



HAL
open science

Sensibilisation aux drogues chimiothérapeutiques des tumeurs P53 négatives par activation de la phosphatase

Wip1

Victor Clause

► To cite this version:

Victor Clause. Sensibilisation aux drogues chimiothérapeutiques des tumeurs P53 négatives par activation de la phosphatase Wip1. Sciences agricoles. Université Bourgogne Franche-Comté, 2017. Français. NNT : 2017UBFCI002 . tel-02094528

HAL Id: tel-02094528

<https://theses.hal.science/tel-02094528>

Submitted on 9 Apr 2019

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.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

UFR Sciences de la Vie, Terre et Environnement

Ecole doctorale Environnements - Santé

THÈSE

Présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

Discipline : Biochimie et Biologie Moléculaire

**SENSIBILISATION AUX DROGUES
CHIMIOThERAPEUTIQUES DES TUMEURS
P53-NEGATIVES PAR ACTIVATION
DE LA PHOSPHATASE WIP1**

Présentée et soutenue par Victor CLAUSSE

Le 22 Mars 2017

Membres du jury :

Pr Marc Bardou Directeur de thèse
Pr Filippo Rosselli Rapporteur
Dr Rémy Pedoux Rapporteur
Dr Carmen Garrido..... Examineur

Tout est poison et rien n'est sans poison : la dose seule fait qu'un produit n'est pas un poison.

Paracelse, *Septem Defensiones*, 1537

Remerciements

Je tiens tout d'abord à vivement remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail malgré leurs obligations professionnelles. Je remercie le Professeur Filippo Rosselli et le Docteur Rémy Pedoux pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail. Je remercie également tous les membres du jury pour avoir accepté d'être examinateurs de ce travail.

Je remercie le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, la Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer et La Ligue Contre le Cancer pour avoir financé mes travaux.

Je remercie le Docteur Carmen Garrido pour m'avoir accueilli au sein de son équipe au cours de ces 3 ans et demi. Merci pour votre bonne humeur et votre disponibilité à chaque fois que cela s'est avéré nécessaire.

Je remercie le Professeur Marc Bardou et le Docteur Oleg Demidov pour leur encadrement tout au long de cette thèse. Merci pour votre aide et vos conseils, pour m'avoir permis de profiter de votre grande expérience, et m'avoir aidé à résoudre les problèmes que j'ai rencontrés durant l'accomplissement de ces travaux. Merci Oleg pour ces délicieux chocolats russes !

Merci à toute l'équipe Garrido pour leur bonne humeur, et leur gentillesse lorsqu'un réactif manquant se retrouve finalement disponible ! Merci beaucoup Burhan pour ton aide inestimable quand le temps me manquait, pour ton rire et tes blagues. Merci Christophe pour les tampons de western ! Merci beaucoup Sébastien pour tes connaissances et ton aide en microscopie. Merci Guillaume pour les réserves de nourriture dans le tiroir de ton bureau ! Merci Arlette pour ton aide en cytométrie en flux, pour tes connaissances en œnologie et les discussions passionnantes qui m'auront fait découvrir la région Bourgogne et ses bons vins. Merci aussi pour t'être autant investie lors des repas de Noël.

Merci Laetitia pour avoir gardé mon chat lorsque j'avais besoin de m'aérer l'esprit et de quitter Dijon. Merci Jennifer pour ta constante bonne humeur et les fous rires que tu auras déclenchés en inventant des expressions au quotidien. Merci Etienne pour ta bonne cuisine, Marion pour

ta bonne humeur, et merci Alexia et Pierre pour m'avoir aidé à refaire le monde un certain jeudi soir de Novembre devant le Beer Country Club...

Et enfin, je tiens à remercier ma famille pour son soutien, déjà lors de ma décision de quitter la vie active, de reprendre des études et de démarrer une thèse. Merci à mes parents de m'avoir soutenu durant ces années de thèse. Merci Cécile pour ce repas place Emile Zola où j'ai pu rencontrer Laurent. Merci Annabelle et Yoann pour les invitations à Crissey et pour les bonnes soirées que j'y ai passées. Je pense aussi particulièrement à toi Aurélien, merci pour toutes ces discussions et pour m'avoir permis de penser à autre chose avec Cyril et Brice tout au long de ces 5 ans passés à Dijon, pendant mon master puis ma thèse. Merci aussi Jeanne, grâce à toi j'ai pu travailler la vulgarisation de mon projet de recherche pendant 3 ans !

Résumé

P53 est mutée dans plus de la moitié des cancers humains et son inactivation est souvent associée à une résistance à la thérapie anti-cancer. Notre équipe a montré précédemment que dans le cas de tumeurs où P53 est inactive, la surexpression de la phosphatase WIP1 permettait la restauration de l'efficacité de la chimiothérapie, et une protection des tissus sains face aux effets secondaires du traitement. Afin d'améliorer cette stratégie innovante, mes travaux de recherche se sont portés sur deux objectifs principaux : trouver une protéine qui peut interagir avec la voie de signalisation de WIP1 et potentialiser son action dans cette stratégie thérapeutique, et réaliser un criblage à haut débit afin de trouver des molécules chimiques pouvant activer WIP1. Nous avons réalisé un criblage d'interférence à ARN de l'intégralité du kinome humain afin d'identifier plusieurs kinases, dont l'inhibition potentialise l'action anti-tumorale de WIP1. Cela a ainsi mis en évidence l'action de WEE1 et HIPK2, dont des inhibiteurs existent, sur la voie de signalisation de WIP1. Inhiber WEE1 avec une faible dose de MK-1775, un inhibiteur spécifique de cette kinase, a permis de réduire la concentration efficace de cisplatine, entraînant une apoptose caspase-3-dépendante. De plus, combiner le MK-1775 avec la surexpression de WIP1 n'a pas d'impact sur l'effet protecteur de cette phosphatase envers les tissus sains. Nous avons ensuite cherché à identifier un composé chimique permettant la surexpression de WIP1 en absence de P53. Grâce à un outil mis au point avec la technologie TALEN, nous avons intégré sous le contrôle du promoteur de WIP1 le gène rapporteur de la luciférase et ainsi effectué un criblage à haut débit d'une banque de molécules chimiques déjà toutes approuvées par la FDA. Nous avons ainsi montré que le Vorinostat, un inhibiteur des histone-déacétylases, permettait une augmentation de la transcription de WIP1 d'un facteur 10, ce qui a été confirmé par RT-qPCR et au niveau protéique par western blot dans des cellules de cancer du sein mutées pour P53. Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence un moyen de potentialiser la stratégie de traitement des tumeurs P53-négatives basée sur la phosphatase WIP1. Le développement d'inhibiteurs de WEE1 et d'HIPK2 et d'un activateur de la phosphatase WIP1 comme le Vorinostat utilisés en combinaison avec la chimiothérapie permettrait d'augmenter l'efficacité du traitement des tumeurs P53-négatives.

Abstract

P53 is mutated in more than half of human cancers and when inactivated is often associated with a resistance to anti-cancer therapy. Our team has previously shown that in the case of P53-negative tumors, overexpression of WIP1 phosphatase sensitizes tumor cells to chemotherapy, while protecting normal tissues from the side effects of the treatment. To improve this innovative strategy, my research work has been focused on two main objectives. Firstly, to find a protein which can interact with WIP1 pathway and potentiate its action in this therapeutic strategy. Secondly, to develop a high throughput screening in order to find a molecule which can activate WIP1. We realized a siRNA screening of the whole human kinome to identify several kinases, whose inhibition could potentiate anti-tumoral action of WIP1. We have shown that WEE1 and HIPK2, which both have available inhibitors, have an action on WIP1 pathway. Inhibiting WEE1 with a low dose of MK-1775, a specific inhibitor of this kinase, allowed us to decrease effective cisplatin concentration, inducing a caspase-3-dependent apoptosis. Moreover, the combination of MK-1775 with WIP1 overexpression does not impair the protective effect that this phosphatase provides towards normal tissues. We then looked for a chemical compound which could induce WIP1 overexpression in the absence of P53. Thanks to a tool designed with TALEN technology, we inserted in P53-negative cells the luciferase reporter gene under the control of the WIP1 promoter, and performed a high throughput screening of a library of chemical compounds approved by FDA. We have shown that the Vorinostat, an HDAC inhibitor, induces a 10-fold increase in WIP1 transcription, which was confirmed by RT-qPCR and at the protein level by western blot in breast cancer cells with inactive P53. This work uncovered a way to potentiate the WIP1-based therapeutic strategy of P53-negative tumors. Developing WEE1 and HIPK2 inhibitors and WIP1 activators like Vorinostat to be used in combination with chemotherapeutic agents is a promising way to increase the efficiency of the treatments of P53-negative tumors.

Table des matières

Remerciements.....	3
Résumé	5
Abstract.....	6
Liste des figures	10
Abréviations.....	12
Introduction.....	14
I. Epidémiologie.....	15
II. Le suppresseur de tumeur P53, une protéine avec un rôle central dans la thérapie anti-cancer.	19
1. Découverte et structure.....	19
2. Rôle de P53 dans la réponse au stress.....	22
3. La voie de signalisation de P53 dans deux processus majeurs : apoptose et cycle cellulaire.	25
4. Les mutations de P53.....	30
a. Inactivation.....	30
b. Gain de fonction.....	33
5. Contre la résistance induite par l'inactivation de P53 : la thérapie du point de contrôle G2/M et le phénomène de létalité synthétique.....	35
a. Inhiber ATR/ATM.....	36
b. Inhiber CHK1.....	37
c. Inhiber WEE1.....	38
d. La létalité synthétique : cibler les cellules mutées pour P53.....	42
III. Wild-Type p53-Induced Phosphatase 1 (WIP1), un régulateur de P53.	45
1. La phosphatase WIP1.....	45
2. L'interactome de WIP1.	46
a. La régulation négative de P53.....	46
b. γ H2AX, un substrat de la phosphatase WIP1.....	46
c. Voies de signalisation additionnelles.	47
3. WIP1 dans les cancers P53-positifs.....	50
a. Régulation de la voie des MAPK-kinases – exemple du cancer du sein.	50

b.	Régulation de la voie de réponse des dommages à l'ADN – exemples des cancers hématopoïétiques et intestinaux.	51
IV.	WIP1 dans les cancers P53-négatifs.....	53
1.	Le paradoxe WIP1.	53
2.	La surexpression de WIP1 sensibilise les cellules P53-négatives à la chimiothérapie.	55
3.	La surexpression de WIP1 permet l'activation du facteur de transcription RUNX2 et régule le ratio BAX/BCL-XL.	57
4.	WIP1 permet la protection des cellules saines lors de la chimiothérapie.....	59
V.	Le statut de P53 en clinique.	60
	Objectifs de la thèse	63
	Matériel et Méthodes	64
a.	Culture cellulaire.	65
b.	Criblage à haut débit du kinome humain et analyse de γ H2AX.....	65
c.	Tests de cytotoxicité.....	66
d.	Immunofluorescence anti phospho-histone H3.	66
e.	Immunofluorescence anti γ H2AX.	66
f.	Analyse BrdU et caspase-3 active par cytométrie en flux.....	67
g.	Détection de la production de superoxydes mitochondriaux avec le réactif MitoSOX.....	67
h.	Test <i>in vivo</i> de la cytotoxicité du traitement combinatoire.	67
i.	Mise au point d'un modèle de détection de l'activation du promoteur de WIP1 par émission de luminescence.	68
j.	Criblage à haut débit d'activateurs de WIP1.....	69
k.	Tests de surexpression de WIP1.....	69
l.	Anticorps de western blot.....	69
m.	Amorces de PCR.....	69
n.	Analyse corrélative de données cliniques : statut de P53 et expression du gène <i>PPM1D</i> sur la survie des patients.	70
o.	Statistiques.....	70
	Résultats.....	71
1.	Criblage du kinome humain	72

2. L'inhibition de la kinase WEE1 diminue la phosphorylation de H2AX induite par le cisplatine et sensibilise les cellules Saos2 à cette drogue.	77
3. L'inhibition de WEE1 combinée à la surexpression de WIP1 ne sensibilise pas les cellules normales au cisplatine.	84
4. WIP1 affecte positivement la survie des patients atteints de tumeurs colorectales P53-négatives.	86
5. Le Vorinostat induit une surexpression de WIP1 dans les cellules P53-négatives Saos2 et T47D.	88
Discussion	93
Conclusion et Perspectives.....	100
Bibliographie	104
ANNEXES.....	120
1. Article scientifique	121
2. Création des TALEN™ ciblant le promoteur de Wip1 par Cellectis Bioresearch.	141
3. Cartes des deux matrices d'intégrations créées pour la technologie TALEN™.	144
4. Stratégie de clonage employée	147
5. Liste des composés chimiques criblés pour la recherche d'activateurs de la transcription de <i>PPM1D</i>	152

Liste des figures

Figure 1: Nombre estimé des nouveaux cas de cancer dans 21 zones mondiales en 2012. ...	15
Figure 2 : Pourcentages estimés des patients pouvant avoir accès à la radiothérapie en 2013.	17
Figure 3 : Domaines structuraux de P53.	20
Figure 4 : De multiples stress activent P53 et induisent différentes réponses.	22
Figure 5 : Principales modifications post-traductionnelles de P53.....	24
Figure 6 : Principaux gènes cibles du facteur de transcription P53 dans le cycle cellulaire et l'apoptose.....	25
Figure 7 : P53 dans l'apoptose.	26
Figure 8 : Représentation schématique de l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire après un dommage à l'ADN.	29
Figure 9 : TP53 est inactivé par des mutations somatiques dans la plupart des cancers humains.....	31
Figure 10 : En cas de gain de fonction de P53 mutante, cela peut lui permettre d'interagir avec différentes protéines ce qui induira une augmentation ou inhibition de leurs activités.	34
Figure 11 : Représentation schématique des voies de signalisation impliquant ATM, ATR, CHK1, CHK2 et WEE1 dans la mise en œuvre des points de contrôle du cycle cellulaire.	41
Figure 12 : La nutline-3 en combinaison avec un inhibiteur des kinases Aurora permet de tuer sélectivement les cellules cancéreuses mutées pour P53.....	43
Figure 13 : Principales cibles de la phosphatase WIP1 dans la voie de signalisation de P53..	49
Figure 14 : Représentation schématique d'une portion de la voie de signalisation de l'apoptose en présence de P53 (gauche) ou en son absence (droite).....	58
Figure 15 : La phosphorylation de H2AX n'est pas corrélée à la mort cellulaire suite à un traitement au CDDP de cellules P53-négatives lorsque WIP1 est surexprimée.....	72
Figure 16 : Cinétique de phosphorylation/déphosphorylation de H2AX suite à un dommage à l'ADN induit par le CDDP.....	73
Figure 17 : Inhiber ATR diminue la phosphorylation de H2AX induite par le CDDP.	74

Figure 18 : Criblage à haut débit de la variation de phosphorylation de H2AX suite à la transfection inverse d'ARNsi ciblant l'intégralité du kinome humain.	75
Figure 19 : Un ARNsi ciblant la kinase HIPK2 diminue la phosphorylation de γ H2AX mais augmente la sensibilité des cellules Saos2 P53-négatives au CDDP.....	76
Figure 20 : L'inhibition de WEE1 diminue la phosphorylation de γ H2AX.....	77
Figure 21 : L'inhibition de WEE1 potentialise la cytotoxicité du CDDP envers les cellules Saos2.	78
Figure 22 : La mort des cellules Saos2 suite à un traitement combinant CDDP, MK-1775 et surexpression de WIP1 ne résulte pas d'une catastrophe mitotique.	79
Figure 23 : Le cisplatine et le MK-1775 entraînent l'activation d'un signal pro-apoptotique dans les cellules Saos2 WIP1-on résultant en l'activation de la caspase-3 en phase S....	80
Figure 24 : La triple combinaison permet une apoptose caspase-3-dépendante et l'induction du clivage de PARP dans les cellules Saos2 P53-négatives.....	81
Figure 25 : La production de superoxydes mitochondriaux est corrélée à l'expression de WIP1 et prédit le destin cellulaire.....	82
Figure 26 : L'inhibition de WEE1 suite à la triple combinaison diminue la phosphorylation de H2AX d'une manière dépendante de WIP1 et dérégule HIPK2.....	83
Figure 27 : L'inhibiteur de WEE1 MK-1775 n'augmente pas la mort cellulaire par lui-même in vitro ou in vivo sans combinaison avec le CDDP.....	85
Figure 28 : L'expression de PPM1D est corrélée à une meilleure survie des patients atteints de cancer colorectaux lorsque P53 est mutée.	86
Figure 29 : Validation de la lignée cellulaire nouvellement créée Saos2-TAL-GP7.....	89
Figure 30 : Criblage à haut débit d'activateurs de WIP1.....	90
Figure 31 : Le Vorinostat induit l'expression de WIP1.	91
Figure 32 : Schéma récapitulatif de la stratégie thérapeutique basée sur la surexpression de Wip1 afin de restaurer l'efficacité de la chimiothérapie dans les cellules p53-négatives, exemple de la lignée Saos2.....	103

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

APAF-1 : *apoptotic peptidase activating factor 1*

ATM : *ataxia telangiectasia mutated*

ATR : *ataxia telangiectasia and Rad3-related*

BAX : *Bcl-2-associated X protein*

BCL-2 : *B-cell lymphoma 2*

BCL-XL : *B-cell lymphoma-extra large*

BCR-ABL1 : *breakpoint cluster region – abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*

BID : *BH3 interacting-domain death agonist*

BRAF : *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*

BRCA1 : *breast cancer 1*

BRCA2 : *breast cancer 2*

CDDP : cisplatine, cis-diaminedichloroplatine(II)

CDC25A : *cell division cycle 25A*

CDK2 : *cyclin-dependent kinase 2*

CHK1 : *checkpoint kinase 1*

CHK2 : *checkpoint kinase 2*

COP-1 : *constitutively photomorphogenic 1*

EGR-1 : *early growth response protein 1*

EME1 : *crossover junction endonuclease EME1*

EML4-ALK : *echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase*

ERK : *extracellular signal-regulated kinase*

FDA : *federal drug administration*

HAT : *histone acetyltransferase*

HDAC : *histone deacetylase*

HER-2 : *human epidermal growth factor receptor 2*

H2AX : histone H2A variant H2AX

IACR : *International Association of Cancer Registries*

IHC : Immunohistochimie

KRAS : *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

MDM2 : *murine double minute 2*

MEF : *mouse embryonic fibroblast*

MUS81 : *MUS81 structure-specific endonuclease subunit*

NF- κ B : *nuclear factor-kappa B*

NOXA : *phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*

PIKK : *phosphoinositide 3-kinase-related protein kinase*

PIRH-2 : *RING-H2 type E3*

PPM1D : *protein phosphatase 1D magnesium-dependent*

PP2C : *protein phosphatase type 2C*

PUMA : *p53 upregulated modulator of apoptosis*

P38MAPK : *p38 mitogen-activated protein kinase*

Rb : *retinoblastoma protein*

RUNX : *runt-related transcription factor*

SLF : syndrome de Li Fraumeni

TALEN : *transcription activator-like effector nuclease*

TNF α : *tumor necrosis factor α*

TP53 : *tumor protein 53*

UV : ultra-violet

WEE1 : Wee1 G2 checkpoint kinase

WIP1 : wild-type p53-induced phosphatase 1

Introduction

I. Epidémiologie.

Le cancer est un problème majeur de santé publique. Le projet GLOBOCAN de l'IACR (*International Association of Cancer Registries*) rassemble les données du cancer spécifiques à chaque pays. D'après les données de ce projet, il y a eu en 2012 pas moins de 14,1 millions de nouveaux cas de cancers et 8,2 millions de personnes sont décédées des suites d'un cancer cette même année. Les cancers diagnostiqués le plus fréquemment sont ceux du poumon, du sein, de la prostate, du foie, de l'estomac, et le cancer colorectal.

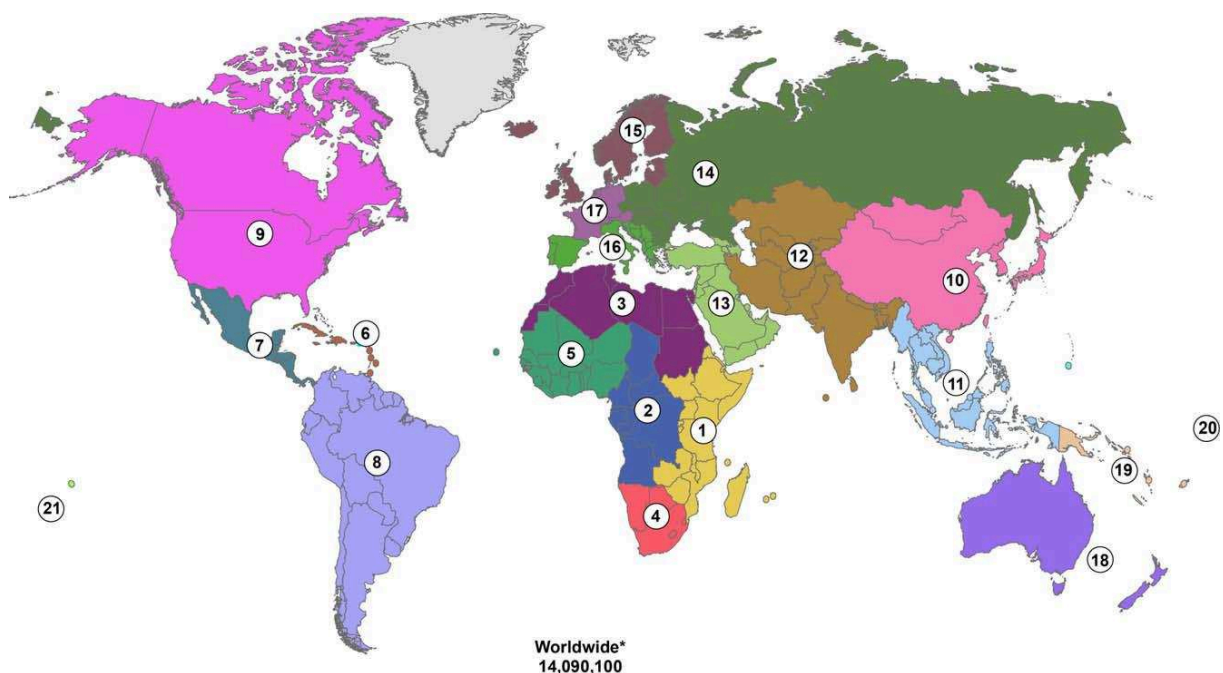


Figure 1: Nombre estimé des nouveaux cas de cancer dans 21 zones mondiales en 2012.

1- Afrique de l'est (287300) ; 2- Afrique centrale (74100) ; 3- Afrique du nord (220600) ; 4- Afrique du sud (82900) ; 5- Afrique de l'ouest (182100) ; 6- Caraïbes (90800) ; 7- Amérique centrale (197600) ; 8- Amérique du sud (807700) ; 9- Amérique du nord (1786400) ; 10- Asie de l'est (4145000) ; 11- Asie du sud-est (786400) ; 12- Asie du sud et centrale (1514000) ; 13- Asie de l'ouest (317600) ; 14- Europe du centre et de l'est (1036900) ; 15- Europe du nord (525900) ; 16- Europe du sud (769200) ; 17- Europe de l'ouest (1110300) ; 18- Australie et Nouvelle-Zélande (143400) ; 19- Mélanésie (10000) ; 20- Micronésie (800) ; 21- Polynésie (1200).
Source : GLOBOCAN 2012 (Torre, Bray et al. 2015).

Le cancer du sein est le cancer diagnostiqué le plus fréquemment et la plus forte cause de mortalité due au cancer chez la femme au niveau mondial, avec 1,7 millions de nouveaux cas et 521900 décès en 2012. Le cancer du poumon est celui diagnostiqué le plus fréquemment chez l'homme au niveau mondial. Le cancer colorectal est le troisième cancer diagnostiqué le plus fréquemment chez l'homme et le deuxième chez la femme, avec 1,4 millions de nouveaux cas et 693900 décès en 2012 (GLOBOCAN 2012). Cependant, les cancers les plus fréquents dans les pays développés ne seront pas forcément les mêmes dans les pays en voie de développement. En effet, les taux d'incidence du cancer colorectal, de la prostate, du sein chez la femme ou du poumon sont bien plus élevés dans les pays développés (Torre, Bray et al. 2015). Les pays en voie de développement rassemblent 57% des cancers diagnostiqués mondialement et 65% de la mortalité due au cancer, bien qu'ils représentent environ 82% de la population mondiale totale. Cela s'explique en raison de plusieurs facteurs qui les différencient des pays développés : une pyramide des âges centrée sur la population jeune, un tabagisme bien moins étendu, ou simplement l'importance d'autres maladies que le cancer sur la mortalité dans ces pays. Le cancer est également sous diagnostiqué dans ces pays, ce qui explique également des statistiques d'incidence plus faibles que dans les pays développés. L'incidence globale des cancers va malheureusement continuer à augmenter. Il y a 10 ans Bray *et al* ont prédit petit à petit une grande augmentation de l'incidence dans les pays en voie de développement, ce qui commence à se confirmer aujourd'hui, cela à cause d'un vieillissement de la population et de l'augmentation de la prévalence des facteurs de risque connus (Bray and Moller 2006, Torre, Bray et al. 2015).

De nombreux facteurs de risque sont en cause comme le vieillissement de la population, ou d'autres facteurs dits modifiables, tels que le tabagisme, l'alcool, le surpoids, une activité physique insuffisante, ou un régime alimentaire comportant trop de viande rouge. L'importance d'un facteur de risque par rapport à un autre dépend des régions et des populations et n'est aujourd'hui pas du tout homogène mondialement (Whiteman and Wilson 2016) (Danaei, Vander Hoorn et al. 2005). L'accès aux soins est également extrêmement important et très disparate en fonction des pays, ce qui a un impact majeur sur la mortalité due aux cancers dans les pays en voie de développement. Ceci est mis en évidence en observant la répartition mondiale des possibilités d'accès à la radiothérapie, représentée en figure 2.

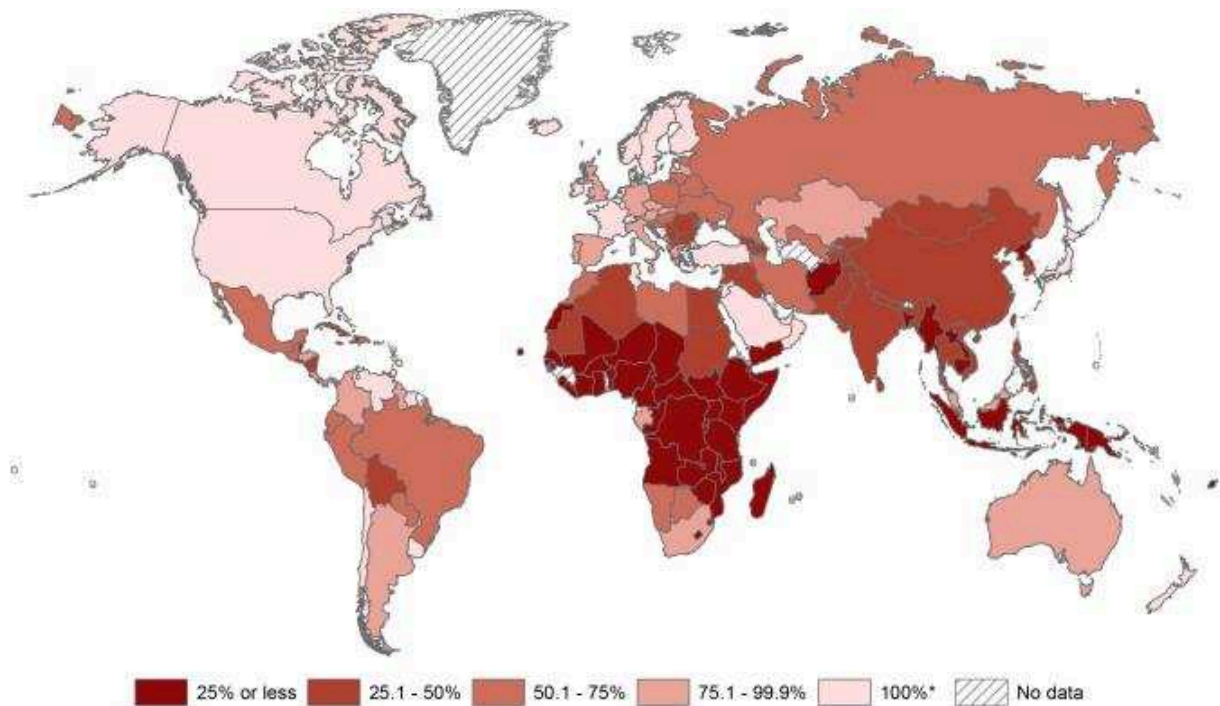


Figure 2 : Pourcentages estimés des patients pouvant avoir accès à la radiothérapie en 2013. Les pays avec 100% des patients ayant accès au traitement incluent également les pays où l'accès à la radiothérapie est supérieur à la demande, bien qu'il puisse exister des disparités d'accès au sein de ces pays (Torre, Bray et al. 2015).

Aujourd'hui, les progrès de la médecine et le développement de nouvelles technologies permettent de caractériser le cancer au niveau moléculaire. Ainsi, il a été possible de décrire précisément les gènes, les mutations et les changements épigénétiques responsables de l'apparition de la maladie. Le développement tumoral ne résulte généralement pas d'une unique mutation mais plutôt d'une série de modifications génétiques et épigénétiques de l'ADN. Ces modifications peuvent être acquises somatiquement, et seront alors dues à l'impact de l'environnement et des habitudes de vie. Cependant, des modifications de l'ADN peuvent également être transmises de manière héréditaire, et on parlera alors de prédisposition génétique au cancer. Par exemple, une mutation germinale du gène suppresseur de tumeur TP53 augmente ainsi drastiquement les probabilités de développer un cancer (Schneider, Zelle et al. 1993). Des études cliniques récentes ont montré que 10,7% des patients atteints de cancer du sein montraient une mutation germinale les prédisposant à développer la maladie (Tung, Lin et al. 2016), et 14,6% chez les patients atteints d'un cancer du sein triple négatif, où 77% de ces mutations germinales touchent le gène *BRCA1* (Couch,

Hart et al. 2015). Ainsi, tous les individus ne sont pas égaux vis-à-vis des risques de développer un cancer. Cela est dû à ces prédispositions génétiques transmises de manière héréditaire, comme par exemple le polymorphisme mononucléotidique ou l'instabilité micro-satellitaire ou d'autres mutations touchant des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur. Ces modifications, différentes d'un individu à l'autre, soulignent la susceptibilité d'un individu à développer la maladie (Lea, Jackson et al. 2007). Des variations héréditaires parmi les plus étudiées sont les mutations touchant les gènes *BRCA1* et *BRCA2*, retrouvées dans 50% des familles dites à risque, touchées par deux cas ou plus de cancers ovariens (Antoniou, Gayther et al. 2000). La plupart des altérations génétiques rencontrées lors des cancers sont cependant somatiques et sont des mutations ponctuelles, des insertions ou délétions, des translocations, des fusions de gènes, une variabilité du nombre de copies ou une perte d'hétérozygotie (Dutt and Beroukhim 2007). Ces modifications peuvent entraîner une surexpression d'oncogènes et/ou une diminution ou disparition d'expression des gènes suppresseurs de tumeur comme par exemple *TP53*. Il est important de continuer à développer des programmes permettant d'étudier à haut débit les génomes des cancers afin de pouvoir identifier les allèles en modulant les risques. Cependant, l'interprétation de telles données peut être compliquée, ces allèles étant souvent localisés dans les régions chromosomiques de fonctions inconnues, intergéniques et introniques (Reis, Vargas et al. 2016). Un facteur de risque parmi les plus étudiés et documentés est le rapport entre tabagisme et cancer du poumon, où les mutations des gènes *KRAS* et *TP53* sont directement corrélées à l'apparition de la maladie (Gealy, Zhang et al. 1999). Le gène suppresseur de tumeur *TP53* est en effet d'une importance capitale dans la prévention et la thérapie anti-tumorale.

II. Le suppresseur de tumeur P53, une protéine avec un rôle central dans la thérapie anti-cancer.

La protéine P53 répond à divers signaux de stress et a un rôle majeur dans de très nombreux processus physiologiques, comme le cycle cellulaire, la sénescence ou l'apoptose, mécanismes intrinsèquement liés au développement tumoral. L'importance de la protéine P53 dans ces processus est mise en évidence par le fait que son gène est muté dans plus de la moitié des cancers humains (Bieging, Mello et al. 2014).

1. Découverte et structure.

C'est en 1979 que pour la première fois la protéine P53 fut mise en évidence. Les Dr Lane et Crawford montrèrent qu'une protéine était liée à l'antigène T dans les cellules transformées SV-40 (Lane and Crawford 1979). Des expériences additionnelles réalisées dans 2 lignées SV-40 transformées, 12 lignées cellulaires cancéreuses et 3 cultures primaires humaines confirmèrent qu'il s'agissait bien d'une protéine inconnue à ce jour, et qu'elle pesait 53000 Dalton (Crawford, Pim et al. 1981). Elle fut donc nommée P53. Elle fut de plus en plus étudiée, et au début des années 1990 Hollstein *et al* ont démontré que la suppression de son activité de suppresseur de tumeur *via* divers types de mutations était une étape importante dans le développement de nombreux cancers (Hollstein, Sidransky et al. 1991). Sa voie de signalisation est complexe et sa compréhension est passée par la description des partenaires cellulaires de P53, pouvant s'y lier et réguler ses fonctions. Ainsi, en 1992, Momand *et al* ont décrit l'inhibition de P53 par MDM2, une E3 ubiquitine ligase qui catalyse la polyubiquitinylation de P53 et induit sa dégradation protéasomale, régulant ainsi son expression (Momand, Zambetti et al. 1992, Harris and Levine 2005).

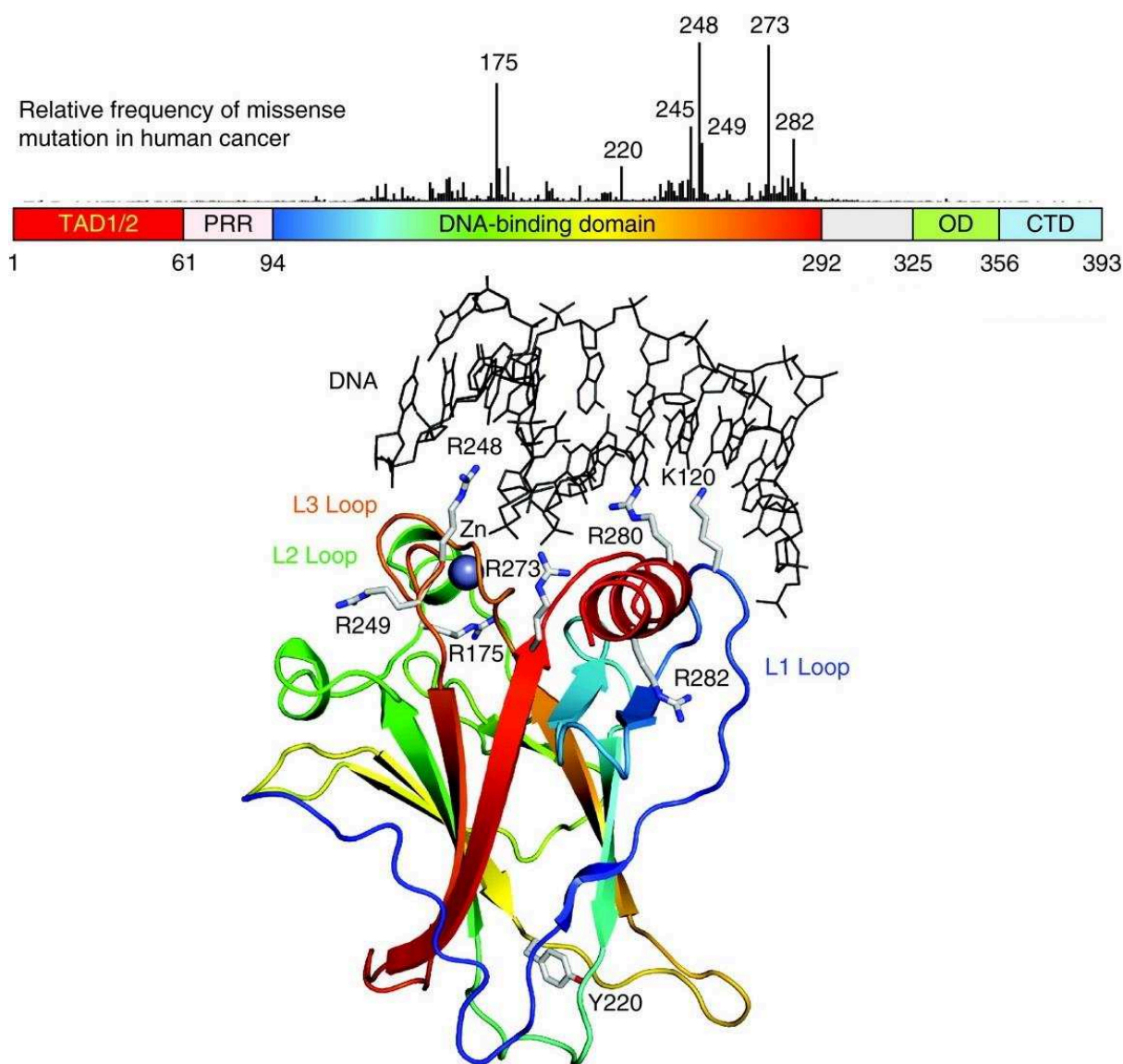


Figure 3 : Domaines structuraux de P53.

Le domaine de transactivation (TAD) en extrémité amino-terminale qui peut être subdivisé en sous-domaines TAD1 et 2, est suivi d'une région riche en proline (PRR). Le domaine structuré de liaison à l'ADN et celui de tétramérisation (OD) sont reliés par une région linker. Tout comme le TAD, le domaine régulateur est situé à l'extrémité carboxy-terminale (CTD). Les barres verticales représentent la fréquence relative de mutations faux-sens dans les cancers humains pour chaque résidu, basé sur la base de données TP53 mutation database (p53.iarc.fr) de l'agence internationale pour la recherche sur le cancer (Petitjean, Mathe et al. 2007) et montrent que la plupart des mutations sont localisées sur le domaine de fixation à l'ADN (Joerger and Fersht 2008, Joerger and Fersht 2010).

La structure de P53 comprend 393 résidus d'acides aminés. Sa première fonction est d'agir en tant que facteur de transcription, biologiquement actif sous forme tétramérique. Sa structure présente un domaine de transactivation à l'extrémité amino-terminale, une région riche en proline, un domaine de fixation à l'ADN et un domaine de tétramérisation, et un domaine régulateur à l'extrémité carboxy-terminale (figure 3).

Les fonctions de suppression tumorale de P53 sont connues depuis longtemps et ont été maintes fois décrites (Zilfou and Lowe 2009), et elle a d'ailleurs été surnommée gardienne du génome par le Dr Lane en 1992, après la description d'un modèle où son activation suite à un dommage de l'ADN entraîne un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire, puis une réparation de l'ADN ou l'apoptose (Lane 1992). De nombreux agents chimiothérapeutiques causant des dommages à l'ADN peuvent activer la voie de P53 et induire la sénescence, et il a été également montré que la perte de fonction de P53 peut empêcher la sénescence induite par les drogues et entraîne une progression tumorale (Schmitt, Fridman et al. 2002, Roninson 2003). Trente-sept ans après sa découverte, P53 est encore loin d'avoir livré tous ses secrets. Les rôles de P53 ne se cantonnent pas à ses fonctions de suppresseur de tumeur *via* le contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose ou de la sénescence. Aujourd'hui, on continue à découvrir de nouvelles fonctions de P53, comme la régulation du métabolisme (Vousden and Ryan 2009), l'implantation de l'embryon (Levine, Tomasini et al. 2011), ou lors de la différenciation et du développement (Hu 2009, Vousden and Prives 2009).

2. Rôle de P53 dans la réponse au stress.

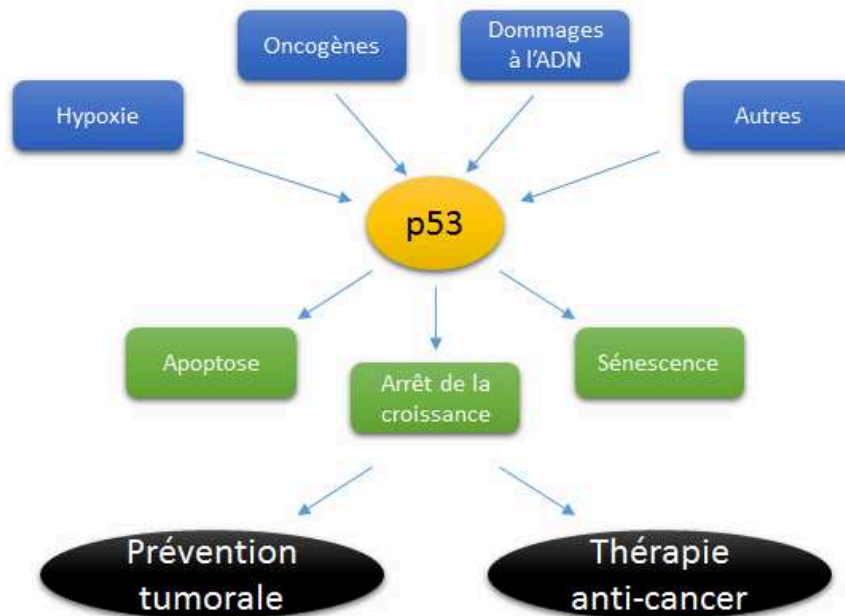


Figure 4 : De multiples stress activent P53 et induisent différentes réponses.

En réponse à de nombreux signaux de stress, P53 sera activée d'une manière spécifique par des modifications post-traductionnelles. En tant que facteur de transcription, P53 va pouvoir, suite à son activation, se lier aux régions promotrices de nombreux gènes. P53 va alors induire une grande diversité de réponses, comme l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence ou la réparation de l'ADN (Vogelstein, Lane et al. 2000).

Les cellules sont constamment soumises à de nombreux facteurs mettant à mal l'intégrité de leur ADN, exogènes comme les UV, ou endogènes comme les espèces réactives de l'oxygène, produites lors de réactions métaboliques au sein des cellules vivantes. Chaque cellule du corps humain subit des milliers d'altérations de son ADN chaque jour. Etant dépositaire de l'information génétique de l'individu, il est crucial que l'ADN soit préservé. Afin de résister à ces dommages, au fur et à mesure de l'évolution la sélection naturelle a entraîné l'apparition de systèmes afin de les détecter, de signaler leur présence à la cellule et de permettre leur réparation (Jackson and Bartek 2009, Nicolai, Rossi et al. 2015). La réponse au stress varie d'une totale réparation à la mort cellulaire. P53 peut induire un arrêt du cycle cellulaire suite

aux dommages à l'ADN, ce qui donnera à la cellule le temps nécessaire à la réparation (Kastan and Bartek 2004, Bartek and Lukas 2007). Si le dommage à l'ADN est trop sévère et que la cellule ne peut parvenir à sa réparation, P53 peut induire l'apoptose ou entraîner les cellules dans le processus de sénescence. La sénescence est un arrêt permanent du cycle cellulaire, et dépend de P53, qu'elle soit induite par le raccourcissement des télomères ou par les dommages à l'ADN (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007).

La chimiothérapie moderne dans les cancers repose sur la propriété des cellules cancéreuses à être plus sensibles au dommage à l'ADN que les autres cellules du corps humain, et les agents chimiques induisant de tels dommages sont depuis longtemps utilisés lors du traitement des cancers (Cheung-Ong, Giaever et al. 2013). L'importance de P53 dans la voie de signalisation de la réponse aux dommages à l'ADN induits par les drogues anti-cancer implique qu'une meilleure compréhension de cette voie est d'une importance capitale afin d'améliorer les techniques thérapeutiques actuelles et de développer de nouvelles approches. La chimiothérapie, les radiations ionisantes, induisent des dommages à l'ADN qui vont donc entraîner une réponse cellulaire au niveau de P53 : surexpression transitoire, et activation par diverses modifications post-traductionnelles. L'activation par phosphorylation est la modification post-traductionnelle la plus répandue dans les cellules de mammifères. P53 peut également subir des acétylations, méthylation, sumoylation ou ubiquitinylation. Cependant dans le cas de p53, les deux modifications post-traductionnelles les plus fréquentes sont la phosphorylation et l'acétylation (Bode and Dong 2004). Les signaux de stress entraînent l'activation de kinases et d'acétyltransférases qui modifieront P53 pour la stabiliser et l'activer dans le noyau cellulaire où elle remplira alors son rôle de facteur de transcription. Barlev *et al* ont montré que l'acétylation de P53 sur son extrémité C-terminale est en fait une cascade d'événements entraînant le recrutement de coactivateurs et d'HAT (*histone acetyltransferase*) et est indispensable à son activité (Barlev, Liu et al. 2001). L'équilibre entre acétylation et déacétylation de P53 est crucial pour son activité. Ainsi, la déacétylation de P53 par des HDAC (*histone deacetylase*) entraîne une baisse dose-dépendante de son activité suite à son ubiquitinylation et sa dégradation protéasomale (Juan, Shia et al. 2000, Bode and Dong 2004). La phosphorylation de P53 se produit quant à elle sur de nombreux sites qui ont été mis en évidence chez l'humain après un dommage à l'ADN, notamment sur les sérines 6, 9, 15, 20, 33, 37 et 46 et les thréonines 18 et 81 (Bode and Dong

2004). Lorsque P53 n'est plus requise, MDM2, COP-1 ou PIRH-2 permettent son ubiquitinylation et sa dégradation protéasomale (Bode and Dong 2004, Kruse and Gu 2009). Les principales modifications post-traductionnelles de P53 sont détaillées en figure 5. Ces modifications post-traductionnelles de P53 ne sont pas les seuls mécanismes permettant de réguler son expression. Il a été montré que l'ARNm de P53 peut aussi être stabilisé, modifiant l'expression de ce suppresseur de tumeur. Vilborg *et al* ont ainsi montré l'implication de WIG-1 dans cette modification post-transcriptionnelle, lui-même une cible du facteur de transcription P53. WIG-1 se lie à l'ARNm de P53 et le stabilise en 3' UTR (*untranslated region*) (Vilborg, Glahder et al. 2009, Lucchesi, Zhang et al. 2016).

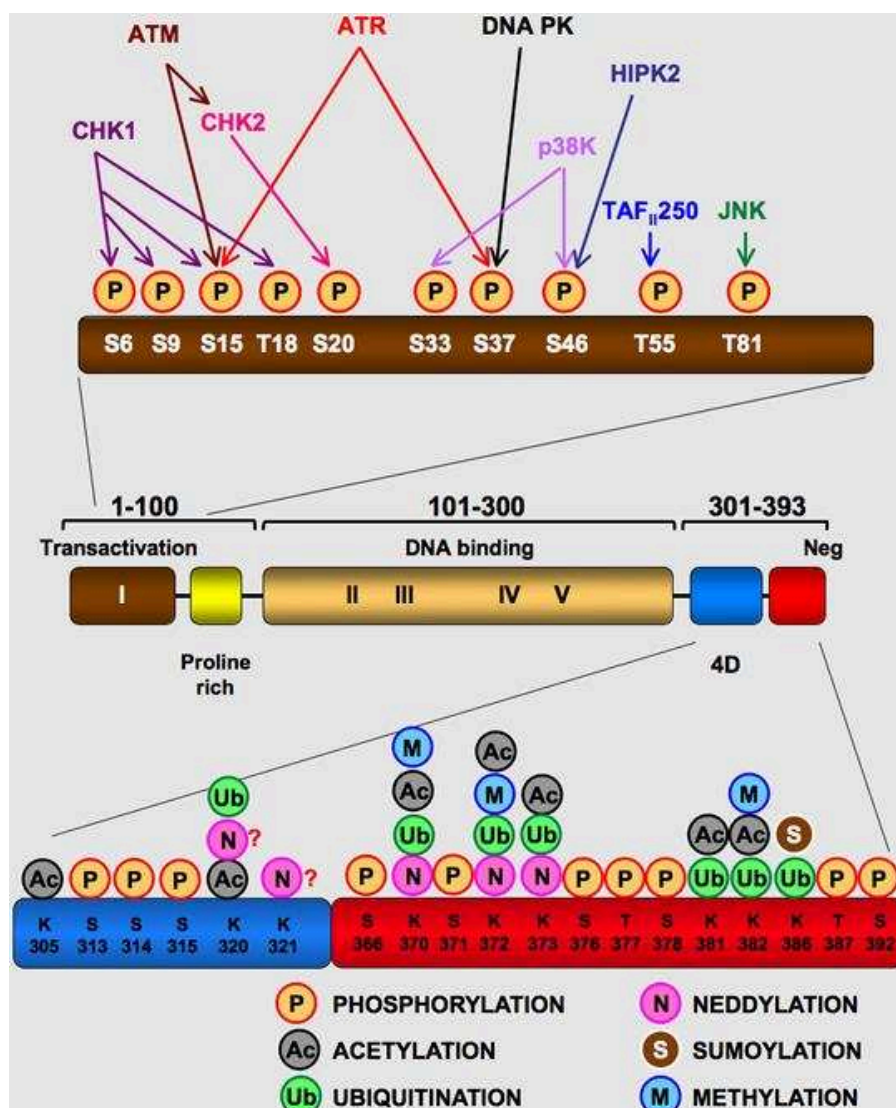


Figure 5 : Principales modifications post-traductionnelles de P53.

L'extrémité N-terminale est fortement phosphorylée, alors que l'extrémité C-terminale peut être phosphorylée, acétylée, neddylée, ubiquitinylée ou sumoylée (4D : domaine de tétramérisation ; Neg : domaine de régulation négative).

3. La voie de signalisation de P53 dans deux processus majeurs : apoptose et cycle cellulaire.

Le mécanisme par lequel le suppresseur de tumeur P53 contrôle le destin de la cellule n'est pas encore totalement maîtrisé de nos jours, et on ignore toujours pourquoi certaines cellules sont plus susceptibles de subir l'apoptose que d'autres, ce qui est le cas des cellules cancéreuses par rapport aux normales par exemple. On sait cependant que plusieurs facteurs entrent en compte dans le choix de l'induction d'un arrêt du cycle cellulaire ou de l'apoptose. Le promoteur qui est ciblé par le facteur de transcription P53, la durée et la magnitude de la réponse sont en cause.

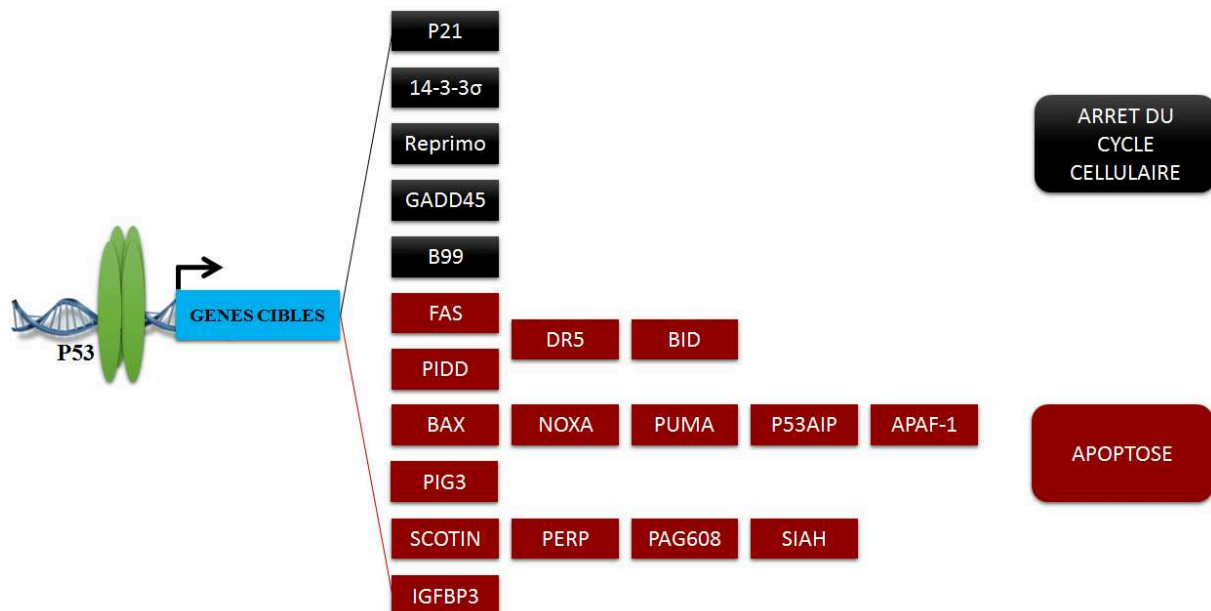


Figure 6 : Principaux gènes cibles du facteur de transcription P53 dans le cycle cellulaire et l'apoptose.

Les modifications post-traductionnelles de P53 ayant permis son activation sélectionnent dans une certaine mesure le choix de l'activité de P53. Il a été montré que les phosphorylations par exemple impactent sa liaison à l'ADN. Il a été aussi proposé qu'une certaine combinaison de phosphorylation/acétylation entraîne une réponse spécifique (Gu and Zhu 2012, Khoo, Verma et al. 2014). La méthylation, la sumoylation et la neddylation de P53 ont été rapportées comme régulant la stabilité de P53 et son activation transcriptionnelle. La variété de

modifications post-traductionnelles affectant P53 lui permet de répondre aux signaux de stress de manière adéquate en induisant la transcription de gènes cibles spécifiques induisant par exemple un arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose (figure 6) (Riley, Sontag et al. 2008). L'apoptose se produit selon la voie intrinsèque, ou mitochondriale, ou la voie extrinsèque des récepteurs de mort.

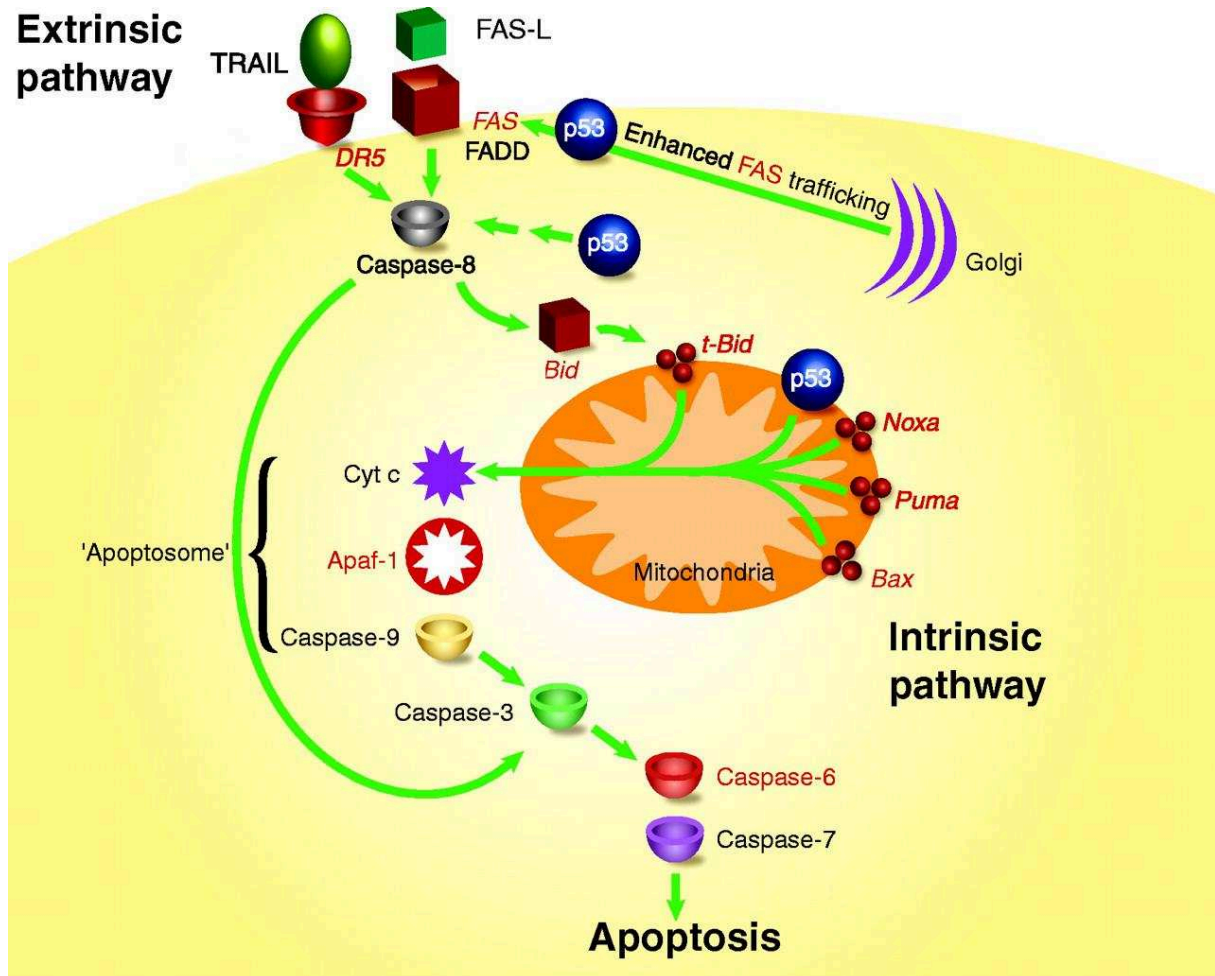


Figure 7 : P53 dans l'apoptose.

