



**HAL**  
open science

# Rôles de la protéine Damaged-DNA Binding 2 sur l'adhérence, les propriétés nanomécaniques et la voie du $TGF\beta 1$ dans les cellules tumorales mammaires

Claire Barbieux

► **To cite this version:**

Claire Barbieux. Rôles de la protéine Damaged-DNA Binding 2 sur l'adhérence, les propriétés nanomécaniques et la voie du  $TGF\beta 1$  dans les cellules tumorales mammaires. Automatique / Robotique. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0337 . tel-01571606v2

**HAL Id: tel-01571606**

**<https://hal.science/tel-01571606v2>**

Submitted on 3 Aug 2017

**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.

**Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)**

**Thèse**

**Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

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

par **Claire BARBIEUX**

**Rôles de la protéine Damaged-DNA Binding 2 sur l'adhérence, les propriétés nanomécaniques et la voie du TGF $\beta$ 1 dans les cellules tumorales mammaires**

**Le 15 Décembre 2015**

**Membres du Jury :**

<b>Président :</b>	M. Bruno CHARPENTIER	Prof., UMR7365 CNRS-UL IMoPA, Nancy
<b>Rapporteurs :</b>	Mme Ruth RIMOKH	DR, INSERM U1052 CRCL, Lyon
	M. Jérôme DEVY	Dr., UMR7369 CNRS-URCA MEDyC, Reims
<b>Examineurs:</b>	Mme Monique DONTENWILL	DR, UMR7213 CNRS-UniStra LBP, Strasbourg
	M. Philippe BECUWE	Prof., UMR7039 CNRS-UL CRAN, Nancy co-directeur de thèse
	Mme Stéphanie GRANDEMANGE	Dr., UMR7039 CNRS-UL CRAN, Nancy co-directeur de thèse
<b>Invité :</b>	M. Grégory FRANCIUS	CR, UMR7564 CNRS-UL LCPME, Nancy

## REMERCIEMENTS

« *Ce que signifie le mot recherche? Vivre pleinement la question.* »

Edgar Morin

Les différents éléments sont maintenant combinés, associés et assemblés. Pour que tout ceci se concrétise, il ne manque plus que votre contribution. Merci à vous d'avoir accepté de porter un regard critique à ce travail. Je souhaiterais exprimer toute ma gratitude à Mme Ruth Rimokh et M. Jérôme Devy d'avoir bien voulu être rapporteurs de cette thèse et d'y consacrer un peu de leur temps. Je remercie également M. Bruno Charpentier et Mme Monique Dontenwill, avec qui les échanges ont été nombreux et constructifs pendant ces trois ans, et qui ont tous deux accepté de participer à l'évaluation de ce travail.

\*  
\* \*

Une thèse n'est définitivement pas le travail d'une seule et unique personne, mais nécessite la présence de toute une équipe. Toutes mes pensées vont donc vers vous, vous qui avez partagé mon quotidien pendant trois ans et qui avez contribué, chacun à votre façon, à l'aboutissement de ce travail. Vous avez été des enseignants, des modèles, des amis voire même des confidents pour certains, mais tous des aides précieuses. Merci à vous !

*Il y a tout d'abord celles et ceux avec qui j'ai eu la chance de travailler...*

Mes premières pensées s'adressent naturellement à mes directeurs de thèse **Philippe Becuwe** et **Stéphanie Grandemange**. Vous avez tout d'abord été des enseignants, des enseignants passionnants et passionnés qui ont marqué mon parcours scolaire et qui n'ont que conforté mon envie de faire de la recherche. Troisième étudiante de votre collaboration, je mesure la chance que j'aie, d'avoir pu bénéficier de votre propre expérience et de vos conseils au cours de ces trois années.

**Philippe**, voilà 5 ans, vous m'avez convaincue de changer de parcours et de rejoindre le côté cellulaire. Peut-être le regrettez-vous (Surprise le 15 !), pour ma part ce revirement aura été une révélation. Je vous remercie de m'avoir offert le premier point d'entrée dans votre équipe au cours d'un stage de M1 et de m'avoir permis de débiter une thèse avec vous.

**Stéphanie**, en trois ans tu as pu laisser libre court à ton imagination et m'attribuer les pires surnoms (p'tit boulet, morue sans oublier l'indétrônable Willy). Enfin à ta décharge, tu as également été gâtée niveau surnom (n'est-ce pas Rafiki?). Mais ton imagination ne se limite pas aux petits noms gentils, et s'exprime aussi dans le travail. Toujours en effervescence, pleine de nouvelles idées, travailler avec toi est une expérience stimulante et enrichissante. Je te remercie de tout cœur d'avoir bien voulu m'accorder ta confiance... Un brin exigeante et perfectionniste, tu as su me pousser et tirer le meilleur de moi. Pour autant, de par ta bienveillance et parce qu'« un thésard au fond c'est comme un cocker en manque d'affection », tu es toujours parvenue à me rassurer et me reconforter. Que te dire de plus ? A part Merci pour tout ? A part que j'espère devenir plus tard une aussi bonne chef pour mes étudiants que tu ne l'as été pour moi...

Je ne peux oublier « les filles », avec qui j'ai partagé un bureau mais surtout des fous-rires, des confidences sans oublier l'arrivée de vos petits bonhommes. On parle souvent de vous comme si vous n'étiez qu'une seule entité, qu'une seule et même personne, mais je tiens à vous adresser un mot à chacune. **Emilie**, ta douceur et ton calme diffèrent tellement de mon caractère plus « explosif ». Travailler avec toi finira peut-être un jour par me tempérer ?! En tout cas, ce sont des qualités que j'ai pu apprécier. Merci pour ton aide et ton écoute tout au long de ces trois ans. Avec toi **ma Vanon** (la plus grande pipelette que j'ai jamais connue), je partage des choses peu communes : une même date de naissance, un petit côté «pitbull», un lapin un peu zinzin. Nul doute, ça rapproche ! Tu as été mon record de temps passé au téléphone, mon issue de secours aux coups de blues, ma complice dans de nombreuses pitreries, une confidente... et dire qu'au début tu me trouvais bizarre! Merci pour ton amitié et ton soutien à toute épreuve!

Avec autant de filles, il fallait bien un peu de testostérone dans ce bureau, merci **Rémi, Guillaume et Alexis** (ça fait peut être un peu beaucoup là quand même!). Tous thésards, vous connaissez les mêmes joies, les mêmes galères, les mêmes inquiétudes. **Rémi**, tu es mon acolyte des débuts, celui qui m'a beaucoup appris, qui m'a servi de modèle et qui est à l'origine de nombreuses «expériences ludiques». Deux ans passés ensemble, deux ans de conseils musicaux et cinématographiques éclairés (enfin la plupart du temps), de pâtisseries et de moments insolites. Merci pour ces instants inoubliables. **Guillaume et Alexis**, vous êtes maintenant les prochains sur la liste et je vous lègue volontiers le trou de l'ermite. J'ai apprécié votre bonne humeur et votre sympathie, sans oublier les «Chinese and English Days». Bon courage à vous ! J'ai également une pensée pour les quelques stagiaires qui ont rythmé mes années de thèse. Un merci tout particulier à mon bon (tout) petit **Jérémy** pour ton investissement et ton intérêt mais aussi pour le grain de folie que tu as amené.

Une partie de ce travail est ancrée dans l'interdisciplinarité et a fait intervenir des experts en microscopie de force atomique et en traitement de signal. J'ai ainsi pu rencontrer **Grégory**, un chercheur passionné du LCPME, qui a su me rendre accessibles les subtilités de la microscopie de force atomique et les paramètres physico-chimiques qui s'y rattachent. A toi j'associe **Jalal** et vous remercie tous les deux d'avoir pris le temps de m'apprendre à faire les mesures et à les analyser. L'équipe est complétée par **Charles et David**, spécialistes du traitement de signal au sein du CRAN. **Charles**, merci pour ton investissement dans le traitement des très très très nombreuses données de microscopie et tout au long de ce projet. **David**, à force tu as pris l'habitude de parler aux biologistes (même si pour toi la biologie reste un « mystère ») et parviens à expliquer simplement des choses qui semblent affreusement complexes. Au-delà de l'aspect professionnel, je souhaite vous remercier tous les quatre pour votre bonne humeur, vos blagues (parfois un peu douteuses...) et votre accessibilité.

La voie du TGF $\beta$ , une grande nouveauté et des débuts parfois un peu obscurs pour nous... Merci à **Sabine et Sandra** de nous avoir fait partager leurs expériences respectives, de nous avoir fourni les premiers outils. Avec vous deux, les échanges et conseils ont été nombreux et constructifs tout au long de ces trois années. Une dédicace un peu spéciale à **Sandra**, qui en plus de ses conseils avisés, est l'auteure de phrases devenues cultes telles que celle sur les applaudissements du stress !

J'ai également une pensée pour tous les autres membres du 9<sup>e</sup> étage, en particulier **Lionel, Nadège et Murielle** pour le côté 2B, ainsi que tout le côté 1B. Votre sympathie à tous n'a rendu le quotidien que plus agréable!

Au cours de ma thèse j'ai pu découvrir les joies de l'enseignement. Merci aux immunologistes (**Jean-Pol, Sandra, Christine et Armelle**) de m'avoir intégrée à votre équipe et à vos enseignements pendant trois ans. Grâce à vous, l'envie de devenir, peut-être un jour, maître de conférences s'est confirmée !

*Puis il y a toutes celles et ceux avec qui je n'ai pas travaillé, mais sans qui ces trois années auraient été bien moins drôles et bien moins agréables...*

Tous les amis, qu'on se soit connu au cours de ces trois années (**Damien et Vairis mais aussi Yoann**), qu'on se connaisse depuis plus longtemps, je pense notamment aux rescapés de la meilleure promo de M1 de tous les temps (**Guillaume, Gauthier, Diane, Estelle**), ou depuis toujours (**Amélie**). Même si on ne se voit pas toutes les semaines, les moments avec vous ont été de vraies bouffées d'air frais ! J'ai une pensée très spéciale pour **Eugénie, Mélanie** sans oublier mon frerot **Thibault**. **Eugénie et Mélanie**, c'est grâce aux formations DCCE que nous nous sommes rencontrées (les Vosges ça a du bon !), et vous faites maintenant partie des personnes les plus proches. **Thibault**, mon frerot, tout a commencé il y a 7 ans en L2 et que de souvenirs de ces années... Comme tu dis si bien, «avant on était potes de Fac, maintenant on est de vrais amis». Malgré nos domaines de recherche très variés, tous les quatre on s'est toujours compris, nous avons eu les mêmes doutes, les mêmes angoisses et les mêmes joies au même moment. Votre amitié et votre soutien ont été plus que précieux, et où que vous soyez, aux States, en Europe, dans les îles, pourvu que ça dure ! Une pensée également pour leur moitié respective, et notamment **Lisa**, qui ont subi et supporté de nombreuses soirées « états d'âmes du thésard au fond ».

Enfin et bien évidemment, je remercie ma famille. **Maman et Roger**, tout cela a pu vous paraître bien abstrait et parfois même un tantinet inquiétant. Allez, en voilà une et vous voilà maintenant prêts pour les suivants ! **Arthur et Cécile**, à vous de jouer maintenant ! Puissiez-vous aussi trouver votre voie et vous y épanouir. Une pensée toute particulière à ma **Mémé** (correctrice officielle de fautes d'orthographe), qui s'est toujours intéressée à ma thèse, en me faisant promettre dès le début de l'inviter à ma soutenance. C'est chose faite et je sais combien tu es fière et heureuse de pouvoir être là aujourd'hui.

**A Pépé...**

# SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>1</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b>	<b>8</b>
<b>ABBREVIATIONS</b>	<b>11</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>16</b>
<b>I. Les cancers mammaires : aspects cliniques et diversité des tumeurs</b>	<b>17</b>
A. Epidémiologie et facteurs de risque	17
1. Données épidémiologiques	17
2. Les facteurs de risque associés aux cancers du sein	17
B. Classifications des tumeurs mammaires	18
1. Classification histologique	18
2. Classification anatomopathologique et notions de grades	19
3. Classification moléculaire	20
C. Stratégies thérapeutiques mises en œuvre	21
1. Les traitements locaux	21
2. Les agents de chimiothérapie	22
3. Les traitements personnalisés	23
D. La cancérogenèse mammaire	24
1. Altérations génétiques et croissance tumorale	24
a) Les principales mutations retrouvées dans les tumeurs mammaires	24
b) Les signaux inducteurs de survie cellulaire	25
2. D'une tumeur localisée vers une tumeur envahissante	26
a) Les voies de signalisation contrôlant l'envahissement tumoral	27
b) L'importance du micro-environnement tumoral	27
c) La transition épithélio-mésenchymateuse	29
<b>II. La voie de signalisation du TGFβ : généralités et conséquences sur la tumorigenèse</b>	<b>31</b>
A. Généralités sur la superfamille du TGFβ	31
1. Diversité des ligands	31
2. Variété des récepteurs	32
3. Au centre de la voie de signalisation : les protéines Smads	33
B. La signalisation induite par le TGFβ	34
1. Sécrétion et activation du TGFβ	34
2. Par la voie canonique	35
3. Par la voie non canonique	36
C. Modes de régulation de la voie de signalisation	37
1. Au niveau de l'activité du récepteur	37
2. Au niveau de l'activité des Smads	38
a) Leur état de phosphorylation	38
b) Leur ubiquitinylation	39
3. Régulation de l'activité transcriptionnelle des Smads par l'interaction avec des co-facteurs	39
D. Le TGFβ1 dans les cancers : reflet de la dualité de ses fonctions	41
1. Un suppresseur de tumeur aux stades précoces	41
a) Par son action anti-proliférative	42
b) En régulant la mort cellulaire	42
2. Le TGFβ : promoteur de la progression tumorale	43

a)	D'un facteur anti vers un facteur pro-tumoral	43
b)	Le TGFβ et le remodelage du micro-environnement tumoral	44
c)	L'acquisition de propriétés invasives induite par le TGFβ	45
<b>III.</b>	<b>La protéine DDB2 : activités biologiques et conséquences dans les cancers</b>	<b>48</b>
A.	Caractéristiques et régulation de son expression	48
1.	Caractéristiques structurales du gène ddb2	48
2.	Structure protéique	48
3.	Régulation de l'expression du gène et de la protéine DDB2	49
B.	Activités biologiques de DDB2	49
1.	Dans la réparation de l'ADN	50
a)	Action au sein du complexe UV-DDB	50
b)	Par remodelage de la chromatine	51
c)	Régulation de l'activité de DDB2	51
2.	Dans la transcription génique	52
C.	Conséquences dans les cancers	54
1.	Effet protecteur sur les lésions induites par les UV	54
2.	Implication de DDB2 dans la prolifération des cellules tumorales	54
3.	Rôle de DDB2 dans la sénescence et l'apoptose	55
4.	Relation entre DDB2 et l'invasion tumorale	57
	<b><i>HYPOTHESE &amp; OBJECTIFS DU PROJET DE THESE</i></b>	<b>59</b>
	<b><i>MATERIEL &amp; METHODES</i></b>	<b>61</b>
<b>I.</b>	<b>Culture cellulaire</b>	<b>62</b>
A.	Lignées cellulaires et conditions de culture	62
1.	Lignées cellulaires	62
2.	Conditions de culture	62
B.	Etablissement de modèles transgéniques stables	63
1.	Par un agent polycationique	63
2.	Par infection avec des particules lentivirales	63
<b>II.</b>	<b>Analyse de l'expression de gènes</b>	<b>64</b>
A.	Au niveau transcriptionnel	64
1.	Extraction des ARN	64
2.	RT-PCR en temps réel	64
3.	Par PCR-Array et analyse des résultats avec le logiciel STRING	65
B.	Au niveau traductionnel	67
1.	Extraction de protéines totales	67
2.	Séparation électrophorétique et transfert sur membrane	67
3.	Détection immunologique	67
<b>III.</b>	<b>Evaluation des propriétés d'adhérence des cellules tumorales mammaires</b>	<b>68</b>
A.	Préparation de la plaque de culture	68
B.	Mesure des capacités d'adhérence	68
<b>IV.</b>	<b>Etude des propriétés mécaniques des cellules par microscopie de force atomique</b>	<b>69</b>
A.	Préparation des cultures cellulaires	69
B.	Acquisition des données	69
C.	Traitement des courbes de force	69
D.	Analyse topographique des cellules	70
<b>V.</b>	<b>Analyse de la distribution du cytosquelette d'actine</b>	<b>71</b>

<b>VI. Etude de l'influence de DDB2 sur la voie de signalisation du TGFβ1</b>	<b>71</b>
A. Analyse de l'activité transcriptionnelle des Smads	71
1. Caractéristiques des plasmides utilisés	71
2. Transfection transitoire par un agent polycationique et traitement au TGFβ1	72
3. Mesure des activités luciférase	73
B. Etude de la phosphorylation et de la translocation nucléaire des Smads	73
1. Extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires	73
2. Détection de la phosphorylation des Smads 2 et 3 par Western-Blotting	74
<b>VII. Etude de l'interaction de protéines avec l'ADN par Immunoprécipitation de Chromatine (ChIP)</b>	<b>75</b>
A. Extraction de la chromatine	75
B. Immunoprécipitation de la chromatine	76
C. Analyse par PCR quantitative en temps réel	76
<b>VIII. Analyse de la Transition épithélio-mésenchymateuse spontanée</b>	<b>77</b>
A. Par cytométrie en flux	77
B. Par cytoimmunofluorescence	77
<b>IX. Mesure de la sécrétion de facteurs de croissance par ELISA</b>	<b>78</b>
A. Collecte des milieux conditionnés	78
B. Test ELISA	78
1. Dosage du TGFβ1	78
2. Dosage de l'activine A	79
<b>X. Analyses statistiques</b>	<b>79</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>80</b>
<b>I. Influence de la protéine Damaged-DNA Binding 2 (DDB2) sur les propriétés d'adhérence cellulaire</b>	<b>81</b>
A. Résultats préliminaires	81
B. DDB2 (DAMAGED-DNA BINDING 2) protein: a new modulator of nanomechanical properties and cell adhesion of breast cancer cells	83
<b>II. Mise en évidence d'une relation entre DDB2 et la voie de signalisation du TGFβ</b>	<b>96</b>
A. Influence de DDB2 sur l'expression du TGFβ1	96
B. Influence de DDB2 sur l'activité transcriptionnelle des Smads 2/3	97
C. Influence de DDB2 sur l'expression des différents acteurs de la voie de signalisation du TGFβ1	99
D. Influence de DDB2 sur la phosphorylation et la translocation nucléaire des Smads 2/3	100
E. Mise en évidence de l'interaction de la protéine DDB2 avec le promoteur du gène <i>PAI-1</i> , cible du TGFβ1	100
F. DDB2 et la transition épithélio-mésenchymateuse dans les cellules tumorales mammaires	102
<b>III. Mise en évidence d'une relation entre DDB2 et l'activine A</b>	<b>103</b>
A. Influence de DDB2 sur l'activité transcriptionnelle des Smads 2/3 en présence du récepteur Alk4 de l'activine A et du TGFβ1	103
B. Influence de DDB2 sur l'expression des récepteurs de l'activine A	103
C. Recherche du mécanisme à l'origine de l'influence de DDB2 sur la voie de signalisation issue d'Alk4	104
<b>DISCUSSION</b>	<b>107</b>
<b>I. Modulation par DDB2 des propriétés nanomécaniques et des capacités d'adhérence des cellules tumorales mammaires</b>	<b>108</b>



<b>II. Inhibition par DDB2 de la voie de signalisation induite par le TGFβ1 et conséquences biologiques possibles sur les cellules tumorales mammaires</b>	<b>110</b>
<b>III. DDB2 : un nouveau co-répresseur des Smads activées par le TGFβ1 ?</b>	<b>115</b>
<b>IV. Relation entre les voies de signalisation du TGFβ1 et de l'activine A, inhibées par DDB2</b>	<b>117</b>
<b><i>CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES</i></b>	<b>120</b>
<b><i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i></b>	<b>125</b>
<b><i>ANNEXES</i></b>	<b>149</b>
<b>Liste des productions scientifiques</b>	<b>150</b>

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## Etude Bibliographique

Figure 1 : Répartition géographique mondiale des taux d'incidence et de mortalité du cancer du sein en 2012

Figure 2 : Evolution des taux d'incidence et de mortalité du cancer du sein depuis 1980 en France

Figure 3 : Classification histologique des tumeurs mammaires

Figure 4 : Classification moléculaire des tumeurs mammaires et correspondance avec les cellules de sein normales

Figure 5 : Implication des différents signaux moléculaires au cours de la carcinogenèse mammaire

Figure 6 : Représentation schématique de l'accumulation d'anomalies génétiques à l'origine d'une diversité sous-clonale dans le développement des cancers

Figure 7 : Représentation schématique de l'interdépendance des cellules tumorales et des cellules du micro-environnement tumoral

Figure 8 : Modifications morphologiques et moléculaires au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse

Figure 9 : Sous-familles et structure des facteurs de croissance appartenant à la superfamille du TGF $\beta$  chez les Vertébrés

Figure 10 : Représentation schématique de la structure des trois types de Smads

Figure 11 : Schéma de la sécrétion et de la maturation du TGF $\beta$

Figure 12 : Représentation schématique des voies de signalisation canonique et non canonique induites par le TGF $\beta$  ainsi que de celle de l'activine

Figure 13 : Schéma des phosphatases impliquées dans la régulation de la voie du TGF $\beta$

Figure 14 : Exemples d'interaction des Smads avec des complexes co-activateurs ou co-répresseurs de la transcription de gènes cibles

Figure 15 : Rôle du TGF $\beta$  dans la régulation du cycle cellulaire

Figure 16 : Implication de la protéine 14-3-3 $\zeta$  dans le switch anti à pro-tumoral du TGF $\beta$  dans les cancers mammaires

Figure 17 : Rôle de la superfamille du TGF $\beta$  dans l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse

Figure 18 : Représentation schématique des variants de DDB2 et structure tridimensionnelle de la protéine

Figure 19 : Représentation schématique de la régulation de l'expression du gène codant DDB2

Figure 20 : Représentation schématique du mécanisme de réparation de l'ADN par excision de nucléotide (NER)

Figure 21 : Conséquences du rôle de facteur de transcription de DDB2 dans la cancérogenèse

## **Matériel & Méthodes**

Tableau 1 : Caractéristiques des lignées cancéreuses mammaires utilisées

Tableau 2 : Liste de l'ensemble des couples d'amorces utilisés pour les amplifications par PCR

Tableau 3 : Organisation des plaques Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules utilisées pour l'analyse par PCR-Array

Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés en fonction de leur application

Figure 22 : Représentation schématique d'un microscope de force atomique et des courbes obtenues lors des acquisitions

Figure 23 : Représentation schématique des vecteurs utilisés dans les expériences de gène rapporteur

## **Résultats**

Figure 24 : Analyse de l'expression de DDB2 dans les lignées cancéreuses mammaires MDA-MB231 et MCF7

Figure 25 : Influence de DDB2 sur les propriétés d'adhérence des cellules cancéreuses mammaires

*Figures incluses dans l'article soumis à Nanoscale*

*Figure 1: DDB2 expression level in MDA-MB231 and MCF7 breast cancer cell lines.*

*Figure 2: Correlation between DDB2 expression and loss of adhesion abilities on culture areas of breast cancer cells*

*Figure 3: Principle of AFM measurements and related data*

*Figure 4: Height-map cell morphologies are not affected after the modulation of DDB2 expression*

*Figure 5: Nanomechanical properties of breast cancer cells according to the DDB2 expression level*

*Figure 6: Reorganization of cortical actin-cytoskeleton according to the DDB2 expression in breast cancer cells*

*Table 1: Changes in the adhesion-related gene expression according to DDB2 expression*

Figure 26 : L'expression de DDB2 dans les cellules tumorales mammaires affecte le niveau d'expression de différents gènes impliqués dans la voie du TGF $\beta$ 1

Figure 27 : Etude de la sécrétion de TGF $\beta$ 1 par les cellules tumorales mammaires MDA-MB231

Figure 28 : Analyse de l'activité transcriptionnelle basale des Smads 2/3 dans les cellules tumorales mammaires exprimant ou non DDB2

Figure 29 : Inhibition de l'activité transcriptionnelle des Smads 2/3 induite par le TGF $\beta$ 1 dans les cellules tumorales mammaires surexprimant DDB2

Figure 30 : Inhibition de l'expression de gènes cibles du TGF $\beta$ 1 dans les cellules tumorales mammaires surexprimant DDB2

Figure 31 : Influence de DDB2 sur l'expression des récepteurs et des effecteurs de la voie de signalisation du TGF $\beta$ 1 dans les cellules tumorales mammaires

Figure 32 : Influence de DDB2 sur la phosphorylation et la translocation nucléaire des Smads 2 et 3 activées par le TGF $\beta$ 1 dans les cellules tumorales mammaires

Figure 33 : Interaction de la protéine DDB2 avec le promoteur du gène *PAI-1* dans la région des sites de fixation des Smads 2, 3 et 4

Figure 34 : L'inhibition de DDB2 est associée à une induction spontanée de la TEM dans les cellules MCF7

Figure 35 : Influence de DDB2 sur l'activité transcriptionnelle des Smads 2/3 en présence du récepteur de type I à l'activine (Alk4) et du TGF $\beta$ 1 dans les cellules tumorales mammaires

Figure 36 : Influence de DDB2 sur l'expression des récepteurs de type II de l'activine A dans les cellules tumorales mammaires

Figure 37 : Influence de DDB2 sur l'expression et la sécrétion de l'activine A dans les cellules tumorales mammaires

Figure 38 : Influence de DDB2 sur la voie de signalisation dépendante de Alk4 et induite par le TGF $\beta$ 1 dans les cellules tumorales mammaires

## **Conclusion**

Figure 39 : Schéma de synthèse montrant la relation entre DDB2 et le TGF $\beta$  et les conséquences biologiques potentielles sur les cellules tumorales mammaires

## ABBREVIATIONS

### 1-9

6-4PP Photoproduit pyrimidine (6-4) pyrimidone

### A,B

ACVRIIA/B Activin Receptor type IIA/B  
AND Acide désoxyribonucléique  
ADNc Acide désoxyribonucléique complémentaire  
ADP Adénosine diphosphate  
AFM Atomic Force Microscopy  
Alk Activin-like receptor Kinase  
Akt Protéine Kinase B  
AP-1/2 Activator Protein 1/2  
AR Androgen Receptor  
ARN Acide ribonucléique  
ARNm Acide ribonucléique messenger  
ATM/ATR Ataxia Telangiectasia Mutated/ Ataxia Telangiectasia and Rad3 related  
Bcl-2 B-cell lymphoma 2  
bHLH Basic Helix-Loop-Helix  
BMP Bone Morphogenic Protein  
BMPRII BMP Receptor type II  
BRCA1/2 Breast cancer associated 1/2  
BRE BMP Responsive Element  
BSA Bovine Serum Albumin

### C

Ca<sup>2+</sup> Calcium  
CAF Cancer Associated Fibroblast  
CBP CREB-Binding Protein  
CD Cluster Differentiation  
CDK Cyclin-dependent Kinase  
C/EBP CCAAT/Enhancer binding protein bêta  
c-Flip Cellular FLICE-like inhibitory protein  
ChIP Chromatin Immunoprecipitation  
CO<sub>2</sub> Dioxyde de carbone  
CPD Cyclobutane pyrimidine dimer  
CSC Cancer Stem Cell  
Ct Cycle threshold  
CTGF Connective Tissue Growth Factor  
Cul-4A Culline-4A  
CXCL12/SDF-1 C-X-C motif chemokine 12/Stromal cell-derived Factor 1

## D,E

DAPK	Death-associated protein kinase
DDB1/2	Damaged-DNA binding 1/2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DO	Densité Optique
D-PBS	Tampon phosphate salin
DRO	Dérivés réactifs de l'oxygène
DTT	Dithiotréitol
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Acide ethylene-glycol-tétraacétique
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	Estrogen Receptor
ERCC1	Excision Repair Cross-Complementation group 1
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
ERK1/2	Extracellular signal-Regulated Kinase ½

## F,G,H

FGF	Fibroblast Growth Factor
FKBP12	FK506/ rapamycin binding protein
GADD45β	Growth Arrest and DNA Damage 45 β
GDF	Growth and Differentiation Factor
GG-NER	Global Genome Nucleotide Excision Repair
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HCl	Acide chloridrique
HDAC	Histone Deacetylase
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HMG A2	High mobility group A2

## I,J,K,L

ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
Id-1	Inhibitor of DNA binding 1
IGF-1	Insulin like Growth Factor 1
IGF-R	Insulin like Growth Factor Receptor
IgG/E	Immunoglobuline G/E
IκBα	Inhibitory Kappa B alpha
IKKα	IκB Kinase alpha
INCa	Institut National du Cancer
IRES	Internal Ribosome Entry Site
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KCl	Chlorure de Potassium
LAP	Latency-Associated Peptide

LHRH	Luteinizing Hormone Releasing Hormone
LTBP	Latency Binding Protein

### M,N,O

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
Mg <sup>2+</sup>	Magnésium
MH1/2	Mad Homology 1/2
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MnSOD	Superoxyde Dismutase à Manganèse
MOI	Multiplicity Of Infection
NaCl	Chlorure de Sodium
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate
NEDD4L	Neural precursor cell Expressed Developmentally Downregulated 4-Like
NER	Nucleotide Excision Repair
NES	Nuclear Export Signal
NF-1	Nuclear Factor 1
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NLS	Nuclear Localisation Signal
NRMT	alpha-N-methyltransferase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anion superoxide

### P,Q,R

PAF	Paraformaldéhyde
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PAQR3	Progestin ans AdipoQ Receptor 3
PAR6	Partitioning defective 6
PARP	Poly ADP-Ribose Polymerase
PCNA	Proliférating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PIASγ	Protein Inhibitor of Activated STAT
PIC	Proteases Inhibitor Cocktail
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PP1/2A	Protein Phosphatase 1/2A
PPM1A	Protein Phosphatase Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> dependant 1A
PR	Progesterone Receptor
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PTHrP	Parathyroid Hormone-related Protein
PVDF	Polycinyldifluoride
qPCR	Real-time PCR
RB	Rétinoblastome
RPA	Replicative Protein A
RPLP0	Ribosomal Protein Large P0

RT Reverse Transcription

## S

SAD Smad 4 Activation Domain  
SARA Smad Anchor for Receptor Activation  
SBE Smad Binding Element  
SBR Scarff Bloom Richardson  
SDS Sodium Dodécylsulfate  
SERD Selective Estrogen Receptor Degradation  
SERM Selective Estrogen Receptor Modulators  
shARN small hairpin ARN  
Smad Similar to mother against decapentaplegic  
SP-1 Specificity Protein 1  
STAGA SPT3-TAF9-GCN5 Acetyltransferase complex  
STK11 Serine/Threonine Kinase 11  
STRING Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins  
SVF Sérum de veau foetal  
SWI/SNF SWItch/Sucrose NonFermentable

## T

TAK1 Transforming growth factor  $\beta$ -Activated Kinase 1  
TBE Tris, Borate, EDTA  
TBR11 TGF $\beta$  Receptor type II  
TBS Tampon Tris Salin  
TC-NER Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair  
TEM Transition épithélio-mésenchymateuse  
TEMED Tetramethylethylenediamine  
TFIIH Transcription Factor II Human  
TGF $\beta$  Transforming Growth Factor beta  
TGIF TGF $\beta$  Induced Factor  
TMEPAI Transmembrane Prostate Androgen Induced  
TNF $\alpha$  Tumor Necrosis factor alpha  
TP53 Tumor-Protein 53  
TRAF6 TNF Receptor-Associated Factor 6  
TRIM33/ TIF1 $\gamma$  Tripartite motif containing 33 ou Transcriptional intermediary factor 1 $\gamma$   
TSP-1 Thrombospondine 1

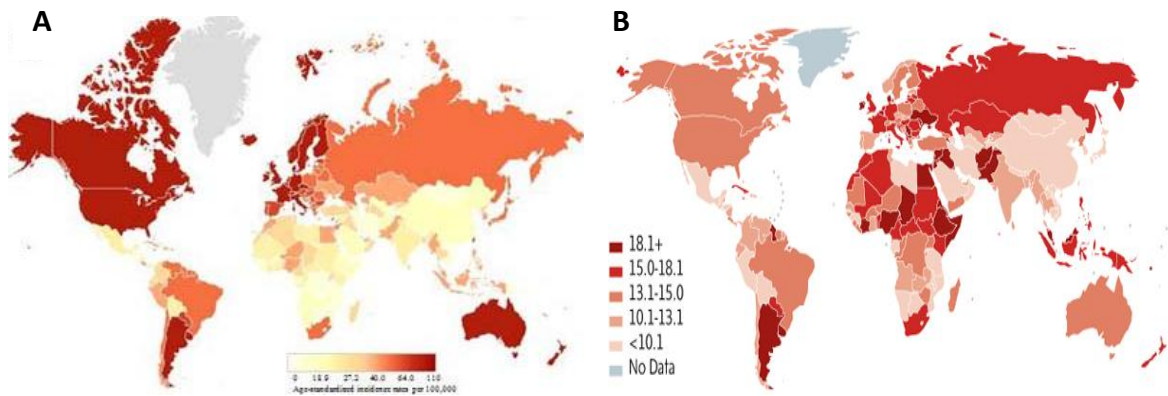
## U,V,W,X,Y,Z

UBB Ubiquitin B  
UCH37 Ubiquitine C-terminal hydrolase 37  
URL Unité Relative de Lumière  
USP15 Ubiquitine Specific Peptidase 15  
UTR Untranslated Region  
UV Ultraviolet

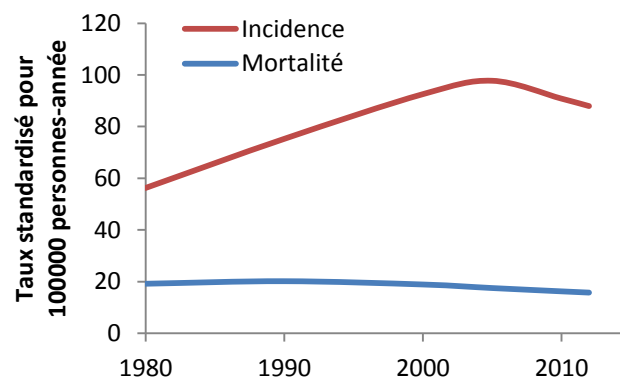


UV-DDB	UV Damaged-DNA Binding protein
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XP	Xeroderma Pigmentosum
XPA/C/E/F	Xeroderma Pigmentosum complementation groups A/C/E/F
Zeb1	Zinc finger E-box-binding homeobox 1

# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**



**Figure 1 : Répartition géographique mondiale des taux d'incidence et de mortalité du cancer du sein en 2012.** Les taux d'incidence standardisé (A) et de mortalité (B) pour 100 000 personnes sont représentés selon un dégradé de rouge. Dans les deux cas, les taux les plus élevés sont représentés par le rouge le plus foncé et les taux les plus faibles par la couleur la plus claire. Tandis que les taux d'incidence les plus forts sont retrouvés dans des pays industrialisés (Amérique du Nord et Europe), l'Afrique sub-saharienne est la région avec la plus forte mortalité. D'après Globocan 2012.



**Figure 2 : Evolution des taux d'incidence et de mortalité du cancer du sein depuis 1980 en France.** Les valeurs représentées correspondent aux taux standardisés pour 100 000 personnes par an. Après une forte augmentation du taux d'incidence jusqu'aux années 2000, celui-ci a tendance à diminuer depuis ces 10 dernières années. Le taux de mortalité est resté stable jusqu'en 2000 et diminue régulièrement depuis. D'après INCa « Les Cancers en France, Edition 2013 ».

## I. Les cancers mammaires : aspects cliniques et diversité des tumeurs

### A. Epidémiologie et facteurs de risque

#### 1. *Données épidémiologiques*

En 2012, l'Organisation Mondiale de la Santé révélait que 25% des cancers diagnostiqués sont des cancers du sein, plaçant celui-ci au premier rang des cancers chez la femme. Dans le monde, durant cette même année, environ 1,7 million de nouveaux cas ont été diagnostiqués et 520000 personnes en sont décédées, ce qui fait du cancer du sein le 2<sup>e</sup> cancer le plus mortel après celui des poumons. L'incidence présente une grande disparité géographique puisque les pays d'Europe de l'Ouest et d'Amérique du Nord semblent être les plus touchés mais la survie à 5 ans dans ces pays est aussi bien meilleure (**Figure 1**).

