la fixation aspécifique de DDB2 sur les billes magnétiques par « DNA pull-down ». (A) Des expériences de « DNA pull-down » sur des billes nues utilisant des quantités croissantes de protéines nucléaires extraites des cellules MCF-7 ont été réalisées (10, 25, 50, 75 ou 100 µg). La DDB2 éventuellement retenue sur les billes nues est ensuite recherchée par une analyse en Western blotting. Des extraits nucléaires et cytoplasmiques de cellules MCF-7 sont déposés en parallèle (50 µg) et utilisés comme contrôles. (B) La DDB2 est également recherchée par Western blotting dans la fraction de protéines non retenues sur les billes.

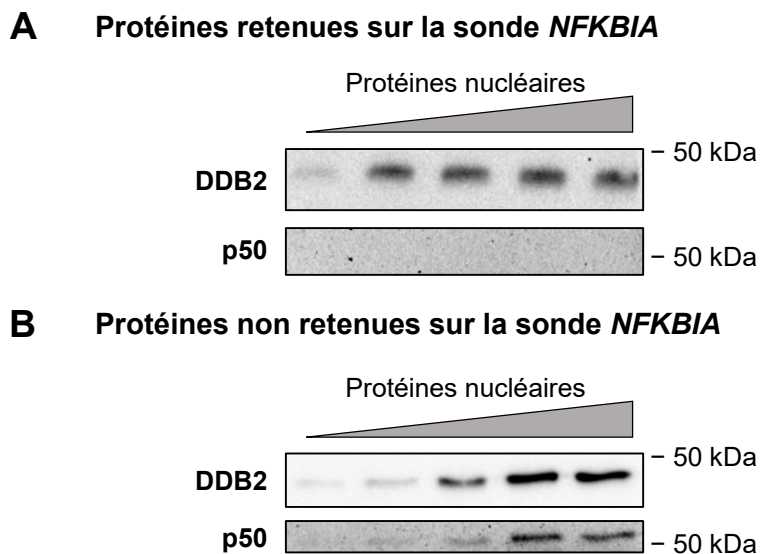


Figure 39 : Détermination de la quantité optimale de protéines nucléaires pour la technique de « DNA pull-down ». (A) Des expériences de « DNA pull-down » ont été réalisées avec 200 µg de billes magnétiques couplées à 1 µg d'oligonucléotide correspondant au site de fixation de DDB2 dans le promoteur du gène NFKBIA et mises en contact avec des quantités croissantes de protéines nucléaires (10, 25, 50, 75 ou 100µg). La fixation des protéines DDB2 et p50, sous-unité du complexe NF-κB, sur la sonde NFKBIA est mise en évidence par Western blotting en utilisant des anticorps polyclonaux spécifiques. (B) De la même manière, les protéines DDB2 et p50 non retenues sur la sonde NFKBIA sont révélées par Western blotting.

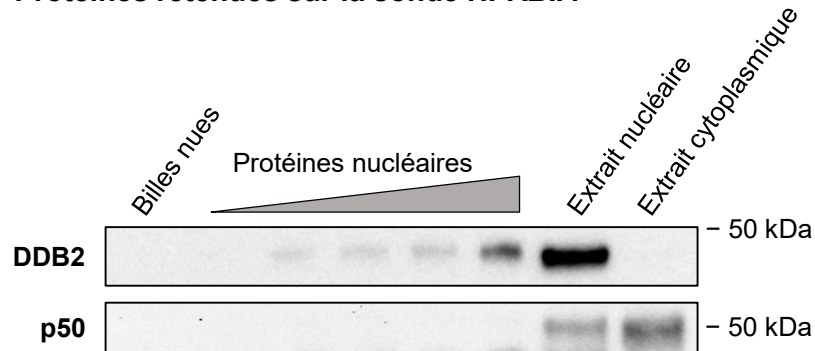
Pour les expériences de « DNA pull-down » nous avons fait synthétiser dans le commerce une sonde oligonucléotidique double brin, de 18 pb, couplé en 5' à une molécule de biotine et contenant la séquence cible de la protéine DDB2.

Nous avons décidé, pour les expériences de « DNA pull-down », d'utiliser les mêmes conditions expérimentales utilisées lors des expériences de retardement sur gel réalisées avec DDB2 sur sa séquence identifiée dans le promoteur du gène *NFKB1A* (Ennen *et al.*, 2013). En particulier, nous avons utilisé, pour piéger les complexes protéiques sur les sondes oligonucléotidiques, un tampon de liaison de même composition et contenant 40 mM de KCl. Le tampon de liaison comporte également une proportion 50 fois supérieure de poly(dI-dC) par rapport à la quantité de sonde oligonucléotidique. Le poly(dI-dC), en excès par rapport à la sonde d'intérêt, sert de compétiteur qui procure des sites non spécifiques afin d'absorber les protéines nucléaires pouvant se lier à n'importe quelle séquence d'ADN.

Après vérification de l'absence de fixation aspécifique de protéines sur les billes magnétiques seules (**Figure 38**), nous avons déterminé la quantité optimale de protéines nucléaires pouvant se fixer sur les billes magnétiques couplées à la sonde ADN. Pour ce faire, nous avons incubé des quantités croissantes d'extraits protéiques nucléaires de cellules MCF-7 (10 à 100 µg) avec 200 µg de billes couplées à 1 µg de sonde oligonucléotidique. Nous avons soumis les protéines retenues sur la sonde ADN à une migration sur gel de polyacrylamide puis à un Western blotting.

La présence de la protéine DDB2 dans les fractions récupérées est analysée par Western blotting. Les résultats indiquent que DDB2 est retenue par les billes couplées à la sonde ADN spécifique pour une quantité d'extrait nucléaire de 10 µg. Toutefois, l'augmentation de la quantité d'extrait nucléaire de 25 à 100 µg n'entraîne pas une augmentation de la quantité de DDB2 retenue contrairement à la fraction non retenue sur les billes, comme le révèle l'analyse obtenue en Western blotting (**Figure 39A**). Ces résultats suggèrent que les sites de fixation de DDB2 sur la sonde ADN couplée aux billes sont saturés dès 25 µg d'extrait nucléaire. Afin de vérifier la spécificité de la liaison de DDB2 sur la sonde, nous avons cherché la présence de la protéine p50, une sous unité du facteur de transcription NF-κB, sur les fractions éluées par Western blotting. Cette protéine est capable de se lier à l'ADN sur une séquence cible qui ne correspond pas à celle couplée aux billes magnétiques. Comme le montre la **figure 39A**, cette sous unité p50 n'est pas détectable dans les fractions protéiques retenues sur la sonde ADN couplée aux billes magnétiques, contrairement à la fraction non retenue (**Figure 39B**). Ceci

A Protéines retenues sur la sonde *NFKB1A*



B Protéines non retenues sur la sonde *NFKB1A*

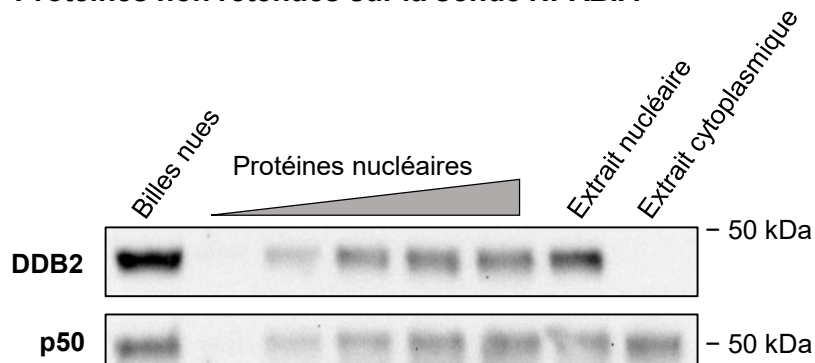


Figure 40: Détermination de la quantité optimale de protéines nucléaires pour la technique de « DNA pull-down » après un blocage avec 1% de BSA des billes couplées à une sonde ADN. (A) Les 200 μ g de billes magnétiques sur lesquelles 1 μ g d'oligonucléotide correspondant à la sonde *NFKB1A* est fixé, sont incubées dans un tampon contenant 1% de BSA avant d'être mises en contact avec des quantités croissantes de protéines (10, 25, 50, 75 ou 100 μ g). La fixation des protéines DDB2 et p50 sur la sonde *NFKB1A* est mise en évidence par Western blotting. (B) Les protéines DDB2 et p50 non retenues sur la sonde *NFKB1A* sont également révélées par Western blotting.

suggère que DDB2 semble retenue spécifiquement au niveau de la sonde oligonucléotidique couplée aux billes.

Afin d'éliminer toute fixation aspécifique de protéines sur les billes tapissées de sondes oligonucléotidiques, un blocage avec 1% de BSA (p/v) a été réalisé dans le tampon de fixation des protéines, après fixation des sondes oligonucléotidiques sur les billes magnétiques et avant l'addition de l'extrait nucléaire. La présence des protéines DDB2 et p50 est analysée ensuite par Western blotting. Cette fois, nous observons qu'une quantité croissante de DDB2 est retenue sur la sonde ADN couplée aux billes magnétiques, selon la quantité de protéines nucléaires utilisées (**Figure 40**). Tandis que DDB2 n'est pas détectable en Western blotting pour 10 µg de protéines nucléaires incubées avec les billes, elle est révélée de façon croissante pour 25 à 100 µg d'extraits utilisés (**Figure 40A**). Cependant, sa présence reste importante dans la fraction de protéines non retenues sur les billes (**Figure 40B**). Comme attendu, la protéine p50 est seulement révélée dans la fraction protéique non retenue sur les billes.

L'ensemble de ces expériences de mise au point du « DNA pull-down » ont permis de définir précisément les conditions expérimentales, à savoir l'utilisation de 200 µg de billes magnétiques couplées à 1 µg de sonde oligonucléotidique en présence de 1% (p/v) de BSA et de 100 µg de protéines nucléaires, et ont conduit aux résultats présentés dans la suite de ce travail.

I.2. Mise en évidence des protéines du complexe UV-DDB et p300

Plusieurs études, menées sur d'autres modèles cellulaires, ont montré l'activité de DDB2 sur l'expression de gènes cibles par interaction avec les protéines DDB1 et Cul4A du complexe UV-DDB (Roy *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014). De même, des travaux menés précédemment au laboratoire et par d'autres équipes ont mis en évidence l'interaction entre la DDB2 et la protéine p300, une histone acétyl transférase, à la fois dans les mécanismes de réparation de l'ADN et dans l'expression génique (Datta *et al.*, 2001; Ennen *et al.*, 2013). Nous avons donc recherché la présence de ces partenaires sur le promoteur des gènes cibles *NFKB1A* et *SOD2* à l'aide de la technique de « DNA pull-down ». A partir d'extraits nucléaires provenant de cellules MCF-7, les protéines retenues sur chaque sonde ADN biotinylée sont analysées par Western blotting, à l'aide d'anticorps spécifiquement dirigés contre les protéines DDB1, Cul4A et p300. Les résultats montrent que chacune des sondes ADN a retenu les protéines DDB2,

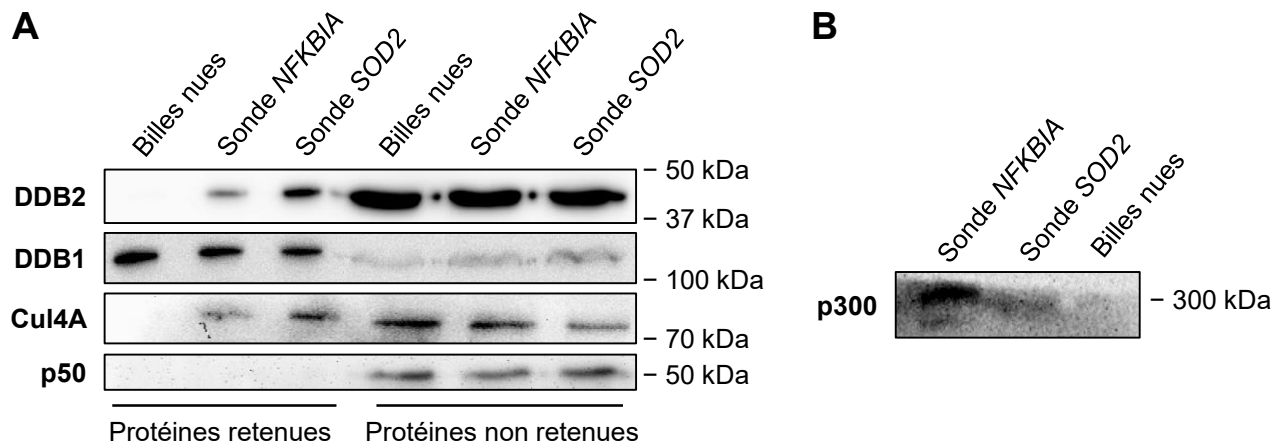


Figure 41 : Mise en évidence de protéines du complexe UV-DDB et de la protéine p300 par « DNA pull-down » sur des séquences du promoteur des gènes NFKBIA et SOD2 fixant DDB2. Parmi les protéines retenues ou non sur les séquences nucléotidiques de fixation de DDB2 identifiées au sein des promoteurs des gènes NFKBIA et SOD2, DDB2, DDB1, Cul4A (A) et p300 (B) sont mises en évidence par Western blotting à l'aide des anticorps polyclonaux spécifiques respectifs. La p50, également mise en évidence, est utilisée comme contrôle négatif. Les billes nues correspondent au témoin sans séquence d'ADN mais ayant été mises en contact avec des protéines nucléaires.

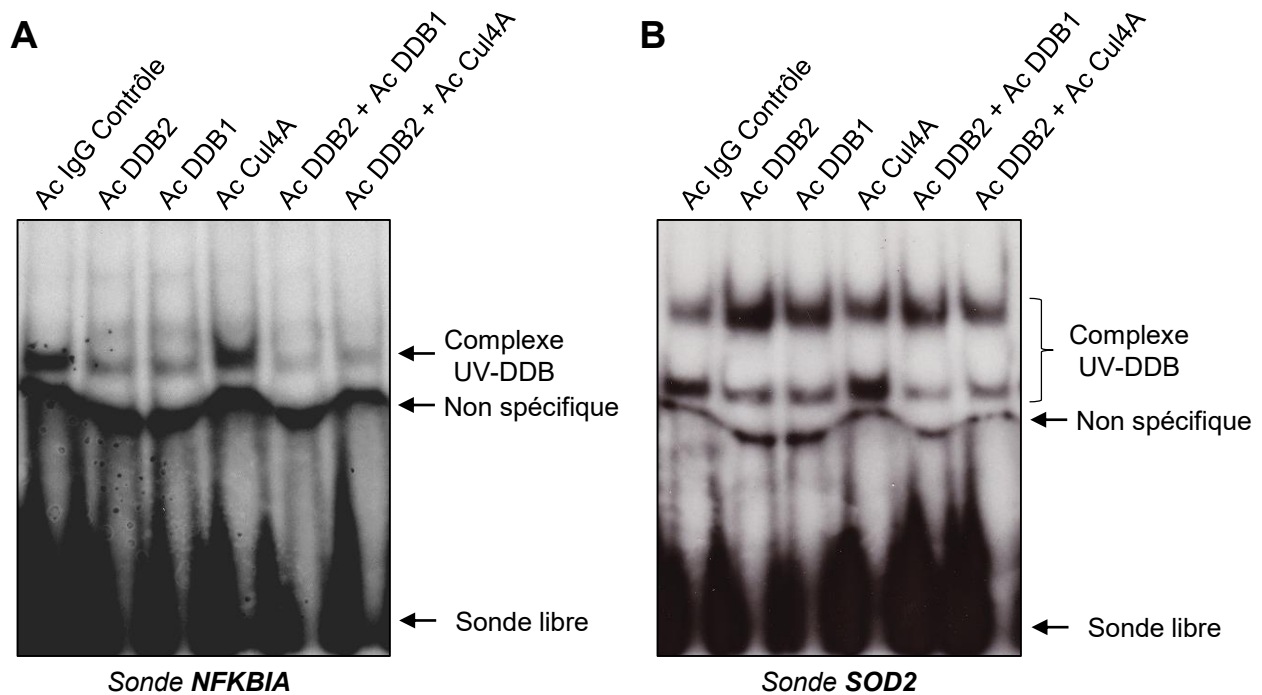


Figure 42 : Analyse par retard sur gel de la présence des protéines du complexe UV-DDB sur les séquences de fixation de DDB2 au sein du promoteur des gènes NFKBIA et SOD2. (A) Chaque oligonucléotide (sonde NFKBIA et SOD2) marqués au ^{32}P et correspondant au site de fixation de DDB2 au sein du promoteur des gènes NFKBIA et SOD2 sont utilisés pour des expériences de retard sur gel avec des protéines nucléaires (5 μg) extraites des cellules MCF-7. (B) La présence des protéines du complexe UV-DDB sur chaque oligonucléotide est recherchée par un super-retard, utilisant 5 μg de protéines nucléaires des cellules MCF-7, pré-incubées avec un ou deux anticorps (Ac) spécifiquement dirigé contre DDB2, DDB1 et Cul4A. La spécificité du résultat est montrée par un super-retard avec un anticorps non spécifique (IgG contrôle).

DDB1 et Cul4A (**Figure 41A**). Dans le cas de p300, seule la sonde correspondante à la séquence du promoteur *NFKB1A* a retenu cette protéine (**Figure 41B**).

I.3. Confirmation de la présence des protéines du complexe UV-DDB et de la protéine p300 sur les promoteurs des gènes cibles de DDB2

La présence des protéines DDB2 et DDB1 est confirmée par gel retard et par immunoprécipitation de chromatine. A l'aide des sondes ADN *NFKB1A* et *SOD2* rendues radioactives et mises en contact avec des extraits nucléaires de cellules MCF-7, un retard sur gel observé. Ce retard est par ailleurs fortement diminué au profit d'un super retard en présence des anticorps dirigés contre les protéines DDB2 et DDB1, par rapport aux immunoglobulines G non spécifiques (IgG Contrôle). En revanche, aucune diminution de l'intensité du retard et aucun super retard n'est observé en présence de l'anticorps dirigé contre la Cul4A, suggérant que cette protéine n'est pas détectable en présence de DDB2 et DDB1 par une approche gel retard (**Figure 42A et 42B**). Les expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont permis de confirmer la présence *in cellulo* des protéines DDB1 et Cul4A du complexe UV-DDB, sur la région cible sur laquelle se fixe DDB2 au sein du promoteur des gènes cibles *NFKB1A* et *SOD2*. La protéine p300 est, quant à elle, retrouvée dans la même région que les protéines du complexe UV-DDB mais uniquement sur le promoteur du gène *NFKB1A* (**Figure 43**).

La présence de DDB1, Cul4A et p300 en même temps que DDB2 sur le promoteur des gènes cibles *NFKB1A* et *SOD2* suggère que ces derniers aient une expression dépendante de l'interaction entre ces protéines.

A l'issue de ces résultats, nous avons vérifié l'expression des gènes codant DDB1 et Cul4A au niveau transcriptionnel par RT-qPCR dans les différentes lignées de cellules tumorales mammaires. Contrairement au gène codant DDB2, les résultats ne montrent pas de corrélation entre le niveau d'expression des gènes DDB1, Cul4A, le statut ER et l'agressivité des cellules cancéreuses mammaires. Ce niveau d'expression des deux gènes est comparable, significativement plus élevé dans les cellules T47D et Hs578T en comparaison avec les trois autres lignées de cellules et significativement plus faible pour la lignée SKBR3 (**Figure 44A et 44B**). Ces résultats révèlent que, contrairement aux autres gènes codant les protéines du complexe UV-DDB, seul le niveau d'expression du gène codant DDB2 semble marquer distinctement la différence entre les cellules ER+ non invasives et ER- invasives et métastatiques.

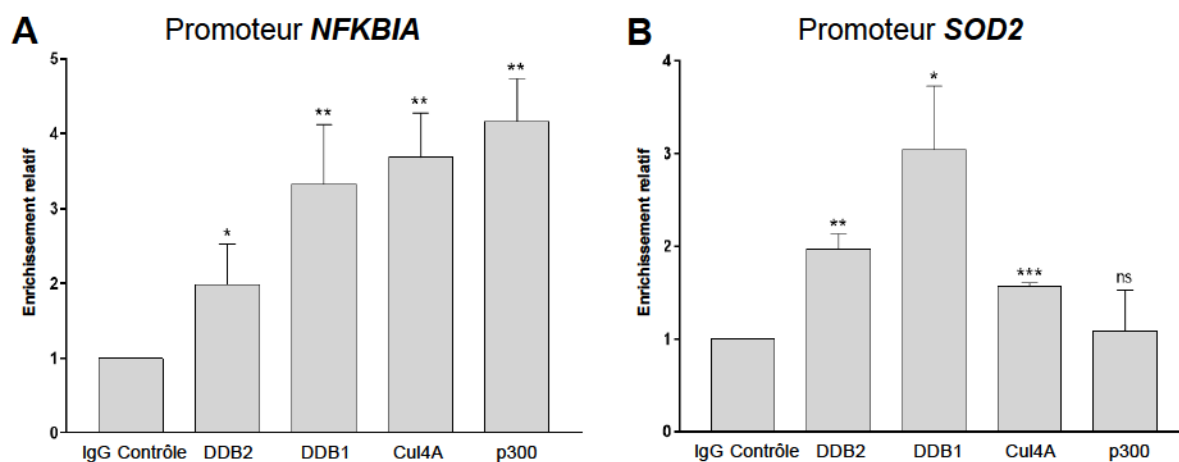


Figure 43 : Analyse de l'interaction des protéines du complexe UV-DDB et de p300 sur le promoteur des gènes *NFKBIA* et *SOD2* par immunoprécipitation de chromatine. L'ADN extrait de la chromatine immunoprécipitée à l'aide d'anticorps spécifiquement dirigés contre les protéines DDB2, DDB1, Cul-4A et p300 est amplifié par PCR en temps réel en utilisant un couple d'amorces qui encadre le site de fixation de DDB2 sur les promoteurs des gènes *NFKBIA* (A) et *SOD2* (B). Les résultats sont présentés en enrichissement relatif par rapport à celui obtenu avec la chromatine immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps non spécifique (IgG contrôle) et fixé à 1. (n=3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

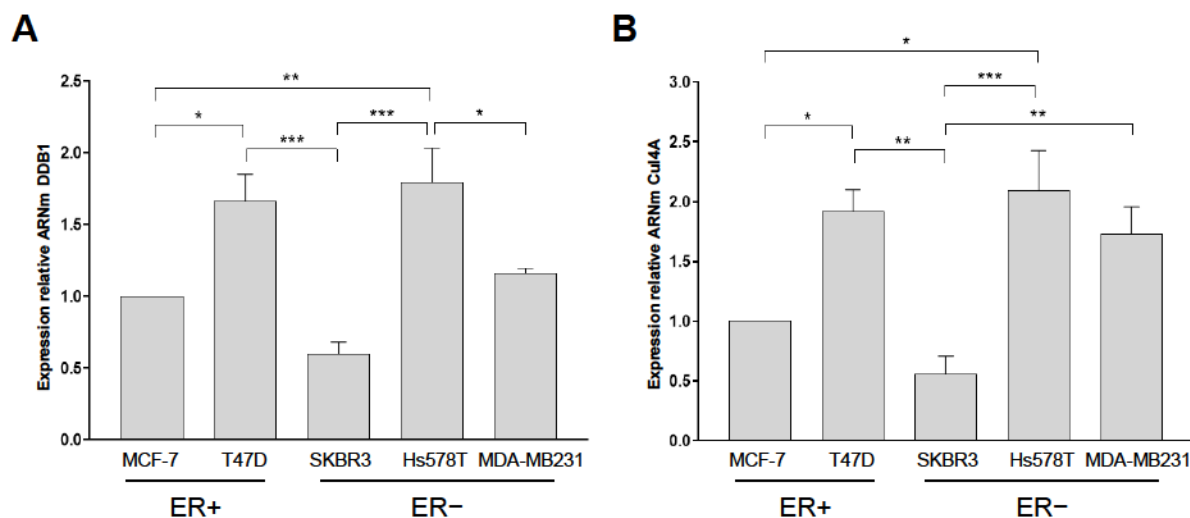


Figure 44 : Analyse de l'expression des gènes codant les protéines DDB1 et Cul-4A au niveau transcriptionnel dans différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires. Le niveau de transcrits codant DDB1 (A) et Cul-4A (B) est évalué par RT-qPCR dans les différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires (n=4), et normalisé par l'expression de deux gènes de référence : *UBB* et *RPLP0*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

Tableau 12 : Liste non exhaustive des protéines retenues par « DNA pull-down » sur les sondes ADN correspondantes aux séquences cibles de DDB2 dans les promoteurs des gènes NFKB1A et SOD2. La présence ou non des protéines sur les sondes ADN est signalé par un signe + (présence) ou – (absence).

Protéine	Sonde NFKB1A	Sonde SOD2
DDB2	+	+
DDB1	+	+
Cul4A	+	+
XRCC1, 5, 6	+	+
ERCC2	+	+
MSH2, 3	+	+
HMGB1	+	+
APEX1	+	+
PolB	+	+
PARP1	+	+
hnRNP K	+	–

II. Identification d'autres partenaires protéiques potentiels de DDB2

Dans le but d'identifier d'autres partenaires protéiques de DDB2 dans la régulation de l'expression des gènes *NFKB1A* et *SOD2*, une analyse par « DNA pull-down » couplée à une identification des protéines par spectrométrie de masse a été réalisée en utilisant des protéines nucléaires extraites de cellules MCF-7.

II.1. Analyse par « DNA pull-down » sur la séquence de fixation de DDB2 suivie de la spectrométrie de masse

Une première analyse protéomique globale a été réalisée sur les sondes correspondantes aux sites de fixation de DDB2 sur le promoteur des gènes *NFKB1A* et *SOD2*, appelées respectivement sondes *NFKB1A* et *SOD2*, à partir d'extraits protéiques nucléaires des cellules MCF-7. Lors de cette analyse, un contrôle, correspondant à des billes magnétiques nues c'est-à-dire non couplées à une sonde ADN a été utilisé. Cette analyse, réalisée une seule fois par le Dr Schaeffer (LSMBO, CNRS, UMR7178) a permis d'obtenir une liste potentielle de protéines pouvant interagir avec DDB2 dans son activité transcriptionnelle. Pour chaque protéine, les données obtenues se limitent au pourcentage de recouvrement. Il ressort de cette analyse la présence de plus de 900 protéines sur la sonde *NFKB1A* et plus de 700 sur la sonde *SOD2*. En éliminant les protéines retenues sur le contrôle billes nues, les protéines identifiées avec un faible pourcentage de recouvrement ainsi que les protéines dont la présence sur l'ADN est aberrante, il existe environ 250 protéines candidates sur chaque sonde ADN. Sur l'ensemble des protéines identifiées, 28 sont spécifiquement retrouvées sur la sonde *NFKB1A* et 111 sur la sonde *SOD2*.

Les résultats de l'analyse montrent la présence, sur les deux sondes, de nombreuses protéines appartenant aux complexes de réparation de l'ADN. Ainsi, nous avons retrouvé les protéines XRCC5/6 qui interviennent dans la recombinaison non homologue, HMGB1 (High Mobility Group Protein 1), MSH2, 3 (MutS Protein Homolog 2, 3) dans la réparation des mésappariements, les protéines du complexe UV-DDB (DDB1, DDB2 et Cul4A) et ERCC2 (XPB) dans la réparation par excision de nucléotides, et les protéines APEX1, XRCC1 et Polβ (DNA Polymerase Beta) dans la réparation des cassures d'ADN double brin, ainsi que la protéine PARP1 (*Tableau 12*).

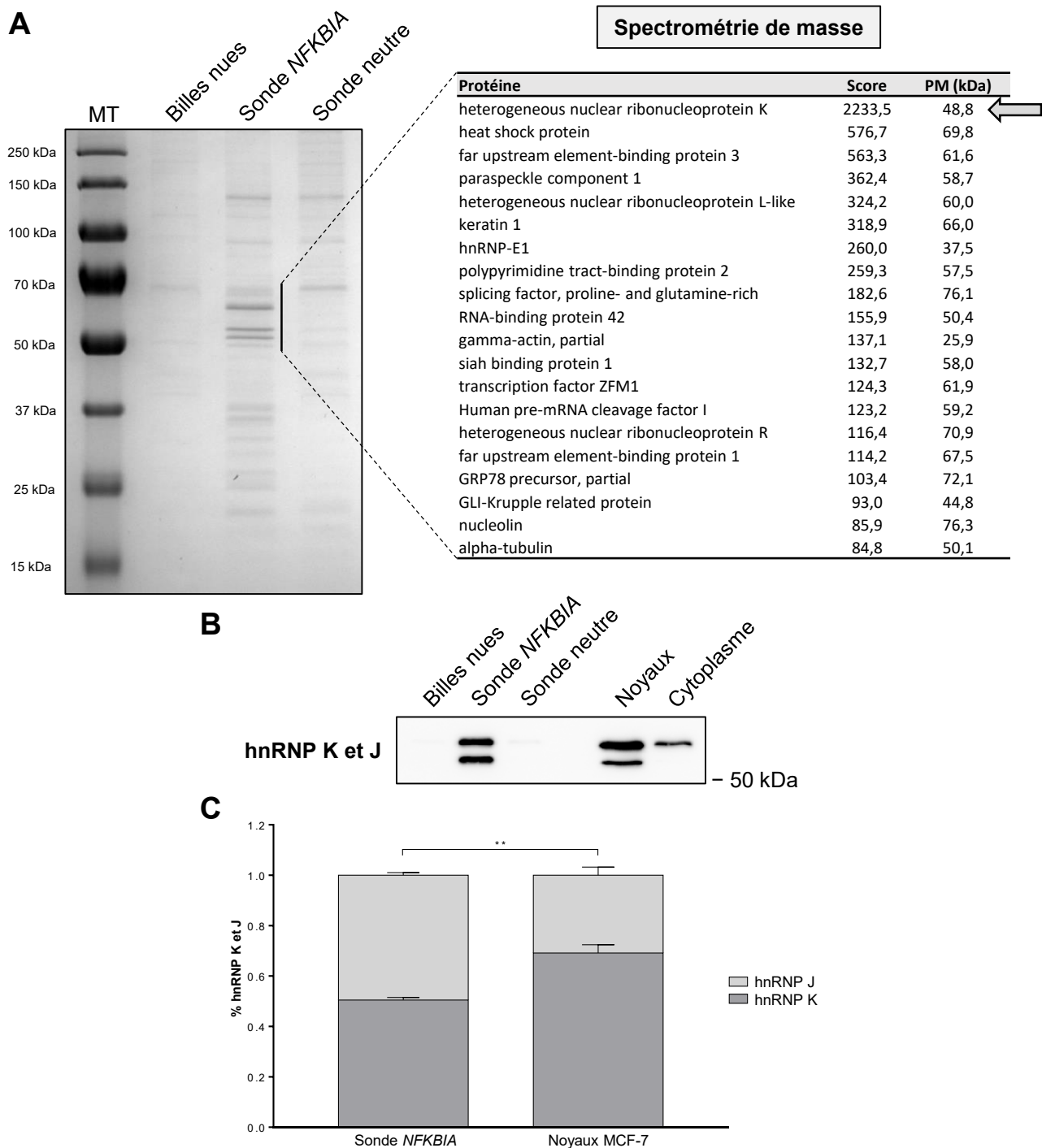


Figure 45 : Mise en évidence des protéines hnRNP K et J par « DNA pull down » réalisées sur la séquence cible de DDB2 dans le promoteur du gène NFKBIA (sonde IkBa). (A) Après « DNA pull down », les protéines retenues sur les sondes NFKBIA et neutres, dont la taille en électrophorèse (PM) est comprise entre 50 et 70 kDa, ont été analysées et identifiées par spectrométrie de masse. Les protéines identifiées sur la sonde NFKBIA sont classées par score par rapport à la sonde neutre. (B) La présence des protéines hnRNP K et J retenues par la sonde NFKBIA est confirmée par Western blotting à l'aide d'un anticorps polyclonal spécifique. Les extraits nucléaire et cytoplasmique sont analysés comme contrôle. (C) Quantification par densitométrie du pourcentage des formes K et J parmi les hnRNPs totales sur la sonde NFKBIA et dans la fraction nucléaire des cellules MCF-7 ($n=3$). $**p<0,005$.