Les gènes cibles de P53 sont représentés en rouge, ce qui montre l'implication du suppresseur de tumeur p53 dans l'apoptose, à la fois dans la voie extrinsèque et intrinsèque. La convergence de ces deux voies apoptotiques à travers BID, un membre de la famille BCL-2 lui aussi régulé par P53 (Sax, Fei et al. 2002), est mise en évidence. Modifié d'après Haupt et al, 2003 (Haupt, Berger et al. 2003).

Les cellules subissant une apoptose dépendante de P53 meurent généralement en suivant la voie mitochondriale, cependant P53 peut également réguler la voie extrinsèque. L'activation de P53 via diverses modifications post-traductionnelles permettra sa stabilisation et sa translocation vers le noyau de la cellule (Liang and Clarke 2001). Elle pourra alors induire la transcription de nombreux gènes cibles, comme *APAF-1*, *BAX*, *NOXA* ou *PUMA* entre autres (Hemann and Lowe 2006), avant la libération du cytochrome c par la mitochondrie, la formation de l'apoptosome et l'activation des caspases menant finalement à l'apoptose (figure 7). Dans la voie extrinsèque, P53 va induire la transcription de *FAS* et *DR5*, lui-même induit en réponse aux dommages à l'ADN (Wu, Burns et al. 1997), ce qui entraînera l'apoptose *via* la caspase 8. Les deux voies de l'apoptose, intrinsèque et extrinsèque, convergent à travers le clivage et l'activation de BID par les caspases 8 et 10, ce qui amplifiera le signal apoptotique. Ainsi, après le déclenchement de la voie des récepteurs de mort, BID pourra s'insérer dans la membrane de la mitochondrie, et activer BAX et BAK initiant les événements de la voie intrinsèque menant à la formation de l'apoptosome (Haupt, Berger et al. 2003). Le niveau d'expression dans la cellule des protéines anti-apoptotiques telles que BCL-2 est également crucial dans la régulation de ce processus. En effet dans plusieurs types de cancers comme le lymphome non hodgkinien ou le cancer du poumon à petites cellules le gène codant pour BCL-2 est amplifié (Yip and Reed 2008). Cependant P53 cytoplasmique peut aussi se lier directement à BCL-2 et l'antagoniser, entraînant finalement l'apoptose (Hemann and Lowe 2006).

Suite à un dommage à l'ADN, P53 n'induit pas uniquement l'apoptose mais peut également entraîner l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 afin de permettre la réparation de l'ADN avant l'entrée en phase S, et éviter ainsi une accumulation de mutations due à la réplication d'un génome altéré. L'implication de P53 dans ce processus est maintenant parfaitement établie, suite à de nombreux travaux effectués dans les années 1990, et mettant en évidence l'absence d'arrêt en phase G1 de cellules ayant subies des radiations ionisantes mais dépourvues de P53 (Geyer, Nagasawa et al. 2000). La réponse au dommage à l'ADN entraînant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 peut dans un premier temps être indépendante de P53 mais celle-ci bien que rapide sera alors transitoire. Il sera nécessaire d'impliquer P53 pour s'assurer que l'arrêt du cycle cellulaire perdure et que le passage en phase S et la réplication de l'ADN soient inhibés.

Cela passe par P21, connu sous le nom de *cyclin-dependent kinase inhibitor*, qui est une cible transcriptionnelle de P53 et qui interagit avec le complexe CDK2-Cycline E et l'inhibe (Bartek and Lukas 2001, Busino, Chiesa et al. 2004). L'établissement transitoire de l'arrêt du cycle est permis par l'inhibition de CDC25A puis l'implication de P53 et P21 en permettra la maintenance. En effet, suite à un dommage à l'ADN, les kinases ATR et ATM vont activer respectivement CHK1 et CHK2, qui alors phosphoryleront CDC25A. Cette hyperphosphorylation de CDC25A la marque pour une ubiquitinylation et une dégradation protéasomale. L'absence de cette phosphatase empêche le retrait des groupements phosphates au niveau des résidus thréonine 14 et tyrosine 15 qui maintiennent le complexe CDK2-Cycline E dans un état inactif, amenant à l'arrêt en phase G1/S (Busino, Chiesa et al. 2004). Cependant ce mécanisme est temporaire et nécessite ensuite l'implication de P53.

P53, une fois activée et stabilisée par ATM, ATR, CHK1 et CHK2, va agir en tant que facteur de transcription pour P21. CHK2 est indispensable à ce processus. Hirao *et al* ont montré que des cellules issues de souris KO pour CHK2 étaient résistantes à l'apoptose induite par les dommages à l'ADN, et que P53 n'était pas stabilisée et n'induisait pas l'expression de P21. La réintroduction de CHK2 entraînait alors la restauration de la transcription de gènes cibles de P53, dont P21, suite à la phosphorylation de P53 sur sa sérine 20 empêchant l'interaction entre MDM2 et P53 (Hirao, Kong et al. 2000). P53, en induisant la transcription de P21 permet son accumulation, jusqu'à atteindre un seuil suffisant au maintien de l'inhibition du complexe CDK2-Cycline E, et ainsi à la maintenance d'un arrêt au point de contrôle G1/S du cycle cellulaire (Bartek and Lukas 2001).

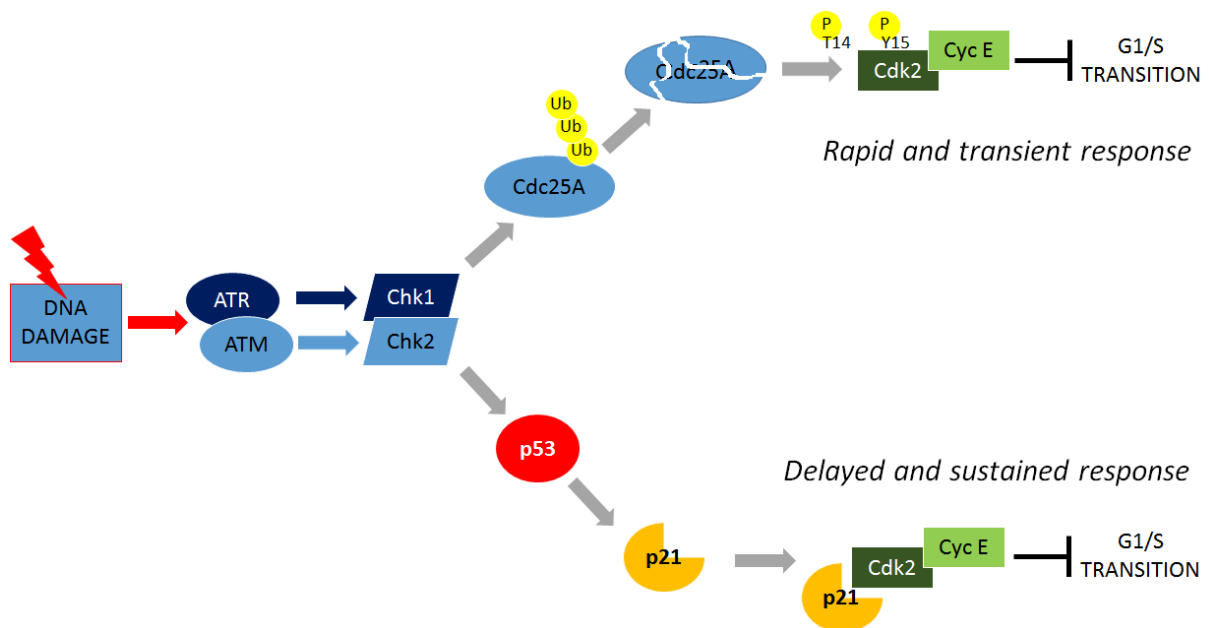


Figure 8 : Représentation schématique de l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire après un dommage à l'ADN.

P53, en association avec d'autres protéines, est un senseur du stress oncogénique, un type de stress caractérisé par une élévation significative de l'activité oncogénique dans les cellules, due à l'augmentation de l'expression de proto-oncogènes, ou à des mutations qui font agir certaines protéines en tant qu'oncogènes. En effet, l'activation d'un oncogène seul n'est généralement pas suffisante pour induire la transformation cellulaire et cette observation a donné naissance au concept de stress oncogénique (Haigis and Sweet-Cordero 2011, Bouafia, Corre et al. 2014). Une activation efficace de la voie de signalisation de P53 aux stades initiaux de la tumorigénèse peut prévenir son développement et éliminer les cellules initiatrices de tumeurs. C'est ce qui rend la voie P53 si cruciale, de par son rôle central dans la prévention tumorale (Oren 2003). Malheureusement, P53 est mutée dans plus de la moitié des cancers humains, ce qui démontre son importance. Ainsi, il existe de nombreux cancers où P53 est inactive ou même non exprimée et cela impacte le traitement, le rendant alors parfois totalement inefficace et les solutions thérapeutiques devront alors être adaptées (Weller 1998).

4. Les mutations de P53.

L'apparition de mutations du gène TP53 peut avoir 3 conséquences, qui peuvent parfois se produire simultanément. Une des conséquences de la mutation est la perte de fonction de P53. Cela peut se produire si les deux allèles deviennent mutés, ou si l'allèle restant est perdu, et les cellules seront alors dépourvues de la protection anti-tumorale fournie par P53 (Sigal and Rotter 2000). Il est également possible que certaines formes mutées de P53 voient leur stabilité augmentée de par leur impossibilité à se fixer à l'ADN et à activer la transcription de *MDM2*. La conséquence la plus fréquente dans ce cas est que la version mutée de P53 sera exprimée en plus grande quantité que la version sauvage, ce qui pourra entraîner par exemple la formation de tétramères contenant un mix de ces différentes versions de P53, alors possiblement inactifs. Ainsi, les versions mutées sur le domaine de liaison à l'ADN peuvent agir en tant que dominants-négatifs et annuler les fonctions normales de P53 sauvage (Chan, Siu et al. 2004). De la même manière, il existe des isoformes de P53, créées la plupart du temps par épissage alternatif. Ces isoformes peuvent avoir une activité biologique par eux-mêmes, augmenter ou réduire les fonctions de P53. Ainsi, il a été montré que la co-transfection de P53 avec $\Delta 133P53$ inhibe fortement l'apoptose dépendante de P53 d'une manière dose-dépendante, et que P53 β (isoforme sans l'extrémité C-terminale) complexe avec P53 ce qui augmente l'activité transcriptionnelle de P53 sur le promoteur de *BAX* (Bourdon 2007). Si des isoformes de P53 peuvent augmenter son activité transcriptionnelle, c'est aussi le cas de versions mutées de cette protéine, qui pourront même acquérir une nouvelle activité, souvent absente lorsque P53 n'a pas subi de mutation. On parle alors de gain de fonction, ce qui peut alors entraîner des conséquences néfastes par gain de fonction oncogénique, en interférant par exemple avec l'apoptose normalement indépendante de P53 (Sigal and Rotter 2000, Oren and Rotter 2010).

a. Inactivation.

Le syndrome de Li Fraumeni (SLF) consiste en une prédisposition à diverses tumeurs. Il n'existe pas d'exclusion de type tumoral, néanmoins 70% des cancers liés au SLF sont des ostéosarcomes, des sarcomes des tissus mous, des cancers du sein pré-ménopause, des

tumeurs du cerveau ou des carcinomes adrénocorticaux. Une caractéristique très importante du SLF est qu'on retrouve une mutation germinale du gène *TP53* dans 80% des familles SLF. Or, l'inactivation de *TP53* suite à cette mutation germinale entraîne comme conséquence une augmentation phénoménale du risque de cancer : 50% à 30 ans, et 90% à 60 ans (Schneider, Zelle et al. 1993).

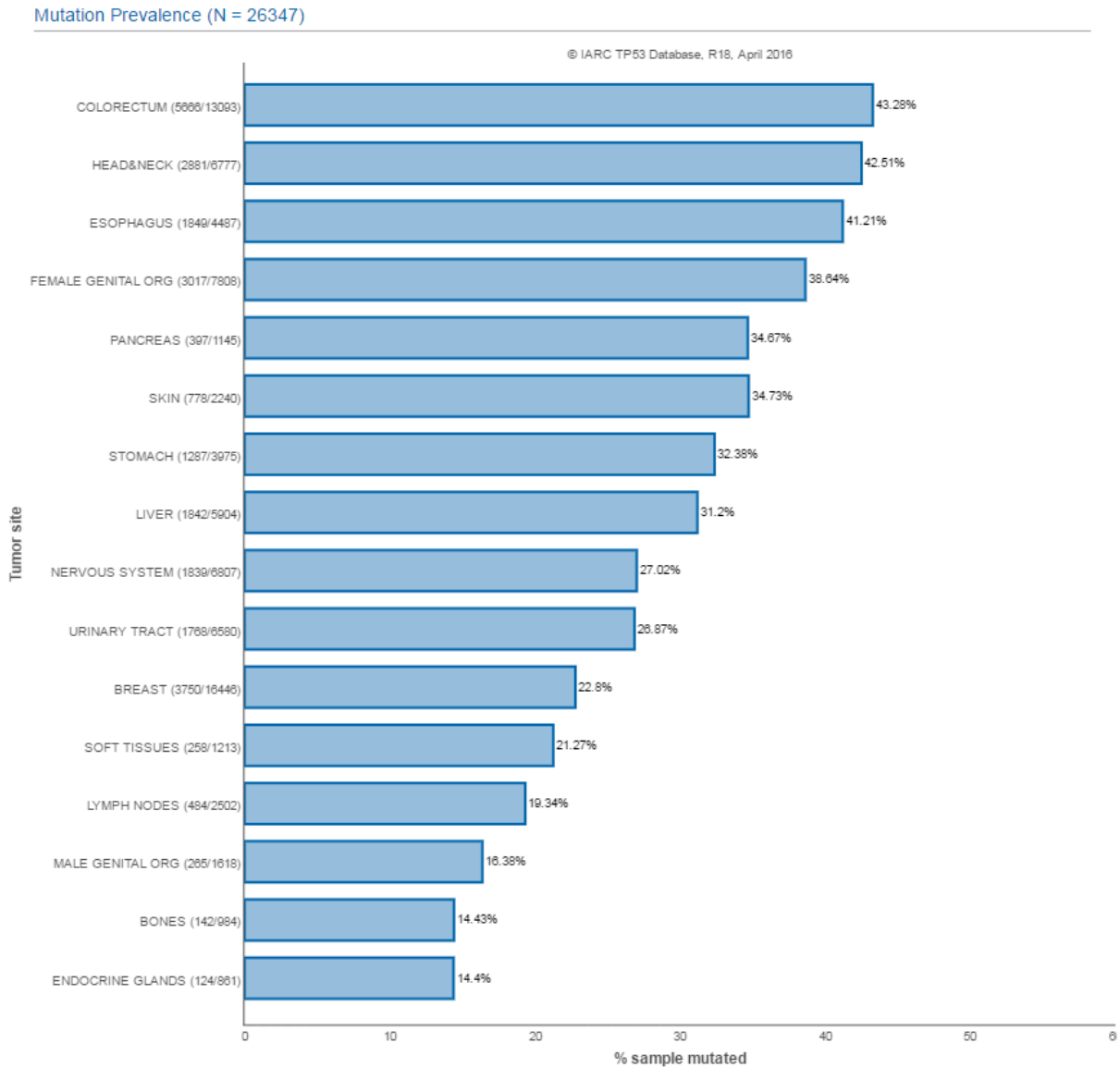


Figure 9 : TP53 est inactivé par des mutations somatiques dans la plupart des cancers humains.

Base de données de l'IARC, avril 2016.

Le gène TP53 est inactivé par des mutations somatiques dans la plupart des cancers humains (figure 9), principalement au niveau du site de liaison à l'ADN par des mutations faux-sens

résultant en substitutions d'une base ou par la perte d'allèles (Olivier, Hollstein et al. 2010). Cependant, un faible taux de mutations de *TP53*, comme dans le cas du cancer du col de l'utérus où le taux de mutation avoisine les 6%, ne signifie pas que P53 sera fonctionnelle la plupart du temps. En effet, *TP53* peut alors être inactivé par d'autres mécanismes, par exemple sa dégradation par la protéine E6 du papillomavirus ou dans d'autres cancers par une surexpression de *MDM2*, un gène codant pour une E3 ubiquitine ligase qui interagit avec P53 et entraîne sa dégradation protéasomale (Momand, Jung et al. 1998, Tommasino, Accardi et al. 2003). P53 est connue pour activer la transcription de *MDM2*, formant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif. C'est le cas également pour COP-1 et PIRH-2, et ces ubiquitines ligases sont surexprimées dans plusieurs types de cancers. Ces régulateurs critiques de P53 vont donc avoir une influence dans le contrôle de l'apoptose, de l'arrêt du cycle cellulaire et de la réparation des dommages à l'ADN (Harris and Levine 2005, Shimada, Kitagawa et al. 2009, Li, Wang et al. 2012). Les conséquences de la perte du suppresseur de tumeur P53 sont donc multiples, et il est connu depuis maintenant une vingtaine d'années que cela impacte également l'efficacité des traitements anti-cancer (Wattel, Preudhomme et al. 1994, Aas, Borresen et al. 1996).

Ainsi, c'est dans le cancer du sein que la corrélation entre inactivation de P53 et mauvaise survie du patient est la plus clairement mise en évidence. En effet, les mutations faux-sens de P53, représentant 80% des mutations et touchant la plupart du temps le site de liaison à l'ADN (Jordan, Inga et al. 2010), sont dans ce cas extrêmement délétères et associées à la pire des statistiques de survie dans ce cancer. Une étude a même montré que dans le cas de mutations n'étant pas faux-sens, ou alors touchant le domaine d'oligomérisation, la survie des patients atteints par un cancer du sein était équivalente à celle observée chez ceux porteurs de P53 sauvage (Vegran, Rebucci et al. 2013). Les mutations faux-sens confèrent également un grand risque de récurrence du cancer, fait observé également dans le cancer du poumon. De la même manière, l'efficacité des traitements et donc indirectement la survie des patients suite à l'inactivation de P53 sont touchées dans de nombreux autres cancers, notamment les cancers hématopoïétiques, colorectaux, de la tête et du cou, ou encore du foie (Robles and Harris 2010). Cependant, des mutations de P53 entraînant non pas une inactivation mais un gain de fonction peuvent également avoir des répercussions variées et souvent néfastes.

b. Gain de fonction.

Les conséquences de mutations gain de fonction de P53 sont diverses, mais ont été décrites comme pouvant notamment impacter l'apoptose, la migration cellulaire, ou encore la prolifération et l'invasion (Oren and Rotter 2010). L'effet anti-apoptotique de mutations gain de fonction de P53 a été mis en évidence dès les années 1990, lorsque des cellules portant de telles mutations montraient une augmentation significative de leur résistance aux traitements anti-cancer tels que l'exposition à des radiations ionisantes ou la chimiothérapie (Li, Sutphin et al. 1998). En inhibant ces versions mutées de P53 par interférence à ARN, il a été possible dans certains cas de restaurer l'efficacité de tels traitements, démontrant ainsi l'impact négatif de la version mutée de P53. Vikhanskaya *et al* ont montré que l'inhibition des versions mutantes de P53 par interférence à ARN entraîne dans plusieurs lignées cellulaires l'expression de gènes cibles de P53 et normalement impliqués dans la réparation de l'ADN et l'apoptose (Vikhanskaya, Lee et al. 2007). Certains gènes cibles de P53, ayant en temps normal des propriétés anti-tumorales peuvent voir leur fonction détournée lorsqu'une version mutante de P53 sera impliquée dans leur régulation au lieu de la version sauvage. C'est le cas d'EGR1, un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la prolifération, la croissance, l'apoptose et l'angiogenèse, des processus intrinsèquement liés à la progression tumorale. Une étude a montré que le statut de P53 impacte drastiquement les effets d'EGR1. Dans les cellules exprimant P53 sauvage il agira normalement et exprimera des fonctions anti-tumorales, alors que la présence d'une version mutante de P53 entraînera des effets pro-tumoraux (Weisz, Zalcenstein et al. 2004). D'autres travaux ont montré un lien entre mutations gain de fonction de P53 et migration/invasion cellulaire, et cela a été corrélé avec une progression vers un stade agressif, avancé, du cancer (Oren and Rotter 2010). Le fait que les versions mutantes de P53 ne soient pas forcément capables d'induire la transcription des cibles usuelles de P53 sauvage a un impact majeur, et notamment sur sa stabilité. Une des cibles les plus décrites de P53 est l'ubiquitine ligase MDM2, responsable d'un rétrocontrôle négatif de P53. Dans la plupart des cas, les versions mutées de P53 sont incapables d'activer la transcription de MDM2, ce qui résulte en un niveau faible de cette dernière. La conséquence directe est que bien que MDM2 soit capable de réguler autant P53 sauvage que mutée, son faible niveau entraînera une augmentation de la demi-vie de la version mutée avec de multiples et souvent néfastes conséquences (Terzian, Suh et al. 2008). Une mutation de P53

entraînant un gain de fonction peut aussi lui permettre d'interagir avec de nombreuses protéines, impactant leurs activités (figure 10).

Ainsi, ces deux possibilités, gain ou perte de fonctions, sont donc d'une importance capitale du fait du rôle central de P53 dans différentes voies de signalisation anti-tumorales, et l'absence de l'activité normale de P53 nécessite l'application d'autres stratégies thérapeutiques.

Modèle	Description	Exemples
	P53 mutante interagit avec l'ADN sur ses sites de fixation ou d'autres régions, pour réguler la transcription. Des cofacteurs de transcription et d'autres protéines peuvent être impliqués.	<ul style="list-style-type: none"> ● PML, EGR1, TOP1 ● p300
	P53 mutante augmente la transcription en complexant avec des facteurs de transcription. Des cofacteurs de transcription et d'autres protéines peuvent être impliqués.	<ul style="list-style-type: none"> ● EGR1, TopBP1, PIN1, VDR ■ ETS1, NF-κB, p63, p73, SP1, SREBP, NF-Y, ETS2 ● p300, HDAC, CBP
	En réponse à un stimulus, P53 mutante est recrutée sur un complexe de régulation de la transcription pouvant inclure des FT, des cofacteurs et d'autres protéines. Cela résulte la plupart du temps en l'activation de l'expression de gènes cibles.	<ul style="list-style-type: none"> ● VDR, PLK2 ■ NF-Y, SP1 ● p300
	P53 mutante diminue la transcription en se liant à des FT et/ou des cofacteurs de transcription et d'autres protéines, parfois empêchant leur liaison à l'ADN. Cette activité peut aussi impliquer l'agrégation de P53 mutante avec d'autres protéines.	<ul style="list-style-type: none"> ● TopBP1, ANKRD11, VDR, SMAD2 ■ p63, p73, SP1 ● p300
	P53 mutante interagit avec d'autres protéines, non directement impliquées dans la régulation de la transcription, et augmente ou bloque leur fonction.	<ul style="list-style-type: none"> ● NRD1, EFEMP2, TOP1, BTG2, MRE11

Figure 10 : En cas de gain de fonction de P53 mutante, cela peut lui permettre d'interagir avec différentes protéines ce qui induira une augmentation ou inhibition de leurs activités. FT : Facteur de transcription ; X : Toute protéine autre qu'un facteur de transcription ou qu'un cofacteur de transcription. Modifié, d'après « p53 mutations in cancer » (Muller and Vousden 2013).

5. Contrer la résistance induite par l'inactivation de P53 : la thérapie du point de contrôle G2/M et le phénomène de létalité synthétique.

Les cellules cancéreuses présentent des mutations sur des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs, ce qui affecte l'efficacité de certains points de contrôles du cycle cellulaire, G1/S, S, ou G2/M, et le suppresseur de tumeur P53 est impliqué dans les voies de signalisation des points de contrôle du cycle cellulaire (Giono and Manfredi 2006). Le point de contrôle G1/S du cycle cellulaire permet à la cellule d'empêcher la réplication de l'ADN lorsque celui-ci a été endommagé. La progression du cycle étant arrêtée, cela donne le temps nécessaire à la cellule pour soit réparer l'ADN soit entrer en sénescence ou apoptose si le dommage est trop important (Mombach, Bugs et al. 2014). Cependant, la déficience en P53 entraîne l'impossibilité d'un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire suite à un dommage à l'ADN. En effet, P21, de la famille des inhibiteurs des cdk, est une cible transcriptionnelle de P53 et il a été montré que P21 est activée et localisée dans le noyau en présence de P53 sauvage, mais pas dans les cellules exprimant une version mutée de P53 (Giono and Manfredi 2006). Or, P21 est indispensable pour l'arrêt en phase G1, et pour sa maintenance (Waldman, Kinzler et al. 1995). L'absence de l'activité de P53 force donc la cellule à se reposer sur le point de contrôle G2/M afin de réparer les dommages à l'ADN. En effet, la protéine P53, bien que participant également à cet arrêt en phase G2, a un rôle plus tourné vers la maintenance de ce point de contrôle que son initiation. La déficience en P53 est donc moins rédhibitoire qu'elle ne l'est pour le point de contrôle G1/S (Bunz, Dutriaux et al. 1998). Une stratégie anti-cancer intéressante consiste donc à inhiber les points de contrôle encore actifs afin de provoquer une catastrophe mitotique et entraîner la mort des cellules cancéreuses (Bucher and Britten 2008). Si les cellules normales ont leurs voies de signalisation des points de contrôles du cycle cellulaire intactes, l'absence du point de contrôle G1/S est, de par la fréquence des mutations touchant P53, une caractéristique répandue dans de nombreux cancers (Massague 2004, Chen, Stephens et al. 2012). Il est donc fréquent que les cellules tumorales doivent se reposer sur les points de contrôle S et G2/M afin de réparer les dommages à l'ADN induits par les traitements anti-cancer, radiations ionisantes ou chimiothérapie (Chen, Stephens et al. 2012).

Comme le point de contrôle S entraîne plus un ralentissement de la réplication qu'un véritable arrêt (Willis and Rhind 2009), l'inhibition du point de contrôle G2/M est devenu une cible privilégiée pour le développement de nouvelles thérapies, ciblant par exemple les kinases ATR, CHK1 ou WEE1 (Kawabe 2004, Bucher and Britten 2008, Chen, Stephens et al. 2012).

a. Inhiber ATR/ATM.

Les phosphatases CDC25 sont au cœur de la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire. Les trois isoformes A, B et C coopèrent au cours du cycle, et notamment pour le point de contrôle G2/M, où la kinase CHK1 va également jouer un rôle majeur dans l'arrêt du cycle cellulaire. Après son activation par ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3 related*), elle phosphoryle CDC25A. Un autre mécanisme peut également provoquer l'arrêt en G2/M, et implique P38MAPK et la phosphorylation de CDC25B et C. Cela crée des sites de liaison pour 14-3-3 σ et empêche ainsi les trois isoformes de CDC25 d'activer le complexe CDK1/Cycline B, induisant donc l'arrêt en G2 (Boutros, Dozier et al. 2006).

L'idée de potentialiser des agents anti-cancer par l'inhibition de points de contrôle du cycle cellulaire date de plus de 30 ans. En effet, c'est en 1982 que Ching Lau et Arthur Pardee montrent que la caféine empêche l'activation du point de contrôle G2/M et ainsi augmente la cytotoxicité des moutardes azotées (Lau and Pardee 1982). Il sera démontré plus tard qu'elle agit par l'inhibition des kinases ATM (*ataxia telangiectasia-mutated*) et ATR (Sarkaria, Busby et al. 1999). Malheureusement, les effets de la caféine sont multiples et dépendants de la dose utilisée. Faire varier la dose peut entraîner un arrêt au point de contrôle G1/S, une induction de l'apoptose ou même une protection contre elle. Et une plus forte dose peut donc également induire l'arrêt en G2/M. Ces effets sont donc extrêmement complexes à maîtriser *in vitro* et à plus forte raison *in vivo*, et son usage est de toute manière rendu trop compliqué de par la toxicité de la molécule chez l'humain aux concentrations requises pour un effet thérapeutique. Le développement d'analogues de la caféine conservant son activité biologique mais présentant une toxicité moindre pourrait être une solution intéressante dans le cas de combinaisons avec des agents inducteurs de dommages à l'ADN pour le traitement du cancer (Bode and Dong 2007). D'autres inhibiteurs d'ATR ont été développés et sont actuellement en essai clinique, comme par exemple l'AZD6738 testé en monothérapie ou en

combinaison avec le carboplatine, l'olaparib ou la radiothérapie (Benada and Macurek 2015, Yap, Krebs et al. 2016). Le VE-822, un analogue du VE-821 mais possédant une meilleure activité et spécificité envers ATR (Fokas, Prevo et al. 2013), est également en phase I d'essai clinique, en combinaison avec la gemcitabine, le cisplatine et l'étoposide (Benada and Macurek 2015).

b. Inhiber CHK1.

Pour l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire, les kinases CHK1 et CHK2 agissent en aval d'ATR et ATM respectivement. CHK1 et CHK2 phosphorylent les phosphatases CDC25, inactivant leur activité et les forçant à rester dans un statut inactif (Boutros, Dozier et al. 2006, Do, Doroshov et al. 2013). Il est donc logique que des molécules ciblant CHK1 et 2 aient été développées. Le développement de ces molécules a alors montré que l'importance de CHK1 était supérieure à celle de CHK2 dans la protection des cellules après un dommage à l'ADN (Sakurikar and Eastman 2015). Ces travaux ont mené à la caractérisation de la 7-hydroxystaurosporine (UCN-01), premier inhibiteur de CHK1 à arriver en essai clinique (Sakurikar and Eastman 2015). De nombreuses études ont été effectuées sur cette molécule, dont notamment une qui a montré l'abolissement du point de contrôle G2/M suite à un dommage à l'ADN et un traitement avec l'UCN-01 pour inhiber CHK1 ce qui a conduit à une augmentation de la toxicité du cisplatine (CDDP) d'un facteur 60 (Bunch and Eastman 1996). Malheureusement, la spécificité de l'UCN-01 est faible, cet inhibiteur a un haut taux de liaison aux protéines plasmatiques, notamment l'AGP (*alpha-1 acidic glycoprotein*) ce qui fait que l'UCN-01 possède une longue demi-vie. Cela entraîne une biodisponibilité très variable. Finalement, l'UCN-01 a été approuvé par la FDA (*Federal Drug Administration*) et testé lors d'essais cliniques (Fuse, Tanii et al. 1998, Fuse, Hashimoto et al. 2000).

De nombreux autres inhibiteurs de CHK1 ont été développés, comme l'AZD7762 (Sausville, Lorusso et al. 2014), le PF-00477736 (Blasina, Hallin et al. 2008), le SCH900776 (Karp, Thomas et al. 2012) ou encore le XL9844 qui lui agit différemment et empêche le point de contrôle de la phase S (Matthews, Yakes et al. 2007). La plupart des molécules développées comme inhibiteurs de CHK1 ont montré leur inefficacité en tant qu'agent chimiothérapeutique unique, à cause de leur toxicité ou à cause d'un phénomène de compensation par activation

des voies ATM et ERK1/2 (Dent, Tang et al. 2011). Cependant, certains inhibiteurs ont pu donner des résultats satisfaisants en combinaison avec d'autres molécules, notamment la gemcitabine, déjà autorisée par la FDA pour le traitement de nombreux cancers (Sakurikar and Eastman 2015). Cependant, l'inhibition d'ATR, ATM ou CHK1 ne sont pas les seules stratégies disponibles afin d'empêcher l'activation du point de contrôle G2/M du cycle cellulaire.

c. Inhiber WEE1.

La kinase WEE1 (*WEE1-like protein kinase*) est un régulateur majeur du cycle cellulaire. Cette kinase a été mise en évidence chez *Schizosaccharomyces pombe* puis décrite comme un élément inhibiteur de la progression du cycle cellulaire pour la première fois dans les années 1980 (Nurse and Thuriaux 1980, Russell and Nurse 1987). Il a été montré au début des années 1990 que WEE1 est responsable de la phosphorylation de CDK1-Cycline B sur la tyrosine 15 (Parker and Piwnica-Worms 1992) ce qui résulte en un arrêt du cycle cellulaire en G2 après un dommage à l'ADN. En phosphorylant les CDK1 et 2, WEE1 contrôle ainsi l'entrée en phase mitotique des cellules et la réplication de l'ADN lors de la phase S du cycle cellulaire. De plus, la surexpression de WEE1 a été observée dans plusieurs types de cancers, comme le carcinome hépatocellulaire, les cancers du sein luminaux et HER-2 positifs, les glioblastomes ou les mélanomes malins, et cette surexpression a été associée à un faible taux de survie (Do, Doroshov et al. 2013). Ainsi, Iorns *et al* ont montré que la surexpression de WEE1 était inversement corrélée à la survie dans les cellules de cancer du sein CAL51, et que son inhibition par interférence à ARN était quant à elle corrélée à une perte de viabilité dans cette lignée cellulaire (Iorns, Lord et al. 2009). Masaki *et al* ont montré l'implication de WEE1 dans la transformation maligne de la cirrhose en carcinome hépatocellulaire et ont suggéré que son inhibition pouvait être une stratégie thérapeutique envisageable (Masaki, Shiratori et al. 2003). Et enfin, l'inhibition de WEE1 dans le glioblastome a également été décrite comme une stratégie intéressante suite à la découverte de l'importance de cette kinase dans le contrôle du passage en phase mitotique (Mir, De Witt Hamer et al. 2010). Une telle importance dans la régulation du cycle cellulaire a donc fait de WEE1 une cible thérapeutique lors de nombreuses études. En effet, l'inactivation de P53 force les cellules à se reposer sur le point de contrôle G2 du cycle cellulaire pour arrêter le cycle et donner à la cellule le temps

nécessaire à la réparation de l'ADN. Des travaux ont montré que l'inhibition de WEE1 force les cellules avec des dommages à l'ADN à entrer en mitose, amenant ensuite à une catastrophe mitotique (De Witt Hamer, Mir et al. 2011). Hirai *et al* ont montré que l'inhibition spécifique de la kinase WEE1 par le MK-1775 permettait la sensibilisation des tumeurs p53-négatives à divers agents induisant des dommages à l'ADN (gemcitabine, CDDP et carboplatine). De plus, l'implication de WEE1 dans cette sensibilisation a été démontrée par sa corrélation avec l'inhibition de la phosphorylation de CDC2, une cible directe de WEE1 (Hirai, Iwasawa et al. 2009). Une autre étude récente a montré que l'inhibition de WEE1 par un traitement au MK-1775 suite à une chimiothérapie de tumeurs P53-négatives avec du CDDP, permettait l'abolition de la résistance de ces cellules cancéreuses à la thérapie anti-cancer. Osman *et al* ont montré que l'inhibition de WEE1 par le MK-1775 entraînait une réponse aux dommages à l'ADN, suggérant une potentielle utilisation comme agent unique. Ils ont également montré que l'inhibition de WEE1 entraînait le passage en mitose de cellules PCI-13 de carcinome de la tête et du cou mutées pour P53. Normalement résistantes au CDDP, ces cellules subissent alors suite à ce traitement une catastrophe mitotique les sensibilisant à cette thérapie (Osman, Monroe et al. 2015). Ces résultats prometteurs ont conduit à la réalisation de plusieurs essais précliniques et cliniques du MK-1775, aussi bien en association qu'en monothérapie où son action a été démontrée chez des patients atteints de tumeurs solides réfractaires porteuses de mutations de *BRCA1* (Kreahling, Gemmer et al. 2012, Do, Wilsker et al. 2015). *BRCA1* joue un rôle prépondérant dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue (Zhang 2013), ce qui pourrait impliquer un phénomène de létalité synthétique dans cet essai clinique. L'induction de dommages à l'ADN par le MK-1775 permettrait ainsi de tuer les cellules cancéreuses porteuses d'une mutation somatique de *BRCA1*, les cellules normales ne portant pas cette mutation ayant une meilleure capacité à réparer les dommages induits par ce traitement. En effet, bien que cette utilisation en tant qu'agent unique ait été également corrélée à l'inhibition de la phosphorylation de CDC2, il y a actuellement controverse sur le mécanisme mis en œuvre. Il a ainsi été proposé que le MK-1775 induise par lui-même des dommages à l'ADN ce qui entraîne la mort cellulaire dans un mécanisme indépendant d'une entrée précoce en phase mitotique (Do, Doroshov et al. 2013, Do, Wilsker et al. 2015).

A ceci s'ajoute de récentes études qui ont démontré le rôle de la kinase WEE1 dans la réparation de l'ADN et plus particulièrement dans le processus de recombinaison homologue et de stabilisation des fourches de réplication. Dominguez-Kelly *et al* ont montré que l'inhibition de WEE1 dans les cellules U2OS, donc positives pour P53, entraînait une accumulation des cellules en phase S et une réponse aux dommages à l'ADN (Dominguez-Kelly, Martin et al. 2011). De plus, la déplétion de WEE1 diminue quasiment de moitié la vitesse de la fourche de réplication. En effet, WEE1 interagit avec l'endonucléase MUS81, et le complexe MUS81-EME1 est connu pour jouer un rôle critique dans les étapes initiales de la réparation de l'ADN par recombinaison homologue en clivant l'ADN au niveau des fourches de réplication et produisant temporairement des ruptures double-brin (Dominguez-Kelly, Martin et al. 2011, Martin, Dominguez-Kelly et al. 2011). Toutes ces études ont montré l'importance à de nombreux niveaux de la kinase WEE1, et l'intérêt d'agir sur sa régulation pour l'établissement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

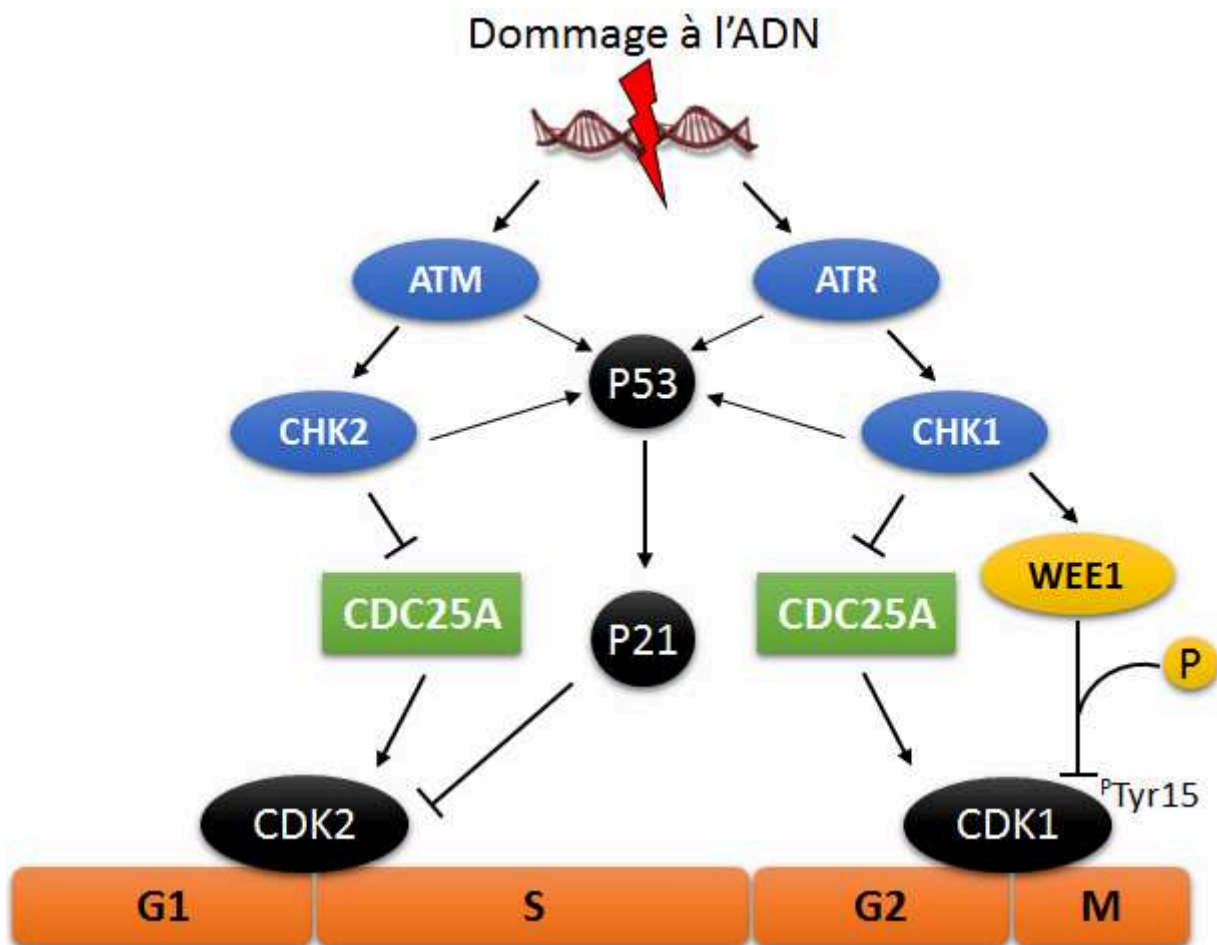


Figure 11 : Représentation schématique des voies de signalisation impliquant ATM, ATR, CHK1, CHK2 et WEE1 dans la mise en œuvre des points de contrôle du cycle cellulaire.

Suite à un dommage à l'ADN détecté en phase G1, ATR et ATM vont activer CHK1 et CHK2, entraînant l'inactivation de CDC25A. Le complexe CDK2-Cycline A/E est alors maintenu dans un état inactif et le cycle est arrêté en phase G1. WEE1 agit quant à elle lors du point de contrôle G2. Ainsi, suite à un dommage à l'ADN détecté au point de contrôle G2, les kinases ATM ou ATR seront activées, en fonction du type de stress génotoxique. ATR est la kinase principale responsable de la phosphorylation et de l'activation de CHK1. CHK1 va ensuite phosphoryler WEE1 et CDC25A, ce qui entraîne l'activation de l'activité kinase de WEE1 et l'inactivation de l'activité phosphatase de CDC25A. WEE1 phosphoryle et inactive CDK1-Cycline B sur le résidu tyrosine 15, résultant en l'arrêt du cycle cellulaire en G2, et ainsi allouant du temps à la cellule pour procéder à la réparation de l'ADN.

d. La létalité synthétique : cibler les cellules mutées pour P53.

Le phénomène de létalité synthétique est ancien, et a été décrit dès les années 1920 par Calvin Bridges chez *Drosophila melanogaster* (Bridges 1922). Deux gènes seront décrits comme létaux-synthétiques si uniquement la dérégulation simultanée des deux gènes résulte en la mort cellulaire. Il faut différencier la létalité synthétique du phénomène d'addiction oncogénique, où une cellule cancéreuse dépend de l'activité d'une oncoprotéine pour sa croissance et sa survie. La cellule tumorale devient dépendante des modifications des caractéristiques cellulaires de prolifération, de survie et d'invasion induites par l'oncogène. La suppression de cet oncogène peut alors restaurer les propriétés normales de la cellule. Cela a permis le développement par les laboratoires pharmaceutiques ces dernières années de nombreux inhibiteurs ciblant par exemple des protéines kinases oncogéniques comme BCR-ABL, BRAF ou EML4-ALK (Fece de la Cruz, Gapp et al. 2015). Cependant, dans le cas de mutations entraînant une perte de fonction comme cela peut être le cas pour P53, altérer l'expression d'un partenaire létal-synthétique de *TP53* devrait théoriquement pouvoir détruire sélectivement les cellules cancéreuses mutées pour P53 et épargner les cellules normales, qui elles ne présentent pas de mutation de ce gène suppresseur de tumeur (Wang and Simon 2013).

Généralement, la stratégie sera d'inactiver par un traitement avec un inhibiteur spécifique un des gènes, alors que son partenaire létal-synthétique est lui déjà inactivé (Nijman 2011). Cela ouvre de nouvelles opportunités thérapeutiques, car la chimiothérapie est connue pour ses lourds effets secondaires. Le phénomène de létalité synthétique a aussi été utilisé *via* la surexpression -et non l'inhibition- d'un gène alors que son partenaire létal-synthétique est inactivé. L'équipe de David P. Lane a ainsi démontré l'intérêt de la combinaison de la nutline-3 et du VX-680, un inhibiteur de la kinase Aurora (Cheok, Kua et al. 2010). La nutline-3 inhibe l'interaction MDM2-P53 ce qui entraîne une élévation de l'expression de ce suppresseur de tumeur due à la diminution de sa régulation négative. Les kinases Aurora A, B et C sont des sérine-thréonine kinases dont l'inhibition induit une endoreduplication et une ségrégation des chromosomes aberrante, et ces kinases ont été décrites comme surexprimées dans de nombreuses tumeurs (Gautschi, Heighway et al. 2008, Cheok, Kua et al. 2010). Cheok *et al* ont montré que l'inhibition de la kinase Aurora avec l'inhibiteur VX-680 induit une endoreduplication et une mort cellulaire quel que soit le statut de P53 dans les lignées

cancéreuses étudiées, et que la surexpression de P53 avant le traitement au VX-680 empêche cette endoréduplication, et protège les cellules de l'apoptose induite par le VX-680. En effet, cette surexpression de P53 grâce à la nutline-3 induit un arrêt, réversible, du cycle cellulaire en phase G1 ou G2 dans les cellules normales. Cet arrêt permet de protéger ces cellules normales porteuses de P53 sauvage des effets secondaires de la chimiothérapie, généralement aspécifique et atteignant aussi les cellules non cancéreuses. Ainsi les auteurs ont profité du phénomène de létalité synthétique mais au lieu d'inactiver un gène, ils ont forcé sa surexpression en combinaison avec un inhibiteur tuant sélectivement les cellules mutées pour P53 avec des effets réversibles sur les cellules saines (Cheek, Kua et al. 2010).

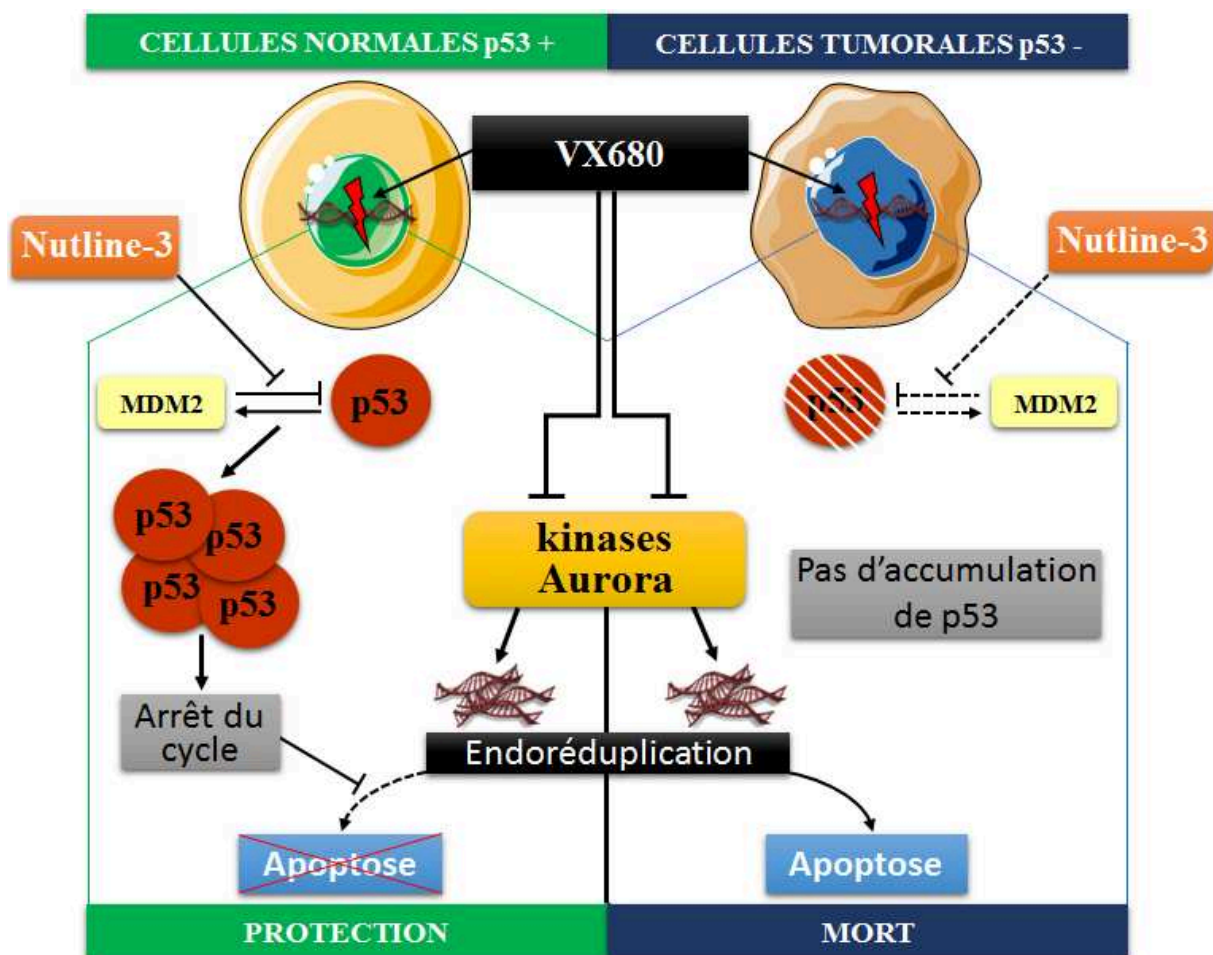


Figure 12 : La nutline-3 en combinaison avec un inhibiteur des kinases Aurora permet de tuer sélectivement les cellules cancéreuses mutées pour P53.

Cheek et al ont utilisé le phénomène de létalité synthétique, mais en induisant une surexpression dans les cellules normales d'un gène absent des cellules cancéreuses, ici TP53 (Cheek, Kua et al. 2010).

Ainsi, appliquer des traitements anti-cancer efficaces lorsque la protéine P53 est mutée se révèle être toujours un challenge en oncologie moderne. La résistance induite par cette mutation extrêmement fréquente force à développer de nouvelles stratégies, comme la thérapie du point de contrôle G2 du cycle cellulaire, ou l'utilisation du phénomène de létalité synthétique. Une autre protéine, la phosphatase WIP1, a été décrite comme un régulateur de P53, et il s'avère que son importance dans cette voie de signalisation pourrait permettre le développement de nouvelles stratégies de traitement anti-cancer dans le cas de tumeurs portant des mutations rendant P53 inactive.

III. Wild-Type p53-Induced Phosphatase 1 (WIP1), un régulateur de P53.

1. La phosphatase WIP1.

Un des principaux mécanismes contrôlant la signalisation cellulaire est la phosphorylation et la déphosphorylation. C'est à la fin des années 1990 que fut mise en évidence la protéine phosphatase WIP1, par Fiscella de l'équipe d'Ettore Appella (Fiscella, Zhang et al. 1997). WIP1 est codée par le gène *PPM1D* et appartient à la famille des sérine-thréonine phosphatases PP2C (*protein phosphatase type 2C*). Elle a d'abord été décrite comme induite suite à une exposition à des radiations ionisantes et étant une cible du facteur de transcription P53 (Fiscella, Zhang et al. 1997). Il est intéressant de mentionner que dans cette étude, où WIP1 a été décrite pour la première fois, les auteurs ont montré que la surexpression de WIP1 entraînait un arrêt de la croissance cellulaire, et ce dans 2 lignées cellulaires : les cellules de glioblastome T98G et d'ostéosarcome Saos2. Cependant, d'autres études ultérieures ont montré une action radicalement différente de WIP1, agissant alors comme un oncogène (Bulavin, Demidov et al. 2002). Cette controverse aux débuts de l'étude de cette phosphatase est éclaircie de nos jours et était due au statut de P53 dans les lignées T98G et Saos2, toutes deux négatives pour ce suppresseur de tumeur. En effet, il s'avère que la présence ou non de P53 est extrêmement importante lors de l'étude des effets de la manipulation des niveaux de WIP1, donnant des résultats complètement différents en fonction du statut de cette première. Bien que WIP1 ait été initialement décrite comme exprimée suite à l'activation du facteur de transcription P53, il a été montré rapidement que WIP1 peut également être exprimée en son absence, comme cela a été fait dans la lignée d'adénocarcinome du poumon H1299 (Takekawa, Adachi et al. 2000). WIP1 est dépendante des cations Mg^{2+}/Mn^{2+} et insensible à l'acide okadaïque, un inhibiteur de phosphatases à large spectre. De nombreuses études de WIP1 ont été effectuées, et il en ressort que cette protéine joue un rôle majeur dans de nombreuses voies de signalisation, et donc notamment celle de P53.

2. L'interactome de WIP1.

a. La régulation négative de P53.

Les équipes des Dr Appella et Donehower ont créé des souris déficientes pour WIP1, ce qui leur a permis de montrer que les fonctions immunitaires de ces souris sont impactées, de par une diminution des réponses des cellules T et B. De plus, les fibroblastes issus d'embryons déplétés pour WIP1 présentent une diminution de leur vitesse de croissance et entrent plus rarement en mitose que les fibroblastes normaux, montrant un impact de WIP1 au niveau du cycle cellulaire. Ces fibroblastes présentent une plus grande phosphorylation de P53 sur sa sérine 15 (Choi, Nannenga et al. 2002). P53 est phosphorylée en réponse à un dommage à l'ADN par de nombreuses kinases, dont notamment ATM, ATR, CHK1 et CHK2 (Bartek and Lukas 2001). Lu *et al* ont montré que WIP1 déphosphoryle P53 sur sa sérine 15 dans un système purifié en mettant un phosphopeptide p53-ser15 en présence de la phosphatase. Les auteurs ont ensuite montré que dans les fibroblastes issus de souris KO (*knock-out*) pour WIP1, les niveaux de phosphorylation de P53 sur sa sérine 15 suite à une exposition à des radiations ionisantes étaient bien supérieurs à ceux mesurés dans les fibroblastes sauvages, montrant que WIP1 affecte la phosphorylation de P53 induite par un dommage à l'ADN, mais que cette phosphatase n'a pas d'effet sur l'activation des kinases ATM et ATR suite à l'exposition à des radiations ionisantes (Lu, Nannenga et al. 2005). Ainsi, WIP1 ayant été décrite comme une cible du facteur de transcription P53, les auteurs ont décrit une boucle de rétrocontrôle négatif entre P53 et WIP1, soulignant l'importance de WIP1 dans la réponse aux dommages à l'ADN. Il a par la suite été montré que WIP1 déphosphoryle de nombreuses autres cibles dans cette voie de signalisation.

b. γ H2AX, un substrat de la phosphatase WIP1.

Des ruptures double-brin de l'ADN vont entraîner la modification de l'histone H2A variant H2AX. Cet histone est le substrat de plusieurs PIKKs (*phosphoinositide 3-kinase-related protein kinases*) qui une fois phosphorylé sur sa sérine 139 (alors nommé γ H2AX) par DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*), ATM ou ATR permet le recrutement et l'accumulation des composants essentiels de la voie de signalisation de la réponse aux dommages de l'ADN et des

protéines de réparation de l'ADN (Podhorecka, Skladanowski et al. 2010). Or, WIP1 déphosphoryle directement γ H2AX sur sa sérine 139, régulant ainsi négativement une des principales molécules de reconnaissance des dommages à l'ADN et initiatrices de la réponse cellulaire à ces dommages (Cha, Lowe et al. 2010, Macurek, Lindqvist et al. 2010, Moon, Lin et al. 2010, Oh, Bustin et al. 2011). Le rétrocontrôle négatif direct ou indirect de WIP1 dans la voie de signalisation de P53 est indispensable afin de préserver la cellule et de lui permettre de récupérer après un dommage à l'ADN. P53 n'est pas qu'un suppresseur de tumeur, et ne se limite pas à être le « gardien du génome » de Sir David Lane (Lane 1992) en agissant dans le cycle cellulaire et l'apoptose. De plus en plus de fonctions lui sont attribuées au fur et à mesure des recherches effectuées. P53 joue entre autres un rôle dans l'auto-renouvellement, le développement et la différenciation (Molchadsky, Rivlin et al. 2010, Spike and Wahl 2011). Une régulation très précise de sa voie de signalisation est donc indispensable, ce que WIP1 participe à accomplir.

c. Voies de signalisation additionnelles.