En France métropolitaine, le nombre de nouveaux cas est estimé à 48 763 pour 11 886 décès en 2012, plaçant ainsi le cancer du sein au premier rang des cancers les plus meurtriers dans l'hexagone. Il existe cependant des différences du taux de mortalité selon les régions. Alors que le taux d'incidence du cancer du sein est réparti de manière homogène sur le territoire, la mortalité est plus importante dans les régions du Nord. Toutefois, 76% des cancers du sein diagnostiqués entre 1989 et 2004 présentent une survie nette à 10 ans, le plaçant ainsi en tant que cancer de bon pronostic.

Bien que le nombre de cancer du sein ait doublé entre 1980 et 2000, le taux d'incidence diminue d'en moyenne 1,5% par an depuis 15 ans (**Figure 2**). Cette baisse concerne exclusivement les tumeurs détectées à un stade précoce et s'explique principalement par la diminution des prescriptions de traitements hormonaux lors de la ménopause. De la même manière, le taux de mortalité diminue régulièrement de 1,5% par an depuis 10 ans. Il s'agit d'une conséquence directe des campagnes de dépistage mises en œuvre permettant une prise en charge thérapeutique précoce. Le développement de la personnalisation des traitements a également participé à cet effet.

#### 2. *Les facteurs de risque associés aux cancers du sein*

Le premier des facteurs de risques est, de manière évidente, le sexe du patient, puisque 99% des cancers du sein touchent des femmes. L'âge de la patiente semble également avoir une influence sur l'incidence. En effet, la détection d'une tumeur mammaire concerne, pour 50% des cas, des femmes entre 50 et 69 ans. Cette catégorie de la population est directement

ciblée par les campagnes de dépistage, en permettant aux femmes âgées de 50 à 74 ans de réaliser une mammographie tous les 2 ans (INCa, 2012).

Outre l'âge, les antécédents personnels et familiaux sont également à prendre en compte dans l'évaluation du risque de développer un cancer du sein. Une patiente ayant déjà été atteinte d'une première tumeur mammaire ou d'une hyperplasie présente 3 à 5 fois plus de risques quant à la survenue d'un second cancer. Par ailleurs, 20 à 30% des femmes atteintes d'un cancer du sein ont des antécédents familiaux. Ces derniers peuvent résulter d'une forme familiale de cancer du sein résultant de mutations sur les gènes BRCA1 et 2 (Breast Cancer Associated 1 et 2). Seuls 5 à 10% des tumeurs mammaires présentent des mutations clairement identifiées. Toutefois, pour une femme porteuse de ces mutations, le risque est de 40 à 88% de développer un cancer du sein et de 10 à 65% pour un cancer ovarien (Engel and Fischer, 2015). D'autres mutations plus rares sont aussi associées à une augmentation du risque de développer un cancer du sein. C'est notamment le cas des gènes codant les protéines TP53 (Tumor Protein 53), PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) et STK 11 (Sérine/Thréonine Kinase 11(Aloraifi et al., 2015);. Cependant, l'identification de ces mutations ne suffit pas à expliquer l'ensemble des cancers mammaires familiaux.

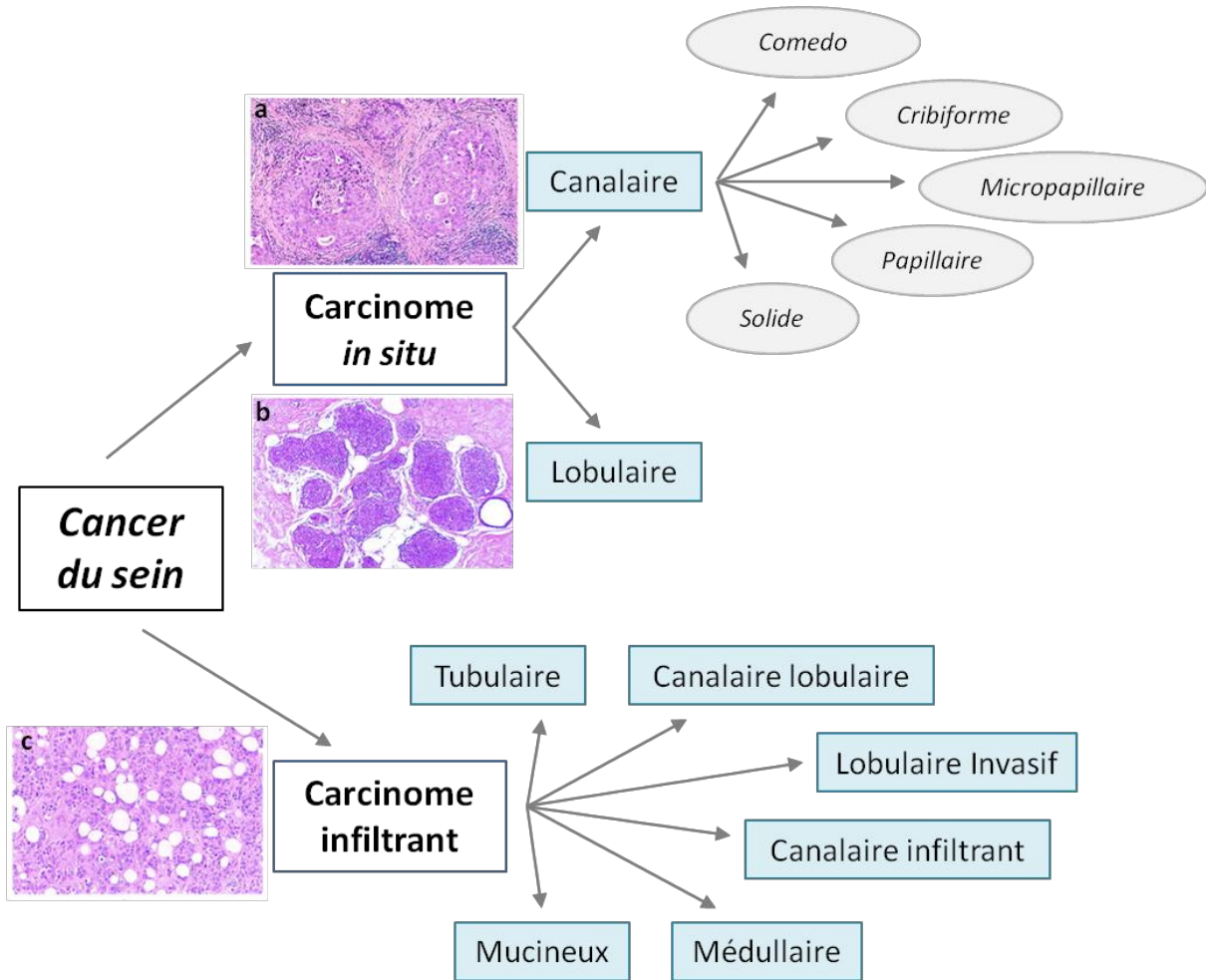
La prescription de traitements hormonaux, particulièrement au cours de la ménopause, expose d'autant plus les patientes aux tumeurs mammaires (Collins et al., 2005). Comme pour de nombreuses pathologies, d'autres facteurs environnementaux et métaboliques, tels que le tabagisme, la consommation d'alcool et l'obésité sont associés à un risque accru de développer un cancer du sein.

## **B. Classifications des tumeurs mammaires**

Les cancers du sein peuvent être classés selon leurs caractéristiques histologiques, anatomopathologiques ou selon l'expression de certains marqueurs moléculaires.

### ***1. Classification histologique***

La plupart des cancers mammaires sont des adénocarcinomes, c'est-à-dire qu'ils se développent à partir de cellules épithéliales mammaires. Ces cellules épithéliales constituent l'unité de base de la glande mammaire, responsable de la lactation et qui est composée de lobules et de canaux. Ainsi on parle d'adénocarcinomes lobulaires ou canaux, en fonction de la localisation d'origine des cellules épithéliales. L'adénocarcinome canalaire est plus fréquent que l'adénocarcinome lobulaire.



**Figure 3 : Classification histologique des tumeurs mammaires.** Les cancers mammaires peuvent être localisés (*in situ*) ou invasifs. Les cellules cancéreuses sont le plus souvent d'origine canalaire (ductal) ou lobulaire (lobular). Les différents sous-types histologiques répertoriés sont représentés. En a, b, c, sont représentées respectivement des coupes histologiques d'adénocarcinome *in situ* canalaire et lobulaire ainsi qu'une coupe de carcinome invasif observées au grossissement x100. D'après (Arpino et al., 2005; Malhotra et al., 2010).

Outre l'origine des cellules, les différents types de cancers mammaires sont également séparés selon leur degré d'invasivité. En effet, deux grandes catégories ont été définies : les carcinomes *in situ* non invasifs et les carcinomes infiltrants (**Figure 3**).

Les carcinomes *in situ* sont une forme très précoce de cancer mammaire et se caractérisent par des tumeurs bien délimitées car les cellules qui les constituent n'ont pas franchi la membrane basale. Dans 90% des cas, il s'agit de carcinomes canauxiaux *in situ*, au sein desquels il existe une grande variété histologique (Comedo, Papillaire... ; **Figure 3**) (Malhotra et al., 2010). Il s'agit de cancers de bon pronostic qui, sans traitements, peuvent devenir invasifs.

Les carcinomes invasifs en général sont beaucoup plus fréquents que les carcinomes *in situ* puisque le carcinome canalaire infiltrant représente à lui seul près de 80% des cancers du sein. L'adénocarcinome lobulaire infiltrant ne représente lui que 10% des tumeurs mammaires invasives. Il existe d'autres sous-types histologiques beaucoup plus rares : canalaire/lobulaire, mucineux, tubulaire, médullaire et papillaire (**Figure 3**) (Malhotra et al., 2010). Dans l'ensemble de ces tumeurs, les cellules ont franchi la membrane basale qui les délimitait, et sont capables d'infiltrer les tissus voisins, voire d'autres organes (métastases) dans les formes les plus avancées.

## 2. Classification anatomopathologique et notions de grades

De l'histologie même des tumeurs, découlent d'autres classifications qui permettent d'apprécier l'état d'avancement de la maladie, son pronostic ainsi que la thérapie à mettre en place. C'est notamment le cas du grade de Scarff Bloom et Richardson (SBR). Celui-ci repose sur différents critères : l'organisation en tubule, les atypies cytonucléaires et le nombre de mitoses, qui se voient attribuer un score de 1, 2 ou 3. Par exemple, un score de 1 est donné à une biopsie principalement organisée en tubes alors que l'absence de tubes sur la coupe histologique est caractérisée par un score de 3. Les atypies cytonucléaires sont caractérisées par des noyaux de taille et de forme irrégulières ainsi que des cellules de tailles différentes. La présence de ces atypies au sein d'une biopsie est associée à un score de 3 pour ce critère. Enfin, les mitoses présentes dans chaque champ d'observation sont comptées et plus elles sont nombreuses, plus le score attribué sera élevé. Les scores attribués à chaque critère sont ensuite additionnés répartissant ainsi les grades en trois niveaux : I (score de 3 à 5), II (score entre 6 et 7) et III (score de 8 ou 9). Le niveau I correspond à une tumeur composée de cellules différenciées et le III, au contraire, à une tumeur constituée de cellules dédifférenciées. Les

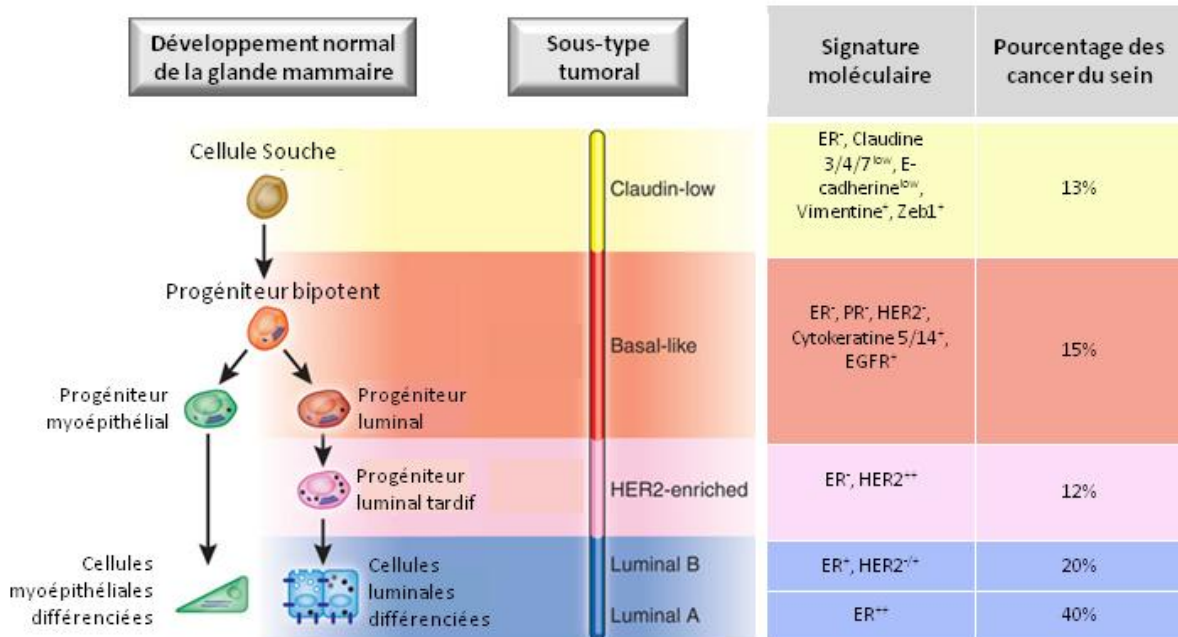
tumeurs mammaires peuvent également être nivelées par un système plus global, ne reposant pas uniquement sur l'histologie, le système TNM du Comité Partagé Américain sur le Cancer (AJCC). Cette classification repose sur la taille de la tumeur (T), l'invasion des ganglions lymphatiques et le nombre de ganglions touchés (N) et la présence de métastases (M).

Toutefois, ces classifications, même si elles permettent d'établir des pronostics plus ou moins favorables, ne sont pas suffisantes pour optimiser le traitement des patientes. Le traitement de patientes, présentant un envahissement des ganglions lymphatiques, avec une association de doxorubicine et de paclitaxel, révèle des différences dans la réponse thérapeutique. L'expression de certains marqueurs au sein de la cohorte a été analysée de manière rétrospective, et a permis de révéler que les patientes ayant le mieux répondu à la thérapie portaient des tumeurs exprimant HER2 (Isakoff, 2010). Améliorer cette classification nécessite de prendre en compte l'unicité de chaque tumeur et particulièrement les anomalies moléculaires qui ont conduit à son développement.

### ***3. Classification moléculaire***

Le développement des techniques d'étude du génome et du transcriptome ont permis de mettre en évidence que l'hétérogénéité des tumeurs mammaires était vraie non seulement à l'échelle histologique, mais aussi à l'échelle moléculaire. Ces études ont permis d'établir une nouvelle classification, reposant exclusivement sur le profil d'expression de gènes des cellules tumorales mammaires. Ainsi, les travaux de Perou et collaborateurs sont les premiers à proposer une classification moléculaire reposant sur l'étude de l'expression de 8102 gènes chez 42 patientes (Perou et al., 2000). Cette étude est complétée trois ans plus tard et établit une classification en 5 sous-groupes (Sorlie et al., 2003). Depuis les travaux de Perou et Sorlie, la répartition des cancers du sein en sous-types a un peu évolué et repose à l'heure actuelle sur 7 sous-groupes : Luminal A, Luminal B, Luminal C, HER2-enriched, Basal-Like, Normal-Like et Claudin-Low (Kittaneh et al., 2013). Cette classification repose principalement sur l'expression de trois récepteurs : celui aux oestrogènes (ER), celui à la progestérone (PR) ainsi que le co-récepteur de l'EGF (HER2, Human Epidermal growth factor Receptor 2). Les sous-types Luminal A et B expriment fortement les récepteurs hormonaux alors que les sous-types Basal-like, Claudin-low et HER2-enriched ne les expriment pas. Le récepteur HER2 est essentiellement retrouvé dans le sous-groupe HER2-enriched, bien que les tumeurs du groupe Luminal B puissent également exprimer le co-récepteur à l'EGF. Les tumeurs appartenant aux sous-groupes Claudin-low et basal-like sont





**Figure 4 : Classification moléculaire des tumeurs mammaires et correspondance avec les cellules de sein normales.** Les travaux des quinze dernières années ont permis d'établir une classification en 7 sous-groupes selon l'expression de marqueurs moléculaires. La signature moléculaire de 5 de ces sous-groupes ainsi que leur représentation dans les tumeurs mammaires sont répertoriées. L'expression de certains marqueurs a permis d'établir des corrélations entre chaque sous-groupe et les cellules participant au développement d'un tissu mammaire sain. D'après (Malhotra et al., 2010; Perou)(Perou, 2010).

également qualifiées de triple négatives car elles n'expriment aucun des récepteurs mentionnés plus haut. Toutefois, elles se distinguent par l'absence des Claudines 3/4/7 dans les tumeurs Claudin-low. Les principales caractéristiques de ces sous-types sont représentées en **Figure 4**, excepté pour le sous-groupe Luminal C, qui a récemment été identifié et dont la signature moléculaire n'est pas clairement définie (Dvorkin-Gheva and Hassell, 2014). Le sous-type Normal-like est quant à lui caractérisé par l'expression de gènes spécifiques du tissu adipeux (Yersal and Barutca, 2014). Un dernier groupe émerge depuis ces dernières années, celui des cellules souches cancéreuses mammaires. Ces cellules expriment fortement la protéine transmembranaire CD44 mais faiblement CD24 (Cluster Differentiation 44 et 24) et sont capables d'initier le développement d'une tumeur (Malhotra et al., 2010).

Cette classification en sous-types moléculaires a été facilitée et standardisée par une analyse systématique de l'expression de 50 gènes, représentant la signature moléculaire PAM50 (Parker et al., 2009). Celle-ci semble aussi avoir une valeur pronostique quant aux risques de récurrence. En plus de l'aide à la classification moléculaire, d'autres signatures moléculaires ont été établies en tant qu'analyses pronostiques. C'est le cas par exemple des signatures Oncotype-DX (Paik et al., 2004) et MammaPrint (van 't Veer et al., 2002), ciblant respectivement l'expression de 21 et 70 gènes, et permettant d'évaluer le risque de récurrence ou de développer des métastases de patientes atteintes d'un cancer du sein sans envahissement ganglionnaire (Kittaneh et al., 2013). Mieux connaître les profils génétiques de chaque patiente constitue un enjeu en recherche, et particulièrement en recherche clinique afin d'optimiser la stratégie thérapeutique mise en place.

## C. Stratégies thérapeutiques mises en œuvre

### 1. *Les traitements locaux*

La chirurgie reste le meilleur moyen d'éradiquer des petites tumeurs localisées et de traiter le centre peu vascularisé, et donc peu accessible aux traitements, des grosses tumeurs. Elle peut être conservatrice (tumorectomie) ou non (mastectomie). La tumorectomie vise à retirer l'intégralité du tissu tumoral ainsi qu'une partie du tissu sain voisin et n'est utilisée que pour de petite tumeur. Au contraire, la mastectomie correspond à l'ablation du sein et est mise en œuvre pour des tumeurs dont la taille est trop importante par rapport à la taille du sein, ou pour des tumeurs infiltrantes. Selon les cas, il peut être nécessaire de retirer également des ganglions lymphatiques axillaires. Suite à la chirurgie, un traitement complémentaire adapté

au type de tumeur est proposé. L'un de ces traitements le plus souvent proposé est la radiothérapie.

Tout comme la chirurgie, la radiothérapie est un traitement local. Elle consiste en l'irradiation des cellules cancéreuses par des rayons ionisants les endommageant et bloquant ainsi leur prolifération, tout en préservant les tissus sains. Elle peut être réalisée par deux approches : par une source de rayonnements externe ciblant spécifiquement la zone à traiter (radiothérapie externe) ou par l'injection d'un élément radioactif (Iridium 192) au contact de la zone à traiter (curiethérapie). Dans le cadre du cancer du sein, la radiothérapie externe est préférée et vise à traiter soit la glande mammaire et le site tumoral, soit la paroi thoracique et les ganglions axillaires. Dans certains cas, les métastases cérébrales et osseuses peuvent également être traitées par radiothérapie. Bien que dans la majorité des cas la radiothérapie soit appliquée suite à une chirurgie, une nouvelle technique d'irradiation per-opératoire est actuellement développée (Kawamura et al., 2015).

## ***2. Les agents de chimiothérapie***

La chimiothérapie est un traitement systémique qui n'est pas administré de manière systématique, et concerne principalement les cancers infiltrants et notamment les métastatiques. La plupart du temps elle est mise en place après une chirurgie afin d'éliminer toutes les cellules cancéreuses résiduelles et de diminuer le risque de récurrence, on parle alors de chimiothérapie adjuvante. Cependant, lorsque la tumeur est trop grosse pour être opérée de manière conservatrice, une chimiothérapie néo-adjuvante peut être mise en œuvre avant la chirurgie. Un traitement de chimiothérapie est généralement administré en 4 à 6 cures et présente une bonne réponse, puisque dans 30 à 60% des cas de cancers avancés, la tumeur a totalement disparu suite à la chimiothérapie.

Dans le cadre du cancer du sein, quatre grandes familles d'agents chimiothérapeutiques sont utilisés : les agents alkylants (cyclophosphamide), les anthracyclines (doxorubicine, épirubicine), les taxanes (paclitaxel, docetaxel) et les anti-métabolites (méthotrexate, 5-Fluorouracile). Bien qu'ayant des modes d'actions différents, toutes ces drogues bloquent la réplication de l'ADN et la division cellulaire. Tandis que le cyclophosphamide alkyle l'ADN, la doxorubicine induit la formation d'adduits sur l'ADN et inhibe la topoisomérase II (Hortobágyi, 2012). Le 5-Fluorouracile, quant à lui, inhibe la thymidylate synthase (Longley et al., 2003). Les taxanes n'agissent non pas sur l'ADN mais sur le fuseau mitotique. En bloquant la réorganisation et la dépolymérisation des microtubules

lors de l'anaphase, les taxanes empêchent la séparation des chromatides sœurs et donc la mitose (Herbst and Khuri, 2003).

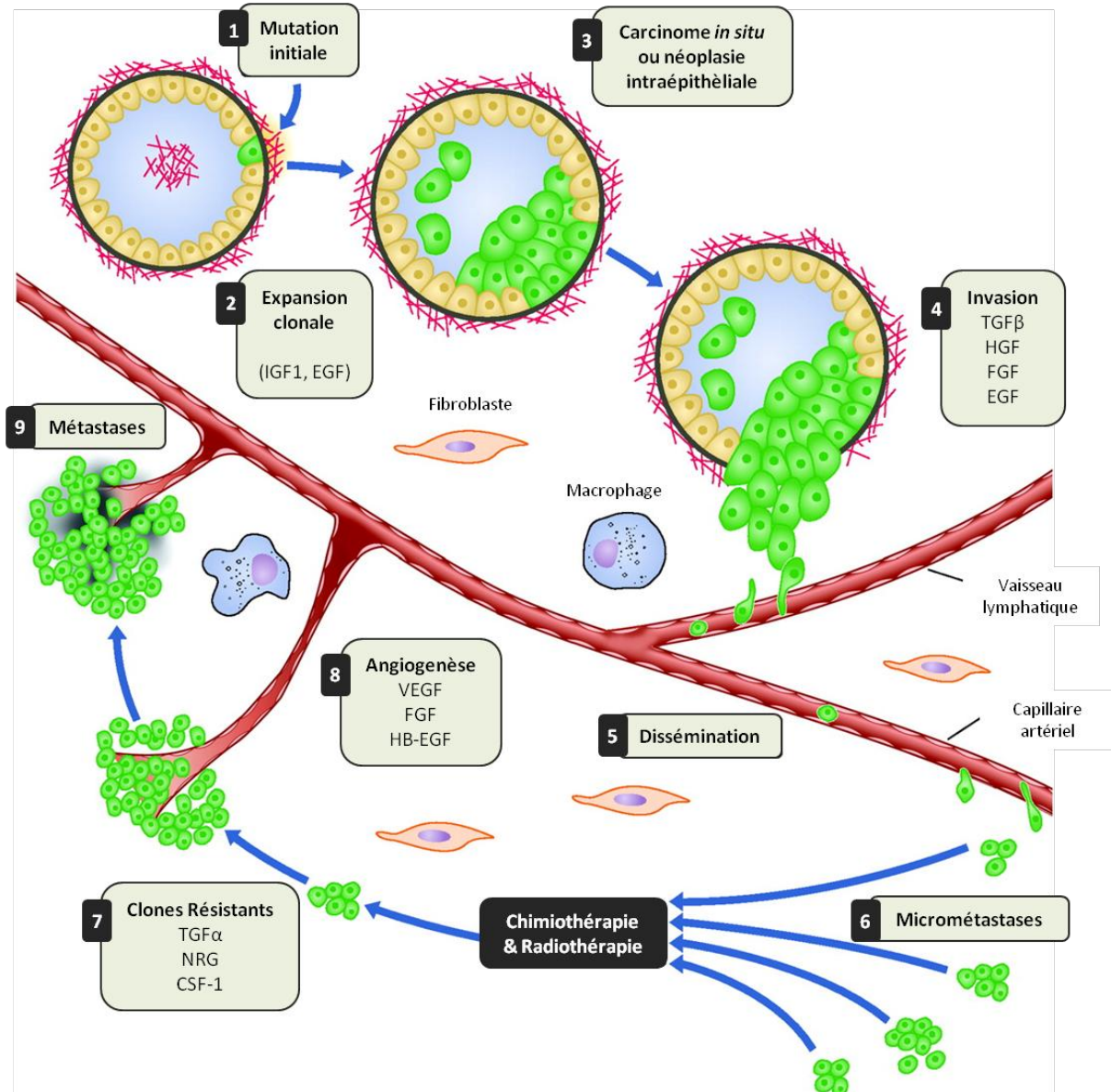
Toutefois, ces différents agents sont souvent utilisés en combinaison en fonction du type de tumeurs. Par exemple, une étude a montré que les patientes atteintes d'une tumeur triple négative étaient en rémission totale après une chimiothérapie néo-adjuvante associant plusieurs agents. En revanche, la chimiothérapie néoadjuvante mise en œuvre ne permet pas de traiter efficacement les tumeurs appartenant aux sous-groupes Luminal A et B (Lv et al., 2011). Dans ce sens, un cycle de chimiothérapie, débutant par de faibles doses de paclitaxel suivies d'une association de 5-Fluorouracile, d'épirubicine (une anthracycline) et de cyclophosphamide, présente une bien meilleure efficacité pour des patientes atteintes d'un carcinome basal-like que pour des patientes atteintes de tumeur de type luminal (Anan et al., 2015).

### ***3. Les traitements personnalisés***

L'administration de ces traitements dépend directement de la classification moléculaire de la tumeur et de l'expression de certains marqueurs comme le récepteur aux oestrogènes (ER) ou le co-récepteur à l'EGF (HER2).

L'hormonothérapie ne peut être prescrite qu'à des patientes atteintes de tumeurs hormonosensibles, exprimant les récepteurs aux oestrogènes (ER) et à la progestérone (PR). L'hormonothérapie consiste à abroger l'effet des hormones féminines qui stimulent la prolifération et la survie des cellules tumorales mammaires. Ceux-ci peuvent être inhibés par des anti-oestrogènes de type SERM (Selective Estrogen Receptor Modulators) ou SERD (Selective Estrogen Receptor Degradation). Les SERM, tel que le tamoxifène, sont des antagonistes de ER tandis que les SERD favorisent la dégradation de ce récepteur. L'effet des hormones féminines sur les tumeurs mammaires peut être inhibé plus en amont, en bloquant la sécrétion de celles-ci. Chez la femme ménopausée, des anti-aromatases, comme l'anastrozole, empêchent la transformation des androgènes en oestrogènes. Chez les patientes plus jeunes, la sécrétion des hormones féminines est bloquée par des antagonistes de la LHRH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone) qui inhibe la stimulation des ovaires par l'hypophyse et donc la sécrétion d'oestrogènes.

Depuis quelques années, l'apparition des thérapies ciblées personnalise encore un peu plus la stratégie thérapeutique mise en œuvre pour chaque patiente. Ces thérapies résultent d'analyses approfondies des profils d'expression génique des tumeurs et des anomalies les



**Figure 5 : Implication des différents signaux moléculaires au cours de la carcinogénèse mammaire.** L'initiation est la première étape de la carcinogénèse et correspond à l'apparition d'une cellule ayant accumulé un grand nombre d'altérations génétiques (1). Sous l'influence de différents signaux comme l'EGF ou l'IGF-1, cette cellule sera capable de se multiplier au cours de la promotion jusqu'à former un carcinome *in situ* (2). D'autres signaux et modifications des cellules cancéreuses surviennent durant la dissémination, conférant ainsi aux cellules des propriétés invasives (4-6). Bien que les traitements permettent d'éradiquer bon nombre de cellules cancéreuses, certaines y sont résistantes sous l'effet d'autres signaux tels que le TGF $\alpha$ , les neurégulines (NRG) et le colony stimulating factor-1 (CSF-1), favorisant ainsi l'apparition de métastases (7-9). D'après (Witsch et al., 2010).

caractérisant. Les thérapies ciblées reposent sur ces anomalies, ce qui les rend spécifiques des cellules tumorales et sont donc moins délétères pour les tissus sains. Parmi les cancers du sein diagnostiqués, 12 à 20% présentent une amplification du gène codant le co-récepteur au facteur de croissance épithélial (EGF), HER2. Dans ce cas, une thérapie ciblée existe et peut être employée dans la prise en charge thérapeutique de la patiente. Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé, le trastuzumab qui, en se fixant à ce récepteur, empêche la fixation de l'EGF et l'induction de sa cascade de signalisation pro-proliférative. Toutefois certaines patientes développent des résistances et l'utilisation d'autres thérapies ciblées, comme le lapatinib, un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase du récepteur à l'EGF, peut contrecarrer cet effet (Valabrega et al., 2007).

#### **D. La cancérogenèse mammaire**

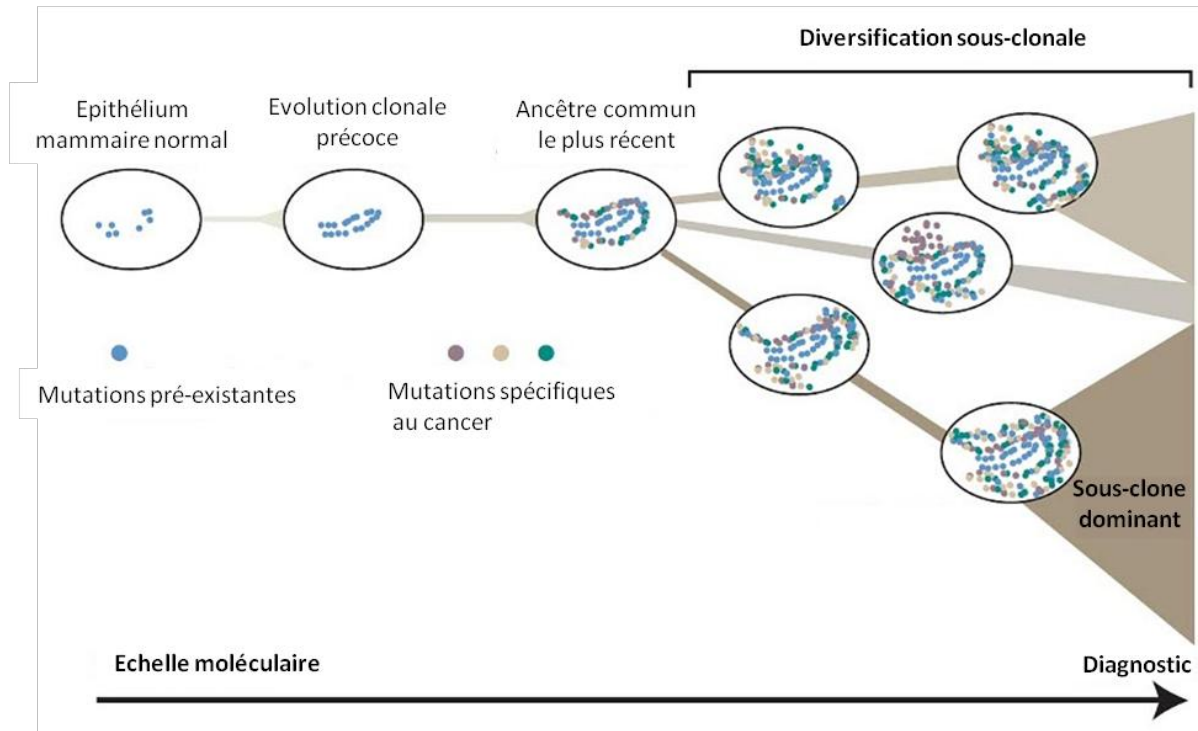
Généralement, la cancérogenèse se décline en trois étapes : l'initiation, la promotion et la dissémination. Ces trois étapes couvrent l'intégralité du développement d'un cancer, depuis l'apparition d'une cellule cancéreuse à l'envahissement d'autres organes par les métastases. Divers mécanismes moléculaires, conférant ainsi de nouvelles propriétés aux cellules, sont impliqués au cours de chaque stade d'évolution de la tumeur (**Figure 5**).

##### **1. Altérations génétiques et croissance tumorale**

###### a) Les principales mutations retrouvées dans les tumeurs mammaires

Le développement d'un cancer résulte d'une accumulation d'altérations génétiques, qu'il s'agisse aussi bien de mutations, que de délétions ou de translocations. Dans le cadre du cancer du sein, les principales mutations sont somatiques, c'est-à-dire qu'elles ne touchent que les cellules cancéreuses, mais peuvent être nombreuses et de nature très variée. L'apparition de ces altérations génétiques est multifactorielle. L'âge, les prédispositions génétiques ou l'exposition à des agents environnementaux, chimiques ou physiques sont autant de facteurs qui jouent en leur faveur.

De nombreuses études se sont appliquées à identifier et comprendre les mutations touchant les cellules tumorales mammaires. Dans ce sens, une équipe a montré que le spectre d'acquisition de mutation variait au cours de l'évolution de la tumeur. Les mutations les plus précoces sont essentiellement des substitutions, et notamment la substitution d'une Cytidine en une Thymidine dans les îlots CpG, modifiant ainsi le profil de méthylation du génome. De manière intéressante, il semble exister sur le génome des points chauds de mutations. En effet,



**Figure 6 : Représentation schématique de l'accumulation d'anomalies génétiques à l'origine d'une diversité sous-clonale dans le développement des cancers.** L'apparition d'un cancer résulte d'une évolution des mutations aboutissant à la prolifération anarchique des cellules. A partir d'un ancêtre commun porteur d'un certain nombre de mutations, plusieurs sous-populations émergent et sont toutes porteuses des mêmes altérations que le progéniteur commun. L'apparition de ces sous-populations dépend elle-même de la prolifération cellulaire et de l'accumulation d'anomalies génétiques survenant à chaque réplication de l'ADN. Bien que ces populations sous-clonales confèrent une certaine hétérogénéité, il apparaît que l'une d'elle prend le dessus sur les autres. La multiplication de cette sous-population est à l'origine de la formation de la masse tumorale qui pourra ensuite être diagnostiquée. Illustration réalisée par l'Institut Sanger (Royaume-Uni) d'après (Nik-Zainal et al., 2012a).

ces substitutions sont préférentiellement localisées sur certaines portions de chromosomes (Nik-Zainal et al., 2012b). Les anomalies plus importantes, comme les délétions ou les amplifications chromosomiques apparaissent plus tardivement (Nik-Zainal et al., 2012a). L'accumulation d'altérations génétiques est à l'origine de populations sous-clonales au sein d'une tumeur, jusqu'à ce qu'une sous-population prenne le dessus sur les autres, accélérant ainsi la croissance de la tumeur (**Figure 6**).