Nous avons focalisé la suite de notre recherche de partenaires potentiels de DDB2 sur le promoteur du gène *NFKBIA*, afin de limiter leur nombre dans notre analyse protéomique, en y ajoutant un contrôle supplémentaire lors de l'expérience de « DNA pull-down » qui correspond à une sonde ADN dont la séquence n'est théoriquement pas reconnue par des facteurs de transcription, couplée aux billes magnétiques (sonde neutre). Après l'approche par « DNA pull-down » réalisée sur la sonde correspondante à la séquence fixant DDB2 sur le promoteur du gène *NFKBIA* et appelée sonde *NFKBIA*, les protéines retenues sont visualisées après leur migration sur un gel ayant subi une coloration au bleu de Coomassie colloïdal. Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec le « DNA pull-down » réalisé avec une sonde non spécifique, appelée sonde neutre. Le profil électrophorétique révèle la présence de bandes de protéines retenues par les deux sondes. Cependant, certaines protéines retenues uniquement sur la sonde *NFKBIA* sont mises en évidence sous la forme de bandes majoritaires, dont la taille moléculaire est comprise entre 50 et 70 kDa (**Figure 45A**). Cette région du gel, préalablement découpée, est analysée par spectrométrie de masse par le Dr J.B. Vincourt au sein de la plateforme protéomique (IMoPA, UMR 7365 CNRS, Vandœuvre-lès-Nancy), et comparée à celle contenant les protéines retenues sur la sonde neutre. A l'issue de cette analyse, une vingtaine de protéines retenues par la sonde *NFKBIA* ont ainsi été identifiées, dont la quantification est reflétée par un score indiqué dans la **figure 45A**. Parmi elles, certaines sont identifiées comme facteurs de transcription (FUSE 1 et 3 ou far upstream element-binding 1 et 3, GLI-Krupple related protein, le facteur de transcription ZFM1), ou interagissant avec des ARNs (les protéines de la famille hnRNP ou heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, L-like, E1, le facteur de clivage de pré-ARNm ou encore des facteurs d'épissage). Certaines d'entre-elles sont des protéines du cytosquelette (nucléoline, γ -actine, α -tubuline) qui ne sont pas connues pour interagir avec les acides nucléiques. La liste des protéines identifiées par spectrométrie de masse, classées par score, est présentée dans la **figure 45A**.

II.2. Identification de la protéine hnRNP K comme partenaire potentiel de DDB2

De façon surprenante et originale, la protéine ayant le score le plus élevé, lors de l'analyse par spectrométrie de masse, est la protéine hnRNP K (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K). Cette protéine est connue initialement pour son rôle dans les processus d'épissage et de traduction en interagissant avec les ARNm dont les séquences sont riches en

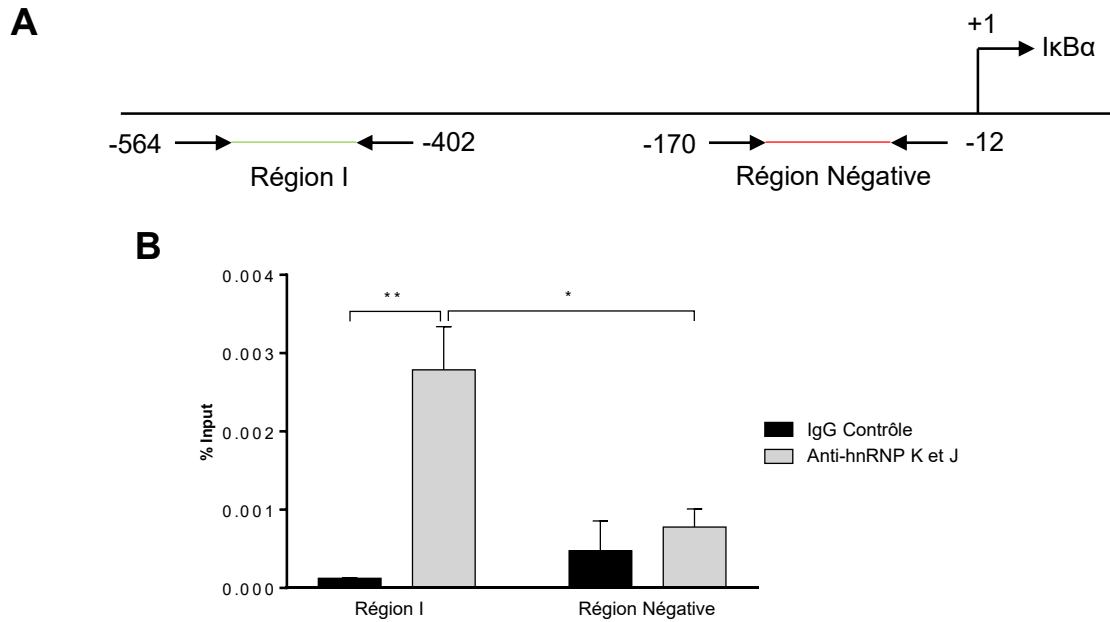


Figure 46 : Analyse de l'interaction des protéines hnRNP K et J sur le promoteur du gène NFKB1A dans les cellules MCF-7 par immunoprécipitation de chromatine. L'ADN immunoprécipité à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre les protéines hnRNP K et J ou d'une immunoglobuline G contrôle (IgG Contrôle) a été amplifiée par PCR en temps réel en utilisant un couple d'amorces encadrant soit la région I qui renferme le site de fixation de DDB2, ou une région négative comme contrôle dans le promoteur NFKB1A. Les résultats sont exprimés en % du Input qui correspond à de la chromatine non immunoprécipitée (contrôle positif) (n=3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

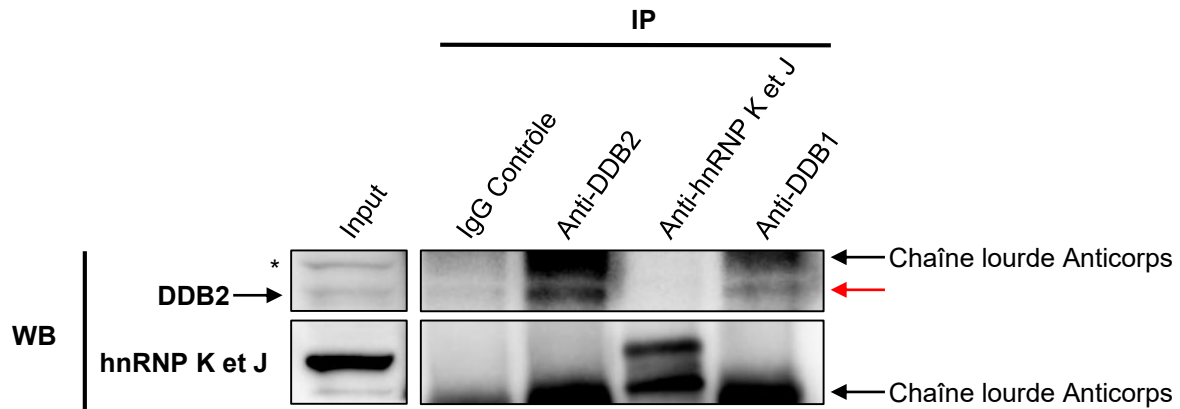


Figure 47 : Analyse de l'interaction entre les protéines DDB2 et hnRNP K et J par co-immunoprécipitation de protéines. DDB2, hnRNP K et J et DDB1 sont immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps spécifiquement dirigé contre elles (IP). Puis, la présence des protéines DDB2 (flèche rouge) et hnRNP K et J est révélée dans chaque immunoprécipitation par Western blotting (WB). Le témoin négatif de l'expérience correspond à l'immunoprécipitation avec l'IgG contrôle.

cytidines (Barboro *et al.*, 2014; Piñol-Roma *et al.*, 1988). Cette protéine avait déjà été retrouvée liée à cette sonde ADN uniquement lors de la première analyse réalisée par le Dr Schaeffer à Strasbourg (**Tableau 12**). La capacité de la sonde *NFKB1A* à retenir la protéine hnRNP K est confirmée par une analyse en Western blotting des protéines retenues par « DNA pull-down ». Cette analyse révèle également la présence d'une seconde protéine de taille moléculaire légèrement inférieure, qui pourrait correspondre, selon la littérature, à la protéine hnRNP J, très peu connue mais décrite comme une isoforme de la hnRNP K (**Figure 45B**) (Bomsztyk *et al.*, 2004). La quantification des Western blottings révèle que la sonde *NFKB1A* semble avoir une affinité plus grande pour la forme hnRNP J que pour K. En effet, les deux hnRNPs sont retrouvées en quantité quasiment égale sur la sonde *NFKB1A*, alors que la forme J ne représente proportionnellement que 35% de ces protéines, comme le montre un Western blotting réalisé avec un extrait nucléaire de cellules MCF-7 (**Figure 45C**).

La mise en évidence de la présence des protéines hnRNP K et J sur le site de fixation de DDB2 par des expériences de « DNA pull-down » ont été confirmées sur le promoteur du gène *NFKB1A* par une approche d'immunoprécipitation de la chromatine. A partir de cellules MCF-7 et à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre les protéines hnRNP K et J, la chromatine immunoprécipitée est analysée par PCR en temps réel à l'aide de couples d'amorces répertoriés dans le **tableau 6**. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'enrichissement de la chromatine par rapport à la fraction non-immunoprécipitée (% d'input). Ils sont comparés à ceux obtenus avec une immunoglobuline non spécifique servant de contrôle (IgG contrôle). Les résultats de ces expériences montrent une fixation significative des protéines hnRNP K et J dans une région du promoteur contenant la séquence utilisée en « DNA pull-down » (appelée Région I), comprise entre -564 et -402 pb en amont du site d'initiation de la transcription (**Figure 46A**). A l'inverse, ces protéines ne sont pas retrouvées sur le promoteur dans une autre région (appelée Région Négative) située entre -170 et -12 pb en amont du site d'initiation de la transcription (**Figure 46B**).

Afin d'approfondir l'idée que les protéines hnRNP K et J soient des partenaires potentiels de DDB2 dans la régulation de la transcription de gènes cibles, des expériences de co-immunoprécipitation de protéines ont été réalisées dans le but d'identifier une interaction physique entre-elles. Cependant, ces expériences n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction physique entre ces protéines, car DDB2 n'est pas retrouvée co-immunoprécipitée avec les protéines hnRNP K et J, et réciproquement. A l'inverse, DDB2 est co-immunoprécipitée avec la protéine DDB1 (**Figure 47**).

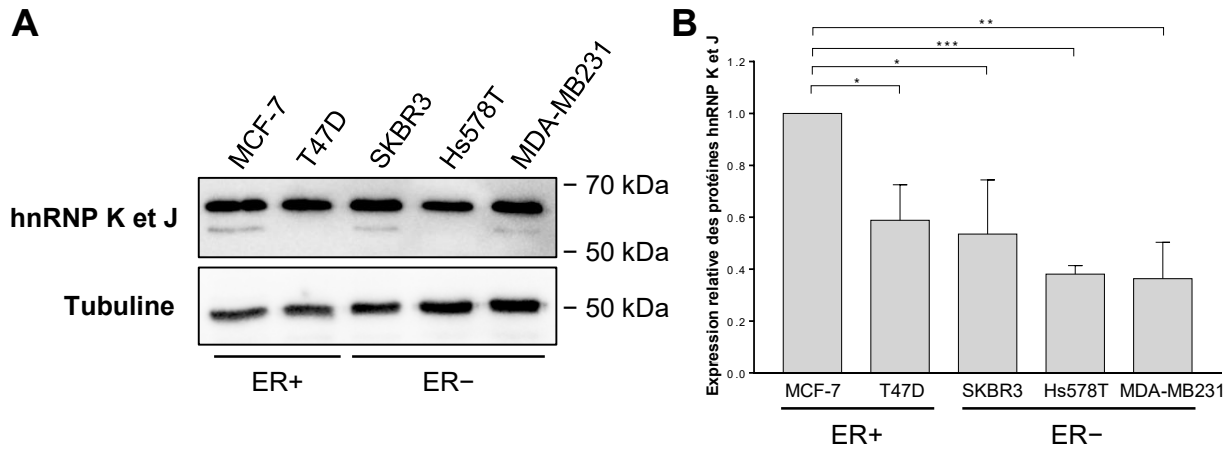


Figure 48 : Analyse du niveau d'expression des protéines hnRNP K et J dans les lignées de cellules cancéreuses mammaires. (A) Western blotting représentatif du niveau d'expression des protéines hnRNP K et J dans des protéines totales extraites de différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires. (B) Quantification par densitométrie du niveau d'expression des protéines hnRNP K et J normalisé par rapport à l'expression de la tubuline ($n=3$). * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,001$.

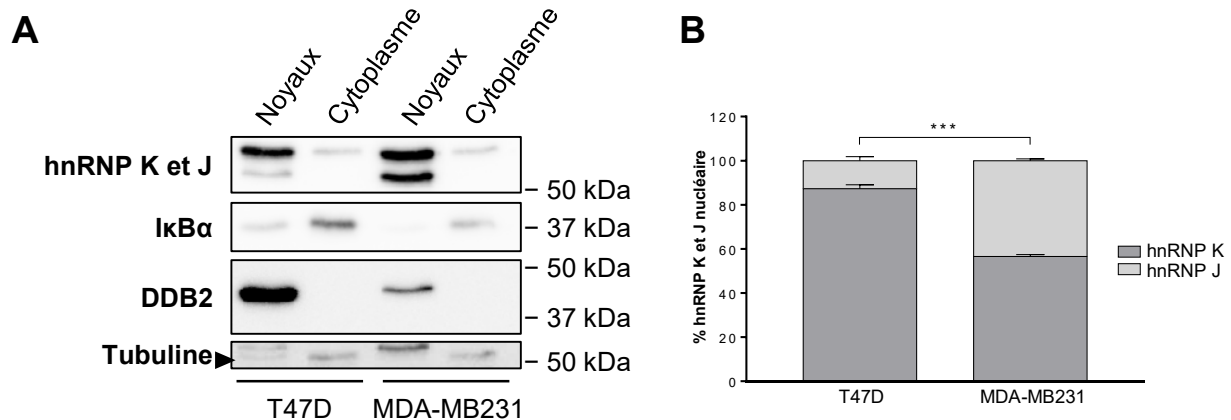


Figure 49 : Etude de la localisation cellulaire des protéines hnRNP K et J. (A) Western blotting représentatif, réalisé avec des extraits nucléaire et cytoplasmique de cellules T47D et MDA-MB231. IκBα et DDB2 servent de témoin positif, respectivement pour les extraits cytoplasmique et nucléaire. (B) Quantification par densitométrie du pourcentage des formes K et J parmi les protéines hnRNPs dans les fractions nucléaires des cellules T47D et MDA-MB231 ($n=3$). *** $p<0,001$.

II.3. Etude de l'expression et de la localisation des protéines hnRNP K et J dans les cellules tumorales mammaires

En raison de son action dans différents processus biologiques fondamentaux, une modification du niveau d'expression de la protéine hnRNP K peut être retrouvée dans certains cancers (Gallardo *et al.*, 2016). Le niveau d'expression des protéines hnRNP K et J a donc été analysé par Western blotting dans différentes lignées de cellules tumorales mammaires. Tandis que le niveau de ces protéines n'est significativement pas différent dans les cellules T47D, SKBR3, Hs578T et MDA-MB231, il est jusqu'à 2,5 fois plus élevé dans les cellules MCF-7 (**Figure 48A et 48B**). De même, aucune corrélation n'est retrouvée entre le niveau d'expression des protéines hnRNP K et J et celui d'IkBa d'une part, le statut ER ou encore le niveau d'agressivité des cellules tumorales d'autre part.

En dehors du niveau d'expression de la protéine hnRNP K, certaines études ont montré que sa localisation subcellulaire pouvait jouer un rôle important dans son activité. En effet, une localisation aberrante de cette protéine est retrouvée dans certains cancers du foie ou du côlon (Carpenter *et al.*, 2006; Ostrowski et Bomsztyk, 2003). Nous avons étudié la localisation des protéines hnRNP K et J dans les cellules cancéreuses mammaires T47D et MDA-MB231 qui les expriment toutes deux à un niveau semblable. Cependant, les premières expriment significativement plus la protéine IkBa que les secondes. Après un fractionnement cellulaire, nous avons recherché la présence des protéines hnRNP K et J dans les fractions cytoplasmique et nucléaire par Western blot. Les résultats sont comparés à ceux obtenus pour IkBa qui est très majoritairement cytoplasmique et DDB2, qui quant à elle est strictement nucléaire. Les résultats présentés dans la **figure 49A** montrent que la protéine hnRNP K est présente en grande majorité dans le noyau des cellules T47D et MDA-MB231, tandis que la forme J semble être quant à elle strictement nucléaire. A quantité égale de protéines nucléaires utilisées pour réaliser le Western blot, la quantification par densitométrie des résultats obtenus en **figure 49B** indique une proportion plus importante de la forme J (45%) dans les cellules MDA-MB231 que dans les T47D (13%).

Pour jouer un rôle dans la régulation de la transcription génique, ces protéines doivent être liées à l'ADN et ainsi être associées à la chromatine. Afin de connaître si les protéines hnRNP K et J sont liées à la chromatine ou plutôt nucléoplasmiques, nous avons préparé ces deux fractions à partir d'une extraction de noyaux. La détection de l'histone H3, à l'aide d'un anticorps spécifique, a été utilisée comme contrôle caractéristique des protéines liées à la

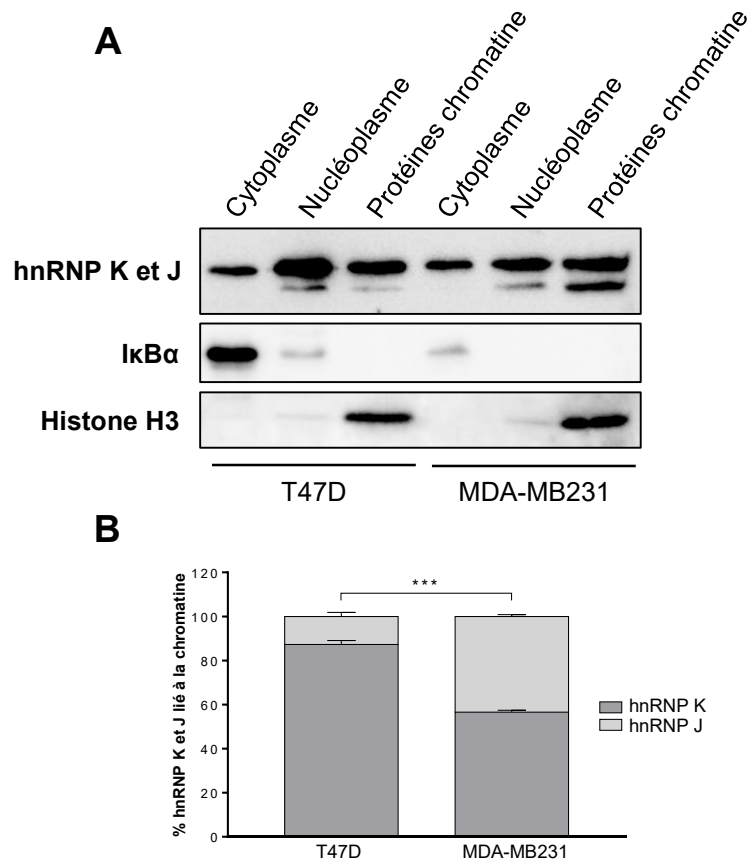


Figure 50 : Mise en évidence de l'association des protéines hnRNP K et J à la chromatine. (A) Western blotting représentatif, réalisé avec des protéines cytoplasmiques, nucléoplasmiques et liées à la chromatine extraites des cellules T47D et MDA-MB231. IκBα et l'Histone H3 servent de témoin positif, respectivement pour les extraits de protéines cytoplasmiques et liées à la chromatine. (B) Quantification par densitométrie du pourcentage des formes K et J parmi les protéines hnRNP dans les fractions de protéines liées à la chromatine des cellules T47D et MDA-MB231 (n=3). ***p<0,001.

chromatine. Les résultats présentés sur la **figure 50A** révèlent que la protéine hnRNP K est retrouvée à la fois dans la fraction nucléoplasmique et de protéines liées à la chromatine. La forme J est également retrouvée dans les deux fractions obtenues des deux lignées cellulaires. Cependant, cette forme de hnRNP est principalement liée à la chromatine dans les cellules MDA-MB231 (**Figure 50A**). En utilisant l'histone H3 comme témoin des protéines liées à la chromatine pour une quantification précise des deux formes dans les deux lignées cellulaires, les résultats montrent que la forme J dans cette fraction, représente 44% des protéines hnRNP K et J dans les cellules MDA-MB231 au lieu de 15% dans les cellules T47D (**Figure 50B**). Ces résultats indiquent donc que la forme J est principalement liée à la chromatine et peut expliquer qu'elle soit retenue plus facilement par « DNA pull-down » parmi les formes hnRNP K et J (**Figure 45C**).

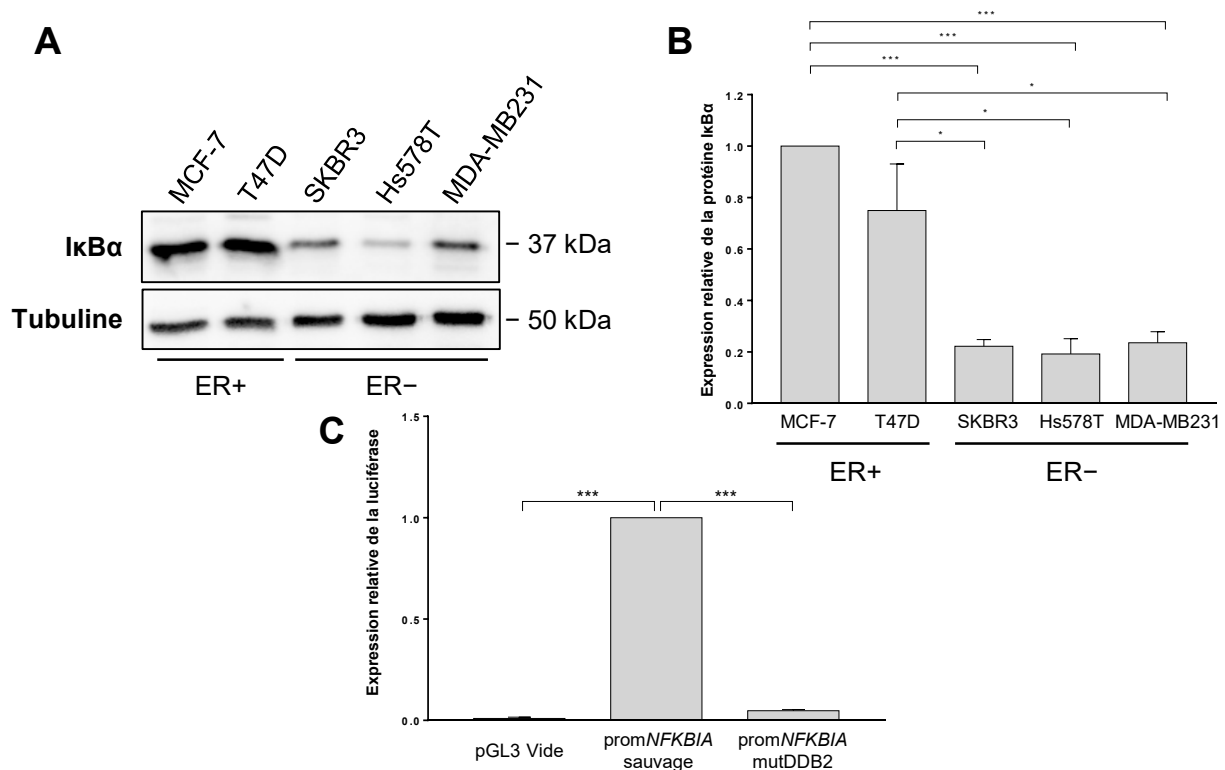


Figure 51 : Analyse du niveau d'expression de la protéine IκBα dans les différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires. (A) Western blotting représentatif du niveau d'expression d'IκBα réalisé avec des protéines totales extraites de différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires. (B) Quantification du niveau d'expression d'IκBα normalisé par rapport à l'expression de la tubuline (n=3). (C) Les cellules MCF-7 ont été transfectées avec différentes constructions plasmidiques pGL3 dans lesquelles le gène rapporteur codant la luciférase Firefly est placé sous le contrôle du promoteur du gène NFKBIA muté ou non pour le site de fixation pour DDB2. L'activité du promoteur a été évaluée en mesurant l'activité de la luciférase rapportée à celle obtenue de la Renilla qui provient du contrôle de co-transfection (n=3). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

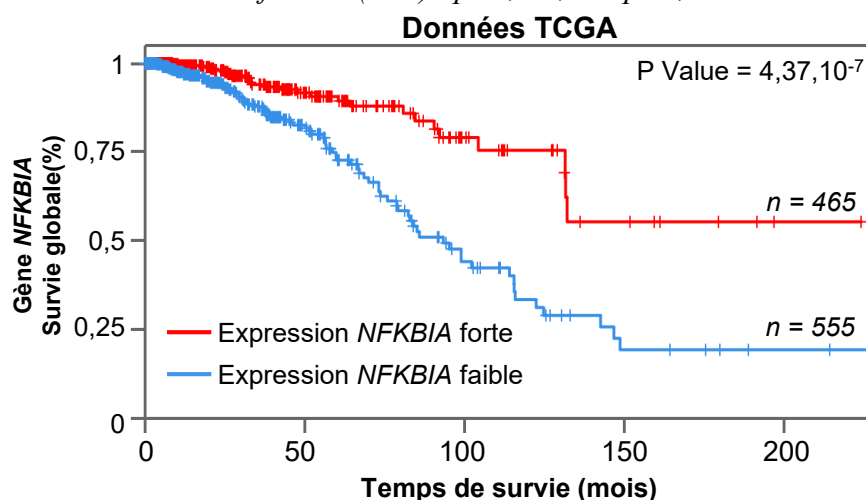


Figure 52 : Etude rétrospective montrant l'influence de l'expression du gène NFKBIA sur la survie globale de patientes atteintes d'un cancer du sein. A partir de la base de données TCGA (The Cancer Genome Atlas), l'étude a été réalisée sur une cohorte de 1020 échantillons cliniques, montrant la survie globale des patientes en mois selon le niveau d'expression faible ou fort des transcrits du gène NFKBIA.

III. Importance des protéines hnRNP K et J, partenaires de DDB2, dans la régulation d'expression du gène *NFKBIA*

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons souhaité nous focaliser sur la régulation du gène *NFKBIA* et d'évaluer la part jouée par les hnRNP K et J dans son expression, par rapport aux autres régulateurs connus, dont DDB2, Sp1, AP-2 α et Ets-1. Ce gène codant la protéine inhibitrice du facteur de transcription NF- κ B présente un intérêt majeur en cancérologie.

III.1. Etude du niveau d'expression du gène *NFKBIA* dans les cellules et les tumeurs mammaires

Le niveau d'expression de la protéine I κ B α est analysé par Western blotting dans les différentes lignées de cellules tumorales mammaires. Les résultats montrent que la protéine I κ B α est significativement exprimée 5 fois plus dans les cellules cancéreuses ER+ (MCF-7 et T47D) que dans les cellules ER- et plus agressives (SKBR3, Hs578T et MDA-MB231) (**Figure 51A et 51B**). De même, la transfection des cellules tumorales avec un plasmide contenant le promoteur proximal du gène *NFKBIA*, placé en amont du gène de la luciférase, révèle que ce promoteur a une activité 10 fois supérieure dans les cellules MCF-7 que dans les MDA-MB231 (**Figure 51C**). Ces résultats sont confirmés par une analyse dans la base de données TCGA (The Cancer Genome Atlas) montrant l'expression au niveau transcriptionnel du gène *NFKBIA* réalisée sur une cohorte de 1020 tumeurs mammaires. De façon significative, une corrélation entre le niveau d'expression du gène *NFKBIA* et la survie globale des patientes atteintes d'un cancer du sein est observée. Pour 465 tumeurs, dont le niveau d'expression du gène est élevé, plus de 50% des patientes ont une survie globale au-delà de 200 mois. Par contre, pour les 555 tumeurs restantes, dont le niveau d'expression du gène *NFKBIA* est faible, seulement 20% des patientes ont une survie globale au-delà de 200 mois (**Figure 52**).

Dans les cellules tumorales mammaires, l'expression d'I κ B α peut dépendre de différents facteurs de transcription dont les sites de fixation ont été identifiés antérieurement dans d'autres types cellulaires. Il s'agit, en dehors de ceux pour NF- κ B et appelés κ B1, κ B et κ B3 (Ito *et al.*, 1995), de sites de fixation pour Sp1, AP-2 α et Ets-1, identifiés par une empreinte à la DNase dans les cellules Jurkat (Algarté *et al.*, 1999), et la protéine DDB2 mis en évidence par l'équipe du laboratoire (Ennen *et al.*, 2013). Après alignement de la séquence du promoteur

du gène *NFKBIA* humain avec celle provenant d'autres espèces animales à l'aide du logiciel BioEdit, nous observons une forte homologie de séquence, notamment au niveau des sites de fixation déjà identifiés (**Figure 53**), suggérant que ces derniers jouent un rôle majeur dans la régulation de la transcription du gène *NFKBIA* pour avoir été conservés au cours de l'évolution. Nous avons vérifié la fonctionnalité et l'importance de ces sites dans la régulation de l'expression du gène *NFKBIA* dans les cellules cancéreuses mammaires par une approche de mutagenèse dirigée. Cette dernière a consisté à muter deux nucléotides dans chacun des sites de fixation de DDB2, Sp1, AP-2 α et Ets-1, au sein de la séquence du promoteur proximal, préalablement placée en amont du gène codant la luciférase (**Figure 54**). Les différentes constructions plasmidiques obtenues ont été transfectées dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et l'activité du promoteur proximal du gène *NFKBIA* muté a été évaluée par l'activité luciférase relative et comparée avec celle du promoteur non muté ou sauvage. Les résultats montrent que la mutation du site de fixation pour la protéine Sp1 en position -36 et pour DDB2 en position -488 pb par rapport au site d'initiation diminue respectivement d'environ 80% et 90% l'activité du promoteur proximal du gène *NFKBIA* dans les cellules MCF-7. Cependant de façon surprenante, l'activité du promoteur est significativement plus haute lorsque les sites de fixation pour DDB2 et Sp1 sont simultanément mutés que lorsque chaque site est muté séparément. Par contre, la mutation du site de fixation pour AP-2 α ou pour Ets-1 entraîne seulement une diminution, respectivement d'environ 45% et 25% de l'activité du promoteur proximal, suggérant que ces deux facteurs de transcription, contrairement à DDB2 et Sp1, jouent un rôle mineur dans la régulation de l'expression du gène *NFKBIA* (**Figure 54**).