P53 elle-même est le facteur de transcription principal activant la transcription de *PPM1D*, mais il en existe d'autres. Lowe *et al* ont montré que le promoteur du gène *PPM1D* contient un site κ B conservé dans l'évolution et que la sous-unité p65 de NF- κ B s'y fixe. L'inhibition de NF- κ B entraîne ainsi la diminution de l'expression de WIP1 et au contraire l'activation de NF- κ B par un traitement au TNF α augmente l'expression de WIP1 dans les cellules MCF-7 (Lowe, Cha et al. 2010). Le promoteur de *PPM1D* contient aussi plusieurs éléments de réponse à l'œstrogène. Le récepteur à œstrogène α se fixe sur le promoteur de WIP1 et sa stimulation par un traitement à l'œstradiol induit une augmentation d'un facteur 3 de l'ARNm de WIP1 et de son niveau protéique (Han, Yu et al. 2009). Dans une autre étude, Rossi *et al* ont montré que le promoteur du gène de WIP1 contient également un élément de réponse à l'AMP cyclique (CRE, *cyclic AMP response element*) et que la liaison de CREB (*cyclic AMP response element binding protein*) au promoteur de *PPM1D* augmente suite à une exposition des cellules HCT116 p53^{+/+} ou p53^{-/-} à des radiations ionisantes (Rossi, Demidov et al. 2008). Song *et al* ont quant à eux montré que c-Jun se lie au promoteur de WIP1 et permet également son induction après avoir irradié des cellules A549 avec des UV (Song, Han et al. 2010). Ainsi, de multiples voies de signalisation peuvent être mises en œuvre pour induire l'expression de

WIP1, et de la même manière, sa propre action sur la voie de signalisation de P53 est mise en évidence en observant les nombreuses cibles de la phosphatase WIP1, suite à son expression en conséquence d'un dommage à l'ADN et de l'activation de P53 par ATM et ATR. Cela induit des niveaux élevés de WIP1, et permet donc la déphosphorylation de nombreuses cibles de cette protéine.

Il a été dit plus haut que WIP1 déphosphoryle directement P53 sur sa sérine 15 et crée ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif. De plus, WIP1 peut potentialiser l'action de MDM2 pour encore réduire les niveaux de ce suppresseur de tumeur. En effet, WIP1 déphosphoryle MDM2 sur sa sérine 395, augmentant sa stabilité et son affinité pour P53 (Lu, Ma et al. 2007). Mais elle déphosphoryle également un grand nombre de molécules impliquées dans cette voie de signalisation, et c'est tout le système de signalisation des dommages à l'ADN qui est impacté par l'activité de la phosphatase WIP1. Ainsi, Shreeram *et al* ont montré que la phosphorylation d'ATM suite à un dommage à l'ADN est drastiquement réduite dans des cellules d'ostéosarcome Saos2 où la production de WIP1 était induite, que WIP1 déphosphoryle directement ATM sur sa sérine 1981 et que la phosphorylation de CHK2 par ATM était également indirectement inhibée (Shreeram, Demidov et al. 2006). Il a été montré que WIP1 interagit avec CHK1 et déphosphoryle cette kinase sur sa sérine 345, inhibant son activité (Lu, Nannenga et al. 2005), mais également avec CHK2 qu'elle déphosphoryle sur sa thréonine 68 (Fujimoto, Onishi et al. 2006). L'accumulation nucléaire de P38 est fortement diminuée quand WIP1 est surexprimée. Takekawa *et al* ont montré que WIP1 est co-immunoprécipitée avec P38, et qu'elle l'inactive par déphosphorylation d'un résidu thréonine suite à des conditions de stress comme un traitement à l'H₂O₂ ou des irradiations UV (Takekawa, Adachi et al. 2000). De nos jours, de nombreuses stratégies de traitement anti-cancer se reposent sur la réponse aux dommages de l'ADN afin d'induire la mort cellulaire. Une telle implication de WIP1 dans la régulation de cette voie de signalisation en fait donc une cible de choix en cancérologie.

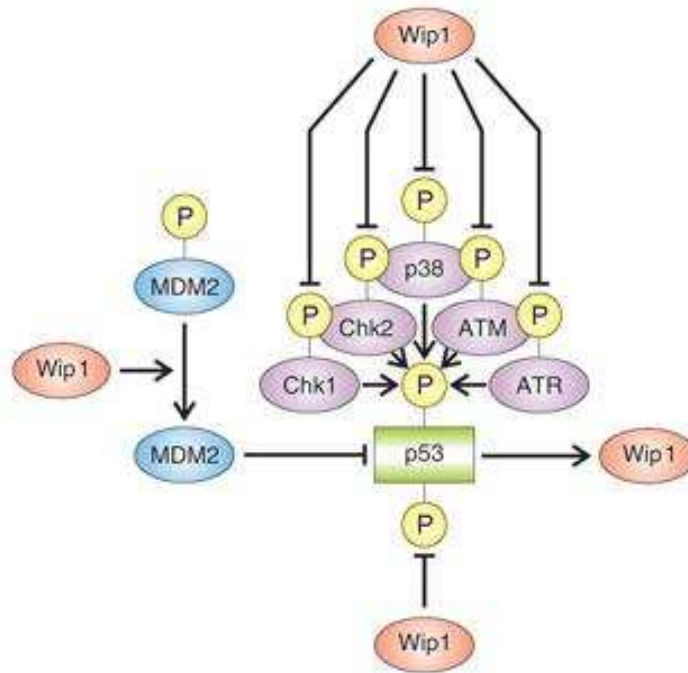


Figure 13 : Principales cibles de la phosphatase WIP1 dans la voie de signalisation de P53.

La phosphatase WIP1 déphosphoryle un nombre important de protéines dans la voie de signalisation de P53. Parmi ces cibles se trouvent P38, CHK1/2, ATM/ATR et P53 elle-même, déphosphorylée par WIP1 sur sa sérine 15. Modifié d'après Van Maerken et al, 2009 (Van Maerken, Vandesompele et al. 2009).

3. WIP1 dans les cancers P53-positifs.

a. Régulation de la voie des MAPK-kinases – exemple du cancer du sein.

L'importance de WIP1 dans la tumorigénèse, et en particulier dans les glandes mammaires et dans le cancer du sein, a été mise en évidence lorsqu'il a été montré que *PPM1D* était amplifié dans environ 15% des cancers du sein (Emelyanov and Bulavin 2015). Les mutations et amplifications de WIP1 sont la plupart du temps présentes dans les cellules épithéliales luminales qui expriment les récepteurs à l'estrogène, et ceci a été confirmé chez la souris par Tarulli *et al* (Tarulli, De Silva et al. 2013). Les auteurs ont aussi montré l'importance de WIP1 dans le développement des glandes mammaires chez des souris WIP1 KO, et que WIP1 régulait STAT5 et la kinase ERK. Chez les patients atteints de cancer du sein luminaux, les mutations de WIP1 y sont les plus fréquentes et synonymes de mauvais pronostic (Emelyanov and Bulavin 2015). Afin de pouvoir étudier en détail les effets de la surexpression de WIP1, des modèles de souris permettant cette surexpression ont été créés. A ce jour, deux ont été mis au point, un modèle permettant une surexpression ubiquitaire (Gilmartin, Faitg et al. 2014), et un où WIP1 n'est surexprimée que dans les glandes mammaires (Wong, Le Guezennec et al. 2009). Dans ce modèle, aucune apparition spontanée de tumeur n'a été observée, alors que de nombreuses études ont montré l'importance de WIP1 par exemple dans le cancer du sein et ont corrélé sa surexpression avec des stages plus agressifs et un mauvais pronostic. Ainsi, la surexpression de WIP1 pourrait avoir un effet potentialisant mais n'être pas suffisant pour initier la tumorigénèse (Goloudina, Kochetkova et al. 2016). Bien que P53 soit mutée dans de nombreux cancers, et que ce soit le cas dans 30% des cancers du sein, il s'agit extrêmement rarement de ceux où WIP1 est amplifiée, probablement car la surexpression de WIP1 inhibe P53 et protège les cellules de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose normalement induits par les oncogènes (Bulavin, Demidov et al. 2002, Emelyanov and Bulavin 2015). Ainsi, dans les cellules MCF-7, l'amplification de WIP1 entraîne un dérèglement du cycle cellulaire et une résistance à l'apoptose, et cela est dû au rétrocontrôle négatif de WIP1 sur la voie de signalisation de P53 et aussi à la suppression de l'expression de P16, un suppresseur de tumeur régulant le point de contrôle G1/S par inhibition de la phosphorylation de Rb (*retinoblastoma protein*) par les complexes cycline D/CDK4 et Cycline D/CDK6 (Omura-Minamisawa, Diccianni et al. 2001, Yu, Ahn et al. 2007, Cen, Carlson et al. 2012). Ainsi, le rôle

oncogénique de WIP1, indiscutable de par l'apparition d'un phénotype très résistant aux tumeurs chez les souris WIP1 KO (Bulavin, Phillips et al. 2004), serait plus un rôle de potentialisation et supporte l'apparition des mutations induisant le cancer. Cette idée de coopération oncogénique a été montrée *in vivo* où WIP1 promeut la tumorigénèse en coopération avec l'oncogène *ERBB2* via la voie de signalisation de P38MAPK (Demidov, Kek et al. 2007).

b. Régulation de la voie de réponse des dommages à l'ADN – exemples des cancers hématopoïétiques et intestinaux.

Dans d'autres types de cancers, les effets de WIP1 sur la tumorigénèse dépendent d'une autre voie de signalisation. Ainsi, dans le cas des cancers hématopoïétiques c'est son impact sur la réponse aux dommages à l'ADN qui est en œuvre, *via* ATM. Il a en effet été montré que WIP1 déphosphoryle directement ATM (Shreeram, Demidov et al. 2006). Shreeram *et al* ont croisé des souris déficientes en WIP1 avec des souris transgéniques exprimant MYC spécifiquement dans les lymphocytes B et ils ont montré que les souris WIP1^{+/-} ou WIP1^{-/-} étaient considérablement plus résistantes à l'apparition de tumeurs induites par MYC que les souris sauvages (Shreeram, Hee et al. 2006). Les auteurs ont également montré que ce phénomène était indépendant de la voie de P38MAPK. En effet, la diminution de l'activation de P38 n'a eu aucun effet sur l'apparition du lymphome. En revanche, le phénotype de suppresseur de tumeur obtenu dans les souris déficientes en WIP1 est supprimé dans les souris ayant un fond génétique ATM^{-/-}, or la phosphorylation de P53 sur sa sérine 15 suite à un dommage à l'ADN est effectuée par ATM. Cela prouve que la phosphatase WIP1 contribue à la suppression de la formation de lymphomes d'une manière qui dépend de P53 et ATM et donc de la voie de signalisation des réponses aux dommages à l'ADN (Shreeram, Hee et al. 2006). L'équipe de Dmitry Bulavin a montré que la phosphatase WIP1 a également un rôle prépondérant dans la formation des polypes suite aux mutations touchant le suppresseur de tumeur APC (*adenomatosis polyposis coli*) (Demidov, Timofeev et al. 2007). Dans ce type de cancer, il a été montré que des cellules souches étaient impliquées dans son développement et sa propagation. Ces cellules souches intestinales cancéreuses, non différenciées, pourraient ainsi être d'intéressantes cibles thérapeutiques (Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007). Des expériences réalisées chez des souris KO pour WIP1 ont montré que dans le cas du cancer

colorectal APC^{min}, l'absence de WIP1 entraîne une élévation du seuil d'activation de l'apoptose dépendante de P53. Cela sensibilise les cellules souches intestinales à l'apoptose en réponse à l'activation d'oncogènes, les empêchant de se transformer en cellules souches initiateuses de tumeurs (Demidov, Timofeev et al. 2007). Ainsi, l'inhibition de WIP1 montre, *via* la voie de signalisation de P53 dans la réponse aux dommages à l'ADN et dans la voie des kinases MAPK, un intérêt thérapeutique certain, afin de lutter contre son action oncogénique. Cependant, cela dépend complètement du statut du suppresseur de tumeur P53, et des mutations impliquant une suppression de l'activité de P53 vont induire des effets totalement opposés.

IV. WIP1 dans les cancers P53-négatifs.

1. Le paradoxe WIP1.

Lors de la découverte de la phosphatase WIP1 à la fin des années 1990, l'équipe du Dr Ettore Appella a travaillé avec deux lignées cellulaires cancéreuses de glioblastome et d'ostéosarcome : T98G et Saos2. Ils ont procédé à des tests de croissance cellulaire et sont arrivés à la conclusion que la surexpression de WIP1, et non son inhibition, avait des effets anti-tumoraux (Fiscella, Zhang et al. 1997). Ce n'est que bien plus tard que cette controverse initiale sera définitivement élucidée, en démontrant que WIP1 possède deux facettes bien distinctes : une oncogénique et une de suppresseur de tumeur, et que cela dépend du statut du suppresseur de tumeur P53 (Goloudina, Tanoue et al. 2012).

P53 est un des plus importants suppresseurs de tumeur, et a un impact déterminant sur la transformation oncogénique, la croissance tumorale et la réponse aux traitements anti-cancer (Wattel, Preudhomme et al. 1994, Breen, Heenan et al. 2007, Wang, Mosel et al. 2012, Hai, Sakashita et al. 2015). Cela a été suggéré dès qu'un modèle de souris déficient en P53 a été conçu, et que les auteurs se sont aperçus que cela n'affectait pas le développement des souris mais entraînait une augmentation significative de la fréquence d'apparition de tumeurs spontanées (Donehower, Harvey et al. 1992). Il est donc logique que WIP1, un des principaux régulateurs de P53, soit devenue une cible thérapeutique d'intérêt. Cela a amené le développement de plusieurs inhibiteurs de cette phosphatase, dont le GSK2830371 qui a montré de bons résultats dans le cas de cellules tumorales exprimant P53 sauvage (Gilmartin, Faitg et al. 2014).

Cependant, les mutations de P53, un phénomène récurrent en cas de cancer, peuvent entraîner de nombreuses conséquences différentes, allant d'une absence de modification de son activité à sa suppression totale, ou encore à des gains de fonctions pro-oncogéniques (Freed-Pastor and Prives 2012). La plupart des traitements anti-cancer reposent sur le fait d'induire des dommages à l'ADN afin de supprimer les cellules tumorales et dépendent de la

voie de P53 (Bouchet, Caron de Fromentel et al. 2006). P53 régulant l'apoptose, inhiber WIP1 quand P53 n'est pas mutée permet une augmentation de la mort cellulaire, et l'absence de ce suppresseur de tumeur se traduit par une résistance des cellules cancéreuses à de nombreuses chimiothérapies. De plus, dans plusieurs modèles murins, le phénotype résistant à la tumorigénèse induit par la délétion de WIP1 est supprimé en absence de P53 (Demidov, Timofeev et al. 2007).

Or, notre équipe a montré que dans les cellules d'ostéosarcome Saos2, où le gène de P53 est délété et qui possèdent une haute résistance au cisplatine, l'absence de P53 rend inexistants les effets positifs d'une inhibition de WIP1 qui sont observés dans le cas de tumeurs où P53 est exprimée normalement (Demidov, Kek et al. 2007, Goloudina, Tanoue et al. 2012).

2. La surexpression de WIP1 sensibilise les cellules P53-négatives à la chimiothérapie.

A ce jour, très peu de travaux ont été effectués sur la modulation de la phosphatase WIP1 dans le cas de tumeurs mutées pour P53. Notre équipe s'est penchée sur la controverse initiale datant de la découverte de WIP1 et décrivant une potentielle activité de suppresseur de tumeur dans le cas où P53 est inactive. En effet, en absence de P53, le principal substrat de la phosphatase WIP1 et son principal facteur de transcription, de nouvelles fonctions de WIP1 et de nouveaux partenaires de cette protéine peuvent être plus facilement révélés et devenir plus importants qu'ils ne l'étaient en présence de P53, alors masqués par son activité (Goloudina, Kochetkova et al. 2016).

Or, de nombreux gènes pro-apoptotiques ont P53 comme facteur de transcription, ce qui est le cas par exemple du gène *BAX* (el-Deiry 1998). C'est pourquoi rendre efficace une thérapie anti-cancer avec P53 inactive continue aujourd'hui de représenter un défi en oncologie. Plusieurs stratégies ont été proposées et citées plus haut, comme par exemple l'inhibition de la kinase CHK1 afin de provoquer une catastrophe mitotique (Demidova, Aau et al. 2009), mais la toxicité de cette stratégie et ses importants effets secondaires dans les tissus sains rendent extrêmement compliquée son application (Greenow, Clarke et al. 2009). Notre équipe a mis au point une approche alternative basée sur l'activation de WIP1 dans les cellules P53-négatives, mettant en évidence son potentiel de suppresseur de tumeur qui avait été décrit lors de sa découverte dans les années 1990 (Fiscella, Zhang et al. 1997).

Ainsi, notre équipe a généré des lignées cellulaires dans lesquelles l'induction de WIP1 est sous le contrôle d'un promoteur inductible aux tétracyclines. Suite à son induction dans la lignée cellulaire d'ostéosarcome humain Saos2, la surexpression de WIP1 entraîne une augmentation significative de la mort cellulaire suite à un traitement avec diverses drogues chimiothérapeutiques, notamment le cisplatine, l'étoposide, le 5-Fluorouracile ou la camptothécine (Goloudina, Tanoue et al. 2012). Les cellules Saos2, résistantes à la chimiothérapie car privées de P53, montrent logiquement une absence d'élévation du niveau des caspases 3 et 9 et de la protéine pro-apoptotique BAX suite à un traitement au cisplatine. Cependant, ces caspases actives sont détectées aussi bien dans les cellules U2OS, possédant

P53 sauvage, que dans les cellules Saos2 quand WIP1 est surexprimée, et de même pour BAX. Cette apoptose dépendante de caspase-3 lors de la surexpression de WIP1 montre qu'il existe un facteur de transcription permettant l'expression des gènes pro-apoptotiques en absence de P53 et en présence de WIP1.

3. La surexpression de WIP1 permet l'activation du facteur de transcription RUNX2 et régule le ratio BAX/BCL-XL.

La famille de facteurs de transcription RUNX comprend plusieurs membres qui sont exprimés spécifiquement dans certains tissus et régulent divers processus physiologiques. RUNX1 est surtout présent dans les cellules hématopoïétiques, RUNX3 a été rapporté comme contrôlant la neurogénèse, la thymopoïèse et la prolifération de l'épithélium gastrique. Le facteur de transcription RUNX2 quant à lui interagit avec de nombreux partenaires dans de nombreuses voies de signalisation (Ito 2008). Il a été décrit comme ayant un rôle dans l'ostéogénèse, en régulant négativement la prolifération des ostéoblastes, mais aussi dans la progression métastatique du cancer du sein et de la prostate. Ainsi, tout comme WIP1, RUNX2 semble pouvoir être qualifié de suppresseur de tumeur, ou d'oncogène, en fonction du contexte cellulaire (Lian, Javed et al. 2004, Zaidi, Pande et al. 2007, Onodera, Miki et al. 2010). Or un autre rôle lui a été attribué, cette fois en lien direct avec l'apoptose, *via* la régulation du gène *BAX*. Eliseev *et al* ont montré qu'il existe deux éléments de réponse à RUNX2 dans le promoteur de *BAX*, et à l'aide d'un clonage de ce promoteur en amont du gène rapporteur luciférase que son activité est augmentée d'une manière dose-dépendante à la surexpression de RUNX2. Ils ont montré que dans les cellules Saos2, la surexpression de RUNX2 entraîne une augmentation des niveaux de BAX et par voie de conséquence une augmentation de sensibilité à l'apoptose (Eliseev, Dong et al. 2008). Or notre équipe a montré que l'apoptose induite par le cisplatine et la surexpression de WIP1 dans les cellules Saos2 P53-négatives était inhibée par l'utilisation d'un ARNsi dirigé contre RUNX2, validant ainsi l'implication de ce facteur de transcription dans la restauration de la sensibilité des cellules P53-négatives à la chimiothérapie. Ce résultat a été confirmé *in vivo* grâce à la greffe de cellules tumorales P53-négatives Saos2 ou Saos2 WIP1-on. Un traitement des souris au cisplatine a empêché la croissance tumorale uniquement dans le cas où l'expression de WIP1 était induite dans les cellules tumorales *via* l'ajout de doxycycline dans l'eau des souris (Goloudina, Tanoue et al. 2012). Une régulation positive des protéines pro-apoptotiques n'est pas le seul changement de niveau d'expression remarquable, c'est le cas aussi pour les protéines anti-apoptotiques,

qui verront leur expression régulée négativement. BCL-XL est la première protéine présentant des fonctions identiques à BCL-2 qui aura été découverte et intégrée à sa famille (Boise, Gonzalez-Garcia et al. 1993), ce qui s'explique par une grande similarité dans leur séquence (Muchmore, Sattler et al. 1996). L'expression de BCL-XL est régulée positivement par la voie de signalisation de NF- κ B (Khoshnan, Tindell et al. 2000, Marinari, Costanzo et al. 2004). Or, l'implication de WIP1 dans cette voie de signalisation a été prouvée, et décrite comme étant un régulateur négatif, *via* la déphosphorylation directe de la sous-unité P65 de NF- κ B (Chew, Biswas et al. 2009). Notre équipe a montré que dans les cellules Saos2 ayant subi un traitement au cisplatine et où WIP1 est surexprimée, l'expression de BCL-XL est diminuée, et corrélée à la déphosphorylation de la sous-unité P65 de NF- κ B. Ainsi, la sensibilisation des cellules P53-négatives à la chimiothérapie est dépendante de WIP1 *via* la régulation du ratio BAX/BCL-XL (Goloudina, Mazur et al. 2012). Les effets de WIP1 sur l'apoptose dépendent de la présence ou non de P53, et sa présence dans les cellules saines ouvre de nouvelles perspectives.

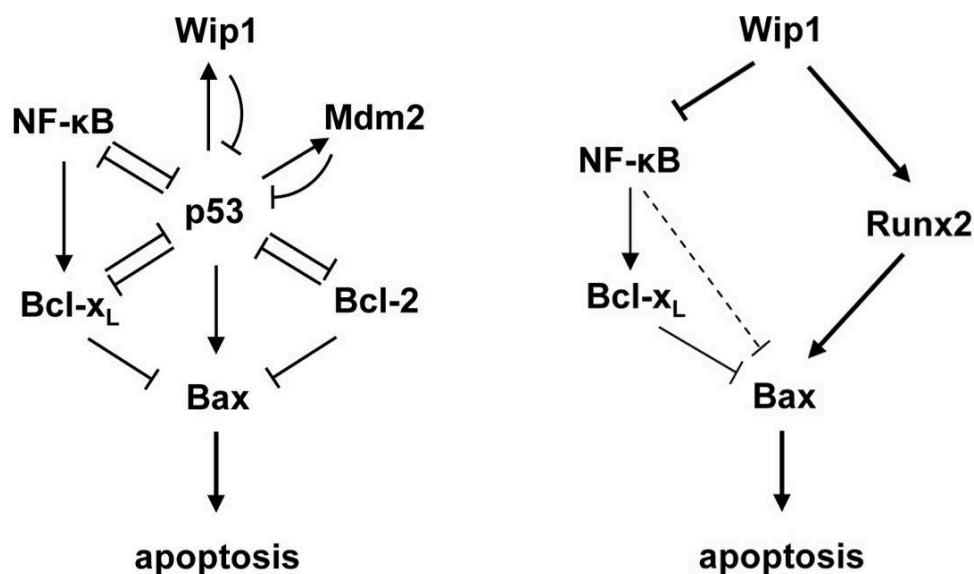


Figure 14 : Représentation schématique d'une portion de la voie de signalisation de l'apoptose en présence de P53 (gauche) ou en son absence (droite).

L'apoptose dépendante de la surexpression de WIP1 intervient *via* les voies de signalisation de NF- κ B et RUNX2. WIP1 déphosphoryle la sous-unité P65 de NF- κ B entraînant une diminution de la protéine anti-apoptotique BCL-XL tout en activant le facteur de transcription RUNX2, responsable de la transcription de BAX dans les cellules Saos2 en absence de P53. La régulation par WIP1 du ratio BAX/BCL-XL entraîne une apoptose caspase-3 dépendante dans les cellules cancéreuses P53-négatives suite à un traitement au cisplatine (Goloudina, Mazur et al. 2012).

4. WIP1 permet la protection des cellules saines lors de la chimiothérapie.

Les cellules saines ont une différence fondamentale avec les cellules cancéreuses, elles ne sont pas touchées par les mutations affectant le suppresseur de tumeur P53. Ainsi, la stratégie reposant sur la surexpression de la phosphatase WIP1 dans les cellules p53-négatives permet d'envisager des conséquences dans les cellules saines également. En effet, les cellules normales vont être protégées par une activation transitoire de WIP1, entraînant une inhibition de la réponse dépendante de P53 à la chimiothérapie. Ceci a été confirmé par notre équipe en observant l'apoptose induite par le cisplatine dans les cryptes intestinales et les testicules de souris sauvages ou modifiées génétiquement pour surexprimer WIP1. L'activation de la caspase-3 dans ces deux organes est significativement diminuée quand WIP1 est surexprimée, les protégeant de l'apoptose induite par le cisplatine (Goloudina, Tanoue et al. 2012). Ainsi, augmenter l'efficacité des drogues anti-cancer n'est pas forcément synonyme d'augmentation de la réponse aux dommages de l'ADN. En général, la chimiothérapie va induire des cassures double-brin de l'ADN, amenant à la phosphorylation de H2AX, et à la cascade d'événements résultants en une réparation de l'ADN ou à la destruction finale de la cellule. WIP1 déphosphoryle γ H2AX sur sa sérine 139 et donc sa surexpression dans les cellules P53-négatives diminue la voie de signalisation de réponse aux dommages à l'ADN, cependant cela permet la restauration de la sensibilité de ces cellules à la chimiothérapie. De plus, l'inhibition de P53 par WIP1 dans les cellules normales permet de diminuer les effets secondaires du traitement, connus pour être malheureusement très lourds lors de la thérapie anti-cancer. Ainsi WIP1 permet l'élargissement de la fenêtre thérapeutique dans le traitement des tumeurs P53-négatives.

V. Le statut de P53 en clinique.

Malgré de plus en plus de données cliniques montrant un impact significatif des mutations de P53 sur l'efficacité des traitements anti-cancer et la survie des patients (Kandioler-Eckersberger, Ludwig et al. 2000, Li, Jiang et al. 2008, Muret, Yacoub et al. 2008, Bourdon, Khoury et al. 2011, Xu, Xu et al. 2014), il n'existe toujours pas de consensus à ce sujet et des résultats contradictoires ont été obtenus, à cause notamment de la variété des mutations de P53 et de la méthode utilisée pour les détecter, des types de cancers en cause et des traitements appliqués dans ces études cliniques (Fernandez-Cuesta, Anaganti et al. 2011, Varna, Bousquet et al. 2011, Yang, Du et al. 2013). Ainsi, certaines stratégies thérapeutiques seront uniquement valables dans un cas particulier dépendant du statut de P53, comme c'est le cas pour la modulation des niveaux de la phosphatase WIP1 (Goloudina, Mazur et al. 2012, Goloudina, Tanoue et al. 2012, Clause, Goloudina et al. 2016, Goloudina, Kochetkova et al. 2016), puisque son inhibition est valable dans les cancers possédant P53 sauvage alors que sa surexpression l'est dans les cancers P53-négatifs. Cela met en évidence l'importance de la détection du statut de P53 chez les patients atteints de cancer, afin d'ajuster les choix thérapeutiques. Ceci est aujourd'hui déjà effectué, cependant la disparité des conclusions obtenues lors des études cliniques empêche l'utilisation et le développement de P53 comme un biomarqueur sûr, et pouvant guider de manière incontestable les décisions cliniques (Tan and Cheok 2014). Il manque aujourd'hui un moyen fiable et précis d'évaluer les mutations de P53, et à un coût faible permettant une utilisation en routine.

Le moyen le plus fréquemment utilisé à l'heure actuelle est l'immunohistochimie (IHC). En effet, un marquage positif pour P53 sert de preuve indirecte d'une mutation, puisque la forme sauvage de ce suppresseur de tumeur est normalement rapidement dégradée. Cependant, de nombreuses mutations, incluant parfois même des mutations faux-sens, n'entraînent pas d'accumulation de protéine mutante, ce qui résulte en un faux négatif observé en IHC (Soussi and Beroud 2001). Une accumulation de protéines sauvages, à cause d'un mécanisme de dégradation altéré ou de signaux de stress persistants peut entraîner également un faux-positif en IHC, car la plupart des anticorps utilisés ne différencient pas version sauvage et

mutée, et les résultats d'IHC dépendent également trop du protocole utilisé et souffrent d'un manque de standardisation (Tan and Cheok 2014). Un autre moyen de détecter une mutation de P53 la rendant non fonctionnelle a été développé au milieu des années 1990. Flaman *et al* ont décrit un système permettant de détecter chez *Saccharomyces cerevisiae* l'activation du gène *ADE2* sous le contrôle transcriptionnel de P53, les colonies contenant P53 sauvage étant alors blanches, et celles contenant P53 mutée, rouges (Flaman, Frebourg et al. 1995). Ce test a été nommé FASAY pour *Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast*. Cependant, ce test n'est pas infallible, il ne permet pas par exemple de détecter les mutations se produisant dans la séquence du promoteur de *TP53* (Tan and Cheok 2014). Ainsi, le moyen le plus sûr et permettant une conclusion certaine reste le séquençage du gène *TP53*. Cependant, bien que le séquençage de quelques gènes soit fait pour certains cancers, *TP53* n'est pas systématiquement séquençé, le coût de cette méthode de détection étant encore trop élevé de nos jours pour une utilisation en routine. De plus, afin de limiter ces coûts, le séquençage de *TP53* est souvent restreint au domaine de liaison à l'ADN, qui comprend 80% des mutations touchant P53. Cependant, cela signifie que 20% des mutations ne seront alors pas détectées. D'après Soussi *et al*, une analyse des exons 4 à 10 serait acceptable, car cela mènerait à une détection de 99% des mutations (Soussi and Beroud 2001).

Mettre au point un test diagnostique permettant d'estimer la fonctionnalité de P53 plutôt que la détection spécifique de la mutation est d'un plus grand intérêt clinique. Dans cet objectif, Miller *et al* ont développé un test basé sur une « signature d'expression génique », différente en fonction du statut de P53, suite à l'analyse de puces à ADN couvrant plus de 30000 gènes sur un échantillon de 251 tumeurs du sein dont les profils génétiques de *TP53* étaient connus par séquençage (Miller, Smeds et al. 2005). Ils ont ainsi décrit un modèle d'expression de 32 gènes permettant de distinguer à coup sûr P53 mutante et sauvage, corrélé à la classification des tumeurs, et qui prédit d'une meilleure manière les conséquences de la mutation de *TP53* que ne le fait la description de la mutation seule, du point de vue des risques de récurrence, de la survie, de la réponse à la chimiothérapie et à la radiothérapie (Miller, Smeds et al. 2005). D'une manière intéressante, parmi les 32 gènes de la signature décrite, aucun n'est une cible transcriptionnelle de P53 ou n'a été décrit dans sa voie de signalisation, bien qu'un certain nombre soit associé à la croissance et à la prolifération, comme *MYBL2*, *TFF1*, *BRRN1*, *CHAD*, *SCGB3A1*, *DACH* ou *CDCA8* (Miller, Smeds et al. 2005).

Ainsi, bien qu'il soit admis que le statut de P53 ait une importance capitale dans la prédiction de la réponse thérapeutique des patients atteints de cancer, les moyens mis en œuvre en clinique sont encore insuffisants, car ceux permettant une analyse fiable et précise sont trop coûteux pour une utilisation en routine. L'IHC reste la méthode la plus utilisée en routine, et une amélioration des techniques de détection ou une alternative moins coûteuse que le séquençage serait bénéfique à la fois pour l'application des traitements aux patients, mais aussi dans une optique de justification du développement de thérapies plus adaptées, comme par exemple le choix d'inhiber WIP1 dans les cancers où P53 est sauvage ou de surexprimer cette phosphatase dans le cas des cancers P53-négatifs en combinaison avec une chimiothérapie classique.

Objectifs de la thèse

Les résultats obtenus précédemment par notre équipe ont démontré l'intérêt qu'il y avait à surexprimer WIP1 dans les cellules P53-négatives afin de restaurer l'efficacité de la chimiothérapie lorsque cette absence de P53 entraînait une résistance aux traitements classiques. De plus, cette surexpression permet la protection des tissus sains lors du traitement. C'est pourquoi les objectifs de ces travaux de thèse se sont concentrés sur ces points :

- Réaliser un criblage de l'intégralité du kinome humain afin de mettre en évidence des kinases pouvant interagir avec la voie de signalisation de WIP1, et dont l'inhibition pourrait potentialiser la stratégie basée sur la surexpression de cette phosphatase.
- Confirmer l'utilité de la kinase dans la potentialisation de notre stratégie, ceci devant être réalisé par la modulation de son expression et la réalisation de tests de cytotoxicité.
- Définir le mécanisme d'action permettant la potentialisation de notre stratégie *via* la modulation de l'expression d'une kinase interagissant avec la voie de signalisation de WIP1.
- Confirmer que la mort cellulaire mise en œuvre reste une apoptose caspase-dépendante, et ce malgré l'intervention d'un autre acteur dans la stratégie thérapeutique.
- Vérifier *in vivo* que les effets bénéfiques de la surexpression de WIP1 envers les tissus sains lors du traitement ne sont pas impactés par la combinaison du traitement avec l'inhibition d'une kinase.
- Mettre au point un outil de criblage à haut débit permettant la découverte d'un activateur de WIP1.
- Vérifier que les molécules découvertes induisent bien l'expression de WIP1 au niveau ARN et protéique.

Matériel et Méthodes

a. Culture cellulaire.

La lignée Saos2 Tet-on, cellules d'ostéosarcome humain avec un système d'expression de gène inductible à la tétracycline ont été achetées à Clontech, USA. Ces cellules Saos2 ont été modifiées pour exprimer de manière stable WIP1 suite à un traitement à la doxycycline (Sigma-Aldrich, D9891). Les cellules Saos2-TAL-GP7 ont été créées selon un protocole détaillé plus bas avec la technologie TALEN™ afin d'intégrer le gène rapporteur de la luciférase en amont du promoteur de WIP1. Les cellules T47D, cellules de cancer du sein humain ont été achetées à l'ATCC (ATCC HTB-133). Les fibroblastes embryonnaires murins ont été isolés selon un protocole standard à partir de souris c57-Bl/6 sauvages en gestation depuis 12 jours. Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées à 37°C avec 5% de CO₂ dans un incubateur humide dans du DMEM *high glucose* (Dutscher, L0104-500) ou du RPMI 1640 avec L-Glutamine (Dutscher, L0500-500) pour les cellules T47D, avec 10% de SVF (Pan Biotech, 8500-P131704) et un cocktail d'antibiotiques pénicilline-streptomycine-amphotéricine (Pan Biotech, P06-07300). Pour induire WIP1, les cellules ont été traitées avec 1 µg/ml de doxycycline 24 heures avant un traitement au CDDP (Sigma-Aldrich, P4394) et/ou au MK-1775 à une concentration de 75 nM, un inhibiteur spécifique de la kinase WEE1 (Axon Medchem, 955365-80-7).

b. Criblage à haut débit du kinome humain et analyse de γH2AX.

Les cellules ont été transfectées (transfection inverse) dans des plaques 96 puits avec une banque d'ARNsi ciblant les kinases humaines *siGENOME SMARTpool siRNA library* (Dharmacon, GE Healthcare Europe GmbH, G-003505), un oligonucléotide fluorescent ou un ARNsi non ciblant en tant que contrôle de transfection. 2 jours après, la transfection a été évaluée avec l'oligonucléotide fluorescent (Dharmacon, GE Healthcare Europe GmbH, D-001630-02-05), et les cellules ont été traitées avec 25 µM de CDDP. 28 heures après le traitement au CDDP, les cellules ont été fixées avec du PFA 4% (Sigma-Aldrich, P6148-500) pendant 20 minutes à température ambiante, puis perméabilisées avec du méthanol 90% sur glace pendant 30 minutes avant le blocage et le marquage avec un anticorps monoclonal anti H2AX-pSer139-Alexa488 (BD Pharmingen, 560445). Après le marquage, les cellules ont été re-suspendues dans du PBS pour le criblage à haut débit en cytométrie en flux, réalisé avec le cytomètre Guava EasyCyte (Merck Millipore). Les données obtenues ont été analysées avec le

logiciel FlowJo. Les puits transfectés avec l'ARNsi ciblant les kinases humaines et montrant une modification d'au minimum $\pm 40\%$ de la phosphorylation d'H2AX comparé à l'ARNsi contrôle ont été arbitrairement définis comme résultats positifs.

c. Tests de cytotoxicité.

La cytotoxicité des traitements réalisés a été déterminée par l'emploi du kit *Cytotox96 Non-Radioactive kit* (Promega, G1780), en suivant le protocole standard du fabricant. Cependant, afin d'obtenir une meilleure précision la méthode a été optimisée en suivant les recommandations publiées par Smith *et al*, 2011 (Smith, Wunder et al. 2011).

d. Immunofluorescence anti phospho-histone H3.

Les cellules ont été traitées avec 75 nM de MK-1775 2 heures avant l'ajout de 100 ng/ml de Nocodazole (Selleck Chemicals, S2775) et 25 μ M de CDDP pendant 16 heures. Les cellules ont ensuite été fixées dans du PFA 4% pendant 20 minutes à température ambiante et bloquées dans du PBS contenant 3% de BSA et 0,3% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, T8787-250) pendant 1 heure. Un anticorps monoclonal anti phospho-H3-Alexa488 (Cell signaling, 9708S) a été utilisé au 1/50^{ème} et les échantillons ont été incubés sur la nuit à 4°C. Les lamelles ont été rincées 3 fois au PBS, puis 1 fois dans de l'eau distillée avant d'être montées sur lame avec un milieu de montage contenant du DAPI (Vector, H-1200).

e. Immunofluorescence anti γ H2AX.

Les cellules ont soit été traitées avec 1 μ g/ml de doxycycline pendant 24 heures, soit transfectées avec un ARNsi SMARTpool dirigé contre WEE1, HIPK2 ou non ciblant (Dharmacon, GE Healthcare Europe GmbH, M-005050-02, M003266-03 et D-001210-02-05 respectivement). 48 heures après la transfection, les cellules ont été traitées avec 15 μ M de CDDP pendant 28 heures avant de réaliser l'immunofluorescence dirigée vers γ H2AX. Les cellules ont été fixées dans du PFA 4% pendant 20 minutes à température ambiante et bloquées dans du PBS contenant 3% de BSA et 0,3% de Triton X-100 pour 1 heure. Un anticorps monoclonal anti H2AX-pSer139-Alexa488 a été utilisé au 1/200^{ème} et les échantillons ont été

incubés sur la nuit à 4°C. Les lamelles ont été rincées 3 fois au PBS, puis 1 fois dans de l'eau distillée avant d'être montées sur lame avec un milieu de montage contenant du DAPI.

f. Analyse BrdU et caspase-3 active par cytométrie en flux.

L'analyse par cytométrie en flux de l'incorporation de BrdU et de sa corrélation avec la caspase-3 active a été réalisée dans les cellules d'ostéosarcome humain Saos2. La triple combinaison (15 µM CDDP, 1 µg/ml doxycycline et 75 nM MK-1775) a été appliquée aux cellules pendant 48 heures. Un kit d'analyse BrdU a été utilisé (BD-Pharmingen, 552598), avec un anticorps anti-BrdU couplé à l'APC (BD-Pharmingen, 51-23619L) et un anticorps anti caspase-3 active couplé à la PE (BD-Pharmingen, 550821). L'expérience a été réalisée en suivant les recommandations du fournisseur.

g. Détection de la production de superoxydes mitochondriaux avec le réactif MitoSOX.

La formation de superoxydes mitochondriaux a été détectée par cytométrie en flux en utilisant le marqueur fluorescent MitoSOX (Thermo Fisher Scientific, M36008). Brièvement, après traitement chimiothérapeutique des cellules au CDDP, de 0 à 35 µM pendant 24 heures, les cellules ont été collectées et re-suspendues dans de l'HBSS (Dutscher, L0611-500) contenant 2 µM de réactif MitoSOX. Après 15 minutes d'incubation à 37°C dans l'obscurité, les cellules ont été rincées 2 fois dans du PBS avant d'être analysées au cytomètre Guava EasyCyte (Merck Millipore).

h. Test *in vivo* de la cytotoxicité du traitement combinatoire.

Des souris sauvages et WIP1-KO mises au point précédemment sur un fond génétique C57-Bl/6 (Wong, Le Guezennec et al. 2009) ont eu accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*. L'expérimentation animale a été effectuée en accord avec les directives de la *Federation of European Laboratory Animal Science Associations*. Les souris ont reçu l'inhibiteur de WEE1 MK-1775 à une dose de 30 mg/kg *per os*, dilué dans une solution de méthylcellulose 0,5% (Sigma Aldrich, M0262). 3 heures après, 10 mg/kg de CDDP ont été injectés en intra-

péritonéal. 12 heures plus tard, les souris ont été sacrifiées et les intestins récupérés, fixés dans du formol pendant 24 heures avant d'être conservés dans de l'éthanol 70% jusqu'à l'expérience d'immunohistochimie, réalisée avec un anticorps monoclonal anti caspase-3 (R&D systems, AF835) et visualisée à l'aide du kit Dako EnVision System-HRP (Dako, K4010).

i. Mise au point d'un modèle de détection de l'activation du promoteur de WIP1 par émission de luminescence.

Les cellules Saos2 d'ostéosarcome humain ont été utilisées comme base pour la modification génétique du promoteur de WIP1, afin d'y intégrer sous son contrôle le gène de la luciférase et celui de la GFP sous le contrôle du promoteur CMV. Afin de réaliser cette modification, la technologie TALEN (*Transcription Activator-Like Effector Nuclease*) a été utilisée afin de cibler la modification à l'endroit du génome choisi. Les deux plasmides TALEN ont été conçus par Collectis Bioresearch. La stratégie de fabrication des TALEN est détaillée en annexe. Deux matrices d'intégration ont été créées par clonage dans le vecteur de base pGL3-basic : une contenant CMV-GFP à la suite de la luciférase, et une autre contenant le gène de résistance à la puromycine. Ont été rajoutés par clonage dans le vecteur pGL3 un peptide de clivage P2A, deux bras d'homologie à *PPM1D* pour permettre la recombinaison homologue, et la cassette puromycine ou GFP (les cartes des plasmides créés et la stratégie détaillée de clonage sont disponibles en annexe). 4 vecteurs ont alors été transfectés simultanément aux cellules Saos2 à l'aide du réactif JetPEI (Polyplus, 101-10N) : les deux TALEN, et les deux matrices d'intégration, GFP et puromycine, le but étant de modifier le promoteur de WIP1 dans les 2 allèles, l'un en y intégrant la séquence luciférase-GFP et l'autre la séquence luciférase-puromycine. Afin de sélectionner les cellules où l'intégration s'est effectuée, elles ont ensuite été soumises à une sélection à 2.5 µg/ml de puromycine, et les cellules survivantes ont ensuite été triées par FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) afin de ne conserver que celles positives pour la GFP, la résistance à la puromycine simultanément à l'expression de GFP prouvant la modification des deux allèles. Une sélection clonale a ensuite été effectuée et les clones s'étant développés ont été analysés par PCR afin de vérifier la stabilité de l'intégration.

j. Criblage à haut débit d'activateurs de WIP1.

Les cellules Saos2-TAL-GP7, modifiées comme décrit précédemment pour que l'activation du promoteur de WIP1 se traduise par une émission de luminescence, ont été ensemencées dans des plaques 96 puits, puis traitées le lendemain avec 10 µM de 1170 composés différents provenant d'une banque de molécules chimiques toutes approuvées par la FDA (*Federal Drug Administration*) (*FDA-approved drug library*, Selleck Chemicals, L1300). La liste complète des molécules testées est disponible en annexe. 24 heures après le traitement, les cellules ont été lysées, la fluorescence de la GFP a été mesurée, puis la luminescence à l'aide du kit *Luciferase assay system* (Promega, E4550), le tout avec le lecteur de plaque *EnVision Multilabel Reader* (Perkin Elmer, 2104-0010A).

k. Tests de surexpression de WIP1.

Les cellules T47D ont été traitées avec 10 µM de Vorinostat (Selleck Chemicals, S1047), puis avec ou sans l'inhibiteur du protéasome MG-132 (Sigma-Aldrich, M7449) pendant 16 heures avant la récupération des cellules à une concentration de 1 µM. Les cellules ont été récupérées avec un grattoir puis lysées avec un tampon contenant 1M HEPES pH 7.6, 4M NaCl, 0.5M EDTA, 10% NP-40 et 0.5% Triton X-100, avant d'être analysées par western blot.

l. Anticorps de western blot.

Les anticorps monoclonaux anti WIP1 et HIPK2 ont été fournis par le Dr Ettore Appella (*National Institutes of Health, National Cancer Institute, USA*). Les anticorps anti WEE1 (#13084T) et PARP clivé (#5625) ont été achetés chez Cell Signaling.

m. Amorces de PCR.

Les amorces de PCR permettant de vérifier la construction génétique réalisée avec la technologie TALEN étaient les suivantes : Vérification d'intégration – Sens, 5'-TGA CGG TGG AAA TTT CCT AAG T-3' ; Anti-sens, 5'-GCC TTA TGC AGT TGC TCT CC-3' – Vérification du génotype sauvage – Sens, 5'-TGA CGG TGG AAA TTT CCT AAG T-3' ; Anti-sens, 5'-CAA GAA TAG GCT GCA GGG AG-3'. L'ARN total a été récupéré grâce au kit RNeasy (Qiagen, 74104) en

suivant le protocole standard du fabricant. La transcription inverse a été réalisée avec le kit MLV-Reverse transcriptase (Promega, M3682). Les amorces de PCR afin de détecter l'augmentation de WIP1 ont été choisies d'après Han *et al*, 2009 (Han, Yu et al. 2009). Sens, 5'-AGT GAT GGA CTT TGG AAT AT-3'; Anti-sens, 5'-ACT TCT GGA GAG ATG CAG ATT AC-3'. Les PCR ont été réalisées à l'aide du qPCR master mix *Kapa Sybr Fast* (Kapa Biosystems, KM4103).

n. Analyse corrélative de données cliniques : statut de P53 et expression du gène *PPM1D* sur la survie des patients.

Une approche bio-informatique a permis l'analyse d'un ensemble de données Affymetrix d'expression génique de 566 patients atteints d'un cancer du côlon. 2 cohortes ont été étudiées, en fonction du statut de P53 chez les patients, sauvage, ou muté. La corrélation entre expression de *PPM1D* avec le statut de P53 et la survie des patients a été calculée en utilisant la technique standard « *A-package* ».

o. Statistiques.

Toutes les données sont exprimées comme la moyenne \pm erreur standard et les expériences ont été indépendamment répétées au minimum 3 fois. Les différences entre deux groupes ont été analysées avec le test *t* de Student non apparié à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 et les données ont été considérées significatives lorsque $P < 0,05$.

Résultats

1. Criblage du kinome humain

Il a été rapporté précédemment que l'augmentation du niveau de phosphorylation de H2AX (=γH2AX) n'était pas uniquement corrélée à de sévères dommages à l'ADN, mais aussi à une plus grande réponse à ces dommages, menant à l'initiation du programme de mort cellulaire. Sachant que d'une part WIP1 déphosphoryle directement γH2AX et que d'autre part cette phosphatase augmente la toxicité du CDDP dans les cellules P53-négatives Saos2 (Goloudina, Tanoue et al. 2012), nous avons décidé de vérifier que dans ces cellules, le niveau de phosphorylation de γH2AX sur sa sérine 139 n'était pas corrélé à la mort cellulaire induite par ce traitement chimiothérapeutique.

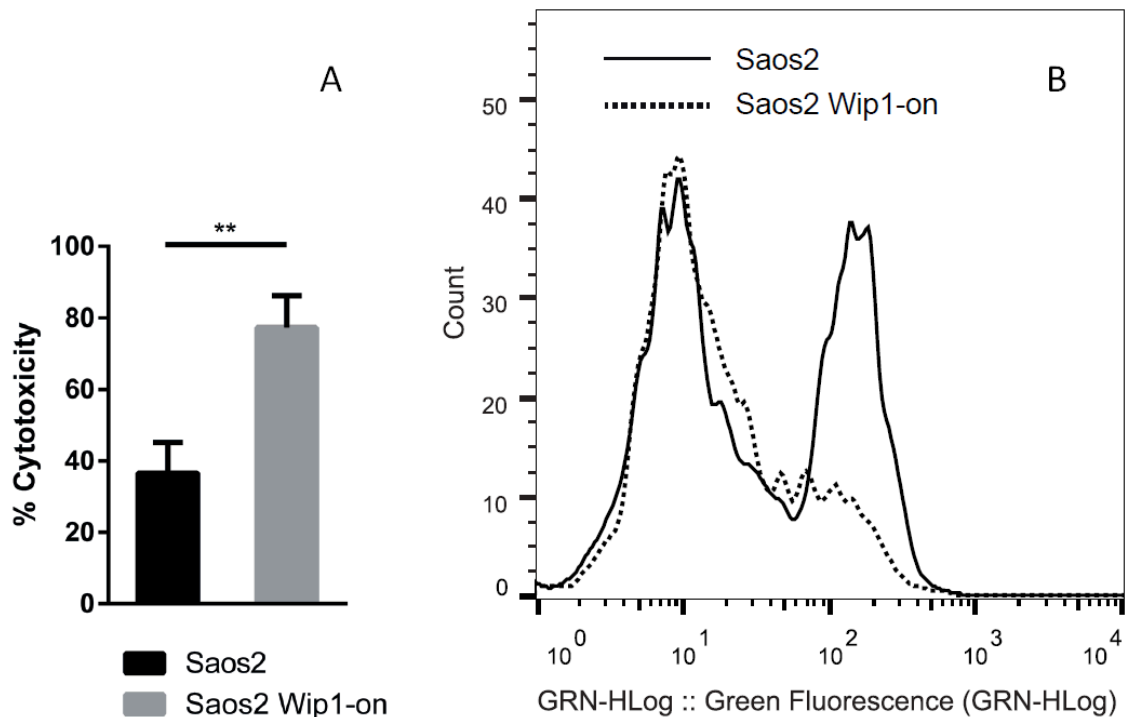


Figure 15 : La phosphorylation de H2AX n'est pas corrélée à la mort cellulaire suite à un traitement au CDDP de cellules P53-négatives lorsque WIP1 est surexprimée.

(A) L'induction de la phosphatase WIP1 dans les cellules Saos2 grâce à l'ajout d'1 µg/mL de doxycycline 24 heures avant un traitement au CDDP de 25 µM augmente de manière significative la mort cellulaire 72 heures après le traitement. (B) La phosphorylation de γH2AX, marqueur principal du dommage à l'ADN, est diminuée par l'induction de WIP1 dans les cellules Saos2 grâce à l'ajout d'1 µg/mL de doxycycline pendant 24 heures et ce malgré un traitement au CDDP de 25 µM pendant 72 heures.

Nous avons prouvé que l'induction de WIP1 dans les cellules Saos2 augmente de manière significative la toxicité du traitement au CDDP, mais que le niveau de phosphorylation de γ H2AX était plus faible que dans les cellules contrôles résistantes au CDDP sans induction de Wip1 (figure 15).

Durant le processus de réponse aux dommages de l'ADN, γ H2AX est phosphorylé sur sa sérine 139 par plusieurs kinases, comme ATM, ATR ou les DNA-PK. WIP1 a été rapportée comme étant la principale phosphatase capable d'enlever le groupement phosphate de ce site, ramenant ce marqueur du dommage à l'ADN à un statut inactif (Cha, Lowe et al. 2010). Sachant cela, nous avons analysé la phosphorylation de γ H2AX pendant 50 heures suite à l'administration de CDDP afin de déterminer le moment où l'action de WIP1 dans le processus de déphosphorylation de cette histone est la plus importante. Nous avons démontré que l'action de cette phosphatase est la plus critique entre 26 et 30 heures après le traitement au CDDP (figure 16).

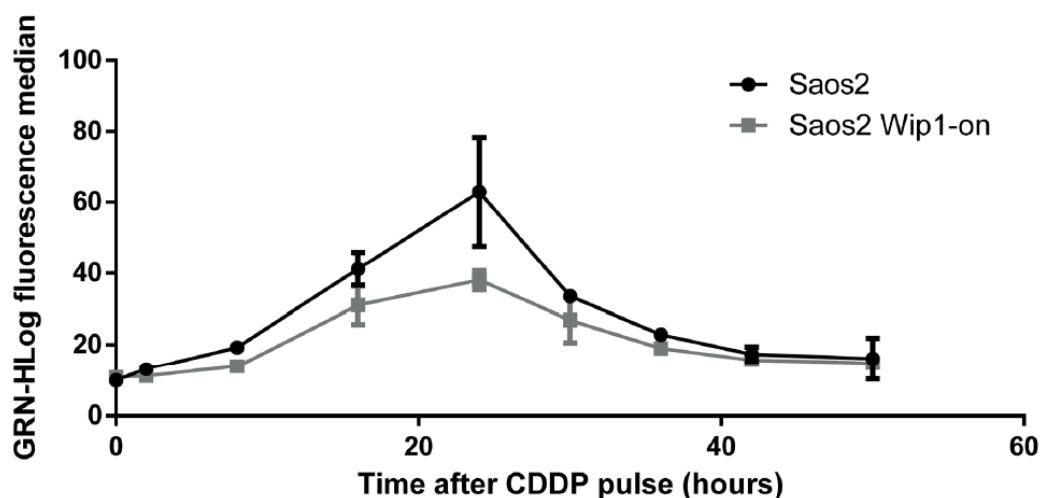


Figure 16 : Cinétique de phosphorylation/déphosphorylation de H2AX suite à un dommage à l'ADN induit par le CDDP.

Analyse par cytométrie en flux de l'évolution de la phosphorylation de γ H2AX en fonction du temps suite à un pulse de 100 μ M de CDDP pendant 1 heure, avec ou sans induction de WIP1 grâce à l'ajout d'1 μ g/mL de doxycycline 24 heures avant le pulse.

Nous avons formulé l'hypothèse que certaines kinases pourraient négativement réguler WIP1. L'inhibition de telles kinases pourrait ainsi augmenter l'activité de WIP1, simultanément

réduisant la phosphorylation de γ H2AX et augmentant la sensibilité des cellules tumorales déficientes en P53 à la thérapie anti-cancer. C'est pourquoi nous avons effectué un criblage avec une banque d'ARNsi ciblant l'intégralité du kinome humain afin d'identifier les kinases impactant l'activité de WIP1 après un dommage à l'ADN. La phosphorylation de la sérine 139 de γ H2AX a été utilisée comme témoin de l'activité de WIP1, 28 heures après un traitement des cellules Saos2 avec du CDDP. Il a fallu tout d'abord valider le système et définir les conditions optimales pour effectuer le criblage. Nous avons décidé d'utiliser un ARNsi dirigé contre la kinase ATR, connue pour phosphoryler directement H2AX sur sa sérine 139 suite à un dommage à l'ADN induit par le CDDP (Pabla, Huang et al. 2008).

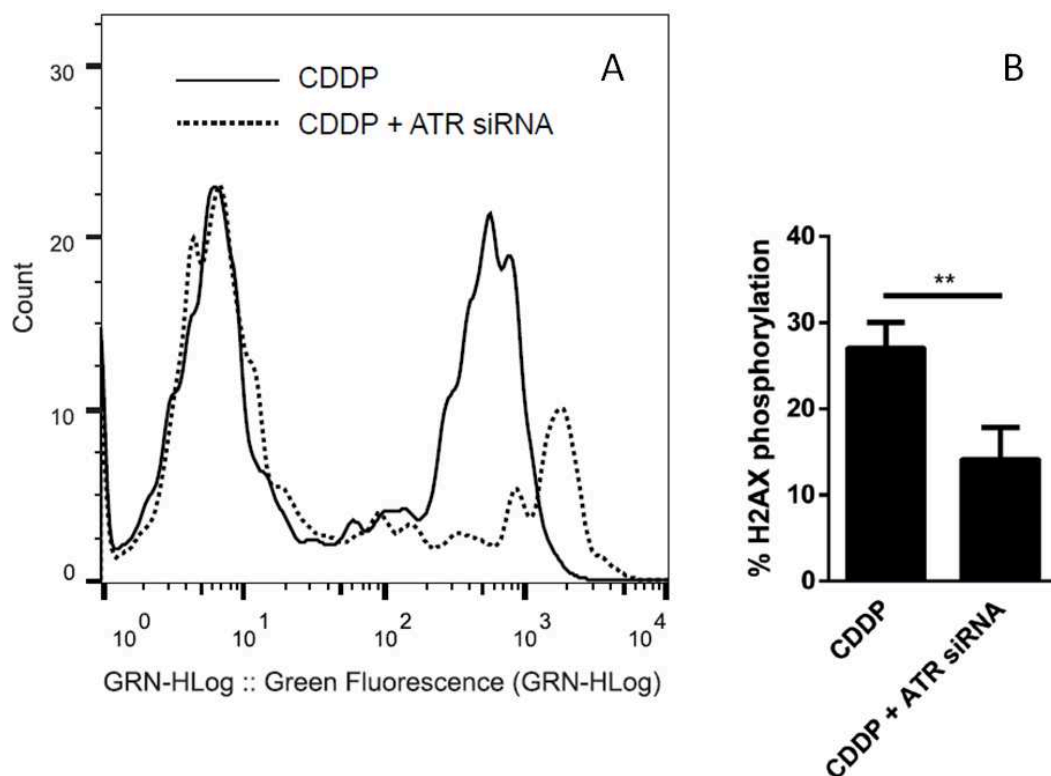


Figure 17 : Inhiber ATR diminue la phosphorylation de H2AX induite par le CDDP.