A ce jour, un peu plus de 4000 altérations génétiques toutes natures confondues, affectant environ 2500 gènes, ont été identifiées dans les cancers du sein (Yang et al., 2015). Toutefois, certains gènes semblent être particulièrement touchés par les altérations génétiques. C'est le cas notamment du gène codant la protéine p53, qui est muté dans 30% des cas de cancers du sein. D'autres comme *PIKCA*, *PTEN*, *HER2* ou encore *SMAD4* comportent également souvent des mutations dans les cancers mammaires (Watson et al., 2013) (Nik-Zainal et al., 2012b). Bien que le nombre de gènes touchés soit conséquent, ils sont très souvent impliqués dans la prolifération cellulaire et l'échappement à l'apoptose.

Dans 5 à 10% des cas, les altérations génétiques sont également retrouvées dans les cellules germinales, rendant les cas de cancer du sein héréditaires et familiaux. Le plus souvent, ces cas familiaux sont associés à des mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* et une perte de fonction de ces protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. La présence de ces mutations augmente considérablement non seulement le risque de développer une tumeur mammaire, mais également celui de déclencher un cancer ovarien (Teng et al., 2008).

#### b) Les signaux inducteurs de survie cellulaire

La promotion d'un cancer mammaire passe par une étape de croissance tumorale. Certaines mutations décrites précédemment ont pour conséquence directe d'augmenter le pouvoir prolifératif des cellules cancéreuses. C'est le cas particulièrement de celles touchant le gène codant PTEN, engendrant ainsi une activation constitutive de la voie de survie PI3K/Akt (Phosphatidylinositol-3 Kinase) (Davis et al., 2014).

En plus des altérations génétiques qui activent la prolifération cellulaire, celle-ci est également stimulée par des signaux extracellulaires. Ces derniers sont le plus souvent d'origine endocrine, via les hormones stéroïdiennes (œstrogènes et progestérone), ou paracrine/autocrine, par l'intermédiaire des facteurs de croissance (EGF, IGF pour Insulin-like Growth Factor). L'action des œstrogènes fait principalement intervenir deux types de



récepteurs nucléaires ER $\alpha$  et ER $\beta$ . En comparant les profils transcriptomiques de cellules, dont la voie des œstrogènes est soit inhibée, soit stimulée, des études ont montré que les œstrogènes induisaient l'expression de nombreux gènes, notamment impliqués dans la progression du cycle cellulaire (Frasor et al., 2003). Toutefois, il semble que cet effet ne soit que le résultat de l'activité de ER $\alpha$ , puisque ER $\beta$ , au contraire, semble avoir un effet anti-prolifératif sur les cellules tumorales mammaires (Paruthiyil et al., 2004).

De nombreux facteurs de croissance sont capables de stimuler la prolifération des cellules tumorales, particulièrement l'EGF et l'IGF-1 (Voudouri et al., 2015). Ces deux facteurs de croissance se fixent respectivement aux récepteurs de la famille ErbB et IGF-R et activent la prolifération cellulaire via les voies Ras/Raf/MAPK et PI3K/Akt. De plus, il semble exister de nombreuses connections entre ces signaux mitogènes. En effet, des études ont montré qu'une co-stimulation avec de l'EGF et de l'IGF-1 induisait une activation synergique des voies de signalisation (Zielinski et al., 2009), potentialisant ainsi leurs effets mitogènes. La cascade induite par l'IGF-1 est également capable d'activer la voie des œstrogènes, amplifiant ainsi son action proliférative (Song et al., 2010) ; (Zhang et al., 2011). A l'inverse, les hormones sexuelles sont également à même d'induire, par un mécanisme non génomique, l'activation des récepteurs à l'EGF ou à l'IGF-1 (Skandalis et al., 2014).

En plus de leur impact sur la prolifération, l'ensemble de ces voies favorise également la survie cellulaire. Comme cela a déjà été évoqué plus haut, les facteurs de croissance tels que l'EGF ou l'IGF-1 induisent l'activation de la voie PI3K/Akt, appelée aussi voie de survie, dont la suractivation a largement été associée à de nombreuses résistances aux thérapies (Baselga, 2011) ; (Burriss, 2013). La voie hormonale favorise également la survie cellulaire en régulant positivement l'expression de gènes codant des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Schacter et al., 2014) ; (Lewis-Wambi and Jordan, 2009).

## ***2. D'une tumeur localisée vers une tumeur envahissante***

La dernière étape de la progression tumorale correspond à sa capacité à se disséminer au-delà du lit tumoral d'origine, aussi bien dans les tissus avoisinants que dans d'autres plus éloignés. L'envahissement des autres tissus résulte de la capacité des cellules tumorales à dégrader la matrice extracellulaire et à passer dans la circulation sanguine. Cette progression tumorale peut également s'accompagner du développement de résistances aux thérapies. L'acquisition de ces propriétés par les cellules cancéreuses mammaires est sous le contrôle de nombreux facteurs de croissance mais également du micro-environnement tumoral.

a) Les voies de signalisation contrôlant l'envahissement tumoral

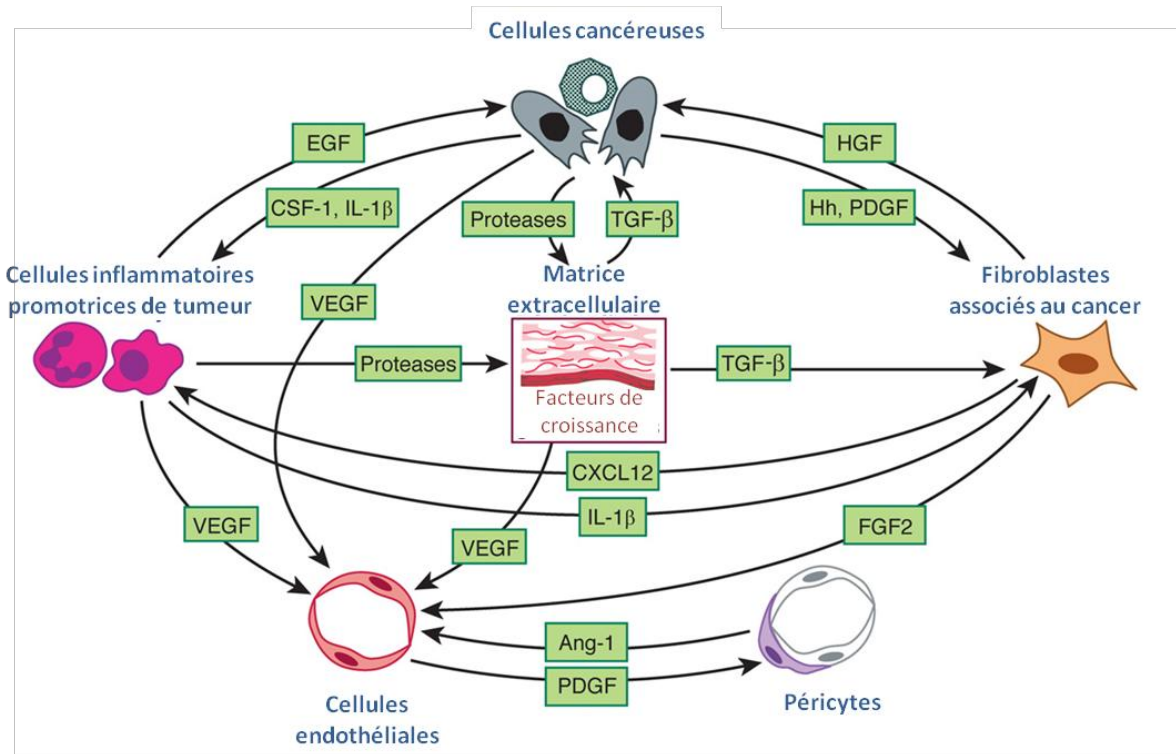
Les voies de l'EGF et de l'IGF-1, vues précédemment et bien connues pour leur activité mitogène, ont aussi un rôle à jouer dans l'acquisition d'un phénotype envahissant des cellules tumorales mammaires. En effet, une stimulation par ces deux facteurs de croissance, de cellules tumorales mammaires triple-négatives leur confère un haut pouvoir tumorigénique associé à une augmentation de leurs capacités invasives (Castaño et al., 2013).

Toutefois, à ce stade elles sont loin d'être les seules voies de signalisation impliquées. Par exemple, la glycoprotéine Wnt en se fixant à son récepteur Frizzled permet la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine, où elle régule l'expression de gènes cibles codant des métalloprotéases ou des protéines matricielles, connues pour leur rôle dans l'envahissement tumoral (Herbst et al., 2014). Cette voie de signalisation agit non seulement sur la prolifération et l'apoptose, mais également sur les capacités métastatiques. En effet, l'inhiber *in vivo* réduit considérablement les métastases pulmonaires induites par injection orthotopique ou dans la circulation, de cellules tumorales mammaires (Jang et al., 2015). Par ailleurs, la superfamille du TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor) est également un puissant régulateur de l'acquisition de propriétés métastatiques. Ces effets sont multiples et concernent notamment l'échappement au système immunitaire, l'angiogenèse ou encore la transdifférenciation d'une cellule épithéliale en une cellule mésenchymateuse possédant des capacités invasives (Padua and Massagué, 2009). Les cancers mammaires envahissent préférentiellement les os par des métastases ostéolytiques, nécessitant l'action du TGF $\beta$  (Chiechi et al., 2013). En effet, les lésions ostéolytiques sont nettement réduites lorsque les cellules tumorales mammaires expriment un récepteur soluble du TGF $\beta$ , empêchant ainsi l'activation de sa voie de signalisation (Mourskaia et al., 2009).

De nombreux autres facteurs de croissance, comme l'HGF, le PDGF ou encore la voie des intégrines participent également à l'acquisition de propriétés invasives des cellules tumorales mammaires (Yilmaz and Christofori, 2009). Bon nombre de ces facteurs sont sécrétés de manière paracrine par les cellules avoisinant les cellules tumorales, qui constituent le micro-environnement tumoral.

b) L'importance du micro-environnement tumoral

Le micro-environnement tumoral est une architecture complexe qui se compose de cellules souches cancéreuses (CSC), de cellules endothéliales, de fibroblastes associés au



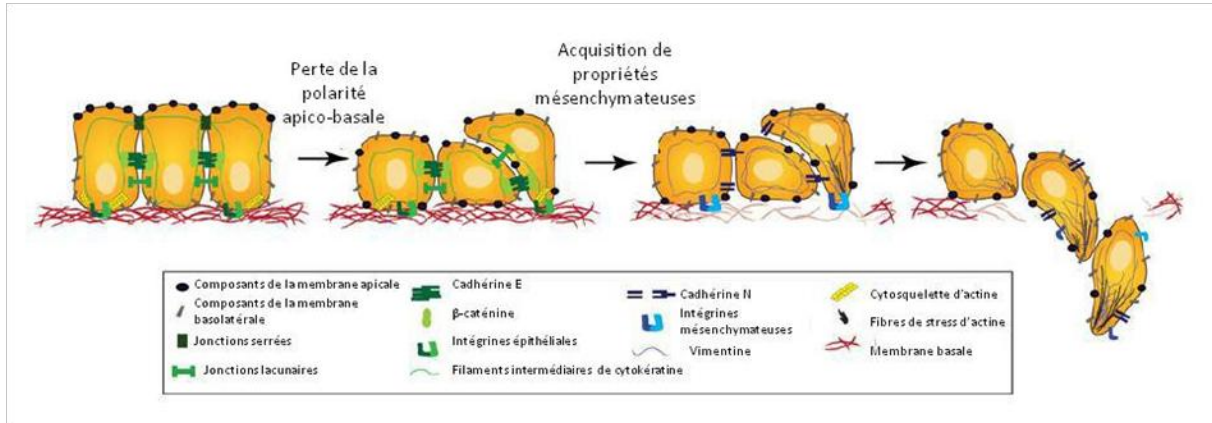
**Figure 7 : Représentation schématique de l'interdépendance des cellules tumorales et des cellules du micro-environnement tumoral.** Le micro-environnement tumoral est composé de la matrice cellulaire ainsi que de cellules endothéliales, inflammatoires, de péricytes de fibroblastes en plus des cellules cancéreuses. L'ensemble de ces éléments sont en étroite collaboration par l'intermédiaire notamment de la sécrétion de nombreux facteurs de croissance et cytokines (Exemple : TGF $\beta$ , VEGF, IL-1 $\beta$ ...). Ces interactions sont mises à profit des cellules tumorales afin de promouvoir leur progression. D'après (Hanahan and Weinberg, 2011).

cancer (CAF) et de cellules immunitaires inflammatoires, en plus des cellules tumorales. L'ensemble de ces éléments ont un rôle important dans la progression tumorale (**Figure 7**).

Les CSCs ont un rôle particulier et qui leur est propre, puisque celles-ci permettent le renouvellement de la tumeur. Il s'agit d'une réserve de cellules porteuses de toutes les mutations oncogéniques et capables de ré-initier le développement d'une tumeur (Atena et al., 2014). Les autres types cellulaires influent directement sur les capacités à envahir d'autres tissus des cellules tumorales. Par exemple, les cellules inflammatoires du système immunitaire sécrètent des facteurs de croissance mitogènes (EGF) ou des facteurs de croissance pro-angiogéniques (VEGF, FGF2). De plus, en sécrétant des métalloprotéases matricielles, les cellules inflammatoires du système immunitaire sont également capables de dégrader la matrice extra-cellulaire, aidant ainsi la migration des cellules tumorales (Hanahan and Weinberg, 2011). Le rôle des CAF dans la progression tumorale semble essentiel puisqu'ils modifient le micro-environnement en faveur de la tumeur, notamment en réprimant la réponse immunitaire cytotoxique au profit de cellules immunitaires sécrétrices de cytokines pro-tumorales (exemple : les macrophages associés à la tumeur sécrétant de l'IL-6) (Liao et al., 2009). De plus, ces cellules sécrètent également du TGF $\beta$ , qui, comme nous l'avons mentionné auparavant, est capable de réguler la croissance et l'invasivité tumorales (Yu et al., 2014).

Les fibroblastes associés au cancer sont également activateur de l'angiogenèse en sécrétant une chimiokine CXCL12, qui recrute les progéniteurs endothéliaux (Orimo et al., 2005). Les cellules endothéliales et les péricytes sont des acteurs clés de l'angiogenèse, stimulée par exemple par le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ou le FGF (Welti et al., 2013). La vascularisation tumorale est différente de la vascularisation physiologique qui possède une hiérarchisation de son organisation. L'angiogenèse tumorale est caractérisée par la formation d'un réseau vasculaire désorganisé et composé de vaisseaux anormalement perméables, favorisant ainsi le passage des cellules tumorales dans la circulation sanguine (Siemann, 2011).

Un micro-environnement favorable n'est néanmoins pas suffisant pour qu'une cellule tumorale envahisse d'autres tissus. En effet, elle doit subir au préalable de profondes modifications au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) qui lui confèreront des capacités migratrices.



**Figure 8 : Modifications morphologiques et moléculaires au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse.** La transition épithélio-mésenchymateuse se caractérise par une perte de la polarité apico-basale des cellules épithéliales et des modifications de leurs propriétés d'adhérence. Dans les cellules ayant subi la TEM, les jonctions cellule-cellule ne se font plus par l'intermédiaire de la E-cadhérine mais de la N-cadhérine et les intégrines permettant l'interaction avec la matrice extra-cellulaire sont modifiées. De plus, les cellules épithéliales acquièrent une morphologie plus étalée résultant de filaments intermédiaires composés non plus de cytokeratine, mais de vimentine. L'ensemble des modifications favorisent les capacités migratrices des cellules tumorales. D'après (Micalizzi et al., 2010).

c) La transition épithélio-mésenchymateuse

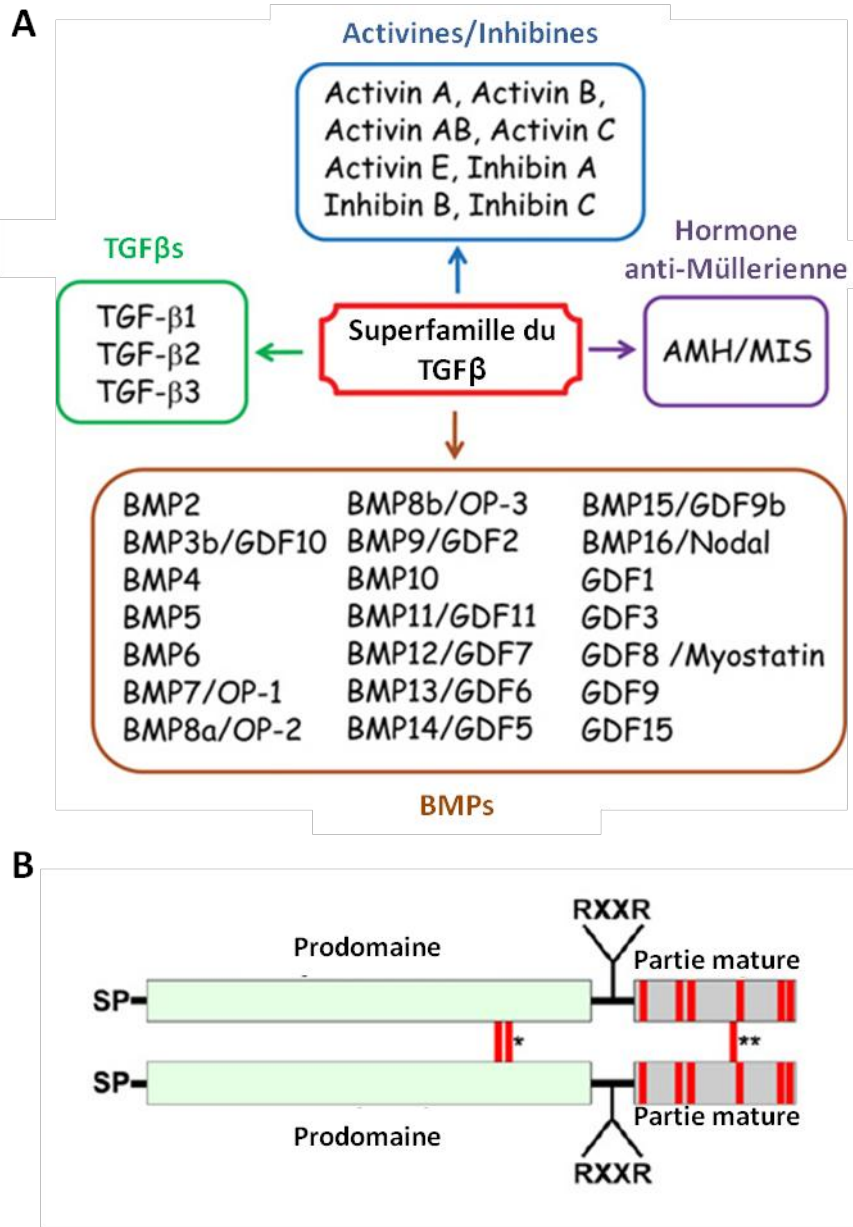
La TEM correspond à la transdifférenciation de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses mobiles. C'est un phénomène transitoire et réversible qui s'accompagne d'une perte de la polarité apico-basale des cellules, de modifications profondes de leurs capacités d'adhérence aux autres cellules, mais également à la matrice extracellulaire, ainsi que d'un remaniement du cytosquelette (Yilmaz and Christofori, 2009). L'ensemble des remaniements mis en œuvre au cours de la TEM est illustré en **Figure 8**.

Au cours du passage d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux, l'expression de certains gènes est inhibée au profit d'autres. Les gènes codant les protéines claudines, occludines ou connexines, constituants des jonctions serrées et lacunaires, voient leur niveau d'expression diminué au cours de la TEM. La cadhérine épithéliale (E-cadhérine), impliquée dans les jonctions adhérentes, est également réprimée et se voit remplacée par une autre cadhérine mais de type neural (N-cadhérine). Au niveau des jonctions adhérentes, les cadhérines portées par deux cellules voisines interagissent l'une avec l'autre en présence de calcium. Toutefois, la force d'interaction entre 2 cadhérines de type E est plus forte que celle entre 2 N-cadhérine. De plus, lorsqu'elle est exprimée, la N-cadhérine est préférentiellement localisée au niveau des lamellipodes. Le remplacement de la E-cadhérine par la N-cadhérine au cours de la TEM favorise ainsi la perte d'adhérence cellule-cellule et l'acquisition de capacités migratrices des cellules tumorales (Yilmaz and Christofori, 2009). De la même manière, les filaments intermédiaires, composés exclusivement de cytokératine dans les cellules épithéliales, sont constitués de vimentine dans les cellules les plus invasives (Polioudaki et al., 2015). En plus de changements de composition, le cytosquelette se réorganise, sous l'action des protéines G Rho, en un réseau dynamique comptant de nombreuses fibres de stress (Lamouille et al., 2014).

L'ensemble de ces processus cellulaires est contrôlé par 3 familles de facteur de transcription (SNAIL, ZEB et TWIST), dont l'expression est précocement induite au cours de la TEM. Ces protéines sont capables d'interagir avec de nombreux complexes de remaniement de la chromatine (exemple : des protéines Polycomb PRC2, le complexe Switch/Sucrose nonfermentable SWI/SNF) et régulant ainsi l'expression de leurs gènes cibles comme celui codant la E-cadhérine. Ces facteurs de transcription contribuent activement à l'acquisition de propriétés invasives. En effet, la surexpression de Snail ou Slug dans une lignée d'adénocarcinome mammaire faiblement invasive, les MCF7, diminue leurs capacités à

adhérer à différentes protéines matricielles et augmente dans le même temps leur pouvoir invasif (Smith et al., 2014) (Bailey et al., 2012).

Ces facteurs de transcription inducteurs de la TEM ne sont pas constamment exprimés et leur expression est finement régulée. Elle ne peut être induite que sous l'effet de certains facteurs de croissance (TGF $\beta$ , FGF, l'EGF ou Wnt), sécrétés notamment par les cellules du micro-environnement tumoral (Lamouille et al., 2014). Comprendre les mécanismes moléculaires régulant l'induction de la TEM représente un réel enjeu en cancérologie puisque l'identification de ces mécanismes permettrait de limiter l'échappement métastatique de cellules tumorales. La superfamille du TGF $\beta$  semble particulièrement importante dans l'induction de la TEM et l'acquisition de propriétés invasives des cellules tumorales.



**Figure 9 : Sous-familles et structure des facteurs de croissance appartenant à la superfamille du TGFβ chez les Vertébrés.** La superfamille du TGFβ peut être divisée en 4 sous-groupes : les activines/inhibines, les TGFβ, les BMPs/GDFs et l’hormone anti-Müllerienne. Ces différentes sous-familles ainsi que les membres qui les constituent sont présentés en **A**. Malgré la quantité de membres différents appartenant à la superfamille du TGFβ, tous partagent une structure commune schématisée en **B**. Chacun des membres possède un pro-domaine en N-terminal et une partie mature en C-terminal. Six résidus Cystéine (barre rouge) bien conservés, s’organisent en un nœud Cystéine. D’autres cystéines, marquées par deux astérisques, situées dans le pro-domaine et dans le domaine mature permettent la dimérisation du ligand en formant un pont disulfure entre les 2 sous-unités (celles indiquées par un astérisque sont spécifiques aux TGFβ). Le site RXXR correspond au site de clivage par la furine. D’après (Mueller and Nickel, 2012; Santibañez et al., 2011).



## II. La voie de signalisation du TGF $\beta$ : généralités et conséquences sur la tumorigenèse

### A. Généralités sur la superfamille du TGF $\beta$

#### 1. Diversité des ligands

La superfamille du TGF $\beta$  est composée d'une quarantaine de facteurs de croissance, séparés en 4 sous-groupes : les isoformes du TGF $\beta$ , les BMPs (Bone Morphogenic Protein) et GDFs (Growth and Differentiation Factors), les inhibines/activines et l'hormone anti-Müllerienne (**Figure 9A**) (Santibañez et al., 2011). Malgré la diversité apparente, ces facteurs de croissance sont tous des polypeptides agissant sous forme de dimères. Ils sont tous synthétisés sous forme de précurseur dont le pro-domaine devra être clivé pour libérer la partie mature et active du facteur de croissance (Mueller and Nickel, 2012). De plus, certaines homologies structurales ont été répertoriées. Par exemple, 6 résidus Cystéines situés en C-terminal sont très conservés entre les différents membres de la superfamille du TGF $\beta$ . La formation du dimère de ligands passe par 1 à 2 cystéines supplémentaires qui sont liées de manière covalente par des ponts disulfures représentés en **Figure 9B** (Galat, 2011).

Le sous-groupe des BMPs et des GDFs est de loin le plus abondant, puisqu'il est constitué à lui seul de 20 membres. Ces facteurs de croissance interviennent notamment dans l'angiogenèse, au cours du développement embryonnaire de plusieurs organes (les os, le cœur, les poumons...) mais également dans la reproduction (Mueller and Nickel, 2012). Certains d'entre eux semblent toutefois être également associés à quelques pathologies. C'est le cas par exemple de BMP2 dans certaines formes d'arthrite ou encore de BMP3 et BMP11 dans les cancers colorectaux (Wang et al., 2014).

Cinq isoformes d'activines/inhibines sont connues à l'heure actuelle chez l'homme. Elles sont formées d'un homo- ou hétérodimère de sous-unités bêta pour les activines ( $\beta$ A ou  $\beta$ B). Les inhibines sont quant à elles constituées d'une sous-unité alpha et d'une des sous-unités bêta mentionnées ci-dessus. Celles-ci sont sécrétées par les gonades et impliquées à plusieurs niveaux dans la régulation des fonctions reproductrices en stimulant les organes reproducteurs (ovaires et testicules) mais aussi l'hypophyse, régulant la sécrétion d'hormones sexuelles. (Xia and Schneyer, 2009). Les activines, notamment la A, sont aussi exprimées par les cellules du système immunitaire au cours d'une réaction inflammatoire et induisent la sécrétion d'IgG et d'IgE par les lymphocytes B (Ogawa et al., 2008). En plus de ses rôles

physiologiques, l'activine A est également associée à la progression des cancers pulmonaires et œsophagiens (Loomans and Andl, 2014).

Le TGF $\beta$  représente la dernière sous-famille qui se compose de 3 formes chez les mammifères : les TGF $\beta$  1, 2 et 3. Elles sont codées par 3 gènes différents mais présentent de 71 à 80% d'homologies dans leur séquence protéique. Le TGF $\beta$ 1 est l'isoforme la plus abondante exprimée de manière ubiquitaire tandis que les formes 2 et 3 sont respectivement exprimées par les cellules nerveuses et les cellules pulmonaires et rénales (Kubiczkova et al., 2012). Le TGF $\beta$  est impliqué dans la régulation de nombreux processus biologiques, aussi bien dans le développement que dans la régulation de la réponse immunitaire. De plus, il est également mis en cause dans de nombreuses pathologies, parmi lesquelles sont retrouvées les fibroses cardiaques, pulmonaires et hépatiques ainsi que les cancers (Santibañez et al., 2011).

L'ensemble de ces facteurs de croissance se fixe à un hétéro-tétramère de récepteurs composé d'un dimère de récepteurs de type I et d'un dimère de récepteurs de type II. Chaque ligand se fixe spécifiquement sur un couple de récepteurs de type I et II qui lui est propre, activant ainsi la cascade de signalisation faisant intervenir les protéines Smads.

## ***2. Variété des récepteurs***

La plupart des facteurs de croissance de la superfamille du TGF $\beta$  se fixe dans un premier temps au récepteur de type II. De manière générale, ils sont structurés en trois domaines : en N-terminal un domaine extracellulaire de fixation au ligand, un domaine transmembranaire et enfin un dernier en C-terminal possédant une activité Sérine-Thréonine Kinase (Mueller and Nickel, 2012). Quatre principaux récepteurs de type II ont été décrits : celui du TGF $\beta$  (TBR2), ceux de l'activine (ACVR1A et ACVR1B) et enfin celui des BMP (BMP2). Tandis que les isoformes du TGF $\beta$  et de l'activine ne se fixent qu'au récepteur de type II correspondant, les BMPs peuvent interagir avec le BMP2 mais également avec ACVR1A et ACVR1B (Hinck, 2012).

Les récepteurs de type I sont regroupés au sein de la famille des Alk (Activin receptor-like kinase) qui comprend 7 membres nommés Alk1 à Alk7. L'activine et le TGF $\beta$  utilisent les Alk 4, 5 et 7, alors que la voie de signalisation des BMPs et GDFs passe en général par les Alk 1, 2, 3 et 6 (Hinck, 2012). Structuellement, les récepteurs de type I sont assez proches de ceux de type II. Ils sont également organisés en un domaine de fixation du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine possédant une activité Sérine-Thréonine Kinase (Mueller and Nickel, 2012). En plus de ces trois domaines, les récepteurs de type I comprennent un

domaine intracellulaire proche de la membrane et riche en Glycine et Sérine, appelé boîte GS. Ce domaine est essentiel dans l'activation du récepteur de type I par le récepteur de type II (Graham and Peng, 2006). Au niveau du domaine kinase, se trouve une boucle propre à chaque récepteur, la boucle L45, et qui définit la spécificité des protéines Smads activées par le récepteur (Feng and Derynck, 1997).

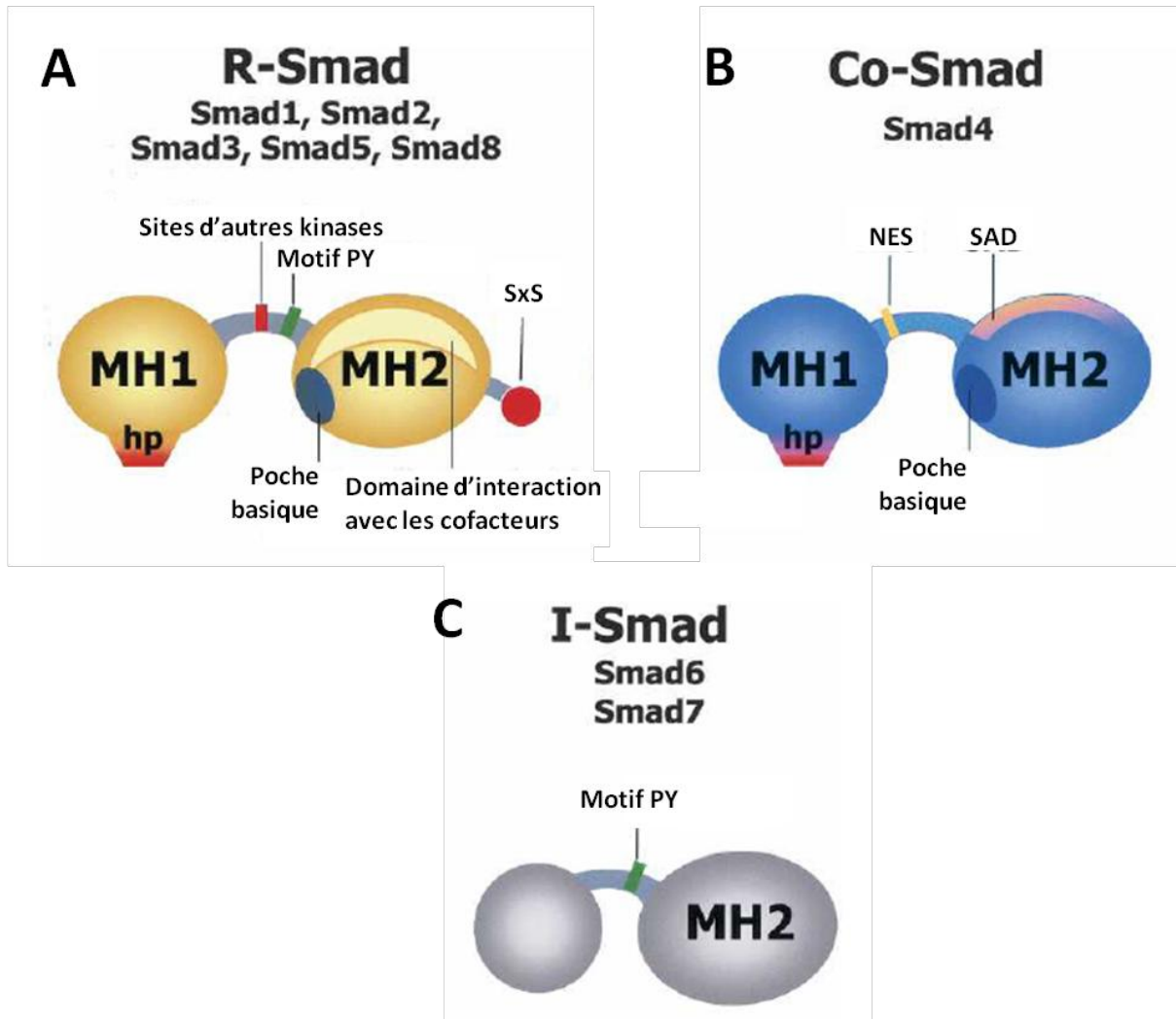
En plus des deux types de récepteurs inducteurs de la signalisation, un troisième type de récepteur a été décrit et appelé récepteur accessoire (Betaglycan, endogline...). Ces récepteurs peuvent fixer les différents types de ligands mais présentent des domaines cytoplasmiques tronqués. Ils jouent un rôle dans la régulation de l'activation des voies de signalisation. Par exemple, le betaglycan, plus connu sous le nom de récepteur au TGF $\beta$  de type III, favorise les complexes TBRI/TBR II et donc la voie du TGF $\beta$  mais inhibe celles de l'activine et des BMP (Massagué, 2012) ; (de Caestecker, 2004). Par ailleurs, l'endogline ne peut fixer directement les facteurs de croissance et semble au contraire stimuler la voie des BMPs et inhiber celle du TGF $\beta$  (de Caestecker, 2004).

L'interaction du ligand avec son récepteur est à l'origine de l'activation de leur activité kinase qui phosphoryle les effecteurs de la voie de signalisation, les protéines Smads.

### 3. *Au centre de la voie de signalisation : les protéines Smads*

Des protéines similaires aux Smads ont été mises en évidence chez la Drosophile et *C. elegans* où elles portent respectivement les noms de Mad et Sma. Sur le génome humain, il existe 8 gènes codant des protéines d'environ 500 résidus d'acides aminés, réparties en 3 groupes selon leur fonction. Les Smads 1, 2, 3, 5 et 8 appartiennent à la catégorie des R-Smads pour Smads régulées par le récepteur. La protéine Smad4 quant à elle, est appelée Co-Smad pour co-opératrice, car elle est capable d'interagir avec les R-Smads ainsi qu'avec d'autres facteurs de transcription. Enfin, les Smads 6 et 7 inhibent la voie de signalisation par un rétro-contrôle négatif. Leur structure protéique est organisée en 2 domaines globulaires reliés par un connecteur ou « linker ». Les domaines globulaires comportent des spécificités relatives à la fonction portée par la protéine Smad (Massagué et al., 2005).

Les deux domaines globulaires des R-Smads sont nommés MH1 et MH2 (Mad Homology 1 et 2) respectivement situés en N et C-terminal (**Figure 10A**). Le domaine MH1 comprend une séquence de localisation nucléaire (NLS) et porte le site de fixation à l'ADN. Smad2, comprenant une insertion de 30 acides aminés dans le domaine de liaison à l'ADN,



**Figure 10 : Représentation schématique de la structure des trois types de Smads.** Les R-Smads et la Co-Smad, médiatrices de la signalisation, se décomposent en deux domaines globulaires MH1 et MH2 séparés par un « linker » (A et B). Chacune de ces protéines porte en leur domaine MH1 une structure en épingle à cheveux (hp) interagissant avec l'ADN. Toutes deux présentent également une poche basique dans le domaine MH2 permettant la formation des complexes R-Smads/Co-Smad. L'interaction avec les co-facteurs transcriptionnels se fait par des régions du domaine MH2 (appelé SAD pour Smad4). Les R-Smads possèdent plusieurs sites de phosphorylation dans le « linker » un site de phosphorylation par le récepteur de type I (SxS). Le motif PY permet l'interaction avec des ubiquitine ligases. Dans sa région charnière, la protéine Co-Smad comporte une séquence d'export nucléaire (NES). Les Smads inhibitrices, I-Smads (C), sont également composées de deux domaines globulaires, dont un domaine MH2 en C-terminal. Leur « linker » comprend, comme les R-Smads, un motif PY pour l'interaction avec des ubiquitine ligases. D'après Massagué et al., 2005

est incapable de se lier directement à l'ADN. Le domaine MH2, quant à lui, permet l'interaction avec diverses protéines comme le récepteur de type I, des co-facteurs transcriptionnels ou des complexes de remodelage de la chromatine (Macias et al., 2015). Le site de phosphorylation par le récepteur de type I est situé en C-terminal et est constitué de 2 Sérines séparées par un résidu. De manière générale, le TGF $\beta$  et l'activine activent les Smads 2 et 3, alors que les récepteurs aux BMPs et aux GDFs phosphorylent les Smads 1, 5 et 8. Le connecteur possède des sites de phosphorylation d'autres kinases (CDK8/9, MAPK...) ainsi qu'un motif PY (Proline/Tyrosine), permettant l'interaction avec des protéines E3 ubiquitine ligase pour la dégradation des Smads par le protéasome (Aragón et al., 2011).