L'expression de la protéine Sp1 est précisément corrélée à celle de I κ B α et DDB2, à la fois au niveau transcriptionnel et traductionnel, à savoir élevée dans les cellules tumorales mammaires non invasives et faible dans les invasives et métastatiques (**Figure 55**). Ces résultats sont également montrés lors d'une analyse de la base de données TCGA (The Cancer Genome Atlas) réalisée sur 1023 échantillons cliniques, dans laquelle nous révélons un niveau d'expression du gène codant Sp1 plus faible dans les tumeurs mammaires agressives et ER- (**Figure 56**). L'activité de DDB2 et Sp1 sur l'induction d'expression du gène *NFKBIA* est cependant indépendante d'une interaction entre-elles. En effet, Sp1 n'est pas retenue sur les billes couplées à la sonde *NFKBIA* spécifique pour DDB2, lors des expériences de « DNA pull-down », comme le montre l'analyse par Western blotting réalisée sur la fraction retenue, alors qu'elle est présente dans la fraction non retenue (**Figure 57**).

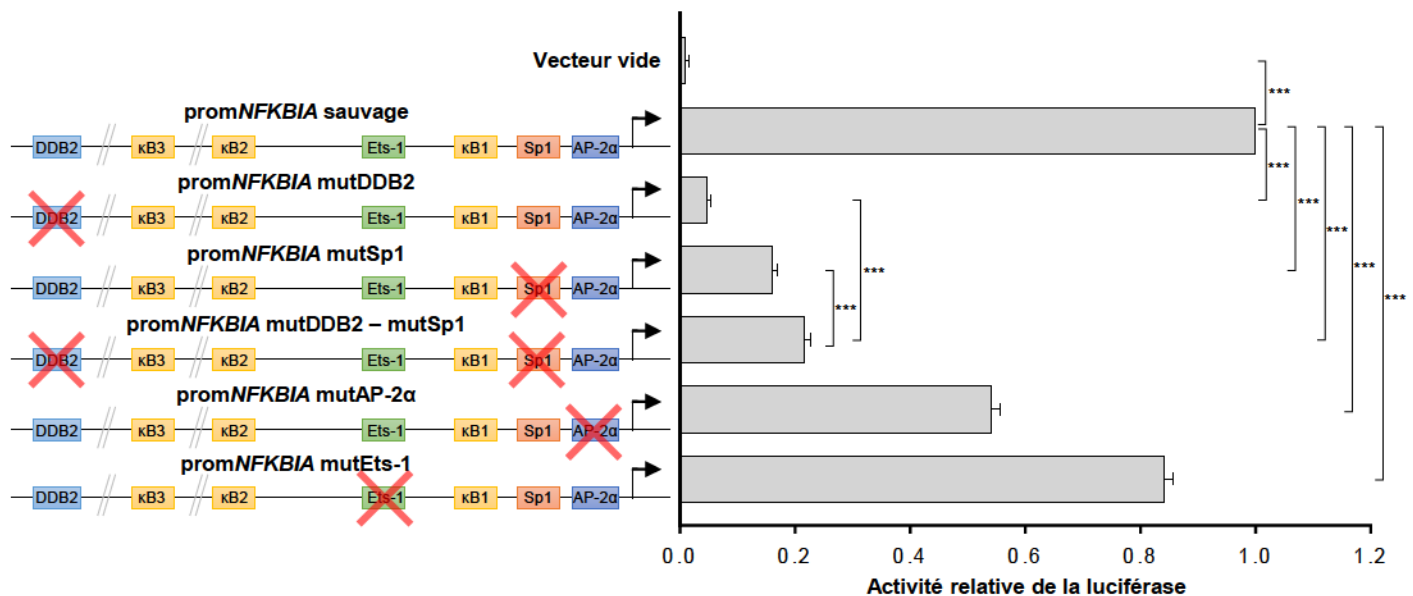


Figure 54 : Etude de la fonctionnalité des sites de fixation pour les protéines DDB2, AP-2α, Sp1 et Ets-1 sur le promoteur proximal du gène NFKBIA. Les cellules MCF-7 ont été transfectées avec différentes constructions plasmidiques pGL3 dans lesquelles le gène rapporteur luciférase Firefly est placé sous le contrôle du promoteur du gène NFKBIA, dont les différents sites de fixation des régulateurs connus ont été mutés (croix rouges). Les conséquences de ces mutagenèses dirigées sur l'activité du promoteur ont été évaluées en mesurant l'activité de la luciférase rapportée à celle obtenue de la Renilla qui provient du plasmide contrôle de co-transfection (n=3). Les résultats sont ainsi exprimés en activité relative de la luciférase. *** $p < 0,001$.

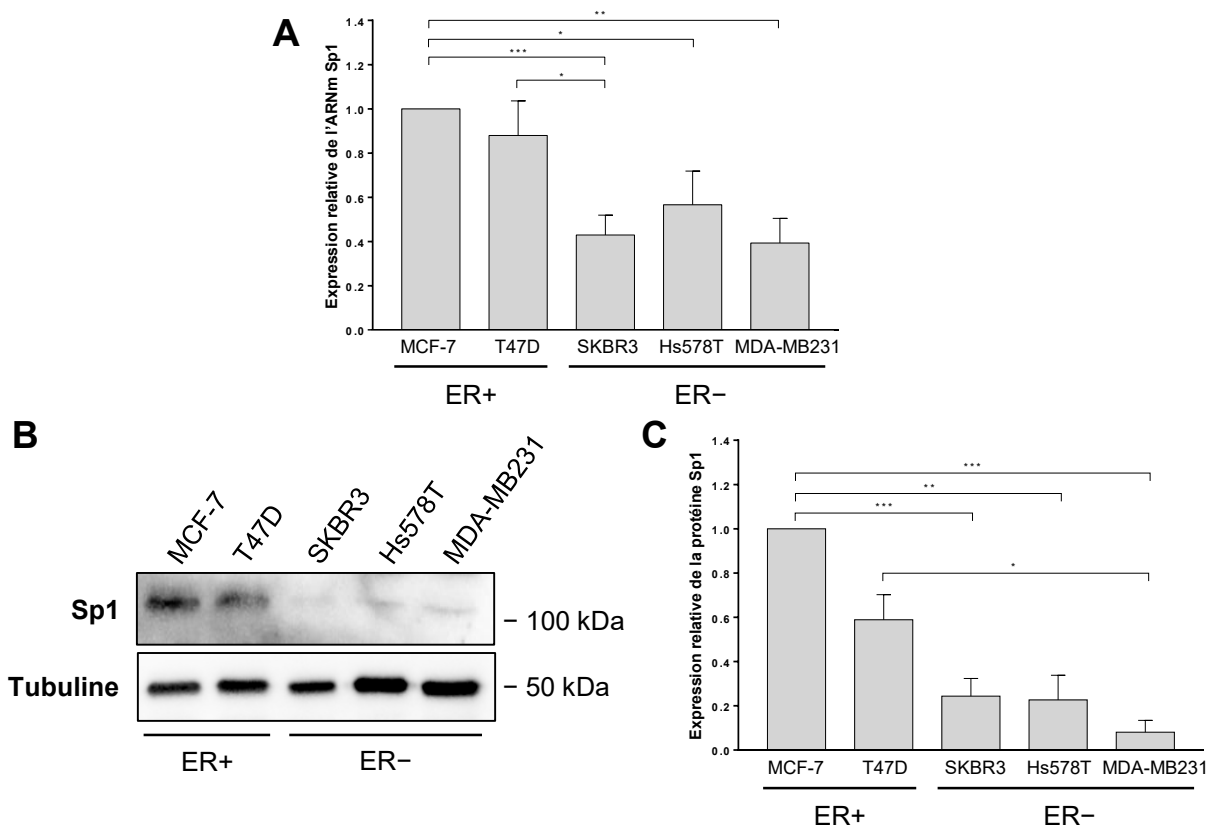


Figure 55 : Analyse de l'expression du gène Sp1 dans différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires. (A) Le niveau de transcrits codant la protéine Sp1 est évaluée par RT-qPCR dans les différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires (n=4). Ce niveau d'expression de Sp1 est normalisé par l'expression de deux gènes de référence : UBB et RPLP0. (B) Western blotting représentatif du niveau d'expression de la protéine Sp1 réalisé avec des protéines totales extraites de différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires. (C) Quantification par densitométrie du niveau d'expression de la protéine Sp1 normalisée par rapport à l'expression de la tubuline (n=3). *p<0,05 ; **p<0,005 ; ***p<0,001.

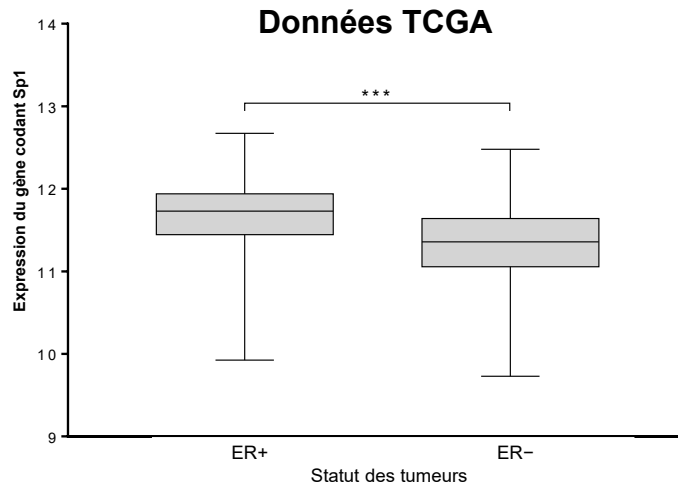


Figure 56 : Etude rétrospective du niveau d'expression du gène codant la protéine Sp1 dans les tumeurs mammaires de patientes atteintes d'un cancer du sein. A partir de la base de données TCGA (The Cancer Genome Atlas), l'étude a été réalisée sur une cohorte de 1023 échantillons cliniques, montrant le niveau d'expression des transcrits du gène codant Sp1 selon le statut ER des tumeurs mammaires.

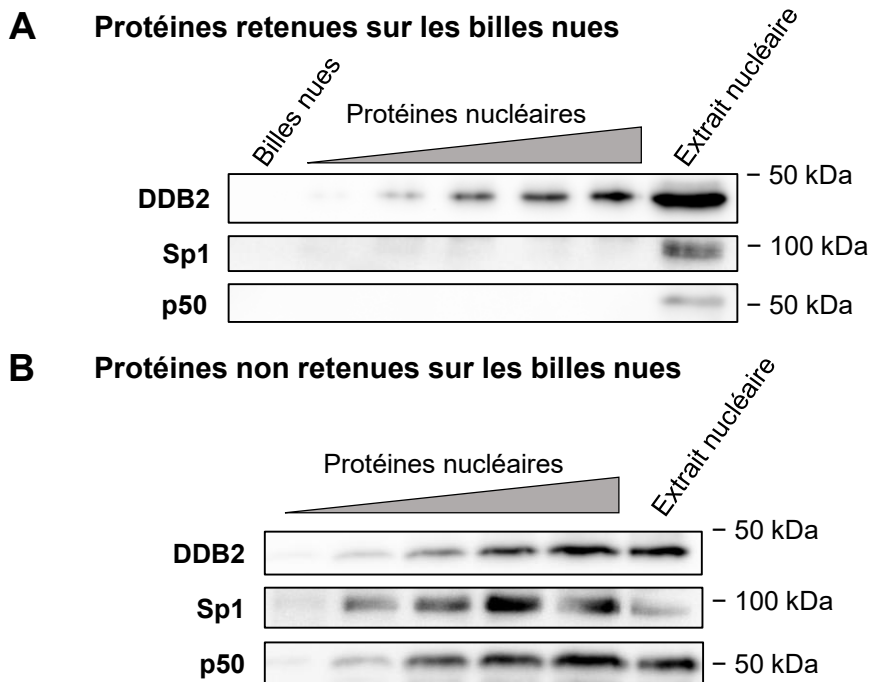


Figure 57 : Analyse par « DNA pull-down » de la fixation de la protéine Sp1 sur la séquence cible de DDB2 du promoteur du gène NFKBIA. (A) Parmi les protéines retenues (A) ou non (B) sur la séquence nucléotidique de fixation de DDB2 identifiée au sein du promoteur du gène NFKBIA (sonde NFKBIA), la présence de la protéine Sp1 est recherchée par Western blotting. La DDB2 et la p50 sont également révélées comme contrôles, respectivement positif pour la fraction retenue et non retenue sur la sonde NFKBIA. En parallèle, un extrait nucléaire est analysé par Western blotting afin de révéler les protéines Sp1, DDB2 et p50 (contrôle positif). Enfin, la fraction issue d'un « DNA pull-down » réalisé avec des billes nues en présence de 100 µg de protéines est également analysée par Western blotting afin d'évaluer la fixation aspécifique (contrôle négatif).

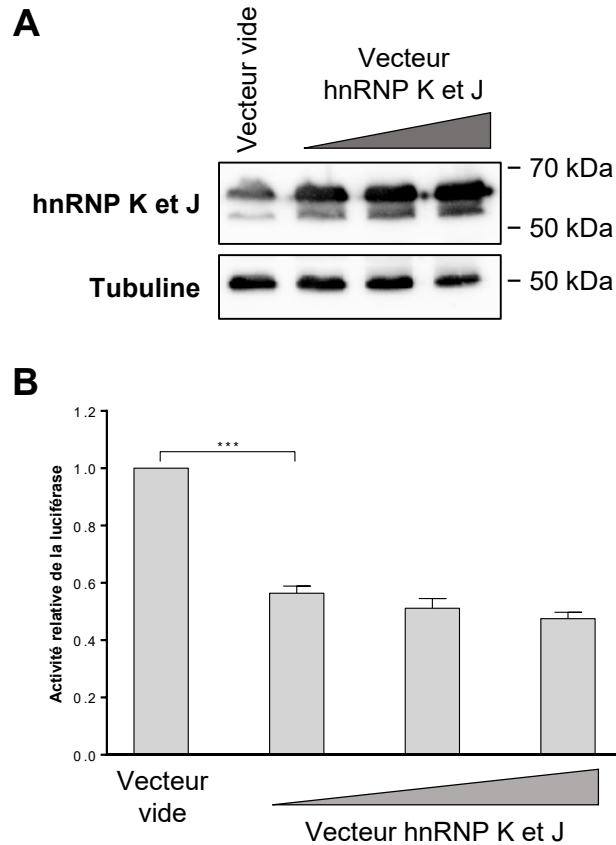


Figure 58 : Effet d'une surexpression des protéines hnRNP K et J sur l'activité du promoteur du gène NFKBIA dans les cellules HEK 293. Les cellules HEK 293 ont été co-transfectées avec des quantités croissantes d'un plasmide permettant la surexpression des protéines hnRNP K et J (200, 400 et 600 ng pour 10^5 cellules), un plasmide contenant le gène codant la luciférase Firefly placé sous le contrôle du promoteur proximal du gène NFKBIA et un plasmide contrôle contenant le gène codant la luciférase Renilla placé sous le contrôle du promoteur CMV. (A) La surexpression des protéines hnRNP K et J est évaluée par Western blotting sur les protéines totales extraites des cellules HEK 293 à l'aide d'un anticorps spécifique. (B) L'influence de la surexpression des protéines hnRNP K et J sur l'activité du promoteur NFKBIA est évaluée en mesurant l'activité de la luciférase Firefly rapportée à celle obtenue de la Renilla. Les résultats sont ainsi exprimés en activité relative de la luciférase (n=3). *** $p < 0,001$.

III.2. Effet des protéines hnRNP K et J sur l'expression transcriptionnelle du gène *NFKBIA*

III.2.1. Influence d'une surexpression des protéines hnRNP K et J

Dans cette étude, nous avons transfecté de façon transitoire des cellules humaines embryonnaires de rein (HEK 293) et des cellules tumorales mammaires avec le plasmide pXJ41 contenant l'ADNc qui code la protéine hnRNP K afin d'en évaluer les conséquences sur l'expression et l'activité du promoteur proximal du gène *NFKBIA*.

La surexpression de la protéine hnRNP K après transfection des cellules HEK 293 avec des quantités croissantes de plasmide est vérifiée par Western blotting, qui révèle non seulement une augmentation de la forme K mais également de l'isoforme de taille réduite et supposée être la forme J (**Figure 58A**). Les cellules HEK 293 surexprimant hnRNP K et J sont transfectées avec le gène luciférase mis sous contrôle du promoteur du gène *NFKBIA*. Les résultats indiquent une diminution significative de l'activité du promoteur *NFKBIA* qui peut atteindre 50% pour la surexpression la plus élevée des protéines hnRNP K et J, par rapport aux cellules contrôles transfectées avec le plasmide vide (**Figure 58B**). La même expérience réalisée cette fois sur les cellules tumorales mammaires T47D transfectées transitoirement avec le plasmide conduisant à une surexpression des protéines hnRNP K et J (**Figures 59A et 59B**), permet de montrer également une diminution d'environ 50% de l'activité du promoteur proximal *NFKBIA* (**Figure 59C**), mais aussi de 40% le niveau d'expression de l'ARNm codant la protéine I κ B α (**Figure 59D**). Ces résultats obtenus sur les cellules T47D sont confirmés sur les MDA-MB231 exprimant déjà faiblement le gène *NFKBIA*. Dans ces cellules, la surexpression transitoire de hnRNP K et J (**Figure 60A et 60B**) entraîne une diminution drastique d'environ 70% du niveau d'expression d'ARNm codant la protéine I κ B α (**Figure 60C**).

L'ensemble de ces résultats suggère que les protéines hnRNP K et J jouent un rôle de répresseur de l'expression du gène *NFKBIA*.

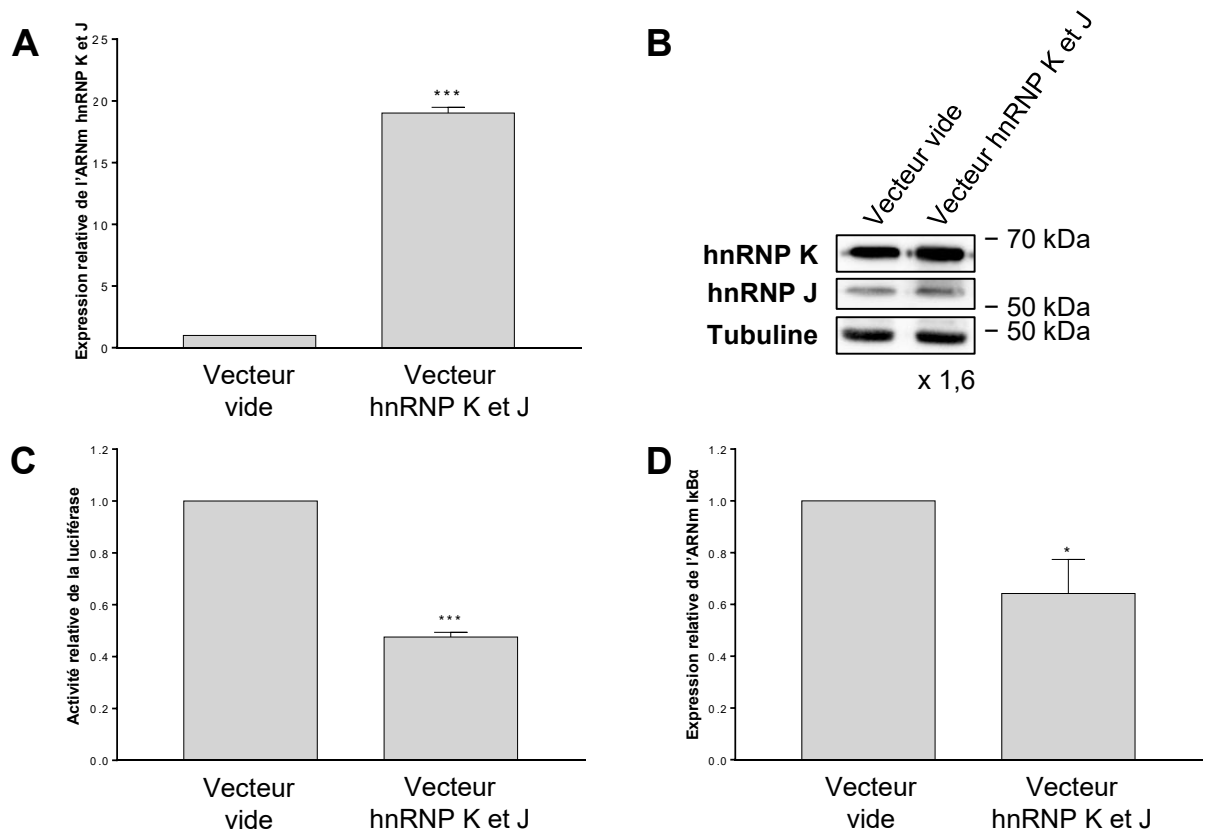


Figure 59 : Effet d'une surexpression des protéines hnRNP K et J sur l'expression du gène NFKBIA dans les cellules T47D. Les cellules T47D ont été transfectées avec un vecteur d'expression vide ou contenant l'ADNc codant hnRNP K et J. Le niveau de surexpression des hnRNP est mesuré aux niveaux transcriptionnel par RT-qPCR (A) et traductionnel par Western blotting (B) (n=3). La distinction des formes K et J est montrée sur la figure. (C) L'effet de cette surexpression des hnRNP K et J sur l'expression du gène NFKBIA est évalué en mesurant l'activité de son promoteur et du niveau de son transcrit. (C) Les cellules T47D surexprimant ou non les hnRNP K et J sont transfectées avec le plasmide contenant le gène codant la luciférase Firefly placé sous le contrôle du promoteur proximal du gène NFKBIA et celui contenant le gène codant la luciférase Renilla placé sous le contrôle du promoteur CMV. L'activité du promoteur NFKBIA est évaluée en mesurant l'activité de la luciférase Firefly rapportée à celle obtenue de la Renilla (n=3). Les résultats sont ainsi exprimés en activité relative de la luciférase (n=3). (D) Le niveau de transcrits du gène NFKBIA est évalué par RT-qPCR dans les cellules T47D surexprimant les hnRNP K et J (n=3). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

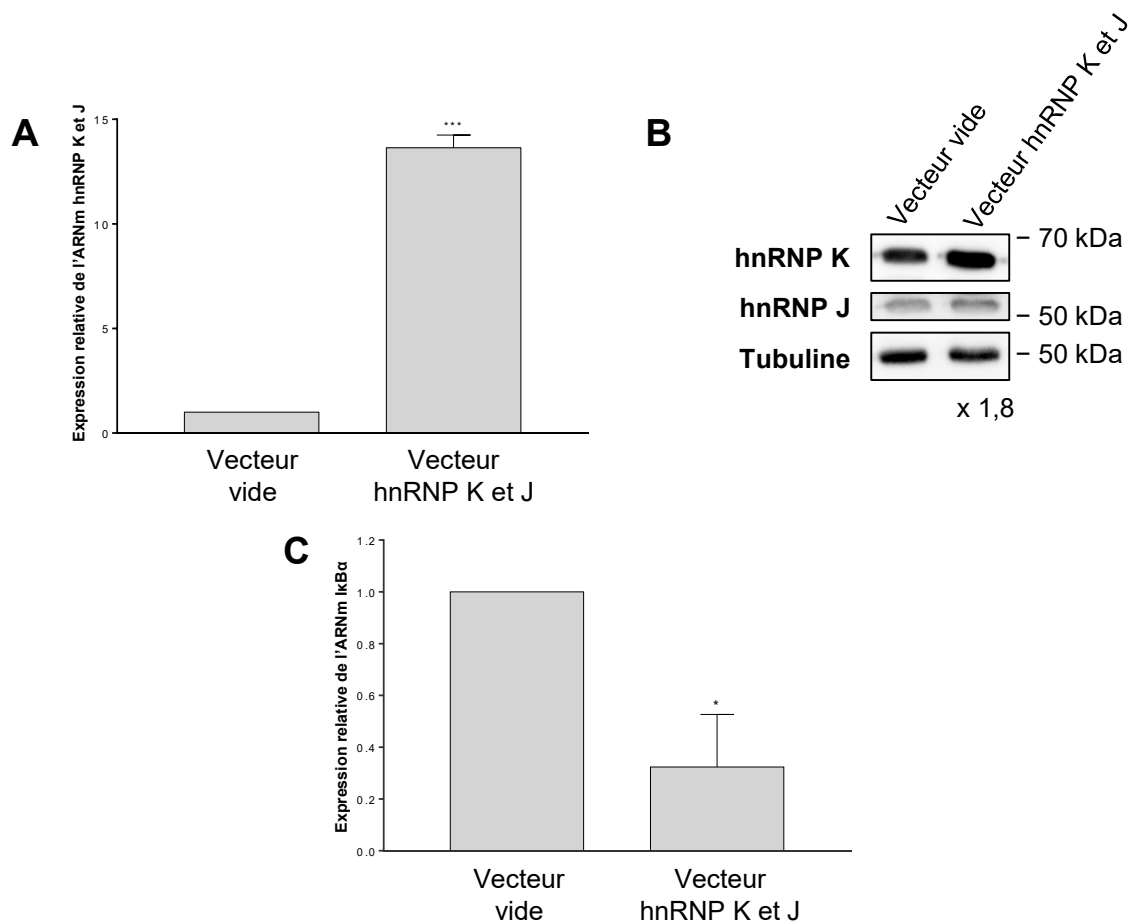


Figure 60: Effet d'une surexpression des protéines hnRNP K et J sur l'expression du gène NFKBIA dans les cellules MDA-MB231. Les cellules MDA-MB231 ont été transfectées avec un vecteur d'expression vide ou contenant l'ADNc codant hnRNP K et J. Le niveau de surexpression des hnRNP est mesuré aux niveaux transcriptionnel par RT-qPCR (A) et traductionnel par Western blotting (B) (n=3). La distinction des formes K et J est montrée sur la figure. (C) L'expression du gène NFKBIA est évalué au niveau transcriptionnel par RT-qPCR dans les cellules MDA-MB231 surexprimant ou non les hnRNP K et J (n=3). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

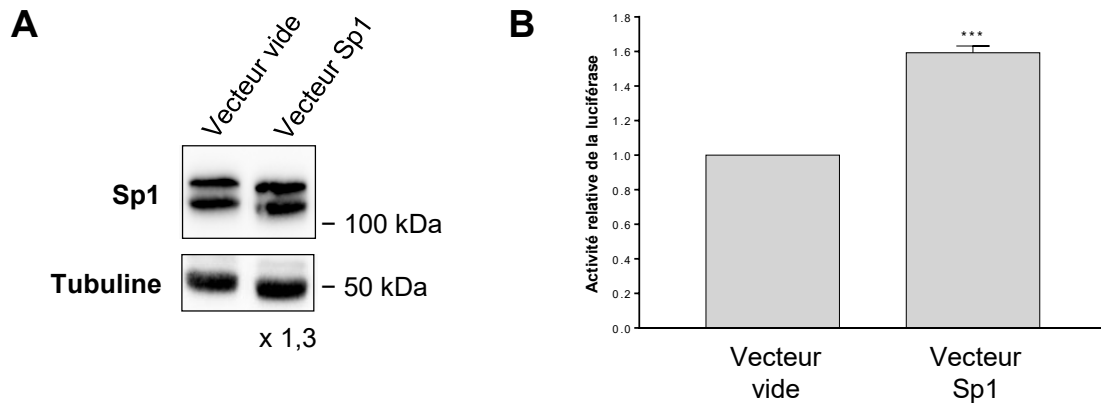


Figure 61 : Effet d'une surexpression de la protéine Sp1 sur l'activité du promoteur du gène NFKBIA dans les cellules T47D. Les cellules T47D ont été co-transfectées avec le plasmide permettant la surexpression de Sp1 ou le vecteur vide, celui contenant le gène codant la luciférase Firefly placé sous le contrôle du promoteur proximal du gène NFKBIA et le plasmide contrôle contenant le gène codant la luciférase Renilla placé sous le contrôle du promoteur CMV. (A) La surexpression de Sp1 est évaluée par western blotting avec les protéines totales extraites des cellules T47D. (B) L'influence de la surexpression de Sp1 sur l'activité du promoteur NFKBIA est évaluée en mesurant l'activité de la luciférase Firefly rapportée à celle obtenue de la Renilla. Les résultats sont ainsi exprimés en activité relative de la luciférase (n=3). ***p<0,001.

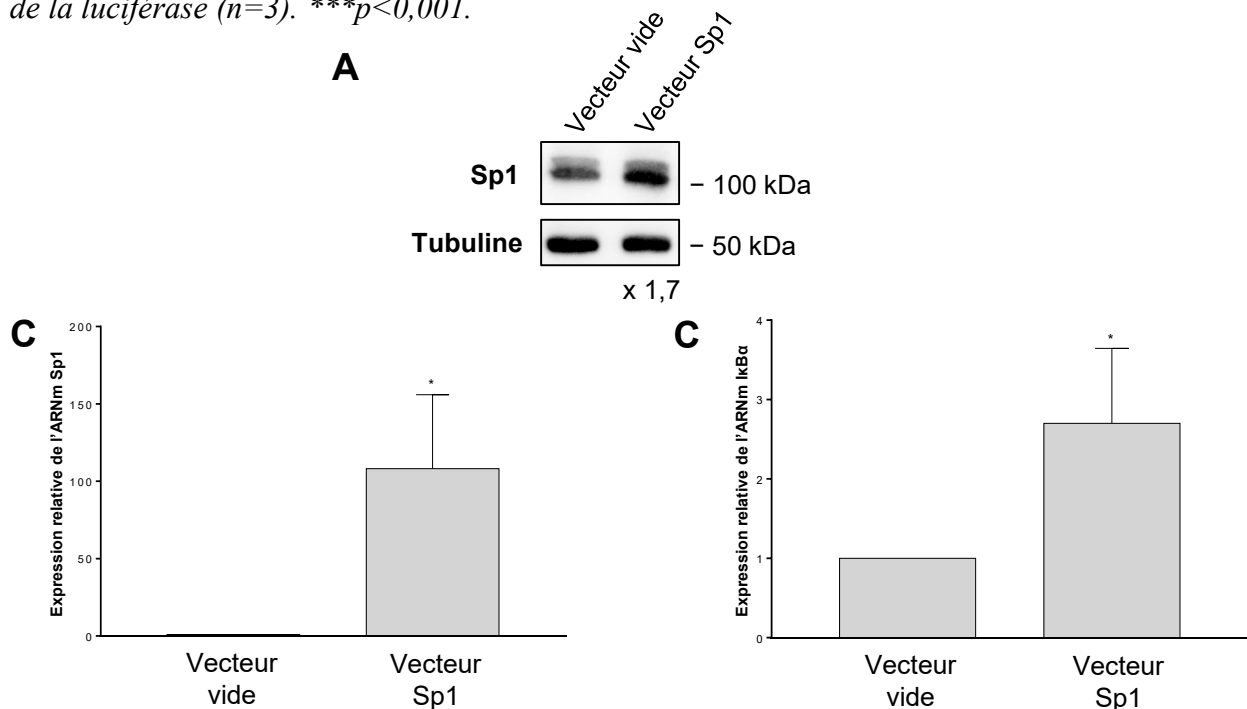


Figure 62 : Effet d'une surexpression de la protéine Sp1 sur l'expression du gène NFKBIA dans les cellules MDA-MB231. Les cellules MDA-MB231 ont été transfectées avec un vecteur d'expression vide ou contenant l'ADNc codant la protéine Sp1. Le niveau de surexpression de Sp1 est mesuré aux niveaux traductionnel par Western blotting (A) et transcriptionnel par RT-qPCR (A) (n=3). (C) L'expression du gène NFKBIA est évalué au niveau transcriptionnel par RT-qPCR dans les cellules MDA-MB231 surexprimant ou non Sp1 (n=4). *p<0,05.