La phosphorylation de H2AX est diminuée par l'inhibition de la kinase ATR induite par une transfection inverse des cellules d'ostéosarcome humain Saos2 avec un ARNsi SMARTpool. 48 heures après la transfection, les cellules ont été traitées avec 25 μ M de CDDP pendant 28 heures, puis la phosphorylation de H2AX a été mesurée par cytométrie en flux. Le profil de cytométrie est montré en (A) et la variation moyenne suite à l'inhibition d'ATR est montrée en (B).

L'ARNsi ciblant ATR impactant de manière significative la phosphorylation de H2AX (figure 17), nous avons décidé de procéder au criblage de 711 kinases. Les ARNsi induisant une modification de la phosphorylation de H2AX de 40% minimum comparés aux contrôles ont été définis comme positifs. Cependant, parmi ces résultats positifs, ont été écartées toutes les kinases déjà connues pour directement phosphoryler H2AX (figure 18).

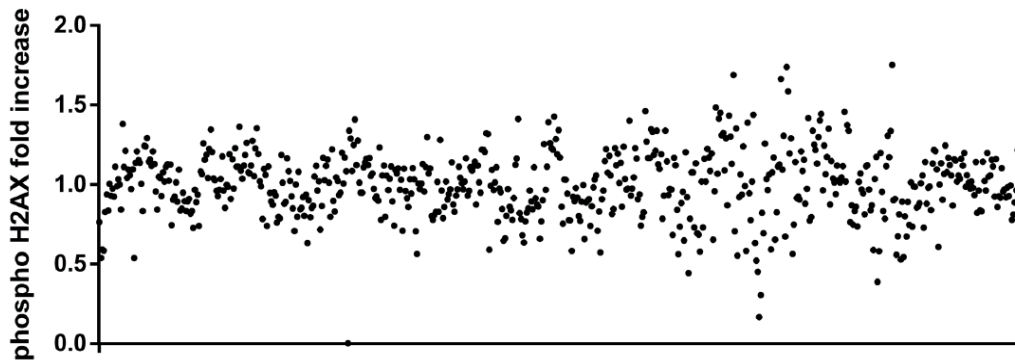


Figure 18 : Criblage à haut débit de la variation de phosphorylation de H2AX suite à la transfection inverse d'ARNsi ciblant l'intégralité du kinome humain.

Analyse par cytométrie en flux de l'évolution de la phosphorylation de H2AX. Chaque point représente une kinase spécifique inhibée par interférence à ARN.

De manière intéressante, l'ARNsi ciblant la kinase HIPK2 était parmi les ARNsi qui réduisaient la phosphorylation de H2AX induite par le CDDP, et nous avons pu confirmer ce résultat (figure 19-A). La kinase HIPK2 a récemment été décrite comme un régulateur négatif de WIP1, qui affecte également la phosphorylation de H2AX suite à un dommage à l'ADN (Choi, Na et al. 2013). De plus, nous avons observé une augmentation significative de la sensibilité des cellules Saos2 au CDDP suite à l'inhibition de la kinase HIPK2 avec un ARNsi spécifique ($P=0,0037$), indiquant que la déplétion de HIPK2 restaure l'activité de WIP1 (figure 19-B).

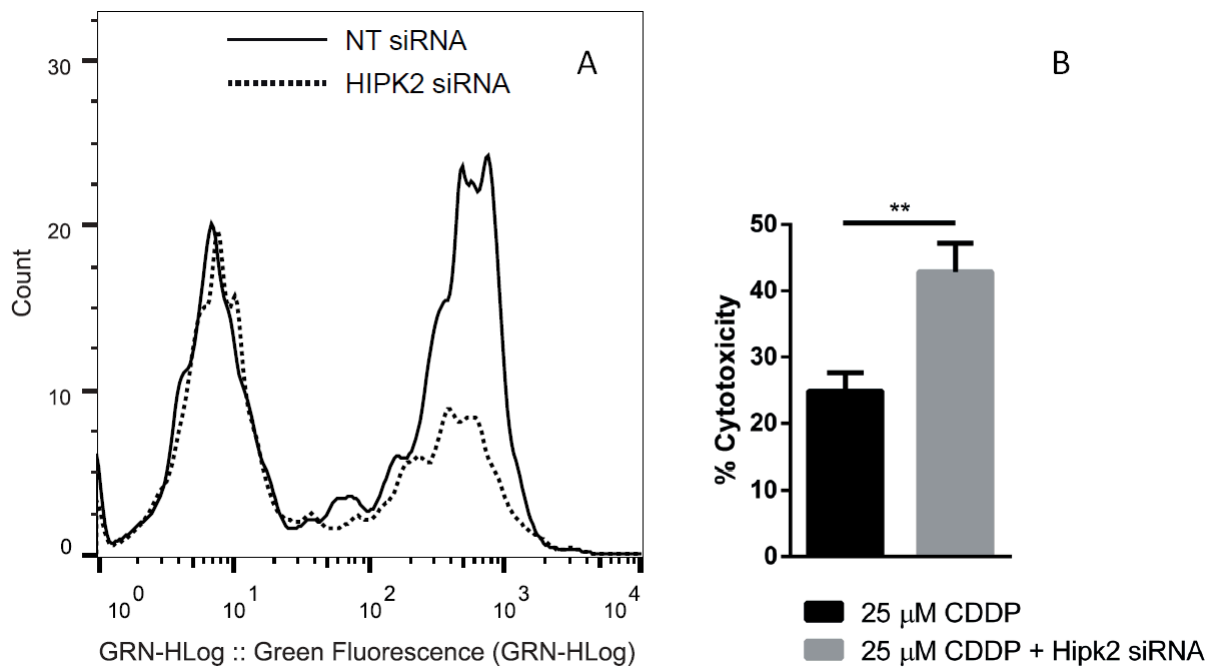


Figure 19 : Un ARNsi ciblant la kinase HIPK2 diminue la phosphorylation de γ H2AX mais augmente la sensibilité des cellules Saos2 P53-négatives au CDDP.

(A) Analyse par cytométrie en flux de la phosphorylation de H2AX après un traitement avec 25 μ M de CDDP pendant 28 heures après la transfection inverse d'un ARNsi contrôle (ligne) ou ciblant HIPK2 (pointillés). (B) Comparaison de la cytotoxicité d'un traitement de 25 μ M de CDDP pendant 72 heures de cellules Saos2 avec ou sans transfection d'un ARNsi ciblant HIPK2.

2. L'inhibition de la kinase WEE1 diminue la phosphorylation de H2AX induite par le cisplatine et sensibilise les cellules Saos2 à cette drogue.

Parmi les résultats positifs identifiés, nous avons sélectionné la kinase WEE1 comme preuve de principe que l'inhibition d'une kinase pourrait augmenter la sensibilité des cellules tumorales p53-négatives à la chimiothérapie sans augmenter le marqueur de signalisation des dommages à l'ADN, ici γ H2AX. WEE1 n'a jamais été rapportée comme affectant directement la phosphorylation de γ H2AX. Nous avons confirmé que l'ARNsi dirigé contre WEE1 diminuait la phosphorylation de cet histone suite à un dommage à l'ADN induit par le CDDP.

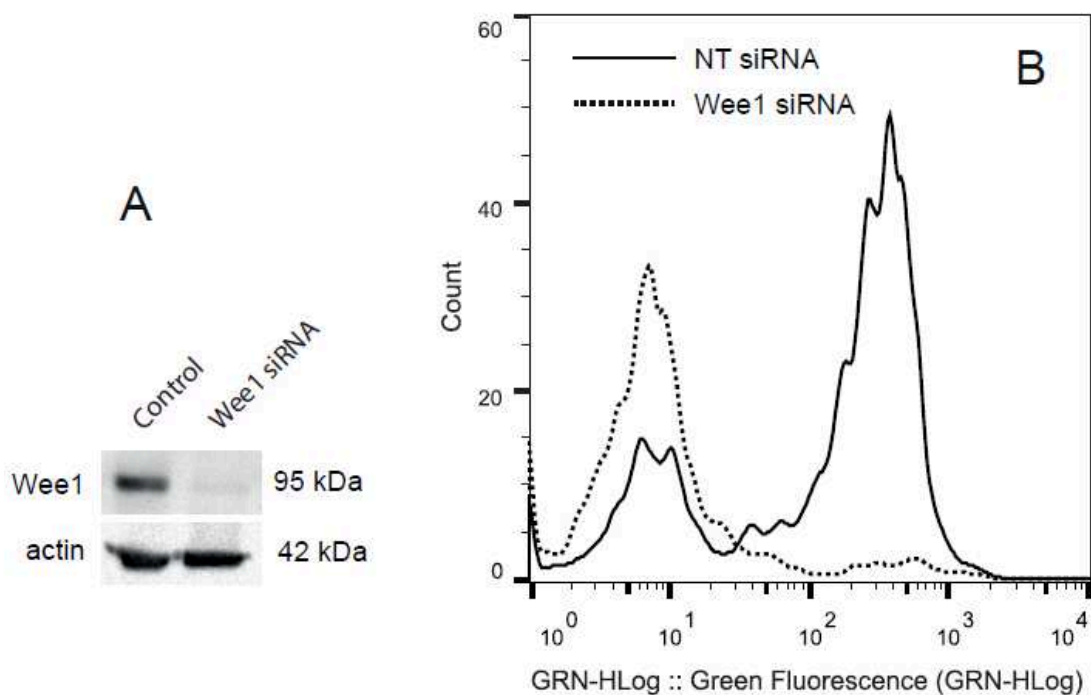


Figure 20 : L'inhibition de WEE1 diminue la phosphorylation de γ H2AX.

L'inhibition de WEE1 par interférence à ARN, confirmée par western blot (A) entraîne une diminution de la phosphorylation de γ H2AX induite par un traitement au CDDP de 25 μ M pendant 28 heures réalisé 48 heures après la transfection.

Récemment, le composé chimique MK-1775 a été identifié comme étant un inhibiteur spécifique de l'activité de la kinase WEE1. Il a été rapporté que ce composé pouvait sensibiliser

plusieurs types de lignées cellulaires cancéreuses à de nombreux agents chimiothérapeutiques. Nous avons démontré que le MK-1775 potentialise la sensibilisation dépendante de WIP1 des cellules Saos2 P53-négatives au CDDP, et ce même en utilisant une plus faible concentration de chimiothérapie ($P=0,0099$). En effet, en utilisant la triple combinaison (CDDP + MK-1775 + surexpression de WIP1), nous avons pu réduire la concentration effective de CDDP de 40%, passant de 25 μM (utilisés avec WIP1 seule) à 15 μM (figures 21-A et 21-B). Il est important de noter que nous avons utilisé une très faible concentration de MK-1775 (75 nM) afin d'éviter une cytotoxicité induite par ce composé seul. A cette concentration, il a été montré que le MK-1775 ne peut inhiber WEE1 qu'à hauteur de 50%, en se servant de la phosphorylation de CDC2 comme marqueur de son activité (Hirai, Iwasawa et al. 2009). Au contraire, en absence de surexpression de WIP1, la sensibilisation des cellules tumorales à la chimiothérapie par le MK-1775 ($P=0,0201$) est grandement atténuée.

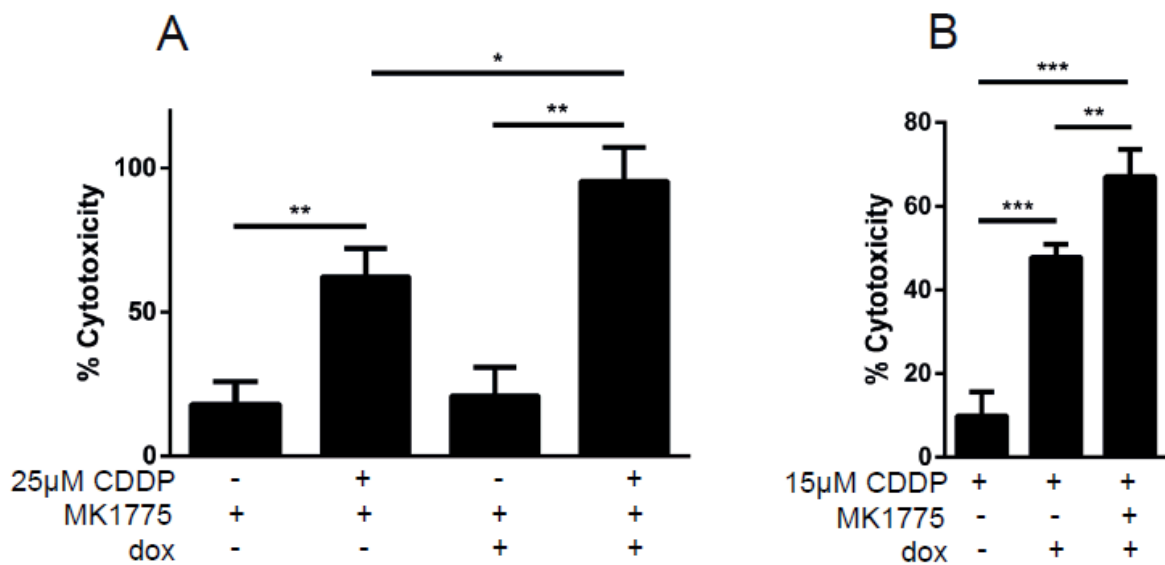


Figure 21 : L'inhibition de WEE1 potentialise la cytotoxicité du CDDP envers les cellules Saos2.

WEE1 a été inhibée grâce à 75 nM de MK-1775 2 heures avant un traitement de (A) 25 μM ou (B) 15 μM de CDDP en présence ou non de 1 $\mu\text{g/ml}$ de doxycycline pour induire l'expression de WIP1.

WEE1 est un régulateur majeur du point de contrôle G2/M du cycle cellulaire. Il a été décrit que l'inhibition de WEE1 empêche l'arrêt du cycle cellulaire au point de contrôle G2/M suite à un dommage à l'ADN. Suite à des ruptures double-brin induites par la chimiothérapie,

l'inhibition de WEE1 induit une entrée prématurée des cellules en phase G2 du cycle cellulaire, porteuses d'un ADN non réparé, et ce faisant entraîne une catastrophe mitotique provoquant la mort des cellules (De Witt Hamer, Mir et al. 2011). Nous avons démontré que le nombre de cellules entrant en mitose suite à un traitement avec la triple combinaison mentionnée ci-dessus était similaire au nombre de cellules entrant en mitose suite à un traitement avec uniquement le CDDP (figure 22). L'activité préservée des points de contrôle pré-mitotiques peut s'expliquer par le fait que la concentration de MK-1775 utilisée est insuffisante pour inhiber totalement l'action de la kinase WEE1. En effet, les cellules utilisées étant totalement déplétées pour P53, le point de contrôle G1 y est également compromis, étant donné que P53 en est un régulateur indispensable, comme mentionné plus haut.

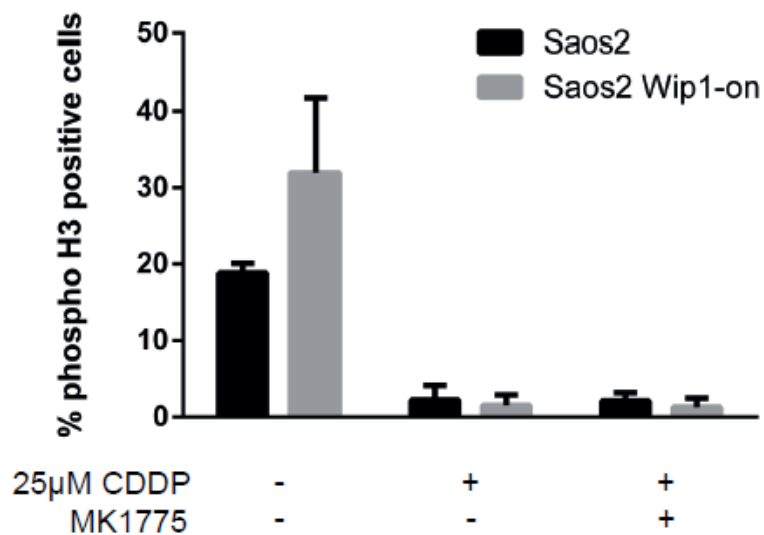


Figure 22 : La mort des cellules Saos2 suite à un traitement combinant CDDP, MK-1775 et surexpression de WIP1 ne résulte pas d'une catastrophe mitotique.

Immunofluorescence ciblant le marqueur mitotique phospho-histone H3. Les cellules ont été traitées pendant 16 heures avec 100 ng/ml de nocodazole pour les bloquer en mitose, avec la triple combinaison 25 µM CDDP, 75 nM MK-1775 et 1 µg/ml de doxycycline pour induire la surexpression de WIP1.

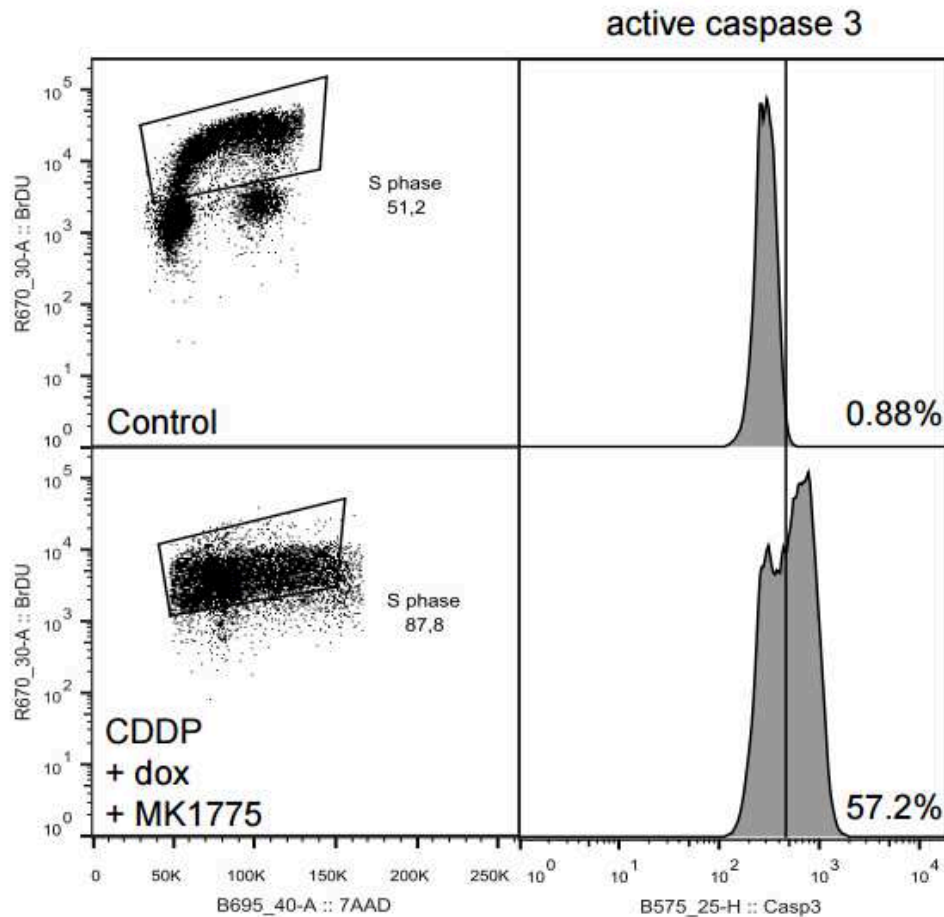


Figure 23 : Le cisplatine et le MK-1775 entraînent l'activation d'un signal pro-apoptotique dans les cellules Saos2 WIP1-on résultant en l'activation de la caspase-3 en phase S.

Analyse par cytométrie en flux d'un double marquage caspase-3 active/BrdU. La triple combinaison (15 μ M CDDP, 1 μ g/mL de doxycycline et 75 nM de MK-1775) a été appliquée aux cellules pendant 48 heures. 1 heure avant la fin du traitement, 10 μ M de BrdU ont été ajoutés au milieu de culture.

Le profil de cycle cellulaire des cellules traitées avec les différentes combinaisons (soit CDDP seul, CDDP + MK-1775 ou surexpression de WIP1, ou triple combinaison) suggère que dans le cas de la double ou triple combinaison, la plupart des cellules entrent en phase S du cycle afin de répliquer leur ADN. De plus, nous avons pu montrer que le signal pro-apoptotique est activé en phase S, comme montré figure 23, par une colocalisation de la caspase-3 active avec le marquage BrdU de la population cellulaire se trouvant en phase S.

La figure 24 montre que les cellules traitées selon notre stratégie, CDDP, MK-1775 et surexpression de WIP1 meurent d'une apoptose caspase-3-dépendante, mettant en évidence l'efficacité de cette triple combinaison sur des cellules P53-négatives. L'efficacité de ce nouveau traitement a été également confirmée par une augmentation dans le niveau d'expression de PARP clivé après son utilisation sur les cellules Saos2.

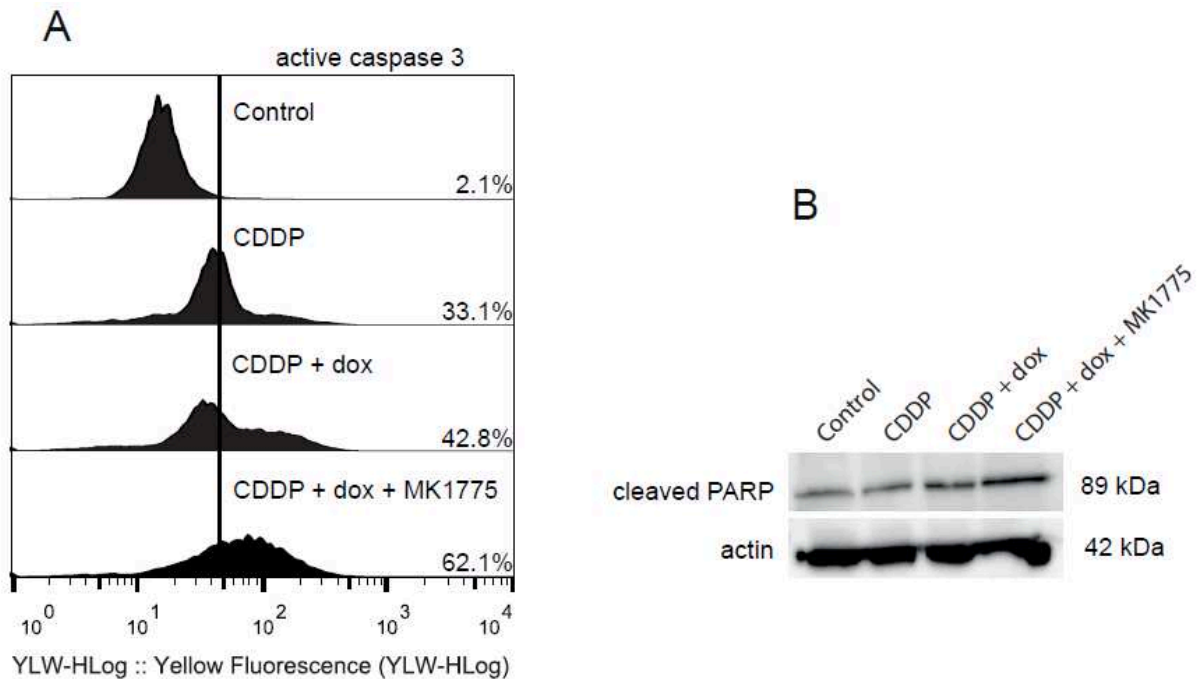


Figure 24 : La triple combinaison permet une apoptose caspase-3-dépendante et l'induction du clivage de PARP dans les cellules Saos2 P53-négatives.

(A) Analyse par cytométrie en flux d'un marquage caspase-3 active de cellules Saos2 n'ayant subi aucun traitement, ou alors 25 μ M de CDDP seul, avec 1 μ g/mL de doxycycline pour induire WIP1 ou en triple combinaison avec 75 nM de MK-1775. (B) Western blot dirigé contre PARP clivé sur des lysats de cellules Saos2 n'ayant subi aucun traitement, ou alors 15 μ M de CDDP seul, avec 1 μ g/mL de doxycycline pour induire WIP1 ou en triple combinaison avec 75 nM de MK-1775.

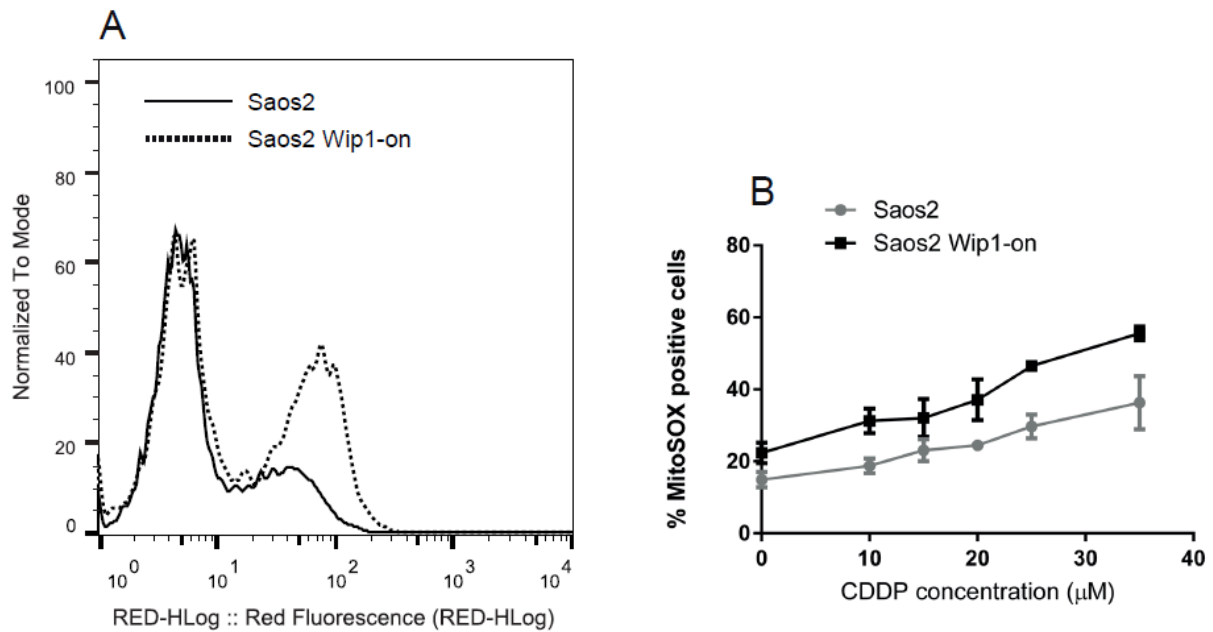


Figure 25 : La production de superoxydes mitochondriaux est corrélée à l'expression de WIP1 et prédit le destin cellulaire.

(A) Analyse par cytométrie en flux montrant la dépendance de WIP1, induite par la doxycycline, pour la formation d'espèces réactives de l'oxygène après un traitement avec 25 μM de CDDP pendant 24 heures. (B) Analyse par cytométrie en flux de la production de superoxydes mitochondriaux. Les cellules d'ostéosarcome Saos2 ont été traitées avec des doses de plus en plus importantes de CDDP pendant 24 heures avec ou sans induction de WIP1 par 1 $\mu\text{g/ml}$ de doxycycline. La formation des superoxydes mitochondriaux a été détectée à l'aide du réactif MitoSOX après une incubation des cellules avec 2 μM du marqueur pendant 15 minutes à 37°C.

L'oxydation de la mitochondrie, que nous avons détectée avec le réactif fluorescent MitoSOX, est augmentée d'une manière dépendante au traitement au CDDP et à l'expression de WIP1 (figure 25). Ainsi, la mort cellulaire dans les cellules Saos2 suite à la chimiothérapie en présence de surexpression de WIP1 implique la voie mitochondriale et est fortement corrélée à son oxydation. Il est intéressant de rappeler que l'induction de WIP1 diminue la phosphorylation de H2AX suite à un traitement des cellules avec le CDDP (figure 15-B). Ainsi, la cytotoxicité du traitement et la production d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules cancéreuses P53-négatives ne sont pas corrélées à l'expression de γH2AX , marqueur principal du dommage à l'ADN.

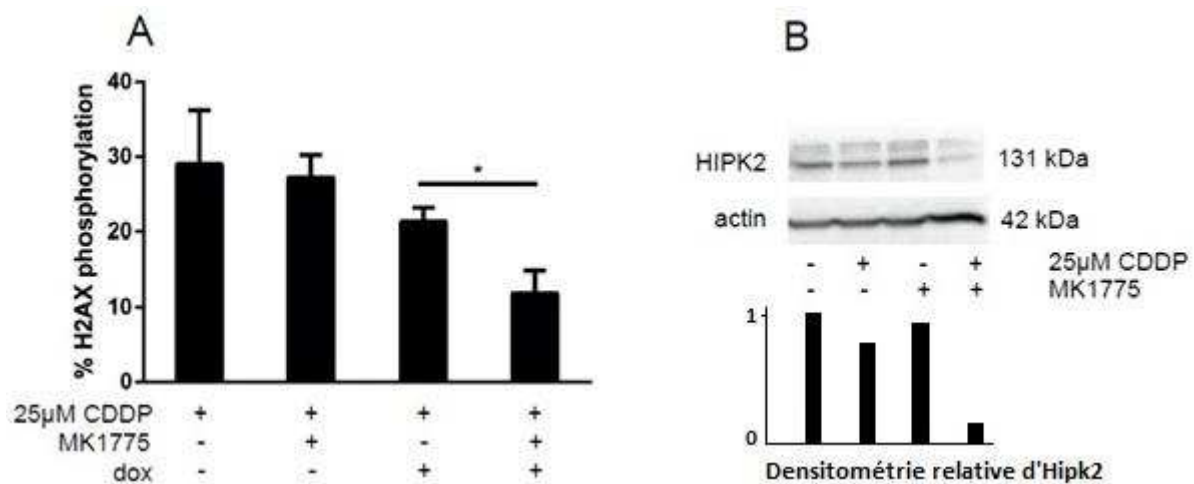


Figure 26 : L'inhibition de WEE1 suite à la triple combinaison diminue la phosphorylation de H2AX d'une manière dépendante de WIP1 et dérégule HIPK2.

(A) Analyse de la phosphorylation de H2AX suite à un traitement des cellules Saos2 avec 25 µM de CDDP avec ou sans inhibition de WEE1 par 75 nM de MK-1775 et induction de WIP1 par un traitement de 1 µg/ml de doxycycline. (B) Western blot dirigé contre la kinase HIPK2 avec ou sans CDDP et MK-1775. La densitométrie relative du signal HIPK2 rapporté au contrôle d'actine a été calculée avec le logiciel ImageJ. La première barre représentant l'intensité de HIPK2 est l'unité, les autres montrant la variation par rapport à cette condition contrôle.

Suite à cela, nous avons montré que l'inhibiteur de WEE1 MK-1775 réduit la phosphorylation de H2AX induite par un traitement au CDDP dans les cellules d'ostéosarcome Saos2, et ce d'une manière dépendante de WIP1 ($P=0,0103$; figure 26-A), puisque le MK-1775 n'a pas d'impact sur la phosphorylation de H2AX par lui-même dans les cellules sans surexpression de WIP1 par un traitement à la doxycycline. Cela indique que la kinase WEE1 pourrait affecter négativement l'activité de la phosphatase WIP1, et ainsi l'inhibition de WEE1 par le MK-1775 peut activer WIP1 et augmenter la sensibilité des cellules P53-négatives au CDDP. De manière intéressante le traitement simultané avec le CDDP et le MK-1775 déstabilise la kinase HIPK2, un régulateur négatif de l'activité de WIP1 (Choi, Na et al. 2013), confirmant ainsi l'implication de WEE1 dans la régulation négative de la voie de signalisation de WIP1 (figure 26-B).

3. L'inhibition de WEE1 combinée à la surexpression de WIP1 ne sensibilise pas les cellules normales au cisplatine.

La chimiothérapie conventionnelle peut sévèrement affecter de nombreux tissus et organes ce qui peut mener à de lourds effets secondaires durant et après le traitement anti-cancer (Pabla and Dong 2012, Lin, Ng et al. 2015, Brewer, Morrison et al. 2016).

Nous avons trouvé que notre proposition de triple combinaison n'augmente pas de manière significative la mort cellulaire des fibroblastes embryonnaires murins normaux (figure 27-A). De plus, le traitement de souris sauvages et transgéniques exprimant WIP1 grâce à un promoteur ubiquitaire (pUBC-WIP1) a montré que le MK-1775, utilisé à des concentrations proposées pour le traitement anti-cancer (30 mg/kg) n'est pas toxique, et ce pour des tissus à prolifération rapide comme l'épithélium intestinal. Nous avons également mis en évidence le fait que le MK-1775, quand administré conjointement au CDDP, n'altère pas l'effet protecteur envers les tissus sains obtenu grâce à la surexpression de WIP1 durant la chimiothérapie (Goloudina, Tanoue et al. 2012). En effet, nous avons observé une diminution du nombre de cellules apoptotiques dans les souris pUBC-WIP1 comparé aux souris sauvages après un traitement combinant MK-1775 et CDDP administré à 10 mg/kg (figure 27-B).

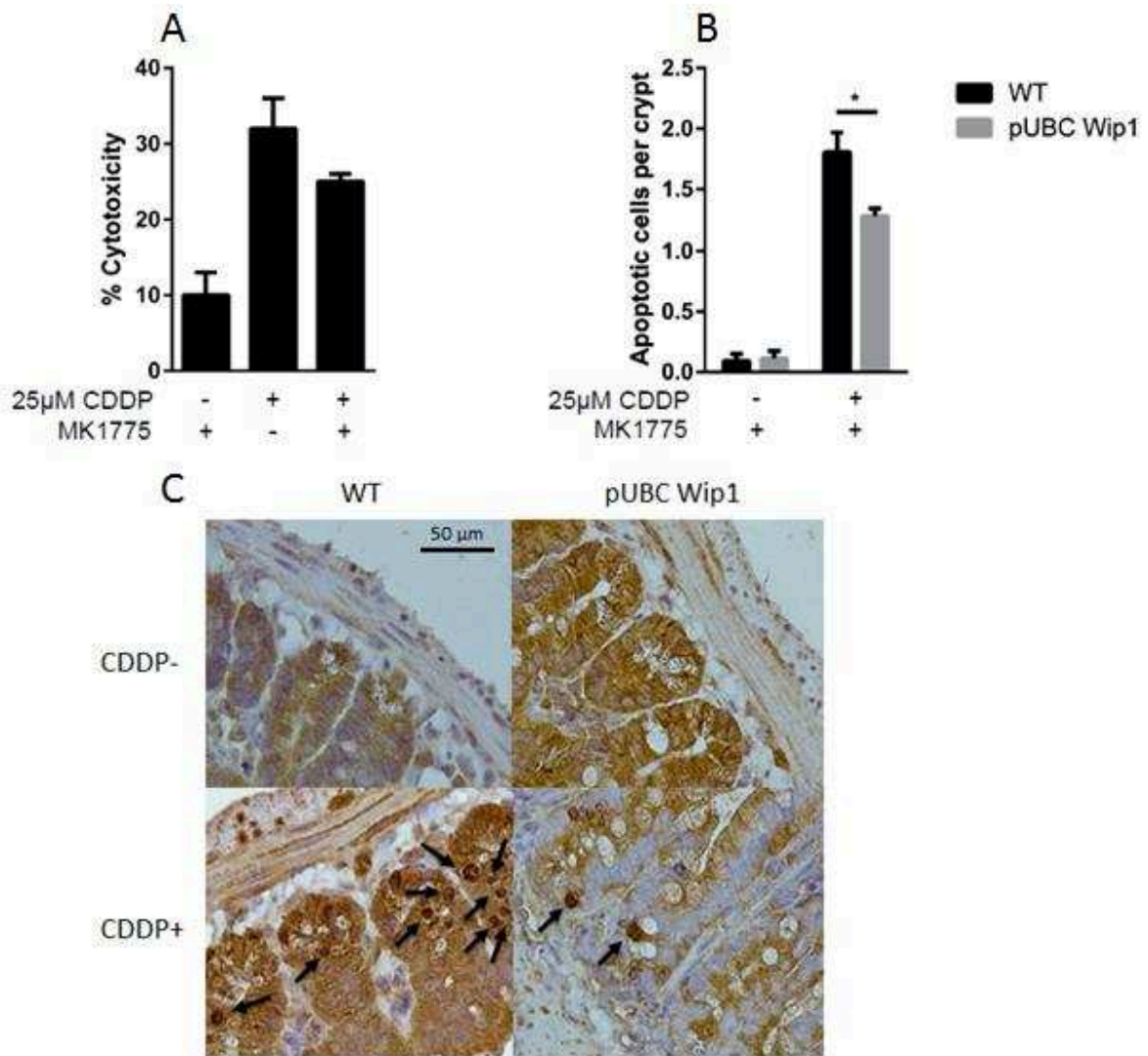


Figure 27 : L'inhibiteur de WEE1 MK-1775 n'augmente pas la mort cellulaire par lui-même in vitro ou in vivo sans combinaison avec le CDDP.

(A) Analyse cytotoxique de cellules MEFs suivant un traitement avec 75 nM de MK-1775 et 25 μ M de CDDP pendant 72 heures. (B-C) Immunohistochimie de coupes d'intestins de souris sauvages (WT) ou exprimant WIP1 (pUBC WIP1) après un traitement per os avec 30 mg/kg de MK-1775 2 heures avant une injection ip de 10 mg/kg de CDDP. Les cellules apoptotiques ont été marquées avec un anticorps anti caspase-3 clivée et ont été comptées dans au minimum 100 cryptes intestinales par souris.

4. WIP1 affecte positivement la survie des patients atteints de tumeurs colorectales P53-négatives.

Afin de déterminer l'importance biologique de l'expression du gène *PPM1D* codant pour WIP1 dans des tumeurs avec des statuts de P53 variables, nous avons utilisé une approche bio-informatique sur une banque de données d'expression génique de patients atteints d'un cancer colorectal. Parmi les patients, 190 échantillons correspondent à des patients avec un statut mutant inactif pour P53 et 161 échantillons contiennent P53 sauvage.

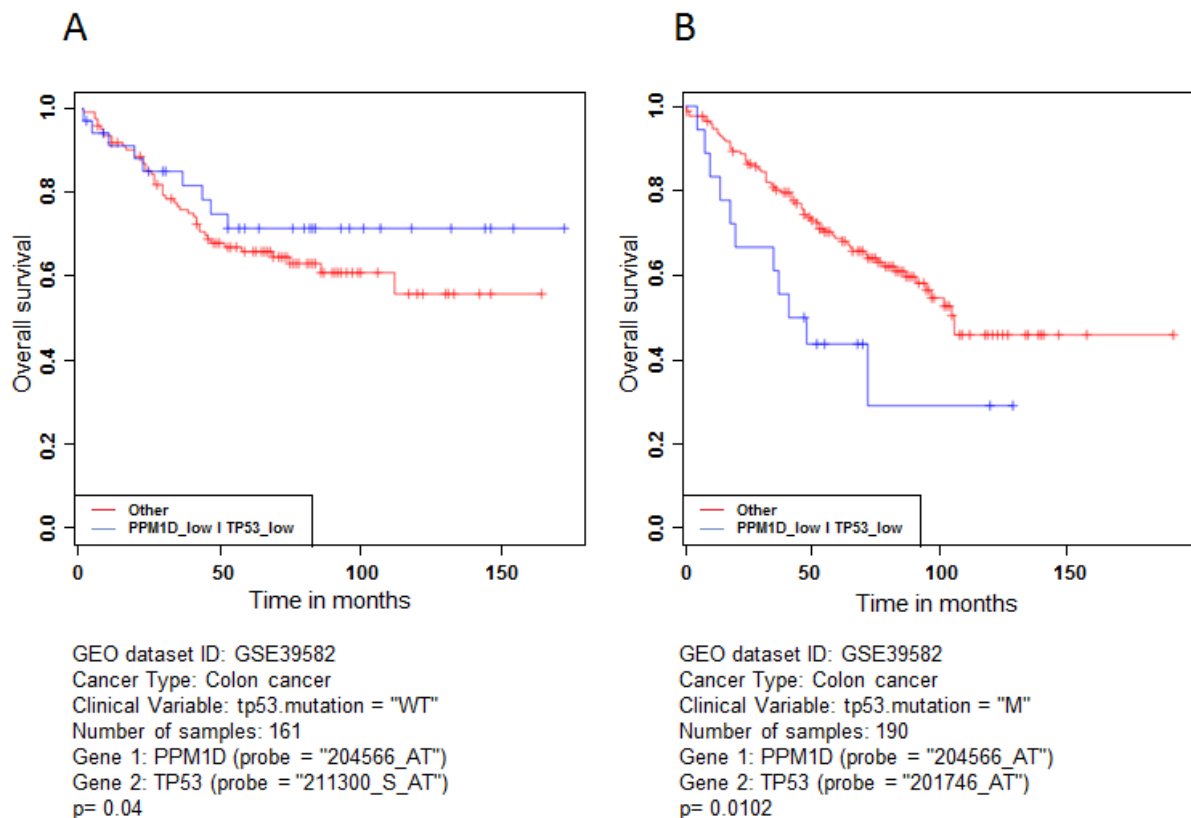


Figure 28 : L'expression de *PPM1D* est corrélée à une meilleure survie des patients atteints de cancer colorectaux lorsque P53 est mutée.

Analyse bio-informatique de deux cohortes de patients atteints de cancer du côlon. L'effet de corrélation entre la survie des patients et l'expression du gène *PPM1D* avec le statut de P53, sauvage (A) ou muté/inactif (B) a été calculé depuis un set de données Affymetrix, à l'aide de la technique standard « A-package ».

Ces deux cohortes ont été examinées séparément pour la corrélation entre l'expression de *PPM1D* et la survie des patients. Ainsi, en présence de P53 sauvage, un faible niveau d'expression de *PPM1D* est corrélé à un meilleur pronostic, ce qui concorde avec le rôle oncogénique de la phosphatase WIP1 décrit dans la littérature dans ce cas ($P= 0,04$; figure 28-A). En revanche, en absence de P53 ou en présence d'un mutant inactif, un faible niveau d'expression de *PPM1D* est associé avec un faible taux de survie des patients atteints de cancer du colon, surtout après 75 mois ($P=0,0102$; figure 28-B). Ce résultat confirme, bien qu'indirectement, le rôle positif de *PPM1D* en absence de P53 fonctionnelle. Collectivement, ces résultats suggèrent que WIP1 présente effectivement des rôles opposés dans les tumeurs avec P53 sauvage comparé aux tumeurs mutées pour P53.

5. Le Vorinostat induit une surexpression de WIP1 dans les cellules P53-négatives Saos2 et T47D.

Les résultats obtenus et détaillés précédemment ont été réalisés en induisant la surexpression de WIP1 grâce à une modification génétique dans les cellules d'ostéosarcome humain Saos2, en insérant en amont du gène *PPM1D* un promoteur inductible aux tétracyclines. Le gène *PPM1D* peut ainsi dans ces cellules être exprimé suite à un traitement avec de la doxycycline. Afin de s'affranchir de cet inconvénient et de pouvoir transférer ce modèle reposant sur une modification génétique en pratique, dans un premier temps *in vivo* chez la souris puis lors d'une étude clinique, il était impératif de trouver une molécule permettant d'induire l'expression de la phosphatase WIP1 dans les cellules P53-négatives. Afin de réaliser cet objectif, les cellules d'ostéosarcome Saos2 ont été modifiées à l'aide de la technologie TALEN afin d'intégrer le gène rapporteur luciférase sous le contrôle du promoteur de WIP1. Deux matrices d'intégration ont été conçues, une possédant la cassette permettant la résistance à la puromycine des cellules modifiées, et l'autre le gène de la GFP sous le contrôle direct du promoteur CMV. Ainsi, en présence des TALEN et des deux matrices d'intégration, une recombinaison homologe se produit permettant l'intégration ciblée des gènes d'intérêt. Une succession de clonages dans le vecteur pGL3 basic a permis de créer les deux matrices puromycine et GFP. Des PCR ont été réalisées afin de sélectionner un clone chez lequel les deux allèles de WIP1 ont été modifiés, l'un en intégrant la matrice puromycine, l'autre en intégrant la matrice GFP (figure 29-A). La lignée cellulaire ainsi obtenue, permettant la détection de l'activation du promoteur de WIP1 par une émission de luminescence due à l'expression de la luciférase a été nommée Saos2-TAL-GP7.

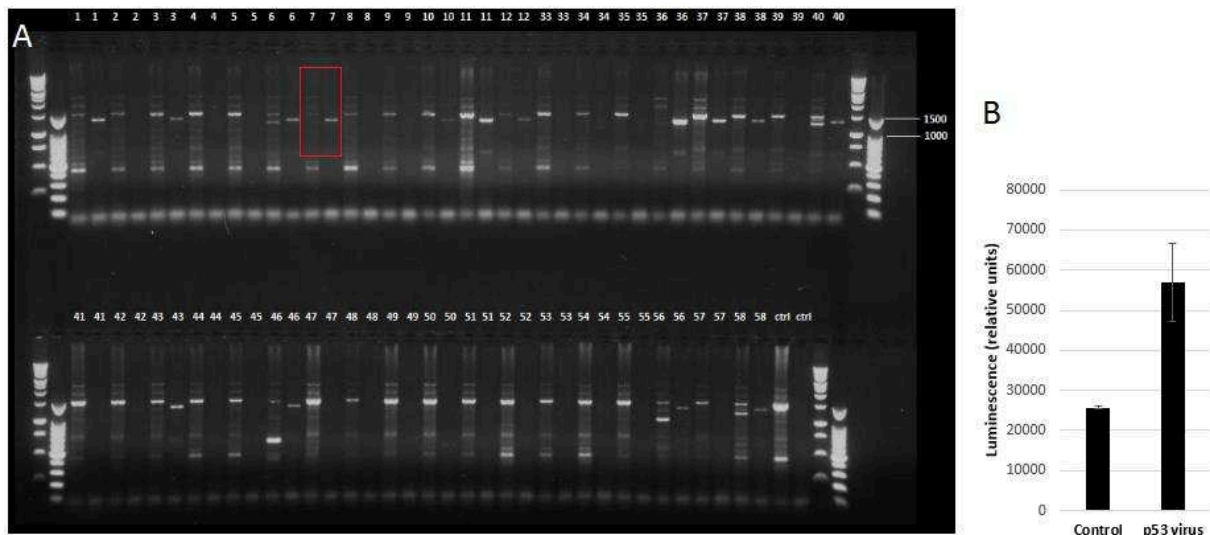


Figure 29 : Validation de la lignée cellulaire nouvellement créée Saos2-TAL-GP7.

(A) Suite à la transfection des TALEN ciblant le promoteur de *WIP1* et des matrices d'intégration puromycine et GFP, une PCR a été réalisée afin de déterminer un clone chez lequel l'intégration s'est effectuée de manière stable et où le génotype sauvage est absent des deux allèles. Le clone 7 répond à ces attentes et a été nommé Saos2-TAL-GP7. (B) Les cellules Saos2-TAL-GP7 ont été infectées avec un virus induisant l'expression de P53, facteur de transcription de *PPM1D*, et un test de luminescence a été effectué avec le kit luciférase assay system de Promega.

Afin de vérifier l'efficacité du modèle, des virus codant pour P53 ont été créés et utilisés afin d'infecter ces cellules. Suite à l'infection des cellules Saos2-TAL-GP7, une augmentation significative de luminescence a été détectée, validant ainsi la construction génétique comme outil de criblage afin de chercher une molécule pouvant permettre l'induction de *WIP1* suite à l'activation du promoteur du gène *PPM1D* (figure 29-B).

Ainsi, les cellules Saos2-TAL-GP7 ont étéensemencées en plaques 96 puits puis traitées avec une banque de molécules approuvées par la FDA. Ce criblage à haut débit a permis de détecter plusieurs composés induisant l'expression de *WIP1*, et notamment le Vorinostat, un inhibiteur des histone-déacétylases, qui induit une augmentation du niveau de luminescence d'un facteur 10 par rapport au contrôle (figure 30).

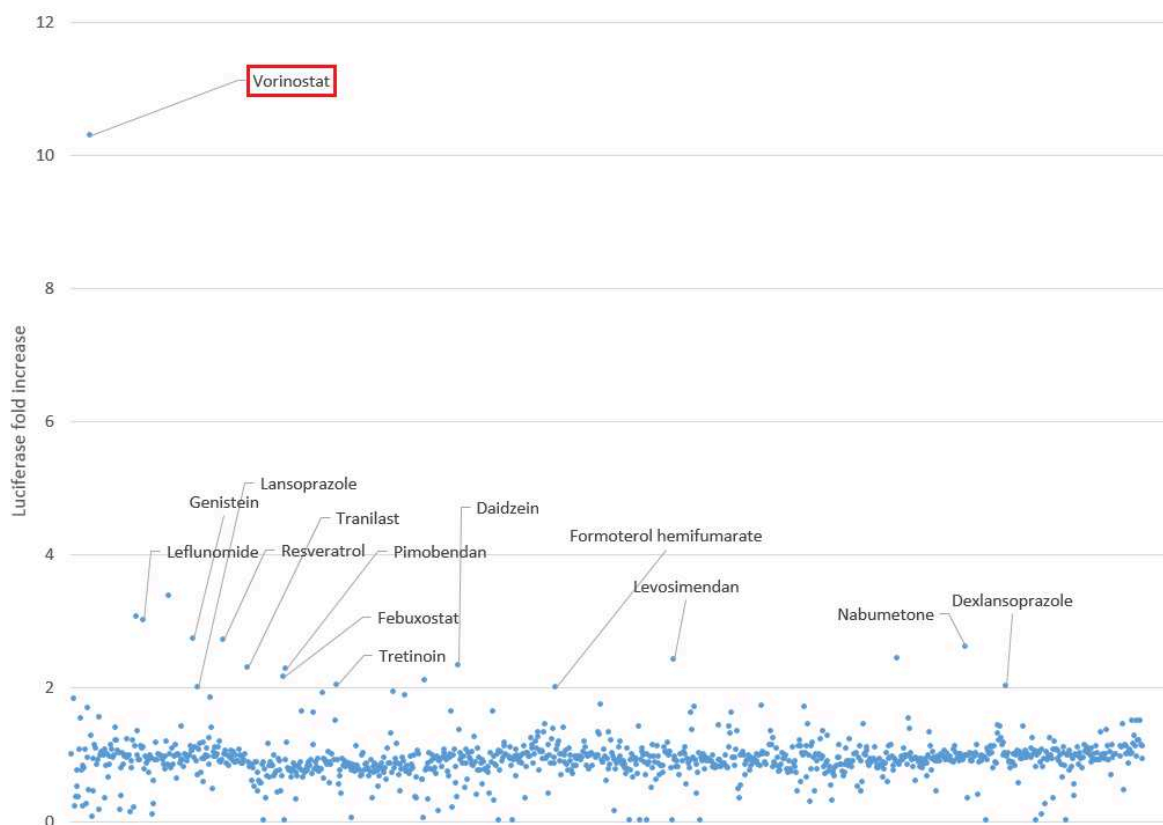


Figure 30 : Criblage à haut débit d'activateurs de WIP1.

Les cellules Saos2-TAL-GP7 ont étéensemencées en plaques 96 puits et traitées avec une banque de molécules chimiques approuvées par la FDA, à une concentration de 10 μM . 24 heures après le traitement, les cellules ont été lysées, et la fluorescence de la GFP a été mesurée afin de normaliser la luminescence obtenue à l'aide du kit luciferase assay system de Promega.

Afin de valider le Vorinostat comme pouvant être utilisé conjointement à la chimiothérapie au cisplatine et à l'inhibition de WEE1 avec le MK-1775, nous avons dans un premier temps vérifié que le résultat du criblage pouvait être répété. Nous avons pu confirmer qu'un traitement avec 10 μM de Vorinostat sur les cellules Saos2-TAL-GP7 pendant 24 heures induisait toujours une forte augmentation de la luminescence observée (figure 31-A). Nous avons ensuite voulu vérifier qu'un traitement avec cette molécule permettait une détection de l'augmentation de l'expression du gène *PPM1D* codant pour WIP1 au niveau de l'ARN messager et au niveau protéique. Les lignées d'ostéosarcome et de cancer du sein humains Saos2 et T47D ont été traitées avec 10 μM de Vorinostat pendant différents temps. Il convient de noter que les cellules Saos2 n'expriment pas P53, et que les T47D en expriment une forme inactive car mutée au niveau de son site de liaison à l'ADN.

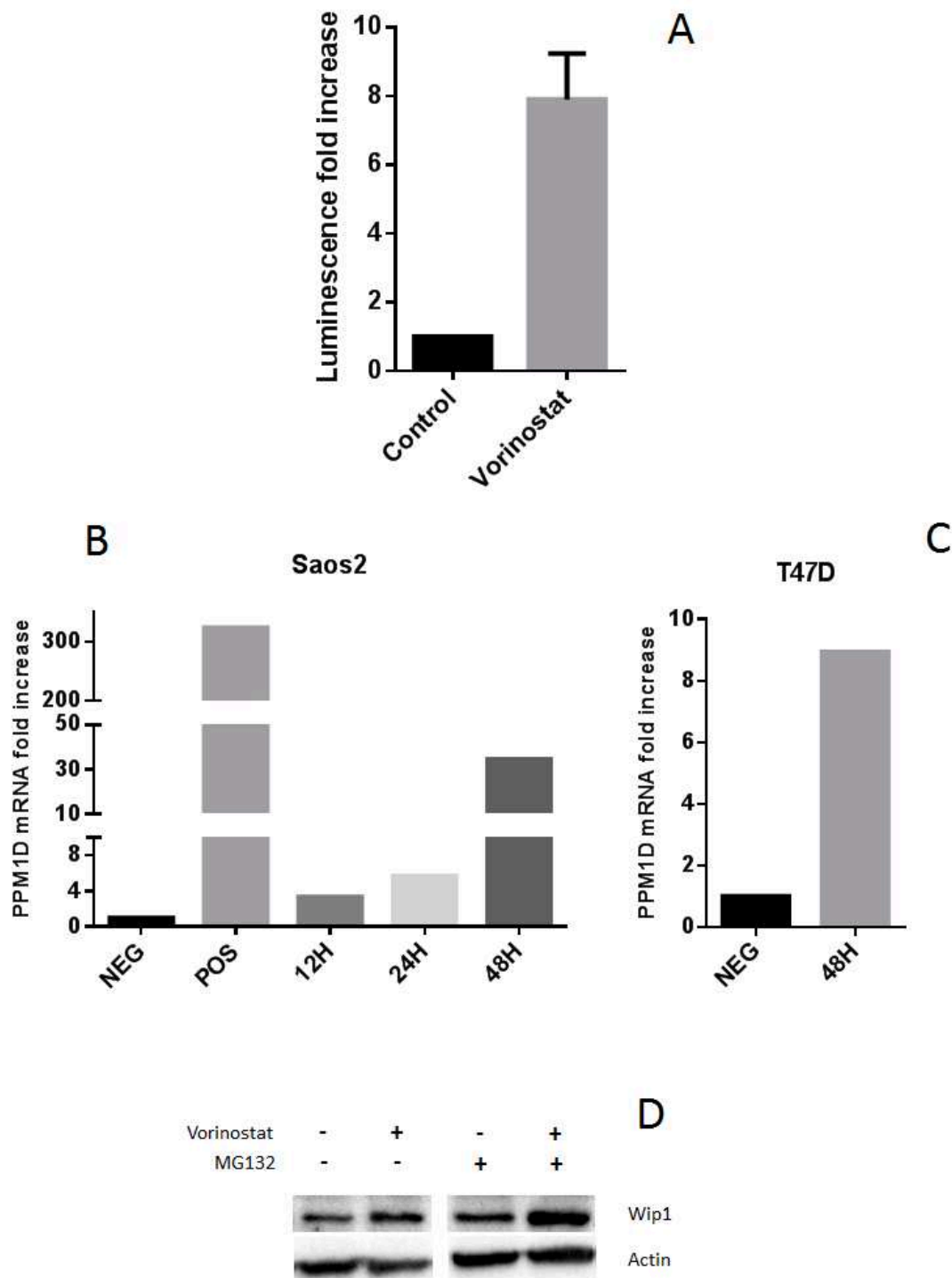


Figure 31 : Le Vorinostat induit l'expression de WIP1.

(A) Les cellules Saos2-TAL-GP7 ont été traitées avec 10 μ M de Vorinostat pour 24 heures, puis lysées et la luminescence a été mesurée. Les données sont normalisées par rapport aux contrôles traités uniquement avec du DMSO. (B) Données de RTqPCR chez la lignée Saos2 ou (C) T47D montrant l'expression de PPM1D après un traitement de 10 μ M de Vorinostat pour différents temps. (D) Western blot anti WIP1 après un traitement de cellules T47D avec 10 μ M de Vorinostat pour 34 heures, avec ou sans 1 μ M de MG132 pour 8 heures avant la récupération et la lyse des cellules.