La protéine Smad4 a une organisation assez similaire à celle des R-Smads, excepté qu'elle ne possède aucun site de phosphorylation (**Figure 10B**), mais possède une séquence d'export nucléaire (NES) dans le « linker ». Une région à l'interface du connecteur et du domaine MH2, appelée SAD (Smad 4 Activation Domain), permet le recrutement par Smad4 de co-répresseurs et co-activateurs de la transcription de gènes cibles (Massagué et al., 2005).

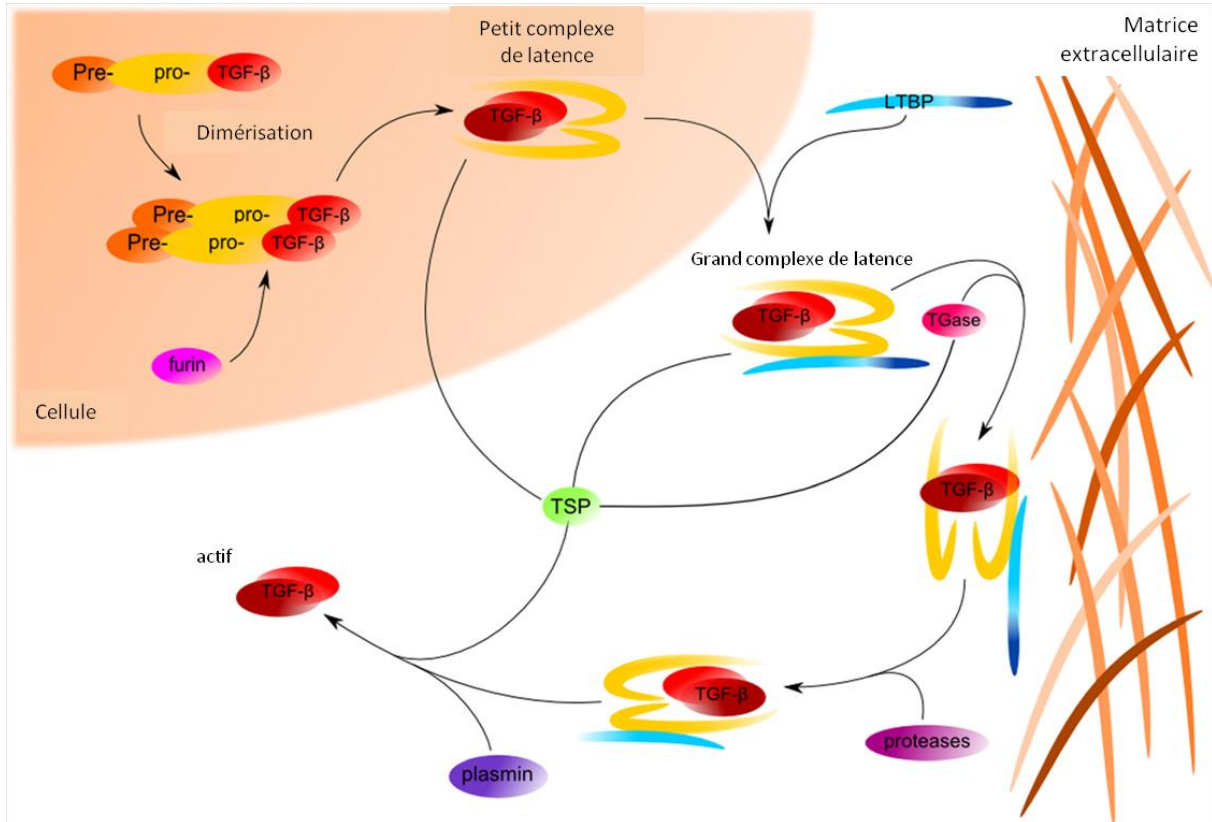
Les Smads inhibitrices 6 et 7 présentent une organisation légèrement différente, comme l'indique la **Figure 10C**. Elles comportent un domaine globulaire en N-terminal suivi d'un « linker » et d'un domaine MH2 en C-terminal. La présence de ce domaine permet aux Smads inhibitrices d'interagir avec les R-Smads ou le récepteur de type I. Comme les R-Smads, les Smads 6 et 7 possèdent également un motif PY au niveau du « linker » (Massagué et al., 2005). La protéine Smad7 est capable d'interférer aussi bien avec les voies du TGF $\beta$  et de l'activine qu'avec celles induites par les BMPs ou les GDFs. En revanche, Smad6 inhibe spécifiquement la cascade de signalisation induite par les BMPs et les GDFs.

Ce travail de thèse étant principalement focalisé sur le TGF $\beta$ , les mécanismes moléculaires détaillés par la suite ne concerneront que la signalisation induite par ce facteur de croissance.

## **B. La signalisation induite par le TGF $\beta$**

### ***1. Sécrétion et activation du TGF $\beta$***

Le premier point limitant dans l'induction de la cascade de signalisation par le TGF $\beta$  est sa présence, sous forme active, dans l'espace extracellulaire. En effet, ce facteur de croissance n'est pas exprimé ni sécrété directement sous sa forme active et demande l'intervention d'autres facteurs pour qu'il puisse se fixer à son récepteur. Le TGF $\beta$  est synthétisé sous forme d'un grand précurseur d'environ 400 acides aminés. Dès lors le dimère



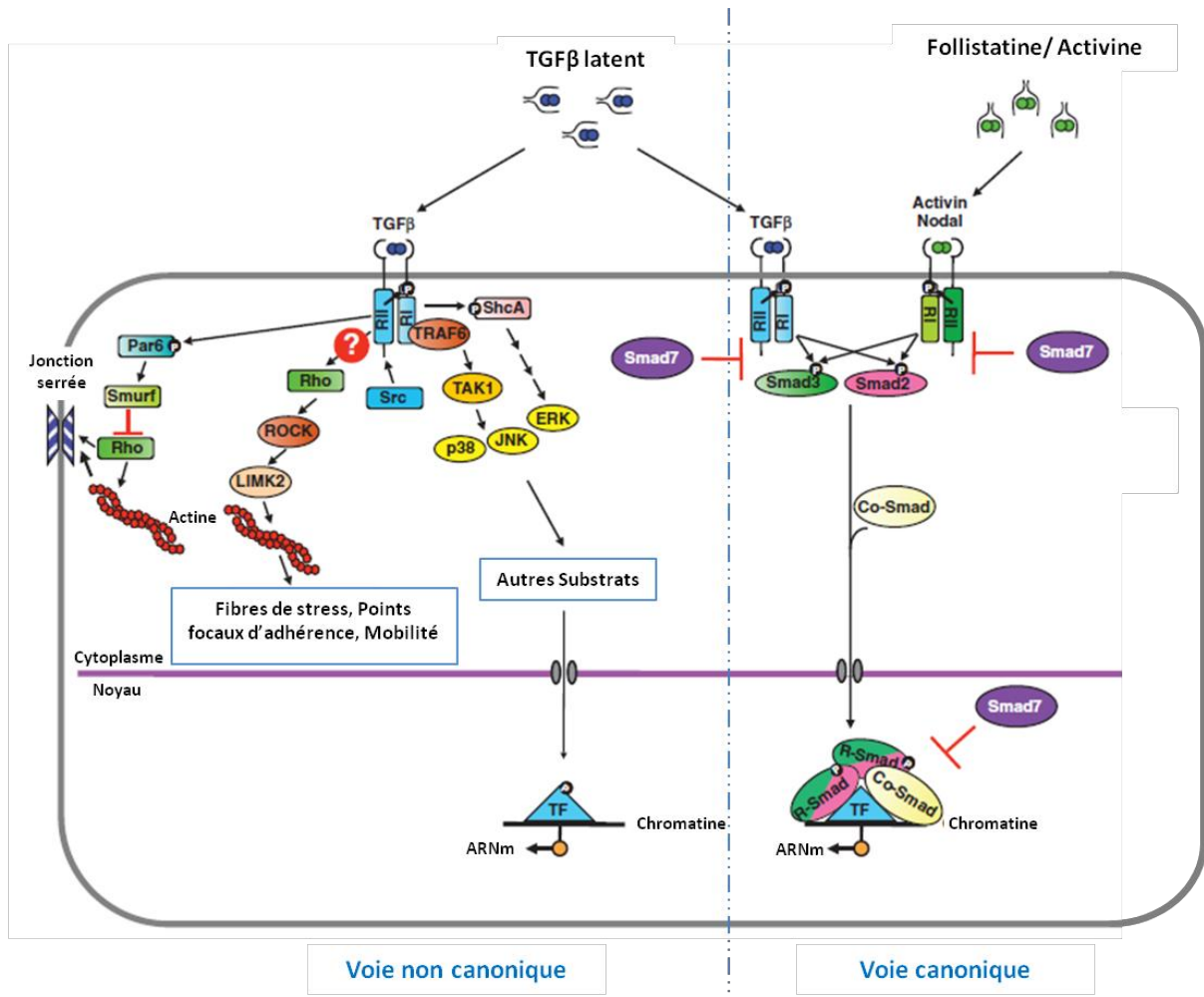
**Figure 11 : Schéma de la sécrétion et de la maturation du TGFβ.** Le TGFβ est synthétisé sous forme d'un précurseur se dimérisant et contenant un peptide signal (Pre) et un pro-domaine. La première étape de maturation consiste en le clivage du peptide signal et du pro-domaine par une furine convertase. Le clivage des pro-domaines du dimère libère le TGFβ mature et un peptide de latence (LAP) qui en restant associé au TGFβ mature constitue le petit complexe latent. Ce complexe est sécrété dans la matrice extracellulaire où il est associé à une protéine LTBP formant ainsi le grand complexe de latence. Ce dernier peut être fixé de manière covalente aux constituants de la matrice extra-cellulaire par action d'un transglutaminase (TGase). La libération du TGFβ mature fait intervenir dans un premier temps des protéases pour libérer le grand complexe de la matrice extracellulaire. L'action de la plasmine ou de la thrombospondine (TSP) permettent de rompre l'interaction avec le peptide LAP, libérant ainsi le TGFβ mature actif. D'après Kubiczkova et al., 2012.

se forme par l'intermédiaire de 2 ponts disulfures entre les 2 prodomaines et les deux parties matures. Rapidement les prodomaines sont clivés par une endopeptidase, la furine, libérant ainsi une protéine dimérique d'environ 70kDa appelée LAP (Latency-associated Peptide) et la partie C-terminal de 112 acides aminés, appelée TGF $\beta$  mature (Khalil, 1999). Toutefois le clivage du précurseur n'est pas suffisant pour activer le TGF $\beta$  puisque ce dernier reste associé de manière non-covalente au LAP (**Figure 11**). Dans l'appareil de Golgi, le TGF $\beta$  associé au LAP se fixe à une protéine LTBP (Latency Binding Protein), facilitant la sécrétion du TGF $\beta$ .

Pour que le TGF $\beta$  puisse être actif et induire une signalisation cellulaire, il faut que celui-ci se détache du LAP. Plusieurs mécanismes de libération du TGF $\beta$  ont été décrits jusqu'alors. La voie principale et privilégiée d'activation du TGF $\beta$  latent fait intervenir la Thrombospondine 1 (TSP-1). La séquence KRFK de TSP-1 interagit avec un motif LSKL porté par le peptide de latence. Cette interaction est stabilisée par une deuxième entre un motif WxxW de TSP-1 et un site actif en C-terminal du TGF $\beta$  mature. Ces interactions engendrent des modifications conformationnelles du LAP, aboutissant à la libération du TGF $\beta$  mature (Young and Murphy-Ullrich, 2004). D'autres mécanismes impliquant les intégrines, et plus particulièrement les dimères  $\alpha_V\beta_6$  et  $\alpha_V\beta_8$ , ont été décrits (Fontana et al., 2005); (Mu et al., 2002). En effet, l'interaction de la sous-unité alpha avec le LAP active la sous-unité bêta, qui, en interaction avec le cytosquelette et des protéines de la matrice extracellulaire, engendre une traction des deux sous-unités, libérant ainsi le TGF $\beta$  mature. L'activation du TGF $\beta$  mature peut également dépendre de protéases telles que les MMPs 2 et 9 ou la plasmine (Kubiczkova et al., 2012). La protéolyse catalysée par ces enzymes peut toucher, soit le peptide de latence, soit la protéine LTBP mais libère dans les deux cas le dimère de TGF $\beta$  mature, prêt à se fixer à son récepteur.

## 2. *Par la voie canonique*

Le dimère de TGF $\beta$  se fixe à un dimère de récepteur de type II (TBRII) et induit le recrutement du récepteur de type I, Alk5. La fixation du ligand permet l'autophosphorylation du récepteur de type II, qui devient alors capable de phosphoryler Alk5 en son domaine GS (Kubiczkova et al., 2012). Le récepteur de type I phosphorylé subit un changement conformationnel aboutissant à la libération de la protéine FKBP12 (FK506/ rapamycin binding protein) et laissant la place aux Smads 2/3 (Huse et al., 1999). Le récepteur de type I phosphoryle alors les protéines Smad2 et/ou Smad3 sur 2 résidus Sérine situés en C-terminal. L'interaction des Smads 2/3 avec Alk5 peut être facilitée par la protéine SARA (Smad



**Figure 12 : Représentation schématique des voies de signalisation canonique et non canonique induites par le TGFβ ainsi que de celle de l'activine.** Le TGFβ actif se fixe à un hétérotétramère de récepteurs qui s'activent en s'autophosphorylant. Une fois activés, ils sont alors capables d'activer la voie de signalisation canonique en phosphorylant les Smads 2/3. Ces dernières s'associent alors avec la protéine Smad co-opératrice, Smad4, et ce complexe est transloqué dans le noyau. En coopération avec d'autres facteurs de transcription (TF), le complexe activé régule la transcription de gènes cibles. L'activine une fois libérée de la follistatine, se fixe à son récepteur et induit une signalisation identique à la voie canonique du TGFβ. L'hétérotétramère de récepteurs est aussi capable d'activer d'autres médiateurs de la signalisation, regroupés dans la voie non canonique. Suite à la fixation du TGFβ sur son récepteur, la voie des p38/JNK est activée par l'intermédiaire de TRAF6 et TAK1. L'activité d'autres facteurs de transcription est alors induite. De plus, les récepteurs au TGFβ sont à l'origine d'un désassemblage des jonctions serrées en agissant sur la protéine Par6 et d'un remaniement du cytosquelette d'actine en régulant l'activité de protéines G comme Rho ou ROCK. D'après Moustakas and Heldin, 2009.



Anchor for Receptor Activation) (Di Guglielmo et al., 2003). En interagissant avec les Smads, SARA facilite leur phosphorylation par le récepteur de type I. Cette phosphorylation diminue ainsi l'affinité des Smads pour la protéine SARA et sont ainsi libérés dans le cytoplasme.

La phosphorylation des Sérines permet la dimérisation des Smads 2/3 ainsi que leur interaction avec Smad4, formant ainsi un oligomère R-Smads/Smad4 (Massagué et al., 2005). Ces complexes peuvent être composés soit d'un dimère de Smad2 ou de Smad3 et de Smad4, soit d'un hétérodimère Smads 2/3 et Smad4 (Inman and Hill, 2002). L'ensemble du complexe peut être transloqué dans le noyau grâce aux séquences NLS reconnues par des importines. Toutefois, la présence de Smad4 n'est pas nécessaire au passage dans le noyau des Smads 2/3 activées. Par exemple, la protéine Smad3 activée seule peut être importée dans le noyau par l'intermédiaire de l'importine bêta-1 (Kurisaki et al., 2001). Dans le noyau, le complexe Smad2/3-Smad4 se fixe sur une séquence d'ADN (5'-CAGAC-3') appelée SBE (Smad Binding Element), régulant ainsi l'expression de gènes cibles. Les Smads 2/3 subissent alors une phosphorylation du « linker » par CDK8/9 (Cyclin-Dependent Kinase 8/9), qui stimule leur activité transcriptionnelle en favorisant le recrutement de co-facteurs de la transcription (Alarcón et al., 2009). Cette cascade de signalisation est illustrée en **Figure 12**.

### 3. *Par la voie non canonique*

Le TGF $\beta$  induit majoritairement une signalisation par les Smads. Cependant, d'autres voies de signalisation, regroupées sous le terme de « voie non canonique », peuvent également être activées par la fixation du TGF $\beta$  sur son récepteur (**Figure 12**). C'est notamment le cas de la voie des MAPK et de la voie PI3K (Massagué, 2012). Cette activation est complexe et semble dépendre du type cellulaire, mais elle fait intervenir d'autres médiateurs comme TRAF6 (TNF-receptor associated factor 6) ou TAK1 (TGF $\beta$  associated kinase 1) (Mu et al., 2012). TRAF6, interagissant avec Alk5, est activé par la formation de l'hétérotétramère de récepteurs. Son site catalytique possède une activité ubiquitine ligase et son activation engendre à la fois une auto-ubiquitinylation, ainsi qu'une poly-ubiquitinylation activatrice de TAK1. Cette dernière, appartenant à la famille des MAPK Kinases, s'autophosphoryle permettant alors la phosphorylation de ces cibles telles que p38 (Sorrentino et al., 2008). De plus, le TGF $\beta$  semble aussi être directement impliqué dans la polarisation et l'architecture cellulaire. En effet, le récepteur de type II phosphoryle directement la protéine PAR6 (partitioning defective 6), un régulateur de la polarité cellulaire. La phosphorylation de PAR6 permet la dégradation de la petite protéine G, RhoA par l'intermédiaire de l'ubiquitine

ligase Smurf1. La perte de RhoA a pour conséquence directe, le désassemblage des jonctions serrées et du cytosquelette d'actine (Ozdamar et al., 2005).

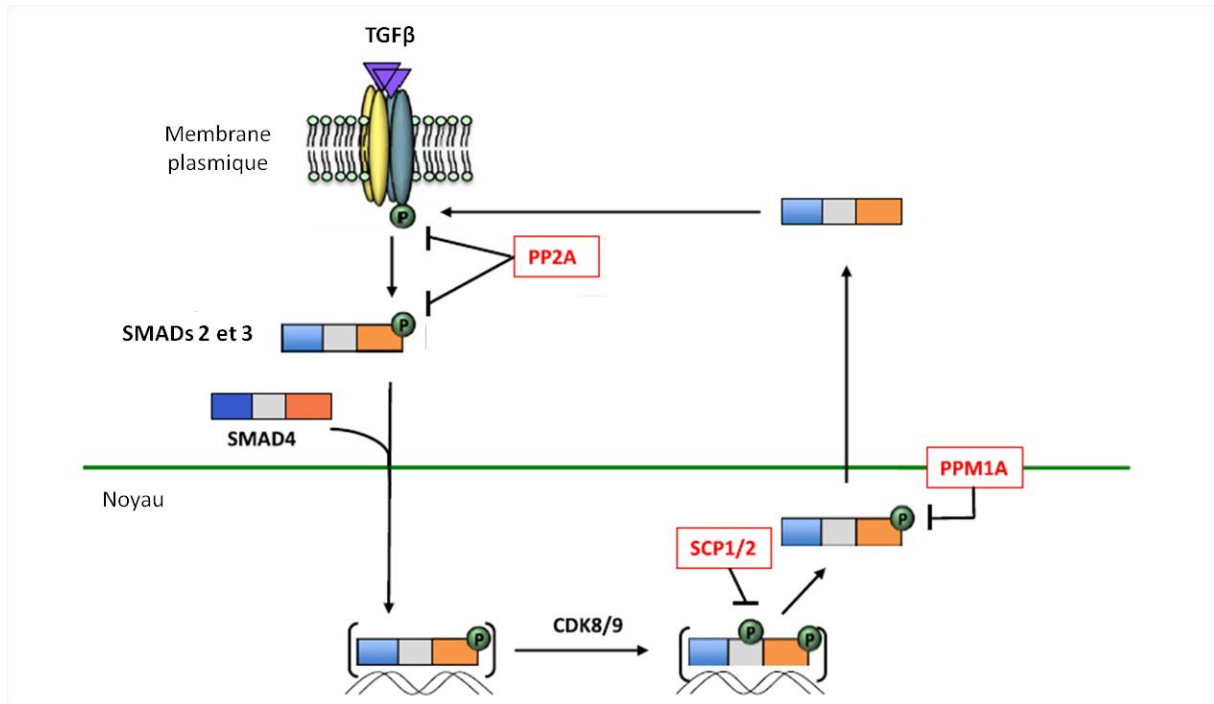
### C. Modes de régulation de la voie de signalisation

#### 1. *Au niveau de l'activité du récepteur*

La présence des récepteurs du TGF $\beta$ , au niveau de la membrane plasmique, est le premier mode de régulation de l'activation de la voie de signalisation. Deux mécanismes d'endocytose du récepteur ont été décrits jusqu'alors (de Caestecker, 2004). Le premier dépend des clathrines et permet la dégradation ou le recyclage de l'hétérotétramère de récepteurs (Di Guglielmo et al., 2003) ; (Huang and Chen, 2012). Les récepteurs du TGF $\beta$  peuvent également être endocytés selon un mécanisme dépendant des cavéolines et aboutissant à la dégradation du récepteur (Di Guglielmo et al., 2003).

L'activation de la cascade de signalisation requiert une autophosphorylation activatrice du domaine kinase de TBRII au niveau des Sérines 213 et 409. Cependant, l'autophosphorylation du récepteur de type II peut s'effectuer au niveau de la Sérine 416, et inhibe dans ce cas son activité kinase et la phosphorylation du récepteur de type I (Huang and Chen, 2012). Par ailleurs, la phosphorylation du récepteur de type I est régulée par 2 phosphatases : PP1 et PP2A (Protein phosphatase 1 et 2A) (**Figure 13**). Le recrutement de PP1 au niveau du récepteur de type I et sa déphosphorylation sont permis par l'interaction de Smad7 avec Alk5 et la sous-unité régulatrice de PP1 (Shi et al., 2004). La protéine phosphatase 2A, en présence de sa sous-unité régulatrice B $\delta$  peut également déphosphoryler le récepteur de type I (Batut et al., 2008). A l'heure actuelle, aucune protéine capable de déphosphoryler le récepteur de type II n'a été répertoriée.

D'autres modifications post-traductionnelles peuvent réguler l'activité des récepteurs au TGF $\beta$ . En plus d'être régulée par l'endocytose, la dégradation du récepteur de type I peut également être réalisée par le protéasome. En effet, lorsque la protéine inhibitrice Smad7 interagit avec le récepteur de type I, elle est capable de recruter une E3 ubiquitine ligase comme Smurf 1 et 2 et NEDD4L (Neural precursor cell expressed developmentally downregulated 4-Like) (Huang and Chen, 2012). Ces protéines greffent sur une lysine du récepteur de type I plusieurs ubiquitines, induisant ainsi sa dégradation par le protéasome (Ebisawa et al., 2001) ; (Kuratomi et al., 2005)). Ces effets peuvent être contrecarrés par l'intervention de protéines déubiquitylantes telles que USP15 (Ubiquitine Specific Peptidase



**Figure 13 : Schéma des phosphatases impliquées dans la régulation de la voie du TGF $\beta$ .** La phosphorylation étant essentielle dans l'activation de la voie de signalisation du TGF $\beta$ , la régulation de celle-ci fait intervenir différentes phosphatases. Dans le cytoplasme, la phosphatase PP2A déphosphoryle aussi bien le récepteur de type I que les Smads activées. Dans le noyau, deux types de protéines sont capables de déphosphoryler les Smads 2/3. Les protéines SCP ciblent spécifiquement les phosphorylations du linker greffées par différentes sortes de kinases. La phosphatase PPM1A, bien que sa localisation intra-cellulaire soit discutée, enlève spécifiquement les phosphorylations de la queue C-terminale ajoutées par le récepteur de type I. D'après (Bruce and Sapkota, 2012).

15 (Moustakas and Heldin, 2013). Le récepteur de type I peut également être SUMOylé, augmentant ainsi l'activation de la signalisation induite par le TGF $\beta$ . L'équipe de Kang et collaborateurs a montré que plusieurs groupements SUMO étaient greffés sur une lysine du récepteur de type I, différente de celle qui est ubiquitinylée lorsque celui-ci est phosphorylé et actif. (Kang et al., 2008). Le mode de régulation du récepteur de type II étant peu étudié, il est difficile de savoir s'il est également sensible à certaines de ces modifications post-traductionnelles.

L'activité kinase des récepteurs de type I et II peut être modulée par différents types de modifications post-traductionnelles interférant avec la phosphorylation des Smads. Ces protéines étant les acteurs de la voie de signalisation, les principaux modes de régulation de celle-ci touchent essentiellement leur activité.

## 2. *Au niveau de l'activité des Smads*

### a) Leur état de phosphorylation

Comme cela a précédemment été évoqué, l'activité des R-Smads dépend de leur phosphorylation. Cette phosphorylation peut être bloquée par l'intervention des Smads inhibitrices. Dans la voie du TGF $\beta$ , Smad7 agit selon un mécanisme de rétrocontrôle négatif. Cette protéine, en interagissant avec la boucle L45 du récepteur de type I, empêche l'interaction des Smads 2/3 avec celui-ci et ainsi leur phosphorylation (Kamiya et al., 2010). En plus du blocage de leur phosphorylation, les Smads 2/3 peuvent également être dégradée, induisant ainsi l'inactivation de la voie de signalisation. Le mécanisme précis d'inactivation de la voie du TGF $\beta$  n'est pas encore clairement élucidé mais les Smads 2/3 ont été identifiées comme étant les cibles de quelques phosphatases (**Figure 13**). La première identifiée est PPM1A (Protein Phosphatase Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> dependant 1A) qui semble déphosphoryler les Smads dans le noyau et ainsi favoriser leur export (Lin et al., 2006). Cependant sa localisation nucléaire est controversée, puisque dans certains types cellulaires PPM1A est exclusivement retrouvée dans le cytoplasme (Bruce and Sapkota, 2012). La phosphatase PP2A, également impliquée dans la déphosphorylation du récepteur de type I, est capable de déphosphoryler Smad3 mais uniquement en condition hypoxique (Heikkinen et al., 2010).

En plus des Sérines ciblées par Alk5 dans le domaine MH2, d'autres sites de phosphorylation et régulateurs de l'activité des protéines Smads ont été décrits, notamment au niveau du « linker ». La phosphorylation du « linker » des Smads 2/3 par les MAPK ERK1/2

ou p38 inhibe leur activité (Heldin and Moustakas, 2012). Dans ce contexte, une autre famille de phosphatases, la famille SCP (Small C-terminal domain Ser/Thr phosphatase), cible spécifiquement les phosphorylations ajoutées par les protéines MAPK, rétablissant ainsi la voie de signalisation du TGF $\beta$  (Sapkota et al., 2006 ; (Wrighton et al., 2006).

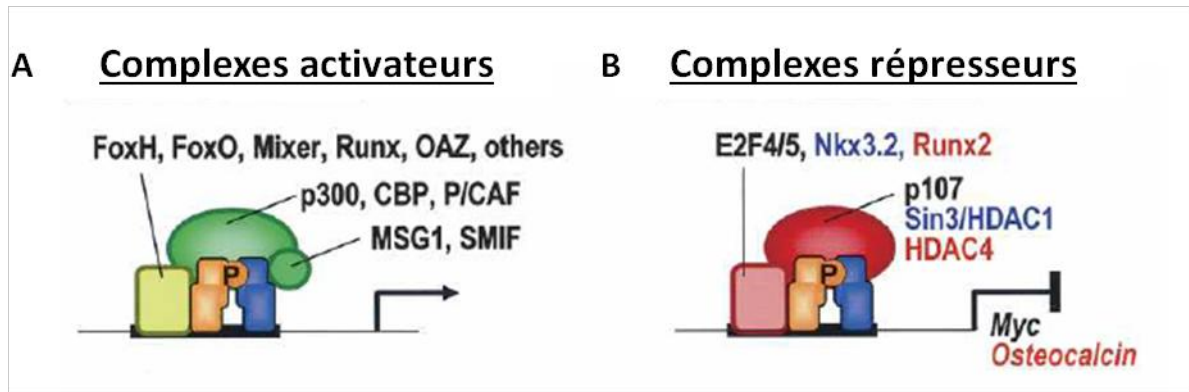
#### b) Leur ubiquitinylation

La dégradation des Smads constitue, après la déphosphorylation, le deuxième mécanisme à l'origine de l'inactivation de la voie de signalisation du TGF $\beta$ . Les protéines Smads sont dégradées par le protéasome, suite à l'ajout d'ubiquitine par des protéines E3 ubiquitine ligases telles que Smurf 1 et 2 ou NEDD4L. Les protéines Smurf 1 et 2 régulent le niveau d'expression protéique des Smads. En revanche, NEDD4L est à l'origine de la dégradation des Smads activées. Suite à la phosphorylation des Smads 2/3 par Alk5 et CDK8/9, la kinase GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3 bêta) phosphoryle à son tour les protéines Smads. Cette dernière phosphorylation facilite l'interaction de NEDD4L avec le motif PY situé dans le « linker » et l'ubiquitinylation puis la dégradation des Smads 2 et 3 (Gao et al., 2009). La protéine Smad coopératrice, Smad4, peut également être ubiquitinylée. L'ubiquitine ligase, TRIM33 ou TIF1 $\gamma$  (Tripartite motif containing 33 ou Transcriptional intermediary factor 1 $\gamma$ ) a un rôle essentiel dans la régulation de l'activité de Smad4. En greffant un groupement ubiquitine sur une lysine de Smad4, TIF1 $\gamma$  inhibe son association avec Smad2 (Dupont et al., 2009). La protéine Smad4 peut être protégée de l'ubiquitinylation par sa SUMOylation dans son domaine MH1 catalysée par PIAS1 (Lin et al., 2003). L'intervention de protéines déubiquitinyllantes, telles que USP15 ou UCH37 (Ubiquitine C-terminal hydrolase 37) permet de réverser l'ubiquitinylation des Smads et donc de les protéger de la dégradation par le protéasome (Zhang et al., 2014).

Tous ces processus ont des conséquences sur l'activité transcriptionnelle des Smads. Cette activité peut être aussi bien activatrice que répressive et dépend des co-facteurs avec lesquels le complexe R-Smads/Smad4 interagit (**Figure 14**).

### ***3. Régulation de l'activité transcriptionnelle des Smads par l'interaction avec des co-facteurs***

Les Smads interagissent dans le noyau avec de nombreuses familles de facteurs de transcription, dont quelques exemples sont donnés **Figure 14**. Le premier facteur interagissant avec les Smads identifié appartient à la famille des Fox (Forkhead box). S'en est suivie



**Figure 14 : Exemples d'interaction des Smads avec des complexes co-activateurs ou co-répresseurs de la transcription de gènes cibles.** En fonction des co-facteurs avec lesquels le complexe R-Smads/Smad4 interagit, il peut être activateur (A) ou répresseur (B) de la transcription. Les Smads activées peuvent s'associer avec d'autres facteurs de transcription comme les Fox et des complexes remodelant la chromatine tels que p300, activant ainsi l'expression de gènes cibles. D'autre part, leur interaction avec E2F4/5 et p107 est à l'origine de l'inhibition de l'expression de c-myc par le TGF $\beta$ . D'après (Massagué et al., 2005).

l'identification de nombreuses autres familles pouvant intervenir dans la régulation transcriptionnelle des Smads, telles que les familles RUNX, Hox, E2F ainsi que de nombreuses protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine (Massagué et al., 2005).

Le TGF $\beta$  est associé à une baisse de l'expression de l'oncogène c-myc, un facteur de transcription connu pour son action proliférative. Cette diminution de son expression résulte de l'interaction des Smads 2/3 avec E2F4/5 et p107. Ce complexe protéique est formé dans le cytoplasme et est transloqué dans le noyau sous l'effet du TGF $\beta$  où il se fixe entre les deux sites d'initiation de la transcription du gène codant c-Myc (Chen et al., 2002). Dans ce sens, il a également été démontré que les Smads en interaction avec p300 et Sp-1 induisaient l'expression de p15<sup>INK4b</sup>, qui lui joue un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire (Feng et al., 2000). Une étude complémentaire a montré, qu'en plus des facteurs précédemment cités intervenant dans la régulation de c-myc et de p15<sup>INK4b</sup>, la présence de C/EBP $\beta$  (CCAAT/Enhancer binding protein béta) sur leur promoteur était nécessaire (Gomis et al., 2006). Récemment, une équipe a démontré qu'au sein de cellules de carcinomes hépatiques, Smad2/3 interagissait avec le facteur de transcription FoxO3 augmentant ainsi l'expression de Bim, une protéine pro-apoptotique. Pour pouvoir interagir avec les Smads 2/3, la protéine FoxO3 doit être phosphorylée au préalable (Zhao et al., 2015b).

D'autres facteurs moins classiques participent également à la régulation de l'expression de gènes par les Smads 2 et 3. Par exemple, une étude a récemment mis en évidence que l'induction par le TGF $\beta$  des gènes codant Snail et Slug, deux facteurs de transcription impliqués dans la TEM, nécessitait l'interaction des Smads 2/3 avec IKK $\alpha$  (I $\kappa$ B Kinase alpha). En effet, cette protéine est capable d'interagir avec les R-Smads sur les promoteurs de ces deux gènes. L'inhibition de l'expression de IKK $\alpha$  est non seulement associée à une baisse de l'expression de Snail et Slug, mais également à une baisse de la fixation des Smads 2/3 sur leur promoteur respectif (Brandl et al., 2010).

Il existe aussi des co-répresseurs qui semblent avoir une affinité particulière pour les Smads. C'est le cas par exemple des protéines Ski et SnoN, qui en interagissant avec les Smads 2, 3 et 4 peuvent aussi bien inhiber la formation du complexe R-Smads/Smad4 en entrant en compétition avec Smad4, mais également l'activité transcriptionnelle de ce complexe en recrutant des histones déacétylases (Massagué et al., 2005). D'autres répresseurs, comme la protéine TGIF (TGF $\beta$  induced factor), créent une compétition entre le recrutement

de protéines activatrices de la transcription et celui de complexes répresseurs. En effet, TGIF, en interagissant avec Smad 2 et 3, recrute le complexe mSin3/HDAC (mammalian Sin3/Histone deacetylase) et empêche notamment l'intervention du complexe CBP/p300 (Wotton et al., 2001). La protéine TIF1 $\gamma$  semble également posséder une certaine affinité pour les Smads. En plus d'ubiquitinyler Smad4, cette ubiquitine ligase peut interagir avec les Smads 2/3 sur les promoteurs de leurs gènes cibles tel que PAI-1 (Fattet et al., 2013; Hesling et al., 2011). C'est en interagissant sur l'ADN avec les histones H3 que la fonction ubiquitine ligase de TIF1 $\gamma$  est activée et engendre une dissociation rapide du complexe de Smads activées (Agricola et al., 2011).

Le rôle activateur ou répresseur transcriptionnel des Smads ne semblent pas uniquement dépendre du gène cible considéré. De nombreux autres facteurs interviennent dans la régulation de l'expression de leurs gènes cibles, rendant la compréhension des mécanismes très complexes et dépendants du type cellulaire étudié. Les gènes cibles du TGF $\beta$  peuvent être très nombreux et d'une grande diversité. Toutefois, les exemples cités ci-dessus prouvent que le TGF $\beta$  est particulièrement impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose et des capacités migratrices des cellules. Ces processus étant particulièrement importants dans la cancérogenèse, le TGF $\beta$  joue un rôle essentiel dans le développement et la progression des tumeurs mammaires.