III.2.2. Activité des protéines hnRNP K et J en présence d'une surexpression de Sp1

Afin d'évaluer l'importance de cette activité de répresseur des protéines hnRNP K et J en présence de Sp1, qui régule positivement l'expression du gène *NFKBIA*, nous avons réalisé des expériences visant à surexprimer en même temps les deux protéines.

Dans un 1^{er} temps, nous avons vérifié l'effet d'une surexpression de Sp1 sur l'expression du gène *NFKBIA*. Lorsque la protéine Sp1 est surexprimée transitoirement dans des cellules tumorales mammaires, à l'aide d'un plasmide contenant son ADNc (pCDNA Sp1), l'expression du gène *NFKBIA* est augmentée. En effet, dans les cellules T47D surexprimant Sp1, l'activité du promoteur proximal du gène *NFKBIA*, rapportée par l'activité relative de la luciférase, est augmentée de 1,6 fois par rapport aux cellules contrôles (**Figure 61**). De même, dans les cellules MDA-MB231, surexprimant Sp1, l'expression au niveau transcriptionnel du gène *NFKBIA* est augmentée d'environ 3 fois (**Figure 62**). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors des expériences de mutagenèse dirigée contre les sites de fixation de Sp1 et présentés en **figure 54**. Lorsque cette protéine Sp1 est surexprimée en même temps que les protéines hnRNP K et J de façon transitoire dans les cellules tumorales mammaires T47D, nous observons une diminution de l'activité du promoteur proximal du gène *NFKBIA* de 50 % (**Figure 63**), similaire à celle obtenue dans les mêmes cellules surexprimant seulement hnRNP K et J en **figure 59**. Ces résultats suggèrent donc que les protéines hnRNP K et J agissent bien comme un répresseur, capable d'empêcher l'activité d'un inducteur comme Sp1, sur le promoteur proximal du gène *NFKBIA*.

III.2.3. Activité des protéines hnRNP K et J en présence d'une surexpression de DDB2

Nous avons voulu évaluer l'importance de l'activité de répresseur des protéines hnRNP K et J en présence de DDB2, dont le laboratoire a montré antérieurement que sa surexpression de façon stable entraîne une augmentation de l'activité du promoteur proximal et de l'expression du gène *NFKBIA* dans les cellules tumorales mammaires (Ennen *et al.*, 2013).

Tandis que la surexpression transitoire de DDB2 conduit bien à une répression de ses gènes cibles *SOD2* et *BCL2*, traduite par la diminution de l'activité de leur promoteur respectif placé en amont du gène codant la luciférase dans les cellules HEK 293 (**Figure 63A et 63B**) et qui avait été montrée précédemment dans les cellules tumorales mammaires (Minig *et al.*, 2009;

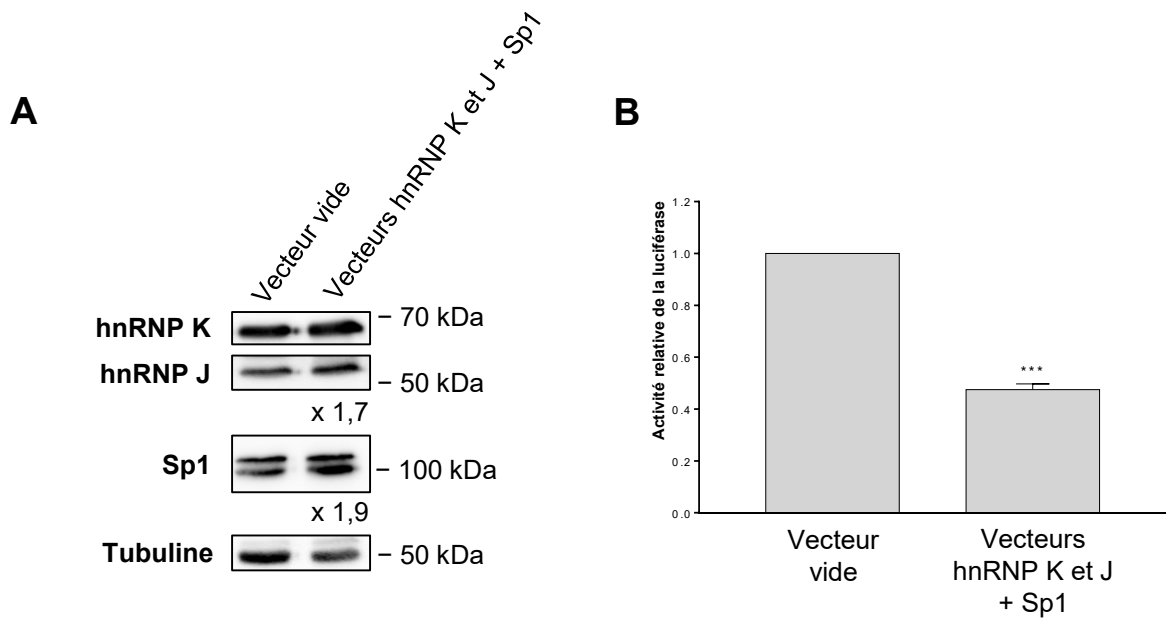


Figure 63 : Effet de la surexpression simultanée des protéines hnRNP K et J et Sp1 sur l'activité du promoteur du gène NFKBIA dans les cellules tumorales mammaires T47D. (A) Les cellules ont été transfectées avec un vecteur d'expression vide ou les deux contenant respectivement l'ADNc codant les protéines hnRNP K et J et Sp1. Le niveau de surexpression de Sp1 et des hnRNP est évalué par Western blotting (B) (n=3). Les cellules surexprimant les protéines ou non sont transfectées avec le plasmide contenant le gène codant la luciférase Firefly placé sous le contrôle du promoteur proximal du gène NFKBIA et celui contenant le gène codant la luciférase Renilla placé sous le contrôle du promoteur CMV. L'activité du promoteur NFKBIA est évaluée en mesurant l'activité de la luciférase Firefly rapportée à celle obtenue de la Renilla. Les résultats sont ainsi exprimés en activité relative de la luciférase (n=3). ***p<0,001.

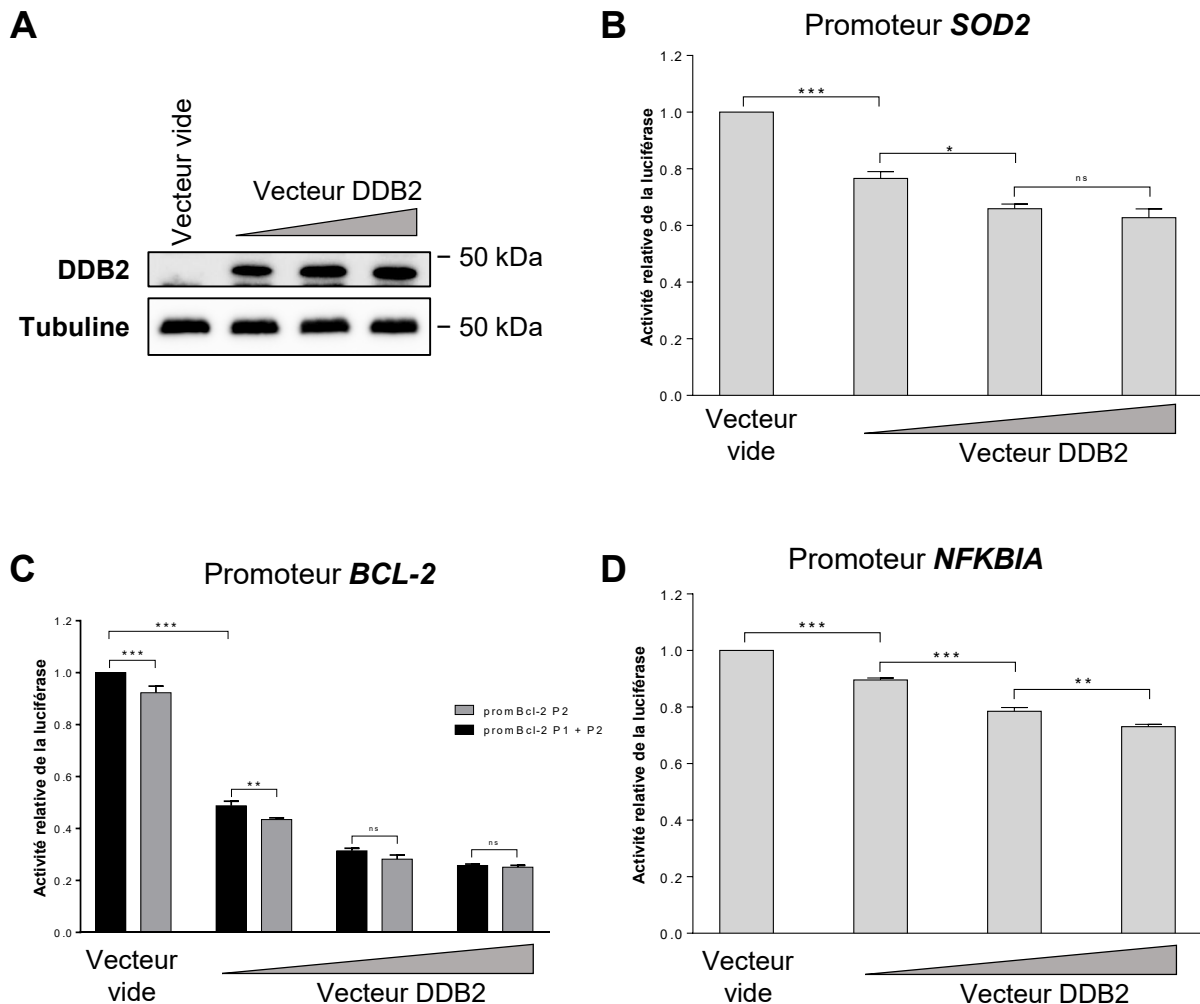


Figure 64 : Effet de la surexpression de la protéine DDB2 sur l'activité des promoteurs des gènes SOD2, BCL-2 et NFKBIA dans les cellules HEK 293. Les cellules HEK 293 ont été co-transfectées avec des quantités croissantes d'un plasmide permettant la surexpression de DDB2 (200, 400 et 600 ng pour 10^5 cellules), un plasmide contenant le gène codant la luciférase Firefly placé sous le contrôle du promoteur proximal du gène NFKBIA, ou SOD2 ou encore BCL-2. Les cellules reçoivent également le plasmide contrôle contenant le gène codant la luciférase Renilla. (A) La surexpression de DDB2 est évaluée par western blotting sur les protéines totales extraites des cellules HEK 293 à l'aide d'un anticorps spécifique. L'influence de la surexpression de DDB2 est évaluée sur l'activité du promoteur SOD2 (B), BCL-2 (C) et NFKBIA (D) est évaluée en mesurant l'activité de la luciférase Firefly rapportée à celle obtenue de la Renilla. Les résultats sont ainsi exprimés en activité relative de la luciférase ($n=3$). * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,001$.

Thèse de R. Klotz, 2014), nous n'avons cependant pas retrouvé l'activité inductrice de DDB2 sur l'expression du gène *NFKBIA*. Les résultats présentés en **figure 64** ont été obtenus sur les cellules HEK 293 surexprimant de façon transitoire DDB2 à des quantités croissantes (**Figure 64A**), qui révèlent de manière surprenante, une diminution de l'activité du promoteur proximal du gène *NFKBIA*, de manière dose dépendante de la protéine (**Figure 64C**). Néanmoins, nous avons réalisé des transfections des cellules HEK 293 avec les plasmides permettant de surexprimer en même temps DDB2 et les protéines hnRNP K et J afin d'évaluer les conséquences sur l'activité du promoteur proximal du gène *NFKBIA*. Trois expériences différentes ont été réalisées, faisant varier soit la quantité de vecteur d'expression de DDB2, ou de hnRNP K et J ou les deux mais inversement. Les résultats indiquent que l'effet répresseur des protéines hnRNP K et J sur le gène *NFKBIA* semble être augmenté lorsque la protéine DDB2 est surexprimée. En **figure 65A**, l'activité du promoteur proximal du gène dans les cellules HEK 293 est diminuée d'environ 20% en présence d'une surexpression seule de DDB2 pour atteindre jusqu'à 40% en combinant avec une quantité croissante de hnRNP K et J, en comparaison avec celle évaluée dans les cellules ne surexprimant aucune des protéines. Les mêmes résultats sont obtenus lorsque cette fois la quantité d'expression de DDB2 varie et celle des protéines hnRNP K et J reste constante (**Figure 65B**). Lorsque les protéines sont surexprimées de façon inverse, nous retrouvons bien une diminution de l'activité du promoteur proximal de *NFKBIA*. Cependant, cette diminution peut atteindre 50% de façon significative par rapport aux autres conditions de transfection, pour une quantité faible de hnRNP K et J et moyenne pour DDB2, et inversement (**Figure 65C**). Ces résultats suggèrent donc que l'activité de répresseur des protéines hnRNP K et J sur l'expression du gène *NFKBIA* semble dominer sur celle de DDB2, lorsque cette dernière est surexprimée de façon transitoire.

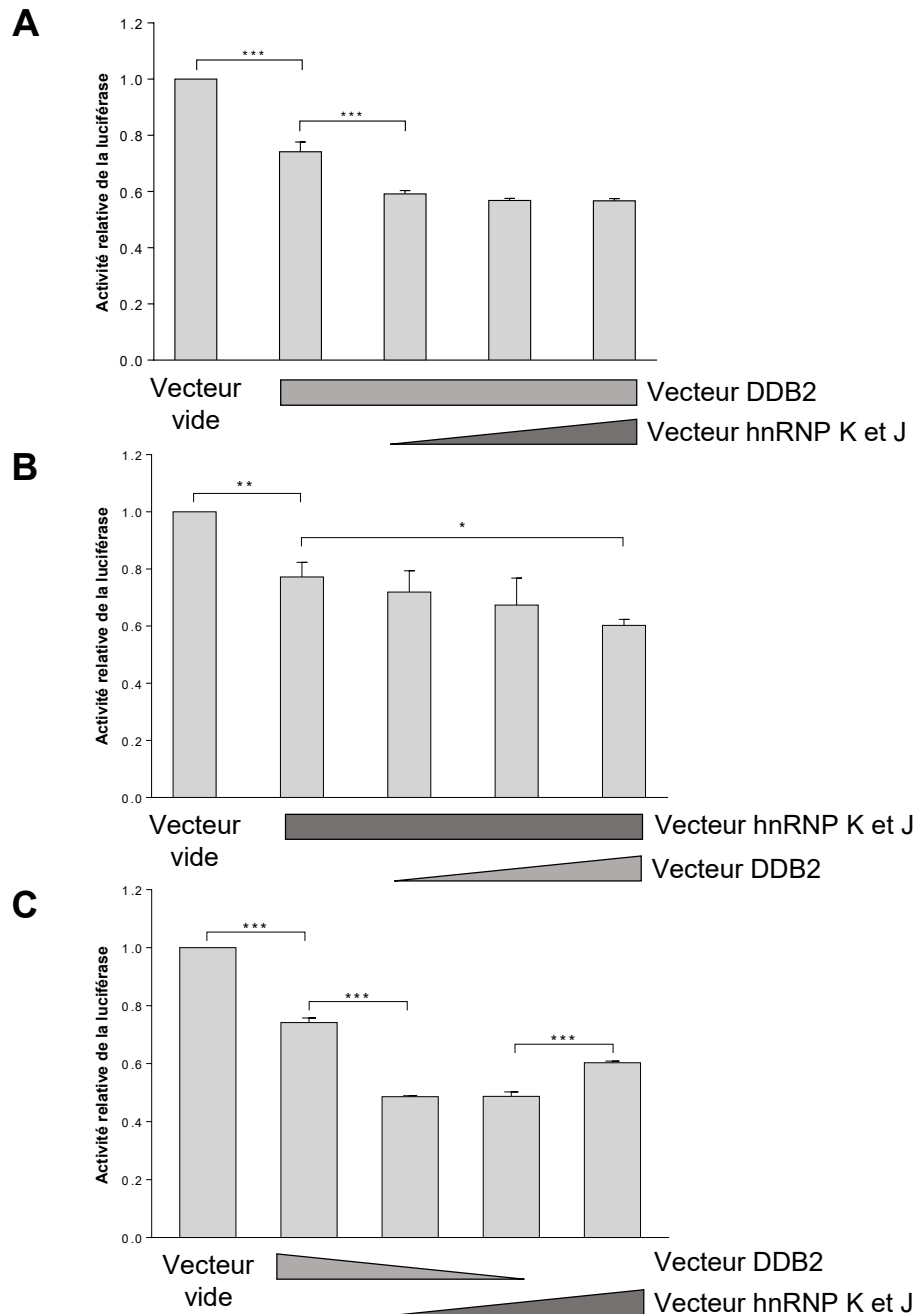


Figure 65 : Effet de la surexpression simultanée des protéines hnRNP K et J et DDB2 sur l'activité du promoteur du gène NFKB1A dans les cellules HEK 293. Les cellules ont été transfectées avec les plasmides contenant respectivement l'ADNc codant les protéines hnRNP K et J et DDB2, à des quantités différentes selon les conditions montrées sur la figure. Les cellules contrôles ont été transfectées quant à elles avec un vecteur d'expression vide. Les cellules surexprimant les protéines ou non sont ensuite transfectées avec le plasmide contenant le gène codant la luciférase Firefly placé sous le contrôle du promoteur proximal du gène NFKB1A et celui contenant le gène codant la luciférase Renilla placé sous le contrôle du promoteur CMV. L'activité du promoteur NFKB1A est évaluée en mesurant l'activité de la luciférase Firefly rapportée à celle obtenue de la Renilla. Les résultats sont ainsi exprimés en activité relative de la luciférase (n=3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

DISCUSSION GENERALE

En dehors de son implication dans la réparation de l'ADN par excision de nucléotides, la protéine DDB2 est capable de réguler l'expression de gènes cibles en se fixant sur des séquences spécifiques situées sur le promoteur de ces derniers. Ainsi, en agissant comme répresseur des gènes *SOD2* et *BCL2* codant respectivement les protéines SODMn et Bcl-2, DDB2 favorise la prolifération et la sensibilité aux chimiothérapies des cellules cancéreuses mammaires (Becuwe *et al.*, 2014; Kattan *et al.*, 2008b; Minig *et al.*, 2009; Thèse de R. Klotz, 2014). A l'inverse, en activant l'expression du gène *NFKBIA* codant l'inhibiteur cytoplasmique du facteur de transcription NF- κ B, DDB2 empêche l'acquisition des propriétés migratrices et invasives des cellules cancéreuses mammaires (Ennen *et al.*, 2013).

D'un point de vue structural, la protéine DDB2 possède un domaine hélice-boule-hélice à son extrémité N-terminale suivi d'un domaine WD40, connu pour intervenir dans les interactions protéine-protéine (Scrima *et al.*, 2008; Stirnimann *et al.*, 2010). Ainsi, en absence d'activité enzymatique, la protéine DDB2 ne peut à elle seule réguler l'expression de gènes cibles au niveau transcriptionnel. Elle recruterait alors d'autres protéines au niveau des promoteurs de ces gènes cibles afin de réguler l'expression génique. La protéine DDB2 est capable d'interagir avec le facteur de transcription E2F1 et d'augmenter l'expression des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN mais également avec des protéines de remodelage de la chromatine lors de la réparation de l'ADN (Datta *et al.*, 2001; Hayes *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2009). Certaines équipes ont déjà identifié des partenaires protéiques de DDB2 dans la transcription de gènes cibles dans des modèles de cancers du côlon ou de l'ovaire par des approches d'immunoprécipitation de chromatine ou de co-immunoprécipitation de protéines (Fantini *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2000; Roy *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014, 2015). Cependant, la recherche des partenaires protéiques de DDB2 dans la régulation génique n'a jamais fait l'objet d'étude précise dans les cellules cancéreuses mammaires. De plus, elle n'a pour l'instant pas permis d'expliquer l'activité inductrice ou répressive de DDB2 selon les gènes cibles dans les autres modèles de cellules tumorales.

I. DDB2 au sein du complexe UV-DDB dans la régulation de l'expression génique

Nous avons recherché les partenaires protéiques de DDB2 à partir des cellules d'adénocarcinome mammaire de la lignée MCF-7 qui expriment naturellement DDB2, par une approche de « DNA pull-down ». Cette technique a été réalisée en utilisant des sondes ADN d'environ 20 nucléotides dont les séquences sont issues des promoteurs des gènes *SOD2* et *NFKBIA* et contenant le site de fixation identifié pour DDB2 (5'- AGCCTGCAGCCT -3' pour *SOD2* et 5'- TCCCCTA -3' pour *NFKBIA*).

La réalisation de cette technique, très peu utilisée au laboratoire, a nécessité une mise au point qui a été réalisée à partir de la sonde ADN contenant le site de fixation pour la protéine DDB2 au niveau du promoteur du gène *NFKBIA*. La fixation de la protéine DDB2 sur sa séquence cible de ce promoteur avait été montrée par des expériences de retard de migration sur gel (Ennen *et al.*, 2013). Cette technique et celle du « DNA pull-down » reposent sur le même principe, à la différence que la seconde est réalisée sur une matrice solide de billes magnétiques tapissées de streptavidine et sur lesquelles est fixée une sonde ADN couplée à la biotine. C'est pourquoi nous avons utilisé, pour la liaison des protéines sur les sondes ADN, un tampon dont la composition est identique à celle utilisée pour les expériences de retard de migration sur gel. En particulier la concentration en KCl du tampon a été fixée à 40mM. Ces conditions correspondent à celles qui avaient été précédemment utilisées pour l'identification de la protéine DDB2 sur le promoteur du gène *SOD2* (Minig *et al.*, 2009). Les premiers résultats nous indiquent que les protéines DDB1 (Damaged-DNA Binding 1) et Cul4A (Culline 4A), appartenant au complexe UV-DDB, sont retrouvées parmi les protéines retenues sur les sondes ADN correspondant au promoteur des gènes *NFKBIA* et *SOD2*. Même si la présence de la Cul4A n'a pu être confirmée par la technique de retardement sur gel, la présence de l'ensemble du complexe sur les promoteurs est confirmée dans les cellules cancéreuses mammaires de la lignée MCF-7 par immunoprécipitation de chromatine. Il est possible que l'épitope reconnu par l'anticorps dirigé contre la protéine Cul4A ne soit pas accessible lors de la technique de retardement sur gel ou que les conditions de migration électrophorétique ne permettent pas de maintenir cette protéine au sein du complexe contrairement à l'approche par immunoprécipitation de chromatine qui nécessite la fixation des protéines sur la chromatine par une étape contenant du formaldéhyde. La présence de ces protéines a déjà été montrée sur le promoteur d'autres gènes cibles de DDB2 dans d'autres études. En effet, il a été montré par co-

immunoprécipitation de protéines que DDB2 réprime l'expression du gène *BCL2* en recrutant la protéine HDAC1 par l'intermédiaire de DDB1, et augmente ainsi la sensibilité des cellules cancéreuses ovariennes au cisplatine (Zhao *et al.*, 2014). Il a été également montré par une approche d'immunoprécipitation de chromatine réalisée sur les cellules cancéreuses coliques, que la protéine DDB2 forme un complexe avec DDB1 et Cul4A dans une région très similaire du promoteur des gènes *VEGFA*, *SNAIL* et *ZEB1*. L'expression de ces derniers est ainsi réprimée, avec pour conséquence que les cellules ne peuvent pas subir la transition épithélio-mésenchymateuse responsable de leurs capacités migratrices et invasives (Roy *et al.*, 2013). La présence de DDB2 au sein d'un complexe contenant DDB1 et Cul4A a également été mise en évidence au niveau du promoteur du gène *NFKB1A* dont l'expression en conséquence est augmentée. Ainsi, d'après nos résultats et les données de la littérature, la protéine DDB2 semble avoir pour partenaires privilégiés, les protéines formant le complexe UV-DDB dans la régulation de l'expression génique, comme dans la réparation NER des lésions de l'ADN. Contrairement à DDB2, aucune corrélation n'a été observée entre l'expression des protéines DDB1 et Cul4A, et les capacités invasives des cellules tumorales. C'est le cas des cellules tumorales invasives telles que Hs578T et MDA-MD231 qui expriment fortement DDB1 et Cul4A. Dans ces cellules, la forte expression des gènes *BCL2* et *SOD2* dépend d'un niveau très faible de DDB2.

Les protéines DDB1 et Cul4A n'ont jamais été réellement décrites comme étant capables d'interagir avec l'ADN, à l'inverse de DDB2. Il existe seulement une étude qui montre le rôle de DDB1 dans l'expression constitutive du gène codant la fibromoduline dans des fibroblastes, en interagissant avec une séquence spécifique sur la région promotrice différente de celles identifiées au laboratoire (Bevilacqua *et al.*, 2005). Nous pouvons donc supposer que le mécanisme de fixation du complexe UV-DDB sur le promoteur de gènes cibles serait similaire à celui impliqué dans la réparation NER, dans lequel la protéine DDB2 recrute les protéines DDB1 et Cul4A et fait le lien entre l'ADN et ces partenaires (Scrima *et al.*, 2008; Tang et Chu, 2002).

Nous n'avons pas déterminé le domaine d'interaction de DDB2 à l'ADN dans la transcription génique. Il est envisageable que les résidus de la protéine DDB2 interagissant avec l'ADN sur les promoteurs des gènes soient similaires à ceux impliqués lors de la réparation par excision de nucléotides. En effet, l'équipe de Zhao a montré que, dans les cellules cancéreuses ovariennes, la mutation K244E de la protéine DDB2 empêche sa fixation sur le promoteur du gène *BCL2* (Zhao *et al.*, 2014). Cette mutation, retrouvée chez certains patients XP-E, empêche

la reconnaissance de lésions de l'ADN par DDB2 et le recrutement du complexe UV-DDB lors de la réparation de l'ADN par excision de nucléotides (Luijsterburg *et al.*, 2012; Tang et Chu, 2002). Ces patients présentent alors une sensibilité accrue aux UV et développent rapidement des cancers de la peau en raison d'une mauvaise réparation des lésions de l'ADN. Ce constat est le même chez des patients porteurs de la mutation D307Y du gène codant une protéine DDB2 incapable d'interagir avec DDB1 (Luijsterburg *et al.*, 2012; Tang et Chu, 2002). Chez ces patients, porteurs d'une de ces mutations décrites du gène codant une DDB2 non fonctionnelle, le développement et la progression de tumeurs pourraient dépendre, non seulement d'une déficience du système de réparation de l'ADN, mais également d'une expression dérégulée des gènes cibles, liée à un défaut dans le recrutement du complexe UV-DDB sur l'ADN.

L'unique activité enzymatique connue du complexe UV-DDB est portée par la fonction E3 ubiquitine ligase de la Cul4A. Lors de la réparation de l'ADN, elle favorise l'ajout de groupements ubiquitine sur les histones H2A, H3 et H4, qui conduit à leur dégradation, et favorise ainsi la décondensation de la chromatine (Lan *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2006). Cette activité de la Cul4A doit également permettre une décondensation et un remodelage de la chromatine, indispensable pour l'expression des gènes, en favorisant le recrutement au niveau des séquences régulatrices, non seulement du complexe UV-DDB mais également des facteurs de transcription activateurs ou inhibiteurs de la transcription génique. C'est le cas du gène *SOD2*, pour lequel le laboratoire a montré que la présence de DDB2, au sein du complexe UV-DDB, favorise le recrutement du facteur de transcription AP-2 α connu comme répresseur de ce gène, en agissant sur le remodelage de la chromatine (Minig *et al.*, 2009). De même, l'activation du gène *NFKB1A* par DDB2 pourrait également être reliée à l'activité ubiquitine ligase de Cul4A, responsable de la décondensation de la chromatine et donc favorable à la transcription génique.

II. DDB2, remodelage de la chromatine et régulation des gènes

Les protéines DDB2 et DDB1 possèdent un ou plusieurs domaines WD40 (1 pour la protéine DDB2 et 3 pour la DDB1), connus pour intervenir dans les interactions protéine-

protéine (Fischer *et al.*, 2011; Stirnimann *et al.*, 2010). Ainsi, la mise en évidence du complexe UV-DDB sur les séquences cibles de DDB2 par « DNA pull-down » nous a permis de valider cette approche et de rechercher par la suite d'autres protéines susceptibles d'interagir avec les domaines WD40 des protéines DDB1 et DDB2 et ainsi d'intervenir plus spécifiquement dans la régulation de l'expression génique. Nos résultats de « DNA pull-down » et d'immunoprécipitation de chromatine ont d'ailleurs confirmé ceux obtenus précédemment au laboratoire (Ennen *et al.*, 2013), au sujet du recrutement de l'histone acétyl transférase p300 au niveau du promoteur du gène *NFKBIA*. La présence de p300 conjointement avec celle de DDB2 est connue dans le cadre de la réparation de l'ADN afin de décondenser la chromatine et augmenter l'accessibilité des sites lésés à la machinerie de réparation (Datta *et al.*, 2001). Ainsi, le recrutement de la protéine p300 sur le promoteur du gène *NFKBIA* par DDB2 intervient dans l'expression augmentée du gène *NFKBIA*, et devrait être associé à une augmentation de l'acétylation des histones que nous n'avons pas vérifiée au cours de ce travail. Tout comme p300, il a déjà été décrit que le recrutement par DDB2 de SWI/SNF ou encore STAGA permettent un relâchement de la chromatine favorable au recrutement de l'ARN polymérase et à l'expression de gènes (Martinez *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2009). Cependant, nous n'avons pas observé la présence de p300 sur le promoteur du gène *SOD2*, dont DDB2 réprime l'expression. Cette observation est en accord avec le niveau très faible d'acétylation de l'histone H3 au niveau de la lysine 27 (H3K27) et de la lysine 9 (H3K9), montré antérieurement au laboratoire (Minig *et al.*, 2009 ; Thèse de R. Klotz, 2014). Dans le cas du gène *BCL2*, la fixation de DDB2 sur le promoteur entraîne au contraire le recrutement de la protéine HDAC1 et ce par l'intermédiaire de DDB1 (Zhao *et al.*, 2014). Cependant, notre analyse protéomique réalisée avec la séquence de DDB2 sur le promoteur du gène *SOD2* réprimée comme celui codant *BCL2* ne nous a pas permis de confirmer la présence de cette protéine HDAC1.