Une RTqPCR a été réalisée et a démontré que le Vorinostat permet une induction significative des niveaux d'ARNm de *PPM1D* dans ces deux lignées cellulaires (figure 31-B, 31-C). Une augmentation protéique a également pu être observée par western blot chez la lignée T47D. La différence de niveau d'expression de la protéine WIP1 est mieux visible par western blot après avoir inhibé le protéasome par un traitement au MG132 (figure 31-D). Il apparaît ainsi que le Vorinostat peut être utilisé pour induire WIP1 dans les cellules P53-négatives. Ainsi, le Vorinostat est un candidat prometteur dans la recherche d'un activateur de WIP1 dans des lignées cellulaires cancéreuses où P53 est absente ou inactive.

Discussion

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, une grande augmentation de l'incidence des cancers est à prévoir dans les vingt prochaines années, notamment à cause du vieillissement de la population, des difficultés de diagnostic et de prévention dans certains pays et aussi à cause de facteurs de risques établis tels que le tabagisme, l'obésité ou l'inactivité physique (Torre, Bray et al. 2015). C'est pourquoi il est primordial de réussir à développer de meilleures stratégies anti-cancer afin de pouvoir augmenter le taux de guérison de ces maladies. Dans certains types de tumeurs, des approches thérapeutiques ciblent le statut du suppresseur de tumeur P53, où alors des stratégies différentes pourront être employées en fonction du statut sauvage ou muté de P53 (Wang and Sun 2010). Dans les tumeurs où le statut de P53 est sauvage, WIP1 adopte une activité oncogénique. Elle est amplifiée dans de nombreuses tumeurs quand P53 n'est pas mutée et le fait qu'elle soit surexprimée lui donne le potentiel d'interférer dans de nombreuses voies de signalisation qui normalement ont un effet anti tumoral (Lu, Nguyen et al. 2008). Elle est ainsi amplifiée et affecte négativement les caractéristiques tumorales dans le cancer du sein, le neuroblastome, le médulloblastome, l'adénocarcinome ovarien à cellules claires, le carcinome gastrique, l'adénocarcinome pancréatique ou encore la leucémie lymphoïde chronique (Demidov, Kek et al. 2007, Goloudina, Kochetkova et al. 2016). C'est pourquoi chez ce type de patients, son inhibition est une stratégie qui permet d'augmenter l'efficacité de la thérapie anti-cancer, tout en diminuant la récurrence de la maladie (Bang, Yamaguchi et al. 2008, Rayter, Elliott et al. 2008, Tan, Lambros et al. 2009, Wang and Sun 2010). Ainsi, développer dans ce cas des inhibiteurs de WIP1 est une stratégie pertinente afin de cibler les mécanismes biologiques spécifiques à la tumeur et favorisant son développement.

Les données obtenues précédemment par notre équipe (Goloudina, Mazur et al. 2012, Goloudina, Tanoue et al. 2012) et celles collectées durant cette thèse mettent en évidence le besoin impératif de déterminer le statut du suppresseur de tumeur P53 préalablement à l'administration d'un traitement afin d'anticiper son efficacité et de l'ajuster si nécessaire. En effet, la stratégie anti-cancer basée sur l'inhibition de la phosphatase WIP1 est inefficace dans le cas où P53 est mutée et inactive. Cependant dans ce cas, c'est son activation qui permet la sensibilisation des cellules cancéreuses à la chimiothérapie. Ces rôles complètement opposés induits par l'expression du gène *PPM1D* en fonction du statut de P53 sont la clé de voûte d'une nouvelle stratégie thérapeutique innovante. En effet, une des caractéristiques les plus

intéressantes, découverte lors de ces travaux, est le fait que la surexpression de WIP1 ne potentialise un effet cytotoxique en combinaison à la chimiothérapie qu'uniquement au niveau tumoral. Ainsi, sa surexpression transitoire dans les tissus normaux n'induit aucune conséquence néfaste pour les cellules, mais au contraire permet leur protection contre le déclenchement de la voie de P53 suite à un dommage à l'ADN créé par le traitement chimiothérapeutique. P53 dans les tissus normaux est un acteur responsable des effets délétères des agents chimiothérapeutiques, c'est pourquoi à la fin des années 1990 Komarov *et al* avaient travaillé sur la pifithrin- α , un inhibiteur réversible de P53, afin de diminuer les effets secondaires du traitement chez la souris (Komarov, Komarova et al. 1999). Les données obtenues durant la thèse montrent que la surexpression de WIP1, et ce même lorsque combinée à l'inhibition de WEE1 par le MK-1775, permet la protection chez la souris des tissus normaux à développement rapide, ici l'intestin, contre le cisplatine.

En effet, les dérivés du platine, dont le cisplatine fait partie, sont des agents chimiothérapeutiques très utilisés dans le traitement de tumeurs solides comme le cancer de la tête et du cou, du poumon, des testicules, ou des ovaires. L'efficacité de l'utilisation de ces agents dépend de leur dose, malheureusement c'est le cas de leurs effets secondaires également, et en particulier la toxicité qu'induisent les dérivés du platine au niveau rénal. De nombreux rapports ont décrit le lien entre insuffisance rénale aiguë et traitement de patients avec du cisplatine, ce qui du coup est un obstacle majeur à son utilisation à des concentrations qui pourraient maximiser son activité antinéoplasique (Hanigan and Devarajan 2003, Townsend, Tew et al. 2009). De plus, lorsque le suppresseur de tumeur P53 est muté et inactif, ce qui est le cas dans plus de la moitié des cancers humains, l'efficacité de tels traitements et donc la survie des patients sont sévèrement impactées (Wen, Reles et al. 1999, Reles, Wen et al. 2001).

Or, notre équipe a montré que l'activation de WIP1 dans le cas de tumeurs P53-négatives permettait de sensibiliser les cellules cancéreuses au traitement, mais également en même temps de protéger les cellules saines des effets secondaires de la chimiothérapie, en provoquant dans les tumeurs une apoptose caspase-3-dépendante et en inhibant dans les tissus sains l'apoptose contrôlée par P53 (Goloudina, Mazur et al. 2012, Goloudina, Tanoue et al. 2012). C'est pourquoi l'activation de WIP1, qui permet ces actions à deux niveaux, est une nouvelle stratégie thérapeutique intéressante, dans l'objectif d'un traitement efficace dans le

cas de mutations de P53 mais prenant aussi en grande considération le besoin d'amélioration de la qualité de vie du patient lorsqu'il subit les traitements anti-cancer.

Afin de potentialiser l'effet protecteur de la surexpression de la phosphatase WIP1, l'optimisation des doses de chimiothérapie utilisées est nécessaire. Moins la quantité de drogue administrée est importante, moindres seront les effets secondaires. C'est dans cette optique, ainsi que dans celle d'augmenter son effet potentialisant lors du traitement des cellules cancéreuses qu'un criblage à haut débit du kinome humain a été réalisé. Le but de ce criblage était de pouvoir mettre en évidence les kinases dont l'inhibition dans les cellules P53-négatives pourrait à la fois diminuer la phosphorylation de H2AX induite par le cisplatine et en même temps augmenter leur sensibilité à la chimiothérapie, pour *in fine* pouvoir en diminuer les doses administrées tout en conservant une bonne efficacité cytotoxique envers les cellules tumorales. L'histone H2AX a été décrite dans de nombreux articles comme étant un substrat de l'activité enzymatique de WIP1 (Shreeram, Demidov et al. 2006, Cha, Lowe et al. 2010, Moon, Lin et al. 2010, Moon, Nguyen et al. 2010, Oh, Bustin et al. 2011). C'est pourquoi identifier des kinases qui régulent négativement la voie de signalisation de WIP1 permettrait en jouant sur leur niveau d'expression d'augmenter l'activité de WIP1 et ainsi réduire le signal de dommage à l'ADN qu'est la phosphorylation de H2AX mais également de potentialiser la stratégie thérapeutique basée sur la surexpression de WIP1 dans les cellules P53-négatives et de restaurer plus efficacement leur sensibilité envers les agents chimiothérapeutiques. Récemment, Choi *et al* ont montré que la kinase HIPK2, en conditions normales, phosphoryle constitutivement WIP1 qui est maintenue à un niveau bas par dégradation protéasomale, alors qu'en conditions de stress comme un dommage à l'ADN, WIP1 se dissocie de HIPK2 et est stabilisée (Choi, Na et al. 2013). Nous avons pu confirmer les données de ce groupe, en démontrant que la kinase HIPK2 impacte la phosphorylation de H2AX d'une manière dépendante de WIP1, et que sa déplétion restaure l'activité de la phosphatase. En effet, nous avons pu observer de la même manière que *via* une surexpression de WIP1, une augmentation de la sensibilité des cellules P53-négatives Saos2 au CDDP après inhibition de HIPK2.

Cette confirmation de l'action de HIPK2 sur WIP1 a démontré la robustesse du principe d'utiliser la phosphorylation de H2AX comme marqueur de l'activité de WIP1 afin de cribler le kinome humain et de chercher des kinases pouvant interagir avec la voie de signalisation de WIP1. Ainsi, la kinase WEE1 a été un autre résultat de ce criblage. Elle a été décrite au début

des années 1990 comme agissant sur le point de contrôle G2 du cycle cellulaire en phosphorylant CDC2 (McGowan and Russell 1993), mais n'a jamais été décrite comme affectant directement la phosphorylation de H2AX. Nous avons pu montrer que l'inhibition de la kinase WEE1 permet de potentialiser la stratégie basée sur la surexpression de WIP1 afin de restaurer l'efficacité de la chimiothérapie dans les cellules P53-négatives, tout en diminuant la phosphorylation de l'histone H2AX suite à un traitement des cellules au cisplatine. Grâce à la potentialisation de cette stratégie, nous avons pu réduire la concentration de chimiothérapie utilisée. Ainsi, nous avons atteint des niveaux similaires de cytotoxicité envers les cellules cancéreuses quand nous les avons traitées avec 15 μ M de CDDP, en surexprimant WIP1 et en inhibant WEE1 grâce à 75 nM de MK-1775 que lors de l'utilisation de 25 μ M de CDDP uniquement en surexprimant WIP1. Cela correspond à une diminution de 40% de la quantité de cisplatine utilisée tout en conservant la même activité cytotoxique du traitement. Diminuer la quantité de cisplatine est un atout majeur dans le challenge que représente la minimisation des effets secondaires lors d'une chimiothérapie. De plus, moins de drogue va également renforcer l'effet protecteur qu'apporte la surexpression de WIP1 dans les cellules saines.

La très faible concentration de MK-1775, non toxique en elle-même, que nous avons utilisée n'est suffisante que pour inhiber environ 50% de l'activité enzymatique de la kinase WEE1, détectée en mesurant la quantité de phosphorylation sur la tyrosine 15 de CDC2 (Hirai, Iwasawa et al. 2009). A cette concentration, nous avons montré en étudiant la phosphorylation du marqueur mitotique H3 que le point de contrôle G2 du cycle cellulaire était préservé et que les cellules s'accumulent en phase S suite à un traitement avec du cisplatine. Ce phénomène induit par cette drogue dans les cellules P53-négatives avait déjà été mis en évidence par notre équipe dans le cadre de la stratégie basée sur l'expression de WIP1 (Goloudina, Tanoue et al. 2012). Notre hypothèse est que la mort cellulaire induite par cette stratégie thérapeutique combinant cisplatine, WIP1 et inhibition de WEE1 est différente d'une catastrophe mitotique, comme nous l'avons prouvé en montrant l'élévation des niveaux de caspase-3 active dans la population cellulaire en phase S, et qu'elle se produit spécifiquement à ce moment du cycle cellulaire. La faible concentration de MK-1775 que nous avons utilisée présente également l'avantage de ne pas être suffisante pour induire une activité en tant que simple agent chimiothérapeutique. En effet, à de hautes concentrations,

il a été proposé que le MK-1775 puisse induire des dommages à l'ADN par lui-même et provoquer la mort cellulaire par un mécanisme autre qu'une catastrophe mitotique, ce qui avait été l'idée première derrière les essais cliniques pour son utilisation (Do, Doroshow et al. 2013). Or, notre stratégie basée sur la surexpression de WIP1 vise à sensibiliser les cellules résistantes à la chimiothérapie afin de permettre l'emploi de doses plus faibles de drogues, tout en n'augmentant pas le signal de dommage à l'ADN, d'où l'importance de conserver un faible taux de phosphorylation de H2AX et de limiter les concentrations des molécules utilisées. Ainsi, nous avons montré que le MK-1775 permettait d'activer la voie de signalisation de WIP1 via la dérégulation de la kinase HIPK2.

Les données obtenues montrent donc un effet bénéfique à l'utilisation d'une stratégie basée sur la surexpression de WIP1 dans le cas de cancers P53-négatifs, comme il a été montré que l'inhibition de WIP1 pouvait être bénéfique dans le cas où P53 sauvage est toujours présente dans les tumeurs (Clausse, Goloudina et al. 2016). Le fait que la stratégie d'inhibition de WIP1 dépende du statut de P53 a été confirmé par l'analyse bio-informatique de données génétiques de patients atteints de cancers colorectaux. En effet, nous avons ainsi montré que l'expression de *PPM1D* est corrélée à un mauvais pronostic quand l'activité de P53 est conservée au sein des tumeurs, alors que l'expression de ce gène codant pour WIP1 entraîne un meilleur pronostic lorsque P53 est mutée. Ces données valident l'intérêt qu'il y a à développer à la fois des inhibiteurs et des activateurs de WIP1. C'est pourquoi nous avons cherché à déterminer des molécules chimiques qui pourraient activer la transcription de WIP1 et par voie de conséquence augmenter la quantité de phosphatase présente au sein de cellules dépourvues de P53 et traitées par cette molécule. Pour réaliser cet objectif nous avons conçu un outil grâce à la technologie TALEN, ce qui a permis d'insérer dans les cellules Saos2 P53-négatives un gène rapporteur, ici la luciférase, sous le contrôle du promoteur de WIP1. Cette méthode nous a permis de tester un grand nombre de molécules, que nous avons choisies parmi une banque déjà approuvée par la FDA. Parmi les composés que nous avons testés, un est sorti du lot de par sa capacité à augmenter bien plus que les autres le signal de luminescence émis (d'un facteur 10), synonyme d'activation du promoteur de WIP1. Il s'agit du Vorinostat, aussi connu sous le nom SAHA pour *suberoylanilide hydroxamic acid*. C'est un inhibiteur des HDAC en essai clinique dans le traitement de plusieurs types de tumeurs, et validé pour le traitement des lymphomes cutanés à cellules T. Il a été montré qu'en

monothérapie, le Vorinostat est actif à la fois dans des tumeurs hématologiques et solides, et que ses effets anti-prolifératifs sont dus à l'accumulation de protéines acétylées suite à l'inhibition des HDAC. Le Vorinostat a été rapporté comme induisant l'acétylation de nombreux facteurs de transcription, comme E2F-1, YY1, SMAD7, EKLF, P53, BCL-6, HIF-1, NF-Y, NF-κB et GATA-1 (Richon 2006). Nos données montrent qu'il pourrait donc agir sur un facteur induisant la transcription de *PPM1D* en absence de p53. Il pourrait s'agir du facteur de transcription NF-κB cité précédemment. En effet il a été décrit que ce dernier régule positivement l'expression de WIP1 (Lowe, Cha et al. 2010). Nous avons pu vérifier l'action du Vorinostat sur l'expression de WIP1 également au niveau protéique. WIP1 étant dégradée au niveau protéasomal (Choi, Na et al. 2013), il est logique que nous ayons pu mieux apprécier son induction *in vitro* par le Vorinostat en combinant le traitement avec un inhibiteur du protéasome, ici le MG132. Ainsi, un traitement combinant chimiothérapie, induction de WIP1 par le Vorinostat, et inhibition de WEE1 par le MK-1775, lui aussi en essai clinique, pourrait être une stratégie efficace dans le traitement des cancers P53-négatifs, habituellement résistants aux thérapies usuelles.

Conclusion et Perspectives

La fréquence des mutations de P53 dans les cancers humains démontre l'importance de ce suppresseur de tumeur dans le processus de tumorigénèse. Ainsi, P53 est mutée dans les tumeurs de plus d'un patient sur deux, or les mutations impactant l'activité de P53 sont souvent synonymes de résistance aux traitements. De nombreuses études ont montré que l'inhibition de la phosphatase WIP1 était une stratégie viable lors du traitement des tumeurs dans lesquelles l'activité de P53 est intacte. Cependant, lorsque des mutations la rendent inactive, c'est l'activation de WIP1 et non plus son inhibition qui permet de sensibiliser les cellules tumorales à la chimiothérapie. WIP1 est connue pour réguler négativement P53 en la déphosphorylant sur sa sérine 15. C'est la raison pour laquelle une activation transitoire de WIP1 dans les cellules normales permet également de les protéger de l'apoptose induite par P53 lors des traitements anti-cancer, et donc de limiter les effets secondaires touchant les tissus sains. La voie de signalisation des dommages à l'ADN, dont P53 et WIP1 sont des acteurs majeurs, est complexe, et notre équipe a émis l'hypothèse qu'une kinase pouvait être responsable de la modulation du niveau d'expression de WIP1, et donc que contrôler l'expression de cette kinase pourrait permettre de potentialiser la stratégie thérapeutique basée sur la surexpression de WIP1. Un criblage de l'intégralité du kinome humain a permis de mettre en évidence la kinase WEE1, dont l'inhibition permet de diminuer la phosphorylation de H2AX suite à un dommage à l'ADN induit par le cisplatine, synonyme d'activation de WIP1. L'inhibition de WEE1 grâce à son inhibiteur MK-1775 a permis de potentialiser la mort cellulaire induite par la chimiothérapie dépendante de l'activité de WIP1 dans les cellules P53-négatives Saos2. La combinaison de cisplatine, MK-1775 et surexpression de WIP1 piège les cellules en phase S du cycle cellulaire et entraîne une apoptose caspase-3-dépendante, corrélée à la production de superoxydes mitochondriaux. Nous avons montré que l'inhibition de WEE1 permet de moduler les niveaux d'expression de WIP1 en dérégulant HIPK2, une kinase connue pour cibler WIP1 et entraîner sa dégradation protéasomale. Grâce à l'inhibition de WEE1 par le MK-1775, nous avons pu réduire de 40% la concentration effectrice de cisplatine tout en conservant des niveaux de cytotoxicité équivalents à ceux obtenus sans l'inhibition de WEE1. De plus, des souris sauvages et transgéniques exprimant WIP1 de manière constitutive ont montré que l'administration de MK-1775 n'empêche pas l'effet protecteur envers les tissus sains résultant de la surexpression de WIP1 lors d'un traitement au cisplatine. Afin d'envisager de vérifier à terme l'efficacité de cette stratégie en clinique, il était indispensable de découvrir une molécule qui, administrée conjointement à la

chimiothérapie, pourrait induire l'expression de WIP1. La mise au point d'un outil de criblage à haut débit a permis de découvrir qu'un traitement avec le Vorinostat, ou SAHA, induit l'expression de WIP1 dans des cellules de cancer du sein où P53 est mutée et non fonctionnelle. Le Vorinostat, déjà utilisé en clinique dans le traitement d'autres types de tumeurs, pourrait ainsi être un candidat idéal à un traitement combinatoire mêlant chimiothérapie et inhibition de WEE1 par le MK-1775. La stratégie basée sur l'expression de WIP1 dans les tumeurs P53-négatives est une nouvelle approche thérapeutique prometteuse de ce type de tumeurs, et les résultats obtenus ont montré que le développement d'activateurs de WIP1 était aussi important que le développement d'inhibiteurs de cette phosphatase dans le cas de tumeurs dans lesquelles l'activité de P53 reste normale.

Cependant, d'autres pistes sont à explorer afin d'approfondir notre connaissance du mécanisme responsable de l'efficacité de cette stratégie, et peut-être de découvrir de meilleurs activateurs de WIP1. Ainsi, notre équipe est en collaboration avec le *National Cancer Institute* et le *National Center for Advancing Translational Sciences (National Institutes of Health, Bethesda, USA)*. Ces instituts réalisent des criblages à haut débit sur plusieurs centaines de milliers de molécules chimiques afin de découvrir des activateurs et inhibiteurs de WIP1, et cela nous permettra de tester de nouveaux candidats pouvant permettre sa surexpression. Nous chercherons également à confirmer l'action du Vorinostat dans d'autres lignées cellulaires, et comparerons son effet en fonction des types de mutations de P53. Nous avons montré l'importance de la phase S du cycle cellulaire dans la mort cellulaire induite par notre stratégie dans les cellules Saos2. Une étude protéomique permettrait d'étudier l'interactome de WIP1 durant cette phase, afin de comprendre la dynamique responsable de l'apoptose des cellules à ce moment. La spectrométrie de masse permettra de définir les molécules interagissant avec WIP1 uniquement durant la phase S. Ainsi, la manipulation d'une cible potentielle de WIP1 durant cette phase pourrait être une alternative à la surexpression de cette phosphatase. Enfin, dans un modèle de xéno greffe de tumeurs P53-négatives chez la souris, nous validerons la stratégie *in vivo* en observant la croissance tumorale suite au traitement avec la triple combinaison, cisplatine, MK-1775 et Vorinostat, ou toute autre molécule potentiellement découverte entre temps et pouvant induire WIP1 d'une manière plus efficace.

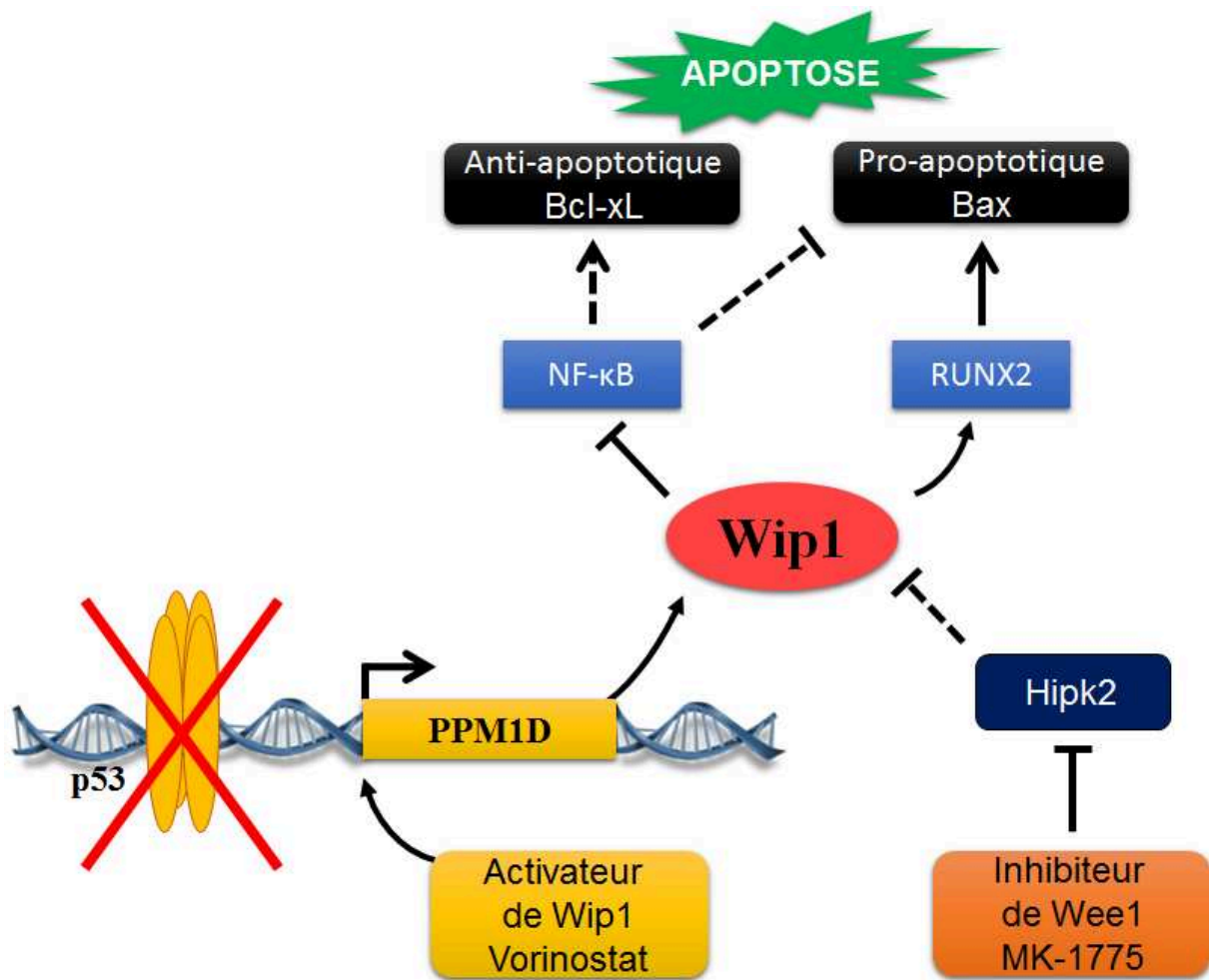


Figure 32 : Schéma récapitulatif de la stratégie thérapeutique basée sur la surexpression de Wip1 afin de restaurer l'efficacité de la chimiothérapie dans les cellules p53-négatives, exemple de la lignée Saos2.

La balance entre diminution des niveaux des protéines anti-apoptotiques telles que BCL-XL et augmentation des niveaux des protéines pro-apoptotiques telles que BAX est responsable de l'activation de l'apoptose. Le Vorinostat induit une augmentation de l'expression du gène PPM1D et parallèlement, inhiber WEE1 avec le MK-1775 dérégule HIPK2, la kinase qui cible WIP1 pour sa dégradation protéasomale. Cela résulte en une élévation des niveaux de la protéine WIP1. Cette phosphatase est un régulateur négatif de la voie NF-κB ce qui indirectement diminuera les niveaux de la protéine anti-apoptotique BCL-XL. Elle va pouvoir également déphosphoryler RUNX2 sur sa sérine 432 ce qui permettra la transcription de BAX, restaurant l'apoptose dans les cellules P53-négatives.

Bibliographie

Aas, T., A. L. Borresen, S. Geisler, B. Smith-Sorensen, H. Johnsen, J. E. Varhaug, L. A. Akslen and P. E. Lonning (1996). "Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients." Nat Med **2**(7): 811-814.

Antoniou, A. C., S. A. Gayther, J. F. Stratton, B. A. Ponder and D. F. Easton (2000). "Risk models for familial ovarian and breast cancer." Genet Epidemiol **18**(2): 173-190.

Bang, J., H. Yamaguchi, S. R. Durell, E. Appella and D. H. Appella (2008). "A small molecular scaffold for selective inhibition of Wip1 phosphatase." ChemMedChem **3**(2): 230-232.

Barlev, N. A., L. Liu, N. H. Chehab, K. Mansfield, K. G. Harris, T. D. Halazonetis and S. L. Berger (2001). "Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases." Mol Cell **8**(6): 1243-1254.

Bartek, J. and J. Lukas (2001). "Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage." FEBS Lett **490**(3): 117-122.

Bartek, J. and J. Lukas (2007). "DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation." Curr Opin Cell Biol **19**(2): 238-245.

Benada, J. and L. Macurek (2015). "Targeting the Checkpoint to Kill Cancer Cells." Biomolecules **5**(3): 1912-1937.

Biegging, K. T., S. S. Mello and L. D. Attardi (2014). "Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression." Nat Rev Cancer **14**(5): 359-370.

Blasina, A., J. Hallin, E. Chen, M. E. Arango, E. Kraynov, J. Register, S. Grant, S. Ninkovic, P. Chen, T. Nichols, P. O'Connor and K. Anderes (2008). "Breaching the DNA damage checkpoint via PF-00477736, a novel small-molecule inhibitor of checkpoint kinase 1." Mol Cancer Ther **7**(8): 2394-2404.

Bode, A. M. and Z. Dong (2004). "Post-translational modification of p53 in tumorigenesis." Nat Rev Cancer **4**(10): 793-805.

Bode, A. M. and Z. Dong (2007). "The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer." Cancer Lett **247**(1): 26-39.

Boise, L. H., M. Gonzalez-Garcia, C. E. Postema, L. Ding, T. Lindsten, L. A. Turka, X. Mao, G. Nunez and C. B. Thompson (1993). "bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death." Cell **74**(4): 597-608.

Bouafia, A., S. Corre, D. Gilot, N. Mouchet, S. Prince and M. D. Galibert (2014). "p53 requires the stress sensor USF1 to direct appropriate cell fate decision." PLoS Genet **10**(5): e1004309.

Bouchet, B. P., C. Caron de Fromentel, A. Puisieux and C. M. Galmarini (2006). "p53 as a target for anti-cancer drug development." Crit Rev Oncol Hematol **58**(3): 190-207.

Bourdon, J. C. (2007). "p53 Family isoforms." Curr Pharm Biotechnol **8**(6): 332-336.

Bourdon, J. C., M. P. Khoury, A. Diot, L. Baker, K. Fernandes, M. Aoubala, P. Quinlan, C. A. Purdie, L. B. Jordan, A. C. Prats, D. P. Lane and A. M. Thompson (2011). "p53 mutant breast cancer patients

expressing p53gamma have as good a prognosis as wild-type p53 breast cancer patients." Breast Cancer Res **13**(1): R7.

Boutros, R., C. Dozier and B. Ducommun (2006). "The when and wheres of CDC25 phosphatases." Curr Opin Cell Biol **18**(2): 185-191.

Bray, F. and B. Moller (2006). "Predicting the future burden of cancer." Nat Rev Cancer **6**(1): 63-74.

Breen, L., M. Heenan, V. Amberger-Murphy and M. Clynes (2007). "Investigation of the role of p53 in chemotherapy resistance of lung cancer cell lines." Anticancer Res **27**(3A): 1361-1364.

Brewer, J. R., G. Morrison, M. E. Dolan and G. F. Fleming (2016). "Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Current status and progress." Gynecol Oncol **140**(1): 176-183.

Bridges, C. (1922). "The origin of variation." Amer Nat **56**: 51-63.

Bucher, N. and C. D. Britten (2008). "G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer." Br J Cancer **98**(3): 523-528.

Bulavin, D. V., O. N. Demidov, S. Saito, P. Kauraniemi, C. Phillips, S. A. Amundson, C. Ambrosino, G. Sauter, A. R. Nebreda, C. W. Anderson, A. Kallioniemi, A. J. Fornace, Jr. and E. Appella (2002). "Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity." Nat Genet **31**(2): 210-215.

Bulavin, D. V., C. Phillips, B. Nannenga, O. Timofeev, L. A. Donehower, C. W. Anderson, E. Appella and A. J. Fornace, Jr. (2004). "Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway." Nat Genet **36**(4): 343-350.

Bunch, R. T. and A. Eastman (1996). "Enhancement of cisplatin-induced cytotoxicity by 7-hydroxystaurosporine (UCN-01), a new G2-checkpoint inhibitor." Clin Cancer Res **2**(5): 791-797.

Bunz, F., A. Dutriaux, C. Lengauer, T. Waldman, S. Zhou, J. P. Brown, J. M. Sedivy, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1998). "Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage." Science **282**(5393): 1497-1501.

Busino, L., M. Chiesa, G. F. Draetta and M. Donzelli (2004). "Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis." Oncogene **23**(11): 2050-2056.

Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 729-740.

Cen, L., B. L. Carlson, M. A. Schroeder, J. L. Ostrem, G. J. Kitange, A. C. Mladek, S. R. Fink, P. A. Decker, W. Wu, J. S. Kim, T. Waldman, R. B. Jenkins and J. N. Sarkaria (2012). "p16-Cdk4-Rb axis controls sensitivity to a cyclin-dependent kinase inhibitor PD0332991 in glioblastoma xenograft cells." Neuro Oncol **14**(7): 870-881.

Cha, H., J. M. Lowe, H. Li, J. S. Lee, G. I. Belova, D. V. Bulavin and A. J. Fornace, Jr. (2010). "Wip1 directly dephosphorylates gamma-H2AX and attenuates the DNA damage response." Cancer Res **70**(10): 4112-4122.

Chan, W. M., W. Y. Siu, A. Lau and R. Y. C. Poon (2004). "How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer?" Molecular and Cellular Biology **24**(8): 3536-3551.

Chen, T., P. A. Stephens, F. K. Middleton and N. J. Curtin (2012). "Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer." Drug Discov Today **17**(5-6): 194-202.

Cheok, C. F., N. Kua, P. Kaldis and D. P. Lane (2010). "Combination of nutlin-3 and VX-680 selectively targets p53 mutant cells with reversible effects on cells expressing wild-type p53." Cell Death Differ **17**(9): 1486-1500.

Cheung-Ong, K., G. Giaever and C. Nislow (2013). "DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology." Chem Biol **20**(5): 648-659.

Chew, J., S. Biswas, S. Shreeram, M. Humaidi, E. T. Wong, M. K. Dhillon, H. Teo, A. Hazra, C. C. Fang, E. Lopez-Collazo, D. V. Bulavin and V. Tergaonkar (2009). "WIP1 phosphatase is a negative regulator of NF-kappaB signalling." Nat Cell Biol **11**(5): 659-666.

Choi, D. W., W. Na, M. H. Kabir, E. Yi, S. Kwon, J. Yeom, J. W. Ahn, H. H. Choi, Y. Lee, K. W. Seo, M. K. Shin, S. H. Park, H. Y. Yoo, K. Isono, H. Koseki, S. T. Kim, C. Lee, Y. K. Kwon and C. Y. Choi (2013). "WIP1, a homeostatic regulator of the DNA damage response, is targeted by HIPK2 for phosphorylation and degradation." Mol Cell **51**(3): 374-385.

Choi, J., B. Nannenga, O. N. Demidov, D. V. Bulavin, A. Cooney, C. Brayton, Y. Zhang, I. N. Mbawuiké, A. Bradley, E. Appella and L. A. Donehower (2002). "Mice deficient for the wild-type p53-induced phosphatase gene (*Wip1*) exhibit defects in reproductive organs, immune function, and cell cycle control." Mol Cell Biol **22**(4): 1094-1105.

Clausse, V., A. R. Goloudina, B. Uyanik, E. Y. Kochetkova, S. Richaud, O. A. Fedorova, A. Hammann, M. Bardou, N. A. Barlev, C. Garrido and O. N. Demidov (2016). "Wee1 inhibition potentiates Wip1-dependent p53-negative tumor cell death during chemotherapy." Cell Death Dis **7**: e2195.

Couch, F. J., S. N. Hart, P. Sharma, A. E. Toland, X. Wang, P. Miron, J. E. Olson, A. K. Godwin, V. S. Pankratz, C. Olswold, S. Slettedahl, E. Hallberg, L. Guidugli, J. I. Davila, M. W. Beckmann, W. Janni, B. Rack, A. B. Ekici, D. J. Slamon, I. Konstantopoulou, F. Fostira, A. Vratimos, G. Fountzilas, L. M. Pelttari, W. J. Tapper, L. Durcan, S. S. Cross, R. Pilarski, C. L. Shapiro, J. Klemp, S. Yao, J. Garber, A. Cox, H. Brauch, C. Ambrosone, H. Nevanlinna, D. Yannoukakos, S. L. Slager, C. M. Vachon, D. M. Eccles and P. A. Fasching (2015). "Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer." J Clin Oncol **33**(4): 304-311.

Crawford, L. V., D. C. Pim, E. G. Gurney, P. Goodfellow and J. Taylor-Papadimitriou (1981). "Detection of a common feature in several human tumor cell lines--a 53,000-dalton protein." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(1): 41-45.

Danaei, G., S. Vander Hoorn, A. D. Lopez, C. J. Murray, M. Ezzati and g. Comparative Risk Assessment collaborating (2005). "Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors." Lancet **366**(9499): 1784-1793.

De Witt Hamer, P. C., S. E. Mir, D. Noske, C. J. Van Noorden and T. Wurdinger (2011). "WEE1 kinase targeting combined with DNA-damaging cancer therapy catalyzes mitotic catastrophe." Clin Cancer Res **17**(13): 4200-4207.

Demidov, O. N., C. Kek, S. Shreeram, O. Timofeev, A. J. Fornace, E. Appella and D. V. Bulavin (2007). "The role of the MKK6/p38 MAPK pathway in Wip1-dependent regulation of ErbB2-driven mammary gland tumorigenesis." Oncogene **26**(17): 2502-2506.

Demidov, O. N., O. Timofeev, H. N. Lwin, C. Kek, E. Appella and D. V. Bulavin (2007). "Wip1 phosphatase regulates p53-dependent apoptosis of stem cells and tumorigenesis in the mouse intestine." Cell Stem Cell **1**(2): 180-190.

Demidova, A. R., M. Y. Aau, L. Zhuang and Q. Yu (2009). "Dual regulation of Cdc25A by Chk1 and p53-ATF3 in DNA replication checkpoint control." J Biol Chem **284**(7): 4132-4139.

Dent, P., Y. Tang, A. Yacoub, Y. Dai, P. B. Fisher and S. Grant (2011). "CHK1 inhibitors in combination chemotherapy: thinking beyond the cell cycle." Mol Interv **11**(2): 133-140.

Do, K., J. H. Doroshow and S. Kummar (2013). "Wee1 kinase as a target for cancer therapy." Cell Cycle **12**(19): 3159-3164.

Do, K., D. Wilsker, J. Ji, J. Zlott, T. Freshwater, R. J. Kinders, J. Collins, A. P. Chen, J. H. Doroshow and S. Kummar (2015). "Phase I Study of Single-Agent AZD1775 (MK-1775), a Wee1 Kinase Inhibitor, in Patients With Refractory Solid Tumors." J Clin Oncol **33**(30): 3409-3415.

Dominguez-Kelly, R., Y. Martin, S. Koundrioukoff, M. E. Tanenbaum, V. A. Smits, R. H. Medema, M. Debatisse and R. Freire (2011). "Wee1 controls genomic stability during replication by regulating the Mus81-Eme1 endonuclease." J Cell Biol **194**(4): 567-579.

Donehower, L. A., M. Harvey, B. L. Slagle, M. J. McArthur, C. A. Montgomery, Jr., J. S. Butel and A. Bradley (1992). "Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours." Nature **356**(6366): 215-221.

Dutt, A. and R. Beroukhim (2007). "Single nucleotide polymorphism array analysis of cancer." Curr Opin Oncol **19**(1): 43-49.

el-Deiry, W. S. (1998). "Regulation of p53 downstream genes." Semin Cancer Biol **8**(5): 345-357.

Eliseev, R. A., Y. F. Dong, E. Sampson, M. J. Zuscik, E. M. Schwarz, R. J. O'Keefe, R. N. Rosier and M. H. Drissi (2008). "Runx2-mediated activation of the Bax gene increases osteosarcoma cell sensitivity to apoptosis." Oncogene **27**(25): 3605-3614.

Emelyanov, A. and D. V. Bulavin (2015). "Wip1 phosphatase in breast cancer." Oncogene **34**(34): 4429-4438.

Fece de la Cruz, F., B. V. Gapp and S. M. Nijman (2015). "Synthetic lethal vulnerabilities of cancer." Annu Rev Pharmacol Toxicol **55**: 513-531.

Fernandez-Cuesta, L., S. Anaganti, P. Hainaut and M. Olivier (2011). "p53 status influences response to tamoxifen but not to fulvestrant in breast cancer cell lines." Int J Cancer **128**(8): 1813-1821.

Fiscella, M., H. Zhang, S. Fan, K. Sakaguchi, S. Shen, W. E. Mercer, G. F. Vande Woude, P. M. O'Connor and E. Appella (1997). "Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(12): 6048-6053.

Flaman, J. M., T. Frebourg, V. Moreau, F. Charbonnier, C. Martin, P. Chappuis, A. P. Sappino, I. M. Limacher, L. Bron, J. Benhattar and et al. (1995). "A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(9): 3963-3967.

Fokas, E., R. Prevo, J. R. Pollard, P. M. Reaper, P. Charlton, B. Cornelissen, K. Vallis, E. M. Hammond, M. M. Olcina, W. G. McKenna, R. J. Muschel and T. B. Brunner (2013). "ATR targeting by the novel inhibitor VE-822 selectively sensitizes pancreatic cancer cells and tumors to radiation and chemoradiation." Strahlentherapie Und Onkologie **189**: 41-41.

Freed-Pastor, W. A. and C. Prives (2012). "Mutant p53: one name, many proteins." Genes Dev **26**(12): 1268-1286.

Fujimoto, H., N. Onishi, N. Kato, M. Takekawa, X. Z. Xu, A. Kosugi, T. Kondo, M. Imamura, I. Oishi, A. Yoda and Y. Minami (2006). "Regulation of the antioncogenic Chk2 kinase by the oncogenic Wip1 phosphatase." Cell Death Differ **13**(7): 1170-1180.

Fuse, E., A. Hashimoto, N. Sato, H. Tanii, T. Kuwabara, S. Kobayashi and Y. Sugiyama (2000). "Physiological modeling of altered pharmacokinetics of a novel anticancer drug, UCN-01 (7-hydroxystaurosporine), caused by slow dissociation of UCN-01 from human alpha1-acid glycoprotein." Pharm Res **17**(5): 553-564.

Fuse, E., H. Tanii, N. Kurata, H. Kobayashi, Y. Shimada, T. Tamura, Y. Sasaki, Y. Tanigawara, R. D. Lush, D. Headlee, W. D. Figg, S. G. Arbuck, A. M. Senderowicz, E. A. Sausville, S. Akinaga, T. Kuwabara and S. Kobayashi (1998). "Unpredicted clinical pharmacology of UCN-01 caused by specific binding to human alpha1-acid glycoprotein." Cancer Res **58**(15): 3248-3253.

Gautschi, O., J. Heighway, P. C. Mack, P. R. Purnell, P. N. Lara, Jr. and D. R. Gandara (2008). "Aurora kinases as anticancer drug targets." Clin Cancer Res **14**(6): 1639-1648.

Gealy, R., L. Zhang, J. M. Siegfried, J. D. Luketich and P. Keohavong (1999). "Comparison of mutations in the p53 and K-ras genes in lung carcinomas from smoking and nonsmoking women." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **8**(4 Pt 1): 297-302.

Geyer, R. K., H. Nagasawa, J. B. Little and C. G. Maki (2000). "Role and regulation of p53 during an ultraviolet radiation-induced G1 cell cycle arrest." Cell Growth Differ **11**(3): 149-156.

Gilmartin, A. G., T. H. Fainig, M. Richter, A. Groy, M. A. Seefeld, M. G. Darcy, X. Peng, K. Federowicz, J. Yang, S. Y. Zhang, E. Minthorn, J. P. Jaworski, M. Schaber, S. Martens, D. E. McNulty, R. H. Sinnamon, H. Zhang, R. B. Kirkpatrick, N. Nevins, G. Cui, B. Pietrak, E. Diaz, A. Jones, M. Brandt, B. Schwartz, D. A. Heerding and R. Kumar (2014). "Allosteric Wip1 phosphatase inhibition through flap-subdomain interaction." Nat Chem Biol **10**(3): 181-187.

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

Goloudina, A. R., E. Y. Kochetkova, T. V. Pospelova and O. N. Demidov (2016). "Wip1 phosphatase: between p53 and MAPK kinases pathways." Oncotarget **7**(21): 31563-31571.

Goloudina, A. R., S. J. Mazur, E. Appella, C. Garrido and O. N. Demidov (2012). "Wip1 sensitizes p53-negative tumors to apoptosis by regulating the Bax/Bcl-xL ratio." Cell Cycle **11**(10): 1883-1887.

Goloudina, A. R., K. Tanoue, A. Hammann, E. Fourmaux, X. Le Guezennec, D. V. Bulavin, S. J. Mazur, E. Appella, C. Garrido and O. N. Demidov (2012). "Wip1 promotes RUNX2-dependent apoptosis in p53-negative tumors and protects normal tissues during treatment with anticancer agents." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(2): E68-75.

Greenow, K. R., A. R. Clarke and R. H. Jones (2009). "Chk1 deficiency in the mouse small intestine results in p53-independent crypt death and subsequent intestinal compensation." Oncogene **28**(11): 1443-1453.

Gu, B. and W. G. Zhu (2012). "Surf the post-translational modification network of p53 regulation." Int J Biol Sci **8**(5): 672-684.

Hai, J., S. Sakashita, G. Allo, O. Ludkovski, C. Ng, F. A. Shepherd and M. S. Tsao (2015). "Inhibiting MDM2-p53 Interaction Suppresses Tumor Growth in Patient-Derived Non-Small Cell Lung Cancer Xenograft Models." J Thorac Oncol **10**(8): 1172-1180.

Haigis, K. M. and A. Sweet-Cordero (2011). "New insights into oncogenic stress." Nat Genet **43**(3): 177-178.

Han, H. S., E. Yu, J. Y. Song, J. Y. Park, S. J. Jang and J. Choi (2009). "The estrogen receptor alpha pathway induces oncogenic Wip1 phosphatase gene expression." Mol Cancer Res **7**(5): 713-723.

Hanigan, M. H. and P. Devarajan (2003). "Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms." Cancer Ther **1**: 47-61.

Harris, S. L. and A. J. Levine (2005). "The p53 pathway: positive and negative feedback loops." Oncogene **24**(17): 2899-2908.

Haupt, S., M. Berger, Z. Goldberg and Y. Haupt (2003). "Apoptosis - the p53 network." J Cell Sci **116**(Pt 20): 4077-4085.

Hemann, M. T. and S. W. Lowe (2006). "The p53-Bcl-2 connection." Cell Death Differ **13**(8): 1256-1259.

Hirai, H., Y. Iwasawa, M. Okada, T. Arai, T. Nishibata, M. Kobayashi, T. Kimura, N. Kaneko, J. Ohtani, K. Yamanaka, H. Itadani, I. Takahashi-Suzuki, K. Fukasawa, H. Oki, T. Nambu, J. Jiang, T. Sakai, H. Arakawa, T. Sakamoto, T. Sagara, T. Yoshizumi, S. Mizuarai and H. Kotani (2009). "Small-molecule inhibition of Wee1 kinase by MK-1775 selectively sensitizes p53-deficient tumor cells to DNA-damaging agents." Mol Cancer Ther **8**(11): 2992-3000.

Hirao, A., Y. Y. Kong, S. Matsuoka, A. Wakeham, J. Ruland, H. Yoshida, D. Liu, S. J. Elledge and T. W. Mak (2000). "DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2." Science **287**(5459): 1824-1827.

Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein and C. C. Harris (1991). "p53 mutations in human cancers." Science **253**(5015): 49-53.

Hu, W. (2009). "The role of p53 gene family in reproduction." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(6): a001073.

Iorns, E., C. J. Lord, A. Grigoriadis, S. McDonald, K. Fenwick, A. Mackay, C. A. Mein, R. Natrajan, K. Savage, N. Tamber, J. S. Reis-Filho, N. C. Turner and A. Ashworth (2009). "Integrated functional, gene expression and genomic analysis for the identification of cancer targets." PLoS One **4**(4): e5120.

Ito, Y. (2008). "RUNX genes in development and cancer: regulation of viral gene expression and the discovery of RUNX family genes." Adv Cancer Res **99**: 33-76.

Jackson, S. P. and J. Bartek (2009). "The DNA-damage response in human biology and disease." Nature **461**(7267): 1071-1078.

Joerger, A. C. and A. R. Fersht (2008). "Structural biology of the tumor suppressor p53." Annu Rev Biochem **77**: 557-582.

Joerger, A. C. and A. R. Fersht (2010). "The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(6): a000919.

Jordan, J. J., A. Inga, K. Conway, S. Edmiston, L. A. Carey, L. Wu and M. A. Resnick (2010). "Altered-function p53 missense mutations identified in breast cancers can have subtle effects on transactivation." Mol Cancer Res **8**(5): 701-716.

Juan, L. J., W. J. Shia, M. H. Chen, W. M. Yang, E. Seto, Y. S. Lin and C. W. Wu (2000). "Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation." J Biol Chem **275**(27): 20436-20443.

Kandioler-Eckersberger, D., C. Ludwig, M. Rudas, S. Kappel, E. Janschek, C. Wenzel, H. Schlagbauer-Wadl, M. Mittlbock, M. Gnant, G. Steger and R. Jakesz (2000). "TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients." Clin Cancer Res **6**(1): 50-56.

Karp, J. E., B. M. Thomas, J. M. Greer, C. Sorge, S. D. Gore, K. W. Pratz, B. D. Smith, K. S. Flatten, K. Peterson, P. Schneider, K. Mackey, T. Freshwater, M. J. Levis, M. A. McDevitt, H. E. Carraway, D. E. Gladstone, M. M. Showel, S. Loechner, D. A. Parry, J. A. Horowitz, R. Isaacs and S. H. Kaufmann (2012). "Phase I and pharmacologic trial of cytosine arabinoside with the selective checkpoint 1 inhibitor Sch 900776 in refractory acute leukemias." Clin Cancer Res **18**(24): 6723-6731.

Kastan, M. B. and J. Bartek (2004). "Cell-cycle checkpoints and cancer." Nature **432**(7015): 316-323.

Kawabe, T. (2004). "G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs." Mol Cancer Ther **3**(4): 513-519.

Khoo, K. H., C. S. Verma and D. P. Lane (2014). "Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy." Nat Rev Drug Discov **13**(3): 217-236.

Khoshnan, A., C. Tindell, I. Laux, D. Bae, B. Bennett and A. E. Nel (2000). "The NF-kappa B cascade is important in Bcl-xL expression and for the anti-apoptotic effects of the CD28 receptor in primary human CD4+ lymphocytes." J Immunol **165**(4): 1743-1754.

Komarov, P. G., E. A. Komarova, R. V. Kondratov, K. Christov-Tselkov, J. S. Coon, M. V. Chernov and A. V. Gudkov (1999). "A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy." Science **285**(5434): 1733-1737.

Kreahling, J. M., J. Y. Gemmer, D. Reed, D. Letson, M. Bui and S. Altiock (2012). "MK1775, a selective Wee1 inhibitor, shows single-agent antitumor activity against sarcoma cells." Mol Cancer Ther **11**(1): 174-182.

Kruse, J. P. and W. Gu (2009). "Modes of p53 regulation." Cell **137**(4): 609-622.

Lane, D. P. (1992). "Cancer. p53, guardian of the genome." Nature **358**(6381): 15-16.

Lane, D. P. and L. V. Crawford (1979). "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells." Nature **278**(5701): 261-263.

Lau, C. C. and A. B. Pardee (1982). "Mechanism by which caffeine potentiates lethality of nitrogen mustard." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(9): 2942-2946.

Lea, I. A., M. A. Jackson, X. Li, S. Bailey, S. D. Peddada and J. K. Dunnick (2007). "Genetic pathways and mutation profiles of human cancers: site- and exposure-specific patterns." Carcinogenesis **28**(9): 1851-1858.

Levine, A. J., R. Tomasini, F. D. McKeon, T. W. Mak and G. Melino (2011). "The p53 family: guardians of maternal reproduction." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(4): 259-265.

Li, R., P. D. Sutphin, D. Schwartz, D. Matas, N. Almog, R. Wolkowicz, N. Goldfinger, H. Pei, M. Prokocimer and V. Rotter (1998). "Mutant p53 protein expression interferes with p53-independent apoptotic pathways." Oncogene **16**(25): 3269-3277.

Li, S., T. Jiang, G. Li and Z. Wang (2008). "Impact of p53 status to response of temozolomide in low MGMT expression glioblastomas: preliminary results." Neurol Res **30**(6): 567-570.

Li, Y. F., D. D. Wang, B. W. Zhao, W. Wang, C. Y. Huang, Y. M. Chen, Y. Zheng, R. P. Keshari, J. C. Xia and Z. W. Zhou (2012). "High level of COP1 expression is associated with poor prognosis in primary gastric cancer." Int J Biol Sci **8**(8): 1168-1177.

Lian, J. B., A. Javed, S. K. Zaidi, C. Lengner, M. Montecino, A. J. van Wijnen, J. L. Stein and G. S. Stein (2004). "Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **14**(1-2): 1-41.

Liang, S. H. and M. F. Clarke (2001). "Regulation of p53 localization." Eur J Biochem **268**(10): 2779-2783.

Lin, C., H. L. Ng, W. Pan, H. Chen, G. Zhang, Z. Bian, A. Lu and Z. Yang (2015). "Exploring Different Strategies for Efficient Delivery of Colorectal Cancer Therapy." Int J Mol Sci **16**(11): 26936-26952.

Lowe, J. M., H. Cha, Q. Yang and A. J. Fornace, Jr. (2010). "Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) is a novel positive transcriptional regulator of the oncogenic Wip1 phosphatase." J Biol Chem **285**(8): 5249-5257.

Lu, X., O. Ma, T. A. Nguyen, S. N. Jones, M. Oren and L. A. Donehower (2007). "The Wip1 Phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop." Cancer Cell **12**(4): 342-354.

Lu, X., B. Nannenga and L. A. Donehower (2005). "PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints." Genes Dev **19**(10): 1162-1174.

Lu, X., T. A. Nguyen, S. H. Moon, Y. Darlington, M. Sommer and L. A. Donehower (2008). "The type 2C phosphatase Wip1: an oncogenic regulator of tumor suppressor and DNA damage response pathways." Cancer Metastasis Rev **27**(2): 123-135.

Lucchesi, C., J. Zhang and X. Chen (2016). "Modulation of the p53 family network by RNA-binding proteins." Transl Cancer Res **5**(6): 676-684.

Macurek, L., A. Lindqvist, O. Voets, J. Kool, H. R. Vos and R. H. Medema (2010). "Wip1 phosphatase is associated with chromatin and dephosphorylates gammaH2AX to promote checkpoint inhibition." Oncogene **29**(15): 2281-2291.

Marinari, B., A. Costanzo, V. Marzano, E. Piccolella and L. Tuosto (2004). "CD28 delivers a unique signal leading to the selective recruitment of RelA and p52 NF-kappaB subunits on IL-8 and Bcl-xL gene promoters." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(16): 6098-6103.

Martin, Y., R. Dominguez-Kelly and R. Freire (2011). "Novel insights into maintaining genomic integrity: Wee1 regulating Mus81/Eme1." Cell Div **6**: 21.

Masaki, T., Y. Shiratori, W. Rengifo, K. Igarashi, M. Yamagata, K. Kurokohchi, N. Uchida, Y. Miyauchi, H. Yoshiji, S. Watanabe, M. Omata and S. Kuriyama (2003). "Cyclins and cyclin-dependent kinases: comparative study of hepatocellular carcinoma versus cirrhosis." Hepatology **37**(3): 534-543.

Massague, J. (2004). "G1 cell-cycle control and cancer." Nature **432**(7015): 298-306.

Matthews, D. J., F. M. Yakes, J. Chen, M. Tadano, L. Bornheim, D. O. Clary, A. Tai, J. M. Wagner, N. Miller, Y. D. Kim, S. Robertson, L. Murray and L. M. Karnitz (2007). "Pharmacological abrogation of S-phase checkpoint enhances the anti-tumor activity of gemcitabine in vivo." Cell Cycle **6**(1): 104-110.

McGowan, C. H. and P. Russell (1993). "Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15." EMBO J **12**(1): 75-85.

Miller, L. D., J. Smeds, J. George, V. B. Vega, L. Vergara, A. Ploner, Y. Pawitan, P. Hall, S. Klaar, E. T. Liu and J. Bergh (2005). "An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(38): 13550-13555.

Mir, S. E., P. C. De Witt Hamer, P. M. Krawczyk, L. Balaj, A. Claes, J. M. Niers, A. A. Van Tilborg, A. H. Zwinderman, D. Geerts, G. J. Kaspers, W. Peter Vandertop, J. Cloos, B. A. Tannous, P. Wesseling, J. A. Aten, D. P. Noske, C. J. Van Noorden and T. Wurdinger (2010). "In silico analysis of kinase expression identifies WEE1 as a gatekeeper against mitotic catastrophe in glioblastoma." Cancer Cell **18**(3): 244-257.

Molchadsky, A., N. Rivlin, R. Brosh, V. Rotter and R. Sarig (2010). "p53 is balancing development, differentiation and de-differentiation to assure cancer prevention." Carcinogenesis **31**(9): 1501-1508.

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

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

Mombach, J. C., C. A. Bugs and C. Chaouiya (2014). "Modelling the onset of senescence at the G1/S cell cycle checkpoint." *BMC Genomics* **15 Suppl 7**: S7.

Moon, S. H., L. Lin, X. Zhang, T. A. Nguyen, Y. Darlington, A. S. Waldman, X. Lu and L. A. Donehower (2010). "Wild-type p53-induced phosphatase 1 dephosphorylates histone variant gamma-H2AX and suppresses DNA double strand break repair." *J Biol Chem* **285**(17): 12935-12947.

Moon, S. H., T. A. Nguyen, Y. Darlington, X. Lu and L. A. Donehower (2010). "Dephosphorylation of gamma-H2AX by WIP1: an important homeostatic regulatory event in DNA repair and cell cycle control." *Cell Cycle* **9**(11): 2092-2096.

Muchmore, S. W., M. Sattler, H. Liang, R. P. Meadows, J. E. Harlan, H. S. Yoon, D. Nettesheim, B. S. Chang, C. B. Thompson, S. L. Wong, S. L. Ng and S. W. Fesik (1996). "X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death." *Nature* **381**(6580): 335-341.

Muller, P. A. J. and K. H. Vousden (2013). "p53 mutations in cancer." *Nature Cell Biology* **15**(1): 2-8.