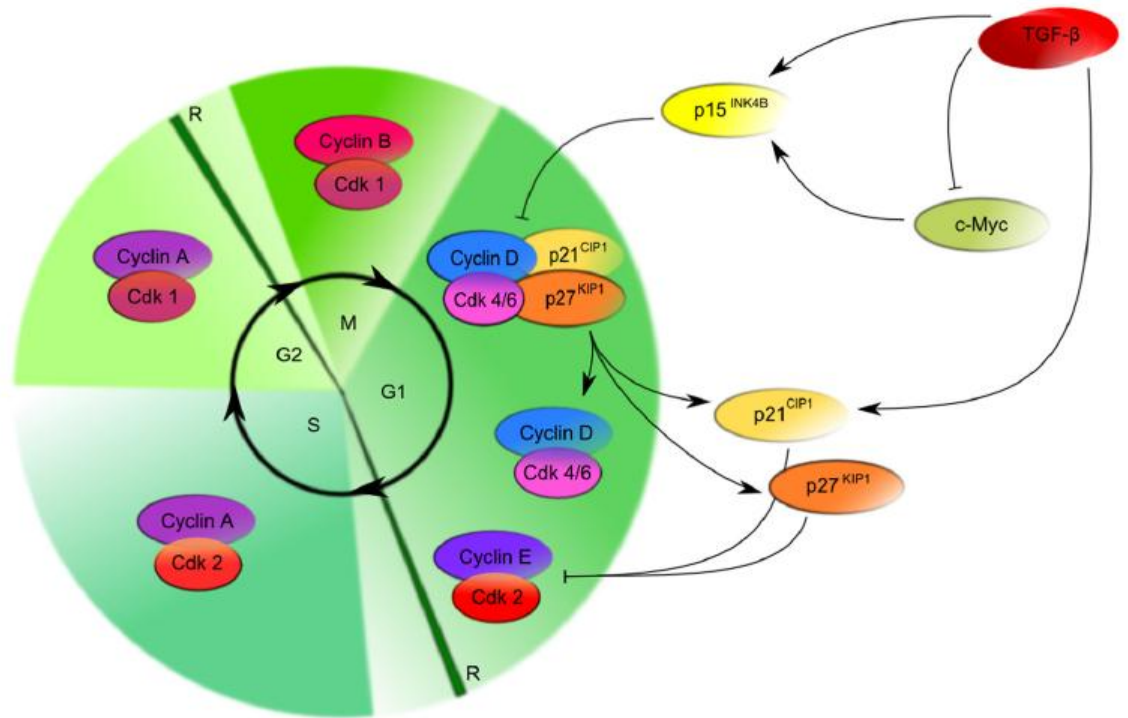
#### **D. Le TGF $\beta$ 1 dans les cancers : reflet de la dualité de ses fonctions**

Le TGF $\beta$  est un facteur de croissance impliqué dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, l'apoptose, l'adhérence ou encore les propriétés invasives. Dans les cancers, il existe un certain paradoxe concernant ce facteur de croissance puisqu'il peut être à tour de rôle anti ou pro-tumoral. Ce travail de thèse s'intéressant particulièrement aux cancers mammaires, les exemples, illustrant le rôle du TGF $\beta$  dans les cancers, concerneront en majorité des modèles de cancers du sein.

##### ***1. Un suppresseur de tumeur aux stades précoces***

Le pouvoir anti-mitotique et pro-apoptotique du TGF $\beta$  ont largement été étudiés et notamment dans des modèles de cellules épithéliales mais aussi au sein de cellules cancéreuses. Ces fonctions lui confèrent un rôle de suppresseur de tumeur.





**Figure 15 : Rôle du TGFβ dans la régulation du cycle cellulaire.** Le TGFβ est un facteur de croissance capable d'inhiber la prolifération cellulaire. Son action affecte essentiellement la phase G1 du cycle cellulaire. En induisant l'expression de p15<sup>INK4b</sup>, ce facteur de croissance inhibe le complexe cycline D-CDK4/6. Les protéines p21<sup>CIP1</sup>, dont l'expression est régulée positivement par le TGFβ, et p27<sup>KIP1</sup> sont ainsi libérées de ce complexe et répriment le complexe Cycline E-CDK2 permettant le passage de la phase G1 à la phase S. L'arrêt du cycle cellulaire par le TGFβ est renforcé par son action répressive de l'expression de c-Myc, inhibant lui-même l'expression de p15<sup>INK4b</sup> et p21<sup>CIP1</sup>. D'après Kubiczkova et al., 2012.

a) Par son action anti-proliférative

Le TGF $\beta$  exerce son rôle cytotatique à deux niveaux : en induisant l'expression de protéines bloquant le cycle, et en inhibant au contraire l'expression de celles qui favorisent sa progression. Par exemple, sous l'effet du TGF $\beta$ , les Smads et les facteurs de transcription FoxO activés se fixent sur les promoteurs des gènes codant p15<sup>INK4b</sup> et p21<sup>CIP1</sup>, induisant ainsi leur transcription (Seoane et al., 2004) ; (Gomis et al., 2006). Ces protéines inhibent respectivement les complexes Cycline D-Cdk4/6 et Cycline E/A-Cdk2, responsables de la progression dans la phase G1 du cycle cellulaire et de la transition de celle-ci vers la phase S. Par ailleurs, il a également été montré que le TGF $\beta$  était capable de réprimer l'expression de l'oncogène c-myc par l'intermédiaire d'un complexe composé de Smad3 E2F4/5 et p107 (Chen et al., 2002). C-myc favorisant la progression du cycle cellulaire en inhibant l'expression p15<sup>INK4b</sup> et p21<sup>CIP1</sup>, l'inhibition de son expression par le TGF $\beta$  renforce l'action anti-proliférative de ce dernier (Imamura et al., 2012). Ce mécanisme de régulation du cycle cellulaire par le TGF $\beta$  est illustré en **Figure 15**.

Par ailleurs, le gène codant la protéine Id-1 (Inhibitor of DNA binding 1) est également réprimé par le TGF $\beta$ . La régulation de son expression par la voie du TGF $\beta$  nécessite l'association de Smad3 avec le facteur de transcription ATF3 (Activating Transcription Factor 3) sur le promoteur de Id-1 (Kang et al., 2003). La protéine Id-1 (Inhibitor of DNA binding 1) interagit avec des facteurs de transcription à hélice-boucle-hélice (bHLH) et empêche leur fixation sur l'ADN. Lorsque Id-1 est faiblement exprimé, les facteurs bHLH se fixent sur les promoteurs de leur gènes cibles, favorisant ainsi la différenciation cellulaire aux dépens de la prolifération (Lasorella et al., 2014).

Le TGF $\beta$  peut également agir indirectement sur la prolifération cellulaire, en inhibant la sécrétion de CXCL12 par les cellules stromales (Zarzynska, 2014), qui est un activateur de la prolifération des cellules tumorales mammaires (Orimo et al., 2005).

b) En régulant la mort cellulaire

Plusieurs études ont révélé que le TGF $\beta$  était capable d'induire l'apoptose dans les cellules épithéliales et hématopoïétiques. Dans ces cellules, les mécanismes mis en jeu impliquent la régulation de l'expression de certains gènes cibles tels que DAPK (Death-associated protein kinase), Bim ou encore GADD45 $\beta$  (Growth Arrest and DNA Damage 45  $\beta$ ) (Zarzynska, 2014). L'induction de l'un de ces gènes par le TGF $\beta$  et les conséquences sur

l'entrée en apoptose ont effectivement pu être observées dans des cellules cancéreuses. En effet, l'expression du gène codant Bim est augmentée dans des cellules de carcinomes hépatiques traitées au TGF $\beta$  (Zhao et al., 2015b). L'entrée en apoptose peut également être régulée par l'interaction de TBRII avec la protéine pro-apoptotique Daxx, activant ainsi c-Jun et le programme de mort cellulaire (Imamura et al., 2012 ; Perlman et al., 2001). Toutefois les mécanismes à l'origine d'une apoptose induite par le TGF $\beta$  dans les cellules cancéreuses sont à ce jour encore peu connus.

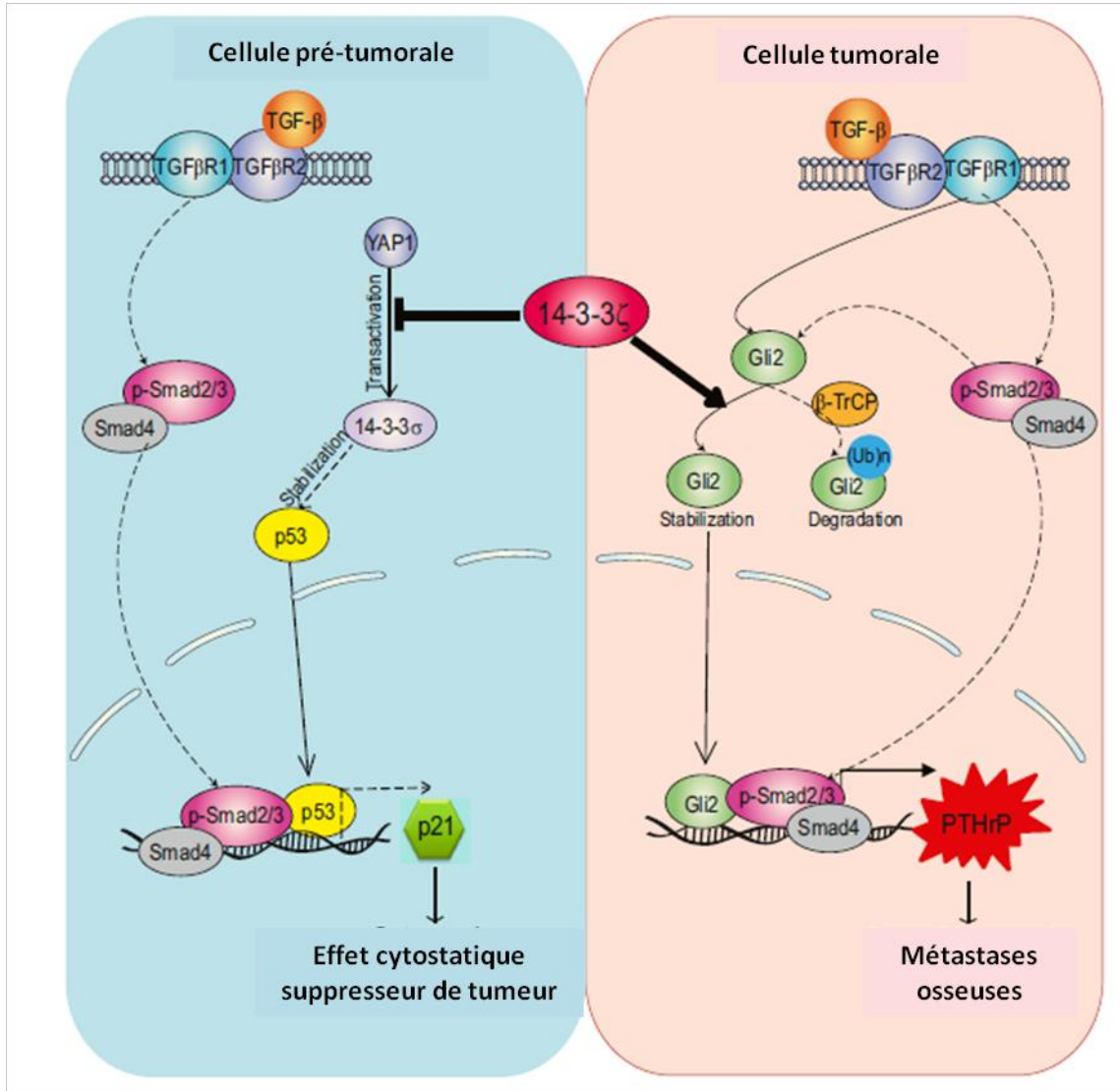
Le TGF $\beta$  est également capable d'induire une mort cellulaire par autophagie dans les cellules tumorales mammaires, en activant à la fois la voie des Smads mais également celle des MAPK de type JNK (c-Jun N-terminal Kinase) (Kiyono et al., 2009). L'induction de l'autophagie à des stades précoces semble effectivement avoir un effet protecteur en limitant le développement de la tumeur. En revanche au cours de stades plus tardifs, celle-ci semble plutôt promouvoir la progression tumorale (Zarzynska, 2014).

De manière intéressante, le rôle de suppresseur de tumeur du TGF $\beta$  ne semble être vrai que pour des cancers à des stades peu avancés. Au cours de la progression tumorale, les cellules cancéreuses deviennent insensibles à l'effet anti-mitotique du TGF $\beta$  et celui-ci exerce alors un rôle de promoteur de tumeur.

## ***2. Le TGF $\beta$ : promoteur de la progression tumorale***

### ***a) D'un facteur anti vers un facteur pro-tumoral***

Le passage du TGF $\beta$  d'un rôle de suppresseur de tumeur à un rôle de promoteur de tumeur est à ce jour encore mal connu. Il semblerait que ses conséquences biologiques soient directement liées au contexte cellulaire. En ce sens, les cellules tumorales semblent capables de détourner sa signalisation à leur profit. En effet, il semble que des co-facteurs des Smads comme FoxO ou C/EBP $\beta$  et ayant une activité anti-tumorale, soient inhibés dans les cellules cancéreuses (Massagué, 2012). Ainsi, un mécanisme concernant le co-facteur C/EBP $\beta$  a été proposé. Ce co-facteur transcriptionnel existe sous deux isoformes appelées LIP et LAP, et ayant respectivement une fonction inhibitrice ou activatrice. La forme LAP en interagissant avec les protéines Smads 2 et 3, intervient dans la régulation de l'expression de p15<sup>INK4b</sup>. Or, il a été mis en évidence que la perte de la réponse cytostatique dans les cellules cancéreuses mammaires était associée à la présence majoritaire de l'isoforme LIP (Gomis et al., 2006).



**Figure 16 : Implication de la protéine 14-3-3ζ dans le switch anti à pro-tumoral du TGFβ dans les cancers mammaires.** A des stades précoces, la protéine 14-3-3σ est activée par la protéine YAP1 (Yes-associated protein) et permet la stabilisation de p53. Cette dernière interagit alors avec les Smads activées et participe à l'induction de l'expression de p21 et donc l'arrêt du cycle cellulaire par le TGFβ. Dans des tumeurs mammaires plus avancées, l'isoforme 14-3-3ζ est exprimée et inhibe l'activation de la forme sigma par YAP1. En parallèle, cette isoforme stabilise la protéine Gli2 qui se complexe aux Smads activées et induit l'expression du gène codant PTHrP, favorisant l'envahissement des os par les cellules tumorales mammaires. D'après (Xu et al., 2015).

Une autre étude plus récente propose un mécanisme différent à l'origine du switch anti/pro-tumoral du TGF $\beta$ . Ce modèle, illustré par la **Figure 16**, repose sur une balance de 2 isoformes de la protéine 14-3-3. Dans des tumeurs peu avancées, l'isoforme 14-3-3 $\sigma$  est exprimée et permet la stabilisation de la protéine p53. Celle-ci forme alors un complexe avec les Smads 2 et 3 phosphorylées et intervient dans la régulation positive de p21 et l'arrêt du cycle cellulaire par la voie du TGF $\beta$ . A des stades plus avancés, l'isoforme 14-3-3 $\zeta$  est prépondérante et inhibe la forme sigma. Ce changement d'isoforme de la protéine 14-3-3 est aussi associé à une stabilisation de la protéine Gli2. Il s'agit également d'un co-facteur avec lequel les Smads interagissent et régulent l'expression d'autres gènes, comme par exemple celui codant PTHrP (Parathyroid hormone-related protein) jouant un rôle clé dans la formation de métastases osseuses par les cellules tumorales mammaires (Xu et al., 2015).

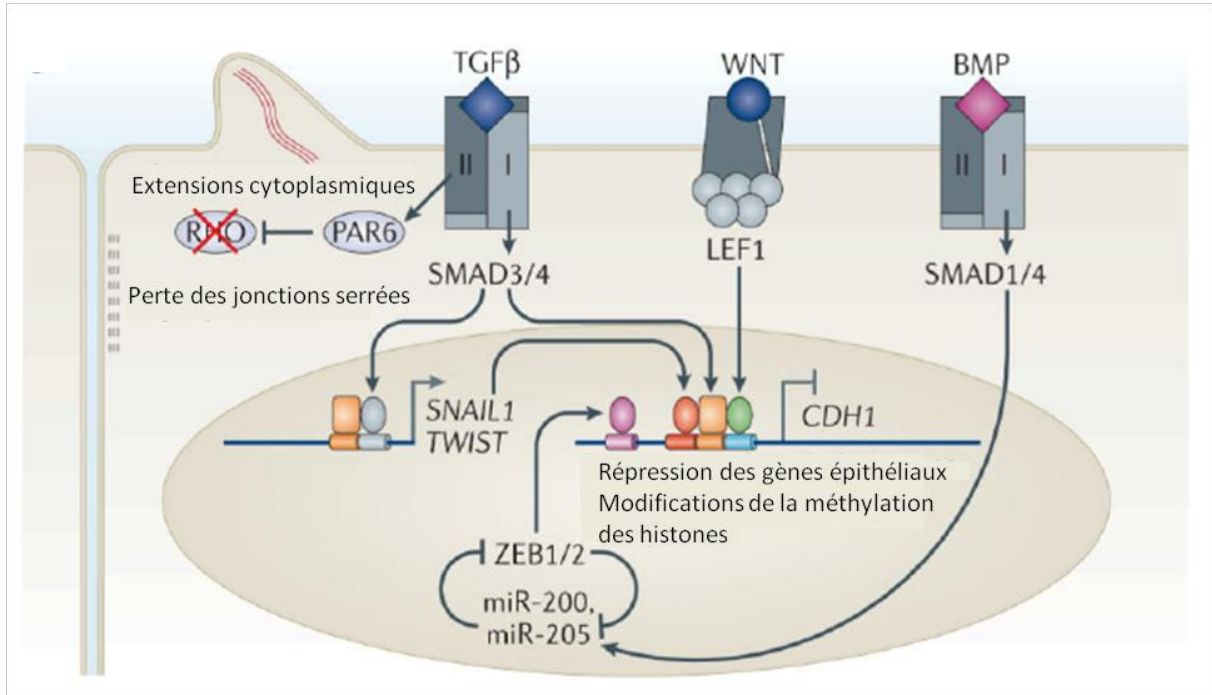
Certains mécanismes mettant en jeu des changements de co-facteurs des protéines Smads permettent d'expliquer le passage du TGF $\beta$  d'un facteur anti- à un facteur pro-tumoral. Toutefois, l'ensemble des mécanismes à l'origine du rôle de promoteur de tumeur du TGF $\beta$  n'est pas encore complètement élucidé.

#### b) Le TGF $\beta$ et le remodelage du micro-environnement tumoral

L'échappement des cellules tumorales au système immunitaire résulte notamment de l'action du TGF $\beta$ . En se fixant sur les MDSC (Myeloid-derived suppressor cell), le TGF $\beta$  active ces dernières qui répriment la réponse cytotoxique en supprimant les cellules NK (Natural Killer) (Zu et al., 2012). Ce facteur de croissance est également à même d'interférer avec la cytotoxicité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en stimulant leur sécrétion d'interleukine 17 (IL-17), ce qui favorise la survie des cellules tumorales (Barcellos-Hoff and Akhurst, 2009).

Les fibroblastes mammaires se transforment au cours de la carcinogenèse mammaire et deviennent alors des fibroblastes associés au cancer (CAFs). Comme cela a été évoqué dans le paragraphe I.D.2.b., ces cellules favorisent la migration des cellules tumorales. La transformation des fibroblastes en CAFs est sous l'influence directe du TGF $\beta$ . Les liens entre cellules tumorales et fibroblastes les transforment peu à peu en CAFs, capables de sécréter du TGF $\beta$ . Une action autocrine de ce facteur de croissance permet ainsi le maintien de ce phénotype particulier (Kojima et al., 2010).

L'impact du TGF $\beta$  sur le micro-environnement tumoral favorise non seulement la croissance tumorale mais également sa progression métastatique.



**Figure 17 : Rôle de la superfamille du TGFβ dans l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse.** L'expression des gènes codant les facteurs inducteurs de la TEM Snail et Twis est directement dépendante des Smads activées en réponse au TGFβ. Ces facteurs de transcription s'associent par la suite avec les Smads elles-mêmes, mais également avec LEF1 (Lymphoid enhancer binding factor 1), un facteur de transcription activé par la voie Wnt. Ces complexes se fixent sur les promoteurs des gènes codant des protéines typiques d'un phénotype épithélial et répriment l'expression de ces gènes. En parallèle, l'interaction du récepteur de type II au TGFβ avec la protéine Par6 et la perte des jonctions serrées qui en résulte favorisent également la TEM. A l'inverse la voie de signalisation des BMPs, en induisant l'expression des microARNs 200 et 205, s'oppose à la TEM. D'après (Massagué, 2012).

c) L'acquisition de propriétés invasives induite par le TGF $\beta$ 

Dans l'échappement métastatique des cellules tumorales mammaires, les voies canonique et non canonique peuvent intervenir. La voie de signalisation du TGF $\beta$  régule aussi bien l'induction de la TEM que la formation de métastases.

La voie canonique mettant en jeu les Smads 2 et 3 est particulièrement mise à contribution dans la transdifférenciation d'une cellule épithéliale en une cellule mésenchymateuse mobile. Plusieurs études révèlent que les R-Smads activées par le TGF $\beta$  sont capables d'augmenter l'expression des facteurs inducteurs de la TEM comme Snail ou Slug. Dans ce sens, Thuault et collaborateurs ont montré que les Smads interagissaient avec un facteur dont elles induisent l'expression, HMGA2 (High mobility group A2) dans des cellules tumorales mammaires murines. Ce complexe se fixe sur un élément de réponse situé 100 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription du gène codant Snail et permet d'induire son expression à l'origine de la TEM (Thuault et al., 2008) ; **Figure 17**). Des études réalisées sur des cellules humaines ont permis de confirmer ces observations. En particulier, deux études ont révélé que l'expression des facteurs de transcription responsables de l'induction de la TEM, Snail et Slug, dépendait de l'interaction des Smads 2 et 3 avec IKK $\alpha$  ou FoxM1 (Brandl et al., 2010) ; (Xue et al., 2014). D'autres études menées sur une lignée de cellules épithéliales mammaires non cancéreuses, les MCF10A, démontrent l'importance de la voie canonique dans l'induction de la TEM par le TGF $\beta$ . Dans ces cellules, la TEM met en jeu une protéine appartenant à la famille des NADPH oxydase, Nox4. Smad3 après traitement au TGF $\beta$ , induit l'expression de Nox4 qui est à l'origine d'une accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO), favorisant alors les capacités migratrices des cellules épithéliales mammaires (Boudreau et al., 2012). Par ailleurs, l'induction de la TEM dans ces cellules semble être sous le contrôle de la protéine TIF1 $\gamma$ , qui régule l'activité transcriptionnelle des Smads. En effet, en interagissant avec les Smads sur les promoteurs de leurs gènes cibles, la protéine TIF1 $\gamma$  réprime l'induction de l'expression de gènes impliqués dans la TEM (Hesling et al., 2011). Lorsque l'expression de TIF1 $\gamma$  est inhibée dans les MCF10A, ces cellules présentent un niveau d'expression de Snail et ZEB1 bien plus important et subissent d'autant plus facilement la TEM.

D'autres gènes cibles du TGF $\beta$ , régulés par la voie canonique favorisent l'échappement métastatique des cellules tumorales mammaires. C'est en particulier le cas du gène codant le facteur de croissance CTGF (Connective Tissue Growth Factor), dont

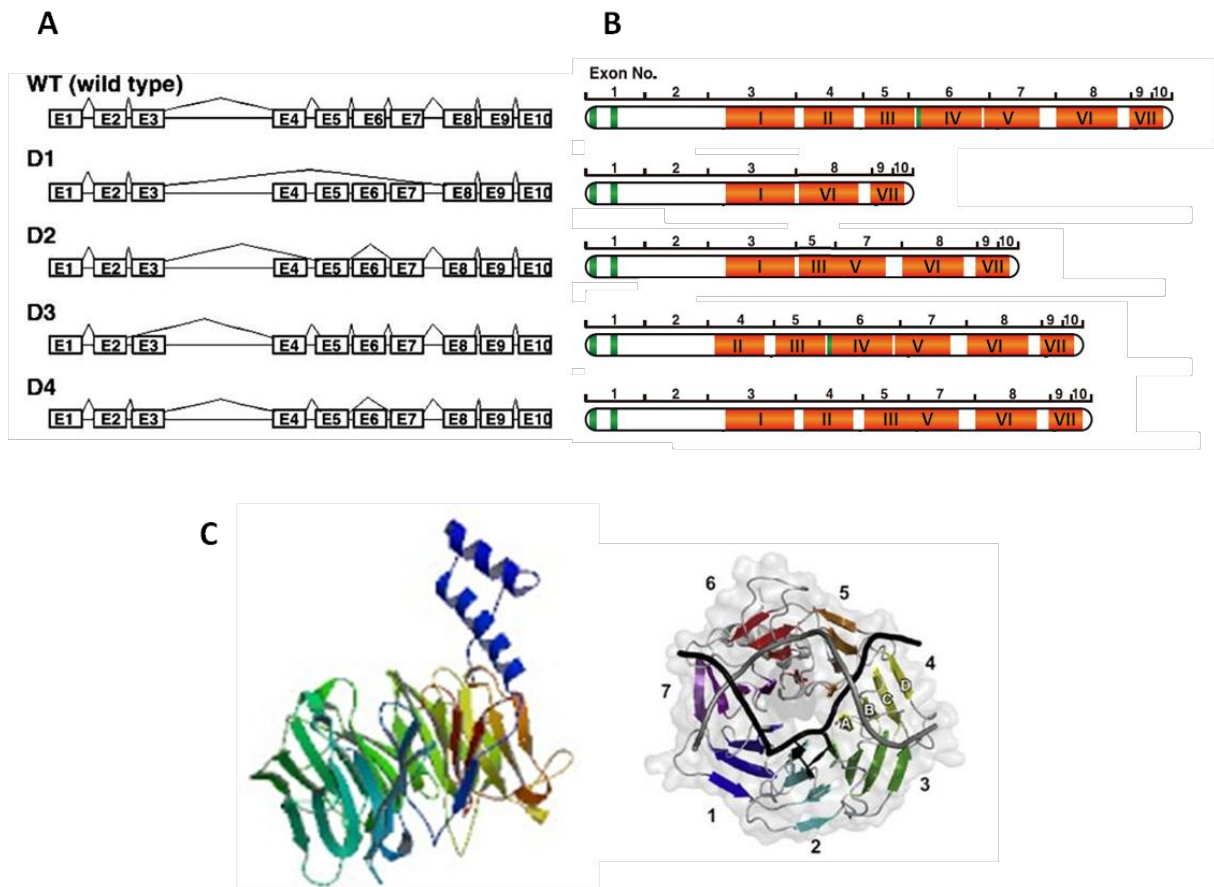
l'expression est induite par le TGF $\beta$  (Grotendorst et al., 1996). Dans les cancers mammaires, son expression est à la fois associée à une augmentation de la mobilité cellulaire *via* les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  (Chen et al., 2007), ainsi qu'à une augmentation *in vivo* des métastases pulmonaires (Chien et al., 2011). Ces derniers travaux montrent que le CTGF stimule également l'angiogenèse tumorale, qui participe à la formation de métastases. Par ailleurs, le gène codant PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor) est un gène cible du TGF $\beta$  largement étudié et positivement régulé par la fixation des Smads sur 3 sites SBE situés dans son promoteur proximal (Dennler et al., 1998) ; (Stroschein et al., 1999a)(Vayalil et al., 2007). Dans les tumeurs mammaires, il a été montré que l'expression de PAI-1 était corrélée à une augmentation du nombre de métastases (Duffy et al., 2014).

L'acquisition de propriétés invasives induites par le TGF $\beta$  peut aussi résulter de l'activation de la voie non canonique. Une étude récente montre que le TGF $\beta$  induit l'expression de TMEPAI (Transmembrane prostate androgen induced), qui, en séquestrant les Smads 2/3, favorise l'activation de la voie PI3K/Akt et la progression métastatique (Singha et al., 2014). Un autre mécanisme utilisant une voie non canonique est à l'origine de la dissolution des jonctions cellules-cellules. Le récepteur de type II est capable de phosphoryler Par6, engendrant ainsi une perte de la polarité apico-basale des cellules épithéliales et facilitant leur échappement (Ozdamar et al., 2005). Le TGF $\beta$  en lui-même est un élément essentiel à la formation de métastases osseuses en induisant l'expression de PTHrP (Padua and Massagué, 2009). En effet, si le TGF $\beta$  est bloqué par un récepteur soluble, les métastases ostéolytiques des cancers mammaires sont significativement diminuées (Mourskaia et al., 2009).

Le TGF $\beta$ , bien qu'étant un facteur de croissance ubiquitaire et impliqué dans de nombreux processus physiologiques, affecte le développement tumoral tant au niveau de sa croissance que de sa dissémination. Toutefois, le paradoxe de la réponse qui lui est associé, tantôt suppresseur de tumeur, tantôt pro-oncogène, n'en fait pas un bon candidat en tant que marqueur pronostique de la progression tumorale mammaire. Afin d'améliorer sa valeur prédictive, il s'agirait de distinguer les cellules insensibles à l'effet cytostatique du TGF $\beta$  de celles qui y sont, révélant ainsi les tumeurs ayant un haut potentiel métastatique. Il existe cependant peu de marqueurs fiables pour prédire le pouvoir invasif d'une tumeur, qui est responsable d'une récurrence de la maladie cancéreuse et qui constitue donc une préoccupation constante en cancérologie. C'est en ce sens que le laboratoire s'intéresse particulièrement à



une protéine nommée Damaged-DNA Binding 2 (DDB2), pour laquelle nous avons révélé l'existence d'une relation entre elle et le TGF $\beta$  durant ce travail. Cette protéine DDB2, initialement connue pour son rôle dans la réparation de l'ADN, possède de nombreuses autres activités biologiques, impliquées notamment dans la croissance et la progression tumorale.



**Figure 18 : Représentation schématique des variants de DDB2 et structure tridimensionnelle de la protéine.** Le gène *ddb2* est composé de 10 exons et code une protéine de 427 acides aminés. L'épissage alternatif des exons 3 à 7 de l'ARN messager codant DDB2 génère 5 isoformes : la sauvage (WT, wild type) et les formes D1 à D4 représentées en **A**. Les protéines issues de la traduction des différentes formes d'ARNm sont schématisées en **B**. La forme sauvage comprend 7 répétitions WD40 (rectangles oranges numérotés de I à VII) et trois séquences de localisation nucléaire (barre verte) dont 2 localisées en N-terminal. Les formes alternativement épissées sont plus petites et perdent une séquence de localisation nucléaire ainsi que des répétitions WD40. La structure tridimensionnelle de la protéine DDB2, sous deux angles différents, est montrée en **C**. En N-terminal se trouve une structure en hélice-boucle-hélice permettant l'interaction avec DDB1. Les motifs répétés WD40 sont organisés en feuillet  $\beta$  anti-parallèle composé de 4 brins (annotés de A à D), le tout formant une structure de  $\beta$ -propeller. D'après Inoki et al., 2004; Scrima et al., 2008; Takedachi et al., 2010.

### III. La protéine DDB2 : activités biologiques et conséquences dans les cancers

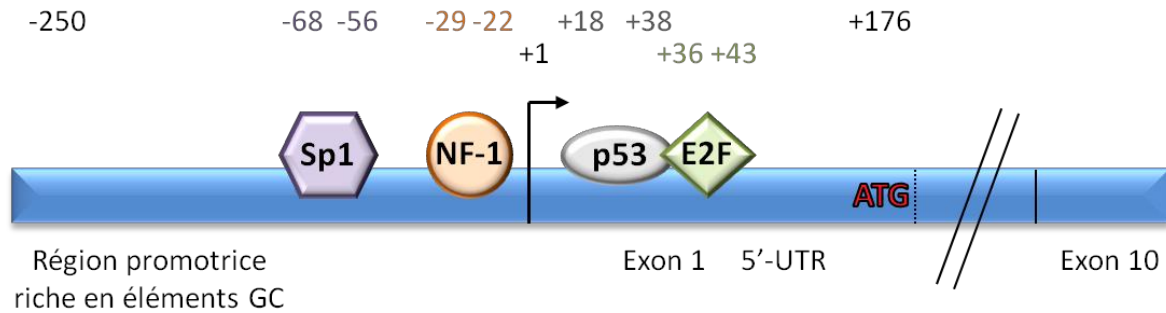
#### A. Caractéristiques et régulation de son expression

##### 1. *Caractéristiques structurales du gène ddb2*

Le gène codant la protéine DDB2 est situé sur le bras court du chromosome 11, qui n'est retrouvé que chez les mammifères (Dualan et al., 1995). Celui-ci est composé de 1284 paires de bases, réparties en 10 exons pouvant être épissés de manière alternative et générant ainsi 5 isoformes différentes : la forme sauvage (contenant tous les exons) et 4 isoformes plus courtes nommées D1 à D4 (Inoki et al., 2004). Seuls les exons 3, 4, 5, 6 et 7 sont soumis à un épissage alternatif, tandis que les exons 1, 2, 8, 9 et 10 sont conservés dans chaque isoforme (**Figure 18A**). L'expression de chaque variant d'épissage varie selon le tissu. La forme D1, qui est la forme la plus courte, est exclusivement exprimée dans le cerveau et le cœur. Les isoformes D2, D3 et D4 sont, quant à elles, faiblement exprimées, quelque-soit le type cellulaire. La forme sauvage est la forme prépondérante et est retrouvée principalement dans le cœur, les poumons, la peau, l'endothélium de la cornée.

##### 2. *Structure protéique*

La protéine DDB2 est composée de 427 acides aminés comportant 2 séquences d'adressage au noyau (NLS) du côté N-Terminal, rendant cette protéine exclusivement nucléaire (Inoki et al., 2004). Les variants produits par épissage alternatif sont dépourvus de ces séquences de localisation nucléaire et sont donc exclusivement cytoplasmique (**Figure 18B**). La séquence protéique est organisée en un motif hélice-boucle-hélice en N-terminal, suivi de 7 répétitions WD40 constituant ainsi un domaine WD40 (Scrima et al., 2008). Ces répétitions sont caractérisées par une structure en feuillet  $\beta$  anti-parallèle de 40 à 60 acides aminés, se terminant par un dipeptide tryptophane-acide aspartique (**Figure 18C**). Ces domaines sont essentiels dans l'interaction de DDB2 avec ses différents partenaires protéiques, qu'ils soient impliqués dans la réparation de l'ADN ou dans la régulation de l'expression de gènes cibles. L'interaction de DDB2 avec l'ADN se fait par l'intermédiaire de deux domaines. La première structure est une épingle constituée des résidus 371 à 373 s'insérant dans le petit sillon de l'ADN et séparant le brin endommagé de celui non lésé. Cette interaction est stabilisée par 3 Arginines et de 2 Lysines formant des liaisons hydrogène avec les groupements phosphodiester de l'ossature de l'ADN (Scrima et al., 2008).



**Figure 19 : Représentation schématique de la régulation de l'expression du gène codant DDB2.** La région proximale du promoteur du gène codant *DDB2* comprend de nombreux sites de fixation de facteurs de transcription. Les protéines Sp1 et NF-1 interagissent avec l'ADN respectivement 56 et 22 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription. D'autres éléments de réponse situés dans la région 5'-UTR en aval du site d'initiation de la transcription ont été également identifiés. C'est le cas par exemple des sites de fixation des protéines p53 et E2F reconnaissant des motifs situés respectivement 18 et 36 paires de bases en aval du site d'initiation de la transcription. La fixation de ces facteurs de transcription permet l'expression de *DDB2*. D'après Nichols et al., 2003; Tan and Chu, 2002.