D'autres protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine, telles que EZH2 et Suv39h, ont déjà été décrites dans la littérature comme partenaires directs ou recrutés par DDB2 sur des gènes cibles. En recrutant l'histone méthyl transférase EZH2, DDB2 réprime les gènes codant la protéine NEDD4L, RNF43 et ALDH1A1 en se fixant sur des séquences d'ADN proches de celle que le laboratoire a identifié dans le promoteur du gène *SOD2* (Zhao *et al.*, 2015 ; Cui *et al.*, 2018). Cependant, nos analyses protéomiques issues des expériences de « DNA pull-down » n'ont pas permis de révéler la présence de EZH2 sur la séquence cible du promoteur *SOD2*, malgré les résultats du laboratoire montrant que DDB2, en se fixant sur cette séquence, entraîne une augmentation de la diméthylation de l'histone H3 sur la lysine 4

(Kampilafkos *et al.*, 2015; Mahmoud *et al.*, 2016; Minig *et al.*, 2009). De même, nous n'avons pas retrouvé Suv39h dans nos analyses protéomiques réalisées sur la séquence cible de DDB2 dans le promoteur du gène *SOD2*, contrairement à ce qui a été montré par l'équipe de Roy (Roy *et al.*, 2013). Cette équipe a en effet révélé la présence de Suv39h pour les gènes cibles identifiés, dont DDB2 réprime l'expression, tels que *VEGFA*, *SNAIL* et *ZEB1*. Il n'est pas exclu que d'autres histone méthyl transférase interviennent dans l'activité de DDB2 sur l'expression des gènes, qui restent à identifier en répétant les analyses protéomiques globales.

III. Les autres partenaires potentiels de DDB2

L'analyse protéomique globale, réalisée avec la plateforme du Dr Schaeffer (LSMBO, CNRS, UMR7178) a conduit à identifier un nombre trop important de partenaires potentiels de DDB2 dans la régulation génique. Parmi eux, la présence de nombreuses protéines appartenant aux complexes de réparation par recombinaison non homologue (XRCC5/6,) des mésappariements (HMGB1/MSH2/MSH3), des cassures double brin (APEX1/PNPK/XRCC1, PolB et PARP1) ou encore par excision de nucléotides comme ERCC2 (XPD) ont révélé la limite de la technique de « DNA pull-down ». La présence de ces protéines de réparation peut s'expliquer par le fait que les sondes *NFKB1A* et *SOD2* utilisées pour le « DNA pull-down » sont reconnues comme une cassure double brin. Néanmoins, la présence de PARP1 et de XRCC5/6, avec un pourcentage de recouvrement assez élevé, sur les deux sondes, a retenu notre attention. PARP1 a déjà été décrite pour interagir avec DDB2 et induire sa poly-ADP ribosylation dans le cadre de la réparation NER. Cette modification post traductionnelle permet de stabiliser DDB2 sur la lésion (Pines *et al.*, 2012). Nous pouvons émettre l'hypothèse que la poly-ADP ribosylation de DDB2 par PARP1 stabiliserait sa fixation sur la séquence cible dans la région promotrice des gènes dans le cadre de la régulation transcriptionnelle, et éviterait son ubiquitinylation par la Cul4A. Cependant, nous n'avons pas confirmé la présence de PARP1 sur le promoteur de ces gènes. Concernant XRCC5/6, une étude réalisée avec les cellules cancéreuses coliques a montré que DDB2 active l'expression du gène *SEMA3A* codant la Sémaphorine 3A, en s'associant avec les protéines XRCC5/6 sur une séquence similaire à celle identifiée sur le promoteur du gène *NFKB1A* (5'-TCCCCTA-3') (Fantini *et al.*, 2017). Les protéines XRCC5/6 sont surtout connues pour leur rôle dans la réparation de l'ADN par recombinaison non homologue.

Afin de diminuer le nombre de protéines retenues lors de cette analyse par spectrométrie de masse, une seconde analyse a été réalisée uniquement sur la sonde *NFKBIA*, avec une sonde neutre comme témoin, correspondante à une séquence ne permettant pas la fixation de facteurs de transcription connus. De plus, cette analyse s'est focalisée sur une taille des partenaires potentiels de DDB2 comprise entre 50 et 70 kDa, retenues par « DNA pull-down » et visualisés par électrophorèse, puis identifiés par spectrométrie de masse par le Dr Vincourt (IMoPa, UMR 7065 CNRS). Le gel électrophorétique montre bien une présence importante de protéines retenues sur la sonde *NFKBIA* qui se distingue de celles retenues par la sonde neutre. Malgré la présence de facteurs de transcription tels que FUSE 1 et 3 ou far upstream element-binding 1 et 3, GLI-Krupple related protein, et ZFM1, retenus sur la sonde *NFKBIA*, notre intérêt s'est porté plus particulièrement vers une famille de protéines interagissant avec des ARNs, qui comprend les protéines hnRNP K et J, parce qu'elles ont été retrouvées également lors de la première analyse réalisée par le Dr Schaeffer à Strasbourg, avec un score de recouvrement élevé.

IV. Les protéines hnRNP K et J : des partenaires potentiels intéressants de DDB2 dans la régulation génique

La protéine hnRNP K est connue initialement pour son rôle dans les processus d'épissage et de traduction en interagissant avec les ARNm dont les séquences sont riches en cytidines (Barboro *et al.*, 2014; Piñol-Roma *et al.*, 1988). Aussi sa présence sur la sonde *NFKBIA* n'est pas totalement surprenante dès lors qu'elle est décrite pour sa capacité à interagir avec des acides nucléiques simple et double brins (Bomsztyk *et al.*, 2004; Swanson et Dreyfuss, 1988). La fixation de cette protéine sur les acides nucléiques est rendue possible grâce à la présence à son extrémité N-terminale de trois domaines appelés domaines KH (hnRNP K Homology domain). Ces trois domaines sont suivis d'une région impliquée dans les interactions avec d'autres protéines, appelée KI (K-protein-Interactive region). Elle possède également un domaine d'interaction avec des protéines kinases à son extrémité C-terminale (Dejgaard et Leffers, 1996; Lu et Gao, 2016). La protéine hnRNP K, qui appartient à la famille de protéines PCBP (Poly(C)-Binding Protein), est capable d'interagir avec l'ADN sur des séquences spécifiques riches en C (Makeyev et Liebhaber, 2002). Plus précisément, elle est capable de se fixer sur des séquences CCCTCCC parfaites ou imparfaites (Bomsztyk *et al.*, 2004; Tomonaga

et Levens, 1995), qui sont très similaires à celle utilisée lors du « DNA pull-down », qui est GTCCTTCCCCTTAGAAG. Il n'est donc pas totalement surprenant de trouver cette protéine au niveau de cette séquence du promoteur *NFKBIA*, comme le confirment les expériences d'immunoprécipitation de chromatine.

Les expériences de Western blotting confirmant la présence de la protéine hnRNP K sur la sonde ADN ont révélé l'existence d'une seconde bande de taille légèrement inférieure qui a retenu notre attention. Dans ce sens, nos expériences entreprises ont permis de montrer que cette protéine de taille plus petite pouvait être la forme J, qui, d'après la littérature, est décrite comme une isoforme de la protéine hnRNP K. Elle est issue d'un épissage alternatif au niveau du premier exon de l'ARNm codant la forme K (Bomsztyk *et al.*, 2004). L'anticorps commercial développé ne permet d'ailleurs pas de distinguer les deux formes de hnRNPs. En dehors de ces données, aucune étude portant sur la protéine hnRNP J n'a été réalisée et sa fonction reste à l'heure actuelle totalement inconnue. De façon surprenante, cette protéine est également surexprimée lorsque les cellules sont transfectées avec le plasmide contenant l'ADNc codant la protéine hnRNP K. Un ARNm transcrit à partir d'un ADNc ne pouvant pas être épissé, il est alors envisageable que la protéine que nous avons appelée hnRNP J ne soit pas issue d'un épissage alternatif mais plutôt d'une modification post-traductionnelle pouvant être un clivage protéolytique. Néanmoins, cette forme J présente une meilleure affinité pour la séquence *NFKBIA* que la protéine hnRNP K. Ce résultat est à associer avec celui montrant que cette forme J, strictement nucléaire est principalement liée à la chromatine.

Afin de montrer les conséquences sur l'expression du gène *NFKBIA* de la fixation de hnRNP K et J sur la séquence cible de DDB2 au niveau du promoteur, nous avons réalisé des expériences visant à surexprimer ces protéines, ainsi que DDB2 et un autre régulateur de ce gène tel que Sp1. C'est ainsi que nous avons observé que la surexpression des hnRNP K et J à la fois dans les cellules normales HEK 293 et les cellules cancéreuses mammaires, entraînait une diminution de l'activité du promoteur et de l'expression du gène *NFKBIA*, suggérant que ces protéines surexprimées ont un rôle de répresseur génique. D'autres équipes ont déjà montré l'implication de cette hnRNP dans la régulation de l'expression génique, et ce à plusieurs niveaux. Elle peut intervenir dans la régulation de la traduction, dans la stabilité des ARNm, l'épissage des pré-ARNm mais également dans la régulation transcriptionnelle (Bomsztyk *et al.*, 2004). En effet, il a été montré que la protéine hnRNP K est retrouvée sur la chromatine au niveau de *loci* de nombreux gènes mais de façon plus importante lorsque ces gènes sont transcriptionnellement actifs par rapport à ceux non exprimés (Ostrowski *et al.*, 2003). D'autres

données de la littérature indiquent que hnRNP K peut interagir à la fois *in vitro* et *in vivo* avec des facteurs de remodelage de la chromatine, comme la protéine du groupe Polycomb Eed et des ADN méthyl transférases, mais également avec des facteurs généraux de la transcription, comme les protéines TBP (TATA-Box binding Protein) et TFIID (Transcriptional Factor IID) ou encore avec des facteurs de transcription comme Zik1 (Zinc finger protein Interacting with ribonucleoprotein K), MZF1 (Myeloïd Zinc Finger 1), Pur α ou Sox10 (Bomsztyk *et al.*, 2004; Da Silva *et al.*, 2002; Denisenko et Bomsztyk, 1997; Denisenko *et al.*, 1996; Michelotti *et al.*, 1996; Shnyreva *et al.*, 2000). C'est ainsi que la protéine hnRNP K a été décrite comme étant capable de réguler l'expression transcriptionnelle de plusieurs gènes. Comme le gène *NFKBIA*, les hnRNPs ont été montrées comme étant capables de réprimer certains gènes comme celui codant l'ostéocalcine, la thymidine kinase humaine ou encore le récepteur à l'acétylcholine neuronal (Du *et al.*, 1998; Lau *et al.*, 2000; Stains *et al.*, 2005). Dans nos cellules, le mécanisme par lequel les protéines hnRNP K et J répriment l'expression du gène *NFKBIA* restent encore à définir. Nous savons, d'après nos expériences de co-immunoprécipitation de protéines, que ce mécanisme ne dépend pas d'une interaction physique entre les protéines hnRNP K et J et DDB2, ni tout autre régulateur connu du gène *NFKBIA*. Il est cependant envisageable que les protéines hnRNP K et J recrutent d'autres protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine ou dans la transcription génique, en présence de DDB2. A l'heure actuelle, hnRNP K n'a pas été montrée seulement dans la répression de l'expression génique. Elle peut également activer l'expression de certains gènes comme l'oncogène *CMYC*, le gène *SRC1A* codant le récepteur tyrosine kinase c-Src, ceux codant la protéine antiapoptotique c-Flip, le facteur de traduction eIF4E (eucaryotic translation Initiation Factor 4E), la tyrosine hydroxylase, le gène *LDLR* (Low Density LipoReceptor) codant un récepteur lipidique (Banerjee *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2010; Li et Liu, 2010; Lynch *et al.*, 2005; Michelotti *et al.*, 1996; Ritchie *et al.*, 2003). Enfin, comme décrit précédemment, les protéines hnRNP K et J sont des protéines connues pour interagir avec des acides nucléiques double et simple brins. Il est alors envisageable que ces protéines recrutent des miR afin de réguler l'expression du gène *NFKBIA*.

V. Relation entre DDB2, Sp1 et hnRNP K et J dans la régulation de l'expression du gène *NFKBIA*

Afin de préciser l'importance des protéines hnRNP K et J dans la répression du gène *NFKBIA*, par rapport aux protéines DDB2 et Sp1 qui sont connues pour induire son expression, nous avons réalisé des expériences visant à moduler de façon transitoire l'expression de ces protéines dans les cellules normales HEK293 et dans les cellules tumorales mammaires. Très peu d'études sont recensées dans la littérature au sujet de la régulation transcriptionnelle du gène *NFKBIA*.

Dans le cas de DDB2, ces expériences révèlent que sa surexpression transitoire dans les cellules HEK 293, entraîne une diminution de l'expression du gène *NFKBIA*. Ces résultats surprenants vont à l'encontre de ceux obtenus précédemment au laboratoire montrant DDB2 comme un régulateur positif dans les cellules cancéreuses mammaires (Ennen *et al.*, 2013) et que nos expériences de mutagenèse dirigée vers son site de fixation dans le promoteur du gène cible durant ce travail confirment l'importance de cette protéine comme un régulateur positif du gène *NFKBIA*. Les différences importantes entre le présent travail et les études précédentes publiées par le laboratoire sont d'une part le type cellulaire utilisé, d'autre part que la surexpression de DDB2 est transitoire. Le choix s'est porté sur les cellules normales HEK 293, pour leur efficacité de transfection. Dans ce cas, il est possible que l'activité de DDB2 soit dépendante de la lignée cellulaire et que la surexpression stable de DDB2, réalisée pour les études précédentes (Ennen *et al.*, 2013) et nécessitant une étape de sélection des cellules, a conduit à l'émergence de clones cellulaires présentant des mécanismes moléculaires dans lesquels l'activité de DDB2 est différente. Néanmoins, nous avons pu observer, dans les cellules HEK 293, que l'activité répressive des protéines hnRNP K et J s'ajoute à celle de DDB2 lorsque ces protéines sont surexprimées conjointement. Même si l'activité des hnRNP K et J semble plus importante, elle n'empêche pas celle de DDB2, suggérant que ces protéines semblent réguler de façon indépendante l'expression du gène *NFKBIA* lorsqu'elles sont surexprimées de façon transitoire.

Le facteur de transcription Sp1, quant à lui, joue un rôle majeur dans la régulation de nombreux gènes impliqués dans divers processus biologiques fondamentaux, notamment ceux impliqués dans la tumorigenèse, comme la prolifération, la survie, l'apoptose, l'angiogenèse, la réparation de l'ADN ainsi que l'invasion tumorale (Beishline et Azizkhan-Clifford, 2015). Le rôle activateur du facteur de transcription Sp1 sur l'expression du gène *NFKBIA* a été

confirmé par mutagenèse dirigée mais également en le surexprimant dans les cellules cancéreuses mammaires. De façon surprenante, une double mutation des sites de fixation pour Sp1 et DDB2 restaure en partie l'activité du promoteur du gène *NFKBIA*. Il est possible d'imaginer que l'absence de fixation de Sp1 et de DDB2, liée à la mutagenèse dirigée, favorise le recrutement d'un facteur activateur de la transcription à activité mineure, puisque le double mutant restaure très partiellement l'activité transcriptionnelle. Nos résultats indiquent que l'activité répressive des protéines hnRNP K et J domine sur celle activatrice de Sp1 dans les cellules cancéreuses mammaires T47D. Ces résultats avaient déjà été observés dans le cas de la régulation des gènes codant l'ostéocalcine, la thymidine kinase humaine et le récepteur à l'acétylcholine neuronal. D'après les auteurs, la protéine hnRNP K, en se fixant sur l'ADN, empêcherait le recrutement du facteur de transcription Sp1 sur le promoteur de ces gènes (Du *et al.*, 1998; Lau *et al.*, 2000; Stains *et al.*, 2005). Ces résultats s'expliqueraient par la forte homologie de séquence entre le site de fixation pour Sp1 (CCCGCCC) et celui pour hnRNP K (CCCTCCC) (Bomsztyk *et al.*, 2004). Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que les protéines hnRNP K et J, lorsqu'elles sont surexprimées, prennent la place de Sp1 sur son site de fixation principal et situé en -36 pb, comme confirmé par nos résultats, dans la région promotrice, et exerce ainsi sa répression du gène *NFKBIA*. Cette activité répressive par interférence sur le site Sp1 pourrait dépendre également de la forme J, dont nous avons montré que sa localisation nucléaire est surtout au niveau de la chromatine et qu'elle semble avoir plus d'affinité pour la séquence cible du promoteur *NFKBIA*, similaire à celle décrite par Bomsztyk *et al.* (2004). Néanmoins, ce mécanisme ne semble pas être général, puisqu'à l'inverse, une équipe a montré que hnRNP K, dans son rôle d'activateur de la transcription génique, induisait l'expression du gène codant la protéine c-Src en coopération avec la protéine Sp1 (Ritchie *et al.*, 2003).

VI. Les hnRNP K et J dans la régulation de l'activité constitutive de NF- κ B et dans la tumorigenèse

Nous avons mis en évidence, pour la première fois, une relation entre les protéines hnRNP K et J, et le niveau d'expression du gène *NFKBIA*, codant l'inhibiteur cytoplasmique du facteur de transcription NF- κ B. En 2014, l'équipe de Liepelt avait déjà établi une relation entre la forme K et la voie de signalisation du facteur de transcription NF- κ B dans des

macrophages. Dans ce cas précis, à l'inverse de nos résultats, la protéine hnRNP K a un rôle inhibiteur de la voie NF- κ B, lorsqu'elle se fixe sur un élément riche en C dans la partie 3'-UTR de l'ARNm codant la kinase TAK1 pour diminuer sa traduction. Cette protéine TAK1, lorsqu'elle est activée, phosphoryle les protéines IKK qui à leur tour phosphorylent I κ B α avant que cette dernière subisse la dégradation, conduit ainsi à l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Liepelt *et al.*, 2014).

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine d'une activité constitutive du facteur de transcription NF- κ B dans les cellules tumorales comme nous l'avons décrit dans la partie introductive. Parmi eux, une dérégulation de l'expression ou de l'activité de la protéine I κ B α peut être responsable de l'activation constitutive de NF- κ B dans les tumeurs mammaires. La protéine I κ B α est très peu exprimée dans les cellules ER- SKBR3, Hs578T et MDA-MB231, très agressives, dont l'activité de NF- κ B est constitutive par comparaison avec les cellules ER+ MCF-7 et T47D, peu agressives (Ahmed *et al.*, 2006; Biswas *et al.*, 2004; Nakshatri *et al.*, 1997; Sovak *et al.*, 1997). Ces résultats sont confirmés par l'étude de la base de données TCGA (The Cancer Genome Atlas), qui indique qu'une forte expression du gène *NFKBIA* dans les cellules tumorales mammaires de patientes atteintes de cancer du sein est associée à un meilleur taux de survie globale de ces patientes, par opposition à celles présentant un faible niveau d'expression de ce gène au niveau tumoral. De plus, une étude rétrospective réalisée sur plus de 5000 tumeurs suggère que l'activation constitutive de NF- κ B pourrait être causée, dans 32,8% des cas, par la délétion du gène *NFKBIA* (Bredel *et al.*, 2013). Dans les cellules triples négatives (TNBC), les mécanismes conduisant à l'activation constitutive de NF- κ B sont à l'heure actuelle très peu décrits. Il a été montré dans ces cellules qu'une forte expression de la protéine NIK (NF- κ B Inducing Kinase) conduisant à l'activation des kinases IKK et à la dégradation de la protéine I κ B α , pouvait être responsable d'une activité constitutive de NF- κ B (Yamamoto *et al.*, 2010).

L'activité constitutive de NF- κ B découlant d'une modification dans la régulation de l'expression du gène *NFKBIA* est décrite dans plusieurs études, qui montrent qu'une simple variation du niveau d'expression de la protéine I κ B α est suffisante pour conduire à une activité constitutive du facteur de transcription. L'absence ou la faible expression d'un régulateur du gène *NFKBIA* peut donc contribuer également à l'activité constitutive de NF- κ B. C'est le cas de DDB2, dont la faible expression est associée à une activité constitutive de NF- κ B dans les cellules tumorales mammaires agressives (Ennen *et al.*, 2013). Dans le même sens, une étude plus ancienne a montré dans les cellules MCF-7 que la surexpression de la transglutaminase 2,

est responsable d'une diminution du niveau d'expression de la protéine IκBα et en conséquence d'une activité constitutive de NF-κB (Kim *et al.*, 2008). A l'issue de ce travail, nous pouvons considérer que les hnRNP K et J participent au mécanisme conduisant à l'activation constitutive de NF-κB en réprimant l'expression du gène *NFKBIA*. Cependant, aucune différence significative du niveau d'expression des hnRNP K et J n'est observée entre toutes les cellules tumorales mammaires et ne permet pas d'expliquer comment dans ce cas ces protéines soient responsables d'une activité constitutive de NF-κB uniquement dans les cellules tumorales agressives. Néanmoins, le fait que la forme J des hnRNPs soit retrouvée majoritairement et de façon significative liée à la chromatine dans les noyaux des cellules métastatiques MDA-MB231, contrairement aux cellules T47D moins agressives, expliquerait la différence dans l'activité constitutive de NF-κB selon les hnRNPs. C'est cette forme J qui est soupçonnée d'intervenir de façon importante dans la répression du gène *NFKBIA* par son affinité élevée pour le promoteur.

Les protéines hnRNPK et J, en contribuant à l'activité constitutive de NF-κB, doivent ainsi jouer un rôle dans la tumorigenèse mammaire. Comme décrit dans l'introduction, NF-κB est impliqué dans la prolifération, la progression métastatique et l'échappement thérapeutique des tumeurs mammaires. Certaines études ont déjà décrit l'implication de la protéine hnRNP K dans le développement des tumeurs, sans beaucoup de précisions (Lu et Gao, 2016). Cette implication semble dépendre de la nature de certains de ces gènes cibles. C'est le cas des oncogènes codant la protéine c-myc et c-Src, impliqués dans de nombreuses voies de signalisation et dans de nombreux cancers (Evans *et al.*, 2003; Lieu et Kopetz, 2010; Michelotti *et al.*, 1996; Ritchie *et al.*, 2003; Takimoto *et al.*, 1993; Tomonaga et Levens, 1995). De même, hnRNP K est capable d'activer l'expression du facteur de traduction eIF4E (eucaryotic translation Initiation Factor 4E) en se fixant sur son promoteur, entraînant ainsi une transformation néoplasique des cellules de type HeLa (Lynch *et al.*, 2005). De par son rôle dans la régulation de l'expression de ces gènes, hnRNP K est considérée comme une oncoprotéine, et cette idée est renforcée par de nombreuses données cliniques rapportant la surexpression de cette protéine dans plusieurs pathologies cancéreuses comme certains mélanomes, cancers de la prostate, du sein, du côlon, des poumons ou encore des voies orales (Barboro *et al.*, 2009; Carpenter *et al.*, 2006; Gallardo *et al.*, 2016; Matta *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2012).

Le fait que les protéines hnRNP K et J favorisent l'activité constitutive de NF-κB laisse à penser qu'elles doivent également contribuer à la progression métastatique et à l'échappement

des tumeurs mammaires. Cette contribution a déjà été soulignée par l'équipe de Chen qui a montré que la protéine hnRNP K est surexprimée dans certaines cellules cancéreuses de nasopharynx et qu'elle entraîne ainsi une résistance à l'apoptose de ces cellules en augmentant l'expression du gène codant la protéine anti-apoptotique c-Flip (Chen *et al.*, 2010). Enfin, une autre étude a montré qu'une surexpression de la protéine hnRNP K conduit à l'augmentation des capacités migratrices des cellules cancéreuses murines NIH 3T3 et des cellules humaines de fibrosarcome HT1080. Dans ces cellules, hnRNP K régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire (certains gènes codant des métalloprotéases comme MMP-3 et MMP-10), l'adhérence cellulaire (comme le gène codant le collagène COL12A1) ou encore l'angiogenèse (comme le gène codant facteur de croissance CTGF) (Gao *et al.*, 2013). Dans le cas des tumeurs mammaires, aucune donnée ne fait état du rôle des hnRNPK et J dans leur progression métastatique. Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence une corrélation entre le niveau d'expression de ces protéines et l'agressivité des cellules tumorales mammaires, excepté pour la forme J, avec toutefois une nécessité de les préciser.

VII. Les partenaires potentiels de DDB2 comme marqueurs cliniques

Les travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont révélé l'intérêt clinique de DDB2, comme marqueur de la prolifération, dans laquelle elle est impliquée, et par son expression qui est corrélée à celle de PCNA, cycline E, DHFR (Dihydrofolate Reductase) et ER α (Kattan *et al.*, 2008a). Elle présente également un intérêt clinique comme marqueur de la progression métastatique et de réponse aux thérapies anticancéreuses, qui vient de son contrôle négatif sur les capacités invasives des cellules tumorales mammaires en exerçant une inhibition sur l'activité constitutive de NF- κ B et une corrélation inverse entre son expression et le grade SBR d'agressivité tumorale (Ennen *et al.*, 2013). Nos résultats confirment ces données puisque l'expression des gènes codant les protéines DDB2 et I κ B α est significativement plus importante dans les modèles de cellules cancéreuses mammaires peu agressives comme les cellules MCF-7 et T47D par opposition aux cellules métastatiques SKBR3, Hs578T et MDA-MB231.

Dans le cadre de ce travail, la recherche de partenaires potentiels, participant à l'activité transcriptionnelle de DDB2 avait également pour objectif d'identifier d'autres marqueurs

pouvant intéresser la recherche clinique. Nos expériences ainsi que l'analyse de la base de données TCGA ont permis d'établir une corrélation semblable à celle obtenue avec DDB2, entre les capacités invasives et métastatiques des cellules tumorales mammaires et une faible expression de la protéine Sp1, un activateur déjà connu de l'expression des gènes *NFKB1A* et *DDB2* (Algarté *et al.*, 1999; Nichols *et al.*, 2003). Nos résultats confirment ceux obtenus par l'équipe de Li qui a montré qu'un faible niveau d'expression de la protéine Sp1 entraîne une faible expression d'IkBa (Li *et al.*, 2014). Un faible niveau d'expression des protéines Sp1 et DDB2 favorise ainsi l'acquisition des propriétés invasives et migratrices des cellules cancéreuses mammaires. Ces données restent cependant à confirmer, car une étude rétrospective, réalisée sur 60 tumeurs mammaires, révèle que le taux de survie globale était plus faible chez des patientes présentant une forte expression de Sp1 au niveau tumoral par opposition à celle ayant une faible expression (Wang *et al.*, 2007). En ce qui concerne les protéines DDB1 et Cul4A du complexe UV-DDB, partenaires de DDB2 dans la régulation de l'expression génique, aucune corrélation n'est observée entre l'expression de leur gène codant et l'agressivité des cellules tumorales mammaires. Plusieurs études cliniques ont révélé que l'expression de la Cul4A, contrairement à DDB2, était associée à une forte agressivité des tumeurs mammaires et à un faible taux de survie globale des patientes (Chen *et al.*, 1998b; Schindl *et al.*, 2007). Ces données ont été associées au rôle décrit de la Cul4A de favoriser la transition épithélio-mésenchymateuse en augmentant l'expression du gène *ZEB1* dans les cellules tumorales (Wang *et al.*, 2014). C'est pour cette raison qu'actuellement, de nouvelles molécules thérapeutiques, inhibitrices de l'activité E3 ubiquitine ligase de la Cul4A, sont en cours de développement (Bulatov et Ciulli, 2015).

Dans le cas des hnRNPs, plusieurs études ont mis en évidence un lien entre le niveau d'expression de la forme K et la progression tumorale. Une étude rétrospective réalisée sur des patients atteints de cancers colorectaux a montré que la protéine hnRNP K était surexprimée dans les cellules tumorales de côlon par rapport aux cellules normales (Carpenter *et al.*, 2006). D'autre part, une surexpression de hnRNP K au niveau nucléaire, uniquement, est retrouvée dans certaines cellules cancéreuses coliques et hépatiques faiblement agressives, associée à une meilleure survie globale des patients, contrairement à ceux pour lesquels l'expression de la protéine est faible (Carpenter *et al.*, 2006; Ostrowski et Bomsztyk, 2003). Dans ce travail, nos expériences n'ont pas mis en évidence une corrélation entre le niveau d'expression de la protéine hnRNP K et l'agressivité des cellules cancéreuses mammaires. Cependant, même si ces données sont à confirmer dans d'autres modèles, nous observons un niveau d'expression

plus important de la forme de hnRNP que nous avons appelée J, dans le noyau et liée à la chromatine des cellules cancéreuses mammaires agressives MDA-MB231 par opposition aux cellules peu agressives T47D. Ces résultats incitent à prospecter la valeur clinique de cette forme J dans une étude réalisée sur des échantillons cliniques de tumeurs mammaires agressives ou non. Cependant plusieurs obstacles majeurs se dressent devant ce genre d'étude qui sont d'une part, que la séquence en acide aminé de la protéine n'est pas connue, d'autre part, qu'il n'existe pas d'anticorps spécifiques de la forme J disponible dans le commerce.

DDB2 ainsi que certains de ses partenaires potentiels de la régulation génique représentent un intérêt en recherche clinique en constituant un nouveau groupe de marqueur prédictif et/ou pronostique de la progression métastatique des cellules cancéreuses mammaires, dont l'étude de leur niveau d'expression dans des échantillons cliniques de tumeurs mammaires doit être envisagée dans l'avenir.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

A l'heure actuelle, la compréhension des mécanismes à l'origine de la progression des tumeurs ainsi que leur échappement aux thérapies représente un axe de recherche majeur en cancérologie dans le monde. Le laboratoire avait précédemment identifiée la protéine DDB2 comme marqueur moléculaire de la tumorigenèse mammaire, notamment par sa capacité à contrôler l'expression de gènes, tels que *SOD2*, codant la SODMn et *NFKBIA*, l'inhibiteur cytoplasmique du facteur de transcription NF- κ B (Ennen *et al.*, 2013). Dans ce travail, l'objectif principal était de rechercher et identifier des protéines participant à l'activité transcriptionnelle de DDB2 sur les gènes cibles *NFKBIA* et *SOD2*, en précisant si cette activité dépend d'une interaction entre-elles.

Nos résultats ont révélé l'implication probable des protéines DDB1 et Culline 4A formant le complexe UV-DDB, dans la régulation de l'expression de ces gènes cibles *SOD2* et *NFKBIA* par interaction avec DDB2, comme décrit dans la littérature. Dans le cas du gène *NFKBIA*, l'ensemble de ces protéines fait intervenir un facteur de remodelage de la chromatine tel que la protéine p300. Il reste à préciser, l'importance réelle de ces protéines dans la régulation des gènes cibles de DDB2, en modulant leur expression.