Muret, J., M. Yacoub, P. Terrier, F. Drusch, A. Laplanche, C. Gaudin, C. Richon, C. Le Pechoux, A. Le Cesne, F. J. Lejeune, T. Tursz, P. Fouret, S. Bonvalot and S. Chouaib (2008). "p53 status correlates with histopathological response in patients with soft tissue sarcomas treated using isolated limb perfusion with TNF-alpha and melphalan." *Ann Oncol* **19**(4): 793-800.

Nicolai, S., A. Rossi, N. Di Daniele, G. Melino, M. Annicchiarico-Petruzzelli and G. Raschella (2015). "DNA repair and aging: the impact of the p53 family." *Aging (Albany NY)* **7**(12): 1050-1065.

Nijman, S. M. (2011). "Synthetic lethality: general principles, utility and detection using genetic screens in human cells." *FEBS Lett* **585**(1): 1-6.

Nurse, P. and P. Thuriaux (1980). "Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *Genetics* **96**(3): 627-637.

Oh, K. S., M. Bustin, S. J. Mazur, E. Appella and K. H. Kraemer (2011). "UV-induced histone H2AX phosphorylation and DNA damage related proteins accumulate and persist in nucleotide excision repair-deficient XP-B cells." *DNA Repair (Amst)* **10**(1): 5-15.

Olivier, M., M. Hollstein and P. Hainaut (2010). "TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(1): a001008.

Omura-Minamisawa, M., M. B. Diccianni, R. C. Chang, A. Batova, L. J. Bridgeman, J. Schiff, S. L. Cohn, W. B. London and A. L. Yu (2001). "p16/p14(ARF) cell cycle regulatory pathways in primary neuroblastoma: p16 expression is associated with advanced stage disease." *Clin Cancer Res* **7**(11): 3481-3490.

Onodera, Y., Y. Miki, T. Suzuki, K. Takagi, J. Akahira, T. Sakyu, M. Watanabe, S. Inoue, T. Ishida, N. Ohuchi and H. Sasano (2010). "Runx2 in human breast carcinoma: its potential roles in cancer progression." *Cancer Sci* **101**(12): 2670-2675.

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

Oren, M. and V. Rotter (2010). "Mutant p53 gain-of-function in cancer." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(2): a001107.

Osman, A. A., M. M. Monroe, M. V. Ortega Alves, A. A. Patel, P. Katsonis, A. L. Fitzgerald, D. M. Neskey, M. J. Frederick, S. H. Woo, C. Caulin, T. K. Hsu, T. O. McDonald, M. Kimmel, R. E. Meyn, O. Lichtarge and J. N. Myers (2015). "Wee-1 kinase inhibition overcomes cisplatin resistance associated with high-risk TP53 mutations in head and neck cancer through mitotic arrest followed by senescence." Mol Cancer Ther **14**(2): 608-619.

Pabla, N. and Z. Dong (2012). "Curtailing side effects in chemotherapy: a tale of PKCdelta in cisplatin treatment." Oncotarget **3**(1): 107-111.

Pabla, N., S. Huang, Q. S. Mi, R. Daniel and Z. Dong (2008). "ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis." J Biol Chem **283**(10): 6572-6583.

Parker, L. L. and H. Piwnica-Worms (1992). "Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase." Science **257**(5078): 1955-1957.

Petitjean, A., E. Mathe, S. Kato, C. Ishioka, S. V. Tavtigian, P. Hainaut and M. Olivier (2007). "Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database." Hum Mutat **28**(6): 622-629.

Podhorecka, M., A. Skladanowski and P. Bozko (2010). "H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy." J Nucleic Acids **2010**.

Rayter, S., R. Elliott, J. Travers, M. G. Rowlands, T. B. Richardson, K. Boxall, K. Jones, S. Linardopoulos, P. Workman, W. Aherne, C. J. Lord and A. Ashworth (2008). "A chemical inhibitor of PPM1D that selectively kills cells overexpressing PPM1D." Oncogene **27**(8): 1036-1044.

Reis, A. H., F. R. Vargas and B. Lemos (2016). "Biomarkers of genome instability and cancer epigenetics." Tumour Biol.

Reles, A., W. H. Wen, A. Schmider, C. Gee, I. B. Runnebaum, U. Kilian, L. A. Jones, A. El-Naggar, C. Minguillon, I. Schonborn, O. Reich, R. Kreienberg, W. Lichtenegger and M. F. Press (2001). "Correlation of p53 mutations with resistance to platinum-based chemotherapy and shortened survival in ovarian cancer." Clin Cancer Res **7**(10): 2984-2997.

Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, E. Pilozzi, M. Biffoni, M. Todaro, C. Peschle and R. De Maria (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." Nature **445**(7123): 111-115.

Richon, V. M. (2006). "Cancer biology: mechanism of antitumour action of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid), a novel histone deacetylase inhibitor." British Journal of Cancer **95**: S2-S6.

Riley, T., E. Sontag, P. Chen and A. Levine (2008). "Transcriptional control of human p53-regulated genes." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(5): 402-412.

Robles, A. I. and C. C. Harris (2010). "Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(3): a001016.

Roninson, I. B. (2003). "Tumor cell senescence in cancer treatment." Cancer Res **63**(11): 2705-2715.

Rossi, M., O. N. Demidov, C. W. Anderson, E. Appella and S. J. Mazur (2008). "Induction of PPM1D following DNA-damaging treatments through a conserved p53 response element coincides with a shift in the use of transcription initiation sites." Nucleic Acids Res **36**(22): 7168-7180.

Russell, P. and P. Nurse (1987). "Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog." Cell **49**(4): 559-567.

Sakurikar, N. and A. Eastman (2015). "Will targeting Chk1 have a role in the future of cancer therapy?" J Clin Oncol **33**(9): 1075-1077.

Sarkaria, J. N., E. C. Busby, R. S. Tibbetts, P. Roos, Y. Taya, L. M. Karnitz and R. T. Abraham (1999). "Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine." Cancer Res **59**(17): 4375-4382.

Sausville, E., P. Lorusso, M. Carducci, J. Carter, M. F. Quinn, L. Malburg, N. Azad, D. Cosgrove, R. Knight, P. Barker, S. Zabludoff, F. Agbo, P. Oakes and A. Senderowicz (2014). "Phase I dose-escalation study of AZD7762, a checkpoint kinase inhibitor, in combination with gemcitabine in US patients with advanced solid tumors." Cancer Chemother Pharmacol **73**(3): 539-549.

Sax, J. K., P. Fei, M. E. Murphy, E. Bernhard, S. J. Korsmeyer and W. S. El-Deiry (2002). "BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity." Nat Cell Biol **4**(11): 842-849.

Schmitt, C. A., J. S. Fridman, M. Yang, S. Lee, E. Baranov, R. M. Hoffman and S. W. Lowe (2002). "A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy." Cell **109**(3): 335-346.

Schneider, K., K. Zelle, K. E. Nichols and J. Garber (1993). Li-Fraumeni Syndrome. GeneReviews(R). R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger et al. Seattle (WA).

Shimada, M., K. Kitagawa, Y. Dobashi, T. Isobe, T. Hattori, C. Uchida, K. Abe, Y. Kotake, T. Oda, H. Suzuki, K. Hashimoto and M. Kitagawa (2009). "High expression of Pirh2, an E3 ligase for p27, is associated with low expression of p27 and poor prognosis in head and neck cancers." Cancer Sci **100**(5): 866-872.

Shreeram, S., O. N. Demidov, W. K. Hee, H. Yamaguchi, N. Onishi, C. Kek, O. N. Timofeev, C. Dudgeon, A. J. Fornace, C. W. Anderson, Y. Minami, E. Appella and D. V. Bulavin (2006). "Wip1 phosphatase modulates ATM-dependent signaling pathways." Mol Cell **23**(5): 757-764.

Shreeram, S., W. K. Hee, O. N. Demidov, C. Kek, H. Yamaguchi, A. J. Fornace, Jr., C. W. Anderson, E. Appella and D. V. Bulavin (2006). "Regulation of ATM/p53-dependent suppression of myc-induced lymphomas by Wip1 phosphatase." J Exp Med **203**(13): 2793-2799.

Sigal, A. and V. Rotter (2000). "Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome." Cancer Res **60**(24): 6788-6793.

Smith, S. M., M. B. Wunder, D. A. Norris and Y. G. Shellman (2011). "A simple protocol for using a LDH-based cytotoxicity assay to assess the effects of death and growth inhibition at the same time." PLoS One **6**(11): e26908.

Song, J. Y., H. S. Han, K. Sabapathy, B. M. Lee, E. Yu and J. Choi (2010). "Expression of a homeostatic regulator, Wip1 (wild-type p53-induced phosphatase), is temporally induced by c-Jun and p53 in response to UV irradiation." J Biol Chem **285**(12): 9067-9076.

Soussi, T. and C. Beroud (2001). "Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome." Nat Rev Cancer **1**(3): 233-240.

Spike, B. T. and G. M. Wahl (2011). "p53, Stem Cells, and Reprogramming: Tumor Suppression beyond Guarding the Genome." Genes Cancer **2**(4): 404-419.

Takekawa, M., M. Adachi, A. Nakahata, I. Nakayama, F. Itoh, H. Tsukuda, Y. Taya and K. Imai (2000). "p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation." EMBO J **19**(23): 6517-6526.

Tan, D. S., M. B. Lambros, S. Rayter, R. Natrajan, R. Vatcheva, Q. Gao, C. Marchio, F. C. Geyer, K. Savage, S. Parry, K. Fenwick, N. Tamber, A. Mackay, T. Dexter, C. Jameson, W. G. McCluggage, A. Williams, A. Graham, D. Faratian, M. El-Bahrawy, A. J. Paige, H. Gabra, M. E. Gore, M. Zvelebil, C. J. Lord, S. B. Kaye, A. Ashworth and J. S. Reis-Filho (2009). "PPM1D is a potential therapeutic target in ovarian clear cell carcinomas." Clin Cancer Res **15**(7): 2269-2280.

Tan, E. Y. and C. F. Cheok (2014). "Bringing p53 into the Clinic." J Cancer Sci Ther **6**(9): 363-369.

Tarulli, G. A., D. De Silva, V. Ho, K. Kunasegaran, K. Ghosh, B. C. Tan, D. V. Bulavin and A. M. Pietersen (2013). "Hormone-sensing cells require Wip1 for paracrine stimulation in normal and premalignant mammary epithelium." Breast Cancer Res **15**(1): R10.

Terzian, T., Y. A. Suh, T. Iwakuma, S. M. Post, M. Neumann, G. A. Lang, C. S. Van Pelt and G. Lozano (2008). "The inherent instability of mutant p53 is alleviated by Mdm2 or p16INK4a loss." Genes Dev **22**(10): 1337-1344.

Tommasino, M., R. Accardi, S. Caldeira, W. Dong, I. Malanchi, A. Smet and I. Zehbe (2003). "The role of TP53 in Cervical carcinogenesis." Hum Mutat **21**(3): 307-312.

Torre, L. A., F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent and A. Jemal (2015). "Global cancer statistics, 2012." CA Cancer J Clin **65**(2): 87-108.

Townsend, D. M., K. D. Tew, L. He, J. B. King and M. H. Hanigan (2009). "Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity." Biomed Pharmacother **63**(2): 79-85.

Tung, N., N. U. Lin, J. Kidd, B. A. Allen, N. Singh, R. J. Wenstrup, A. R. Hartman, E. P. Winer and J. E. Garber (2016). "Frequency of Germline Mutations in 25 Cancer Susceptibility Genes in a Sequential Series of Patients With Breast Cancer." J Clin Oncol **34**(13): 1460-1468.

Van Maerken, T., J. Vandesompele, A. Rihani, A. De Paepe and F. Speleman (2009). "Escape from p53-mediated tumor surveillance in neuroblastoma: switching off the p14(ARF)-MDM2-p53 axis." Cell Death Differ **16**(12): 1563-1572.

Varna, M., G. Bousquet, L. F. Plassa, P. Bertheau and A. Janin (2011). "TP53 status and response to treatment in breast cancers." J Biomed Biotechnol **2011**: 284584.

Vegran, F., M. Rebutti, S. Chevrier, M. Cadouot, R. Boidot and S. Lizard-Nacol (2013). "Only missense mutations affecting the DNA binding domain of p53 influence outcomes in patients with breast carcinoma." PLoS One **8**(1): e55103.

Vikhanskaya, F., M. K. Lee, M. Mazzeletti, M. Brogkini and K. Sabapathy (2007). "Cancer-derived p53 mutants suppress p53-target gene expression--potential mechanism for gain of function of mutant p53." Nucleic Acids Res **35**(6): 2093-2104.

Vilborg, A., J. A. Glahder, M. T. Wilhelm, C. Bersani, M. Corcoran, S. Mahmoudi, M. Rosenstierne, D. Grander, M. Farnebo, B. Norrild and K. G. Wiman (2009). "The p53 target Wig-1 regulates p53 mRNA stability through an AU-rich element." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(37): 15756-15761.

Vogelstein, B., D. Lane and A. J. Levine (2000). "Surfing the p53 network." Nature **408**(6810): 307-310.

Vousden, K. H. and C. Prives (2009). "Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53." Cell **137**(3): 413-431.

Vousden, K. H. and K. M. Ryan (2009). "p53 and metabolism." Nat Rev Cancer **9**(10): 691-700.

Waldman, T., K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1995). "p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells." Cancer Res **55**(22): 5187-5190.

Wang, L., A. J. Mosel, G. G. Oakley and A. Peng (2012). "Deficient DNA damage signaling leads to chemoresistance to cisplatin in oral cancer." Mol Cancer Ther **11**(11): 2401-2409.

Wang, X. and R. Simon (2013). "Identification of potential synthetic lethal genes to p53 using a computational biology approach." BMC Med Genomics **6**: 30.

Wang, Z. and Y. Sun (2010). "Targeting p53 for Novel Anticancer Therapy." Transl Oncol **3**(1): 1-12.

Wattel, E., C. Preudhomme, B. Hecquet, M. Vanrumbeke, B. Quesnel, I. Dervite, P. Morel and P. Fenaux (1994). "p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies." Blood **84**(9): 3148-3157.

Weisz, L., A. Zalcenstein, P. Stambolsky, Y. Cohen, N. Goldfinger, M. Oren and V. Rotter (2004). "Transactivation of the EGR1 gene contributes to mutant p53 gain of function." Cancer Res **64**(22): 8318-8327.

Weller, M. (1998). "Predicting response to cancer chemotherapy: the role of p53." Cell Tissue Res **292**(3): 435-445.

Wen, W. H., A. Reles, I. B. Runnebaum, J. Sullivan-Halley, L. Bernstein, L. A. Jones, J. C. Felix, R. Kreienberg, A. el-Naggar and M. F. Press (1999). "p53 mutations and expression in ovarian cancers: correlation with overall survival." Int J Gynecol Pathol **18**(1): 29-41.

Whiteman, D. C. and L. F. Wilson (2016). "The fractions of cancer attributable to modifiable factors: A global review." Cancer Epidemiol.

Willis, N. and N. Rhind (2009). "Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint." Cell Div **4**: 13.

Wong, E. S., X. Le Guezennec, O. N. Demidov, N. T. Marshall, S. T. Wang, J. Krishnamurthy, N. E. Sharpless, N. R. Dunn and D. V. Bulavin (2009). "p38MAPK controls expression of multiple cell cycle inhibitors and islet proliferation with advancing age." Dev Cell **17**(1): 142-149.

Wu, G. S., T. F. Burns, E. R. McDonald, 3rd, W. Jiang, R. Meng, I. D. Krantz, G. Kao, D. D. Gan, J. Y. Zhou, R. Muschel, S. R. Hamilton, N. B. Spinner, S. Markowitz, G. Wu and W. S. el-Deiry (1997). "KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene." Nat Genet **17**(2): 141-143.

Xu, H. Y., W. L. Xu, L. Q. Wang, M. B. Chen and H. L. Shen (2014). "Relationship between p53 status and response to chemotherapy in patients with gastric cancer: a meta-analysis." PLoS One **9**(4): e95371.

Yang, P., C. W. Du, M. Kwan, S. X. Liang and G. J. Zhang (2013). "The impact of p53 in predicting clinical outcome of breast cancer patients with visceral metastasis." Sci Rep **3**: 2246.

Yap, T. A., M. G. Krebs, S. Postel-Vinay, Y. J. Bang, A. El-Khoueiry, W. Abida, K. Harrington, R. Sundar, L. Carter, E. Castanon-Alvarez, S. A. Im, A. Berges, M. Khan, C. Stephens, G. Ross and J. C. Soria (2016). "Phase I modular study of AZD6738, a novel oral, potent and selective ataxia telangiectasia Rad3-related (ATR) inhibitor in combination (combo) with carboplatin, olaparib or durvalumab in patients (pts) with advanced cancers." European Journal of Cancer **69**: S2-S2.

Yip, K. W. and J. C. Reed (2008). "Bcl-2 family proteins and cancer." Oncogene **27**(50): 6398-6406.

Yu, E., Y. S. Ahn, S. J. Jang, M. J. Kim, H. S. Yoon, G. Gong and J. Choi (2007). "Overexpression of the wip1 gene abrogates the p38 MAPK/p53/Wip1 pathway and silences p16 expression in human breast cancers." Breast Cancer Res Treat **101**(3): 269-278.

Zaidi, S. K., S. Pande, J. Pratap, T. Gaur, S. Grigoriu, S. A. Ali, J. L. Stein, J. B. Lian, A. J. van Wijnen and G. S. Stein (2007). "Runx2 deficiency and defective subnuclear targeting bypass senescence to promote immortalization and tumorigenic potential." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(50): 19861-19866.

Zhang, J. (2013). "The role of BRCA1 in homologous recombination repair in response to replication stress: significance in tumorigenesis and cancer therapy." Cell Biosci **3**(1): 11.

Zilfou, J. T. and S. W. Lowe (2009). "Tumor suppressive functions of p53." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(5): a001883.

ANNEXES

1. Article scientifique

Titre :

Wee1 inhibition potentiates Wip1-dependent p53-negative tumor cell death during chemotherapy.

Auteurs :

Clausse V.

Goloudina A.R.

Uyanik B.

Kochetkova E.Y.

Richaud S.

Fedorova O.A.

Hammann A.

Bardou M.

Barlev N.A.

Garrido C.

Demidov O.N.

Publié dans le journal *Cell Death and Disease* en avril 2016

Wee1 inhibition potentiates Wip1-dependent p53-negative tumor cell death during chemotherapy

V Clause^{1,2}, AR Goloudina^{1,2}, B Uyanik^{1,2}, EY Kochetkova³, S Richaud^{1,2}, OA Fedorova³, A Hammann^{1,2}, M Bardou^{1,2}, NA Barlev³, C Garrido^{1,2,4} and ON Demidov^{*,1,2,3}

Inactivation of p53 found in more than half of human cancers is often associated with increased tumor resistance to anti-cancer therapy. We have previously shown that overexpression of the phosphatase Wip1 in p53-negative tumors sensitizes them to chemotherapeutic agents, while protecting normal tissues from the side effects of anti-cancer treatment. In this study, we decided to search for kinases that prevent Wip1-mediated sensitization of cancer cells, thereby interfering with efficacy of genotoxic anti-cancer drugs. To this end, we performed a flow cytometry-based screening in order to identify kinases that regulated the levels of γ H2AX, which were used as readout. Another criterion of the screen was increased sensitivity of p53-negative tumor cells to cisplatin (CDDP) in a Wip1-dependent manner. We have found that a treatment with a low dose (75 nM) of MK-1775, a recently described specific chemical inhibitor of Wee1, decreases CDDP-induced H2AX phosphorylation in p53-negative cells and enhances the Wip1-sensitization of p53-negative tumors. We were able to reduce CDDP effective concentration by 40% with a combination of Wip1 overexpression and Wee1 kinase inhibition. We have observed that Wee1 inhibition potentiates Wip1-dependent tumor sensitization effect by reducing levels of Hipk2 kinase, a negative regulator of Wip1 pathway. In addition, during CDDP treatment, the combination of Wee1 inhibition and Wip1 overexpression has a mild but significant protective effect in normal cells and tissues. Our results indicate that inhibition of the negative regulators of Wip1 pathway, Wee1 and Hipk2, in p53-negative tumors could potentiate efficiency of chemotherapeutic agents without concomitant increase of cytotoxicity in normal tissues. The development and clinical use of Wee1 and Hipk1 kinase chemical inhibitors might be a promising strategy to improve anti-cancer therapy.

Cell Death and Disease (2016) 7, e2195; doi:10.1038/cddis.2016.96; published online 14 April 2016

Various approaches in modern day anti-cancer treatment rely on DNA damage response (DDR) system so as to target rapidly dividing cancer cells by direct or indirect DNA damage.¹ In the core of the DDR system is the tumor suppressor p53, a transcription factor which by modulating gene expression controls cell response to numerous stressors and determines cell fate.² To overcome the negative supervision of oncogenic behavior by p53, tumor cells should neutralize p53 pathway to allow their uncontrolled growth.^{3,4} The loss of p53 tumor-suppressor functions is occurring in more than half of human cancers and affects many pathways, such as growth, genomic stability, cell death and sensitivity to anti-cancer treatment.⁵ Indeed, p53-negative tumors are often resistant to anti-cancer treatment. Finding new strategies that could restore p53-negative cancer cell sensitivity to chemotherapeutic agents will help to improve the efficacy of anti-cancer therapy.

We have developed an approach based on the synthetic sensitivity phenomenon of p53-negative cancer cells in the presence of overexpressed Wip1 phosphatase.⁶ Importantly,

this approach allows specific targeting of only cancer cells, but not normal tissues. This therapeutic approach of synthetic lethality has been described for the first time in the 1920s by Calvin Bridges in *Drosophila melanogaster*.⁷ When two genes are genetically linked but are involved in different pathways, inactivation of both of them results in synthetic lethality. Yet, individual ablation of either of them does not cause lethality.⁸ In general, synthetic lethality can also be caused by specific drugs that inactivate one of the genes, given that the other is already inactivated.⁹ Importantly, we have shown that synthetic lethality can be caused not only by inactivation of the genes, but also by overexpression of an epistatic gene in the absence of another gene. In support of this hypothesis, we have shown that in p53-negative tumor cells, overexpression of this gene can restore cell death signaling in cisplatin (CDDP)-treated p53-negative cells.¹⁰

In line with this, in p53-negative tumors, Wip1 overexpression acts differently than in tumors harboring wild-type p53. Wip1 overexpression could negatively affect tumor characteristics in p53-positive cancers, such as breast cancer,

¹INSERM UMR 866, Laboratoire d'excellence ARC, Dijon, France; ²University of Burgundy, Dijon, France; ³Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg, Russia and ⁴Anticancer Center Georges François Leclerc, Dijon, France

*Corresponding author: ON Demidov, Faculty of Medicine and Pharmacy, INSERM UMR 866, Laboratoire d'excellence ARC, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, Dijon 21079, France. Tel: +33 (0) 3 8039 3284; Fax: 33 (0) 3 8039 3434; E-mail: oleg.demidov@u-bourgogne.fr

Abbreviations: ATM, Ataxia telangiectasia mutated; ATR, Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein; BrdU, Bromodeoxyuridine; Cdc2, Cell division control protein 2 homolog; CDDP, cis-diaminedichloroplatine(II); DDR, DNA damage response; DNA, Deoxyribonucleic acid; DNA-PK, DNA-dependent protein kinase; H2AX, histone H2A family member X; Hipk2, Homeodomain-interacting protein kinase 2; PARP, Poly ADP-ribose polymerase; PPM1D, Protein phosphatase Mg²⁺/Mn²⁺ dependent 1D; RNA, Ribonucleic acid; Saos, Sarcoma osteogenic; Ser, Serine; siRNA, Small interfering RNA; Wee1, Wee1 G2 checkpoint kinase; Wip1, Wild-type p53-induced phosphatase 1

Received 26.11.15; revised 01.3.16; accepted 07.3.16; Edited by M Agostini

neuroblastoma, medulloblastoma, ovarian clear cell tumor, gastric carcinoma, pancreatic adenocarcinoma and chronic lymphocytic leukemia.^{11,12} Moreover, Wip1-deficient mice have shown a tumor-resistant phenotype strictly dependent on the presence of wild-type p53.^{13,14} Wip1 overexpression induces opposite effects depending on the p53 status of the cell. By regulating the Bax/Bcl-xL ratio in the absence of p53, Wip1 overexpression sensitizes p53-negative tumors to chemotherapy and induces a caspase-3-dependent apoptosis.¹⁰

On the contrary, in normal cells that harbor wild-type p53 tumor suppressor, Wip1 overexpression lowers the amplitude of signaling from damaged DNA to p53.¹⁵ Thus, by attenuating p53 acute response to DNA damage, Wip1 protects normal cells from cisplatin-induced apoptosis.

Two different vectors of Wip1 phosphatase activity in p53-negative and p53-positive backgrounds not only restore chemotherapy efficacy in the former, but also reduce cytotoxicity and side effects in normal tissues, widening the therapeutic window.

The phosphorylation status of histone H2AX is a critical marker of DDR. When phosphorylated on Ser139 (γ H2AX), it initiates DDR by recruiting DDR factors to the DNA-damaged site. Previously, we and other groups have shown that Wip1 induction decreased the level of histone γ H2AX phosphorylation in the course of DNA damage in tumor cell lines.^{16–20} We hypothesized that we could achieve p53-negative cells sensitization with simultaneous normal cell protection by targeting kinases that affect the Wip1– γ H2AX pathway, directly or indirectly.

Here, we have reported an example of two such kinases identified by us in a human siRNA screen, Hipk2 and Wee1. Wee1 is a tyrosine kinase and a major regulator of the G2 checkpoint, which controls entry into mitosis after DDR.²¹ It has been published that Wee1 inhibition can sensitize cells to cisplatin treatment, by forcing them to enter mitosis with unrepaired DNA and inducing a mitotic catastrophe.²² We found that a low subtoxic concentration of a Wee1 inhibitor affects H2AX phosphorylation after CDDP-induced DNA damage and potentiates Wip1-dependent CDDP toxicity towards p53-negative cells, permitting a significant reduction of the efficient CDDP dose.

Results

Kinase library screening. Previously, it was reported that the increased γ H2AX levels correlates not only with more severe damage to DNA, but also with elevated DDR, including initiation of cell death program.²⁴ Knowing the fact that, on one hand, Wip1 directly dephosphorylates γ H2AX and, on another hand, Wip1 increases cytotoxicity of cisplatin, we decided to verify that in p53-negative Saos2-Wip1-ON osteosarcoma cells, levels of p-Ser139 γ H2AX do not correlate with cisplatin-induced cell death. The induction of Wip1 in Saos2 cells increased significantly the cytotoxicity of a cisplatin treatment ($P=0.0047$), but levels of γ H2AX were lower than in control cells resistant to cisplatin without induction of Wip1 (Figure 1a, Supplementary Figure S1A).

During the process of DDR, H2AX is directly phosphorylated on Ser139 by several kinases such as ATM, ATR or DNA-PK.^{25–27} Several phosphatases including Wip1 were reported to be able to remove the phosphate group from this site, making this DNA damage marker turn back to the status OFF. Therefore, we analyzed several timepoints after administration of cisplatin in order to find the critical window in which the effect of Wip1 induction on γ H2AX dephosphorylation was at its maximum level. The most significant reduction of H2AX phosphorylation was observed between 26 and 30 h after cisplatin administration (Figure 1b).

We hypothesized that some kinases could negatively affect Wip1 activity. The inhibition of such kinases could increase Wip1 activity, simultaneously reducing γ H2AX phosphorylation and increasing sensitivity of p53-negative cells to this chemotherapeutic drug. Thus, we decided to perform a high-throughput screening for kinases, which may negatively regulate the activity of Wip1 upon DDR using the loss of phospho-Ser139 H2AX signal as a readout. To this end, we used the timepoint 28 h after CDDP treatment when the maximum activity of Wip1 towards Ser139 H2AX was detected in cisplatin-treated cells transfected with a siRNA kinome library. A 96-well format was used to monitor the phospho-Ser139 H2AX signal by flow cytometry system GUAVA.

To validate the system and set up the experimental conditions of high-throughput screening, we used siRNA to ATR kinase, which directly phosphorylates Ser139 on H2AX upon cisplatin-induced DNA damage.²⁸ We showed that ATR inhibition significantly reduced the level of phospho-H2AX after cisplatin treatment (Supplementary Figure S2).

A library of siRNAs against 711 target kinases was used in this system. siRNAs that were able to change the number of γ H2AX-positive cells, and intensity of γ H2AX phosphorylation by at least 40% compared with control samples treated with non-targeting siRNA and same cisplatin concentration were arbitrarily set up as a threshold for positive hits (Figure 1c). Kinases, which are known as enzymes directly phosphorylating H2AX on Ser139, were excluded from further analysis.

Interestingly, we noticed that the siRNA targeting Hipk2 was among siRNAs that reduced cisplatin-induced phosphorylation of H2AX and we confirmed this result (Figure 2a, Supplementary Figure S1C). Hipk2 kinase was recently reported as a negative regulator of Wip1.²⁹ This confirms that our screen is able to identify regulators of Wip1, which also affect DNA damage-induced phosphorylation of H2AX (Supplementary Figure S3). Moreover, we observed a significant increase in Saos2 sensitivity towards cisplatin after depletion of Hipk2 kinase with specific siRNA ($P=0.0037$), which indicates that the ablation of Hipk2 restores Wip1 activity (Figure 2b).

Wee1 inhibition decreases cisplatin-induced H2AX phosphorylation and sensitizes Saos2 cells to this drug. Among positive hits identified, we selected Wee1 kinase as a proof of principle that inhibition of a kinase could increase tumor cell sensitivity to chemotherapy without any increase in DNA damage signaling mark, that is, γ H2AX. Wee1 was never reported before as a kinase directly affecting γ H2AX phosphorylation.

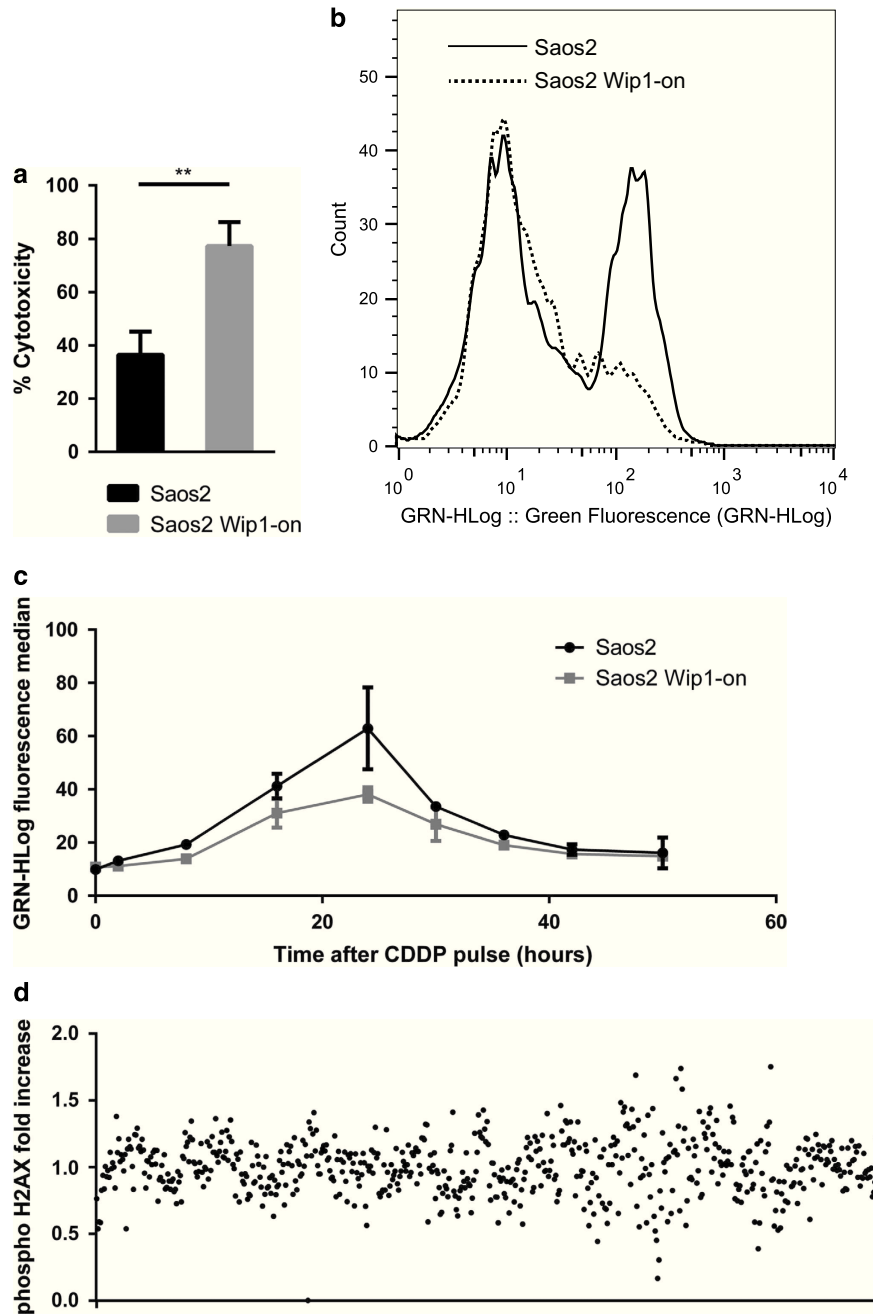


Figure 1 Wip1, a phosphatase that sensitizes p53-negative tumor cells to cisplatin is crucial for H2AX dephosphorylation after DNA damage, which can be used as a marker of Wip1 activity for a screening of human protein kinases interacting with DDR pathway. (a) Induction of Wip1 phosphatase in Saos2 osteosarcoma by a treatment of 1 μ g/ml doxycycline 24 h prior a 25 μ M cisplatin (CDDP) treatment for 72 h sensitizes these p53-negative cells to chemotherapy. (b) H2AX phosphorylation, the main marker of DNA damage, is decreased by Wip1 expression induced by a treatment of cells by 1 μ g/ml doxycycline 24 h prior a 25 μ M CDDP treatment for 28 h. (c) Kinetics of H2AX phosphorylation by flow cytometry with or without Wip1 induction by 1 μ g/ml doxycycline 24 h prior a 100 μ M CDDP pulse for 1 h. (d) High-throughput flow cytometry screening of H2AX phosphorylation following inhibition of the whole human kinase by siRNA reverse transfection in Saos2 osteosarcoma cells. Samples showing a modification of at least $\pm 40\%$ after a 25 μ M CDDP treatment for 28 h compared with controls transfected with non-targeting siRNA were arbitrarily selected as positive hits potentially acting in or through Wip1 pathway

We confirmed that siRNA to Wee1 decreased γ H2AX phosphorylation following cisplatin-induced DNA damage (Figure 3a, Supplementary Figures S1B and S3).

Recently, the chemical compound MK-1775 was identified as a specific inhibitor of Wee1 kinase activity. It was reported

that this compound could sensitize several types of cancer cell lines to a number of chemotherapeutic agents.^{30–32} We demonstrated that MK-1775 potentiated Wip1-dependent sensitization to cisplatin in p53-negative Saos2 cells, even with a lower cisplatin concentration ($P=0.0099$). Indeed, by

using triple combination (cisplatin+MK-1775+Wip1 overexpression), we were able to reduce the effective concentration of cisplatin by 40%, from 25 μ M effective concentration in cells with Wip1 overexpression alone to 15 μ M (Figures 3b and c). It is worth noting that we have used here a low non-toxic concentration of MK-1775, 75 nM, to avoid it acting as a single agent. At that concentration, it has been shown that MK-1775 can inhibit Wee1 only by 50%.³² On the contrary, in the absence of doxycycline-induced Wip1 overexpression, MK-1775-mediated sensitization ($P=0.0201$) of tumor cells to cisplatin was significantly attenuated.

Wee1 is a major positive regulator of G2 checkpoint. It has been suggested that Wee1 inhibition abolishes DNA damage-induced G2 arrest. During chemotherapy-induced DNA damage, Wee1 inhibition promotes premature entry of cells with unrepaired DNA into mitosis thereby inflicting cell death by mitotic catastrophe.³³ Here, we demonstrated that the number of cells entering mitosis in population treated by the above-mentioned triple combination was similar to that observed in cells treated with cisplatin alone (Figure 3d). The preserved activity of pre-mitotic checkpoints can be explained by only partial inhibition of Wee1 in our settings or by activation of checkpoints earlier than G2 arrest. The p53-negative status of our model cell line, Saos2, indicates that G1 checkpoint should be compromised, because p53 is one of the major regulator of G1 arrest.^{34,35}

The cell cycle profile of cells treated with the different combinations (i.e., cisplatin alone, cisplatin plus MK-1775 or Wip1 overexpression, or triple combination) suggests that in triple and double drug combinations, most of the cells were entering S-phase DNA replication process. Moreover, we have shown that pro-apoptotic signaling is activated in S-phase, as shown in Supplementary Figure S4, by a co-localization of active caspase-3 with BrdU staining of S-phase population.

Figure 4a shows that cells treated according to our scheme, CDDP, MK-1775 and Wip1 overexpression, die by a caspase-3-dependent apoptosis, highlighting the efficiency of the triple

combination. The efficacy of this new treatment was also confirmed with an increase in cleaved PARP levels after the treatment (Supplementary Figure S5). The oxidation of mitochondria, detected with MitoSOX red fluorescent reagent, was increased also in a cisplatin- and Wip1-dependent manner (Figures 4b and c). Hence, cell death in Saos2 cells upon Wip1 overexpression involves the mitochondrial pathway and has strong correlation with mitochondrial oxidation. Further, we have found that Wee1 inhibitor MK-1175 reduced cisplatin-induced γ H2AX phosphorylation in a Wip1-dependent manner (Figure 4d, $P=0.0103$), because MK-1775 has no impact on H2AX phosphorylation by itself in cells without Wip1 overexpression. This indicates that Wee1 could negatively affect Wip1 activity. Inhibition of Wee1 by MK-1775 can activate Wip1 and increase p53-negative cell sensitivity towards cisplatin. Interestingly, simultaneous treatment with CDDP and MK-1775 destabilized Hipk2 kinase, the negative regulator of Wip1 activity, confirming that Wee1 is involved in the negative regulation of Wip1 pathway (Figure 4e).

Inhibition of Wee1 combined with Wip1 overexpression does not sensitize normal cells to cisplatin. Conventional chemotherapy can severely affect several normal tissues and organs that could lead to severe side effects during and after anti-cancer treatment.^{36–38} We found that our proposed triple combination did not significantly increase cell death of normal mouse embryonic fibroblasts (Figure 5a). Moreover, treatment of wild-type and Wip1 transgenic mice showed that MK-1775 used at a concentration proposed for anti-cancer treatment (30 mg/kg) is not toxic for fast proliferating tissues such as intestinal epithelium. Furthermore, MK-1775, when added with cisplatin, does not disrupt Wip1-protective effect of normal tissues during chemotherapy,⁶ as less apoptotic cells were observed in pUBC-Wip1 mice compared with WT mice after MK-1775 and 10 mg/kg CDDP treatment (Figure 5b, Supplementary Figure S6).

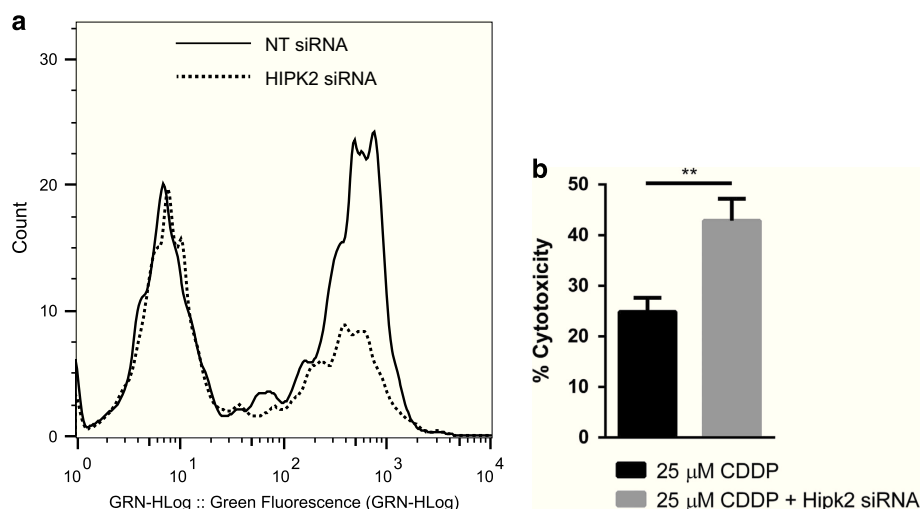


Figure 2 Hipk2 siRNA decreases H2AX phosphorylation but increases cisplatin toxicity in p53-negative Saos2 osteosarcoma cells. (a) Flow cytometry assay of H2AX phosphorylation of Saos2 osteosarcoma cells following a treatment with 25 μ M CDDP for 28 h after a reverse transfection of a non-targeting siRNA (line) or Hipk2 siRNA (dots). (b) Comparison of cytotoxicity following a 25 μ M treatment of CDDP for 72 h in Saos2 osteosarcoma cells with or without a transfection of Hipk2 siRNA

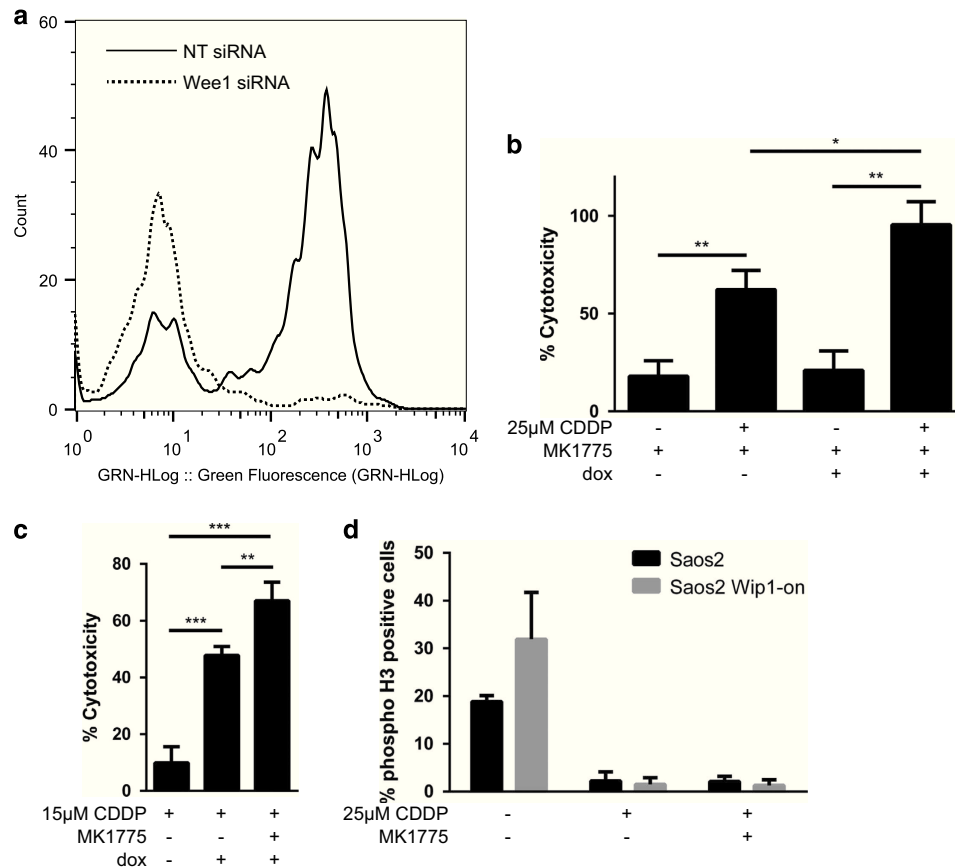


Figure 3 Wee1 partial inhibition potentializes Wip1-dependent cisplatin-induced cytotoxicity in p53-negative tumor cells but not by inducing a mitotic catastrophe. **(a)** Flow cytometry assay of H2AX phosphorylation of Saos2 osteosarcoma cells following a treatment with 25 μ M of CDDP for 28 h after a reverse transfection of a non-targeting siRNA (line) as a control, or Wee1 siRNA (dots). **(b)** Cytotoxicity assay in Saos2 osteosarcoma cells after inhibition of Wee1 by the chemical compound MK-1775 used at a low concentration of 75 nM 2 h prior a 25 μ M CDDP treatment for 72 h, in absence or presence of Wip1, induced by a 1 μ g/ml treatment of doxycycline 24 h prior to the chemotherapeutic treatment. **(c)** Cytotoxicity assay in Saos2 osteosarcoma cells after inhibition of Wee1 by 75nM MK-1775 2 h prior a 15 μ M CDDP treatment for 72 h, with or without Wip1, induced by a 1 μ g/ml treatment of doxycycline. **(d)** Immunofluorescence assay targeting the mitosis-specific marker phospho-histone H3. Cells were treated for 16 h with 100 ng/ml nocodazole to block them in mitosis, with triple combination of 25 μ M CDDP, 75nM Wee1 inhibitor MK-1775 and 1 μ g/ml doxycycline to induce Wip1 overexpression

Wip 1 positively affects survival of patients with p53-negative colorectal tumors. To assess the biological significance of PPM1D gene expression in tumors with variable p53 status, we used a bioinformatics approach on clinical gene expression data of colorectal cancer patients. Among the patients, 190 samples corresponded to patients with a mutant status of p53 and 161 samples contained wild-type p53. These two cohorts were examined separately for the correlation between PPM1D expression and survival of patients. In the presence of wild-type p53, low level of PPM1D expression correlated with better prognosis, which is consistent with the oncogenic role of PPM1D (Figure 6). In contrast, in the presence of mutant p53, low level of PPM1D expression was associated with poor survival of colon cancer patients, especially after 75 months. This result supports, although indirectly, the positive role of PPM1D in the absence of functional p53. Collectively, these results suggest that Wip1 has opposite roles in tumors with wild-type p53 versus the ones with mutant p53.

Discussion

Platinum derivatives, including cisplatin, are widely used chemical agents in the treatment of solid malignancies like neck, lung, testis, ovarian or testis tumors. Their efficacy is dose-dependent, but also are the side effects, particularly nephrotoxicity. Indeed, the main complication after cisplatin chemotherapy is acute kidney injury. This is an important obstacle to the use of doses that maximize its antineoplastic properties.³⁹ Moreover, when the p53 tumor suppressor is mutated and inactive, which is the case in more than half of cancers, the effectiveness of such treatments is significantly compromised.⁴¹ This is why restoring tumor cell sensitivity to anti-cancer agents in p53-negative tumors and at the same time protecting normal tissues from chemotherapy-induced side effects, or at least decreasing toxicity towards them, is a very attractive strategy in oncology. The Wip1 activation in p53-negative cells was a first example of such kind of strategy. Indeed, our team has shown that Wip1 overexpression in

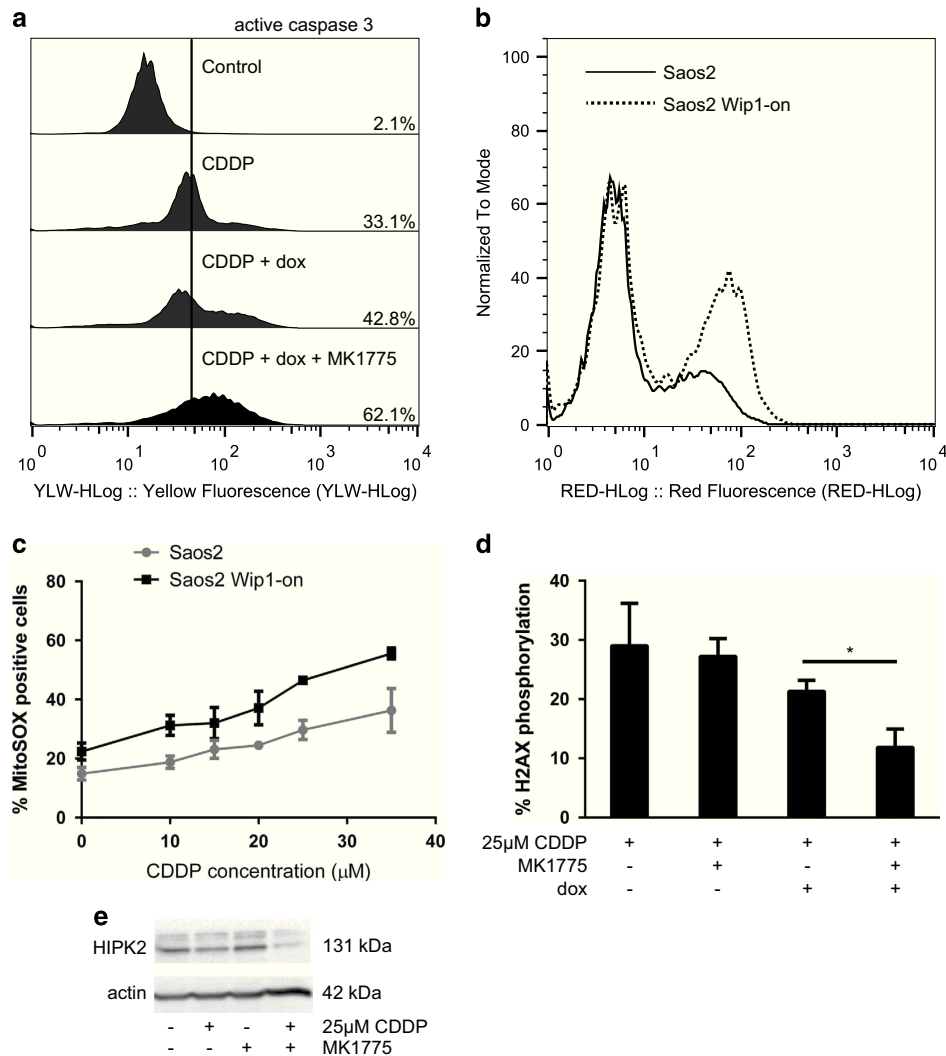


Figure 4 A caspase-3-dependent apoptosis correlated to mitochondrial superoxide production following cisplatin-induced DNA damage is Wip1-dependent in Saos2 osteosarcoma cells, and is related to Hipk2 deregulation by Wee1 kinase inhibition. (a) Anti-active caspase-3 flow cytometry assay following a treatment of Saos2 osteosarcoma cells with 25 μM CDDP alone, with 1 μg/ml doxycycline to induce Wip1 overexpression, or in triple combination with 75 nM MK-1775. (b) Flow cytometry profile showing the Wip1-dependency, induced by doxycycline, of mitochondrial ROS formation after a treatment with 25 μM of CDDP for 24 h. (c) Flow cytometry assessment of mitochondrial superoxide production. Saos2 osteosarcoma cells were treated with increasing doses of CDDP for 24 h with or without induction of Wip1 by 1 μg/ml doxycycline. Mitochondrial superoxide formation has been detected using MitoSOX superoxide indicator by flow cytometry after an incubation of cells with 2 μM of the dye for 15 min at 37 °C. (d) Anti-γH2AX flow cytometry assay following 28 h treatment of Saos2 osteosarcoma cells with 25 μM CDDP, 75 nM MK-1775 and 1 μg/ml doxycycline to induce Wip1 overexpression. (e) Western blot of anti-Hipk2 with or without a 25 μM CDDP treatment and a Wee1 partial inhibition by 75 nM of MK-1775 for 20 h

p53-negative tumor cells fulfills these two objectives, by both promoting caspase-dependent apoptosis in tumors and inhibiting p53-regulated apoptosis in healthy normal tissues.^{5,10}

In this study, as a strategy to potentiate the effect of Wip1 overexpression in p53-negative cancers, we have designed a high-throughput screening of the human kinome and analyzed p53-negative cells for kinases, whose inhibition could decrease cisplatin-induced H2AX phosphorylation and at the same time increase tumor cell sensitivity to chemotherapy. H2AX was reported in several publications as a target of Wip1 enzymatic activity.^{16–20} One of our aims was to identify kinases that negatively regulate Wip1 pathway, so their depletion or inhibition could lead to an increased Wip1

activity and, consequently, to a reduced DNA damage signaling through H2AX and to an elevated sensitivity of p53-negative cells to chemotherapeutic drugs. We confirmed data published by Choi *et al.*,²⁹ demonstrating that Hipk2 kinase can affect H2AX phosphorylation in a Wip1-dependent manner. In p53-negative cells, we observed an increase in sensitivity to chemotherapeutic agent after depletion of Hipk2 kinase, mimicking the phenotype observed by Wip1 overexpression in the same p53-negative type of cells.

As a result of our screen, we identified Wee1 tyrosine kinase, which was previously described as an effector of G2 checkpoint regulation by phosphorylating Cdc2,⁴³ but not as a kinase directly affecting H2AX phosphorylation. siRNA-mediated depletion of Wee1 or treatment with the specific

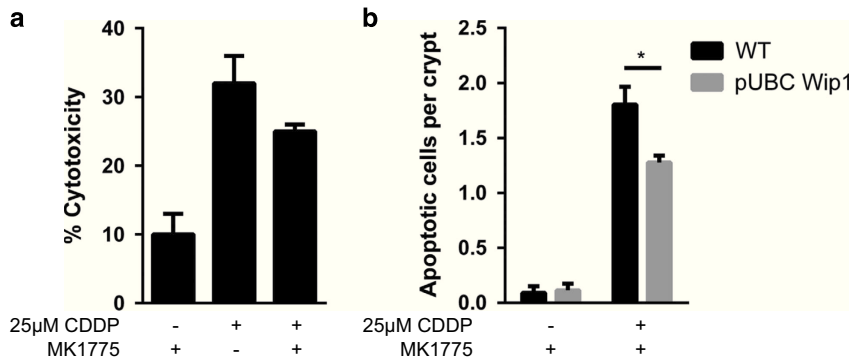


Figure 5 Wee1 inhibitor MK-1775 does not increase cell death by itself *in vitro* or *in vivo* without combination with cisplatin. (a) Cytotoxicity assay in MEF cells following 75 nM MK-1775 and 25 µM CDDP treatment for 72 h. (b) Immunohistochemistry of intestine slides of wild-type mice (WT) and constitutively Wip1-expressing transgenic mice (pUBC-Wip1) after being treated *per os* with 30 mg/kg MK-1775 2 h prior an intraperitoneal injection of 10 mg/kg CDDP. Apoptotic cells were stained with an anti-cleaved caspase-3 monoclonal antibody, and were counted in at least 100 intestine crypts per mice

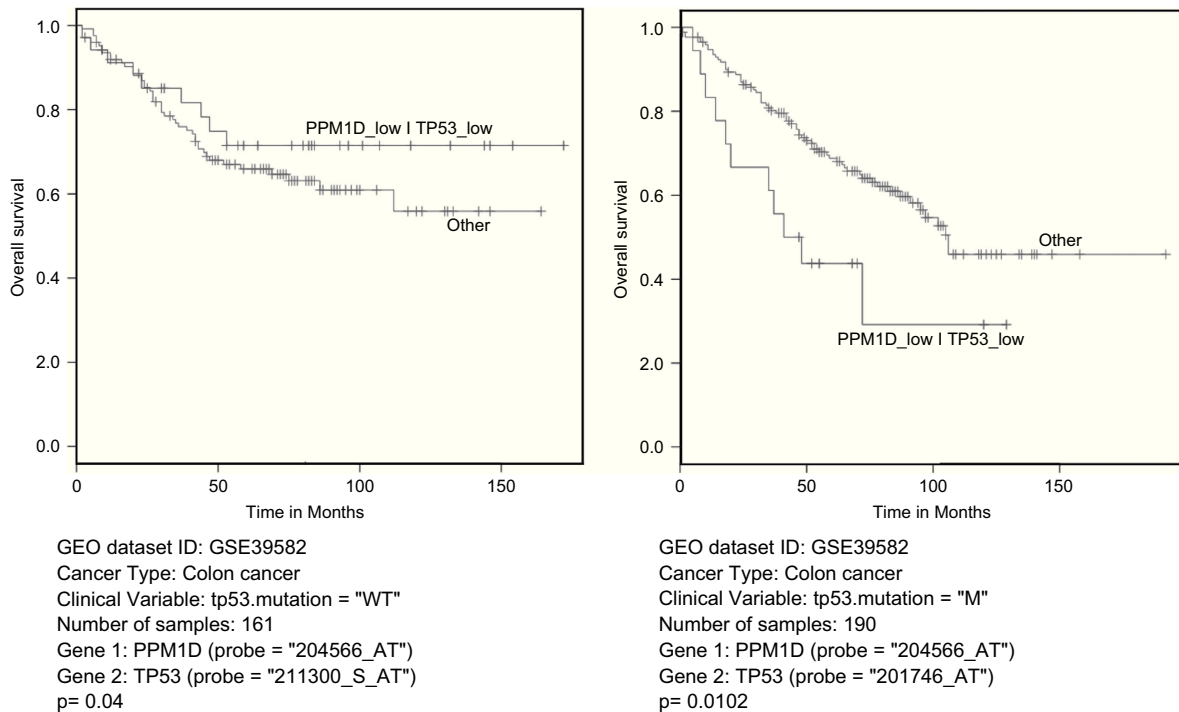


Figure 6 Wip1 positively affects survival of patients with p53-negative colorectal tumors. Bioinformatics analysis of two cohorts of patients with colon cancer. Correlation effects between overall survival of patients and PPM1D gene expression with p53 status was studied from an Affymetrix gene expression dataset, using standard A-package.