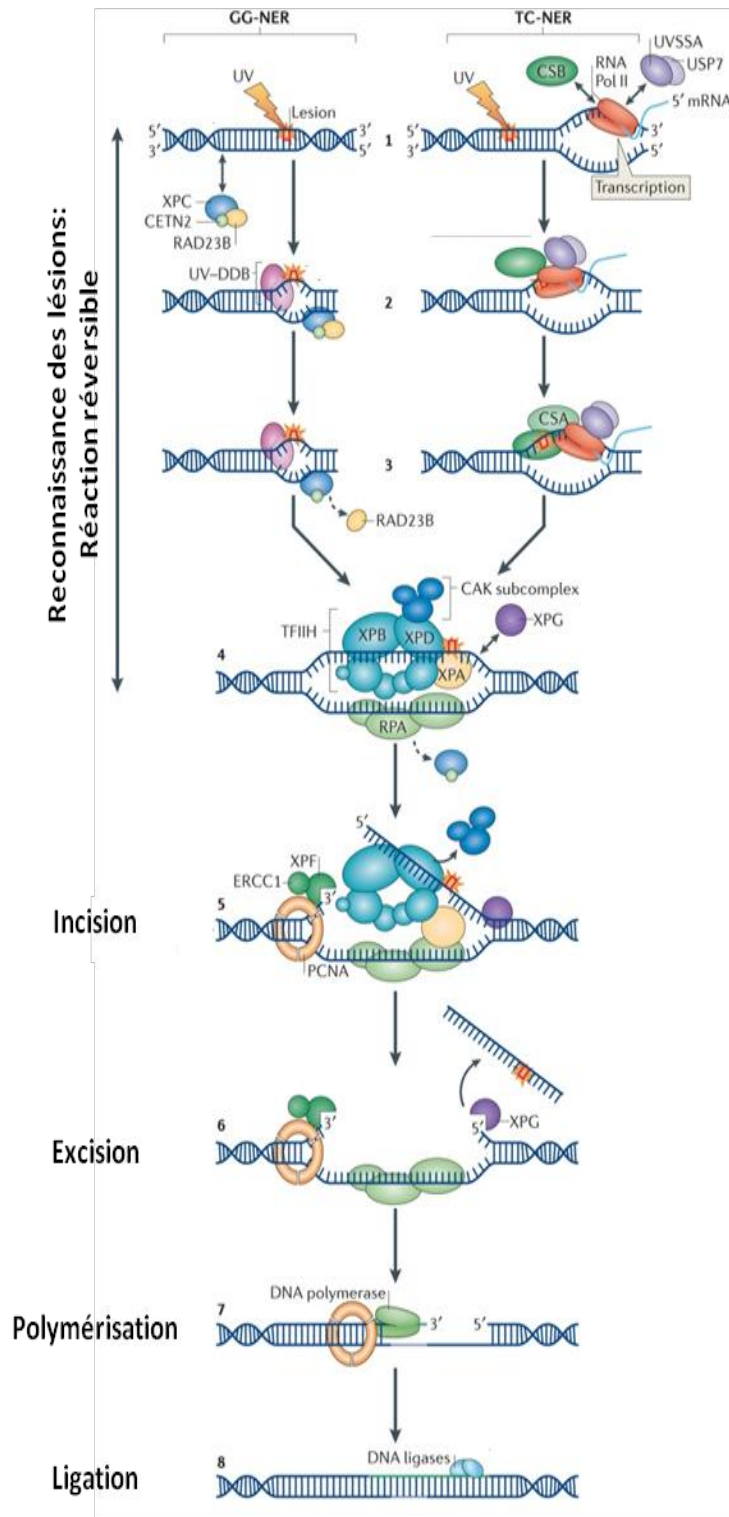
### 3. Régulation de l'expression du gène et de la protéine DDB2

Le mode de régulation de l'expression de ce gène est mal connu. Dans les cellules normales, l'expression de *ddb2* est induite suite à une exposition aux rayons ultraviolets (UV). Suite à l'exposition aux rayonnements, les protéines p53 et TAp63 $\gamma$  en association avec BRCA1 (Breast Cancer Associated 1) se fixent dans la région proximale du promoteur du gène codant DDB2 (Tan and Chu, 2002) ; (Liu et al., 2012) ; (Takimoto et al., 2002). L'augmentation de son expression n'est cependant que transitoire, puisque la protéine est rapidement ubiquitinylée et dégradée par le protéasome. De plus, de nombreux autres éléments de réponse ont été mis en évidence sur le promoteur du gène *ddb2*, notamment ceux des facteurs de transcription NF-1, Sp1 ou encore E2F (Nichols et al., 2003), représentés sur la **Figure 19**. Plus récemment, Roy et collaborateurs ont montré que les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) induisaient également l'expression de DDB2 dans des fibroblastes embryonnaires murins, sans toutefois identifier les acteurs moléculaires impliqués (Roy et al., 2010). Un élément cis-régulateur de 25 nucléotides en 3'-UTR du messenger codant DDB2 a été dernièrement identifié, et réduit le temps de demi-vie de celui-ci (Melanson et al., 2013). Le gène codant la protéine DDB2 est différentiellement exprimé dans les différents types de cancer du sein. En effet, les cellules tumorales mammaires exprimant le récepteur aux oestrogènes (ER $\alpha$ ), MCF7 et T47D, présentent un niveau d'expression élevé de DDB2. A l'inverse, les lignées insensibles aux oestrogènes, comme les cellules MDA-MB231 ou SK-BR-3, expriment faiblement la protéine DDB2 (Kattan et al., 2008a). Bien qu'une corrélation semble exister entre ER $\alpha$  et DDB2, les mécanismes à l'origine de la régulation de l'expression de DDB2 dans les cancers du sein ne sont pas encore connus.

Très récemment, une régulation de l'expression protéique de DDB2 a été mise en évidence. Lors d'un sevrage en sérum, la quantité d'ARNm codant DDB2 ne varie pas alors que la protéine DDB2 est plus abondante. En effet, un élément IRES (Internal Ribosome Entry Site) a récemment été identifié en 5'-UTR de l'ARN messenger codant DDB2 (Dai et al., 2015). Cet élément permet l'initiation de la traduction indépendamment de la coiffe de 7-méthylguanosine et semble être activé dans des conditions de stress.

#### B. Activités biologiques de DDB2

De par sa localisation strictement nucléaire, les activités biologiques de la protéine DDB2 sont en lien avec sa capacité à interagir directement avec l'ADN. Deux rôles



**Figure 20 : Représentation schématique du mécanisme de réparation de l'ADN par excision de nucléotide (NER).** Deux systèmes NER permettent la réparation des nucléotides lésés : un premier vérifiant constamment l'intégrité du génome (GG-NER) et l'autre étant couplé à la transcription (TC-NER). Seule la phase de reconnaissance des dommages diffère entre les deux systèmes. Elle fait intervenir le complexe UV-DDB et XPC dans le cas du GG-NER alors que ce sont les protéines CSA, CSB, UVSSA et USP7 qui sont chargées de la fixation au site lésé pour le système couplé à la transcription (1-3). Le recrutement de la topoisomérase TFIIH, de XPA et RPA au niveau du site endommagé permet de le rendre accessible en déroulant l'ADN (4). Jusque-là, le mécanisme de réparation n'est pas encore initié, et toutes ces étapes sont réversibles.

L'ADN subit un premier clivage par ERCC1/XPF du côté 5' et un second par XPG côté 3' (5-6) libérant ainsi un fragment d'environ 25 nucléotides. L'ADN polymérase delta permet de combler la brèche qui sera définitivement réparée après ligation du fragment nouvellement synthétisé. D'après Marteiijn et al., 2014.

principaux ont été décrits jusqu'alors : un premier concernant la réparation de l'ADN lésé par les UV, et un second en lien avec la transcription génique.

### ***1. Dans la réparation de l'ADN***

#### ***a) Action au sein du complexe UV-DDB***

La protéine DDB2 intervient dans la réparation de l'ADN lésé par les ultraviolets ou des radiations ionisantes. Elle agit au sein du complexe UV-DDB selon un mécanisme d'excision de nucléotides (NER). La réparation par le système NER comporte trois étapes : la reconnaissance du site lésé, la coupure de part et d'autres de la lésion qui sera finalement comblée par polymérisation. La machinerie NER peut intervenir de manière systématique par un contrôle permanent de l'ADN (Global-Genomic, GG-NER) ou au moment de la transcription (Transcription-Coupled repair, TC-NER), chacune faisant intervenir des complexes protéiques spécifiques. La protéine DDB2 est capable de reconnaître les dommages de l'ADN, mais uniquement dans le cadre de sa reconnaissance globale par le système GG-NER (Hwang et al., 1999) (Tang and Chu, 2002).

En interagissant avec les protéines DDB1, Culline-4A et ROC1 au sein du complexe UV-DDB, DDB2 est capable de reconnaître des lésions de 2 types : les dimères de cyclobutane pyrimidiques (CPD) et les photoproduits de pyrimidines-pyrimidones (6-4PP). Ces dimères de pyrimidine peuvent être reconnus par le complexe UV-DDB mais également par les complexes XPC (Xeroderma Pigmentosum C) et XPA-RPA (Xeroderma Pigmentosum A- Replication Protein A). Cependant, la reconnaissance des lésions de type CPD par DDB2 semble essentielle pour leur correction. En effet, la réparation de ce type de dommages est altérée dans les cellules n'exprimant pas DDB2 (Scrima et al., 2011). La reconnaissance des nucléotides endommagés par le complexe UV-DDB permet le recrutement du complexe XPC-hHR23B. La Culline-4A, possédant une activité E3 Ubiquitine Ligase, poly-ubiquitinylyle à la fois DDB2 et le complexe XPC engendrant respectivement la dégradation par le protéasome 26S de l'une et la stabilisation de la liaison protéine-ADN lésé de l'autre (Takedachi et al., 2010)(Takedachi et al.). L'ubiquitinylation de l'octamère d'histones par la culline-4A et sa libération, ainsi que l'intervention de la topoisomérase TFIIH permet de rendre plus accessible le site endommagé aux endonucléases XPG et ERCC1/XPF. L'action de XPG puis de ERCC1/XPF permettent l'excision d'un fragment d'environ 25 nucléotides, qui sera comblée à partir du brin non endommagé grâce à l'ADN polymérase  $\delta$  suivie par l'action d'une ligase. L'ensemble de ce mécanisme est illustré dans la **Figure 20**.

b) Par remodelage de la chromatine

Dans le cadre du système GG-NER, une équipe a montré que DDB2 était associée à un relâchement de la chromatine, nécessaire pour rendre le site endommagé accessible aux complexes de réparation (Luijsterburg et al., 2012). La décondensation de la chromatine résulte de l'ajout de plusieurs ADP-Riboses sur les histones, cette modification post-traductionnelle n'étant possible qu'en présence de la protéine DDB2 fonctionnelle. De plus, au sein du complexe UV-DDB comprenant une E3 Ubiquitine-Ligase, DDB2 est capable de diriger l'ubiquitinylation des histones H2A, H3 et H4 (Scrima et al., 2011). Enfin, il a également été montré que la protéine DDB2 pouvait interagir avec les complexes SWI/SNF (SWItch/Sucrose NonFermentable) (Zhao et al., 2009) ou STAGA (SPT3-TAF9-GCN5 acetyltransferase complex) (Martinez et al., 2001). L'ensemble de ces phénomènes est à l'origine, soit de la libération de l'octamère d'histones, soit d'une relaxation de la chromatine et permettant ainsi l'accès à l'ADN de la machinerie de réparation.

c) Régulation de l'activité de DDB2

En absence de stimulation, DDB2 étant faiblement exprimée, le premier niveau de régulation concerne celle de son expression. Celle-ci est inductible par une exposition aux UV, activant eux-mêmes certains facteurs de transcription régulant le gène *ddb2*. C'est par exemple le cas de la protéine p53, qui sous l'effet d'un stress génotoxique est phosphorylée par le complexe ATM/ATR (Christmann and Kaina, 2013).

La formation du complexe UV-DDB peut elle-même être régulée, et notamment par la présence des variants d'épissage D1 et D2 de DDB2. En effet, ces deux isoformes sont capables d'interagir avec DDB1 mais empêchent son passage dans le noyau et la reconnaissance des nucléotides lésés par le complexe UV-DDB (Inoki et al., 2004).

Au cours de la réparation des dommages à l'ADN, la protéine DDB2 subit différents types de modifications post-traductionnelles, favorisant le bon déroulement de ce processus. L'ubiquitinylation de la protéine DDB2 par la Culline-4A est son principal mode de régulation. En effet, la dégradation par le protéasome résultant de cette dernière est nécessaire à la progression de la réparation par excision de nucléotides (Puumalainen et al., 2014) et semble dépendre de l'activation de la voie p38/MAPK (Mitogen Associated Protein Kinase) (Zhao et al., 2008). De plus, une SUMOylation de DDB2 par la SUMO E3 ligase PIASy dans des cellules de cancer du col utérin exposées aux UV a récemment été mise en évidence (Tsuge et al., 2013) et semble favoriser la réparation des lésions de type CPD. Tout comme



son ubiquitinylation, la SUMOylation de DDB2 semble être associée à un raccourcissement de sa durée de vie. Toutefois, il existe aussi d'autres types de modifications, qui elles, au contraire, renforcent la stabilité de l'interaction de DDB2 avec le site endommagé. Dans ce sens, des travaux de Pines et collaborateurs ont montré que la protéine PARP1 était capable de catalyser l'ajout de plusieurs ADP-riboses sur une lysine située du côté N-terminal de DDB2 (Pines et al., 2012), stabilisant ainsi sa fixation au niveau du site lésé. La PARylation de cette protéine semble être un événement précoce et initiateur de la machinerie de réparation, puisque la présence de poly-ADP-riboses sur le complexe de reconnaissance mais également sur les histones, permet le recrutement de facteurs remodelant la chromatine comme ALC1. Plus récemment, il a également été démontré que la localisation de DDB2 dans le noyau au niveau de l'ADN lésé dépendait d'une  $\alpha$ -N-méthylation sur une Alanine située en N-terminal. La N-terminale RCC1 méthyltransférase (NRMT) est à l'origine de cette modification post-traductionnelle qui semble essentielle pour activer la machinerie de réparations des dommages induits par les UV (Cai et al., 2014).

## ***2. Dans la transcription génique***

Etant donné son rôle dans le remodelage de la chromatine au cours de la réparation, la protéine DDB2 pourrait également intervenir dans la régulation de la transcription génique. De plus, les interactions avérées avec des complexes tels que CBP/p300, SWI/SNF ou STAGA, aussi bien impliqués dans la réparation que dans la régulation de l'expression de gènes, renforcent l'idée que DDB2 régulerait l'expression de gènes.

L'organisation structurale en domaine WD40 de la protéine DDB2 est à l'origine de son interaction avec différents facteurs de transcription. Le premier facteur démontré, pour lequel DDB2 joue un rôle de co-activateur, est E2F1 (Hayes et al., 1998). En effet, en interagissant avec la partie C-terminale de E2F1, DDB2 est capable d'augmenter son activité transcriptionnelle. Une étude plus récente met, au contraire, en évidence un effet négatif de DDB2 sur l'activité transcriptionnelle du récepteur nucléaire aux androgènes (AR). Par l'intermédiaire des répétitions WD40 situées en N-terminal, DDB2 interagit physiquement avec AR, favorisant ainsi sa dégradation par ubiquitinylation (Chang et al., 2012).

D'autres travaux ont confirmé l'implication de DDB2 dans la régulation de la transcription de gènes cibles. Des études menées au laboratoire ont révélé deux gènes cibles de DDB2 dans les cellules d'adénocarcinomes mammaires. Dans un premier temps, il s'est avéré que l'expression du gène *sod2* codant la superoxyde dismutase à Manganèse (MnSOD)

était inhibée en présence de la protéine DDB2 (Minig et al., 2009a). Sa répression s'exerce à plusieurs niveaux : en se fixant directement sur une séquence d'ADN composée d'une répétition séparée de 2 nucléotides charnières (5'-AGCCTGCAGCCT-3'), mais également en favorisant la déacétylation des histones ainsi que le recrutement d'un répresseur transcriptionnel, l'activator protein 2 alpha (AP-2 $\alpha$ ). Suite à cela, une recherche d'autres gènes cibles de DDB2 a conduit le laboratoire à identifier le gène *nfkbia*, codant l'inhibiteur cytoplasmique de NF $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B) I $\kappa$ B $\alpha$  comme cible de la protéine (Ennen et al., 2013). En se fixant sur une séquence située 491 paires de base en amont du site d'initiation de la transcription (5'-TCCCCTA-3'), DDB2 induit l'expression de ce gène.

Sur la base de ces travaux, l'équipe de Zhao et collaborateurs a révélé l'existence de deux autres gènes cibles de DDB2 dans les cancers ovariens. En effet, DDB2 est capable d'interagir sur le promoteur de *bcl2*, 3814 paires de base en amont du site d'initiation de la transcription, avec une séquence similaire à celle identifiée sur le promoteur du gène codant la MnSOD (5'-AGCTTGAAGCCT-3'). Cette interaction ainsi que le recrutement de l'histone déacétylase HDAC1 ont pour conséquence une répression de l'expression de Bcl2 (Zhao et al., 2014). En ce sens, des travaux récents réalisés au laboratoire ont confirmé l'effet négatif de DDB2 sur l'expression de Bcl2 dans les cellules tumorales mammaires. Toutefois, un autre site de fixation situé dans une région plus proximale du promoteur a été découvert, dont la séquence précise reste à déterminer. Très récemment, Zhao et collaborateurs ont également mis en évidence que DDB2 était capable d'interagir avec le promoteur du gène codant la protéine NEDD4L (Neural precursor cell expressed developmentally downregulated 4-Like) et d'inhiber ainsi son expression (Zhao et al., 2015a). Cette répression résulte de la fixation de DDB2 sur une séquence similaire à celle identifiée sur le promoteur de *nfkbia* (5'-TCCCCTTT-3'), en interaction avec une histone méthyltransférase EZH2 (enhancer of zeste homolog 2).

D'autres travaux ont mis en évidence que la protéine DDB2 pouvait réguler négativement l'expression de 4 autres gènes : ceux codant une enzyme anti-oxydante la catalase (Roy et al., 2010), deux facteurs de transcription impliqués dans la TEM Snail et ZEB1, ainsi que le facteur de croissance pro-angiogénique le VEGF (Roy et al., 2013). La régulation de chacun de ces gènes fait intervenir la fixation sur les promoteurs de DDB2, la Culline-4A ainsi que Suv39h, une histone méthyltransférase. Cependant, les séquences nucléotidiques reconnues par la protéine DDB2 sur chacun de ces promoteurs n'ont pas été identifiées.

## C. Conséquences dans les cancers

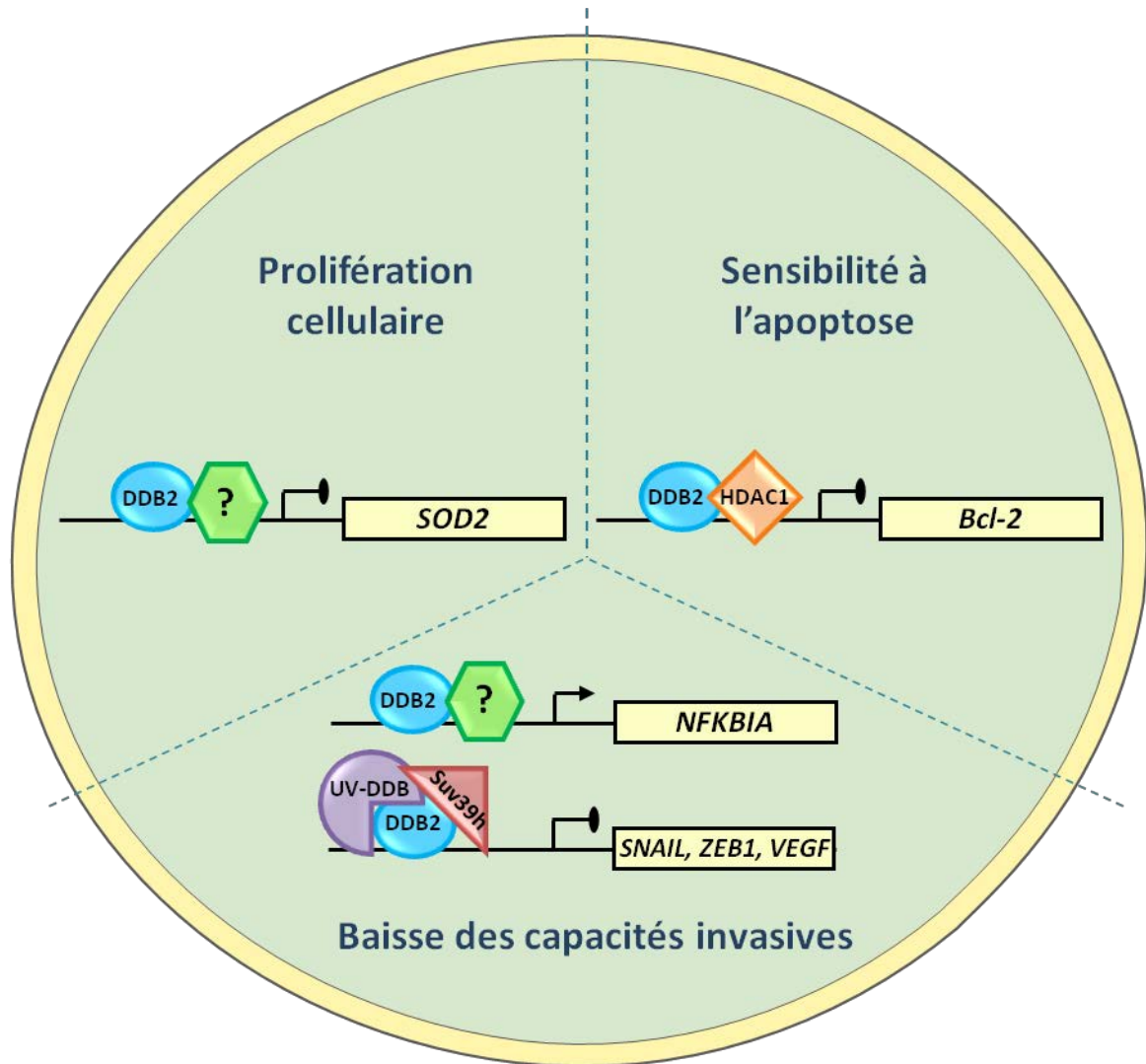
### 1. *Effet protecteur sur les lésions induites par les UV*

La protéine DDB2 étant largement impliquée dans la réparation des lésions de l'ADN induites par les UV, celle-ci peut avoir un rôle protecteur vis-à-vis de leurs effets délétères et mutagènes. Cette idée est renforcée par l'observation du phénotype de patients souffrant de déficiences du système NER. Ces altérations du système de réparation sont associées à trois maladies autosomiques récessives : le Xeroderma Pigmentosum (XP), le syndrome de Cockayne, et la Trichothiodystrophie. Le Xeroderma Pigmentosum, par exemple, une maladie multigénique et multiallélique, se caractérise notamment par une sensibilité accrue des patients aux UV et un risque augmenté de développer un cancer de la peau.

Jusque-là, 7 groupes de malades de XP-A à XP-G ont été décrits. Chaque groupe correspond à des mutations touchant une des protéines du système NER, qui est donc déficiente chez ces patients. L'un de ces groupes, XP-E, est associé à plusieurs types d'altérations de la partie codante du gène *ddb2*. De manière générale, il s'agit de mutations faux-sens qui affectent soit les domaines de liaison à l'ADN, soit la partie interagissant avec DDB1 (Scrima et al., 2008). Dans les cellules provenant de patients XP-E, bien que l'ARNm codant DDB2 soit présent en quantité anormalement importante, la protéine, elle, est totalement absente même après exposition aux UV. L'absence de DDB2 est à l'origine d'une accumulation de dommages à l'ADN non réparés et donc de mutations induites par les UV, augmentant ainsi pour les patients XP-E le risque de développer un mélanome. D'autres données renforcent l'idée que DDB2 jouerait un rôle de suppresseur de tumeur. En effet, des souris homozygotes, dont le gène *ddb2* a été invalidé, présentent une sensibilité accrue aux UV et au développement de mélanomes (Stoyanova et al., 2012). Même en l'absence d'UV, ces souris homozygotes développent spontanément des tumeurs dans de nombreux tissus, dont notamment des adénocarcinomes pulmonaires et mammaires (Itoh et al., 2007).

### 2. *Implication de DDB2 dans la prolifération des cellules tumorales*

Plusieurs observations réalisées dans des cellules normales mettent en évidence un lien entre l'expression de DDB2 et la progression dans le cycle cellulaire. En effet, son expression n'est détectable que dans les cellules se divisant, et atteint son plus haut niveau en fin de phase G1 pour chuter drastiquement en début de phase S (Nag et al., 2001). La présence d'un élément de réponse aux facteurs E2F régulateurs de gènes impliqués dans la réplication de



**Figure 21 : Conséquences du rôle de facteur de transcription de DDB2 dans la cancérogenèse.** Plusieurs études ont montré que DDB2, en interaction avec d'autres facteurs, régule l'expression de différents gènes cibles dans les cancers. D'après (Minig et al., 2009a), la protéine DDB2 réprime l'expression du gène *SOD2*, codant la MnSOD, engendrant ainsi une accumulation d'anions superoxydes et une augmentation de la prolifération des cellules tumorales mammaires. En plus, de favoriser la prolifération cellulaire, DDB2 sensibilise également les cellules à l'apoptose en inhibant l'expression d'une protéine anti-apoptotique, *Bcl-2*. Enfin, deux équipes ont montré l'implication de DDB2 dans la diminution des propriétés invasives de cellules tumorales mammaires et coliques. Dans le premier cas, c'est en induisant l'expression de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  et ainsi l'inhibition de l'activité NF- $\kappa\text{B}$ , que la protéine DDB2 réduit le pouvoir invasif des cellules tumorales mammaires. Dans les cellules coliques, l'expression de DDB2 s'oppose à la TEM en inhibant notamment l'expression des gènes *SNAIL* et *ZEB1*. Cette même équipe a également mis en évidence une répression du VEGF en présence de DDB2. D'après (Ennen et al., 2013; Minig et al., 2009a; Roy et al., 2013; Zhao et al., 2014).

l'ADN, à proximité du site d'initiation de la transcription de *ddb2*, est une preuve supplémentaire du lien entre la protéine DDB2 et le cycle cellulaire (Nichols et al., 2003). De plus, la protéine DDB2 est capable d'interagir avec des protéines qui ont un rôle clé dans la progression du cycle cellulaire comme la Culline-4A. Cette protéine est notamment responsable de la dégradation de p21<sup>CIP1/WAF1</sup> ainsi que de p27<sup>KIP1</sup>, des inhibiteurs des CDK (Cyclin-Dependent Kinase) (Sharma and Nag, 2014). C'est aussi le cas du facteur de transcription E2F1, avec lequel DDB2 interagit par l'intermédiaire d'une séquence similaire à la protéine du rétinoblastome Rb. Cette interaction est à l'origine d'une augmentation de l'expression des gènes cibles de E2F1, particulièrement impliqués dans la réplication de l'ADN et l'entrée en phase S des cellules (Hayes et al., 1998).

Des travaux réalisés au laboratoire ont montré que DDB2 participe à la croissance des cellules tumorales mammaires sensibles aux œstrogènes (ER positives). Dans ces cellules, le passage de la phase G1 à la phase S et la progression de celle-ci semble dépendre de DDB2 (Kattan et al., 2008a). L'équipe a par la suite montré que ce rôle dans la prolifération cellulaire dépendait de l'effet négatif de DDB2 sur l'expression de la MnSOD (Minig et al., 2009a); (Kattan et al., 2008b); **Figure 21**). Cette enzyme anti-oxydante catalyse la dismutation de l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Dans les cellules tumorales mammaires ER positives surexprimant DDB2, le niveau d'expression de la MnSOD est faible et engendre une accumulation d'anions superoxydes, décrit comme un activateur de diverses voies de signalisation favorisant la prolifération cellulaire (Pervaiz and Clement, 2007).

Au contraire, une équipe a très récemment montré dans des cellules de cancer ovarien, que DDB2 est associée à une diminution de leur prolifération. Lorsque DDB2 est surexprimée dans ces cellules, ces dernières sont plus sensibles à la voie du TGF $\beta$ , et en particulier à son effet antiprolifératif. Ceci résulte de l'inhibition de l'expression de NEDD4L (Zhao et al., 2015a), une E3 Ubiquitine Ligase connue pour limiter l'activation de la voie du TGF $\beta$  en ubiquitinylant ses effecteurs activés, les Smads 2 et 3 phosphorylées (Gao et al., 2009).

### ***3. Rôle de DDB2 dans la sénescence et l'apoptose***

La sénescence est un phénomène physiologique qui se caractérise par un arrêt de prolifération des cellules sous l'influence de différents stimuli comme les UV, les traitements de chimiothérapie ou le stress oxydant. C'est justement dans le cadre d'études de l'influence de DDB2 sur la production de dérivés réactifs de l'oxygène que certaines observations ont

mis en évidence une relation entre cette protéine et l'induction précoce de la sénescence. Une première étude menée sur des fibroblastes embryonnaires murins et des cellules de carcinomes coliques a révélé que l'absence de DDB2 était associée à une résistance à l'entrée en sénescence. En effet, sous l'effet d'un stress oxydant, l'expression de DDB2 est augmentée et favorise l'entrée en sénescence des cellules (Roy et al., 2010). Le rôle d'inducteur de l'entrée en sénescence de DDB2, résulterait essentiellement de son action négative sur l'expression d'enzymes antioxydantes (catalase et MnSOD) à l'origine d'une accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène (Roy et al., 2012), bloquant le cycle cellulaire en G1 par l'intermédiaire des voies p53 et MAPK.

En plus de son rôle dans la prolifération et l'arrêt du cycle cellulaire, DDB2 semble également avoir un rôle dans la mort cellulaire par apoptose. Dans un premier temps, les études se sont focalisées sur l'entrée en apoptose après irradiation des cellules aux UV. Dans ce contexte, il a ainsi été mis en évidence que des fibroblastes de peau, provenant de patients porteurs de mutations dans le gène *ddb2*, présentaient une incapacité à entrer en apoptose (Itoh et al., 2004). Ce défaut d'induction de mort cellulaire par les UV résulte d'une baisse de l'activité p53 dans ces cellules, protéine clé dans l'induction de l'apoptose. Une étude a ensuite révélé que DDB2 était essentielle à l'entrée en apoptose suite à des lésions à l'ADN, qu'elles soient induites par des UV ou des agents chimiothérapeutiques. En effet, suite à une exposition aux UV ou un traitement au cisplatine ou à l'aclarubicine, deux traitements utilisés dans les cancers et causant des dommages à l'ADN, les fibroblastes embryonnaires murins *ddb2*<sup>-/-</sup> présentent un arrêt du cycle cellulaire mais un défaut d'entrée en apoptose (Stoyanova et al., 2009). Dans les cellules dont l'expression de DDB2 est déficiente, la dégradation de la protéine p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, protéine inhibant l'apoptose, est bloquée. Cette accumulation de p21<sup>WAF1/CIP1</sup> est à l'origine de la résistance des fibroblastes embryonnaires murins *ddb2*<sup>-/-</sup> à la mort cellulaire.

Des travaux plus récents ont mis en évidence que la protéine DDB2 favorisait l'entrée en apoptose de cellules tumorales ovariennes traitées au cisplatine, de manière indépendante de la voie p53 et de son rôle dans la réparation de l'ADN, mais selon un mécanisme mettant en jeu une protéine anti-apoptotique Bcl-2. Dans ces cellules, l'expression de DDB2 est à la fois corrélée à une baisse de l'expression transcriptionnelle du gène codant Bcl-2 ainsi qu'à une augmentation de sa dégradation par le protéasome (Barakat et al., 2010). Une étude complémentaire a permis d'identifier que DDB2 régulait négativement la transcription de *bcl2* (voir paragraphe III.B.2.) ; **Figure 21**), à l'origine de l'augmentation de la sensibilité des

cellules tumorales ovariennes au cisplatine (Zhao et al., 2014). Dans ce sens, une étude menée au laboratoire, et dont les résultats ne sont pas encore publiés, a montré que l'expression de DDB2 dans les cellules tumorales mammaires était associée à une sensibilité accrue de ces cellules à différents agents de chimiothérapie (doxorubicine et 5-Fluorouracile).

Seule une étude montre au contraire, que DDB2 semble avoir un rôle protecteur sur des cellules de cancer du col utérin exposées aux UV, en induisant l'expression de c-Flip (Cellular FLICE-like inhibitory protein) (Sun et al., 2010).

#### 4. Relation entre DDB2 et l'invasion tumorale

En plus de ses rôles avérés dans la prolifération et la mort cellulaire, des études récentes ont permis de démontrer l'implication de la protéine DDB2 au cours de la progression tumorale. Une étude menée au laboratoire a montré que la surexpression de DDB2, dans des cellules tumorales mammaires hautement métastatiques et ne l'exprimant pas (MDA-MB231 et SK-BR-3), réduisait de manière significative non seulement leurs propriétés invasives *in vitro*, mais aussi leur capacité à former des métastases pulmonaires *in vivo*. De plus, une étude rétrospective, conduite sur 92 échantillons de tumeurs mammaires et corrélant négativement l'expression de DDB2 au grade SBR des tumeurs, conforte ces résultats (Ennen et al., 2013). DDB2 réprime les capacités invasives des cellules tumorales mammaires, en exerçant son rôle de régulateur transcriptionnel des gènes codant la MnSOD et I $\kappa$ B $\alpha$ . Dans les lignées tumorales mammaires ER négatives, DDB2 étant faiblement exprimée, la MnSOD l'est fortement et est à l'origine d'une accumulation de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Kattan et al., 2008b), connu pour activer de nombreuses voies de signalisation impliquées dans l'invasion tumorale. Plus récemment, l'équipe a montré que DDB2 était associée à une baisse de l'activité NF- $\kappa$ B dans les cellules tumorales mammaires, en induisant l'expression de son inhibiteur cytoplasmique I $\kappa$ B $\alpha$  (Ennen et al., 2013) ; **Figure 21**). Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B a largement été impliqué dans l'invasion tumorale, que ce soit en induisant l'expression de gènes cibles comme les métalloprotéases matricielles, ou en permettant le maintien du phénotype invasif des cellules tumorales (Zubair and Frieri, 2013).

Parallèlement, l'équipe de Roy et collaborateurs a révélé l'importance de DDB2 dans l'acquisition d'un phénotype invasif des cellules tumorales coliques. De la même manière que pour le cancer du sein, une étude histologique, sur des biopsies de tumeurs coliques de différents grades, révèle que la protéine DDB2 est d'autant moins exprimée que le cancer est agressif. L'inhibition de DDB2 dans des cellules de cancer du côlon est associée à une

progression tumorale plus rapide *in vivo*. Ces observations résultent de l'opposition de DDB2 à la TEM. En effet, c'est en exerçant son rôle de facteur de transcription que DDB2 bloque la TEM, notamment en réprimant l'expression de 2 facteurs de transcription inducteurs de cette dernière : SNAIL et ZEB1 (Roy et al., 2013). Cette même équipe a également mis en évidence une inhibition de l'expression du facteur de croissance VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), qui est notamment impliqué dans l'angiogenèse tumorale et favorise ainsi l'échappement métastatique des cellules cancéreuses. Ainsi, les cellules de carcinomes coliques, dont l'expression de DDB2 est inhibée, acquièrent spontanément un phénotype mésenchymateux et sont dotées de capacités invasives.

Néanmoins une étude très récente indique au contraire, que DDB2 favoriserait les capacités migratrices de cellules cancéreuses gastriques. DDB2 en interaction avec DDB1 et Cul-4A est capable d'induire la dégradation par le protéasome de PAQR3 (Progesterin and AdipoQ Receptor 3), un récepteur à 7 domaines transmembranaires, qui joue un rôle de suppresseur de tumeur (Qiao et al., 2015).

L'ensemble de ces données indiquent donc l'importance de la protéine DDB2 dans la régulation de l'acquisition des propriétés migratrices et invasives des cellules tumorales. Néanmoins, son implication au cours des événements précoces précédant l'acquisition des propriétés invasives, et notamment dans la régulation de l'adhérence cellulaire, n'a pas encore été élucidée.



## **HYPOTHESE & OBJECTIFS DU PROJET DE THESE**

Le cancer du sein reste la pathologie cancéreuse la plus fréquente dans le monde, malgré des progrès, au cours des 15 dernières années, dans son diagnostic et sa prise en charge thérapeutique. La progression métastatique et l'échappement thérapeutique à l'origine d'une récurrence du cancer du sein, restent une préoccupation permanente en oncologie mammaire. Ceci réside dans le manque de marqueurs biologiques prédictifs suffisamment fiables et de connaissance des mécanismes moléculaires responsables. C'est dans ce contexte que s'inscrit la thématique principale et les résultats obtenus au sein du laboratoire d'accueil, avec l'identification de nouvelles activités biologiques de la protéine DDB2 dans la tumorigenèse mammaire. DDB2 est différentiellement exprimée dans les tumeurs mammaires, leur conférant ainsi des propriétés différentes. Celles qui expriment fortement la protéine présentent des capacités prolifératives élevées et une sensibilité accrue vis-à-vis des agents anticancéreux. Au contraire, les cellules tumorales exprimant peu ou pas DDB2 présentent des capacités invasives et métastatiques, avec une sensibilité fortement diminuée vis-à-vis des agents anticancéreux. Le laboratoire a montré que DDB2 possède ces activités biologiques dans la tumorigenèse mammaire en participant à la régulation de l'expression de gènes cibles (Ennen et al., 2013; Minig et al., 2009a).