Lors de l'analyse protéomique globale visant à rechercher des partenaires protéiques originaux de DDB2, nous avons pu identifier les protéines hnRNP K et J comme répresseur de l'expression transcriptionnelle du gène *NFKBIA*. Cependant, ces protéines agissent en dehors de toute interaction avec DDB2 mais de façon dominante sur l'activité inductrice de cette dernière ou de Sp1 sur le gène *NFKBIA*. Il conviendra de vérifier si les hnRNP K et J sont également impliquées dans la régulation du gène *SOD2*. De plus, il conviendra par la suite de confirmer nos expériences en inhibant l'expression de ces protéines par ARN interférence. Ces résultats révèlent également que l'activité de ces hnRNPs semble dépendre de la forme appelée J, qui est fortement liée à la chromatine et retenue avec une forte affinité sur les séquences cibles de DDB2. Cependant, son rôle précis reste à définir dans la régulation de l'expression génique. Aucune étude n'a jamais été réalisée sur cette protéine, qui ne semble pas correspondre à un variant de la protéine hnRNP K issu d'un épissage alternatif, comme décrit dans la littérature (Bomsztyk *et al.*, 2004). Il sera donc nécessaire d'identifier précisément la séquence en acide aminé de cette protéine afin de développer des anticorps spécifiques non disponibles actuellement dans le commerce, et de moduler spécifiquement son expression pour évaluer précisément la part que joue cette forme J dans l'activité de répresseur des hnRNP K et J sur l'expression du gène *NFKBIA*. Dans cette perspective de travail, il sera également important d'identifier la séquence exacte de fixation de ces protéines sur l'ADN, à partir de la séquence

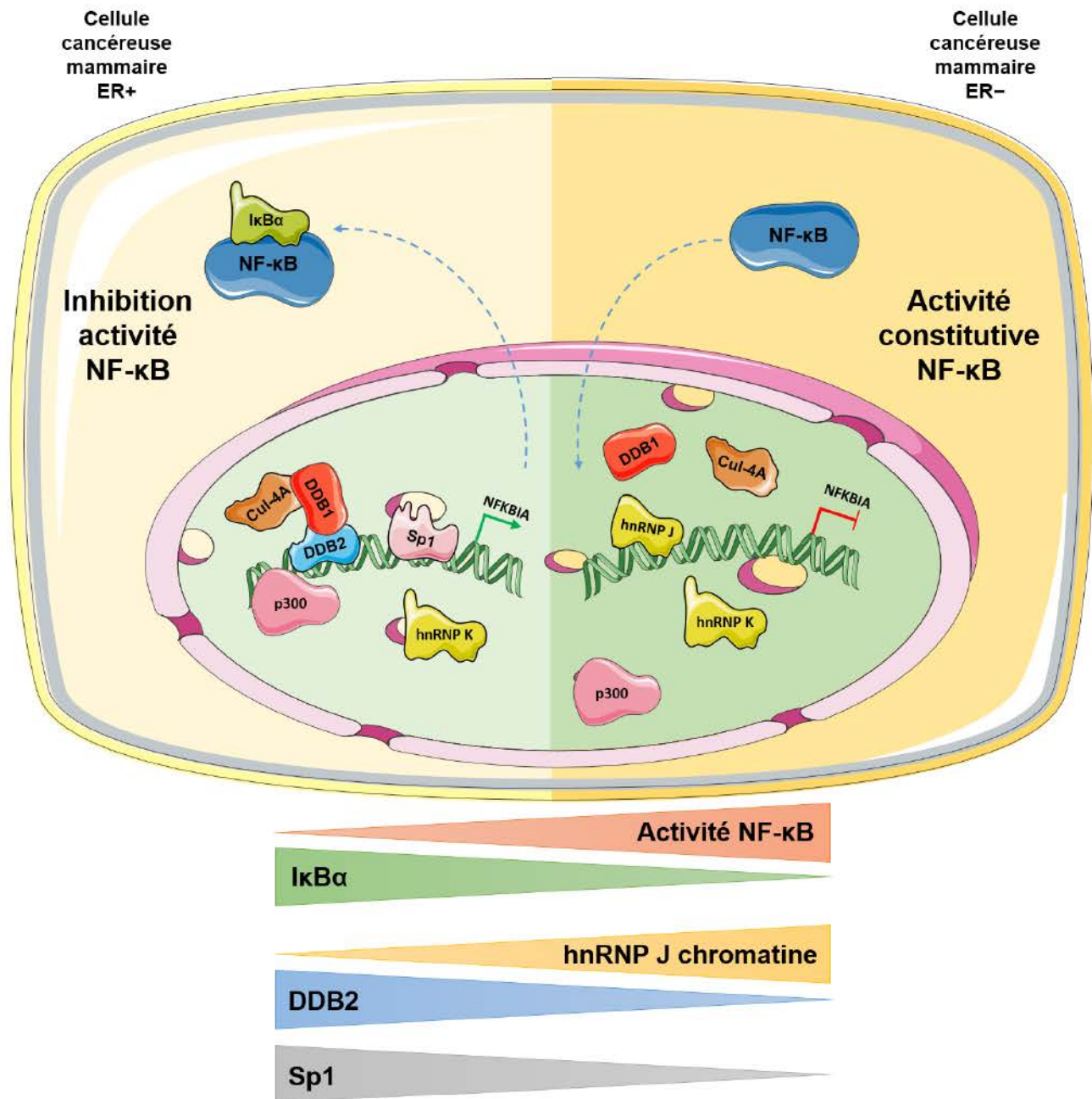


Figure 66 : Modèle proposé de la régulation transcriptionnelle du gène NFKBIA dans les cellules tumorales mammaires ER+ et ER-. A l'inverse des cellules ER-, les cellules cancéreuses mammaires ER+ présentent une expression élevée du gène NFKBIA et une faible activité du facteur de transcription NF-κB. Dans les cellules ER+, les protéines Sp1, p300 ainsi que les protéines du complexe UV-DDB participeraient à l'expression de ce gène. Dans les cellules ER-, l'absence d'expression de DDB2 et Sp1, ainsi que la présence de hnRNP J sur la chromatine favoriseraient la répression du gène NFKBIA.

cible de DDB2, qui a permis de les retenir par « DNA pull-down ». Cette séquence pourra alors être recherchée dans la région promotrice de gènes cibles potentiels, en particulier ceux connus pour leur implication dans la tumorigenèse mammaire et la réponse aux thérapies anticancéreuses.

Même si ce travail n'a pas permis d'identifier réellement un partenaire de DDB2 avec qui elle interagit et qui permet d'expliquer son rôle tantôt dans l'inhibition, tantôt dans l'activation de l'expression de ses gènes cibles, nous disposons néanmoins d'une liste de protéines retenues par « DNA pull-down » et identifiées par spectrométrie de masse, dans laquelle, certains facteurs de transcription seront intéressants à étudier. Ces résultats doivent être confirmés dans l'avenir, par d'autres approches beaucoup plus récentes, comme la technique RIME (Rapid Immunoprecipitation Mass spectrometry of Endogenous proteins) ou la technique enChIP (engineered DNA-binding molecule-mediated Chromatin Immunoprecipitation). Ces approches plus performantes peuvent améliorer l'identification des partenaires de DDB2 et enrichir notre liste de partenaires potentiels révélés durant ce travail. La 1^{ère} approche consiste à identifier par spectrométrie de masse les partenaires protéiques d'une protéine d'intérêt sur la chromatine exclusivement (Mohammed *et al.*, 2013). La 2^{ème} permet d'identifier des protéines fixées à l'ADN par spectrométrie de masse sur une courte région précise du génome (Fujita *et al.*, 2017).

En conclusion, ce travail a mis en évidence une liste de partenaires potentiels de DDB2, dont certains, appartenant au complexe UV-DDB et comme p300, contribuent à l'activité transcriptionnelle de DDB2 sur les gènes *SOD2* et *NFKBIA*, en interagissant avec elle. Nous avons également identifié, mais en dehors de tout partenariat avec DDB2, les hnRNP K et J comme répresseur de l'expression du *NFKBIA*, dans les cellules cancéreuses mammaires. Ces protéines présentent, par leur expression distincte entre les cellules tumorales mammaires métastatiques ou non, un intérêt clinique majeur. C'est le cas en particulier de la forme J des hnRNPs qui, en réprimant le gène *NFKBIA*, contribue au mécanisme moléculaire entraînant l'activité constitutive de NF- κ B (**Figure 66**). Lorsque l'on connaît l'implication de ce facteur de transcription dans les propriétés invasives et la résistance aux thérapies anticancéreuses des tumorales mammaires, nous pouvons ainsi entrevoir l'intérêt clinique de la forme J des hnRNPs, tout comme DDB2, comme facteur prédictif de la progression métastatique et de l'échappement thérapeutique dans le cancer du sein.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abraham, E.H., Prat, A.G., Gerweck, L., Seneveratne, T., Arceci, R.J., Kramer, R., Guidotti, G., et Cantiello, H.F. (1993). The multidrug resistance (*mdr1*) gene product functions as an ATP channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 312–316.
- Ahmed, K.M., et Li, J.J. (2008). NF- κ B-mediated adaptive resistance to ionizing radiation. *Free Radic. Biol. Med.* *44*, 1–13.
- Ahmed, K.M., Cao, N., et Li, J.J. (2006). HER-2 and NF-kappaB as the targets for therapy-resistant breast cancer. *Anticancer Res.* *26*, 4235–4243.
- Ahmed, K.M., Zhang, H., et Park, C.C. (2013). NF- κ B regulates radioresistance mediated by β 1-integrin in three-dimensional culture of breast cancer cells. *Cancer Res.* *73*, 3737–3748.
- Alexander, S., Watt, F., Sawaji, Y., Hermansson, M., et Saklatvala, J. (2007). Activin A is an anticatabolic autocrine cytokine in articular cartilage whose production is controlled by fibroblast growth factor 2 and NF-kappaB. *Arthritis Rheum.* *56*, 3715–3725.
- Algarté, M., Kwon, H., Génin, P., et Hiscott, J. (1999). Identification by in vivo genomic footprinting of a transcriptional switch containing NF-kappaB and Sp1 that regulates the *IkappaBalpha* promoter. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 6140–6153.
- Annunziata, C.M., Stavnes, H.T., Kleinberg, L., Berner, A., Hernandez, L.F., Birrer, M.J., Steinberg, S.M., Davidson, B., et Kohn, E.C. (2010). Nuclear factor kappaB transcription factors are coexpressed and convey a poor outcome in ovarian cancer. *Cancer* *116*, 3276–3284.
- Aroeira, L.S., Aguilera, A., Sánchez-Tomero, J.A., Bajo, M.A., del Peso, G., Jiménez-Heffernan, J.A., Selgas, R., et López-Cabrera, M. (2007). Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *18*, 2004–2013.
- Arya, M., Ahmed, H., Silhi, N., Williamson, M., et Patel, H.R.H. (2007). Clinical importance and therapeutic implications of the pivotal CXCL12-CXCR4 (chemokine ligand-receptor) interaction in cancer cell migration. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *28*, 123–131.
- Aurora, A.B., Aurora, A.B., Biyashev, D., Mirochnik, Y., Zaichuk, T.A., Sánchez-Martinez, C., Renault, M.-A., Losordo, D., et Volpert, O.V. (2010). NF-kappaB balances vascular regression and angiogenesis via chromatin remodeling and NFAT displacement. *Blood* *116*, 475–484.
- Azghadi, S., Candas, D., Fan, M., et Li, J.J. (2015). NF- κ B Controlled CD47 Overexpression in Immuno/Radioresistance of HER-2 Breast Cancer Cells. *Int. J. Radiat. Oncol. • Biol. • Phys.* *93*, S139.

B

- Baay, M., Brouwer, A., Pauwels, P., Peeters, M., et Lardon, F. (2011). Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. *Clin. Dev. Immunol.* 2011, 565187.
- Bagchi, S., et Raychaudhuri, P. (2010). Damaged-DNA Binding Protein-2 Drives Apoptosis Following DNA Damage. *Cell Div.* 5, 3.
- Bai, M., Ma, X., Li, X., Wang, X., Mei, Q., Li, X., Wu, Z., et Han, W. (2015). The Accomplices of NF- κ B Lead to Radioresistance. *Curr. Protein Pept. Sci.* 16, 279–294.
- Bailey, S.T., Miron, P.L., Choi, Y.J., Kochupurakkal, B., Maulik, G., Rodig, S.J., Tian, R., Foley, K.M., Bowman, T., Miron, A., *et al.* (2014). NF- κ B activation-induced anti-apoptosis renders HER2-positive cells drug resistant and accelerates tumor growth. *Mol. Cancer Res. MCR* 12, 408–420.
- Baldwin, A.S. (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J. Clin. Invest.* 107, 241–246.
- Banerjee, K., Wang, M., Cai, E., Fujiwara, N., Baker, H., et Cave, J.W. (2014). Regulation of tyrosine hydroxylase transcription by hnRNP K and DNA secondary structure. *Nat. Commun.* 5, 5769.
- Barakat, B.M., Wang, Q.-E., Han, C., Milum, K., Yin, D.-T., Zhao, Q., Wani, G., Arafa, E.-S.A., El-Mahdy, M.A., et Wani, A.A. (2010). Overexpression of DDB2 enhances the sensitivity of human ovarian cancer cells to cisplatin by augmenting cellular apoptosis. *Int. J. Cancer J.* 127, 977–988.
- Barbieux, C., Bacharouche, J., Soussen, C., Hupont, S., Razafitianamaharavo, A., Klotz, R., Pannequin, R., Brie, D., Bécuwe, P., Francius, G., *et al.* (2016). DDB2 (damaged-DNA binding 2) protein: a new modulator of nanomechanical properties and cell adhesion of breast cancer cells. *Nanoscale* 8, 5268–5279.
- Barboro, P., Repaci, E., Rubagotti, A., Salvi, S., Boccardo, S., Spina, B., Truini, M., Introini, C., Puppo, P., Ferrari, N., *et al.* (2009). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K: altered pattern of expression associated with diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Br. J. Cancer* 100, 1608–1616.
- Barboro, P., Ferrari, N., et Balbi, C. (2014). Emerging roles of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) in cancer progression. *Cancer Lett.* 352, 152–159.
- Barkett, M., et Gilmore, T.D. (1999). Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6910–6924.
- Bashir, M., Damineni, S., Mukherjee, G., et Kondaiah, P. (2015). Activin-A signaling promotes epithelial–mesenchymal transition, invasion, and metastatic growth of breast cancer. *Npj Breast Cancer* 1, 15007.
- Baud, V., et Karin, M. (2009). Is NF- κ B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 33–40.

- Becuwe, P., Ennen, M., Klotz, R., Barbieux, C., et Grandemange, S. (2014). Manganese superoxide dismutase in breast cancer: from molecular mechanisms of gene regulation to biological and clinical significance. *Free Radic. Biol. Med.* 77, 139–151.
- Beishline, K., et Azizkhan-Clifford, J. (2015). Sp1 and the ‘hallmarks of cancer.’ *FEBS J.* 282, 224–258.
- Belguise, K., et Sonenshein, G.E. (2007). PKC θ promotes c-Rel-driven mammary tumorigenesis in mice and humans by repressing estrogen receptor α synthesis. *J. Clin. Invest.* 117, 4009–4021.
- Bentires-Alj, M., Barbu, V., Fillet, M., Chariot, A., Relic, B., Jacobs, N., Gielen, J., Merville, M.-P., et Bours, V. (2003). NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene* 22, 90–97.
- Bergqvist, S., Alverdi, V., Mengel, B., Hoffmann, A., Ghosh, G., et Komives, E.A. (2009). Kinetic enhancement of NF- κ B-DNA dissociation by I κ B α . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 19328–19333.
- Bernal-Mizrachi, L., Lovly, C.M., et Ratner, L. (2006). The role of NF- κ B-1 and NF- κ B-2-mediated resistance to apoptosis in lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 9220–9225.
- Bevilacqua, M.A., Iovine, B., Zambrano, N., D’Ambrosio, C., Scaloni, A., Russo, T., et Cimino, F. (2005). Fibromodulin gene transcription is induced by ultraviolet irradiation, and its regulation is impaired in senescent human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 280, 31809–31817.
- Biswas, D.K., Cruz, A.P., Gansberger, E., et Pardee, A.B. (2000). Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8542–8547.
- Biswas, D.K., Shi, Q., Baily, S., Strickland, I., Ghosh, S., Pardee, A.B., et Iglehart, J.D. (2004). NF- κ B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10137–10142.
- Bloom, H.J., et 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.
- de Boer, J., et Hoeijmakers, J.H.J. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21, 453–460.
- Bomsztyk, K., Denisenko, O., et Ostrowski, J. (2004). hnRNP K: One protein multiple processes. *BioEssays* 26, 629–638.
- Bonizzi, G., et Karin, M. (2004). The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 25, 280–288.
- Bredel, M., Kim, H., Nanda, T.K., Scholtens, D.M., Robe, P.A., Branimir, S.I., et Bonner, J.A. (2013). Deletion of the Tumor Suppressor NFKBIA in Triple-Negative Breast Cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. • Biol. • Phys.* 87, S98.

Briassouli, P., Chan, F., Savage, K., Reis-Filho, J.S., et Linardopoulos, S. (2007). Aurora-A Regulation of Nuclear Factor- κ B Signaling by Phosphorylation of I κ B α . *Cancer Res.* 67, 1689–1695.

C

Cai, Q., Fu, L., Wang, Z., Gan, N., Dai, X., et Wang, Y. (2014). α -N-methylation of damaged DNA-binding protein 2 (DDB2) and its function in nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* 289, 16046–16056.

Carpenter, B., McKay, M., Dundas, S.R., Lawrie, L.C., Telfer, C., et Murray, G.I. (2006). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is over expressed, aberrantly localised and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 95, 921–927.

Catz, S.D., et Johnson, J.L. (2001). Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* 20, 7342–7351.

Cazzalini, O., Perucca, P., Mocchi, R., Sommatis, S., Prosperi, E., et Stivala, L.A. (2014). DDB2 association with PCNA is required for its degradation after UV-induced DNA damage. *Cell Cycle Georget. Tex* 13, 240–248.

Chang, S.-W., Su, C.-H., Chen, H.-H., Huang, C.-W., Tsao, L.-P., Tsao, Y.-P., et Chen, S.-L. (2012). DDB2 is a novel AR interacting protein and mediates AR ubiquitination/degradation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 1952–1961.

Chaturvedi, M., Sung, B., Yadav, V., Kannappan, R., et Aggarwal, B. (2011). NF- κ B addiction and its role in cancer: ‘one size does not fit all.’ *Oncogene* 30, 1615–1630.

Chen, F.E., et Ghosh, G. (1999). Regulation of DNA binding by Rel/NF- κ B transcription factors: structural views. *Oncogene* 18, 6845–6852.

Chen, C., Edelstein, L.C., et G  linas, C. (2000). The Rel/NF- κ B Family Directly Activates Expression of the Apoptosis Inhibitor Bcl-xL. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2687–2695.

Chen, H., Xu, Z., Li, X., Yang, Y., Li, B., Li, Y., Xia, K., Wang, J., Li, S., Wang, M., *et al.* (2018). α -catenin SUMOylation increases I κ B α stability and inhibits breast cancer progression. *Oncogenesis* 7, 28.

Chen, L.C., Manjeshwar, S., Lu, Y., Moore, D., Ljung, B.M., Kuo, W.L., Dairkee, S.H., Wernick, M., Collins, C., et Smith, H.S. (1998a). The human homologue for the *Caenorhabditis elegans* cul-4 gene is amplified and overexpressed in primary breast cancers. *Cancer Res.* 58, 3677–3683.

Chen, L.-C., Chung, I.-C., Hsueh, C., Tsang, N.-M., Chi, L.-M., Liang, Y., Chen, C.-C., Wang, L.-J., et Chang, Y.-S. (2010). The antiapoptotic protein, FLIP, is regulated by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and correlates with poor overall survival of nasopharyngeal carcinoma patients. *Cell Death Differ.* 17, 1463–1473.

- Chen, L.-F., Williams, S.A., Mu, Y., Nakano, H., Duerr, J.M., Buckbinder, L., et Greene, W.C. (2005). NF-kappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7966–7975.
- Chen, Y.Q., Ghosh, S., et Ghosh, G. (1998b). A novel DNA recognition mode by the NF-kappa B p65 homodimer. *Nat. Struct. Biol.* 5, 67–73.
- Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V.J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D., et Maniatis, T. (1995). Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 9, 1586–1597.
- Chng, H.W., Campjohn, R.S., Stone, M.G., Hart, I.R., et Nicholson, L.J. (2006). A new role for the anti-apoptotic gene A20 in angiogenesis. *Exp. Cell Res.* 312, 2897–2907.
- Christian, F., Smith, E.L., et Carmody, R.J. (2016). The Regulation of NF- κ B Subunits by Phosphorylation. *Cells* 5.
- Christmann, M., et Kaina, B. (2013). Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. *Nucleic Acids Res.* 41, 8403–8420.
- Chua, H.L., Bhat-Nakshatri, P., Clare, S.E., Morimiya, A., Badve, S., et 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* 26, 711–724.
- Claudio, E., Brown, K., Park, S., Wang, H., et Siebenlist, U. (2002). BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat. Immunol.* 3, 958–965.
- Cogswell, P.C., Guttridge, D.C., Funkhouser, W.K., et Baldwin, A.S. (2000). Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene* 19, 1123–1131.
- Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschueren, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D., et van Roy, F. (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol. Cell* 7, 1267–1278.
- Courtois, G., et Gilmore, T.D. (2006). Mutations in the NF- κ B signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene* 25, 6831–6843.
- Cui, T., Srivastava, A.K., Han, C., Wu, D., Wani, N., Liu, L., Gao, Z., Qu, M., Zou, N., Zhang, X., et al. (2018). DDB2 represses ovarian cancer cell dedifferentiation by suppressing ALDH1A1. *Cell Death Dis.* 9, 561.

D

- Da Silva, N., Bharti, A., et Shelley, C.S. (2002). hnRNP-K and Pur(alpha) act together to repress the transcriptional activity of the CD43 gene promoter. *Blood* 100, 3536–3544.

- Dai, W., Ma, W., Li, Q., Tao, Y., Ding, P., Zhu, R., et Jin, J. (2015). The 5'-UTR of DDB2 harbors an IRES element and upregulates translation during stress conditions. *Gene* 573, 57–63.
- Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., et Li, J. (2017). Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *J. Cancer* 8, 3131–3141.
- Datta, A., Bagchi, S., Nag, A., Shiyanov, P., Adami, G.R., Yoon, T., et 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, L.A., Chandrasekar, B., Friedrichs, W.E., Donzis, E., Silva, J., Hidalgo, M., Freeman, J.W., et Weiss, G.R. (2004). NF-kappa B inhibition markedly enhances sensitivity of resistant breast cancer tumor cells to tamoxifen. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 15, 885–890.
- DeGregori, J., Kowalik, T., et Nevins, J.R. (1995). Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4215–4224.
- Dehez, F., Gattuso, H., Bignon, E., Morell, C., Dumont, E., et Monari, A. (2017). Conformational polymorphism or structural invariance in DNA photoinduced lesions: implications for repair rates. *Nucleic Acids Res.* 45, 3654–3662.
- Dejardin, E., Bonizzi, G., Bellahcène, A., Castronovo, V., Merville, M.P., et Bours, V. (1995). Highly-expressed p100/p52 (NFkB2) sequesters other NF-kappa B-related proteins in the cytoplasm of human breast cancer cells. *Oncogene* 11, 1835–1841.
- Dejgaard, K., et Leffers, H. (1996). Characterisation of the nucleic-acid-binding activity of KH domains. Different properties of different domains. *Eur. J. Biochem.* 241, 425–431.
- Demicco, E.G., Kavanagh, K.T., Romieu-Mourez, R., Wang, X., Shin, S.R., Landesman-Bollag, E., Seldin, D.C., et Sonenshein, G.E. (2005). RelB/p52 NF-κB Complexes Rescue an Early Delay in Mammary Gland Development in Transgenic Mice with Targeted Superrepressor IκB-α Expression and Promote Carcinogenesis of the Mammary Gland. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10136–10147.
- Denisenko, O.N., et Bomsztyk, K. (1997). The product of the murine homolog of the *Drosophila* extra sex combs gene displays transcriptional repressor activity. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4707–4717.
- Denisenko, O.N., O'Neill, B., Ostrowski, J., Van Seuning, I., et Bomsztyk, K. (1996). Zik1, a transcriptional repressor that interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle K protein. *J. Biol. Chem.* 271, 27701–27706.
- Deveraux, Q.L., et Reed, J.C. (1999). IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13, 239–252.
- Dhawan, P., Su, Y., Thu, Y.M., Yu, Y., Baugher, P., Ellis, D.L., Sobolik-Delmaire, T., Kelley, M., Cheung, T.C., Ware, C.F., et al. (2008). The lymphotoxin-beta receptor is an upstream activator of NF-kappaB-mediated transcription in melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 283, 15399–15408.

Du, Q., Melnikova, I.N., et Gardner, P.D. (1998). Differential Effects of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K on Sp1- and Sp3-mediated Transcriptional Activation of a Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Promoter. *J. Biol. Chem.* 273, 19877–19883.

Dualan, R., Brody, T., Keeney, S., Nichols, A.F., Admon, A., et Linn, S. (1995). Chromosomal localization and cDNA cloning of the genes (DDB1 and DDB2) for the p127 and p48 subunits of a human damage-specific DNA binding protein. *Genomics* 29, 62–69.

Duffy, M.J., McGowan, P.M., Harbeck, N., Thomssen, C., et Schmitt, M. (2014). uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res.* 16, 428.

Duyao, M.P., Buckler, A.J., et Sonenshein, G.E. (1990). Interaction of an NF-kappa B-like factor with a site upstream of the c-myc promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4727–4731.

Dvorkin-Gheva, A., et Hassell, J.A. (2014). Identification of a Novel Luminal Molecular Subtype of Breast Cancer. *PLoS ONE* 9.

E, F

Egan, S.M., et Gollnick, S.O. (2016). miR-30e* is overexpressed in prostate cancer and promotes NF-κB-mediated proliferation and chemotherapeutic resistance. *J. Immunol.* 196, 213.17-213.17.

Ennen, M., Minig, V., Grandemange, S., Touche, N., Merlin, J.-L., Besancenot, V., Brunner, E., Domenjoud, L., et Becuwe, P. (2011). Regulation of the high basal expression of the manganese superoxide dismutase gene in aggressive breast cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 1771–1779.

Ennen, M., Klotz, R., Touche, N., Pinel, S., Barbieux, C., Besancenot, V., Brunner, E., Thiebaut, D., Jung, A.C., Ledrappier, S., *et al.* (2013). DDB2: a novel regulator of NF-κB and breast tumor invasion. *Cancer Res.* 73, 5040–5052.

Espinosa, L., Bigas, A., et Mulero, M.C. (2014). Novel functions of chromatin-bound IκBα in oncogenic transformation. *Br. J. Cancer* 111, 1688–1692.

Espín-Palazón, R., et Traver, D. (2016). The NF-κB family: Key players during embryonic development and HSC emergence. *Exp. Hematol.* 44, 519–527.

Evans, J.R., Mitchell, S.A., Spriggs, K.A., Ostrowski, J., Bomsztyk, K., Ostarek, D., et Willis, A.E. (2003). Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment in vitro and in vivo. *Oncogene* 22, 8012–8020.

Fan, S., Gao, M., Meng, Q., Laterra, J.J., Symons, M.H., Coniglio, S., Pestell, R.G., Goldberg, I.D., et Rosen, E.M. (2005). Role of NF-kappaB signaling in hepatocyte growth factor/scatter factor-mediated cell protection. *Oncogene* 24, 1749–1766.

Fantini, D., Huang, S., Asara, J.M., Bagchi, S., et Raychaudhuri, P. (2017). Chromatin association of XRCC5/6 in the absence of DNA damage depends on the XPE gene product DDB2. *Mol. Biol. Cell* 28, 192–200.

Feltes, B.C., et Bonatto, D. (2015). Overview of xeroderma pigmentosum proteins architecture, mutations and post-translational modifications. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 763, 306–320.

Feng, B., Cheng, S., Hsia, C.Y., King, L.B., Monroe, J.G., et Liou, H.-C. (2004). NF-kappaB inducible genes BCL-X and cyclin E promote immature B-cell proliferation and survival. *Cell. Immunol.* 232, 9–20.

Ferreiro, D.U., et Komives, E.A. (2010). Molecular Mechanisms of System Control of NF-κB Signaling by IκBα. *Biochemistry* 49, 1560–1567.

Fischer, E.S., Scrima, A., Böhm, K., Matsumoto, S., Lingaraju, G.M., Faty, M., Yasuda, T., Cavadini, S., Wakasugi, M., Hanaoka, F., *et al.* (2011). The molecular basis of CRL4DDB2/CSA ubiquitin ligase architecture, targeting, and activation. *Cell* 147, 1024–1039.

Fuchs, S.Y., Spiegelman, V.S., et Suresh Kumar, K.G. (2004). The many faces of β-TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer. *Oncogene* 23, 2028–2036.

Fujita, T., Yuno, M., Suzuki, Y., Sugano, S., et Fujii, H. (2017). Identification of physical interactions between genomic regions by enChIP-Seq. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 22, 506–520.

G

Gallardo, M., Hornbaker, M.J., Zhang, X., Hu, P., Bueso-Ramos, C., et Post, S.M. (2016). Aberrant hnRNP K expression: All roads lead to cancer. *Cell Cycle* 15, 1552–1557.

Gao, R., Yu, Y., Inoue, A., Widodo, N., Kaul, S.C., et Wadhwa, R. (2013). Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K (hnRNP-K) Promotes Tumor Metastasis by Induction of Genes Involved in Extracellular Matrix, Cell Movement, and Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 288, 15046–15056.

Gao, S., Alarcón, C., Sapkota, G., Rahman, S., Chen, P.-Y., Goerner, N., Macias, M.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., et Massagué, J. (2009). Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated Smad2/3 to limit TGF β signaling. *Mol. Cell* 36, 457–468.

Gao, Z., Chiao, P., Zhang, X., Zhang, X., Lazar, M.A., Seto, E., Young, H.A., et Ye, J. (2005). Coactivators and corepressors of NF-kappaB in IkappaB alpha gene promoter. *J. Biol. Chem.* 280, 21091–21098.

Gilmore, T.D. (2006). Introduction to NF-κB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25, 6680–6684.

Gilmore, T.D., et Herscovitch, M. (2006). Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene* 25, 6887–6899.

Gilmore, T.D., et Morin, P.J. (1993). The I κ B proteins: members of a multifunctional family. *Trends Genet.* 9, 427–433.

Godwin, P., Baird, A.M., Heavey, S., Barr, M.P., O’Byrne, K.J., et Gately, K. (2013). Targeting Nuclear Factor-Kappa B to Overcome Resistance to Chemotherapy. *Front. Oncol.* 3.

Görlach, A., et Bonello, S. (2008). The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *Biochem. J.* 412, e17-19.

Gu, Y., Ampofo, E., Menger, M.D., et Laschke, M.W. (2017). miR-191 suppresses angiogenesis by activation of NF- κ B signaling. *FASEB J.* 31, 3321–3333.

Gupta, S.C., Sundaram, C., Reuter, S., et Aggarwal, B.B. (2010). Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim. Biophys. Acta* 1799, 775–787.

Guttridge, D.C., Albanese, C., Reuther, J.Y., Pestell, R.G., et Baldwin, A.S. (1999). NF- κ B Controls Cell Growth and Differentiation through Transcriptional Regulation of Cyclin D1. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5785–5799.

H, I

Han, C., Zhao, R., Liu, X., Srivastava, A., Gong, L., Mao, H., Qu, M., Zhao, W., Yu, J., et Wang, Q.-E. (2014). DDB2 suppresses tumorigenicity by limiting the cancer stem cell population in ovarian cancer. *Mol. Cancer Res. MCR* 12, 784–794.

Han, C., Zhao, R., Kroger, J., He, J., Wani, G., Wang, Q.-E., et Wani, A.A. (2017). UV radiation-induced SUMOylation of DDB2 regulates nucleotide excision repair. *Carcinogenesis* 38, 976–985.

Hayden, M.S., et Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 18, 2195–2224.