Wee1 inhibitor MK-1775 not only reduced cisplatin-induced H2AX phosphorylation in p53-negative Saos2 osteosarcoma cells, but also significantly potentiated Wip1-dependent sensitization to this chemotherapeutic drug. Importantly, we were able to achieve a reduction of the effective concentration for both drugs, CDDP and MK-1775, used in triple combination with Wip1 overexpression without diminishing their anti-tumor toxicity. This result is very interesting from the perspective of minimization of cisplatin side effects, especially acute kidney injury. Furthermore, it enhances the Wip1 overexpression protective effect on the normal tissues.

The very low non-toxic concentration of MK-1775 we used can inhibit only about 50% of Wee1 enzymatic activity.³² At this

concentration, G2 checkpoint was preserved and cells accumulate in S-phase after CDDP treatment as it was shown for Wip1-dependent sensitization of Saos2 cells.⁶ Alternatively, our data indicate that MK-1775 at low concentration could activate Wip1 pathway through deregulation of Hipk2 activity.

The effect of Wip1 overexpression depends on the p53 status of the tumor. Our *in vitro* data on the positive effects of combinatorial treatment with overexpression of Wip1, Wee1 inhibition and chemotherapy are reinforced by the bioinformatics analyses of patients with colorectal cancer. Of note, it has been shown that wild-type p53 inhibited Wee1 expression through miR-26a.⁴⁴ In tumors, where PPM1D is overexpressed,

p53-mediated expression of miR-26a is attenuated. Accordingly, we found that high expression of PPM1D in wild-type p53 tumors correlates with poor prognosis, which is in a good agreement with previously published data.^{45,46} This justifies the development of Wip1 inhibitors to enhance p53-positive tumors treatments, such as neuroblastoma.¹¹ In contrast, in p53-negative tumors, high expression of PPM1D correlates with better prognosis. This result is in line with our approach of overexpression of PPM1D in p53-negative tumors to restore chemotherapy efficiency and at the same time protecting normal tissues from side effects of the treatment. This is why developing activators of PPM1D gene expression to overexpress Wip1 is as important as its inhibitor counterpart. We believe that this new combination of Wip1 overexpression with MK-1775 chemical inhibitor, which is already in clinical trial, represents a novel and promising approach in treating patients harboring p53-negative tumors.

Material and Methods

Cell lines and cell culture. The Saos2 Tet-on cell line, human osteosarcoma cells with a tetracyclin-inducible gene expression system were purchased from Clontech, Mountain View, CA, USA. The Saos2 cells were modified to stably express Wip1 following a treatment with doxycycline (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, D9891), as described in a previous paper.⁶ Murine embryonic fibroblasts were isolated according to the standard protocol from wild-type 12-day c57-BI/6 mice. All cell lines were cultured at 37 °C with 5% CO₂ in a humidified incubator in DMEM high glucose (Dutscher, Brumath, France, L0104-500) with 10% FBS (Pan Biotech, Aidenbach, Germany, 8500-P131704) and Penicillin-Streptomycin-Amphotericin antibiotics (Pan Biotech, P06-07300). To induce Wip1, cells were treated with 1 μg/ml doxycycline 24 h prior to cisplatin (Sigma-Aldrich, P4394) and/or 75nM MK-1775 Wee1 inhibitor treatments (Axon Medchem, Groningen, The Netherlands, 955365-80-7).

High-throughput screening of human kinome and anti-γH2AX assay. Cells were reverse-transfected in 96-well plates with a Dharmacon siGENOME SMARTpool siRNA library of human protein kinases (Dharmacon, GE Healthcare Europe GmbH, Vélizy-Villacoublay, France, G-003505), a fluorescent oligonucleotide or a non-targeting siRNA as a transfection control. Two days after, the transfection condition was monitored with a fluorescent oligonucleotide duplex (Dharmacon, GE Healthcare Europe GmbH, D-001630-02-05), and cells were treated with 25 μM cisplatin. Twenty-eight hours after cisplatin treatment, cells were fixed with 4% PFA (Sigma-Aldrich, P6148-500) for 20 min, then permeabilized with 90% methanol on ice for 30 min before blocking and staining with a Alexa488-conjugated anti-H2AX monoclonal antibody (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA, 560445). After immunostaining, cells were resuspended in PBS for the high-throughput flow cytometry assay performed with the Guava EasyCyte flow cytometer (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Data obtained were analyzed using the FlowJo software. Wells transfected with a siRNA showing a modification of at least ± 40% of H2AX phosphorylation compared with non-targeting siRNA-transfected samples were classified as positive hits.

Cytotoxicity assay. Cytotoxicity of treatments have been assessed with a modified LDH-based production protocol using Promega Cytotox 96 Non-radioactive kit (Promega, Madison, WI, USA, G1780), following the manufacturer's protocol. Cytotoxicity assessment protocol has been modified following the instructions of Smith *et al.*⁴⁸

Phospho-histone H3 immunofluorescence. Cells were treated with 75 nM MK-1775 2 h before adding 100 ng/ml Nocodazole (Selleck Chemicals, Houston, TX, USA, S2775) and 25 μM cisplatin for 16 h. Cells were then fixed in 4% PFA for 20 min and blocked in 1 × PBS containing 3% BSA and 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, T8787-250) for 1 h. Alexa488-conjugated anti-phospho-H3 monoclonal antibody (Cell Signaling, Danvers, MA, USA, 9708S) has been used at a 1:50 dilution and samples were incubated overnight at 4 °C. Coverslips have been rinsed three times with 1 × PBS, then once in deionized water and mounted on slides with a DAPI-containing mounting medium (Vector, Burlingame, CA, USA, H-1200).

MitoSOX mitochondrial superoxide production assay. Mitochondrial superoxide formation was detected by flow cytometry using the MitoSOX fluorogenic dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, M36008). Briefly, after chemotherapeutic treatment of cells with CDDP, from 0 to 35 μM for 24 h, cells were collected and resuspended in HBSS (Dutscher, L0611-500) containing 2 μM MitoSOX reagent. After 15 min of incubation at 37 °C in the dark, cells were washed two times in PBS before analysis on the Guava EasyCyte cytometer (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

In vivo cytotoxicity assay of combinatory treatment. Wild-type and transgenic mice, described previously,⁴⁹ had access to food and water *ad libitum*. Animal experiments were performed following guidelines of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations. Mice received MK-1775 inhibitor at a dose of 30 mg/kg *per os* diluted in 0.5% methylcellulose (Sigma-Aldrich, M0262). Three hours after, 10 mg/kg CDDP were injected intraperitoneally. Twelve hours later, mice were killed and intestines were collected, fixed in formol for 24 h before being stored in 70% ethanol until immunohistochemistry experiment, performed with an anti-caspase-3 monoclonal antibody (R&D systems, Minneapolis, MN, USA, AF835) and visualized using Dako EnVision System-HRP (Dako, Carpinteria, CA, USA, K4010).

Clinical data correlation analysis of p53 status and PPM1D gene expression with survival of patients. A bioinformatics approach has been used, by using an Affymetrix gene expression dataset from 566 patients with colon cancer. Two cohorts have been studied, depending on the p53 status of the patients, wild-type or mutated. Correlation effects of PPM1D expression together with p53 status and survival of patients was calculated using standard A-package.

Statistics. All data are expressed as the mean ± S.E.M. and experiments have been independently repeated at least three times. Differences between two groups were assessed by Student's unpaired *t*-test performed with GraphPad Prism 6 software and data were considered significant if *P* < 0.05.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. This work was supported by ARC Foundation, Laboratoire d'excellence ARC, La Ligue Contre le Cancer CCIR-GE, Grant #14-15-00636, Russian Scientific Fund. We would like to thank Cellmap facilities for their help, especially Amandine Chlémaire and Audrey Geissler from the histology and cytology department and André Bouchot from the optical microscopy and image analysis department. We are thankful to Dr. Appella, Dr. Coussens and Dr. Bulavin for productive discussion in preparation of this MS.

1. Woods D, Turchi JJ. Chemotherapy induced DNA damage response: convergence of drugs and pathways. *Cancer Biol Ther* 2013; **14**: 379–389.
2. Marouco D, Garabadgiu AV, Melino G, Barlev NA. Lysine-specific modifications of p53: a matter of life and death? *Oncotarget* 2013; **4**: 1556–1571.
3. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; **408**: 307–310.
4. Horn HF, Vousden KH. Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* 2007; **26**: 1306–1316.
5. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 594–604.
6. Goloudina AR, Tanoue K, Hammann A, Fourmaux E, Le Guezennec X, Bulavin DV *et al.* Wip1 promotes RUNX2-dependent apoptosis in p53-negative tumors and protects normal tissues during treatment with anticancer agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: E68–E75.
7. Bridges CB. The origin of variation. *Amer Nat* 1922; **56**: 51–63.
8. Kaelin WG Jr. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**: 689–698.
9. Nijman SM. Synthetic lethality: general principles, utility and detection using genetic screens in human cells. *FEBS Lett* 2011; **585**: 1–6.
10. Goloudina AR, Mazur SJ, Appella E, Garrido C, Demidov ON. Wip1 sensitizes p53-negative tumors to apoptosis by regulating the Bax/Bcl-xL ratio. *Cell cycle* 2012; **11**: 1883–1887.
11. Goloudina AR, Kochetkova EY, Pospelova TV, Demidov ON. Wip1 phosphatase: between p53 and MAPK kinases pathways. *Oncotarget* (e-pub ahead of print 11 February 2016).
12. Demidov ON, Kek C, Shreeram S, Timofeev O, Fornace AJ, Appella E *et al.* The role of the MKK6/p38 MAPK pathway in Wip1-dependent regulation of ErbB2-driven mammary gland tumorigenesis. *Oncogene* 2007; **26**: 2502–2506.

13. Demidov ON, Timofeev O, Lwin HN, Kek C, Appella E, Bulavin DV. Wip1 phosphatase regulates p53-dependent apoptosis of stem cells and tumorigenesis in the mouse intestine. *Cell Stem Cell* 2007; **1**: 180–190.
14. Demidov ON, Zhu Y, Kek C, Goloudina AR, Motoyama N, Bulavin DV. Role of Gadd45a in Wip1-dependent regulation of intestinal tumorigenesis. *Cell Death Differ* 2012; **19**: 1761–1768.
15. Lu X, Ma O, Nguyen TA, Jones SN, Oren M, Donehower LA. The Wip1 Phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop. *Cancer Cell* 2007; **12**: 342–354.
16. Cha H, Lowe JM, Li H, Lee JS, Belova GI, Bulavin DV et al. Wip1 directly dephosphorylates gamma-H2AX and attenuates the DNA damage response. *Cancer Res* 2010; **70**: 4112–4122.
17. Shreeram S, Demidov ON, Hee WK, Yamaguchi H, Onishi N, Kek C et al. Wip1 phosphatase modulates ATM-dependent signaling pathways. *Mol Cell* 2006; **23**: 757–764.
18. Oh KS, Bustin M, Mazur SJ, Appella E, Kraemer KH. UV-induced histone H2AX phosphorylation and DNA damage related proteins accumulate and persist in nucleotide excision repair-deficient XP-B cells. *DNA Repair* 2011; **10**: 5–15.
19. Moon SH, Lin L, Zhang X, Nguyen TA, Darlington Y, Waldman AS et al. Wild-type p53-induced phosphatase 1 dephosphorylates histone variant gamma-H2AX and suppresses DNA double strand break repair. *J Biol Chem* 2010; **285**: 12935–12947.
20. Moon SH, Nguyen TA, Darlington Y, Lu X, Donehower LA. Dephosphorylation of gamma-H2AX by WIP1: an important homeostatic regulatory event in DNA repair and cell cycle control. *Cell Cycle* 2010; **9**: 2092–2096.
21. Squire CJ, Dickson JM, Ivanovic I, Baker EN. Structure and inhibition of the human cell cycle checkpoint kinase, Wee1A kinase: an atypical tyrosine kinase with a key role in CDK1 regulation. *Structure* 2005; **13**: 541–550.
22. Osman AA, Monroe MM, Ortega Alves MV, Patel AA, Katsonis P, Fitzgerald AL et al. Wee-1 kinase inhibition overcomes cisplatin resistance associated with high-risk TP53 mutations in head and neck cancer through mitotic arrest followed by senescence. *Mol Cancer Ther* 2015; **14**: 608–619.
23. Pouliot LM, Chen YC, Bai J, Guha R, Martin SE, Gottesman MM et al. Cisplatin sensitivity mediated by WEE1 and CHK1 is mediated by miR-155 and the miR-15 family. *Cancer Res* 2012; **72**: 5945–5955.
24. Nikolova T, Dvorak M, Jung F, Adam I, Kramer E, Gerhold-Ay A et al. The gammaH2AX assay for genotoxic and nongenotoxic agents: comparison of H2AX phosphorylation with cell death response. *Toxicol Sci* 2014; **140**: 103–117.
25. Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Lobrich M, Jeggo PA. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res* 2004; **64**: 2390–2396.
26. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 2001; **276**: 42462–42467.
27. Yang J, Yu Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ. ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis* 2003; **24**: 1571–1580.
28. Pabla N, Huang S, Mi QS, Daniel R, Dong Z. ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2008; **283**: 6572–6583.
29. Choi DW, Na W, Kabir MH, Yi E, Kwon S, Yeom J et al. WIP1, a homeostatic regulator of the DNA damage response, is targeted by HIPK2 for phosphorylation and degradation. *Mol Cell* 2013; **51**: 374–385.
30. Guertin AD, Li J, Liu Y, Hurd MS, Schuller AG, Long B et al. Preclinical evaluation of the WEE1 inhibitor MK-1775 as single-agent anticancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2013; **12**: 1442–1452.
31. Do K, Wilsker D, Ji J, Zlott J, Freshwater T, Kinders RJ et al. Phase I study of single-agent AZD1775 (MK-1775), a Wee1 kinase inhibitor, in patients with refractory solid tumors. *J Clin Oncol* 2015; **33**: 3409–3415.
32. Hirai H, Iwasawa Y, Okada M, Arai T, Nishibata T, Kobayashi M et al. Small-molecule inhibition of Wee1 kinase by MK-1775 selectively sensitizes p53-deficient tumor cells to DNA-damaging agents. *Mol Cancer Ther* 2009; **8**: 2992–3000.
33. De Witt Hamer PC, Mir SE, Noske D, Van Noorden CJ, Wurdinger T. WEE1 kinase targeting combined with DNA-damaging cancer therapy catalyzes mitotic catastrophe. *Clin Cancer Res* 2011; **17**: 4200–4207.
34. Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 1994; **8**: 2540–2551.
35. Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 8493–8497.
36. Pabla N, Dong Z. Curtailing side effects in chemotherapy: a tale of PKCdelta in cisplatin treatment. *Oncotarget* 2012; **3**: 107–111.
37. Lin C, Ng HL, Pan W, Chen H, Zhang G, Bian Z et al. Exploring different strategies for efficient delivery of colorectal cancer therapy. *Int J Mol Sci* 2015; **16**: 26936–26952.
38. Brewer JR, Morrison G, Eileen Dolan M, Fleming GF. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Current status and progress. *Gynecol Oncol* 2015; **140**: 176–183.
39. Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther* 2003; **1**: 47–61.
40. Ozkok A, Edelstein CL. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. *Biol Med Res Int* 2014; **2014**: 967826.
41. Reles A, Wen WH, Schmider A, Gee C, Runnebaum IB, Kilian U et al. Correlation of p53 mutations with resistance to platinum-based chemotherapy and shortened survival in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 2984–2997.
42. Perrone F, Bossi P, Cortelazzi B, Locati L, Quattrone P, Pierotti MA et al. TP53 mutations and pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin and fluorouracil chemotherapy in resected oral cavity squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 761–766.
43. McGowan CH, Russell P. Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *EMBO J* 1993; **12**: 75–85.
44. Lezina L, Purnmessur N, Antonov AV, Ivanova T, Karpova E, Krishan K et al. miR-16 and miR-26a target checkpoint kinases Wee1 and Chk1 in response to p53 activation by genotoxic stress. *Cell Death Dis* 2013; **4**: e953.
45. Peng TS, He YH, Nie T, Hu XD, Lu HY, Yi J et al. PPM1D is a prognostic marker and therapeutic target in colorectal cancer. *Exp Ther Med* 2014; **8**: 430–434.
46. Bulavin DV, Demidov ON, Saito S, Kauraniemi P, Phillips C, Amundson SA et al. Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nat Genet* 2002; **31**: 210–215.
47. Richter M, Dayaram T, Gilmartin AG, Ganji G, Gemmasani SK, Van Der Key H et al. WIP1 phosphatase as a potential therapeutic target in neuroblastoma. *PLoS ONE* 2015; **10**: e0115635.
48. Smith SM, Wunder MB, Norris DA, Shellman YG. A simple protocol for using a LDH-based cytotoxicity assay to assess the effects of death and growth inhibition at the same time. *PLoS ONE* 2011; **6**: e26908.
49. Wong ES, Le Guezennec X, Demidov ON, Marshall NT, Wang ST, Krishnamurthy J et al. p38MAPK controls expression of multiple cell cycle inhibitors and islet proliferation with advancing age. *Dev Cell* 2009; **17**: 142–149.



Cell Death and Disease is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)

SUPPLEMENTARY FIGURES LEGENDS

Figure S1: Protein levels of Wip1, Wee1 and Hipk2 after overexpression or depletion with siRNA. (A) Western blot showing level of Wip1 in the Saos2 Wip1-ON cell line vs Saos2 after a treatment with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxycycline for 24 hours. (B, C) Western blot showing level of Wee1 and Hipk2 after their depletion induced by a SMARTpool siRNA reverse-transfection. 48 hours after transfection, cells were collected, lysed and protein extract was compared to samples transfected with non-targeting control siRNA.

Figure S2: ATR inhibition decreases cisplatin-induced H2AX phosphorylation. H2AX phosphorylation is decreased by ATR inhibition induced by a reverse transfection of Saos2 osteosarcoma cells with a SMARTpool ATR siRNA. 48 hours after transfection, cells have been treated with 25 μM CDDP for 28 hours, then H2AX phosphorylation have been measured by flow cytometry.

Figure S3: Wip1 overexpression or Wee1 and Hipk2 inhibition decrease cisplatin-induced H2AX phosphorylation. Representative immunofluorescence images of Saos2 cells showing the impact of Wip1, Wee1 and Hipk2 on H2AX phosphorylation following DNA damage. Wip1 was induced by a treatment with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxycycline for 24 hours. Wee1 and Hipk2 were both inhibited by a SMARTpool siRNA reverse-transfection. 48 hours after transfection, the cells were treated with 15 μM CDDP for 28 hours before performing immunofluorescence against γH2AX , and compared to cells transfected with non-targeting control siRNA.

Figure S4: Cisplatin and MK-1775 treatment triggers pro-apoptotic signaling in Saos2 Wip1-ON cells resulting in caspase-3 activation in S-phase. Flow cytometry analysis of BrdU/active caspase-3 co-staining of Saos2 cells. The triple combination (15 μ M CDDP, 1 μ g/mL doxycycline and 75 nM MK-1775) was applied to cells for 48 hours. 1 hour before the end of the treatment, 10 μ M of BrdU were added to the culture medium.

Figure S5: Triple combination is efficient in inducing cleaved-PARP in p53-negative Saos2 cells. Western blot showing level of cleaved-PARP in Saos2 osteosarcoma cells after 15 μ M CDDP \pm 1 μ g/mL doxycycline \pm 75 nM MK-1775 for 48 hours, compared to non treated control cells. Densitometry analysis has been done with ImageJ software.

Figure S6: Wee1 inhibitor MK-1775 does not affect the protective effect of Wip1 overexpression in mice intestines. Representative images of immunohistochemical analysis of active caspase-3 staining in intestinal crypts of wild type mice (WT) and constitutively Wip1-expressing transgenic mice (pUBC-Wip1) after being treated *per os* with 30 mg/kg MK-1775 2 hours prior an intraperitoneal injection of 10 mg/kg CDDP.

Supplementary figures will be displayed one per page, from supplementary figure 1 to supplementary figure 6.

Supplementary figure 1: page 133

Supplementary figure 2: page 134

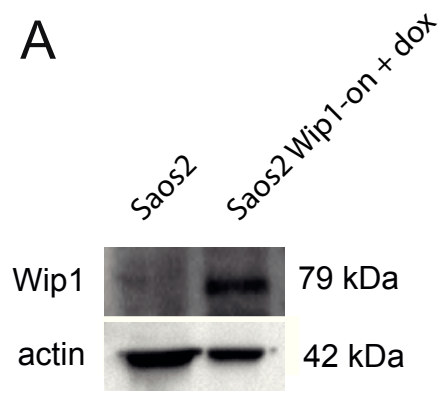
Supplementary figure 3: page 135

Supplementary figure 4: page 136

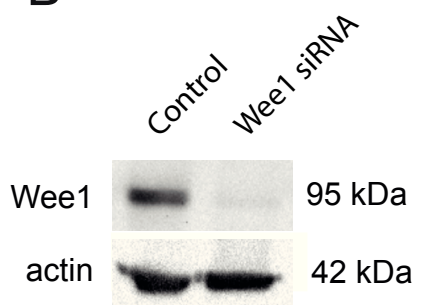
Supplementary figure 5: page 137

Supplementary figure 6: page 138

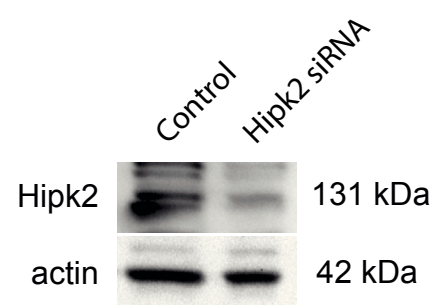
A

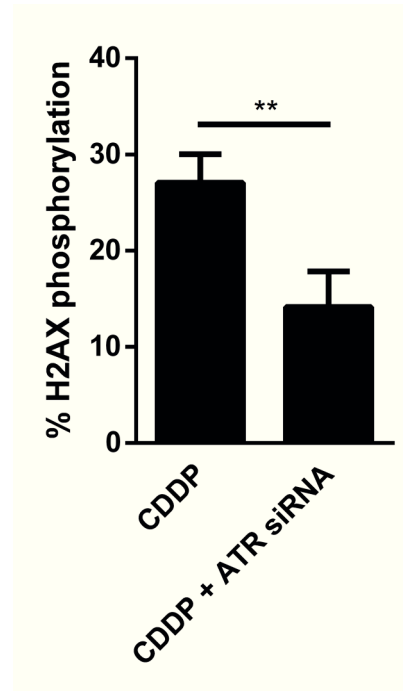
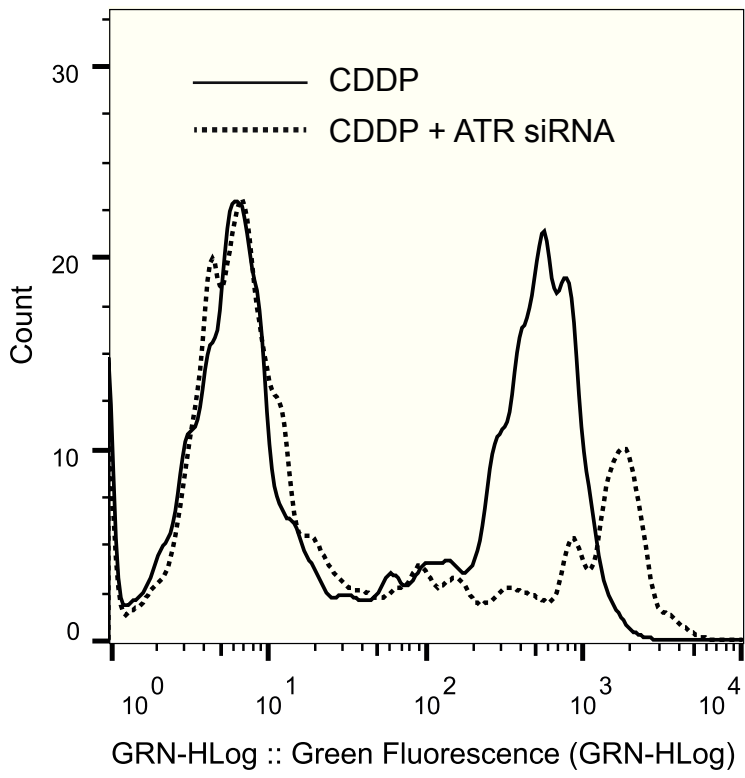


B



C

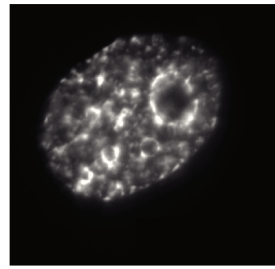
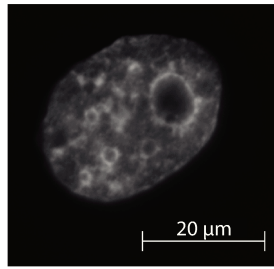




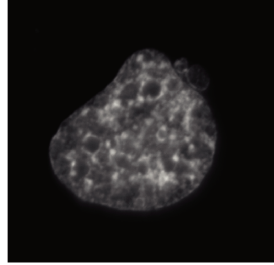
DAPI

γ H2AX

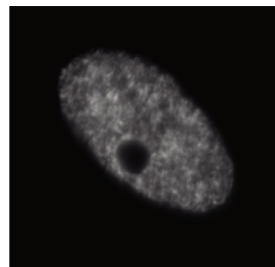
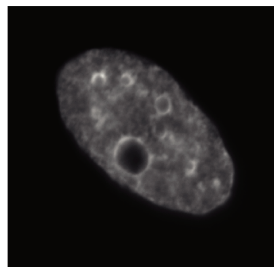
Saos2



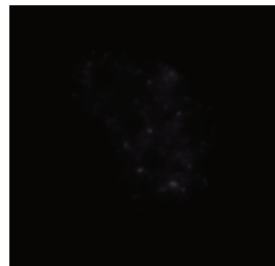
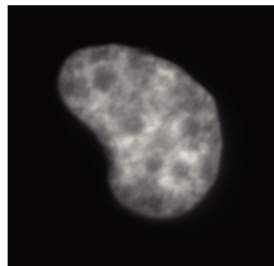
Saos2 Wip1 on+ dox



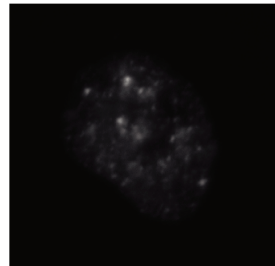
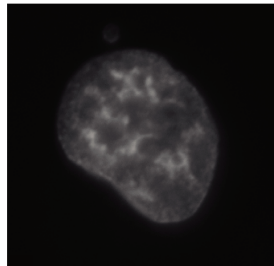
NT siRNA



Wee1 siRNA

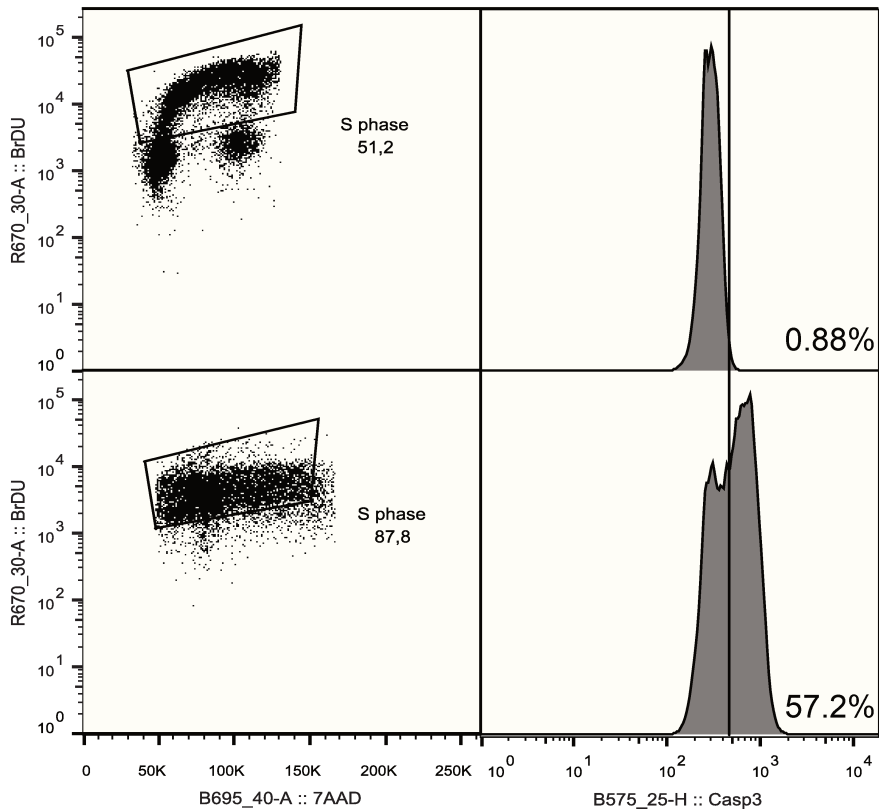


Hipk2 siRNA

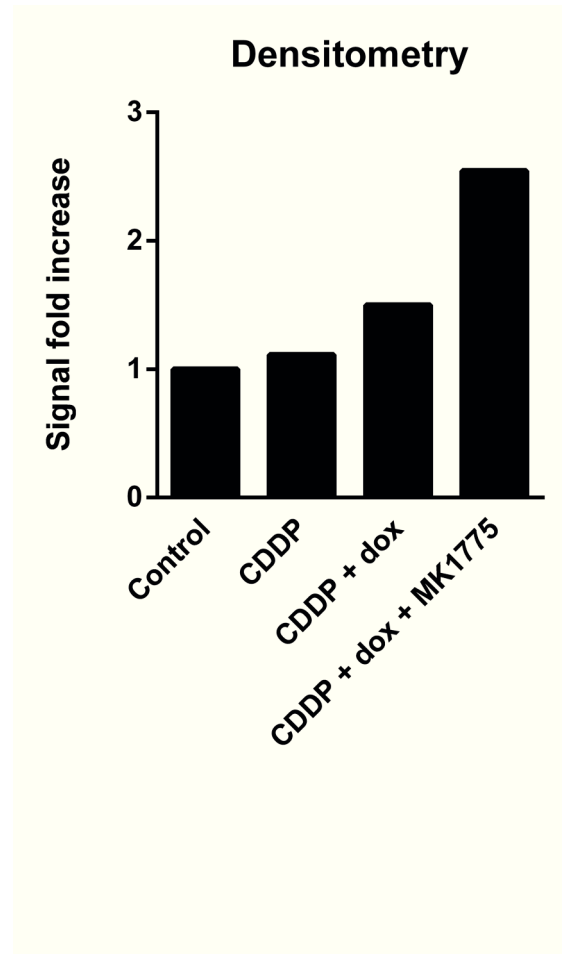
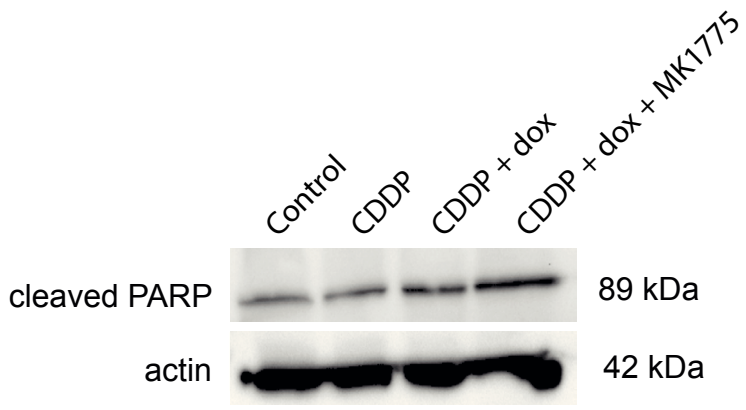


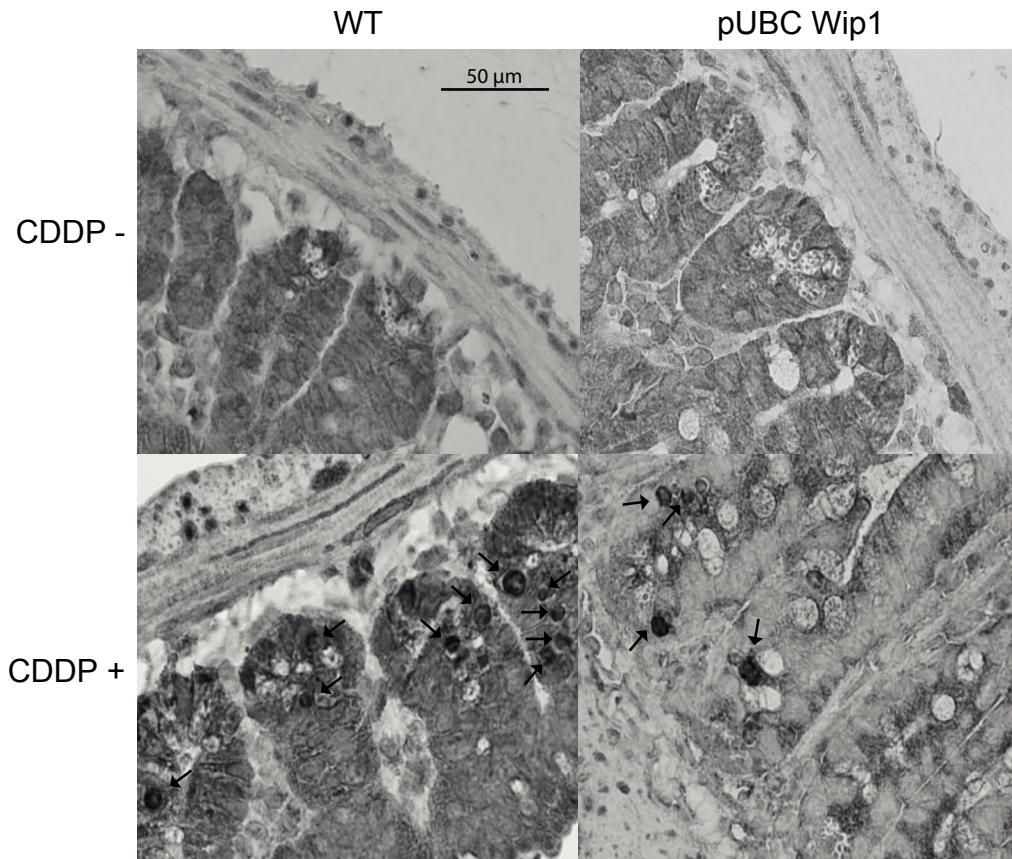
active caspase 3

Control



CDDP
+ dox
+ MK1775





SUPPLEMENTARY MATERIAL

γ H2AX immunofluorescence

Cells were treated either with 1 μ g/mL doxycycline for 24 hours, or transfected with Wee1, Hipk2 SMARTpool siRNA or NT siRNA (Dharmacon, GE Healthcare Europe GmbH, France, M-005050-02, M-003266-03 and D-001210-02-05 respectively). 48 hours after transfection, the cells were treated with 15 μ M CDDP for 28 hours before performing immunofluorescence against γ H2AX. Cells were fixed in 4% PFA for 20 minutes and blocked in 1X PBS containing 3% BSA and 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA, T8787-250) for 1 hour. Alexa488-conjugated anti-H2AX monoclonal antibody (BD Pharmingen, USA, 560445) has been used at a 1:200 dilution and samples were incubated overnight at 4°C. Coverslips have been rinsed three times with 1X PBS, then once in deionized water and mounted on slides with a Dapi-containing mounting medium (Vector, H-1200).

BrdU and active caspase-3 flow cytometry

Flow cytometry analysis of BrdU/active caspase-3 was done in Saos2 osteosarcoma cells. The triple combination (15 μ M CDDP, 1 μ g/mL doxycycline and 75 nM MK-1775) was applied to cells for 48 hours. The BD-Pharmingen BrdU flow kit (BD Pharmingen, USA, 552598) was used, with APC anti-BrdU and PE anti active-caspase 3 antibodies (BD Pharmingen, USA, 51-23619L and 550821 respectively). The experiment was performed following manufacturer's protocol.

Western Blot antibodies

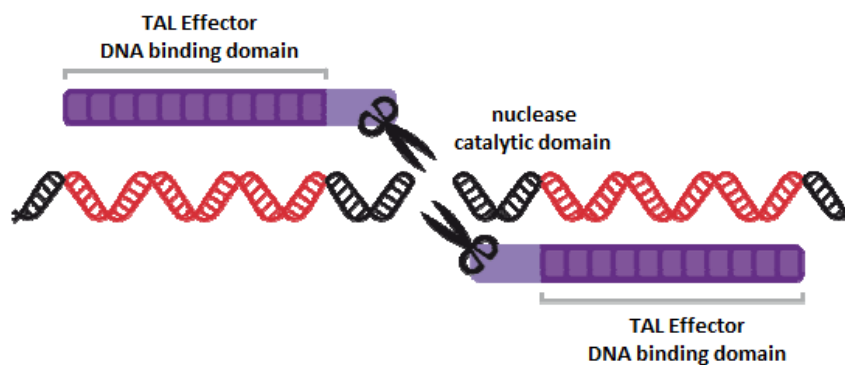
Wip1 monoclonal antibody was purchased from Santa Cruz (Santa Cruz, USA, sc376257). Wee1 antibody was purchased from Cell Signaling (CST, USA, 13084T). Hipk2 antibody has been provided by Dr. Ettore Appella (NIH, Bethesda, USA). Cleaved PARP was purchased from Cell Signaling (CST, USA, 5625).

2. Création des TALEN™ ciblant le promoteur de Wip1 par Collectis Bioresearch.

1. Technology background

a. Overview of the TALEN™ technology

Transcription Activator-Like Effector Nucleases are a novel class of sequence-specific endonucleases. A TAL Effector Nuclease is composed of a TAL Effector DNA-binding domain fused to the catalytic domain of an endonuclease. A functional TALEN™ is defined as a heterodimer of two TAL Effector Nucleases.



b. Overview of the homologous recombination process

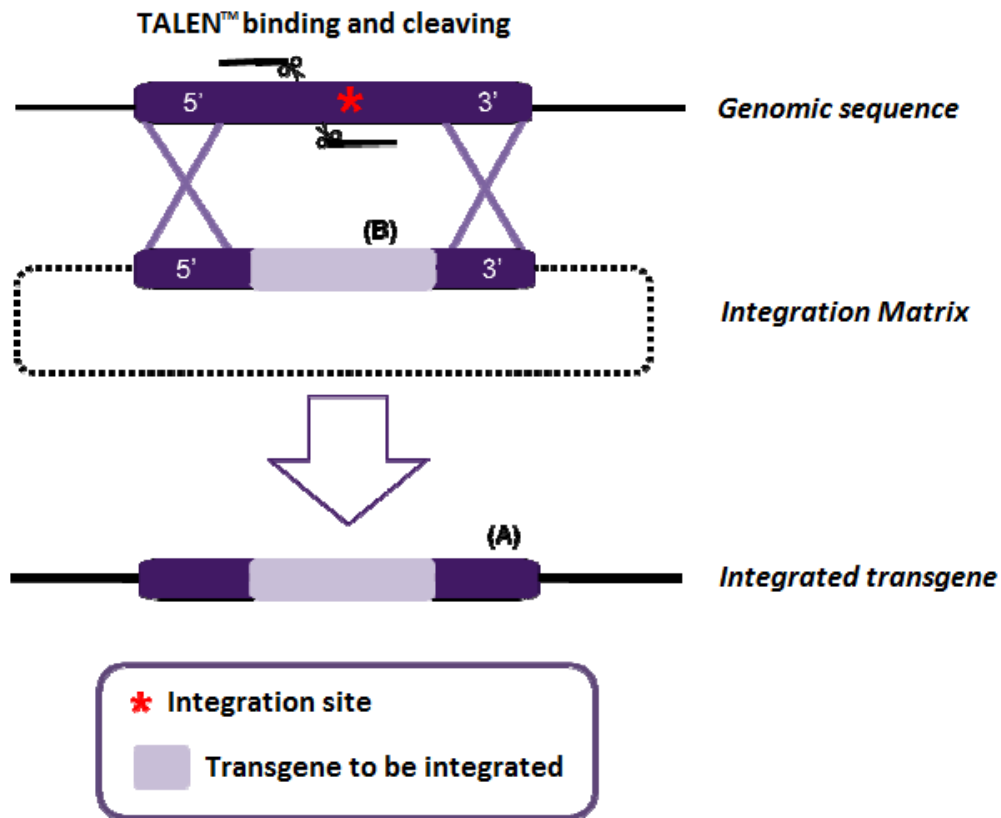
Since the first gene targeting experiments in yeast more than 25 years ago (1, 2), homologous recombination has been used to integrate, replace or delete genomic sequences in a variety of cells (3-5). However, targeted events occur at a very low frequency in mammalian cells. The frequency of homologous recombination can be significantly increased by a specific DNA double-strand break (DSB) at the targeted locus (6,7). The frequency of such DSBs is highly increased by sequence-specific endonucleases, such as TALENs™. Also, the recovery of the desired recombination events is highly increased by the use of selection agents during homologous recombination. Combining increased specific genomic sequence cleavage and the use of selection agents in the most powerful combination for gene targeting.

c. Targeted transgene integration principle

For a targeted transgene integration project, the DSB should occur as close as possible to the position of the chosen integration site. The design of an Integration Matrix is essential to perform the targeted transgene integration. The Integration Matrix is a plasmid whose contains two regions of sequence homologous to the targeted genomic sequence (5' and 3' homologous sequences). Between these two homologous regions is located a heterologous sequence: the transgene to be integrated. By homologous recombination, the transgene, cloned in the Integration Matrix in between the homology regions, is integrated at the TALEN™ recognition site (Figure 1A).

It has been reported by us and by others that about 500 nucleotides of homology for each homology arms are sufficient to obtain a good efficiency of recombination. The transgene to be integrated should be centered within the sequence flanked by the regions of homology (Figure 1B).

Targeted Integration



Example of an Integration Matrix for a targeted transgene integration near a TALEN™ recognition site. (A)DSB-stimulated homologous recombination at the TALEN™ recognition site enables targeted transgene integration; (B) The transgene to be integrated is centered within the regions of homology.

2. Choice of the custom TALEN™ pair

Human PPM1D

aagaaaagccctcgcgcggtcgtgtctcagccgttgctccgcgccgctgccgccccttcccggcggcgaagtctcgggaaaggcccagcggtg
 gcagcccagaggctcgcgaccctctccggacgcccggcctcgcggcacctagccgctgctgccgcccgttctccgtggccttttcgcggtgacgacg
 ggcacggcggcgggaggcggca cagtttcccgggagca cttgtggggttcatcaagaagcagaagggtttcacctcgtcc

The TALEN™ pair is underlined

The left TAL effector DNA-binding domain is in red

The right TAL effector DNA-binding domain is in blue

3. Schematic view of the Integration Matrix

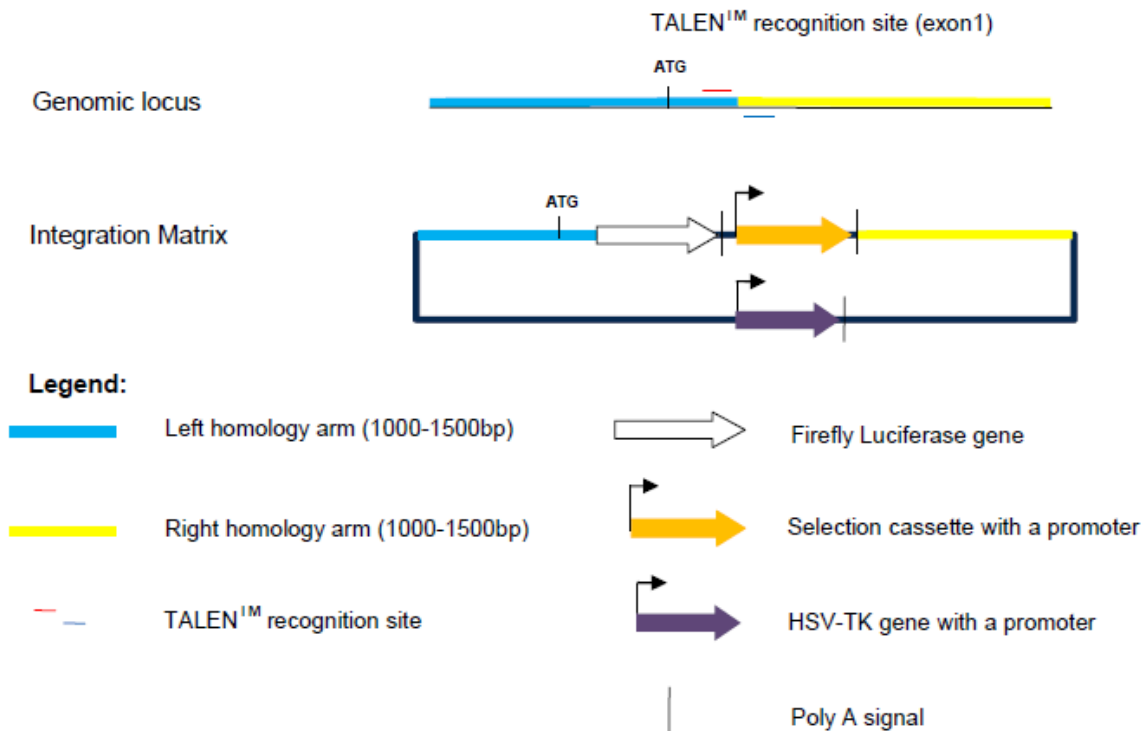
Left homology arm (1000-1500bp)

Firefly Luciferase gene

Selection cassette

Right homology arm

Suicide gene

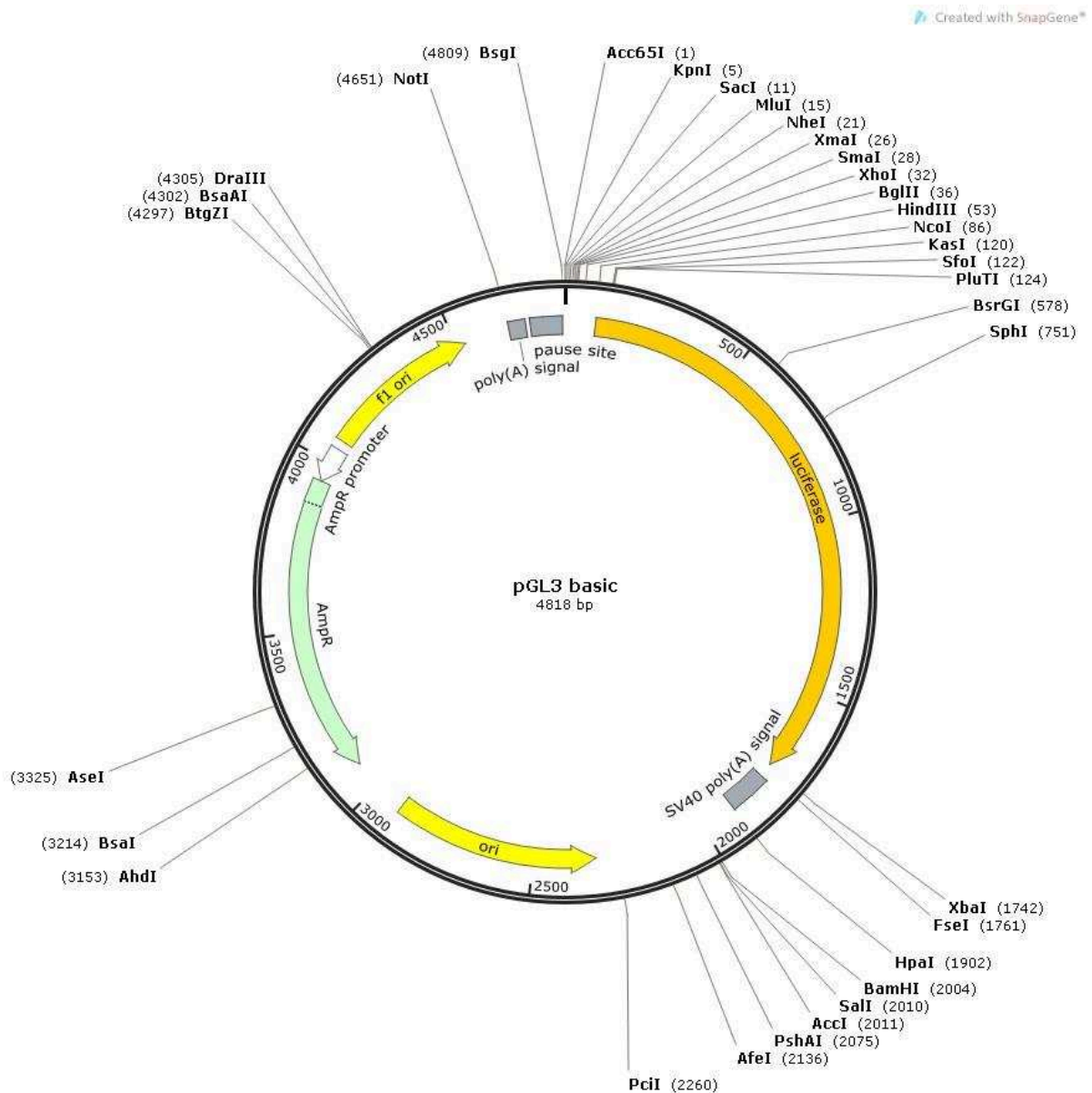


References:

1. Hinnen, A., Hicks, J. B., and Fink, G. R. (1978) Transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 1929-33.
2. Rothstein, R. J. (1983) One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* 101, 202-11.
3. Thomas, K. R., and Capecchi, M. R. (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryoderived stem cells. *Cell* 51, 503-12.
4. Capecchi, M. R. (2001) Generating mice with targeted mutations. *Nat Med* 7, 1086-90.
5. Smithies, O. (2001) Forty years with homologous recombination. *Nat Med* 7, 1083-6.
6. Rouet, P., Smih, F., and Jasin, M. (1994) Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol* 14, 8096-106.
7. Choulika, A., Perrin, A., Dujon, B., and Nicolas, J. F. (1995) Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15, 1968-73.

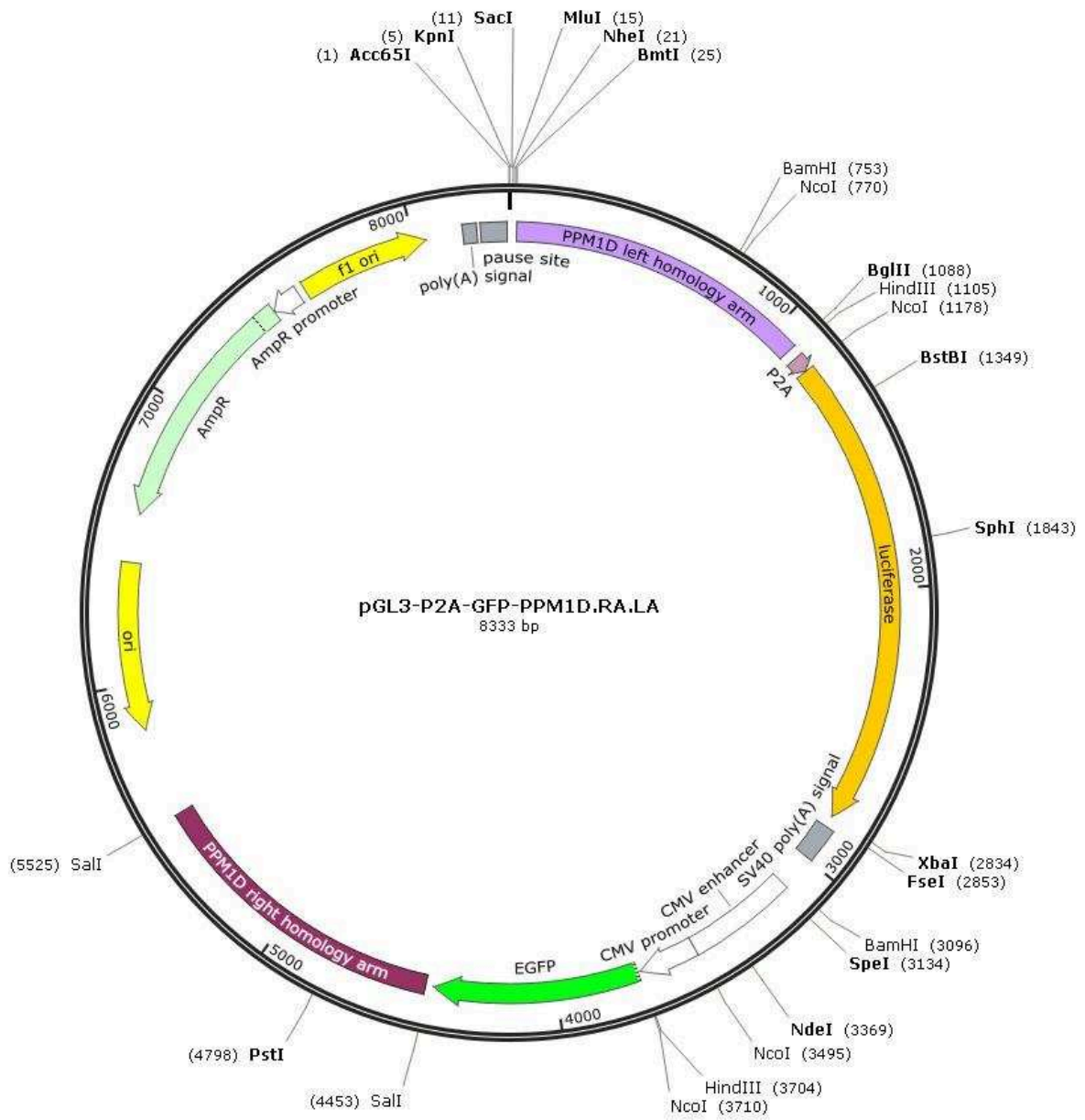
3. Cartes des deux matrices d'intégrations créées pour la technologie TALEN™.

a. Vecteur d'origine



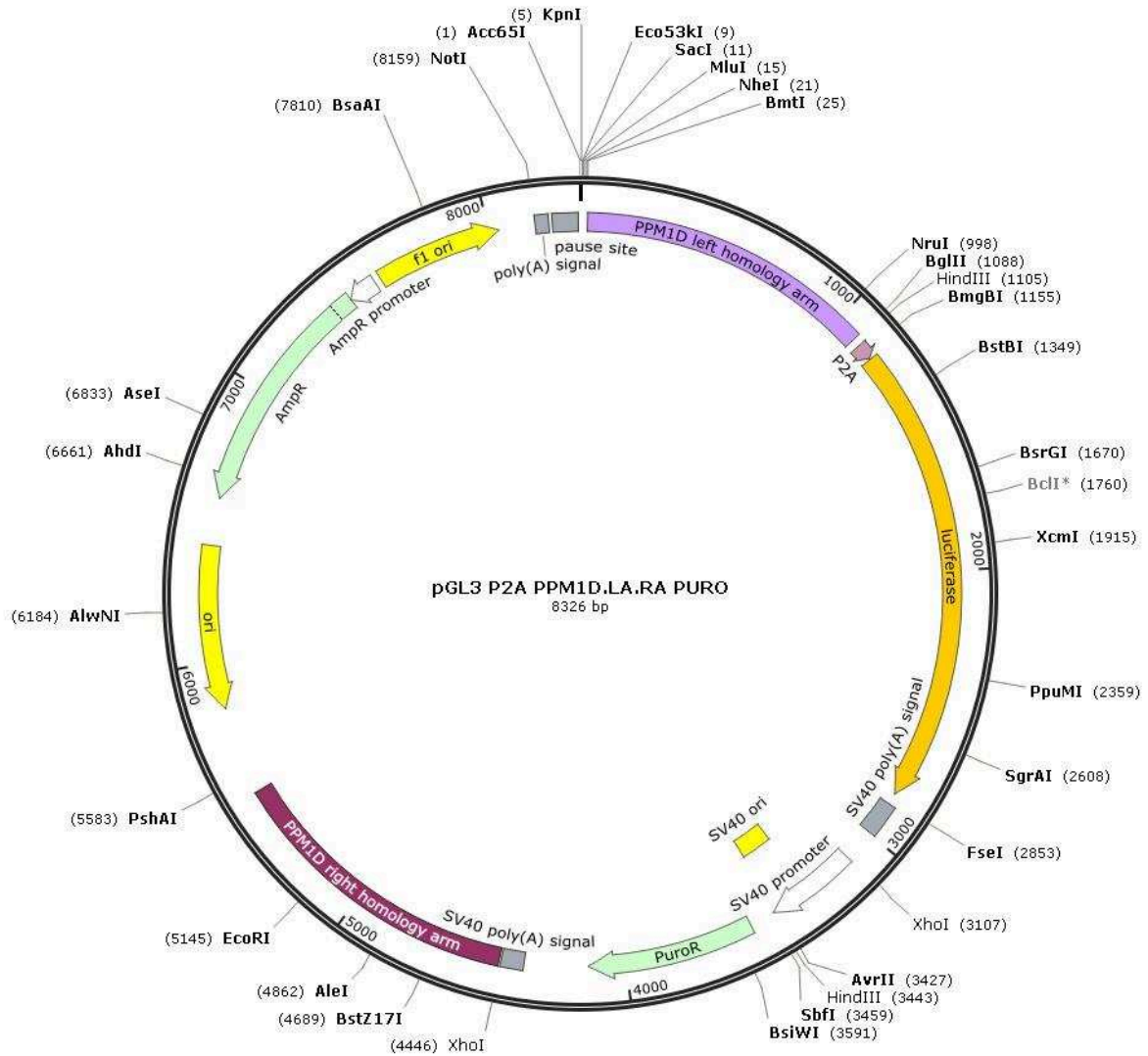
b. Matrice GFP

Created with SnapGene®



c. Matrice Puromycine

Created with SnapGene®



4. Stratégie de clonage employée

Step 1 : P2A construction and insertion in frame with Luciferase in pGL3 basic

P2A construction : Order custom oligos

Forward primer :

AGCTTGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTG
C

Reverse primer :

CATGGCAGGTCCAGGGTTCTCCTCCACGTCTCCAGCCTGCTTCAGCAGGCTGAAGTTAGTAGCTCCGCTTCCA

The oligos should be resuspended in annealing buffer (10mM Tris, pH7.5-8.0, 50mM NaCl, 1m EDTA) and mixed in equimolar concentrations. Mix 2µg of each in a total volume of 50µL - add additional annealing buffer if necessary to get to 50µL.