L'ensemble de ces résultats nous a conduits à émettre l'hypothèse d'une implication de DDB2, jamais décrite jusqu'à maintenant, dans les événements précoces qui conduisent progressivement les cellules tumorales à acquérir des propriétés migratoires et invasives, à l'origine de leur dissémination métastatique. Ces événements précoces correspondent à des modifications profondes des propriétés d'adhérence que subissent les cellules tumorales au cours de la TEM. Certaines données de la littérature supportent notre hypothèse, montrant que DDB2 est capable de s'opposer à la TEM induite sur des cellules d'adénocarcinome colique (Roy et al., 2013). De plus, une analyse transcriptomique préliminaire, réalisée juste avant ce travail de Thèse, est venue également conforter cette hypothèse, en révélant une modulation de l'expression de plusieurs gènes cibles de la voie de signalisation du TGF $\beta$  selon l'expression de DDB2 dans les cellules tumorales mammaires. Il est bien établi que la TEM est associée à une perte de l'adhérence des cellules et à des remaniements du cytosquelette, et

que le TGF $\beta$ , par sa voie de signalisation, contribue à l'induction et à la mise en place de ces événements.

Les objectifs principaux de ce travail se décomposent donc en 2 grandes parties :

- (i) évaluer le rôle de DDB2 dans les propriétés d'adhérence des cellules tumorales mammaires, observer les conséquences sur le remaniement du cytosquelette, et étudier les propriétés des membranes cellulaires (propriétés nanomécaniques) ;
- (ii) étudier s'il existe bien une relation entre DDB2 et la voie de signalisation du TGF $\beta$ , en recherchant le mécanisme moléculaire à l'origine et en étudiant les conséquences sur la TEM.

# **MATERIEL & METHODES**

## I. Culture cellulaire

### A. Lignées cellulaires et conditions de culture

#### 1. Lignées cellulaires

Au cours de ces travaux, deux lignées cellulaires d'adénocarcinomes mammaires ont été utilisées : les cellules MDA-MB231 et les cellules MCF7, toutes deux isolées à partir de métastases de la plèvre. Chacune de ces deux lignées présente des caractéristiques différentes qui sont reportées dans le tableau ci-dessous. Les MDA-MB231 sont des cellules ayant subi la transition épithélio-mésenchymateuse, leur conférant ainsi un haut pouvoir invasif. Ces cellules n'expriment pas les récepteurs hormonaux (ER et PR) et expriment faiblement DDB2. Les MCF7 sont quant à elles faiblement invasives et, contrairement aux MDA-MB231, ces cellules sont hormono-dépendantes et expriment fortement DDB2.

Lignées	Provenance	Statut ER	Statut PR	Statut HER2	Expression de DDB2	Statut p53	Sous-Types
MDA-MB231	ATCC	négatif	négatif	négatif	faible	p53R280K muté	Post-TEM Basal-like
MCF7	D.Picard (Genève)	positif	positif	négatif	forte	sauvage	Luminal

**Tableau1 : Caractéristiques des lignées cancéreuses mammaires utilisées.** Chaque lignée cellulaire est caractérisée selon l'expression des gènes codant les récepteurs aux oestrogènes (ER) et à la progestérone (PR), le co-récepteur à l'EGF (HER2) ainsi que de celui de la protéine DDB2. Le statut de la protéine p53 est indiqué. Cette dernière est mutée dans les cellules MDA-MB231, par une substitution de l'arginine en position 280 par une lysine. Dans la lignée MCF7, la protéine p53 est sauvage. Les MDA-MB231 appartiennent au sous-type moléculaire « basal-like » ayant subi la transition épithélio-mésenchymateuse et sont triple-négatives. Les MCF7 présentent les caractéristiques moléculaires du sous-type luminal, à savoir notamment l'expression des récepteurs hormonaux.

#### 2. Conditions de culture

Les cellules d'adénocarcinomes mammaires sont cultivées en monocouche dans du RPMI 1640 sans rouge phénol (Gibco, Invitrogen, UK) contenant 2mM de glutamine, 0,1 mg/mL de gentamicine (Sigma) et 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Sigma) préalablement décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes. La lignée MCF7 étant hormono-dépendante,

100nM d'oestradiol sont ajoutés au milieu de culture complet. Le milieu est renouvelé tous les 2 jours. Après 3 à 4 jours, les cellules à confluence sont resuspendues par une solution de trypsine à 0,1% contenant 10 $\mu$ M d'EDTA, diluée dans du D-PBS (Gibco). Les cellules sont ensuite réensemencées à 10<sup>5</sup> cellules/mL de milieu de culture. La présence de mycoplasmes est vérifiée bimensuellement à l'aide d'un marquage au Hoechst 33342 (Invitrogen).

Pour certaines expérimentations, notamment les tests ELISA, les lignées d'adénocarcinomes mammaires ont été cultivées dans du DMEM (Gibco) contenant du rouge phénol, 2mM de glutamine, 0,1mg/mL de gentamycine et 10% de sérum de veau foetal. De la même manière, 100nM d'oestradiol sont ajoutés au milieu de culture pour la lignée MCF7 uniquement. Après 2 semaines d'adaptation dans le milieu DMEM, les expériences ont été réalisées.

## **B. Etablissement de modèles transgéniques stables**

### **1. Par un agent polycationique**

Le modèle de MDA-MB231 surexprimant DDB2 a été établi en transfectant le plasmide pcDNA3.1(+) (Invitrogen) portant ou non la séquence codant DDB2 grâce à un agent polycationique, le poly-éthylèneimine (JetPEI PolyPlus Transfection). Une sélection clonale des cellules ayant incorporé le plasmide a été réalisée par traitement avec 400 $\mu$ g/mL de néomycine. Le niveau d'expression de DDB2 de chaque clone a ensuite été analysé par RT-PCR en temps réel (RT-qPCR) et par Western-blotting. Seuls les clones exprimant fortement DDB2 ont été conservés. Le développement de ce modèle a été réalisé au cours de précédents travaux (Minig et al., 2009a).

### **2. Par infection avec des particules lentivirales**

Le modèle de MCF7, dont l'expression de DDB2 est inhibée par ARN interférence, a été développé par infection virale. Pour cela, des particules lentivirales commerciales (sc-37799-V, Santa Cruz) contenant 3 constructions porteuses d'un shARN (small hairpin ARN) dont la cible est l'ARNm codant la protéine DDB2, ont été utilisées. Les cellules sont ensemencées en plaque 24 puits à 5.10<sup>4</sup> cellules par puits et sont infectées le lendemain avec les particules lentivirales à un MOI (Multiplicity Of Infection) de 2. Un agent polycationique, le polybrène (5 $\mu$ g/ml) est ajouté en même temps que les particules lentivirales afin d'augmenter l'efficacité d'infection. En parallèle, des cellules ont également été infectées avec des particules contenant un shARN non spécifique (sc-108080, Santa Cruz). Le milieu

est remplacé 24 heures après infection et les cellules sont sélectionnées de manière polyclonale pendant 7 jours avec 2,5µg/ml de puromycine. Après vérification du niveau d'expression de DDB2 par RT-qPCR et Western-Blotting, les clones présentant respectivement le niveau d'expression de DDB2 le plus proche de la lignée sauvage ou le plus inhibé ont été conservés. Les cellules possédant le shARN non spécifique sont appelées shCTL, tandis que celles ayant été infectées avec une particule contenant les shARN ciblant DDB2 sont appelées shDDB2.

## II. Analyse de l'expression de gènes

### A. Au niveau transcriptionnel

#### 1. *Extraction des ARN*

Les cellules sontensemencées à  $8.10^4$  cellules/mL de milieu de culture et 24 heures après, sont traitées ou non avec 5ng/ml de TGFβ1 (Recombinant Human TGFβ1, R&D Systems) pendant 24 heures. Après trypsination, les culots de cellules sont récupérés et lavés une fois avec du D-PBS. Ils sont ensuite resuspendus dans le tampon de lyse fourni par le kit d'extraction (ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System, Promega) contenant du thioglycérol. Après ajout de 25% d'isopropanol, les lysats sont transférés sur des colonnes et traités à la DNase I. Après plusieurs lavages avec les solutions fournies par le fabricant, les ARN sont élués dans de l'eau ultra-pure. Les échantillons sont dosés par spectrophotométrie au NanoDrop (Thermo Scientific) en mesurant la DO à 260 nm. La qualité de l'extraction est vérifiée par des mesures de DO à 280 nm et 230 nm. Les rapports de DO 260/280nm et 260/230nm sont ensuite calculés et doivent être respectivement supérieurs à 1,8 et 1,7. Seules les extractions remplissant ces conditions sont utilisées par la suite pour la RT-qPCR.

#### 2. *RT-PCR en temps réel*

Cette technique se réalise en 2 temps : la transcription inverse des ARN extraits, suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne pour chaque gène étudié.

La première étape permet la synthèse d'ADNc (complémentaires) à partir de 1µg d'ARN grâce au kit iScript cDNA Synthesis (Biorad). La réaction s'effectue dans un thermocycleur et débute par l'activation de l'enzyme pendant 5 minutes à 25°C. Les ADNc sont synthétisés lors d'une étape de 30 minutes à 42°C avant que l'enzyme ne soit inactivée

Nom	Amorce Sens	Amorce Anti-Sens	Tm	Taille
<b>Amorces</b>				
<b>RT-PCR</b>				
DDB2	5'-CTCCTCAATGGAGGGAACAA-3'	5'-GTGACCACCATTTCGGCTACT-3'	57°C	132 pb
PAI-1	5'-AGAACCTGGGAATGACCGAC-3'	5'-ATGCGGGCTGAGACTATGAC-3'	60°C	169 pb
CTGF	5'-CCTCTTCTGTGACTTCGGCTC-3'	5'-TGCTCTGGAAGGACTCTCCG-3'	60°C	119 pb
Snail	5'-TAGCGAGTGGTTCTTCTGCG-3'	5'-AGGGCTGCTGGAAGGTAAAC-3'	62°C	164 pb
Alk5	5'-GAAAGTGGCGGGGAGAAGAA-3'	5'-CACCAACCAGAGCTGAGTCC-3'	62°C	173 pb
TBR11	5'-GGAGCACCCCTGTGTCGAAA-3'	5'-ATCTGGATGCCCTGGTGGTT-3'	62°C	99 pb
activine A	5'-TCTTCCTGGCTGTTCTGAC-3'	5'-GAGAACGGGTATGTGGAGAT-3'	60°C	115 pb
myostatine	5'-TTGCTGTAACCTTCCCAGGAC-3'	5'-TGGTGTGTCTGTTACCTTGACC-3'	61°C	74 pb
ACVRIIA	5'-CATGCTGGAATGGCAATGCT-3'	5'-ATAACCTGGCTTCTGCGTCG-3'	58°C	70 pb
ACVRIIB	5'-AGCAGAGACGATGTCACGAG-3'	5'-TGTGGGCAATAGACGGCTTG-3'	60°C	89 pb
UBB	5'-GCTTTGTTGGGTGAGCTTGT-3'	5'-CGAAGATCTGCATTTTGACCT-3'	60°C	98 pb
RPLPO	5'-GAAGGCTGTGGTGCTGATGG-3'	5'-CCGGATATGAGGCAGCAGTT-3'	58°C	103 pb
<b>Amorce</b>				
<b>ChIP qPCR</b>				
PAI-1 -280	5'-GGCATGGCAGACAGTCAAC-3'	5'-AAGAGCAAACCCCAATAGC-3'	64°C	108 pb
PAI-1 -580	5'-GGCAGGGATGAGGGAAAGACC-3'	5'-GCCAGCCCAACAGCCACA-3'	66°C	110 pb
PAI-1 -730	5'-TTCAGCCACCACCACCCA-3'	5'-CCGCCTCCGATGATACACG-3'	64°C	130 pb

**Tableau 2 : Liste de l'ensemble des couples d'amorces utilisés pour les amplifications par PCR.** Les couples d'amorces sont classés en fonction de leur application : RT-qPCR ou ChIP qPCR. Les séquences des amorces sens et anti-sens, ainsi que la taille du fragment amplifié sont répertoriées dans ce tableau. Les conditions de température d'hybridation pour chaque couple sont indiquées dans la colonne Tm.

par une incubation de 5 minutes à 85°C. La seconde étape permet l'étude du niveau d'expression des gènes par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les ADNc sont préalablement dilués avant d'être utilisés au 100<sup>ème</sup> ou au 1000<sup>ème</sup> selon le gène étudié, dans 15µL de mix réactionnel contenant de l'iQ<sup>TM</sup> SYBR Green Supermix 2x (Biorad), 300nM d'amorces sens et anti-sens. Pour chaque couple d'amorces, une gamme standard d'ADNc dilués du 10<sup>ème</sup> au 100000<sup>ème</sup> est réalisée, permettant ainsi de calculer l'efficacité d'amplification. Les conditions de PCR de chaque couple d'amorces ont été optimisées de manière à obtenir une efficacité comprise entre 1,95 et 2,05. L'amplification est réalisée par un programme composé d'une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 3 minutes, suivie de 40 cycles. Chaque cycle comprend une première étape de 20 secondes à 95°C, puis 15 secondes à la température d'hybridation des amorces (Tableau 2) et enfin une étape d'élongation de 15 secondes à 72°C. A la fin de chaque cycle, l'incorporation de SYBR Green est mesurée par le thermocycleur iCycler Opticon 2 (Biorad). La spécificité de l'amplification, ainsi que l'absence de dimères d'amorces sont évaluées lors d'une étape terminale permettant d'établir une courbe de fusion. Cette étape consiste en une montée progressive de la température de 50°C à 95°C durant laquelle la fluorescence est mesurée à chaque degré de température.

Le niveau relatif d'expression de chaque transcrite repose sur la détermination du nombre de cycle au bout duquel le seuil de détection de fluorescence est franchi (Ct, Cycle Threshold). Les Ct ainsi obtenus sont normalisés par deux gènes de référence, UBB (Ubiquitin B) et RPLP0 (Ribosomal Protein Large P0) selon la méthode de Pfaffl. Brièvement, les cellules contrôles non traitées de chaque lignée cellulaire sont définies en tant que calibrateur. Pour chaque gène, le  $\Delta Ct$ , c'est-à-dire le Ct du calibrateur auquel est soustrait le Ct de l'échantillon, est calculé. Puis pour chaque échantillon, l'efficacité de la PCR est élevée à la puissance  $\Delta Ct$  ( $E^{\Delta Ct}$ ). Les valeurs ainsi obtenues pour les gènes de référence sont moyennées et le  $E^{\Delta Ct}$  du gène d'intérêt est divisé par la moyenne des  $E^{\Delta Ct}$  des gènes de référence. Ainsi, le niveau d'expression des différents gènes étudiés est fixé à 1 dans les cellules contrôles et permet le calcul du niveau d'expression de ces gènes dans les autres échantillons.

### ***3. Par PCR-Array et analyse des résultats avec le logiciel STRING***

Tout comme pour la RT-PCR en temps réel, les ARNs extraits comme précédemment, subissent une première étape de transcription inverse. Les ADNc sont synthétisés à partir de



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ADAMTS1	ADAMTS13	ADAMTS8	CD44	CDH1	CNTN1	COL11A1	COL12A1	COL14A1	COL15A1	COL16A1	COL1A1
B	COL4A2	COL5A1	COL6A1	COL6A2	COL7A1	COL8A1	VCAN	CTGF	CTNNA1	CTNNA1	CTNND1	CTNND2
C	ECM1	FN1	HAS1	ICAM1	ITGA1	ITGA2	ITGA3	ITGA4	ITGA5	ITGA6	ITGA7	ITGA8
D	ITGAL	ITGAM	ITGAV	ITGB1	ITGB2	ITGB3	ITGB4	ITGB5	KAL1	LAMA1	LAMA2	LAMA3
E	LAMB1	LAMB3	LAMC1	MMP1	MMP10	MMP11	MMP12	MMP13	MMP14	MMP15	MMP16	MMP2
F	MMP3	MMP7	MMP8	MMP9	NCAM1	PECAM1	SELE	SELL	SELP	SGCE	SPARC	SPG7
G	SPP1	TGFB1	THBS1	THBS2	THBS3	TIMP1	TIMP2	TIMP3	CLEC3B	TNC	VCAM1	VTN
H	B2M	HPRT1	RPL13A	GAPDH	ACTB	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

**Tableau 3 : Organisation des plaques Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules utilisées pour l'analyse par PCR-Array.** La répartition des différents gènes étudiés dans la plaque est illustrée dans le tableau ci-dessus. Les gènes codant des protéines impliquées dans les mécanismes d'adhérence sont surlignés en bleu. Les gènes B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH et ACTB en rose correspondent aux 5 gènes de référence utilisés pour cette analyse. Les puits représentés en vert correspondent à des contrôles internes de la plaque. Le puits HGDC permet de vérifier l'absence d'ADN génomique. Les 3 puits RTC sont des témoins de l'efficacité de la RT, tandis que les trois puits PPC assurent l'efficacité de la PCR. D'après Qiagen, RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules.

1 $\mu$ g d'ARN à l'aide du kit RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Ces derniers sont ensuite dilués 5 fois avant d'être ajoutés au mix réactionnel de PCR quantitative contenant le 2x RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermix (Qiagen) selon un rapport de 1/25 puis répartis dans une plaque 96 puits RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules (Qiagen), à raison de 25 $\mu$ L par puits. La réaction de polymérisation en chaîne se fait dans le thermocycleur iCycler Opticon 2 (Biorad) selon le programme du fournisseur. Brièvement, ce programme comprend une première étape d'activation de l'enzyme à 95°C pendant 10 minutes, s'en suivent ensuite 40 cycles comprenant chacun une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes, 30 secondes d'hybridation à 55°C, enfin une dernière étape d'élongation de 30 secondes à 72°C.

Cette plaque permet l'étude du niveau d'expression de 84 gènes codant des protéines impliquées dans l'adhérence ainsi que 5 gènes de référence. Des contrôles internes d'absence d'ADN génomique et d'efficacité de la transcription inverse ainsi que de la PCR permettent de s'assurer de la véracité des résultats obtenus. Le plan de plaque ainsi que la liste des gènes étudiés sur la plaque RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules sont répertoriés dans le tableau 3. L'analyse du niveau relatif d'expression repose sur les Ct (Cycle Threshold) selon la méthode de Pfaffl où l'efficacité de la PCR est fixée à 2. L'expression de chaque gène, préalablement normalisée par les gènes de référence, dans les cellules dont l'expression de DDB2 est modulée, est divisée par celle des cellules contrôles correspondantes. Si ce ratio est inférieur à 1, le gène en question est réprimé dans les cellules dont l'expression de DDB2 est modulée. A l'inverse, une valeur supérieure à 1 reflète la surexpression du gène dans ces mêmes cellules.

Les gènes différentiellement exprimés selon le statut DDB2, lors des expériences de PCR-Array ont été soumis à une analyse par le logiciel STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, <http://string-db.org/>), afin d'identifier des liens entre eux et des voies de signalisation mises en jeu dans les mécanismes d'adhérence. Il s'agit d'une base de données sur les interactions protéine-protéine, qu'elles soient de nature physique ou fonctionnelle. La construction de cette banque de données repose à la fois sur des informations expérimentales provenant d'autres base de données comme Medline, mais aussi sur des analyses génomiques et des similarités entre espèces orthologues (Szklarczyk et al., 2015). Des algorithmes permettent de confronter la liste de gènes proposés aux différentes données compilées, et de construire des réseaux d'interaction. Plus le trait reliant deux

Nom	Fournisseur	Référence	Origine animale	Dilution/ Quantité	Taille
<b>Western-Blot</b>					
Anti-DDB2	Abcam	Ab77765	Lapin	1/1000	48 kDa
Anti-Phospho-Smad2	Cell Signaling	3108	Lapin	1/1000	60 kDa
Anti-Phospho-Smad3	Cell Signaling	9520	Lapin	1/1000	52 kDa
Anti-Smad2/3 total	Cell Signaling	8685	Lapin	1/1000	52-60 kDa
Anti-Smad4	Cell Signaling	9515	Lapin	1/1000	70 kDa
Anti-Smad6	ThermoFischer	PA1-41026	Lapin	1/1000	53 kDa
Anti-Smad7	ThermoFischer	PA1-41506	Lapin	1/1000	46 kDa
Anti-HDAC1	Santa Cruz	Sc-6298	Chèvre	1/1000	60 kDa
Anti- $\alpha$ -Tubuline	Abcam	Ab52866	Lapin	1/2500	50 kDa
Anti-Rabbit IgG peroxydase	Sigma	A9169	Chèvre	1/10000	
Anti-Goat IgG peroxydase	Sigma	A5420	Lapin	1/10000	
<b>Cyto immuno-fluorescence</b>					
Anti-E-cadhérine	BD Biosciences	562869	Souris	1/200	
Anti-Mouse IgG Alexa 594	Invitrogen	A11005	Chèvre	1/100	
<b>ChIP</b>					
Anti-Smad4	Santa Cruz	Sc-7966X	Souris	2 $\mu$ g/IP	
Anti-Smad2/3	Santa Cruz	Sc-8332X	Lapin	2 $\mu$ g/IP	
Anti-DDB2	Santa Cruz	Sc-25386	Lapin	2 $\mu$ g/IP	
IgG contrôle	Active Motif	53010	Souris	2 $\mu$ g/IP	

**Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés en fonction de leur application.** L'origine commerciale et animale de chaque anticorps est répertoriée dans le tableau ci-dessus. Les conditions de dilution des anticorps utilisés pour l'immunodétection sur membrane et la cytoimmunofluorescence, ainsi que leur quantité employée pour les immunoprécipitations de chromatine sont indiquées. Dans le cadre du Western-blotting, la taille de la protéine reconnue par l'anticorps est donnée dans la dernière colonne.

protéines est épais, plus le lien est fort. Il est également possible de faire apparaître la nature et la fonction du lien mis en évidence, lorsque celles-ci sont connues et décrites.

## **B. Au niveau traductionnel**

### **1. Extraction de protéines totales**

Les cellules sont resuspendues et centrifugées à 500g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot cellulaire est lavé dans du PBS, puis repris dans un tampon de lyse contenant 10mM TrisHCl pH 7,4, 5 mM EDTA, 1% de Triton X-100 et des inhibiteurs de protéases. La lyse est effectuée sur glace pendant 30 minutes en agitant vigoureusement les lysats régulièrement. Après une centrifugation à 10000g pendant 10 minutes à 4°C, le surnageant est récupéré. La concentration protéique est déterminée à l'aide d'une solution commerciale (Biorad) par spectrophotométrie à 595nm d'après la méthode de Bradford, à partir d'une gamme standard d'albumine bovine sérique (BSA) à différentes concentrations connues.

### **2. Séparation électrophorétique et transfert sur membrane**

Avant d'être déposées, 50µg de protéines sont dénaturées à 95°C pendant 5 minutes dans 62,5mM TrisHCl pH 6,8 contenant 2% de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), 8% de glycérol, 75mM de dithiothéitol (DTT) et du bleu de bromophénol. Les protéines sont déposées sur un gel de concentration contenant 5% d'acrylamide dans 0,25M TrisHCl pH 6,8 contenant 0,1% de SDS. En fonction des protéines étudiées, un gel de séparation est préparé avec 10% ou 12% d'acrylamide, dans 0,375M TrisHCl pH 8,8 contenant 0,1% de SDS. La migration est réalisée à 110V pendant 2 heures dans un tampon contenant 0,05M Tris, 0,384M Glycine et 0,1% SDS. Les protéines sont transférées du gel vers une membrane de polyvinyl-difluoride (PVDF, Biorad) dans un milieu liquide entre deux piles d'éponge et de papier Whatman imbibés de tampon de transfert contenant 0,05M Tris, 0,384M Glycine, 0,1% SDS et 20% d'éthanol, durant 16 heures à 12V. Le dépôt d'un marqueur de poids moléculaires connus et pré-colorés (ThermoFischer) permet la calibration de la membrane.

### **3. Détection immunologique**

A l'issue du transfert, la membrane est bloquée pendant 2 heures sous agitation grâce à une solution bloquante composée de 5% de lait dilué dans un tampon TrisHCl 50mM pH7,5 contenant 150mM NaCl et 0,1% de Tween-20 (TBS Tween). Les anticorps primaires polyclonaux ou monoclonaux sont dilués dans du TBS-Tween contenant 2,5% d'agent bloquant selon les conditions optimales préalablement définies et rapportées dans le **Tableau**

4, et mis en présence de la membrane pendant 2 heures sous agitation. Après trois lavages de 10 minutes dans du TBS-Tween, la membrane est incubée pendant 45 minutes sous agitation en présence des anticorps anti-Immunoglobulines adéquats couplés à la peroxydase, à raison de 0,04U/mL dans du TBS 0,1% Tween contenant 2,5% d'agent bloquant. Avant la révélation, la membrane est lavée trois fois 15 minutes avec du TBS Tween. L'activité peroxydase est révélée à l'aide d'un substrat chimioluminescent commercial Clarity™ ECL Substrate (Biorad). L'exposition des membranes est réalisée grâce au ChemiDoc (Biorad) permettant ainsi de mettre en évidence une bande correspondant spécifiquement à la protéine reconnue par l'anticorps primaire. L'intensité des bandes ainsi révélées est quantifiée à l'aide du logiciel QuantityOne (Biorad).

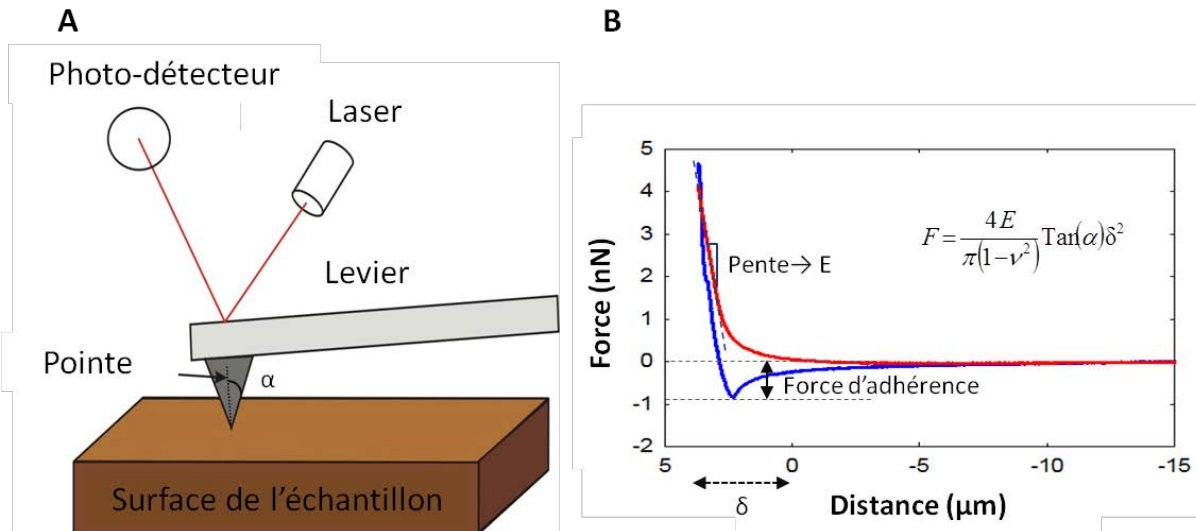
### **III. Evaluation des propriétés d'adhérence des cellules tumorales mammaires**

#### **A. Préparation de la plaque de culture**

Les puits d'une plaque 96 puits sont recouverts avec différentes concentrations, préalablement définies, de protéines de la matrice extracellulaire diluées dans du PBS supplémenté en ions Calcium et Magnésium (PBS-Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>, Sigma) : de la fibronectine (Sigma) à 10µg/cm<sup>2</sup>, du collagène de type I ou IV (Sigma) à 20µg/cm<sup>2</sup>, de la laminine (Sigma) à 4µg/cm<sup>2</sup> de la vitronectine (Sigma) à 0,2µg/cm<sup>2</sup> et du matrigel (BD Biosciences) à 10,5µg/cm<sup>2</sup>. En parallèle un puits contenant une lamelle de verre et un autre vide sont prévus, dans lesquels une solution de PBS-Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup> est ajoutée. Pour que la polymérisation des différentes protéines matricielles soit optimale, la plaque est conservée à température ambiante durant toute une nuit.

#### **B. Mesure des capacités d'adhérence**

Les cellules tumorales sontensemencées à 2,5x10<sup>4</sup> cellules par puits et placées à 37°C pendant 30 minutes (ou une heure et demie uniquement pour les puits contenant la lamelle de verre). Après plusieurs lavages avec du PBS-Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>, les cellules adhérentes sont fixées dans du milieu de culture contenant 4% de paraformaldéhyde (PAF) puis marquées avec 0,1% de Crystal Violet dilué dans 0,4% d'éthanol. La coloration est ensuite reprise dans 10% d'acide acétique et homogénéisée pendant 10 minutes sous agitation. Son absorbance à 595nm est lue par spectrophotométrie grâce à un lecteur de plaque (Victor X, Perkin Elmer).



**Figure 22 : Représentation schématique d'un microscope de force atomique et des courbes obtenues lors des acquisitions.** Les mesures par microscopie de force atomique sont réalisées par l'intermédiaire d'une pointe en silice fixée sur un levier se déplaçant à la verticale (A). La pointe est caractérisée par sa constante de raideur déterminée au préalable et son demi-angle  $\alpha$ . A l'extrémité de la pointe, le faisceau d'un laser est placé et sa réflexion est détectée par un photo-détecteur. L'angle de réflexion du laser permet d'apprécier la topographie de la surface analysée. Lors d'acquisitions selon le mode force-volume, le levier descend jusqu'à ce que la pointe touche la surface avec une force d'interaction spécifique. Ce processus permet de générer des courbes de forces illustrées en B. La courbe rouge correspond à l'approche de la pointe vers la surface, tandis que la courbe bleue correspond au retrait et donc à la perte de contact entre la pointe et les cellules. La distance  $\delta$  représente la distance de déplacement du levier pour laquelle la pointe est en contact avec la surface. Les courbes sont traitées selon le modèle de Sneddon dont la formule mathématique est indiquée. Après l'entrée en contact, la courbe d'approche subit un changement de pente qui reflète le module d'Young E. La valeur minimale de la courbe de retrait représente la force d'adhérence de la surface avec la pointe.

Pour chaque lignée cellulaire, le pourcentage de cellules adhérentes est calculé à partir de l'absorbance d'une solution de  $2,5 \times 10^4$  cellules colorées au Crystal Violet.

#### **IV. Etude des propriétés mécaniques des cellules par microscopie de force atomique**

##### **A. Préparation des cultures cellulaires**

Les cellules MCF7 et MDA-MB231 sontensemencées à  $8 \cdot 10^4$  cellules par mL de milieu en boîte de pétri de 10 cm de diamètre. Deux jours après l'ensemencement, le tapis cellulaire à 50% de confluence est utilisé pour les mesures en microscopie de force atomique.

##### **B. Acquisition des données**

Les acquisitions ont été réalisées avec un microscope de force atomique MFP3D-Bio (Asylum Research Technology, Germany) à l'aide d'une pointe triangulaire en silice (MLCT, Bruker-Nano AXS). Préalablement à chaque mesure, et après avoir placé le laser au bout de la pointe, celle-ci est calibrée en réalisant une courbe de force sur le support de culture. La pente de la droite suivant l'entrée en contact avec le support est calculée, et permet de déterminer la constante de raideur de la pointe. L'ensemble des acquisitions a été réalisé à partir de pointe dont les constantes de raideur étaient comprises entre 12 et 16 pN/nm. Un schéma d'un microscope de force atomique est représenté en **figure 22A**.

Les propriétés mécaniques des cellules ont été étudiées par des acquisitions en mode Force-Volume, dont la fréquence a été fixée à 0,5Hz et la vitesse de déplacement de la pointe à  $10 \mu\text{m}/\text{seconde}$  sur environ  $20 \mu\text{m}$ . Chaque acquisition a été réalisée sur une surface de  $80 \times 80 \mu\text{m}$  avec une résolution de  $50 \times 50$  pixels, soit 2500 courbes de force pour chaque enregistrement. Lors des mesures, la culture est maintenue en RPMI1640 à température ambiante pendant au maximum 2 heures.

##### **C. Traitement des courbes de force**

Le traitement des données a été réalisé en collaboration avec le Dr. Charles Soussen et le Pr. David Brie de l'UMR 7039 CRAN. L'interprétation repose sur un algorithme sous MatLab permettant d'extraire les paramètres physico-chimiques des cellules de manière automatique.

Chaque acquisition génère une image de 50x50 pixels où chaque pixel correspond à une courbe de force. Ces dernières comportent deux phases : une phase d'approche (représentée en rouge sur la **figure 22B**) et une phase de retrait (représentée en bleu sur la **figure 22B**). Tant que la pointe n'est pas entrée en contact avec la surface, la courbe est une droite horizontale et représente la ligne de base. Lorsque le contact pointe-objet se fait, un changement de pente est observé sur la courbe, la pente étant spécifique de la rigidité de chaque objet. Lors de la phase de retrait, la pointe fait le trajet inverse jusqu'à perdre tout contact avec la surface, ce qui se caractérise par un retour à la ligne de base sur la courbe.

Au cours de ce travail, la partie d'approche des courbes a essentiellement été traitée selon le modèle de Sneddon dont la formule mathématique est :

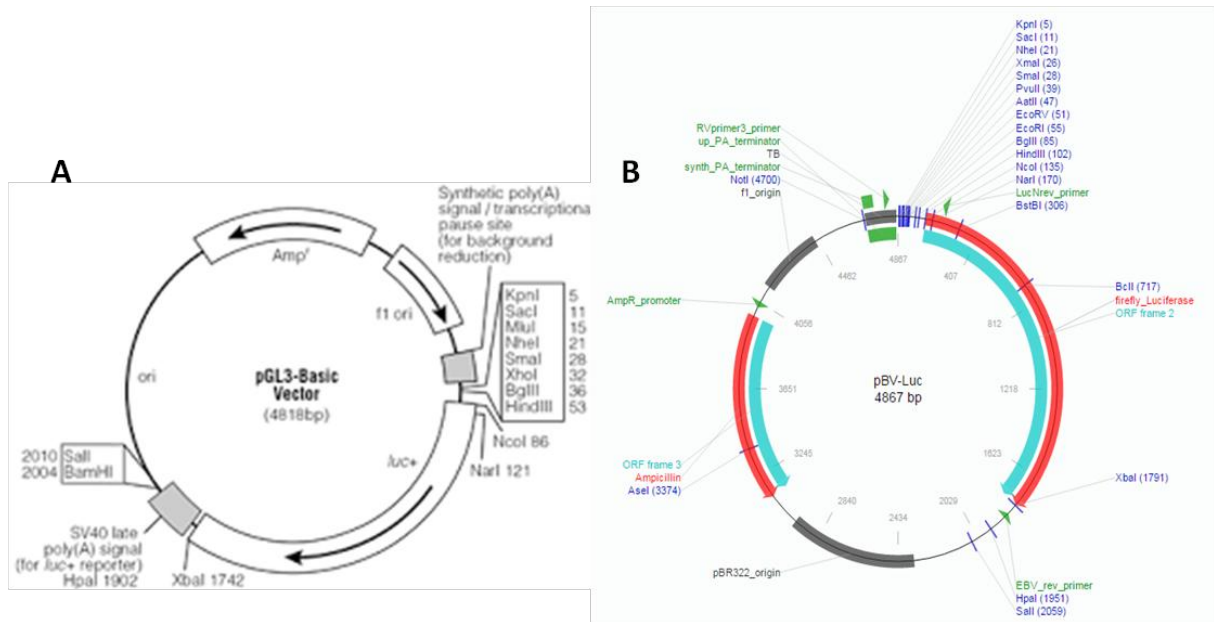
$$F = \frac{4E}{\pi(1-\nu^2)} \tan(\alpha) \delta^2$$

Ce modèle permet d'extraire le module d'Young E, caractéristique de la rigidité de la surface étudiée, en fonction de la force d'appui ou le changement de pente de la courbe d'approche F, du demi-angle de la pointe  $\alpha$ , de l'indentation  $\delta$  (profondeur de l'enfoncement de la pointe) et du coefficient de Poisson  $\nu$ , qui est propre au type de matériau étudié (dans notre cas il est égal à 0,33). Un autre paramètre a également été calculé : la force d'adhérence qui correspond au minimum de la courbe de retrait (**Figure 22B**). Le programme permet le traitement de la globalité de l'image. Afin de s'abstenir des valeurs propres au support de culture, les images sont ensuite segmentées, délimitant ainsi chaque cellule et permettant de ne conserver que les pixels les constituant. Ainsi, les valeurs présentées correspondent à la moyenne des mesures faites sur un minimum de 30 cellules entières.