Hayes, S., Shiyonov, P., Chen, X., et Raychaudhuri, P. (1998). DDB, a Putative DNA Repair Protein, Can Function as a Transcriptional Partner of E2F1. *Mol. Cell. Biol.* 18, 240–249.

He, Y.J., McCall, C.M., Hu, J., Zeng, Y., et Xiong, Y. (2006). DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4–ROC1 ubiquitin ligases. *Genes Dev.* 20, 2949–2954.

Helbig, G., Christopherson, K.W., Bhat-Nakshatri, P., Kumar, S., Kishimoto, H., Miller, K.D., Broxmeyer, H.E., et Nakshatri, H. (2003). NF- κ B Promotes Breast Cancer Cell Migration and Metastasis by Inducing the Expression of the Chemokine Receptor CXCR4. *J. Biol. Chem.* 278, 21631–21638.

Hemalatha, A., Suresh, T.N., et Kumar, M.L.H. (2013). Expression of vimentin in breast carcinoma, its correlation with Ki67 and other histopathological parameters. *Indian J. Cancer* 50, 189–194.

Herrington, F.D., Carmody, R.J., et Goodyear, C.S. (2016). Modulation of NF- κ B Signaling as a Therapeutic Target in Autoimmunity. *J. Biomol. Screen.* 21, 223–242.

- Himelstein, B.P., Lee, E.J., Sato, H., Seiki, M., et Muschel, R.J. (1997). Transcriptional activation of the matrix metalloproteinase-9 gene in an H-ras and v-myc transformed rat embryo cell line. *Oncogene* 14, 1995–1998.
- Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Scheidereit, C., et Strauss, M. (1999). NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2690–2698.
- Hinz, M., Arslan, S.Ç., et Scheidereit, C. (2012). It takes two to tango: IκBs, the multifunctional partners of NF-κB. *Immunol. Rev.* 246, 59–76.
- Hoesel, B., et Schmid, J.A. (2013). The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* 12, 86.
- Holley, A.K., Xu, Y., St. Clair, D.K., et St. Clair, W.H. (2010). RelB regulates manganese superoxide dismutase gene and resistance to ionizing radiation of prostate cancer cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1201, 129–136.
- Huang, D.-B., Huxford, T., Chen, Y.-Q., et Ghosh, G. (1997). The role of DNA in the mechanism of NFκB dimer formation: crystal structures of the dimerization domains of the p50 and p65 subunits. *Structure* 5, 1427–1436.
- Huang, D.-B., Vu, D., et Ghosh, G. (2005). NF-κB RelB Forms an Intertwined Homodimer. *Structure* 13, 1365–1373.
- Huang, S., Fantini, D., Merrill, B.J., Bagchi, S., Guzman, G., et Raychaudhuri, P. (2017). DDB2 Is a Novel Regulator of Wnt Signaling in Colon Cancer. *Cancer Res.* 77, 6562–6575.
- Huang, T.T., Kudo, N., Yoshida, M., et Miyamoto, S. (2000). A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IκBα controls cytoplasmic localization of inactive NF-κB/IκBα complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1014–1019.
- Huber, M.A., Azoitei, N., Baumann, B., Grünert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., Kraut, N., Beug, H., et 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.
- Huxford, T., Huang, D.B., Malek, S., et Ghosh, G. (1998). The crystal structure of the IκappaBalpha/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation. *Cell* 95, 759–770.
- Hwang, B.J., Ford, J.M., Hanawalt, P.C., et 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.
- Inoki, T., Yamagami, S., Inoki, Y., Tsuru, T., Hamamoto, T., Kagawa, Y., Mori, T., et Endo, H. (2004). Human DDB2 splicing variants are dominant negative inhibitors of UV-damaged DNA repair. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 1036–1043.
- Ito, C.Y., Adey, N., Bautch, V.L., et Baldwin, J., ALBERT S. (1995). Structure and Evolution of the Human IκBAGene. *Genomics* 29, 490–495.

Itoh, T., Cado, D., Kamide, R., et 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.* *101*, 2052–2057.

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

J, K

Jiang, L., Lin, C., Song, L., Wu, J., Chen, B., Ying, Z., Fang, L., Yan, X., He, M., Li, J., *et al.* (2012). MicroRNA-30e* promotes human glioma cell invasiveness in an orthotopic xenotransplantation model by disrupting the NF- κ B/I κ B α negative feedback loop. *J. Clin. Invest.* *122*, 33–47.

Jiang, L., Yu, L., Zhang, X., Lei, F., Wang, L., Liu, X., Wu, S., Zhu, J., Wu, G., Cao, L., *et al.* (2016). miR-892b silencing activates NF- κ B and promotes aggressiveness in breast cancer. *Cancer Res. canres.1770.2015*.

Jiang, R., Xia, Y., Li, J., Deng, L., Zhao, L., Shi, J., Wang, X., et Sun, B. (2010). High expression levels of IKK α and IKK β are necessary for the malignant properties of liver cancer. *Int. J. Cancer* *126*, 1263–1274.

Jost, P.J., et Ruland, J. (2007). Aberrant NF- κ B signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood* *109*, 2700–2707.

Kalluri, R., et Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* *119*, 1420–1428.

Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., Hofmann, T.G., Hehner, S.P., Dröge, W., et Schmitz, M.L. (2000). The pro- or anti-apoptotic function of NF- κ B is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur. J. Biochem.* *267*, 3828–3835.

Kampilafkos, P., Melachrinou, M., Kefalopoulou, Z., Lakoumentas, J., et Sotiropoulou-Bonikou, G. (2015). Epigenetic modifications in cutaneous malignant melanoma: EZH2, H3K4me2, and H3K27me3 immunohistochemical expression is enhanced at the invasion front of the tumor. *Am. J. Dermatopathol.* *37*, 138–144.

Kanarek, N., London, N., Schueler-Furman, O., et Ben-Neriah, Y. (2010). Ubiquitination and Degradation of the Inhibitors of NF- κ B. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a000166–a000166.

Kattan, Z., Marchal, S., Brunner, E., Ramacci, C., Leroux, A., Merlin, J.L., Domenjoud, L., Dauça, M., et 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., Dauça, M., et Becuwe, P. (2008b). Role of manganese superoxide dismutase on growth and invasive properties of human estrogen-independent breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* *108*, 203–215.

Kiechl, S., Schramek, D., Widschwendter, M., Fourkala, E.-O., Zaikin, A., Jones, A., Jaeger, B., Rack, B., Janni, W., Scholz, C., *et al.* (2016). Aberrant regulation of RANKL/OPG in women at high risk of developing breast cancer. *Oncotarget* 8, 3811–3825.

Klotz R. (2014). Rôle de la protéine Damaged-DNA Binding 2 dans la réponse des cellules tumorales mammaires aux agents thérapeutiques. Thèse

Ko, H.-M., Kang, J.-H., Choi, J.-H., Park, S.J., Bai, S., et Im, S.-Y. (2005). Platelet-activating factor induces matrix metalloproteinase-9 expression through Ca(2+)- or PI3K-dependent signaling pathway in a human vascular endothelial cell line. *FEBS Lett.* 579, 6451–6458.

Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P., et Wajant, H. (2001). NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3964–3973.

Kriete, A., et Mayo, K.L. (2009). Atypical pathways of NF-kappaB activation and aging. *Exp. Gerontol.* 44, 250–255.

L

LaBarbera, K.E., Hyldahl, R.D., O’Fallon, K.S., Clarkson, P.M., et Witkowski, S. (2015). Pericyte NF-κB activation enhances endothelial cell proliferation and proangiogenic cytokine secretion in vitro. *Physiol. Rep.* 3.

Lacroix, M., Toillon, R.-A., et Leclercq, G. (2006). p53 and breast cancer, an update. *Endocr. Relat. Cancer* 13, 293–325.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Lan, L., Nakajima, S., Kapetanaki, M.G., Hsieh, C.L., Fagerburg, M., Thickman, K., Rodriguez-Collazo, P., Leuba, S.H., Levine, A.S., et Rapić-Otrin, V. (2012). Monoubiquitinated histone H2A destabilizes photolesion-containing nucleosomes with concomitant release of UV-damaged DNA-binding protein E3 ligase. *J. Biol. Chem.* 287, 12036–12049.

Lans, H., Marteijn, J.A., et Vermeulen, W. (2012). ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response. *Epigenetics Chromatin* 5, 4.

Lau, J.S., Baumeister, P., Kim, E., Roy, B., Hsieh, T.Y., Lai, M., et Lee, A.S. (2000). Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins as regulators of gene expression through interactions with the human thymidine kinase promoter. *J. Cell. Biochem.* 79, 395–406.

Lazzari, E., et Meroni, G. (2016). TRIM32 ubiquitin E3 ligase, one enzyme for several pathologies: From muscular dystrophy to tumours. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 79, 469–477.

Lee, J., et Zhou, P. (2007). DCAFs, the Missing Link of the CUL4-DDB1 Ubiquitin Ligase. *Mol. Cell* 26, 775–780.

- Lee, B.-H., Park, S.-Y., Kang, K.-B., Park, R.-W., et Kim, I.-S. (2002). NF-kappaB activates fibronectin gene expression in rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 1218–1224.
- Lewis Phillips, G.D., Li, G., Dugger, D.L., Crocker, L.M., Parsons, K.L., Mai, E., Blättler, W.A., Lambert, J.M., Chari, R.V.J., Lutz, R.J., *et al.* (2008). Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res.* 68, 9280–9290.
- Li, H., et Liu, J. (2010). Identification of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K as a Transactivator for Human Low Density Lipoprotein Receptor Gene Transcription. *J. Biol. Chem.* 285, 17789–17797.
- Li, B., Lu, Y., Yu, L., Han, X., Wang, H., Mao, J., Shen, J., Wang, B., Tang, J., Li, C., *et al.* (2017). miR-221/222 promote cancer stem-like cell properties and tumor growth of breast cancer via targeting PTEN and sustained Akt/NF- κ B/COX-2 activation. *Chem. Biol. Interact.* 277, 33–42.
- Li, C.-W., Xia, W., Huo, L., Lim, S.-O., Wu, Y., Hsu, J.L., Chao, C.-H., Yamaguchi, H., Yang, N.-K., Ding, Q., *et al.* (2012). Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF- α requires NF- κ B-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer Res.* 72, 1290–1300.
- Li, J., Wang, Q.-E., Zhu, Q., El-Mahdy, M.A., Wani, G., Prætorius-Ibba, M., et Wani, A.A. (2006). DNA Damage Binding Protein Component DDB1 Participates in Nucleotide Excision Repair through DDB2 DNA-binding and Cullin 4A Ubiquitin Ligase Activity. *Cancer Res.* 66, 8590–8597.
- Li, L., Gao, P., Li, Y., Shen, Y., Xie, J., Sun, D., Xue, A., Zhao, Z., Xu, Z., Zhang, M., *et al.* (2014). JMJD2A-dependent silencing of Sp1 in advanced breast cancer promotes metastasis by downregulation of DIRAS3. *Breast Cancer Res. Treat.* 147, 487–500.
- Liepelt, A., Mossanen, J.C., Denecke, B., Heymann, F., De Santis, R., Tacke, F., Marx, G., Ostareck, D.H., et Ostareck-Lederer, A. (2014). Translation control of TAK1 mRNA by hnRNP K modulates LPS-induced macrophage activation. *RNA* 20, 899–911.
- Lieu, C., et Kopetz, S. (2010). The Src Family of Protein Tyrosine Kinases: A New and Promising Target for Colorectal Cancer Therapy. *Clin. Colorectal Cancer* 9, 89–94.
- Lin, X., Zhang, X., Wang, Q., Li, J., Zhang, P., Zhao, M., et Li, X. (2012). Perifosine downregulates MDR1 gene expression and reverses multidrug-resistant phenotype by inhibiting PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway in a human breast cancer cell line. *Neoplasma* 59, 248–256.
- Lin, Y., Bai, L., Chen, W., et Xu, S. (2010). The NF- κ B activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* 14, 45–55.
- Liu, J., Lin, M., Zhang, C., Wang, D., Feng, Z., et Hu, W. (2012). TAp63 γ enhances nucleotide excision repair through transcriptional regulation of DNA repair genes. *DNA Repair* 11, 167–176.

Liu, S., Ginestier, C., Ou, S.J., Clouthier, S.G., Patel, S.H., Monville, F., Korkaya, H., Heath, A., Dutcher, J., Klee, C.G., *et al.* (2011). Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer Res.* 71, 614–624.

López-Lázaro, M. (2007). Excessive superoxide anion generation plays a key role in carcinogenesis. *Int. J. Cancer* 120, 1378–1380.

Lu, J., et Gao, F.-H. (2016). Role and molecular mechanism of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in tumor development and progression. *Biomed. Rep.* 4, 657–663.

Lu, Z., Li, Y., Takwi, A., Li, B., Zhang, J., Conklin, D.J., Young, K.H., Martin, R., et Li, Y. (2011). miR-301a as an NF- κ B activator in pancreatic cancer cells. *EMBO J.* 30, 57–67.

Luijsterburg, M.S., Lindh, M., Acs, K., Vrouwe, M.G., Pines, A., van Attikum, H., Mullenders, L.H., et Dantuma, N.P. (2012). DDB2 promotes chromatin decondensation at UV-induced DNA damage. *J. Cell Biol.* 197, 267–281.

Lynch, M., Chen, L., Ravitz, M.J., Mehtani, S., Korenblat, K., Pazin, M.J., et Schmidt, E.V. (2005). hnRNP K Binds a Core Polypyrimidine Element in the Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (eIF4E) Promoter, and Its Regulation of eIF4E Contributes to Neoplastic Transformation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6436–6453.

M

Ma, X., Becker Buscaglia, L.E., Barker, J.R., et Li, Y. (2011). MicroRNAs in NF-kappaB signaling. *J. Mol. Cell Biol.* 3, 159–166.

Magné, N., Toillon, R.-A., Bottero, V., Didelot, C., Houtte, P.V., Gérard, J.-P., et Peyron, J.-F. (2006). NF-kappaB modulation and ionizing radiation: mechanisms et future directions for cancer treatment. *Cancer Lett.* 231, 158–168.

Mahmoud, F., Shields, B., Makhoul, I., Hutchins, L.F., Shalin, S.C., et Tackett, A.J. (2016). Role of EZH2 histone methyltransferase in melanoma progression and metastasis. *Cancer Biol. Ther.* 17, 579–591.

Manna, S.K., Zhang, H.J., Yan, T., Oberley, L.W., et Aggarwal, B.B. (1998). Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *J. Biol. Chem.* 273, 13245–13254.

Marteijn, J.A., Lans, H., Vermeulen, W., et Hoeijmakers, J.H.J. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 465–481.

Martinez, E., Palhan, V.B., Tjernberg, A., Lyman, E.S., Gamper, A.M., Kundu, T.K., Chait, B.T., et 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, 215–230.

- Massoumi, R., Chmielarska, K., Hennecke, K., Pfeifer, A., et Fässler, R. (2006). Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling. *Cell* 125, 665–677.
- Matta, A., Tripathi, S.C., DeSouza, L.V., Grigull, J., Kaur, J., Chauhan, S.S., Srivastava, A., Thakar, A., Shukla, N.K., Duggal, R., *et al.* (2009). Heterogeneous ribonucleoprotein K is a marker of oral leukoplakia and correlates with poor prognosis of squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 125, 1398–1406.
- McGowan, P.M., et Duffy, M.J. (2008). Matrix metalloproteinase expression and outcome in patients with breast cancer: analysis of a published database. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 19, 1566–1572.
- Medici, D., et Nawshad, A. (2010). Type I collagen promotes epithelial-mesenchymal transition through ILK-dependent activation of NF-kappaB and LEF-1. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 29, 161–165.
- Melanson, B.D., Cabrita, M.A., Bose, R., Hamill, J.D., Pan, E., Brochu, C., Marcellus, K.A., Zhao, T.T., Holcik, M., et McKay, B.C. (2013). A novel cis-acting element from the 3'UTR of DNA damage-binding protein 2 mRNA links transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression. *Nucleic Acids Res.* 41, 5692–5703.
- Melisi, D., Niu, J., Chang, Z., Xia, Q., Peng, B., Ishiyama, S., Evans, D.B., et Chiao, P.J. (2009). Secreted Interleukin-1 α Induces a Metastatic Phenotype in Pancreatic Cancer by Sustaining a Constitutive Activation of Nuclear Factor- κ B. *Mol. Cancer Res. MCR* 7, 624–633.
- Merdad, A., Karim, S., Schulten, H.-J., Dallol, A., Buhmeida, A., Al-Thubaity, F., Gari, M.A., Chaudhary, A.G., Abuzenadah, A.M., et Al-Qahtani, M.H. (2014). Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer: MMP-9 as a potential biomarker for cancer invasion and metastasis. *Anticancer Res.* 34, 1355–1366.
- Merkhofer, E.C., Cogswell, P., et Baldwin, A.S. (2010). Her2 Activates NF- κ B and Induces Invasion Through the Canonical Pathway Involving IKK α . *Oncogene* 29, 1238–1248.
- Mettouchi, A., Cabon, F., Montreau, N., Dejong, V., Vernier, P., Gherzi, R., Mercier, G., et Binétruy, B. (1997). The c-Jun-induced transformation process involves complex regulation of tenascin-C expression. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3202–3209.
- Michelotti, E.F., Michelotti, G.A., Aronsohn, A.I., et Levens, D. (1996). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2350–2360.
- Migliori, V., Mapelli, M., et Guccione, E. (2012). On WD40 proteins. *Epigenetics* 7, 815–822.
- Min, C., Eddy, S.F., Sherr, D.H., et Sonenshein, G.E. (2008). NF-kappaB and epithelial to mesenchymal transition of cancer. *J. Cell. Biochem.* 104, 733–744.
- Min, J., Zaslavsky, A., Fedele, G., McLaughlin, S.K., Reczek, E.E., De Raedt, T., Guney, I., Strohlic, D.E., Laura, E., Beroukhi, R., *et al.* (2010). An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and NF- κ B. *Nat. Med.* 16, 286–294.

Minig, V., Kattan, Z., Beeumen, J. van, Brunner, E., et Becuwe, P. (2009). Identification of DDB2 Protein as a Transcriptional Regulator of Constitutive SOD2 Gene Expression in Human Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* *284*, 14165–14176.

Mohammed, H., D'Santos, C., Serandour, A.A., Ali, H.R., Brown, G.D., Atkins, A., Rueda, O.M., Holmes, K.A., Theodorou, V., Robinson, J.L.L., *et al.* (2013). Endogenous purification reveals GREB1 as a key estrogen receptor regulatory factor. *Cell Rep.* *3*, 342–349.

Montagut, C., Tusquets, I., Ferrer, B., Corominas, J.M., Bellosillo, B., Campas, C., Suarez, M., Fabregat, X., Campo, E., Gascon, P., *et al.* (2006). Activation of nuclear factor- κ B is linked to resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Endocr. Relat. Cancer* *13*, 607–616.

Morais, C., Gobe, G., Johnson, D.W., et Healy, H. (2011). The emerging role of nuclear factor kappa B in renal cell carcinoma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *43*, 1537–1549.

Mukherjee, S.P., Quintas, P.O., McNulty, R., Komives, E.A., et Dyson, H.J. (2016). Structural characterization of the ternary complex that mediates termination of NF- κ B signaling by I κ B α . *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 6212–6217.

Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., *et al.* (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* *410*, 50–56.

N, O

Nag, A., Bondar, T., Shiv, S., et 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.

Nakshatri, H., Bhat-Nakshatri, P., Martin, D.A., Goulet, R.J., et Sledge, G.W. (1997). Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 3629–3639.

Nelson, K.K., Ranganathan, A.C., Mansouri, J., Rodriguez, A.M., Providence, K.M., Rutter, J.L., Pumiglia, K., Bennett, J.A., et Melendez, J.A. (2003). Elevated sod2 activity augments matrix metalloproteinase expression: evidence for the involvement of endogenous hydrogen peroxide in regulating metastasis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *9*, 424–432.

Ng, Y.H., Zhu, H., et Leung, P.C.K. (2012). Twist Modulates Human Trophoblastic Cell Invasion via Regulation of N-Cadherin. *Endocrinology* *153*, 925–936.

Nguyen, C.H., Senfter, D., Basilio, J., Holzner, S., Stadler, S., Krieger, S., Huttary, N., Milovanovic, D., Viola, K., Simonitsch-Klupp, I., *et al.* (2015). NF- κ B contributes to MMP1 expression in breast cancer spheroids causing paracrine PAR1 activation and disintegrations in the lymph endothelial barrier in vitro. *Oncotarget* *6*, 39262–39275.

Nichols, A.F., Itoh, T., Graham, J.A., Liu, W., Yamaizumi, M., et Linn, S. (2000). Human Damage-specific 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., et 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.

Novitskiy, G., Potter, J.J., Rennie-Tankersley, L., et Mezey, E. (2004). Identification of a novel NF-kappaB-binding site with regulation of the murine alpha2(I) collagen promoter. *J. Biol. Chem.* 279, 15639–15644.

Oeckinghaus, A., et Ghosh, S. (2009). The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a000034.

Oh, K.-S., Emmert, S., Tamura, D., DiGiovanna, J.J., et Kraemer, K.H. (2011). Multiple Skin Cancers in Adults with Mutations in the XP-E (DDB2) DNA Repair Gene. *J. Invest. Dermatol.* 131, 785–788.

Olivier, M., Hussain, S.P., Caron de Fromentel, C., Hainaut, P., et Harris, C.C. (2004). TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer. *IARC Sci. Publ.* 247–270.

Ostrowski, J., et Bomszyk, K. (2003). Nuclear shift of hnRNP K protein in neoplasms and other states of enhanced cell proliferation. *Br. J. Cancer* 89, 1493–1501.

Ostrowski, J., Kawata, Y., Schullery, D.S., Denisenko, O.N., et Bomszyk, K. (2003). Transient recruitment of the hnRNP K protein to inducibly transcribed gene loci. *Nucleic Acids Res.* 31, 3954–3962.

Ozeki, M., Tamae, D., Hou, D.-X., Wang, T., Lebon, T., Spitz, D.R., et Li, J.J. (2004). Response of cyclin B1 to ionizing radiation: regulation by NF-kappaB and mitochondrial antioxidant enzyme MnSOD. *Anticancer Res.* 24, 2657–2663.

P, Q, R

Park, Y.H. (2017). The nuclear factor-kappa B pathway et response to treatment in breast cancer. *Pharmacogenomics* 18, 1697–1709.

Patel, N.M., Nozaki, S., Shortle, N.H., Bhat-Nakshatri, P., Newton, T.R., Rice, S., Gelfanov, V., Boswell, S.H., Goulet, R.J., Sledge, G.W., *et al.* (2000). Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF-kappaB is enhanced by IkappaBalpha super-repressor and parthenolide. *Oncogene* 19, 4159–4169.

Perez, E.A. (1998). Paclitaxel in Breast Cancer. *The Oncologist* 3, 373–389.

Perkins, N.D. (2006). Post-translational modifications regulating the activity et function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* 25, 6717–6730.

- Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752.
- Perucca, P., Mocchi, R., Guardamagna, I., Bassi, E., Sommatìs, S., Nardo, T., Prosperi, E., Stivala, L.A., et Cazzalini, O. (2018). A damaged DNA binding protein 2 mutation disrupting interaction with proliferating-cell nuclear antigen affects DNA repair and confers proliferation advantage. *Biochim. Biophys. Acta* 1865, 898–907.
- Peto, J., Collins, N., Barfoot, R., Seal, S., Warren, W., Rahman, N., Easton, D.F., Evans, C., Deacon, J., et Stratton, M.R. (1999). Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Gene Mutations in Patients With Early-Onset Breast Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 91, 943–949.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Pianetti, S., Arsura, M., Romieu-Mourez, R., Coffey, R.J., et Sonenshein, G.E. (2001). Her-2/neu overexpression induces NF-kappaB via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of IkappaB-alpha that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN. *Oncogene* 20, 1287–1299.
- Pines, A., Vrouwe, M.G., Marteijn, J.A., Typas, D., Luijsterburg, M.S., Cansoy, M., Hensbergen, P., Deelder, A., Groot, A. de, Matsumoto, S., *et al.* (2012). PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1. *J Cell Biol* 199, 235–249.
- Piñol-Roma, S., Choi, Y.D., Matunis, M.J., et Dreyfuss, G. (1988). Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins. *Genes Dev.* 2, 215–227.
- Pires, B.R.B., Mencalha, A.L., Ferreira, G.M., de Souza, W.F., Morgado-Díaz, J.A., Maia, A.M., Corrêa, S., et Abdelhay, E.S.F.W. (2017). NF-kappaB Is Involved in the Regulation of EMT Genes in Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* 12.
- Pires, B.R.B., Silva, R.C.M.C., Ferreira, G.M., et Abdelhay, E. (2018). NF-kappaB: Two Sides of the Same Coin. *Genes* 9.
- Politi, C., Del Turco, D., Sie, J.M., Golinski, P.A., Tegeder, I., Deller, T., et Schultz, C. (2008). Accumulation of phosphorylated I kappaB alpha and activated IKK in nodes of Ranvier. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 34, 357–365.
- Popov, Y., Patsenker, E., Bauer, M., Niedobitek, E., Schulze-Krebs, A., et Schuppan, D. (2006). Halofuginone induces matrix metalloproteinases in rat hepatic stellate cells via activation of p38 and NFkappaB. *J. Biol. Chem.* 281, 15090–15098.
- Puumalainen, M.-R., Lessel, D., Rüthemann, P., Kaczmarek, N., Bachmann, K., Ramadan, K., et Naegeli, H. (2014). Chromatin retention of DNA damage sensors DDB2 and XPC through loss of p97 segregase causes genotoxicity. *Nat. Commun.* 5, 3695.
- Qiao, S., Guo, W., Liao, L., Wang, L., Wang, Z., Zhang, R., Xu, D., Zhang, Y., Pan, Y., Wang, Z., *et al.* (2015). DDB2 is involved in ubiquitination and degradation of PAQR3 and regulates tumorigenesis of gastric cancer cells. *Biochem. J.* 469, 469–480.

Rapić-Otrin, V., Navazza, V., Nardo, T., Botta, E., McLenigan, M., Bisi, D.C., Levine, A.S., et 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.

Ray, A., Milum, K., Battu, A., Wani, G., et Wani, A.A. (2013). NER initiation factors, DDB2 and XPC, regulate UV radiation response by recruiting ATR and ATM kinases to DNA damage sites. *DNA Repair* *12*, 273–283.

Ritchie, S.A., Pasha, M.K., Batten, D.J.P., Sharma, R.K., Olson, D.J.H., Ross, A.R.S., et Bonham, K. (2003). Identification of the SRC pyrimidine-binding protein (SPy) as hnRNP K: implications in the regulation of SRC 1A transcription. *Nucleic Acids Res.* *31*, 1502–1513.

Romieu-Mourez, R., Landesman-Bollag, E., Seldin, D.C., Traish, A.M., Mercurio, F., et Sonenshein, G.E. (2001). Roles of IKK kinases and protein kinase CK2 in activation of nuclear factor-kappaB in breast cancer. *Cancer Res.* *61*, 3810–3818.

Romieu-Mourez, R., Landesman-Bollag, E., Seldin, D.C., et Sonenshein, G.E. (2002). Protein kinase CK2 promotes aberrant activation of nuclear factor-kappaB, transformed phenotype, and survival of breast cancer cells. *Cancer Res.* *62*, 6770–6778.

Roy, N., Bommi, P.V., Bhat, U.G., Bhattacharjee, S., Elangovan, I., Li, J., Patra, K.C., Kopanja, D., Blunier, A., Benya, R., *et al.* (2013). DDB2 Suppresses Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Colon Cancer. *Cancer Res.* *73*, 3771–3782.

Rüthemann, P., Balbo Pogliano, C., et Naegeli, H. (2016). Global-genome Nucleotide Excision Repair Controlled by Ubiquitin/Sumo Modifiers. *Front. Genet.* *7*.

Ryo, A., Suizu, F., Yoshida, Y., Perrem, K., Liou, Y.-C., Wulf, G., Rottapel, R., Yamaoka, S., et Lu, K.P. (2003). Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Mol. Cell* *12*, 1413–1426.

S

Sachdev, S., Hoffmann, A., et Hannink, M. (1998). Nuclear localization of IkappaB alpha is mediated by the second ankyrin repeat: the IkappaB alpha ankyrin repeats define a novel class of cis-acting nuclear import sequences. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 2524–2534.

Saito, N., Courtois, G., Chiba, A., Yamamoto, N., Nitta, T., Hironaka, N., Rowe, M., Yamamoto, N., et 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*, 46565–46575.

Schapira, M., Tyers, M., Torrent, M., et Arrowsmith, C.H. (2017). WD40 repeat domain proteins: a novel target class? *Nat. Rev. Drug Discov.* *16*, 773–786.

Schatoff, E.M., Leach, B.I., et Dow, L.E. (2017). Wnt Signaling and Colorectal Cancer. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* *13*, 101–110.

- Schindl, M., Gnant, M., Schoppmann, S.F., Horvat, R., et Birner, P. (2007). Overexpression of the human homologue for *Caenorhabditis elegans* cul-4 gene is associated with poor outcome in node-negative breast cancer. *Anticancer Res.* 27, 949–952.
- Schmidt, M.C., Zhou, Q., et Berk, A.J. (1989). Sp1 activates transcription without enhancing DNA-binding activity of the TATA box factor. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3299–3307.
- Scrima, A., Konícková, R., Czyzewski, B.K., Kawasaki, Y., Jeffrey, P.D., Groisman, R., Nakatani, Y., Iwai, S., Pavletich, N.P., et Thomä, N.H. (2008). Structural basis of UV DNA-damage recognition by the DDB1-DDB2 complex. *Cell* 135, 1213–1223.
- Scrima, A., Fischer, E.S., Lingaraju, G.M., Böhm, K., Cavadini, S., et Thomä, N.H. (2011). Detecting UV-lesions in the genome: The modular CRL4 ubiquitin ligase does it best! *FEBS Lett.* 585, 2818–2825.
- Sen, R., et Baltimore, D. (1986). Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921–928.
- Serasanambati, M., et Chilakapati, S.R. (2016). Function of Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) in human diseases- A Review. *South Indian J. Biol. Sci.* 2, 368.
- Sethi, S., Sarkar, F.H., Ahmed, Q., Bandyopadhyay, S., Nahleh, Z.A., Semaan, A., Sakr, W., Munkarah, A., et Ali-Fehmi, R. (2011). Molecular Markers of Epithelial-to-Mesenchymal Transition Are Associated with Tumor Aggressiveness in Breast Carcinoma. *Transl. Oncol.* 4, 222–226.
- Sharma, P., et Nag, A. (2014). CUL4A ubiquitin ligase: a promising drug target for cancer and other human diseases. *Open Biol.* 4.
- Shechter, D., Dormann, H.L., Allis, C.D., et Hake, S.B. (2007). Extraction, purification and analysis of histones. *Nat. Protoc.* 2, 1445.
- Shnyreva, M., Schullery, D.S., Suzuki, H., Higaki, Y., et Bomsztyk, K. (2000). Interaction of two multifunctional proteins. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and Y-box-binding protein. *J. Biol. Chem.* 275, 15498–15503.
- Shoelson, S.E., Lee, J., et Yuan, M. (2003). Inflammation and the IKK β /I κ B/NF- κ B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int. J. Obes.* 27, S49–S52.
- Shostak, K., et Chariot, A. (2011). NF- κ B, stem cells and breast cancer: the links get stronger. *Breast Cancer Res. BCR* 13, 214.
- Singh, A., et Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29, 4741–4751.
- Smith, S.M., Lyu, Y.L., et Cai, L. (2014). NF- κ B Affects Proliferation and Invasiveness of Breast Cancer Cells by Regulating CD44 Expression. *PLOS ONE* 9, e106966.
- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., *et al.* (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8418–8423.