Efficient annealing can be achieved by one of two methods:

Method 1. Place the mixed oligos in a 1.5mL microfuge tube

- Place the tube in 90-95°C hot block and leave for 3-5 minutes.
- Remove the hot block from the heat source (turn off or move block to bench top) allowing for slow cooling to room temperature (~45 minutes).

Method 2. Place mixed oligos in a PCR tube

- Place the tube in a thermocycler programmed to start at 95°C for 2 minutes.
- Then, gradually cool down to 25°C over 45 minutes.

Annealing of the primer to create the P2A insert, surrounded by HindIII and NcoI sites :

```
AGCTTGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTGC
|||||
ACCTTCGCCTCGATGATTGAAGTCGGACGACTTCGTCCGACCTCTGCACCTCCTCTTGGGACCTGGA
```

Insertion of P2A into pGL3 basic

- Cut the vector, so digest 1µg of pGL3 with HindIII and NcoI enzymes, overnight
- Run an agarose gel with GelGreen and cut out the band containing the vector DNA : 4791 bp
- Gel purify the DNA away from agarose using the Gel Extraction Kit from Qiagen

Ligation : subcloning

- Dilute 5µL of annealed oligos in 45µL of nuclease-free water and quantify the concentration (should be about 8ng/µl).
- Mix the annealed oligos with cut vector in ratios between 4:3 and 6:1 (ie 100ng vector with between 75-600ng annealed oligos) in a standard ligation reaction (T4 LIGASE).
- Transform 2.5µL into Top10 bacteria and plate.
- Be sure to pick multiple colonies for mini-prepping and verify insert by sequencing.

Check by sequencing

Step 2 option 1 : Plasmid cloning by restriction enzyme digest – subcloning

Donor plasmid : pinco – enzymatic digestion with BamHI + Sall

Insert = BamHI ^ CMV-GFP ^ Sall

Recipient plasmid : pGL3 P2A Luc → pGL3 P2A Luc CMV GFP

Warning: there is no space between the two restriction sites of BamHI and Sall on pGL3

```
g^gatccg^tcgac
cctag^gcagct^g
```

Sall needs at least 18 nucleotides after the restriction site to cut efficiently. BamHI only 2. So to avoid any digestion problems, cut firstly Sall, then BamHI.

Digestion procedure :

- Digest pinco GFP with BamHI + Sall, overnight.
- Cut pGL3 with Sall, overnight. Control the digestion with a gel, one well with some digestion product, and one control well with the origin plasmid.
- If control is ok, cut the first product with BamHI, for 3 hours. Do a control digestion at the same time with the non-Sall-cut, origin plasmid. Load on a gel the two digestions.
- If the control BamHI digest seems linearized, it should be the same for the previously Sall-cut plasmid. If it's not the case, incubate longer.
- Purify your double digested product.
- Proceed with the subcloning (aka T4 ligation)
- In parallel, run a T4 ligation with only the digested pGL3 vector without any insert, as a control, then transform competent cells also with this control. If too much colonies grow, this means that one cut was not efficiently made, allowing recircularization of the plasmid (→ decrease in cloning efficiency)

Step 2 option 2 – STRATEGY 1 – : Subcloning

Insertion of MB80 Puro cassette (surrounded by NheI and XbaI) in XbaI site. Indeed, NheI and XbaI are compatible and can ligate together.

Advantage : easy to do, another subcloning

Disadvantage : Shift of after-Luc-polyA sequence. But could be still ok.

Insertion of the cassette

- Cut the MB80 vector, so digest 1µg of MB80 with XbaI and NheI enzymes, overnight
- Run an agarose gel with GelGreen and cut out the band containing the insert DNA : ~2kb
- Gel purify the DNA away from agarose using the Gel Extraction Kit from Qiagen
- Linearize the pGL3 P2A Luc CMV GFP vector with XbaI
- Ligate the insert with T4 ligase rxn

Step 2 option 2 – STRATEGY 2 – : Blunt Cloning

Blunt cloning of MB80 Puro cassette into BamHI site

Advantage : will save after-Luc-PolyA sequence

Disadvantage : blunt cloning, so more false positive clones → bidirectional cloning

Procedure :

- Cut the MB80 vector, so digest 1µg of MB80 with XbaI and NheI enzymes, overnight
- Run an agarose gel with GelGreen and cut out the band containing the insert DNA : ~2kb
- Gel purify the DNA away from agarose using the Gel Extraction Kit from Qiagen
- Linearize the pGL3 P2A Luc CMV GFP vector with BamHI

Blunting of vector and insert

- In some instances the ends of the insert or vector require blunting
- T4 DNA Polymerase ([NEB #M0203](#)) or Klenow ([NEB #M0210](#)) will fill in a 5' overhang and chew back a 3' overhang
- The Quick Blunting Kit ([NEB #E1201](#)) is optimized to blunt and phosphorylate DNA ends for cloning in less than 30 minutes
- Analyze agarose gels with longwave UV (360 nm) to minimize UV exposure that may cause DNA damage

Blunting with the Quick Blunting Kit

Blunting Buffer (10X)	2.5 µl
DNA	Up to 5 µg
dNTP Mix (1mM)	2.5 µl
Blunt Enzyme Mix	1 µl
Nuclease-free Water	To 25 µl
Incubation	15 minutes for RE-digested DNA/sheared or 30 minutes for nebulized DNA or PCR products
Heat Inactivation	70°C for 10 minutes

* PCR-generated DNA must be purified before blunting using a commercial purification kit, phenol extraction/ethanol precipitation or gel electrophoresis

- Ligate with T4 reaction

Step 3 : PCR cloning - Right arm cloning with Sall site

Right arm for Sall – Forward primer :

CCCATGTTTTTGGAg**tcgac**AGTTTGCCCGGAGCACTTGT

Right arm for SalI – Reverse primer :

CATTAACACTTAGTG**tcgac**AATGTTGGGCACAGAAATCCT

SEQUENCE of right arm after PCR :

CCCATGGTTTTTGGAG**GTCGAC**AGTTTGCCCGGGAGCACTTGTGGGGTTTCATCAAGAAGCAGAAGGGTTTCAC
CTCGTCCGAGCCGGCTAAGGTTTGCCTGCCATCCGCAAAGGCTTTCTCGCTTGTACCTTGCCATGTGGAAGA
AACTGGGTAAGTTCCTGGCTTGTGGCGCCCGCCCTTTTTCAGGCAGTTCAGGGCTTTTATGGCACCAGCC
CCGCGTGGGCCCCGGCACCCAGAGCGCAACCAAAGTATACACTGATGGAAGTACTAAAAGCTGTAATAGC
GCTTTGCTGGGTGGAGGTCCGGGCAAACCAAGCGCCTTGGGGAAGATAGGATTGCCGTCTCCCTGCAGCCT
ATTCTTGCTTTATTTCCATCCTCCAAGGATCAATGGGAAGCAGTCCACTCCCTTCCCTGCTTCACTTTGGTGGCA
ACCAGAGGAAACGTGTTTGAACCTGGCGCCAGATTTTGGCCAAAAGATAAATCGATGTTGCACCTGGGCCAG
GCGAAGGAAAACTGTAGTGTTCCTTAGAGAATCTGTCATAATTCTGCTCCTGAAAGTCTTATCCCTCTCGGTT
GCCTCTACCGGTGGTGTCACTTCCAGATTGACCCGGGATTGCTGGGGTTGGTTGCTGGAGTAAAGCGTAA
GCTAATTTAGAAGGGCTGAAACGTAACCATCCGGCAACTTAAAGTTTTGGAAGGAATTCCGTTGTAATGATGG
TGAGATGTTTTTAGGATCATAAACCTGTACTGCTTATGAAAACGCGAACGTGTTGTTACCTCTTAA
AAACTGGCCCCGTGTTAAGGGTGTGCGTTAGATTCTGCTTGGGTTTTCTTTTGGAAATTGCCTTAGCTGATTG
CTTTCAGATAGTTCCCAACCGGTTGTTCTAGTTTAAAAGTACTTATAAATTGTAAGTCCCATCAAAAATAAGA
AAAGGCAAGGAATTACTGTATGCTAGAAGGAAATAAAGGTCTTAAATGTCTAAAATTTCCGGTGTAGTTGTAG
TTTCATCTAAGTTTTTTTAAATGTTTGTAAAGCAGGCAGGATTTCTGTGCCAACATT**GTCGAC**CACTAAGTGT
AATG

Then, standard restriction cloning cloning

Purify the PCR product

Linearize pGL3 P2A GFP/Puro vector with Sall (overnight)

➔ T4 ligase Reaction

Step 4 : PCR cloning - Left arm cloning with BglII site

Left arm for BglII – Forward primer :

TTTCTCTATCGATAT**agatct**CCTCCATTCCAGTCGAATAC

Left arm for BglII – Reverse primer :

CGTAGTTAGTATGCC**agatct**GTCGCACACGGCGAAAAAGGC

SEQUENCE of Left arm after PCR :

TTTCTCTATCGATAT**AGATCT**CCTCCATTCCAGTCGAATACGTCCCACCCAGATCCAGCTCAAGGGTGCAGCAC
TTGTTCCGGCCAGCTCACAATCGCCCTTTGGAAGGGAGGTTTCCCGCCATTTGCTTAGGAGGAGGGTGAAC
CTTCTCCCTTCACTTCCACTCGCTGGGGGCCCCGAGCCACACCACCTTCTAGCAAAGCAAGCAGCGGGACGC
CAAGGCCAGCAGGCCGATTAAGAACGCTGGACTGAGCCAAAAGCCTACACAGACCAAGCCGCTCGGAAAG
GATCAACAAGTCCGACAACCCGAGGGCGAAAACGCCGCGGCGTAGGGGAAGCAAAGTGGAGATGCGC
GGGCCAGCGCCAGCGGGGAGGAGGCAGCGCGCCGTCGCAGGGGGAGCGAAGGCGGGGACGGAGG
GCGGGCTCGTCCACTCGACTCCGGATTGGTCGAGCTTAGAGAGCCGAGTGACGTCAGCGGGGGAGAACGCC
TGATTTGTGTGGTGGGCGCGGGCGGTGGGGGAAGCGCAGTGCAGGCGCAACTGCCTGGCTCTGCTCGC
TCCGGCGCTCCGGCCAGCTCTCGCGACAAGTCCAGACATCGCGCGCCCCCTTCTCCGGTCCGCCCCCTC
CCCCTTCTCGGCGTCTCGAAGATAACAATAGTTGGCCGGCGAGCGCCTAGTGTGTCTCCCGCCGCGGATT
CGGCGGGTGCCTGGGACCGCGGGATCCCGCCAGCCGGCCATGGCGGGGCTGACTCGCTGGGAGTGAG
CGTCTTCTCCGACCAGGGCGGGAGGAAGTACATGGAGGACGTTACTCAAATCGTTGTGGAGCCGAACCGAC
GGCTGAAGAAAAGCCCTCGCCGCGGCGGTGCTGTCTAGCCGTTGCCTCCGCGCCGTCGCCGGCCGCCCTT
CCCGCGGCGAAGTCTCGGGGAAAGGCCAGCGGTGGCAGCCCGAGAGGCTCGCGACCCTCTCCCGGACGC

CGGGCCTCGCCGGCACCTAGCCGCTGCTGCCGCCGCGTTCCTCCGTGGCCTTTTTCGCCGTGTGCGACAGAT
CTGGCATACTAACTACG

Then, standard restriction cloning

Purify the PCR product

Linearize pGL3 P2A RA GFP/Puro vector with BglII (overnight)

→ T4 ligase Reaction

5. Liste des composés chimiques criblés pour la recherche d'activateurs de la transcription de *PPM1D*.

Référence de la banque : *FDA-approved drug library*, Selleck Chemicals, L1300

Liste des composés chimiques criblés (Référence – Nom) par ordre alphabétique :

S3188 (+,-)-Octopamine HCl
S4301 (R)-(+)-Atenolol
S3072 (R)-baclofen
S2409 10-DAB (10-Deacetylbaicatin)
S4173 1-Hexadecanol
S1233 2-Methoxyestradiol
S3100 2-Thiouracil
S2553 5-Aminolevulinic acid hydrochloride
S4303 9-Aminoacridine
S3165 Abacavir sulfate
S1123 Abiraterone (CB-7598)
S2246 Abiraterone Acetate (CB7630)
S1210 Abitrexate (Methotrexate)
S1802 Acadesine
S1271 Acarbose
S4010 Acebutolol HCl
S4376 Aceclidine HCl
S2602 Acemetacin (Emflex)
S2538 Acetanilide (Antifebrin)
S4386 Acetarsonsone
S1805 Acetylcholine chloride
S1623 Acetylcysteine
S1806 Acipimox
S1368 Acitretin
S4031 Aclidinium Bromide
S1807 Acyclovir (Aciclovir)
S1276 Adapalene
S1718 Adefovir Dipivoxil (Preveon, Hepsera)
S1981 Adenine
S1983 Adenine hydrochloride
S1982 Adenine sulfate
S1647 Adenosine (Adenocard)
S2082 Adiphenine HCl
S3185 Adrenalone HCl
S1209 Aducril (Fluorouracil)
S1011 Afatinib (BIBW2992)
S1243 Agomelatine

S1640 Albendazole (Albenza)
S1836 Albendazole Oxide (Ricobendazole)
S1624 Alendronate (Fosamax)
S4302 Alexidine HCl
S1468 Alfalcaldol
S1409 Alfuzosin hydrochloride (Uroxatral)
S1928 Alibendol
S2199 Aliskiren hemifumarate
S1630 Allopurinol (Zyloprim)
S4017 Allylthiourea
S2096 Almotriptan malate (Axert)
S1508 Alprostadil (Caverject)
S3167 Altrenogest
S1278 Altretamine (Hexalen)
S3054 Alverine Citrate
S2451 Amantadine hydrochloride (Symmetrel)
S2097 Ambrisentan
S2452 Amfebutamone (Bupropion)
S4149 Amfenac Sodium (monohydrate)
S1260 AMG-073 HCl (Cinacalcet hydrochloride)
S3209 Amidopyrine
S3122 Amikacin hydrate
S3065 Amikacin sulfate
S1811 Amiloride hydrochloride (Midamor)
S2560 Amiloride hydrochloride dihydrate
S1671 Aminocaproic acid (Amicar)
S1672 Aminoglutethimide (Cytadren)
S1673 Aminophylline (Truphylline)
S4073 Aminosalicylate sodium
S4198 Aminothiazole
S1979 Amiodarone HCl
S1280 Amisulpride
S3183 Amitriptyline HCl
S1905 Amlodipine (Norvasc)
S1813 Amlodipine besylate (Norvasc)
S2376 Ammonium Glycyrrhizinate (AMGZ)
S1676 Amorolfine Hydrochloride
S4218 Amoxapine
S3015 Amoxicillin (Amoxycillin)
S2565 Amoxicillin sodium (Amox)
S1636 Amphotericin B (Abelcet)
S3170 Ampicillin sodium
S4148 Ampicillin Trihydrate
S4011 Ampiroxicam
S1639 Amprenavir (Agenerase)
S4144 Amprolium HCl

S3172 Anagrelide HCl
S1188 Anastrozole
S1281 Aniracetam
S4304 Anisindione
S4305 Anisotropine Methylbromide
S4199 Antazoline HCl
S3173 Antipyrine
S2221 Apatinib (YN968D1)
S1593 Apixaban
S1189 Aprepitant (MK-0869)
S2120 Arbidol HCl
S2614 Arecoline
S2069 Argatroban
S1975 Aripiprazole (Abilify)
S2264 Artemether (SM-224)
S1282 Artemisinin
S3150 Articaine HCl
S1283 Asenapine
S2036 Aspartame
S3017 Aspirin (Acetylsalicylic acid)
S1457 Atazanavir sulfate
S3175 Atomoxetine HCl
S2077 Atorvastatin calcium (Lipitor)
S3079 Atovaquone (Atavaquone)
S1985 ATP (Adenosine-Triphosphate)
S1832 Atracurium besylate
S2130 Atropine
S4307 Auranofin
S4019 Avanafil
S1904 Avobenzone (Parsol 1789)
S1005 Axitinib
S1782 Azacitidine (Vidaza)
S3196 Azacyclonol
S4194 Azaguanine-8
S4219 Azaperone
S2106 Azasetron HCl (Y-25130)
S3186 Azatadine dimaleate
S1721 Azathioprine (Azasan, Imuran)
S2552 Azelastine hydrochloride (Astelin)
S3053 Azelnidipine
S3046 Azilsartan (TAK-536)
S3057 Azilsartan Medoxomil (TAK-491)
S1835 Azithromycin (Zithromax)
S4147 Azithromycin Dihydrate
S3195 Azlocillin sodium salt
S1505 Aztreonam (Azactam, Cayston)

S4146 Bacitracin
S1791 Bacitracin zinc
S2064 Balofloxacin
S2128 Bazedoxifene HCl
S3078 Beclomethasone dipropionate
S4383 Bekanamycin
S4197 Bemegride
S1284 Benazepril hydrochloride
S1212 Bendamustine HCL
S4387 Bendroflumethiazide
S4300 Benfotiamine
S2017 Benidipine hydrochloride
S2453 Benserazide
S4388 Bentriomide
S4221 Benzbromarone
S4162 Benzethonium chloride
S4210 Benzocaine
S4161 Benzoic acid
S4308 Benzthiazide
S3163 Benztropine mesylate
S4165 Benzydamine Hydrochloride
S4160 Benzylpenicillin sodium
S4389 Bephenium Hydroxynaphthoate
S3037 Bepotastine Besilate
S4239 Bergapten
S3055 Besifloxacin HCl (Besivance)
S1767 Beta Carotene
S3176 Betahistine 2HCl
S1500 Betamethasone (Celestone)
S1688 Betamethasone Dipropionate (Diprolene)
S1690 Betamethasone valerate (Betnovate)
S4191 Betamipron
S1689 Betapar (Meprednisone)
S2091 Betaxolol (Betoptic)
S1827 Betaxolol hydrochloride (Betoptic)
S2455 Bethanechol chloride
S2098 Bexarotene
S4049 Bextra (valdecoxib)
S4159 Bezafibrate
S1370 Biapenem
S2196 BIBR 953 (Dabigatran etexilate, Pradaxa)
S2154 BIBR-1048 (Dabigatran)
S1190 Bicalutamide (Casodex)
S1854 Bifonazole
S1407 Bimatoprost
S3032 Bindarit

S3130 Biotin (Vitamin B7)
S1285 Biperiden HCl
S4047 Bisacodyl
S4093 Bismuth Subcitrate Potassium
S4032 Bismuth Subsalicylate
S1206 Bisoprolol
S1214 Bleomycin sulfate
S2112 Blonanserin (Lonasen)
S1013 Bortezomib (Velcade)
S1014 Bosutinib (SKI-606)
S3178 Brinzolamide
S2060 Bromhexine HCl
S4309 Bromocriptine Mesylate
S2585 Brompheniramine
S4195 Broxyquinoline
S4390 Brucine
S1286 Budesonide
S3023 Bufexamac
S2607 Buflomedil HCl
S1287 Bumetanide
S2454 Bupivacaine hydrochloride (Marcain)
S1692 Busulfan (Myleran, Busulfex)
S4310 Butacaine
S3154 Butenafine HCl
S1833 Butoconazole nitrate
S3022 Cabazitaxel (Jevtana)
S1469 Calcifediol
S1466 Calcitriol (Rocaltrol)
S4311 Calcium Gluceptate
S2588 Calcium levofolinate (Calcium Folate)
S1288 Camptothecin
S4391 Camylofin Chlorhydrate
S1578 Candesartan (Atacand)
S2037 Candesartan cilexetil (Atacand)
S1156 Capecitabine (Xeloda)
S2051 Captopril (Capoten)
S4359 Carbachol
S4312 Carbadox
S1693 Carbamazepine (Carbatrol)
S3000 Carbazochrome sodium sulfonate
S3179 Carbenicillin disodium
S4368 Carbenoxolone Sodium
S1891 Carbidopa
S4048 Carbimazole
S1215 Carboplatin
S2853 Carfilzomib (PR-171)

S1289 Carmofur
S4136 Carprofen
S1831 Carvedilol
S3073 Caspofungin acetate
S3202 Catharanthine
S1499 Cefaclor (Ceclor)
S1605 Cefdinir (Omnicef)
S1768 Cefditoren pivoxil
S1611 Cefoperazone (Cefobid)
S1371 Cefoselis sulfate
S2544 Cefprozil hydrate (Cefzil)
S4314 Ceftazidime Pentahydrate
S2543 Ceftiofur hydrochloride
S1261 Celecoxib
S1502 Cephalexin (Cefalexin)
S2408 Cephalomannine
S4393 Cephapirin Sodium
S4238 Cepharanthine
S1291 Cetirizine Dihydrochloride
S4242 Cetrimonium Bromide
S4172 Cetylpyridinium Chloride
S1843 Chenodeoxycholic acid
S1677 Chloramphenicol (Chloromycetin)
S2021 Chlormezanone (Trancopal)
S4209 Chlorocresol
S4157 Chloroquine Phosphate
S1641 Chlorothiazide
S1839 Chloroxine
S1816 Chlorpheniramine Maleate
S2456 Chlorpromazine (Sonazine)
S4166 Chlorpropamide
S1771 Chlorprothixene
S4192 Chlorquinaldol
S4156 Chlortetracycline HCl
S4155 Chlorzoxazone
S4171 Choline Chloride
S4208 Chromocarb
S2528 Ciclopirox (Penlac)
S3019 Ciclopirox ethanolamine
S1516 Cidofovir (Vistide)
S2081 Cilazapril monohydrate (Inhibace)
S1293 Cilnidipine
S1294 Cilostazol
S1845 Cimetidine (Tagamet)
S4190 Cinchophen
S3045 Cinepazide maleate

S4361 Cinoxacin
S2027 Ciprofloxacin (Cipro)
S2113 Cisatracurium besylate (Nimbex)
S1166 Cisplatin
S1199 Cladribine
S2555 Clarithromycin (Biaxin, Klacid)
S1847 Clemastine Fumarate
S2080 Cleviprex (Clevidipine)
S4178 Climbazole
S4006 Clinafloxacin (PD127391)
S4315 Clinafoxacin HCl
S2830 Clindamycin
S2457 Clindamycin hydrochloride (Dalacin)
S2596 Clindamycin palmitate HCl
S2048 Clindamycin phosphate
S2584 Clobetasol propionate
S4108 Clodronate Disodium
S1218 Clofarabine
S4107 Clofazimine
S1820 Clofibrate (Atromid-S)
S4207 Clofibric acid
S4394 Clofoctol
S2561 Clomifene citrate (Serophene)
S2541 Clomipramine hydrochloride (Anafranil)
S2458 Clonidine hydrochloride (Catapres)
S4316 Clopamide
S1415 Clopidogrel (Plavix)
S4317 Clorgyline HCl
S4135 Clorprenaline HCL
S2613 Clorsulon
S4106 Closantel
S4105 Closantel Sodium
S1606 Clotrimazole (Canesten)
S2564 Cloxacillin sodium (Cloxacap)
S2459 Clozapine (Clozaril)
S2900 Cobicistat (GS-9350)
S4318 Colistimethate Sodium
S4029 Colistin Sulfate
S2116 Conivaptan HCl (Vaprisol)
S2559 Cortisone acetate (Cortone)
S4170 Coumarin
S3102 Creatinine
S1068 Crizotinib (PF-02341066)
S1917 Crystal violet
S1848 Curcumin
S4015 Cyclamic acid

S4189 Cyclandelate
S2057 Cyclophosphamide monohydrate
S1514 Cyclosporine (Neoral)
S2044 Cyproheptadine HCl (Periactin)
S4167 Cyromazine
S4206 Cysteamine HCl
S1648 Cytarabine
S2053 Cytidine
S2807 Dabrafenib (GSK2118436)
S1221 Dacarbazine (DTIC-Dome)
S1849 Daidzein
S3058 Danofloxacin Mesylate
S1869 Dapoxetine hydrochloride (Priligy)
S2215 DAPT (GSI-IX)
S1373 Daptomycin
S3144 Darifenacin HBr
S1620 Darunavir Ethanolate (Prezista)
S1021 Dasatinib (BMS-354825)
S3035 Daunorubicin HCl (Daunomycin HCl)
S1998 D-Cycloserine
S4072 Decamethonium bromide
S1200 Decitabine
S4145 Decoquinatate
S1712 Deferasirox (Exjade)
S4067 Deferiprone
S1888 Deflazacort (Calcort)
S2604 Dehydroepiandrosterone (DHEA)
S4132 Deoxyarbutin
S4243 Deoxycorticosterone acetate
S4066 Dequalinium chloride
S4012 Desloratadine
S1701 Desonide
S2092 Detomidine HCl
S1322 Dexamethasone
S3124 Dexamethasone acetate
S4099 Dexlansoprazole
S3075 Dexmedetomidine
S2090 Dexmedetomidine HCl (Precedex)
S1222 Dexrazoxane Hydrochloride
S2123 Dextrose (D-glucose)
S4319 Dibenzepine HCl
S4205 Dibenzothiophene
S4038 Dibucaine HCL
S4395 Dichlorisone Acetate
S2177 Dichlorphenamide (Diclofenamide)
S2028 Diclazuril

S1903 Diclofenac
S3063 Diclofenac Diethylamine
S3062 Diclofenac Potassium
S4111 Dicloxacillin Sodium
S4373 Dicyclomine HCl
S1702 Didanosine (Videx)
S1251 Dienogest
S1859 Diethylstilbestrol (Stilbestrol)
S4384 Difloxacin HCl
S4095 Difluprednate
S4396 Digoxigenin
S1865 Diltiazem HCl (Tiazac)
S4320 Dimaprit 2HCl
S2586 Dimethyl Fumarate
S4104 Diminazene Aceturate
S4397 Dipiperodon HCl
S4034 Diphemanil methylsulfate
S1866 Diphenhydramine HCl (Benadryl)
S4321 Diphenylpyraline HCl
S1895 Dipyridamole (Persantine)
S4213 Dirithromycin
S1911 Disodium Cromoglycate
S4322 Disopyramide Phosphate
S1680 Disulfiram (Antabuse)
S1703 Divalproex sodium
S2523 DL-Adrenaline
S2293 DL-Carnitine hydrochloride
S2381 D-Mannitol (Osmitrol)
S1148 Docetaxel (Taxotere)
S1637 Docosanol (Abreva)
S1658 Dofetilide (Tikosyn)
S4186 Domiphen Bromide
S2461 Domperidone (Motilium)
S2462 Donepezil HCl (Aricept)
S2529 Dopamine hydrochloride (Inotropin)
S1374 Doripenem Hydrate
S1375 Dorzolamide HCL
S4037 Doxapram HCl
S1324 Doxazosin mesylate
S1467 Doxercalciferol (Hectorol)
S2045 Doxifluridine
S4164 Doxofylline
S1208 Doxorubicin (Adriamycin)
S4005 Doxycycline HCl
S4240 Doxylamine Succinate
S4153 D-Phenylalanine

S2114 Dronedarone HCl (Multaq)
S4096 Droperidol
S4138 Dropropizine
S1377 Drospirenone
S3041 Droxidopa (L-DOPS)
S2084 Duloxetine HCl (Cymbalta)
S1202 Dutasteride
S2041 Dyclonine HCl
S4097 Dydrogesterone
S1504 Dyphylline (Dilor)
S2535 Econazole nitrate (Spectazole)
S1326 Edaravone (MCI-186)
S1327 Ellagic acid
S2229 Eltrombopag (SB-497115-GR)
S2001 Elvitegravir (GS-9137)
S4323 Emetine
S1704 Emtricitabine (Emtriva)
S1941 Enalapril maleate (Vasotec)
S1657 Enalaprilat dihydrate
S1756 Enoxacin (Penetrex)
S3059 Enrofloxacin
S3147 Entacapone
S1252 Entecavir hydrate
S2035 Epalrestat
S2521 Epinephrine bitartrate (Adrenalinium)
S1223 Epirubicin Hydrochloride
S1707 Eplerenone
S4137 Eprazinone 2HCl
S4102 Eprosartan Mesylate
S1825 Erdosteine
S1023 Erlotinib HCl
S1635 Erythromycin (E-Mycin)
S4060 Erythromycin Ethylsuccinate
S4064 Escitalopram oxalate
S4100 Esmolol HCl
S1743 Esomeprazole magnesium (Nexium)
S2233 Esomeprazole sodium (Nexium)
S1709 Estradiol
S3149 Estradiol valerate
S2466 Estriol
S1665 Estrone
S4196 Ethacridine lactate monohydrate
S4004 Ethambutol HCl
S4152 Ethamsylate
S1625 Ethinyl Estradiol
S1777 Ethionamide

S2611 Ethisterone
S4326 Ethoxzolamide
S3160 Ethynodiol diacetate
S1857 Etidronate (Didronel)
S1328 Etodolac (Lodine)
S1329 Etomidate
S1225 Etoposide (VP-16)
S3080 Etravirine (TMC125)
S1120 Everolimus (RAD001)
S1227 Evista (Raloxifene Hydrochloride)
S1196 Exemestane
S1655 Ezetimibe (Zetia)
S2467 Famciclovir (Famvir)
S2078 Famotidine (Pepcid)
S4327 Famprofazone
S1547 Febuxostat (Uloric)
S1330 Felbamate
S1885 Felodipine (Plendil)
S2468 Fenbendazole (Panacur)
S1794 Fenofibrate (Tricor, Trilipix)
S1823 Fenoprofen calcium
S3027 Fenoprofen calcium hydrate
S4090 Fenspiride HCl
S2031 Fenticonazole nitrate
S2240 Fesoterodine fumarate (Toviaz)
S3208 Fexofenadine HCl
S4227 Fidaxomicin
S1197 Finasteride
S5003 FK-506 (Tacrolimus)
S4027 Flavoxate HCl
S2469 Fleroxacin (Quinodis)
S4201 Florfenicol
S1299 Floxuridine
S1837 Flubendazole (Flutelmium)
S1331 Fluconazole
S1666 Flucytosine (Ancobon)
S1491 Fludarabine (Fludara)
S1229 Fludarabine Phosphate (Fludara)
S1332 Flumazenil
S3181 Flumequine
S4088 Flumethasone
S2030 Flunarizine 2HCl
S2108 Flunixin meglumin
S2470 Fluocinolone acetonide (Flucort-N)
S2608 Fluocinonide (Vanos)
S4228 Fluorometholone Acetate

S1333 Fluoxetine HCl
S1679 Flurbiprofen (Ansaid)
S1908 Flutamide (Eulexin)
S1992 Fluticasone propionate (Flonase, Veramyst)
S1909 Fluvastatin sodium (Lescol)
S1336 Fluvoxamine maleate
S2020 Formoterol hemifumarate
S3038 Fosaprepitant dimeglumine
S4385 Fosfomycin Tromethamine
S2095 Fosinopril sodium (Monopril)
S1300 Ftorafur
S2129 Fudosteine
S1191 Fulvestrant (Faslodex)
S4203 Furaltadone HCl
S1603 Furosemide (Lasix)
S2133 Gabapentin (Neurontin)
S1338 Gabapentin Hydrochloride
S2101 Gabexate mesylate
S1751 Gadodiamide (Omniscan)
S2471 Gallamine triethiodide (Flaxedil)
S1878 Ganciclovir
S1340 Gatifloxacin
S1025 Gefitinib (Iressa)
S1714 Gemcitabine (Gemzar)
S1149 Gemcitabine HCl (Gemzar)
S1729 Gemfibrozil (Lopid)
S2412 Genipin
S2411 Geniposide
S2413 Geniposidic acid
S1342 Genistein
S1376 Gestodene
S2055 Gimeracil
S2026 Ginkgolide A
S4362 Glafenine HCl
S2601 Gliclazide (Diamicron)
S1344 Glimepiride
S1715 Glipizide (Glucotrol)
S3151 Gliquidone
S1716 Glyburide (Diabeta)
S1345 Granisetron HCl
S1740 Guaifenesin (Guaiphenesin)
S4065 Guanabenz acetate
S4328 Guanethidine Sulfate
S4070 Guanidine HCl
S4089 Halobetasol Propionate
S1920 Haloperidol (Haldol)

S4329 Hemicholinium Bromide
S4069 Hexamethonium bromide
S4117 Histamine Phosphate
S4025 Homatropine Bromide
S2562 Hydralazine hydrochloride
S4369 Hydrastinine HCl
S1708 Hydrochlorothiazide
S1696 Hydrocortisone (Cortisol)
S1896 Hydroxyurea (Cytodrox)
S4026 Hydroxyzine 2HCl
S2908 Hygromycin B
S4014 Hyoscyamine (Daturine)
S3148 Ibandronate sodium
S1638 Ibuprofen (Advil)
S1518 Ibuprofen Lysine (NeoProfen)
S2118 Ibutilide fumarate
S1228 Idarubicin HCl
S2605 Idebenone
S1883 Idoxuridine
S1302 Ifosfamide
S1483 Iloperidone (Fanapt)
S2475 Imatinib (Gleevec)
S1026 Imatinib Mesylate
S2109 Imidapril (Tanatril) HCl
S4377 Imipramine HCl
S1211 Imiquimod
S3083 Indacaterol Maleate
S1730 Indapamide (Lozol)
S1723 Indomethacin (Indocid, Indocin)
S1683 Ipratropium bromide
S1507 Irbesartan (Avapro)
S1198 Irinotecan
S2217 Irinotecan HCl Trihydrate (Campto)
S1929 Irsogladine
S2534 Isoconazole nitrate (Travogen)
S4330 Isoetharine Mesylate
S1937 Isoniazid (Tubizid)
S2566 Isoprenaline hydrochloride
S4204 Isosorbide
S1379 Isotretinoin
S4116 Isovaleramide
S4398 Isoxicam
S1662 Isradipine (Dynacirc)
S2476 Itraconazole (Sporanox)
S2086 Ivabradine HCl (Procoralan)
S1144 Ivacaftor (VX-770)

S1351 Ivermectin
S1353 Ketoconazole
S1645 Ketoprofen (Actron)
S1646 Ketorolac (Toradol)
S2024 Ketotifen fumarate (Zaditor)
S1994 Lacidipine (Lacipil, Motens)
S2522 L-Adrenaline (Epinephrine)
S2065 Lafutidine
S1706 Lamivudine (Epivir)
S3024 Lamotrigine
S1354 Lansoprazole
S2111 Lapatinib
S1028 Lapatinib Ditosylate (Tykerb)
S3174 L-Arginine HCl
S2388 L-carnitine (Levocarnitine)
S1247 Leflunomide
S1029 Lenalidomide
S1235 Letrozole
S1236 Leucovorin Calcium
S1939 Levamisole Hydrochloride (Ergamisol)
S1356 Levetiracetam
S4085 Levobetaxolol HCl
S1726 Levodopa (Sinemet)
S1940 Levofloxacin (Levaquin)
S1727 Levonorgestrel (Levonelle)
S2446 Levosimendan
S2104 Levosulpiride (Levogastrol)
S1749 L-Glutamine
S2121 Licofelone
S1357 Lidocaine (Alphacaine)
S3031 Linagliptin (BI-1356)
S2479 Lincomycin hydrochloride (Lincocin)
S1408 Linezolid (Zyvox)
S4217 Liothyronine Sodium
S1997 Liranaftate
S2076 Lisinopril (Zestril)
S4399 Lithium Citrate
S4003 Lithocholic acid
S4400 Lofexidine HCl
S2539 Lomefloxacin hydrochloride (Maxaquin)
S4084 Lomerizine HCl
S1840 Lomustine (CeeNU)
S2610 Lonidamine
S2480 Loperamide hydrochloride
S1380 Lopinavir (ABT-378)
S1358 Loratadine

S2047 Lornoxicam (Xefo)
S1359 Losartan potassium
S1669 Loteprednol etabonate
S2061 Lovastatin (Mevacor)
S4086 Loxapine Succinate
S2599 L-Thyroxine
S3044 Lurasidone HCl
S1137 Malotilate
S2481 Manidipine (Manyper)
S2517 Maprotiline hydrochloride
S2003 Maraviroc
S1464 Marbofloxacin
S1064 Masitinib (AB1010)
S1250 MDV3100 (Enzalutamide)
S2074 Mecarbinat
S1986 Meclizine 2HCl
S4331 Meclocycline Sulfosalicylate
S3060 Medetomidine HCl
S2567 Medroxyprogesterone acetate
S4332 Medrysone
S4078 Mefenamic acid
S1304 Megestrol Acetate
S1974 Meglumine
S1204 Melatonin
S1734 Meloxicam (Mobic)
S2043 Memantine HCl (Namenda)
S1949 Menadione
S4375 Mepenzolate Bromide
S4333 Mepiroxol
S3155 Mepivacaine HCl
S3204 Meptazinol HCl
S4077 Mequinol
S1305 Mercaptopurine
S1381 Meropenem
S1681 Mesalamine (Lialda)
S1735 Mesna (Uromitexan, Mesnex)
S4334 Mesoridazine Besylate
S2125 Mestranol
S4335 Metaproterenol Sulfate
S4336 Metaraminol Bitartrate
S1950 Metformin hydrochloride (Glucophage)
S2527 Methacycline hydrochloride (Physiomycine)
S4337 Methapyrilene HCl
S4039 Methazolamide
S1237 Methazolastone
S3139 Methenamine (Mandelamine)

S1609 Methimazole (Tapazole, Northyx)
S1736 Methocarbamol (Robaxin)
S4338 Methoxamine HCl
S1952 Methoxsalen (Oxsoralen)
S1978 Methscopolamine (Pamine)
S4057 Methyclothiazide
S1642 Methyldopa (Aldomet)
S4378 Methylhydantoin-5-(D)
S1733 Methylprednisolone
S3138 Methylthiouracil
S4339 Meticrane
S1610 Metolazone (Zaroxolyn)
S1856 Metoprolol tartrate
S4379 Metrizamide
S1907 Metronidazole (Flagyl)
S4223 Mevastatin
S4225 Mexiletine HCl
S4179 Mezlocillin Sodium
S1382 Mianserin hydrochloride
S2536 Miconazole (Monistat)
S1956 Miconazole nitrate
S2606 Mifepristone (Mifeprex)
S2589 Miglitol (Glyset)
S3140 Milnacipran HCl
S2484 Milrinone (Primacor)
S4226 Minocycline HCl
S1383 Minoxidil
S4009 Mirabegron (YM178)
S2016 Mirtazapine (Remeron, Avanza)
S4415 Misoprostol
S2073 Mitiglinide calcium
S1732 Mitotane (Lysodren)
S2485 Mitoxantrone Hydrochloride
S2107 Mizolastine (Mizollen)
S1384 Mizoribine (Bredinin)
S3212 Moclobemide
S2079 Moexipril HCl
S3104 Moguisteine
S1987 Mometasone furoate
S1652 Monobenzene (Benoquin)
S4211 Montelukast Sodium
S2486 Moroxydine
S1385 Mosapride citrate
S4340 Moxalactam Disodium
S1465 Moxifloxacin hydrochloride
S2066 Moxonidine

S1501 Mycophenolate mofetil (CellCept)
S2487 Mycophenolic (Mycophenolate)
S4051 Nabumetone
S3105 Nadifloxacin
S1386 Nafamostat mesylate
S4042 nafcillin sodium monohydrate
S3156 Naftifine HCl
S2126 Naftopidil (Flivas)
S2328 Nalidixic acid (NegGram)
S4341 Nalmefene HCl
S3066 Naloxone HCl
S2103 Naltrexone HCl
S2519 Naphazoline hydrochloride (Naphcon)
S1626 Naproxen (Aleve)
S1488 Naratriptan HCl
S1517 Natamycin (Pimaricin)
S2489 Nateglinide (Starlix)
S1549 Nebivolol (Bystolic)
S1969 Nefiracetam (Translon)
S4180 Nefopam HCl
S1213 Nelarabine (Arranon)
S2568 Neomycin sulfate
S2490 Neostigmine bromide (Prostigmin)
S1255 Nepafenac
S4052 Netilmicin Sulfate
S1742 Nevirapine (Viramune)
S1744 Niacin (Nicotinic acid)
S4342 Nialamide
S4181 Nicardipine HCl
S3030 Niclosamide (Niclocide)
S1971 Nicorandil (Ikorel)
S1899 Nicotinamide (Niacinamide)
S4370 Nicotine Ditartrate
S1808 Nifedipine (Adalat)
S4401 Nifenazone
S3018 Niflumic acid
S4182 Nifuroxazide
S1033 Nilotinib (AMN-107)
S2721 Nilvadipine (ARC029)
S2040 Nimesulide
S1747 Nimodipine (Nimotop)
S1748 Nisoldipine (Sular)
S4413 Nitarsone
S1627 Nitazoxanide (Alinia, Annita)
S4232 Nithiamide
S2491 Nitrendipine

S1644 Nitrofurazone (Nitrofur)
S1890 Nizatidine
S4380 Nomifensine Maleate
S2615 Noradrenaline bitartrate monohydrate (Levophed)
S4040 norethindrone
S1509 Norfloxacin (Norxacin)
S4363 Noscapine HCl
S2492 Novobiocin sodium (Albamycin)
S1934 Nystatin (Mycostatin)
S1463 Ofloxacin (Floxin)
S2493 Olanzapine (Zyprexa)
S1604 Olmesartan medoxomil (Benicar)
S2494 Olopatadine hydrochloride (Opatanol)
S4041 olsalazine sodium
S1389 Omeprazole (Prilosec)
S1996 Ondansetron (Zofran)
S1390 Ondansetron hydrochloride (Zofran)
S4150 Orbifloxacin
S1629 Orlistat (Alli, Xenical)
S3121 Ornidazole
S2054 Orphenadrine citrate (Norflex)
S2597 Oseltamivir phosphate (Tamiflu)
S2205 OSI-420 (Desmethyl Erlotinib)
S3047 Otilonium Bromide
S4016 Ouabain
S2563 Oxacillin sodium monohydrate
S1224 Oxaliplatin (Eloxatin)
S4230 Oxaprozin
S1391 Oxcarbazepine
S4402 Oxeladin Citrate
S4343 Oxethazaine
S1830 Oxfendazole
S1851 Oxibendazole
S4344 Oxprenolol HCl
S4229 Oxybuprocaine HCl
S1754 Oxybutynin (Ditropan)
S3117 Oxybutynin chloride
S2495 Oxymetazoline hydrochloride
S4087 Oxymetholone
S1773 Oxytetracycline (Terramycin)
S2052 Oxytetracycline dihydrate
S2496 Ozagrel
S2067 Ozagrel HCl
S1150 Paclitaxel (Taxol)
S2410 Paeoniflorin
S1724 Paliperidone (Invega)

S3050 Palonosetron HCl
S1311 Pamidronate Disodium
S2497 Pancuronium (Pavulon)
S2498 Pantothenic acid (pantothenate)
S4183 Paromomycin Sulfate
S3005 Paroxetine HCl
S4404 Pasiniazid
S3012 Pazopanib
S1035 Pazopanib HCl
S2680 PCI-32765 (Ibrutinib)
S1855 Pefloxacin mesylate
S1135 Pemetrexed
S4008 Pemirolast (BMY 26517) potassium
S4184 Penciclovir
S4151 Penfluridol
S1853 Penicillamine (Cuprimine)
S4007 Pentamidine
S4345 Pentoxifylline
S2716 Peramivir Trihydrate
S4000 Pergolide mesylate
S1506 Perindopril Erbumine (Aceon)
S2577 Phenacetin
S4235 Phenazopyridine HCl
S2542 Phenformin hydrochloride
S1921 Phenindione (Rectadione)
S4045 Pheniramine Maleate
S4364 Phenothrin
S2499 Phenoxybenzamine HCl
S2038 Phentolamine mesilate
S1654 Phenylbutazone (Butazolidin, Butatron)
S2569 Phenylephrine HCl
S2525 Phenytoin (Lepitoin)
S2524 Phenytoin sodium (Dilantin)
S4411 Phosphatidylcholine
S4365 Phthalylsulfacetamide
S4324 Physostigmine Hemisulfate Salt
S4346 Physostigmine Salicylate
S4405 Picrotoxinin
S3106 Pidotimod
S4231 Pilocarpine HCl
S5004 Pimecrolimus
S1550 Pimobendan (Vetmedin)
S4358 Pimozide
S4366 Pinacidil
S4406 Pindolol
S2590 Pioglitazone (Actos)

S2046 Pioglitazone hydrochloride (Actos)
S4347 Pipenzolate Bromide
S4222 Piperacillin Sodium
S4348 Piromidic Acid
S1713 Piroxicam (Feldene)
S1759 Pitavastatin calcium (Livalo)
S1394 Pizotifen malate
S8030 Plerixafor (AMD3100)
S3025 PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride)
S1567 Pomalidomide
S1490 Ponatinib (AP24534)
S1257 Posaconazole
S4392 Potassium Canrenoate
S1897 Potassium iodide
S1497 Pralatrexate (Folotyng)
S2460 Pramipexole (Mirapex)
S2011 Pramipexole dihydrochloride monohydrate
S2594 Pramiracetam
S4092 Pramoxine HCl
S1829 Pranlukast
S1960 Pranoprofen
S1258 Prasugrel (Effient)
S3036 Pravastatin sodium
S1691 Praziquantel (Biltricide)
S1424 Prazosin HCl
S1737 Prednisolone (Hydroretrocortine)
S2570 Prednisolone acetate (Omnipred)
S1622 Prednisone (Adasone)
S1914 Pregnenolone
S4371 Pridinol Methanesulfonate
S1619 Prilocaine
S4237 Primaquine Diphosphate
S1965 Primidone (Mysoline)
S4381 Proadifen HCl
S4022 Probenecid (Benemid)
S2119 Probucof
S4023 Procaine (Novocaine) HCl
S1995 Procarbazine HCl (Matulane)
S4407 Prochlorperazine Dimaleate
S4408 Procodazole
S4349 Procyclidine HCl
S1705 Progesterone (Prometrium)
S2500 Propafenone (Rytmonorm)
S1828 Proparacaine HCl
S4076 Propranolol HCl
S1988 Propylthiouracil

S1881 Prothionamide (Prothionamide)
S1762 Pyrazinamide (Pyrazinoic acid amide)
S1608 Pyridostigmine Bromide (Mestinon)
S3113 Pyridoxine hydrochloride
S4382 Pyrilamine Maleate
S2006 Pyrimethamine
S4075 Pyrithione zinc
S1763 Quetiapine fumarate (Seroquel)
S2581 Quinapril HCl (Accupril)
S2502 Quinine hydrochloride dihydrate
S4409 Quipazine Maleate
S4350 R-(-)-Apomorphine HCl Hemihydrate
S2503 Racecadotril (Acetorphan)
S4351 Ractopamine HCl
S2005 Raltegravir (MK-0518)
S1259 Ramelteon (TAK-375)
S1793 Ramipril (Altace)
S1801 Ranitidine (Zantac)
S1799 Ranolazine (Ranexa)
S1425 Ranolazine dihydrochloride
S1039 Rapamycin (Sirolimus)
S2102 Rasagiline mesylate
S2032 Rebamipide
S3199 Reboxetine mesylate
S1178 Regorafenib (BAY 73-4506)
S1426 Repaglinide
S1601 Reserpine
S1396 Resveratrol
S4056 Retapamulin
S2504 Ribavirin (Copegus)
S2540 Riboflavin (Vitamin B2)
S1741 Rifabutin (Mycobutin)
S1764 Rifampin (Rifadin, Rimactane)
S1760 Rifapentine (Priftin)
S1790 Rifaximin (Xifaxan)
S1614 Riluzole (Rilutek)
S1964 Rimantadine (Flumadine)
S3021 Rimonabant (SR141716)
S1428 Risedronate sodium
S1874 Risedronic acid (Actonel)
S1615 Risperidone (Risperdal)
S2533 Ritodrine hydrochloride (Yutopar)
S1185 Ritonavir
S3002 Rivaroxaban (Xarelto)
S2087 Rivastigmine tartrate (Exelon)
S1607 Rizatriptan Benzoate (Maxalt)

S1397 Rocuronium bromide
S3043 Rofecoxib (Vioxx)
S2131 Roflumilast (Daxas)
S1430 Rolipram
S4352 Rolitetracycline
S4062 Ronidazole
S3189 Ropinirole HCl
S4058 Ropivacaine HCl
S2556 Rosiglitazone (Avandia)
S2075 Rosiglitazone HCl
S2505 Rosiglitazone maleate
S2169 Rosuvastatin calcium (Crestor)
S1880 Roxatidine acetate HCl
S2506 Roxithromycin (Roxl-150)
S1256 Rufinamide (Banzel)
S1378 Ruxolitinib (INCB018424)
S2127 S-(+)-Rolipram
S2507 Salbutamol sulfate (Albuterol)
S4187 Salicylanilide
S1977 Sarafloxacin HCl
S4188 Sasapyrine
S1540 Saxagliptin (BMS-477118, Onglyza)
S2545 Scopine
S2508 Scopolamine hydrobromide
S2537 Secnidazole (Flagentyl)
S4244 Serotonin HCl
S3161 Sertaconazole nitrate
S4053 Sertraline HCl
S4129 Sevelamer HCl
S1431 Sildenafil citrate
S1613 Silodosin (Rapaflo)
S1792 Simvastatin (Zocor)
S2152 Sitafloracin hydrate
S4414 Sodium 4-aminohippurate Hydrate
S4245 Sodium ascorbate
S1999 Sodium butyrate
S4174 Sodium Gluconate
S4013 Sodium Monofluorophosphate
S4074 Sodium nitrite
S4059 Sodium Nitroprusside
S2000 Sodium orthovanadate
S4020 Sodium Picosulfate
S3137 Sodium salicylate
S3048 Solifenacin succinate
S1040 Sorafenib (Nexavar)
S2393 Sorbitol (Glucitol)

S2509 Sotalol (Betapace)
S1884 Sparfloxacin
S2510 Spectinomycin hydrochloride
S4082 Spiramycin
S4054 Spironolactone
S1398 Stavudine
S2572 Streptomycin sulfate
S1312 Streptozotocin (Zanosar)
S2050 Strontium ranelate (Protelos)
S4214 Sucralose
S1958 Sulbactam
S2551 Sulbactam sodium (Unasyn)
S4120 Sulconazole Nitrate
S4081 sulfacetamide sodium
S1770 Sulfadiazine
S2511 Sulfadoxine (Sulphadoxine)
S4175 Sulfaguanidine
S3132 Sulfamerazine
S1618 Sulfameter (Bayrena)
S3133 Sulfamethazine
S1957 Sulfamethizole (Proklar)
S1915 Sulfamethoxazole
S1685 Sulfanilamide
S1617 Sulfapyridine (Dagenan)
S1576 Sulfasalazine (Azulfidine)
S3116 Sulfathiazole
S1916 Sulfisoxazole
S2007 Sulindac (Clinoril)
S1962 Sulphadimethoxine
S1432 Sumatriptan succinate
S1042 Sunitinib Malate (Sutent)
S2015 Suplatast tosylate
S1761 Suprofen (Profenal)
S4367 Suxibuzone
S4357 Tacrine HCl
S1512 Tadalafil (Cialis)
S1900 Talc
S2225 TAME
S1972 Tamoxifen Citrate (Nolvadex)
S2008 Taurine
S1569 Tazarotene (Avage)
S2159 Tebipenem pivoxil (L-084)
S1399 Teicoplanin
S1538 Telaprevir (VX-950)
S1651 Telbivudine (Sebivo, Tyzeka)
S1738 Telmisartan (Micardis)

S2099 Temocapril HCl
S1044 Temsirolimus (Torisel)
S1787 Teniposide (Vumon)
S1401 Tenofovir (Viread)
S1400 Tenofovir Disoproxil Fumarate
S2512 Tenoxicam (Mobiflex)
S2059 Terazosin HCl (Hytrin)
S1725 Terbinafine (Lamisil, Terbinex)
S2557 Terbinafine hydrochloride (Lamisil)
S4353 Terfenadine
S4169 Teriflunomide
S2573 Tetracaine hydrochloride (Pontocaine)
S2574 Tetracycline HCl
S4410 Tetraethylenepentamine 5HCl
S4043 tetrahydrozoline hydrochloride
S4094 Tetramisole HCl
S1193 Thalidomide
S1739 Thiabendazole
S3211 Thiamine HCl (Vitamin B1)
S2583 Thiamphenicol (Thiophenicol)
S1774 Thioguanine
S4374 Thioridazine HCl
S4354 Thiostrepton
S4355 Thonzonium Bromide
S1436 Tianeptine sodium
S4079 Ticagrelor
S1984 Ticlopidine HCl
S1403 Tigecycline
S4122 Tilmicosin
S4068 tinidazole
S1910 Tioconazole
S2062 Tiopronin (Thiola)
S2547 Tiotropium Bromide hydrate
S2603 Tioxolone
S4185 Tiratricol
S1437 Tizanidine HCl
S2514 Tobramycin
S5001 Tofacitinib citrate (CP-690550 citrate)
S4356 Tolazamide
S2443 Tolbutamide
S4021 Tolcapone
S1959 Tolfenamic acid
S4360 Tolmetin Sodium
S2058 Tolnaftate
S4200 Tolperisone HCl
S2550 Tolterodine tartrate (Detrol LA)

S4044 toltrazuril
S2593 Tolvaptan (OPC-41061)
S1438 Topiramate
S1231 Topotecan HCl
S1776 Toremfene Citrate (Fareston, Acapodene)
S1698 Torsemide (Demadex)
S1875 Tranexamic acid (Transamin)
S1439 Tranilast (SB 252218)
S2582 Trazodone hydrochloride (Desyrel)
S1653 Tretinoin (Aberela)
S1933 Triamcinolone (Aristocort)
S1628 Triamcinolone Acetonide
S4080 triamterene
S1667 Trichlormethiazide (Achletin)
S4114 Triclabendazole
S3201 Trifluoperazine 2HCl
S4372 Triflupromazine HCl
S1778 Trifluridine (Viroptic)
S3200 Triflusal
S1404 Trilostane
S2085 Trimebutine
S3129 Trimethoprim
S4416 Trimipramine Maleate
S3146 Tripelennamine HCl
S4176 Trometamol
S1913 Tropicamide
S1898 Tropisetron
S2549 Trosipium chloride (Sanctura)
S4128 Troxipide
S3162 Tylosin tartrate
S1591 Ubenimex (Bestatin)
S3081 Ulipristal
S4177 Uracil
S2025 Urapidil HCl
S2029 Uridine
S1643 Ursodiol (Actigal Urso)
S1876 Valaciclovir HCl
S4050 valganciclovir hydrochloride
S4216 Valnemulin HCl
S1168 Valproic acid sodium salt (Sodium valproate)
S1894 Valsartan (Diovan)
S2575 Vancomycin HCl (Vancocin)
S1046 Vandetanib (Zactima)
S2515 Vardenafil (Vivanza)
S1440 Varenicline tartrate
S1405 Vecuronium Bromide

S1267 Vemurafenib (PLX4032)
S1441 Venlafaxine
S1786 Verteporfin (Visudyne)
S1784 Vidarabine (Vira-A)
S3033 Vildagliptin (LAF-237)
S1248 Vinblastine
S1241 Vincristine
S2110 Vinpocetine (Cavinton)
S1082 Vismodegib (GDC-0449)
S1902 Vitamin B12
S3114 Vitamin C (Ascorbic acid)
S4035 Vitamin D2
S4063 Vitamin D3 (Cholecalciferol)
S4101 Voglibose
S1442 Voriconazole
S1047 Vorinostat (SAHA)
S1119 XL-184 (Cabozantinib)
S2516 Xylazine HCl
S2576 Xylometazoline HCl
S2124 Xylose
S1633 Zafirlukast (Accolate)
S1719 Zalcitabine
S3008 Zaltoprofen
S3007 Zanamivir (Relenza)
S2579 Zidovudine (Retrovir)
S1443 Zileuton
S1444 Ziprasidone hydrochloride
S1314 Zoledronic Acid (Zoledronate)
S1649 Zolmitriptan (Zomig)
S1445 Zonisamide
S4233 Zoxazolamine