Sovak, M.A., Bellas, R.E., Kim, D.W., Zanieski, G.J., Rogers, A.E., Traish, A.M., et Sonenshein, G.E. (1997). Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J. Clin. Invest.* 100, 2952–2960.

Stains, J.P., Lecanda, F., Towler, D.A., et Civitelli, R. (2005). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses transcription from a cytosine/thymidine-rich element in the osteocalcin promoter. *Biochem. J.* 385, 613–623.

Staud, F., et Pavek, P. (2005). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 720–725.

Staudt, L.M. (2010). Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000109.

Stehlik, C., de Martin, R., Kumabashiri, I., Schmid, J.A., Binder, B.R., et Lipp, J. (1998). Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 188, 211–216.

Steward, R. (1989). Relocalization of the dorsal protein from the cytoplasm to the nucleus correlates with its function. *Cell* 59, 1179–1188.

Stirnimann, C.U., Petsalaki, E., Russell, R.B., et Müller, C.W. (2010). WD40 proteins propel cellular networks. *Trends Biochem. Sci.* 35, 565–574.

Stoyanova, T., Yoon, T., Kopanja, D., Mokyr, M.B., et 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.

Stoyanova, T., Roy, N., Kopanja, D., Bagchi, S., et Raychaudhuri, P. (2009). DDB2 decides cell fate following DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 10690–10695.

Sun, S.-C. (2011). Non-canonical NF-κB signaling pathway. *Cell Res.* 21, 71–85.

Sun, N.-K., Sun, C.-L., Lin, C.-H., Pai, L.-M., et Chao, C.C. (2010). Damaged DNA-binding protein 2 (DDB2) protects against UV irradiation in human cells and *Drosophila*. *J. Biomed. Sci.* 17, 27.

Swanson, M.S., et Dreyfuss, G. (1988). Classification and purification of proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles by RNA-binding specificities. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2237–2241.

Swiatkowska, M., Szemraj, J., et Cierniewski, C.S. (2005). Induction of PAI-1 expression by tumor necrosis factor alpha in endothelial cells is mediated by its responsive element located in the 4G/5G site. *FEBS J.* 272, 5821–5831.

T

Tabruyn, S.P., et Griffioen, A.W. (2007). A new role for NF-kappaB in angiogenesis inhibition. *Cell Death Differ.* 14, 1393–1397.

- Takedachi, A., Saijo, M., et 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, 2708–2723.
- Takimoto, M., Tomonaga, T., Matunis, M., Avigan, M., Krutzsch, H., Dreyfuss, G., et Levens, D. (1993). Specific binding of heterogeneous ribonucleoprotein particle protein K to the human c-myc promoter, in vitro. *J. Biol. Chem.* 268, 18249–18258.
- Takimoto, R., MacLachlan, T.K., Dicker, D.T., Niitsu, Y., Mori, T., et el-Deiry, W.S. (2002). BRCA1 transcriptionally regulates damaged DNA binding protein (DDB2) in the DNA repair response following UV-irradiation. *Cancer Biol. Ther.* 1, 177–186.
- Tam, W.F., Lee, L.H., Davis, L., et Sen, R. (2000). Cytoplasmic sequestration of rel proteins by IkappaBalpha requires CRM1-dependent nuclear export. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2269–2284.
- Tan, T., et Chu, G. (2002). p53 Binds and activates the xeroderma pigmentosum DDB2 gene in humans but not mice. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3247–3254.
- Tang, J., et Chu, G. (2002). Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein. *DNA Repair* 1, 601–616.
- Taniguchi, K., et Karin, M. (2018). NF-κB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 309–324.
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., et Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 138, 2101-2114.e5.
- Tobar, N., Villar, V., et Santibanez, J.F. (2010). ROS-NFκappaB mediates TGF-beta1-induced expression of urokinase-type plasminogen activator, matrix metalloproteinase-9 and cell invasion. *Mol. Cell. Biochem.* 340, 195–202.
- Tomonaga, T., et Levens, D. (1995). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a DNA-binding transactivator. *J. Biol. Chem.* 270, 4875–4881.
- Tong, Q., Zheng, L., Lin, L., Li, B., Wang, D., Huang, C., et Li, D. (2006). VEGF is upregulated by hypoxia-induced mitogenic factor via the PI-3K/Akt-NF-kappaB signaling pathway. *Respir. Res.* 7, 37.
- Tsubaki, M., Komai, M., Fujimoto, S.-I., Itoh, T., Imano, M., Sakamoto, K., Shimaoka, H., Takeda, T., Ogawa, N., Mashimo, K., *et al.* (2013). Activation of NF-κB by the RANKL/RANK system up-regulates snail and twist expressions and induces epithelial-to-mesenchymal transition in mammary tumor cell lines. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 32, 62.
- Tsuge, M., Masuda, Y., Kaneoka, H., Kidani, S., Miyake, K., et Iijima, S. (2013). SUMOylation of damaged DNA-binding protein DDB2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 438, 26–31.
- Turpin, P., Hay, R.T., et Dargemont, C. (1999). Characterization of IkappaBalpha nuclear import pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 6804–6812.

V, W

- Van Uden, P., Kenneth, N.S., et Rocha, S. (2008). Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem. J.* 412, 477–484.
- Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Verma, I.M., et Green, D.R. (1998). Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B. *Trends Cell Biol.* 8, 107–111.
- Van Laere, S.J., Van der Auwera, I., Van den Eynden, G.G., van Dam, P., Van Marck, E.A., Vermeulen, P.B., et Dirix, L.Y. (2007). NF-kappaB activation in inflammatory breast cancer is associated with oestrogen receptor downregulation, secondary to EGFR and/or ErbB2 overexpression and MAPK hyperactivation. *Br. J. Cancer* 97, 659–669.
- Vazquez-Santillan, K., Melendez-Zajgla, J., Jimenez-Hernandez, L.E., Gaytan-Cervantes, J., Muñoz-Galindo, L., Piña-Sanchez, P., Martinez-Ruiz, G., Torres, J., Garcia-Lopez, P., Gonzalez-Torres, C., *et al.* (2016). NF-kappaB-inducing kinase regulates stem cell phenotype in breast cancer. *Sci. Rep.* 6, 37340.
- Velaei, K., Samadi, N., Barazvan, B., et Soleimani Rad, J. (2016). Tumor microenvironment-mediated chemoresistance in breast cancer. *Breast Edinb. Scotl.* 30, 92–100.
- Viatour, P., Merville, M.-P., Bours, V., et Chariot, A. (2005). Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem. Sci.* 30, 43–52.
- Wang, H., Zhai, L., Xu, J., Joo, H.-Y., Jackson, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Xiong, Y., et 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, X.-B., Peng, W.-Q., Yi, Z.-J., Zhu, S.-L., et Gan, Q.-H. (2007). [Expression and prognostic value of transcriptional factor sp1 in breast cancer]. *Ai Zheng Aizheng Chin. J. Cancer* 26, 996–1000.
- Wang, Y., Wen, M., Kwon, Y., Xu, Y., Liu, Y., Zhang, P., He, X., Wang, Q., Huang, Y., Jen, K.-Y., *et al.* (2014). CUL4A induces epithelial-mesenchymal transition and promotes cancer metastasis by regulating ZEB1 expression. *Cancer Res.* 74, 520–531.
- Wen, F., Shen, A., Shanas, R., Bhattacharyya, A., Lian, F., Hostetter, G., et Shi, J. (2010). Higher expression of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein k in melanoma. *Ann. Surg. Oncol.* 17, 2619–2627.
- Whiteside, S.T., Epinat, J.C., Rice, N.R., et Israël, A. (1997). I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *EMBO J.* 16, 1413–1426.
- Wilczynska, K.M., Gopalan, S.M., Bugno, M., Kasza, A., Konik, B.S., Bryan, L., Wright, S., Griswold-Prenner, I., et Kordula, T. (2006). A novel mechanism of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 activation by interleukin-1 in primary human astrocytes. *J. Biol. Chem.* 281, 34955–34964.
- Wu, Y., et Zhou, B.P. (2010). TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br. J. Cancer* 102, 639–644.

Wu, C.-S., Chang, K.-P., Chen, L.-C., Chen, C.-C., Liang, Y., Hseuh, C., et Chang, Y.-S. (2012). Heterogeneous ribonucleoprotein K and thymidine phosphorylase are independent prognostic and therapeutic markers for oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 48, 516–522.

X, Y

Xia, Y., Shen, S., et Verma, I.M. (2014). NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol. Res.* 2, 823–830.

Xiao, Q., Hsu, C.Y., Chen, H., Ma, X., Xu, J., et Lee, J.-M. (2005). Characterization of cis-regulatory elements of the vascular endothelial growth inhibitor gene promoter. *Biochem. J.* 388, 913–920.

Xie, W., Wang, Y., Huang, Y., Yang, H., Wang, J., et Hu, Z. (2009). Toll-like receptor 2 mediates invasion via activating NF-kappaB in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 1027–1032.

Xu, Z., Zhang, Y., Li, N., Liu, P., Gao, L., Gao, X., et Tie, X. (2017). Efficacy and safety of lapatinib and trastuzumab for HER2-positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open* 7.

Yamaguchi, N., Ito, T., Azuma, S., Ito, E., Honma, R., Yanagisawa, Y., Nishikawa, A., Kawamura, M., Imai, J., Watanabe, S., *et al.* (2009). Constitutive activation of nuclear factor- κ B is preferentially involved in the proliferation of basal-like subtype breast cancer cell lines. *Cancer Sci.* 100, 1668–1674.

Yamamoto, M., Ito, T., Shimizu, T., Ishida, T., Semba, K., Watanabe, S., Yamaguchi, N., et Inoue, J.-I. (2010). Epigenetic alteration of the NF- κ B-inducing kinase (NIK) gene is involved in enhanced NIK expression in basal-like breast cancer. *Cancer Sci.* 101, 2391–2397.

Yamauchi, S., Ito, H., et Miyajima, A. (2010). IkappaBeta, a nuclear IkappaB protein, positively regulates the NF-kappaB-mediated expression of proinflammatory cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 11924–11929.

Yamazaki, S., Muta, T., et Takeshige, K. (2001). A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei. *J. Biol. Chem.* 276, 27657–27662.

Yan, M., Xu, Q., Zhang, P., Zhou, X., Zhang, Z., et Chen, W. (2010). Correlation of NF- κ B signal pathway with tumor metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 10, 437.

Yan, Y., Zhang, X., et Legerski, R.J. (2011). Artemis interacts with the Cul4A-DDB1DDB2 ubiquitin E3 ligase and regulates degradation of the CDK inhibitor p27. *Cell Cycle Georget. Tex* 10, 4098–4109.

Yang, G., Xiao, X., Rosen, D.G., Cheng, X., Wu, X., Chang, B., Liu, G., Xue, F., Mercado-Uribe, I., Chiao, P., *et al.* (2011). The biphasic role of NF-kappaB in progression and chemoresistance of ovarian cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 2181–2194.

Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., et Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927–939.

Yang, Z., Chen, D., Nie, J., Zhou, S., Wang, J., Tang, Q., et Yang, X. (2016). MicroRNA-143 targets CD44 to inhibit breast cancer progression and stem cell-like properties. *Mol. Med. Rep.* 13, 5193–5199.

Yaron, A., Gonen, H., Alkalay, I., Hatzubai, A., Jung, S., Beyth, S., Mercurio, F., Manning, A.M., Ciechanover, A., et Ben-Neriah, Y. (1997). Inhibition of NF-kappa-B cellular function via specific targeting of the I-kappa-B-ubiquitin ligase. *EMBO J.* 16, 6486–6494.

Yersal, O., et Barutca, S. (2014). Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J. Clin. Oncol.* 5, 412–424.

Yoon, T., Chakraborty, A., Franks, R., Valli, T., Kiyokawa, H., et Raychaudhuri, P. (2005). Tumor-prone phenotype of the DDB2-deficient mice. *Oncogene* 24, 469–478.

Yu, X., Li, Z., Chan, M.T., et Wu, W.K.K. (2015). PAQR3: a novel tumor suppressor gene. *Am. J. Cancer Res.* 5, 2562–2568.

Z

Zhang, Q., Helfand, B.T., Jang, T.L., Zhu, L.J., Chen, L., Yang, X.J., Kozlowski, J., Smith, N., Kundu, S.D., Yang, G., et al. (2009). Nuclear factor-kappaB-mediated transforming growth factor-beta-induced expression of vimentin is an independent predictor of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 3557–3567.

Zhang, W., Ding, W., Chen, Y., Feng, M., Ouyang, Y., Yu, Y., et He, Z. (2011). Up-regulation of breast cancer resistance protein plays a role in HER2-mediated chemoresistance through PI3K/Akt and nuclear factor-kappa B signaling pathways in MCF7 breast cancer cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 43, 647–653.

Zhao, Q., Barakat, B.M., Qin, S., Ray, A., El-Mahdy, M.A., Wani, G., Arafa, E.-S., Mir, S.N., Wang, Q.-E., et 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., Wang, Q.-E., Ray, A., Wani, G., Han, C., Milum, K., et Wani, A.A. (2009). Modulation of nucleotide excision repair by mammalian SWI/SNF chromatin-remodeling complex. *J. Biol. Chem.* 284, 30424–30432.

Zhao, R., Han, C., Eisenhauer, E., Kroger, J., Zhao, W., Yu, J., Selvendiran, K., Liu, X., Wani, A.A., et Wang, Q.-E. (2014). DNA damage-binding complex recruits HDAC1 to repress Bcl-2 transcription in human ovarian cancer cells. *Mol. Cancer Res. MCR* 12, 370–380.

Zhao, R., Cui, T., Han, C., Zhang, X., He, J., Srivastava, A.K., Yu, J., Wani, A.A., et Wang, Q.-E. (2015). DDB2 modulates TGF- β signal transduction in human ovarian cancer cells by downregulating NEDD4L. *Nucleic Acids Res.* 43, 7838–7849.

- Zhao, T.-T., Jin, F., Li, J.-G., Xu, Y.-Y., Dong, H.-T., Liu, Q., Xing, P., Zhu, G.-L., Xu, H., Yin, S.-C., *et al.* (2018). TRIM32 promotes proliferation and confers chemoresistance to breast cancer cells through activation of the NF- κ B pathway. *J. Cancer* 9, 1349–1356.
- Zheng, C., Yin, Q., et Wu, H. (2011). Structural studies of NF- κ B signaling. *Cell Res.* 21, 183–195.
- Zhu, Q., Wei, S., Sharma, N., Wani, G., He, J., Wani, A.A., Zhu, Q., Wei, S., Sharma, N., Wani, G., *et al.* (2017). Human CRL4 DDB2 ubiquitin ligase preferentially regulates post-repair chromatin restoration of H3K56Ac through recruitment of histone chaperon CAF-1. *Oncotarget* 8, 104525–104542.
- Zong, W.X., Edelstein, L.C., Chen, C., Bash, J., et G  linas, C. (1999). The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev.* 13, 382–387.

ANNEXES

CURRICULUM VITAE

Guillaume DROUOT

Doctorant en Sciences de la Vie et de la Santé

PARCOURS UNIVERSITAIRE

- 2014 – 2018** **Préparation d'un Doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé – Université de Lorraine (France)**, travaux dirigés par le Pr. Philippe Becuwe et le Dr. Nadège Touche
- 2012 – 2014** **Master BioSciences et Ingénierie de la Santé – Université de Lorraine (France)**
- Spécialité Biotechnologies Moléculaires et BioIngénierie – Physiopathologies et Thérapeutiques
 - Parcours Aspects Moléculaires Intégrés de la Physiopathologie
- 2009 – 2012** **Licence Sciences de la Vie et de la Santé – Université de Lorraine (France)**
- Parcours Biologie Cellulaire

ACTIVITES DE RECHERCHE

- 2014 – 2018** **Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), CNRS UMR7039 – Université de Lorraine (France) – Doctorant**
- « *Recherche de partenaires protéiques de la protéine Damaged-DNA Binding 2 dans la régulation de l'expression génique : le cas des heterogeneous ribonucleoprotein K et J dans la régulation du gène NFKBIA* », soutenance le 16 Novembre 2018
- Membres du jury :*
- | | | | |
|-----|---------------|-------------------|--------------|
| Mme | V. BAUD | DR INSERM EA7324 | Rapporteur |
| M. | A. JUNG | Chercheur EA3430 | Rapporteur |
| Mme | X. LE BOURHIS | Prof. INSERM U908 | Examineur |
| M. | P. BECUWE | Prof. UMR7039 | Directeur |
| Mme | N. TOUCHE | MCF UMR7039 | Co-directeur |
- 2014** **Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), CNRS UMR7039 – Université de Lorraine (France) – Master 2^{ème} année**
- « *Caractérisation des partenaires protéiques de DDB2 dans la régulation positive du gène NFKBIA* », travaux dirigés par le Dr. Nadège Touche et le Dr. Lionel Domenjoud
- 2013** **Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), CNRS UMR7039 – Université de Lorraine (France) – Master 1^{ère} année**
- « *Caractérisation fonctionnelle du promoteur du gène NFKBIA dans les lignées de cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et T47D* », travaux dirigés par le Dr. Nadège Touche

Communications

- **G. Drouot**, V. Besancenot, E. Brunner, A. Hovasse, C. Schaeffer, L. Domenjoud, N. Touche, P. Becuwe : « *Identification de partenaires protéiques de DDB2 dans la régulation de l'expression de gènes cibles, impliqués dans la carcinogenèse mammaire et la résistance aux thérapies* », Journée de rentrée de l'Ecole Doctorale BioSE, 2015, (**Communication orale**)
- **G. Drouot**, V. Besancenot, E. Brunner, A. Hovasse, C. Schaeffer, L. Domenjoud, N. Touche, P. Becuwe : « *Recherche des partenaires protéiques de DDB2 dans la régulation de l'expression de gènes cibles impliqués dans la carcinogenèse mammaire* », 3^{ème} journée d'échanges sur la Recherche en Cancérologie en Lorraine, Communications Jeunes Chercheurs, 2016, (**Communication orale**)
- **G. Drouot**, V. Besancenot, A. Taverniers, S. Grandemange, P. Becuwe, N. Touche : « *Identification of hnRNP K/J as a repressor of the inhibitor kappa B alpha (IkBa) gene in aggressive breast cancer cells* », European Association for Cancer Research Congress (EACR25), Amsterdam, 2018, (**Poster, abstract publié dans ESMO Open, Volume 3, Issue Supplement 2, page A291**)

Publications

- E. Bignon, M. Marazzi, V. Besancenot, H. Gattuso, **G. Drouot**, C. Morell, LA. Eriksson, S. Grandemange, E. Dumond, A. Monari. (2017). *Ibuprofen and ketoprofen potentiate UVA-induced cell death by a photosensitization process*. Sci Rep. 21;7(1):8885

ACTIVITES PEDAGOGIQUES

- | | |
|--------------------|---|
| 2017 – 2018 | Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche à mi-temps (1/2 ATER) – Université de Lorraine (France), 102 heures d'enseignements <ul style="list-style-type: none"> – Licence 3^{ème} année : TP Cytoimmunofluorescence (16 heures) ; TD et TP Communications cellulaires (16 heures TD et 16 heures TP). – Master 1^{ère} année : TD et TP Méthodologie en biologie cellulaire animale (6 heures TD et 48 heures TP). |
| 2014 – 2017 | Doctorant Contractuel Chargé d'Enseignements – Université de Lorraine (France), 192 heures d'enseignements (64 heures par an) <ul style="list-style-type: none"> – Licence 1^{ère} année : TP Histophysiologie (18 heures) ; TD formation ENT (4 heures). – Licence 3^{ème} année : TP Cytoimmunofluorescence (16 heures) ; TD et TP Communications cellulaires (24 heures TD et 44 heures TP) ; TD et TP Cancérologie (2 heures TD et 72 heures TP) ; TP Organe des sens (12 heures). |

Formation sur la pédagogie	– Formation d’initiation à la pédagogie (1 semaine) – Outils numériques pour la pédagogie (2 jours) – Innovations pédagogiques et outils numériques (1 semaine) – Le numérique pour apprendre à enseigner (2 jours)
Participation à l’encadrement d’étudiant	Célia Perrin , 1 ^{ère} année de Master BioSciences et Ingénierie de la Santé, parcours Biochimie, Biologie Moléculaire et Régulation cellulaire, 2017, « <i>Cinétique d’expression de la protéine DDB2 dans les lignées de cellules cancéreuses mammaires MC7-7 et T47D</i> »

ACTIVITES SCIENTIFIQUES

2014 – 2017	Représentant doctorant élu au Conseil Scientifique de l’Ecole Doctorale Biologie–Santé–Environnement (BioSE) – ED266 – Université de Lorraine (France) – Membre du Conseil Scientifique restreint de l’ED BioSE – Membre du jury du concours de l’ED BioSE pour l’attribution des contrats doctoraux ministériels et du prix de thèse – Participation à l’animation et à l’organisation des journées de l’ED BioSE et des journées de rentrée
--------------------	--

Liste des productions scientifiques

- **Identification of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K/J (hnRNP K/J) as a repressor of the inhibitor kappa B alpha (IκBα) gene in aggressive breast cancer cells.** (*Poster EACR2018*)

G. Drouot, V. Besancenot, A. Taverniers, S. Grandemange, P. Becuwe, N. Touche. (2018). ESMO Open 3, A291–A291

Introduction: Advanced breast cancers do not respond well to therapies and represent a relevant focus for studying molecular mechanisms involved in the tumour progression and drug resistance. The transcription factor NF-κB is often activated constitutively in aggressive breast cancer cells and plays a significant role by inducing many target genes involved in tumour progression and drug resistance. Mechanisms controlling constitutive NF-κB activation are not all clearly understood. Among them, repression of the gene encoding the NF-κB inhibitor, IκBα is not well known. This protein controls NF-κB activation by sequestering it in the cytoplasmic compartment. The present study reports the identification of the hnRNP K/J protein, which is initially known for its role in mRNA splicing and translation, as a repressor of the IκBα gene expression.

Material and methods: Identification of hnRNP K/J protein on the IκBα promoter was carried out by DNA pull-down coupled with a mass spectrometry analysis, and chromatin immunoprecipitation (ChIP) using a specific polyclonal antibodies. The hnRNP K/J protein was overexpressed in breast cancer cell lines by transient transfection, and consequence on the IκBα expression and the proximal IκBα promoter activity was evaluated by RT-qPCR and gene reporter assay, respectively. The hnRNP K/J protein localization was visualised in cells by Western blotting using nuclear and cytoplasmic extracts.

Results and discussions: The IκBα gene is expressed higher in nonaggressive compared to aggressive breast cancer cells. We used previous data showing the importance of the proximal promoter at position –495 from the transcription site for DNA pull-down with nuclear protein extract from MCF-7 cells. Mass spectrometry analysis led to identify hnRNP K/J protein, whose the binding to this region of the proximal IκBα promoter was confirmed by ChIP. The IκBα expression at mRNA level and proximal IκBα promoter activity was strongly decreased in hnRNP K/J-overexpressing breast cancer cells, in contrast to the respective parental cells, suggesting the role of hnRNP K/J protein as a gene repressor.

Conclusion: The identification of hnRNP K/J as a repressor of IκBα gene expression depicts a new molecular mechanism, which may contribute to the high constitutive NF-κB activation in aggressive breast cancer cells and suggests to take it into account in the development of new therapies targeting NF-κB pathway in advanced breast cancers.

- **Ibuprofen and ketoprofen potentiate UVA-induced cell death by a photosensitization process.**

E. Bignon, M. Marazzi, V. Besancenot, H. Gattuso, **G. Drouot**, C. Morell, LA. Eriksson, S. Grandemange, E. Dumond, A. Monari. (2017). Sci. Rep. 21;7(1):8885

Nonsteroidal 2-arylpropionic acids are widely used, over-the-counter, anti-inflammatory drugs. Photosensitivity is a commonly overlooked adverse effect of these drugs. Based on the

combined use of cell viability assays and molecular modeling, we prove and rationalize the photochemical pathways triggering photosensitization for two drugs, ibuprofen and ketoprofen. As its parent compound benzophenone, ketoprofen produces singlet oxygen, upon triplet manifold population. However, ibuprofen and ketoprofen photodissociate and hence may generate two highly reactive radicals. The formation of metastable aggregates between the two drugs and B-DNA is also directly probed by molecular dynamics. Our approach characterizes the coupled influence of the drug's intrinsic photochemistry and the interaction pattern with DNA. The photosensitization activity of nonsteroidal 2-arylpropionic acids, being added to gels and creams for topical use, should be crucially analyzed and rationalized to enact the proper preventive measures.

RESUME

Le laboratoire a identifié récemment la protéine DDB2 (Damaged-DNA Binding 2) comme ayant une activité dans la régulation de l'expression de gènes cibles tels que *SOD2*, *BCL2* et *NFKBIA*, conférant ainsi à cette protéine un rôle dans le contrôle de la progression métastatique ainsi que dans la réponse thérapeutique des cellules tumorales mammaires. Cependant, l'activité réelle de DDB2 dans la transcription génique reste à définir, car la structure de cette protéine ne permet pas réellement d'expliquer son influence sur l'expression de ses gènes cibles. Cette activité peut être soit inhibitrice comme pour *SOD2* et *BCL2*, soit activatrice comme *NFKBIA* qui code la protéine I κ B α , suggérant que DDB2 doit s'associer avec des inhibiteurs ou des activateurs de la transcription génique, ou en favoriser le recrutement.

Afin de rechercher et identifier ces partenaires potentiels, susceptibles de participer à son activité transcriptionnelle, nous avons développé une approche de « DNA pull-down », associée à une analyse protéomique globale par spectrométrie de masse à partir des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 surexprimant naturellement DDB2. Cette approche a permis de révéler la présence du complexe UV-DDB, composé des protéines DDB2, DDB1 et Culline 4A sur le promoteur des gènes *SOD2* et *NFKBIA*. Nous avons également mis en évidence que ce complexe, connu pour participer aux premières étapes de la réparation de l'ADN lésé par des rayonnements UV, favorise le recrutement de l'histone acétyl transférase p300 sur le promoteur du gène *NFKBIA*, pouvant expliquer en partie le rôle activateur de DDB2 sur ce gène cible. Notre analyse protéomique à partir du « DNA pull-down » a contribué également à révéler la présence originale des protéines heterogeneous ribonucleoprotein K et J (hnRNP K et J) sur le promoteur du gène *NFKBIA*, avec un score de recouvrement élevé, parmi de nombreuses autres protéines retenues, et d'une manière indépendante de toute interaction physique avec DDB2. La forme J, très peu décrite, présente une affinité plus grande pour le promoteur du gène *NFKBIA* que la forme K. De plus, nous l'avons observée strictement nucléaire et presque en totalité liée à la chromatine, alors que la forme K est retrouvée aussi dans le cytoplasme. De manière intéressante, nous montrons que la forme J est surexprimée dans le noyau des cellules tumorales MDA-MB231 métastatiques, comparativement aux cellules T47D non métastatiques. Dans la suite de ce travail, nous avons évalué l'importance des hnRNP K et J dans la transcription du gène *NFKBIA* par rapport à DDB2 et un régulateur bien décrit dans la littérature tel que le facteur de transcription Sp1. Nos résultats indiquent que les protéines hnRNP K et J, lorsqu'elles sont surexprimées, jouent un rôle de répresseur du gène *NFKBIA*, en se fixant sur son promoteur, et ce même en présence des activateurs DDB2 et Sp1.

L'ensemble de ce travail a donc contribué à montrer la présence de certaines protéines, pouvant participer à l'activité transcriptionnelle de DDB2, telles que le complexe UV-DDB et p300. De même, mais en dehors de tout partenariat avec DDB2, il a également mis en évidence une relation entre les hnRNP K et J et l'activité constitutive de NF- κ B, en particulier avec la forme J, qui, par son expression corrélée à l'agressivité des cellules tumorales mammaires, présente un intérêt clinique potentiel en tant que marqueur prédictif de la progression métastatique, tout comme DDB2.

Mots clés : Damaged-DNA Binding 2 (DDB2) ; NF- κ B ; *NFKBIA* ; cancer du sein ; régulation transcriptionnelle ; heterogeneous ribonucleoprotein K et J (hnRNP K et J)

ABSTRACT

The laboratory has recently identified the DDB2 (Damaged-DNA Binding 2) protein as a regulator of target gene expression like *SOD2*, *BCL2* and *NFKBIA*, thus conferring to this protein a role in control of metastatic progression and therapeutic response of breast cancer cells. However, the real activity of DDB2 in gene transcription remains to be defined because its structure cannot entirely explain its influence on target gene expression. This protein can act either as an inhibitor like for the *SOD2* and *BCL2* genes or as an enhancer like for the *NFKBIA* gene, encoding I κ B α protein. This suggests that DDB2 must associate with, or promote recruitment, of inhibitors or activators of gene transcription.

In order to search and identify potential partners that could participate in its transcriptional activity, we developed a "DNA pull-down" approach associated with a global proteomic analysis by mass spectrometry from MCF-7 breast cancer cells overexpressing naturally DDB2. With this approach, we reveal the presence of the UV-DDB complex composed by DDB2, DDB1 and Cullin 4A proteins on the *SOD2* and *NFKBIA* gene promoters. We also highlighted that this complex, known for its role in first steps of UV-induced DNA lesion repair, promotes the recruitment of the p300 histone acetyl transferase on the *NFKBIA* gene promoter, which may explain, in part, the enhancer activity of DDB2 on this target gene. The proteomic analysis from the "DNA pull-down" also reveals, with originality, the presence of heterogeneous ribonucleoproteins K and J (hnRNP K and J) on the *NFKBIA* gene promoter with a high recovery score among many other proteins and independently of any physical interaction with DDB2. The J form, very poorly described, shows a higher affinity for *NFKBIA* gene promoter than the K form. Furthermore, we observed that the J form is strictly nuclear and mostly bound to chromatin, while the K form is also found in cytoplasm. Interestingly, we show that the J form is overexpressed in nucleus of metastatic breast cancer MDA-MB231 cells by comparison with non-metastatic breast cancer T47D cells. Then, we evaluated the importance of hnRNP K and J proteins in *NFKBIA* gene transcription compared with DDB2 and with a well-known regulator, the Sp1 transcription factor. Our results show that hnRNP K and J proteins, when they are overexpressed, play a repressor role on *NFKBIA* gene expression by binding on its promoter even in presence of DDB2 and Sp1 activators.

Taken together, these data show that some proteins could participate in DDB2 transcriptional activity, like the UV-DDB complex and the p300 protein. Outside of any interaction with DDB2, this work highlights a relationship between the hnRNP K and J proteins, and NF- κ B constitutive activity, especially with the J form. This latter has an expression correlated with aggressiveness of breast cancer cells and a potential clinical interest as a predictive marker of metastatic progression, like DDB2.

Keywords: Damaged-DNA Binding 2 (DDB2); NF- κ B; *NFKBIA*; breast cancer; transcriptional regulation; heterogeneous ribonucleoprotein K and J (hnRNP K and J)