#### D. Analyse topographique des cellules

Les acquisitions réalisées par microscopie de force atomique permettent également d'obtenir la topographie des cellules. En fonction de la réflexion du laser placé sur le bout de la pointe, des images de hauteur sont générées et permettent d'apprécier le relief de la surface. Les analyses de morphologie par AFM ne nécessitent aucun traitement informatique, puisqu'elles sont automatiquement réalisées au cours de chaque acquisition. Les images les plus représentatives de l'ensemble des acquisitions sont sélectionnées et sont passées en 3 dimensions grâce aux logiciels Asylum Research/Igor. Dans le même temps, une coupe





**Figure 23 : Représentation schématique des vecteurs utilisés dans les expériences de gène rapporteur.** Les éléments de réponse à la superfamille du TGFβ ont été intégrés dans deux types de plasmides, en amont du gène codant la luciférase *firefly*. Les éléments CAGA et BRE sont clonés dans le vecteur pGL3-Basic (A) entre les sites NheI et XhoI pour le site CAGA (Dennler et al., 1998) et par une coupure NheI pour le site BRE (Korchynskiy and ten Dijke, 2002). L'élément de réponse SBE est, quant à lui, cloné dans un vecteur pBV-Luc préalablement coupé au niveau du site SmaI (Zawel et al., 1998).

transversale est réalisée sur chaque image, représentant ainsi graphiquement le relief du tapis de cellules.

## V. Analyse de la distribution du cytosquelette d'actine

Les cellules tumorales mammaires sontensemencées en plaque 12 puits à raison de  $10^5$  cellules par puits, chaque puits contenant une lamelle de verre. Le lendemain de l'ensemencement, les cellules sont fixées dans du milieu de culture contenant 4% de paraformaldéhyde (PAF) pendant 30 minutes. Après un rinçage au PBS, les lamelles sont placées en chambre humide et une solution de PBS contenant 0,2% de Triton et 3% de BSA est déposée à leur surface pendant 30 minutes. Les cellules ainsi fixées et perméabilisées sont mises en présence de Phalloïdine couplée à l'Alexa 488 (Invitrogen), diluée 40 fois dans du PBS pendant 20 minutes, à l'abri de la lumière. Après plusieurs rinçages avec du PBS, les noyaux sont marqués grâce au Hoechst 33342 (Invitrogen), dilué 10000 fois dans du PBS. Les lamelles sont finalement montées sur lame dans un liquide préservant la fluorescence (FluorSave, CalbioChem) et protégées de la lumière. Le marquage est observé à l'objectif 100 à immersion d'un microscope à fluorescence équipé d'une caméra (Nikon80i) pour l'acquisition d'images.

## VI. Etude de l'influence de DDB2 sur la voie de signalisation du TGF $\beta$ 1

### A. Analyse de l'activité transcriptionnelle des Smads

#### 1. Caractéristiques des plasmides utilisés

L'influence de DDB2 sur l'activité transcriptionnelle des Smads a été étudiée par des expériences de gène rapporteur. Pour ce faire, deux vecteurs, dont les cartes sont représentées en **figure 23**, contenant le gène codant la luciférase *firefly* sous le contrôle de trois éléments différents de réponse aux Smads ont été utilisés:

- pGL3-(CAGA)<sub>12</sub> contenant 12 répétitions de l'élément CAGA, site de fixation des Smads 3 et 4, isolé à partir du promoteur du gène codant PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1), qui est un gène cible de la voie du TGF $\beta$ 1 (Dennler et al., 1998);

- pBV-(SBE)<sub>4</sub> correspond quant à lui à 4 répétitions d'une séquence palindromique GTCTAGAC fixant les Smads 3 et 4 *in vitro* (Zawel et al., 1998). L'élément de réponse ainsi créé est appelé SBE pour Smad Binding Element ;
- pGL<sub>3</sub>-(BRE)<sub>2</sub> contient plusieurs motifs, dont notamment 2 SBEs et 2 séquences palindromiques GGCGCC, répondant spécifiquement à une stimulation par les BMP et fixant les Smads 1, 5 et 4. Ce motif appelé BRE pour BMP Responsive Element, a été identifié au sein des promoteurs humain et murin du gène codant Id1 (Inhibitor of DNA Binding 1) (Korchynskyi and ten Dijke, 2002).

En parallèle, un vecteur d'expression pcDNA3.1, contenant la séquence codant Alk4 (Activin Like Receptor Kinase 4) a également été utilisé afin de vérifier la fonctionnalité de la construction pGL3-(CAGA). En effet, il a précédemment été montré que la surexpression du récepteur Alk4 engendrait une activation de l'élément CAGA (Mazerbourg et al., 2004).

L'ensemble de ces plasmides nous a gracieusement été donné par le Dr S. Mazerbourg (UMR 7039 CRAN, Nancy).

Afin de s'assurer de la bonne efficacité des transfections, un plasmide contenant le gène codant la luciférase *renilla* sous le contrôle du promoteur fort SV40 (pRL-SV40, Promega), a également été utilisé.

Ces vecteurs ont été amplifiés par transformation bactérienne d'une souche de DH5 $\alpha$  compétentes (Invitrogen), cultivée dans du milieu LB (Tryptone 10g/L, Extraits de Levure 5g/L et NaCl 10g/L) contenant 50mg/L d'ampicilline. Après 16 heures de culture à 37°C sous agitation, les bactéries sont centrifugées et l'ADN plasmidique est extrait grâce au kit HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen) en suivant les instructions du fabricant. L'ADN extrait est dosé au NanoDrop et déposé sur un gel d'agarose à 0,8% dans une solution de Tris Borate EDTA contenant 500ng/mL de bromure d'éthidium, afin de vérifier l'absence d'ADN génomique pouvant perturber la bonne efficacité des transfections.

## ***2. Transfection transitoire par un agent polycationique et traitement au TGF $\beta$ 1***

Les cellules MDA-MB231 et MCF7 sontensemencées à 1,5x10<sup>5</sup> cellules par puits en plaque 24 puits. Une quantité totale de 1 $\mu$ g de plasmide est transfectée aux cellules en utilisant le poly-éthylèneimine (JetPEI, PolyPlus Transfection), 2 heures après leur ensemencement. L'ADN plasmidique est préalablement incubé dans 150mM de NaCl

contenant 1/50<sup>ème</sup> d'agent de transfection pendant 30 minutes à température ambiante, avant d'être ajouté à la culture cellulaire.

Dans le but de contrôler l'efficacité de transfection, 2 plasmides différents sont transfectés dans les cellules : un portant le gène de la luciférase *firefly* sous le contrôle des différents sites de fixation aux Smads et l'autre celui de la luciférase *renilla* sous le contrôle d'un promoteur fort SV40. La quantité de ce 2<sup>e</sup> plasmide est 5 fois moins importante que celle du plasmide portant le gène de la luciférase *firefly*.

Les plasmides portant le gène de la luciférase *firefly* et celui codant Alk4 sont respectivement transfectés en quantité 5 et 4 fois supérieure à celle du plasmide contenant le gène de la luciférase *renilla*.

Seize heures après transfection, les cellules sont traitées avec 5ng/mL de TGFβ1 et/ou 400ng/mL de follistatine (Recombinant Human Follistatin 288, R&D systems) pendant 24 heures. Les puits sont lavés dans du D-PBS, puis aspirés. La plaque est ensuite congelée à -20°C jusqu'à révélation des activités luciférase.

### **3. Mesure des activités luciférase**

Les activités luciférase *firefly* et *renilla* sont mesurées à l'aide du kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) selon les instructions du fabricant. Brièvement, le tapis cellulaire est recouvert de tampon de lyse et la lyse s'effectue sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante. Les lysats sont récupérés et répartis en plaque 96 puits à fond blanc, à raison de 10µL par puits. La luminescence émise par la luciférase *firefly* est mesurée au lecteur de plaque Victor X (Perkin Elmer) immédiatement après ajout de 50µL d'une solution contenant son substrat. Après ajout de 50µL d'une solution inactivant la luciférase *firefly* et contenant le substrat de la luciférase *renilla*, l'activité de cette dernière est immédiatement mesurée de la même manière. Les résultats sont exprimés en activité luciférase relative, correspondant au rapport des valeurs d'unité relative de lumière (URL) de la luciférase *firefly* sur celles de la luciférase *renilla*.

## **B. Etude de la phosphorylation et de la translocation nucléaire des Smads**

### **1. Extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires**

Les cellules d'adénocarcinomes mammaires sontensemencées à 1,5x10<sup>5</sup> cellules/mL de milieu de culture en boîte de 10cm de diamètre et sont traitées avec 5ng/mL de TGFβ1 pendant 0,5, 4 ou 24 heures. En parallèle, une culture témoin est réalisée en présence de

10 $\mu$ M de SB-431542 (Sigma) pendant 24 heures, correspondant ainsi à une absence totale de stimulation de la voie de signalisation induite par le TGF $\beta$ 1.

Après un rinçage du tapis cellulaire avec du D-PBS, les cellules sont remises en suspension dans du D-PBS par grattage et centrifugées à 500 g à 4°C pendant 5 minutes. Le culot de cellules est resuspendu dans un tampon hypotonique contenant 10mM d'Hepes pH7,9, 10mM KCl, 0,1mM d'EDTA, 0,1mM d'EGTA, 1mM de DTT et 0,5mM de PMSF. Après 15 minutes d'incubation sur glace, 0,6% de détergent NP-40 est ajouté, puis la suspension est centrifugée à 2500g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et constitue la fraction cytoplasmique. Après deux lavages avec le tampon utilisé précédemment, le culot, composé quant à lui des noyaux, est repris dans un tampon Hepes 20mM pH7,9 contenant 0,4M de NaCl, 1mM d'EDTA et d'EGTA et 1mM de DTT et de PMSF. Après 30 minutes à 4°C sous agitation, les échantillons sont centrifugés à 14000g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant contenant les protéines nucléaires est récupéré. Les extraits de protéines cytoplasmiques et nucléaires sont ensuite dosés selon la méthode de Bradford, décrite dans le paragraphe II.B.1).

## ***2. Détection de la phosphorylation des Smads 2 et 3 par Western-Blotting***

Après leur dénaturation, 50 $\mu$ g de protéines cytoplasmiques et 25 $\mu$ g de protéines nucléaires sont séparés dans un gel d'acrylamide à 10% d'acrylamide, selon le protocole détaillé dans le paragraphe II.B.2). Les différentes étapes du Western blotting sont réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites plus haut. En revanche les anticorps primaires dirigés contre les Smads phosphorylées (P-Smad2 et P-Smad3), Smad2/3 total et Smad4 ont été dilués dans du TBS-Tween contenant 5% de BSA et non 2,5% de lait. Les anticorps anti  $\alpha$ -tubuline et HDAC1, servant respectivement d'invariants cytoplasmiques et nucléaires, ont quant à eux été utilisés dans les conditions classiques décrites précédemment.

Les protéines mises en évidence ayant toutes des poids moléculaires compris entre 52kDa et 70kDa, nous ont conduits à procéder à une étape de dé-hybridation des anticorps de la membrane, avant d'incuber celle-ci avec le suivant. Brièvement, suite à la détection immunologique, la membrane est rapidement rincée avec du TBS, puis mise en présence de la solution Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer (ThermoScientific) pendant 10 minutes sous agitation à température ambiante. Après un bref lavage avec du TBS, la membrane est à nouveau bloquée, puis incubée avec un anticorps primaire et secondaire.

## VII. Etude de l'interaction de protéines avec l'ADN par Immunoprécipitation de Chromatine (ChIP)

Pour cette technique, le kit commercial ChIP-IT Express (Active Motif) a été employé conformément aux instructions du fournisseur. La méthode implique trois grandes étapes : l'extraction de la chromatine, l'immunoprécipitation de celle-ci et enfin l'analyse par PCR en temps réel.

### A. Extraction de la chromatine

La première étape consiste à créer des pontages entre les protéines et l'ADN. Pour ce faire, les cellules, à 80% de confluence et préalablement traitées avec 5ng/mL de TGF $\beta$ 1 pendant 1 heure ou avec 10 $\mu$ M de SB-431542 pendant 24 heures, sont fixées avec 1% de formaldéhyde dilué dans du milieu de culture sans sérum pendant 8 minutes sous agitation à température ambiante. Après un rinçage au PBS, la fixation est arrêtée par ajout d'une solution de glycine pendant 5 minutes sous agitation. Les cellules sont remises en suspension par grattage dans du PBS contenant 500nM de PMSF et centrifugées 10 minutes à 1000g à 4°C.

Le culot est ensuite resuspendu dans un tampon de lyse comprenant 500nM de PMSF et 0,5% (v/v) d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC). La lyse s'effectue pendant 45 minutes sur glace et s'achève par la libération des noyaux par une homogénéisation dans un homogénéisateur de type Dounce (Active Motif). Les noyaux sont récupérés en centrifugeant les échantillons 10 minutes à 2500g à 4°C, et sont repris dans un tampon de digestion contenant 500nM de PMSF et 0,5% (v/v) de PIC. Un cocktail enzymatique composé d'endonucléases à 200U/mL est ajouté aux échantillons pendant 5 minutes à 37°C, permettant ainsi la digestion de la chromatine. La réaction est arrêtée en ajoutant 1mM d'EDTA et en plaçant les tubes sur glace pendant 10 minutes. La chromatine digérée est récupérée dans le surnageant après centrifugation à 20000g pendant 10 minutes à 4°C, et conservée à -80°C.

Avant de passer à l'immunoprécipitation, l'efficacité de la digestion est vérifiée et la chromatine fragmentée est dosée. Pour ce faire, 50 $\mu$ L de chromatine digérée sont prélevés, et subissent la réversion des pontages chimiques par ajout de 250mM de NaCl et incubation à 65°C pendant 4 heures. Suite à cela, les protéines sont digérées par ajout de 5 $\mu$ g de Protéinase K (Sigma). L'action de la Protéinase K est stoppée par ajout d'un volume de phénol : chloroforme (1:1). Après centrifugation, la phase aqueuse est collectée, à laquelle 1/10

d'Acétate de Sodium et 2,5 volumes d'éthanol absolu sont ajoutés. Après une nuit à -20°C, l'ADN précipité est centrifugé à 15000g, puis lavé dans de l'éthanol 70% et séché avant d'être repris dans 30µL d'eau stérile, puis dosé au NanoDrop (ThermoScientific). Cette fraction d'ADN purifié constitue un témoin positif de chromatine non immunoprécipitée, appelé « input ».

### **B. Immunoprécipitation de la chromatine**

L'immunoprécipitation est réalisée à partir de 14µg de chromatine digérée et 2µg d'anticorps, répertoriés dans le tableau 2, dilués dans un tampon fourni par le kit en présence de 25µL de billes magnétiques couplées à la protéine G. La chromatine subit également une immunoprécipitation par 2µg d'une Immunoglobuline G non spécifique, permettant ainsi d'apprécier le bruit de fond. Après une incubation d'une nuit à 4°C sur un agitateur rotatif, les complexes fixés par les billes magnétiques sont lavés trois fois avec un tampon de lavage et resuspendus dans 100µL de tampon d'élution. La réversion des pontages chimiques est réalisée par un chauffage à 65°C pendant 4 heures et les protéines sont dégradées par l'action de 5µg de Protéinase K (Sigma) à 37°C pendant 2 heures.

L'analyse par PCR en temps réel nécessite une purification de la chromatine immunoprécipitée au phénol : chloroforme (1:1). La précipitation se fait à -20°C sur la nuit dans de l'éthanol 70% contenant 100mM d'Acétate de Sodium et 30µM de glycogène. Après un lavage à l'éthanol 70% et un séchage, l'ADN immunoprécipité et purifié est repris dans 30µL d'eau stérile.

### **C. Analyse par PCR quantitative en temps réel**

Les conditions utilisées reprennent globalement celles décrites dans le paragraphe II.A.2), exceptée la quantité d'ADN. Dans ce contexte, l'amplification est réalisée à partir de 3µL de chromatine immunoprécipitée. Une gamme standard est également élaborée à partir des « inputs » avec 120, 12, 1,2, 0,12 et 0,012 ng d'ADN. La PCR est réalisée dans le thermocycleur iCycler Opticon2 (Biorad) selon le programme suivant : 3 minutes à 95°C, puis 40 cycles se décomposant en 20 secondes à 95°C, 15 secondes à la température d'hybridation des amorces (Tableau 2) et 15 secondes à 72°C. Le programme s'achève par la génération d'une courbe de fusion, permettant de s'assurer de la spécificité du couple d'amorces.

Les résultats sont exprimés comme l'enrichissement en chromatine par rapport au bruit de fond. La méthode de calcul prend en compte les valeurs de Ct des

immunoprécipitations avec un anticorps spécifique, auxquelles sont retranchés les Ct du bruit de fond obtenu grâce à une immunoprécipitation avec un IgG, (Ct(IP)-Ct(IgG)). Le facteur d'enrichissement correspond à  $E^{-(Ct(IP)-Ct(IgG))}$ , où E est l'efficacité de la PCR.

## VIII. Analyse de la Transition épithélio-mésenchymateuse spontanée

### A. Par cytométrie en flux

Afin de préserver l'intégrité des protéines transmembranaires, le tapis cellulaire est décollé à l'aide d'une solution de PBS contenant 0,2% d'EDTA pendant 10 minutes à 37°C. Les cellules sont centrifugées et resuspendues à 10 millions de cellules/mL de PBS. La première étape consiste à incuber un million de cellules en présence de 1µg d'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt (E-cadhérine) pendant 30 minutes à 4°C. Après un lavage au PBS, un anticorps secondaire, à raison de 0,5µg par million de cellules, reconnaissant la partie constante du premier anticorps et couplé à un fluorochrome (Alexa 488) est placé sur la suspension cellulaire pendant 20 minutes à 4°C et à l'abri de la lumière. Pour fixer les liaisons anticorps-épitopes, le culot de cellules marquées est fixé avec du PBS contenant 1% de paraformaldéhyde pendant 20 minutes sur glace, puis remis en suspension dans du PBS. La quantification des cellules marquées est réalisée par cytométrie en flux (FACSCalibur ; BD Biosciences) à l'aide du logiciel CellQuest. La fluorescence est quantifiée sur 20 000 événements et les résultats sont présentés comme la valeur moyenne relative d'intensité de fluorescence de trois expériences indépendantes.

### B. Par cytoimmunofluorescence

Les cellules cultivées sur des lamelles en verre sont fixées dans du milieu de culture contenant 4% de paraformaldéhyde. L'épitope reconnu par l'anticorps étant extracellulaire, les sites aspécifiques sont bloqués sans perméabilisation membranaire à l'aide d'un tampon phosphate contenant 3% de BSA. Dans cette même solution bloquante, l'anticorps primaire est dilué, selon une dilution optimale déterminée au préalable et répertoriée dans le tableau 4, et mis au contact des cellules pendant 45 minutes à température ambiante. Après 3 lavages successifs avec du PBS, un anticorps secondaire, reconnaissant la partie constante du premier anticorps et couplé au fluorochrome Alexa594, dilué 100 fois dans la solution bloquante est placé sur les lamelles pendant 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Après



3 nouveaux lavages, la dernière étape consiste à marquer les noyaux à l'aide de Hoechst 33342 (Invitrogen) dilué 10000 fois dans du PBS. Finalement, les lamelles sont montées sur lames dans un liquide de montage (FluorSave, Calbiochem) préservant la fluorescence. Les marquages sont observés à l'objectif 100 à immersion d'un microscope à épifluorescence équipé d'une caméra (Nikon80i) pour l'acquisition d'images.

## **IX. Mesure de la sécrétion de facteurs de croissance par ELISA**

### **A. Collecte des milieux conditionnés**

Les cellules d'adénocarcinomes mammaires MDA-MB231 et MCF7 sont ensemencées en plaque 6 puits, à raison de  $5 \times 10^5$  cellules par puits. Une fois la culture à confluence, le milieu est changé. Dans le cas du dosage du TGF $\beta$ 1 sécrété, le tapis cellulaire est lavé deux fois avec du D-PBS avant d'ajouter du milieu RPMI1640 sans sérum. Pour le dosage de l'activine A, les cellules sont cultivées dans du DMEM contenant ou non 5ng/mL de TGF $\beta$ 1. Après 48 heures, le milieu de culture est collecté et centrifugé à 300g, afin d'éliminer les cellules flottantes, et est conservé à -80°C. En parallèle, le tapis cellulaire est remis en suspension par une solution de trypsine et les cellules sont comptées grâce au compteur de cellules TC20 (Biorad). Après centrifugation, le culot cellulaire est lavé puis conservé à -80°C.

### **B. Test ELISA**

Les dosages de TGF $\beta$ 1 et d'activine A sécrétés dans le milieu de culture ont été réalisés respectivement à l'aide des kits TGF $\beta$ 1 Emax<sup>TM</sup> ImmunoAssay System (Promega) et Quantikine<sup>®</sup> ELISA Human Activin A Immuoassay (R&D systems), selon les instructions du fabricant.

#### **1. Dosage du TGF $\beta$ 1**

La quantité de TGF $\beta$ 1 sécrété est dosée à partir d'un test ELISA en sandwich. Dans un premier temps, un anticorps monoclonal spécifique du TGF $\beta$ 1 dans une solution contenant 25mM de NaHCO<sub>3</sub> et de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, est fixé au fond des puits d'une plaque 96 puits. Après une étape de blocage avec une solution bloquante fournie dans le kit, les échantillons dilués 4 fois dans le tampon d'incubation sont mis en présence des anticorps pendant 1h30min à température ambiante sous agitation. En parallèle, une gamme standard de TGF $\beta$ 1 (de

15,6pg/mL à 1000pg/mL) est réalisée, et placée de la même manière au contact des anticorps. Après 5 lavages avec un tampon Tris-HCl 20mM pH 7,6 contenant 150mM de NaCl et 0,05% de Tween-20, un second anticorps, polyclonal, et également spécifique du TGF $\beta$ 1 est ajouté pendant 2 heures à température ambiante sous agitation. Ce second anticorps est reconnu par un troisième, au niveau de sa région Fc, qui est couplé quant à lui à la peroxydase. L'ensemble est révélé en bleu, après addition du substrat de la peroxydase (TMB Solution). La réaction est finalement arrêtée par ajout d'acide chlorhydrique 1N, et l'absorbance est lue à 450nm à l'aide d'un lecteur de plaque (Victor X, Perkin Elmer).

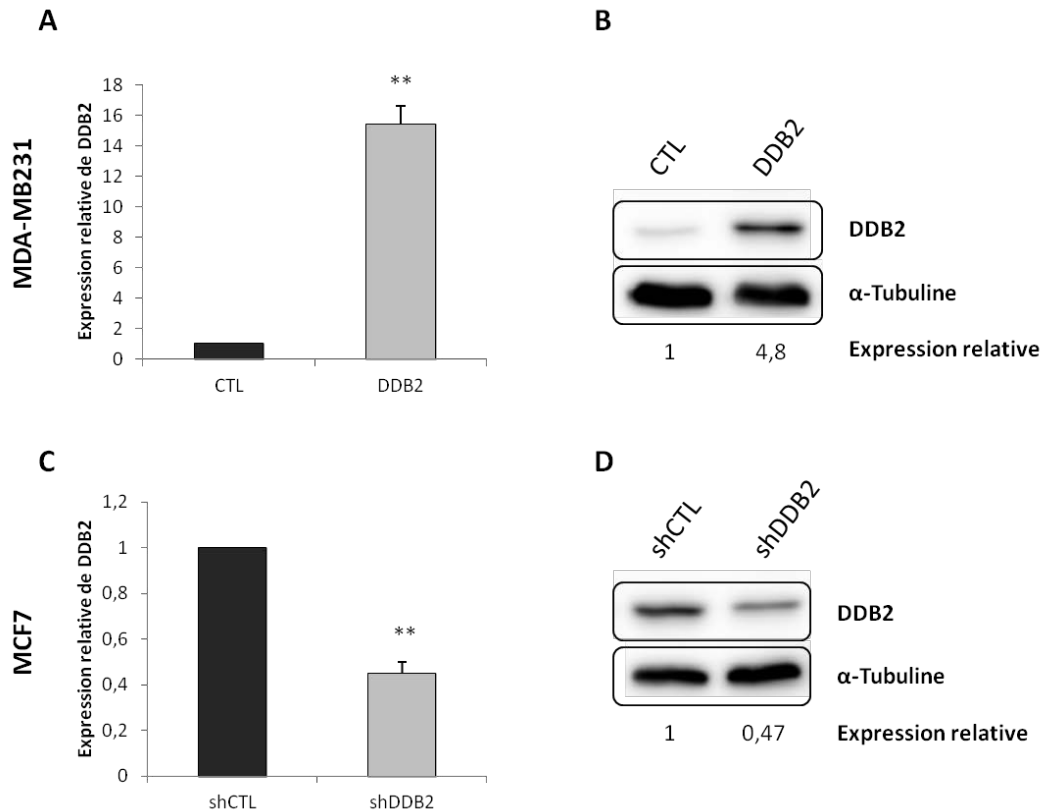
## **2. Dosage de l'activine A**

Ce test repose également sur un test ELISA en sandwich et le déroulement est similaire au précédent. De la même manière, la première étape a consisté à fixer le premier anticorps sur le fond des puits d'une plaque 96 puits. Dans ce cas, les puits sont couverts de streptavidine permettant de fixer l'anticorps primaire couplé à la biotine. L'utilisation d'un système streptavidine-biotine nous a contraints à changer le milieu de culture classique RPMI1640, contenant 0,2mg/L de biotine, par du DMEM ne contenant pas de biotine. Les échantillons non dilués sont placés au contact des anticorps pendant 3 heures à température ambiante sous agitation. Une gamme standard de 15,6pg/mL à 1000pg/mL d'activine A est également réalisée. Après 6 lavages avec le tampon fourni, le second anticorps spécifique de l'activine A et couplé à la peroxydase est ajouté pendant 1 heure à température ambiante. Comme décrit précédemment, le substrat de la peroxydase est ajouté, et la réaction est arrêtée par ajout d'acide chlorhydrique. L'absorbance à 450nm est lue grâce au lecteur de plaque Victor X (Perkin Elmer).

## **X. Analyses statistiques**

Les résultats présentés correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes. Ils sont représentés par la valeur moyenne  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne (SEM). Les analyses statistiques sont réalisées en comparant, pour chaque type cellulaire, la lignée exprimant faiblement DDB2 (MDA-MB231 CTL ou MCF7 shDDB2) à celle l'exprimant fortement (MDA-MB231 DDB2 ou MCF7 shCTL) en utilisant le test *t* de Student. Pour chaque comparaison, la valeur de *p* est calculée et les résultats sont considérés statistiquement significatif à partir de  $p < 0,05$ .

# RESULTATS



**Figure 24 : Analyse de l'expression de DDB2 dans les lignées cancéreuses mammaires MDA-MB231 et MCF7. Par RT-PCR quantitative (A et C).** Les cellules MDA-MB231 (A et B) ont été transfectées de manière stable avec un plasmide vide (CTL) ou portant l'ADNc qui code DDB2 (DDB2). Les MCF7 (C et D), quant à elles, ont été infectées de façon stable par des particules lentivirales contenant des ARN interférents non spécifiques (shCTL) ou ciblant l'ARN messager qui code DDB2 (shDDB2). Le niveau d'expression de DDB2 est normalisé par l'expression de deux gènes de référence : UBB et RPLPO et rapporté à celui des cellules contrôles de chaque lignée. **Par Western-Blotting (B et D).** L'expression protéique de DDB2 est étudiée par Western-Blot sur des extraits de protéines totales de MDA-MB231 (B) ou de MCF7 (D). L' $\alpha$ -tubuline révèle l'homogénéité des dépôts. La quantification est faite par la densitométrie des bandes rapportées à celle de la tubuline. Le niveau d'expression de DDB2 est normalisé par celui des cellules contrôles de chaque lignée. Les résultats représentés correspondent à la valeur moyenne de trois expériences indépendantes  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$

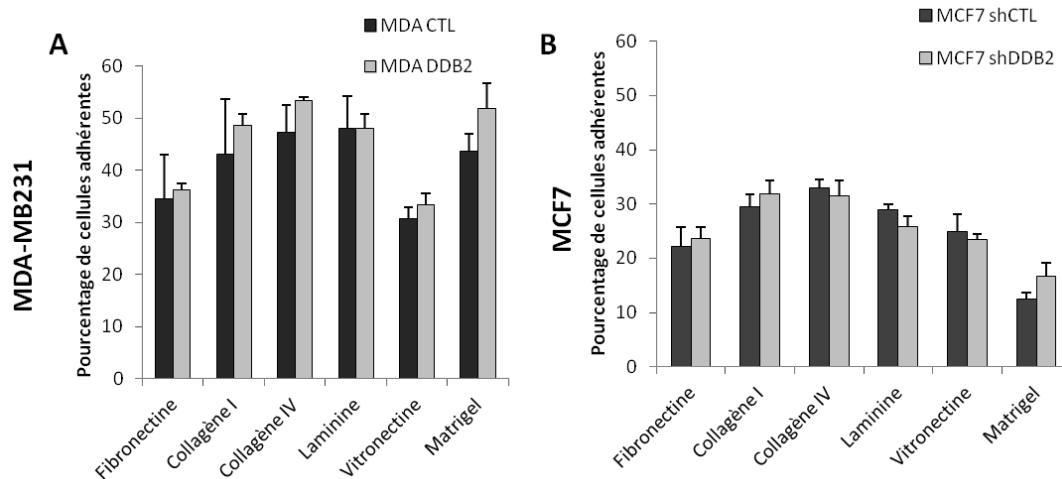
## I. Influence de la protéine **Damaged-DNA Binding 2 (DDB2)** sur les propriétés d'adhérence cellulaire

Le premier objectif de ce travail de thèse a consisté à évaluer le rôle de DDB2 dans les propriétés d'adhérence des cellules tumorales mammaires. Des études précédentes réalisées au laboratoire ont en effet montré que l'expression de la protéine DDB2, dans les cellules tumorales mammaires, était associée à une baisse de leurs capacités migratrices et invasives. Ces propriétés s'acquérant par d'importantes modifications des capacités d'adhérence, nous avons émis l'hypothèse que ces dernières pouvaient être également affectées par l'expression de DDB2.

### A. Résultats préliminaires

Dans cette étude, deux lignées d'adénocarcinomes mammaires ont été utilisées : les MDA-MB231 et les MCF7. Les premières exprimant faiblement DDB2 naturellement, un modèle de surexpression a été établi en les transfectant avec la séquence codant cette protéine (Kattan et al., 2008a) (Ennen et al., 2013). A l'inverse, les MCF7 expriment fortement DDB2 et son expression a été inhibée par interférence à l'ARN en infectant les cellules avec des particules lentivirales qui contiennent des shARN (small hairpin ARN) ciblant l'ARNm codant DDB2 (MCF7 shDDB2). Les cellules contrôles ont été infectées avec des particules lentivirales contenant des shARN non spécifiques (MCF7 shCTL). Le niveau d'expression de DDB2 est analysé par RT-PCR en temps réel et par Western-Blotting (**Figure 24**). Les MDA DDB2 expriment 15 fois plus le gène codant DDB2 que les cellules MDA CTL, tandis que les cellules MCF7 shDDB2 l'expriment 2 fois moins que les MCF7 shCTL. Ces résultats sont confirmés par l'étude de l'expression protéique de DDB2, qui révèle une surexpression d'un facteur 5 dans les MDA-MB231 DDB2 et une inhibition de 50% dans les MCF7 shDDB2. Ces deux modèles cellulaires ont été retenus pour l'ensemble du travail.

Dans le but d'étudier les propriétés d'adhérence des cellules tumorales mammaires, des tests d'adhérence ont été effectués, et ont permis d'apprécier l'affinité des cellules à adhérer à différents supports tels que le verre, le plastique ainsi que sur différentes protéines matricielles. De manière surprenante, les résultats obtenus révèlent que l'adhérence des cellules tumorales mammaires sur les deux supports neutres est significativement diminuée lorsqu'elles surexpriment la protéine DDB2. Par contre, la surexpression de DDB2 ne conduit pas à des différences significatives dans l'adhérence préférentielle des cellules MDA-MB231



**Figure 25 : Influence de DDB2 sur les propriétés d'adhérence des cellules cancéreuses mammaires.** Les cellules sont ensemencées dans des puits préalablement recouverts ou non par différentes protéines de la matrice extracellulaire (Fibronectine, Collagènes I et IV, Laminine, Vitronectine et Matrigel). Après 30 minutes à 37°C, les cellules sont lavées puis fixées. Les cellules ayant adhéré aux différents substrats sont colorées au crystal violet, et le pourcentage de cellules adhérentes est calculé par rapport à la quantité totale de cellules déposées. Les résultats correspondent aux valeurs moyennes  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne de 4 expériences indépendantes réalisées sur les lignées MDA-MB231 (A) et MCF7 (B).

aux collagènes I et IV, à la laminine ou au matrigel (**Figure 25**). De même, l'inhibition de l'expression de DDB2 ne modifie pas significativement l'adhérence préférentielle des cellules MCF7 aux collagènes I et IV (**Figure 25**). Ces résultats démontrent donc des changements principalement lors d'interactions non spécifiques des cellules sur leur support et pourraient en partie s'expliquer par des modifications de la plasticité et la composition de la membrane plasmique des cellules. Ainsi, une approche, utilisant la microscopie de force atomique a permis de mesurer de manière précise les propriétés nanomécaniques de la membrane plasmique des cellules tumorales selon l'expression de DDB2. Ces expériences indiquent que les cellules ne présentent pas de variations morphologiques significatives en fonction du niveau d'expression de DDB2. Néanmoins, une baisse de l'élasticité des membranes est observée dans les cellules exprimant DDB2. Nous avons également pu mettre en évidence une baisse de la force d'adhérence à la pointe de l'appareil dans ces mêmes cellules. La pointe du microscope de force atomique a une composition neutre qui peut être assimilée à la composition du verre. Ainsi, ces résultats confirment les données obtenues lors des tests d'adhérence des cellules sur les surfaces neutres. Dans le but de comprendre, la baisse de l'élasticité observée, nous avons étudié la distribution du cytosquelette d'actine par une coloration à la phalloïdine observée en microscopie à épifluorescence. Les cellules tumorales mammaires exprimant pas ou peu DDB2 (MCF7 shDDB2 et MDA CTL) présentent un réseau d'actine corticale sous membranaire dense comparées aux cellules exprimant DDB2 (MCF7 shCTL et MDA DDB2+). Enfin, les modifications des propriétés d'adhérence cellulaire pouvant être reliée à des modulations de gènes spécifiques, nous avons donc réalisé une analyse par PCR-Array, ciblant spécifiquement des gènes impliqués dans la régulation des propriétés d'adhérence des cellules. Même si de nombreux gènes ont effectivement leur niveau d'expression modulé en fonction de celui de DDB2, seuls ceux codant le TGF $\beta$ 1, le CTGF et ICAM-1 sont communs aux deux lignées cellulaires.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats révèle que l'expression de DDB2 dans les cellules tumorales mammaires induit une baisse de l'adhérence des cellules sur des supports neutres. Ces modifications d'adhérence sont associées à une baisse de l'élasticité membranaire, à un réarrangement du cytosquelette d'actine corticale et des différences dans le profil d'expression de gènes impliqués dans ces processus.

*Les résultats de cette première partie font l'objet d'un article actuellement en révisions dans Nanoscale (soumis en juillet 2015).*

## B. DDB2 (DAMAGED-DNA BINDING 2) protein: a new modulator of nanomechanical properties and cell adhesion of breast cancer cells

Claire Barbieux<sup>1,2</sup>, Jalal Bacharouche<sup>3,4</sup>, Charles Soussen<sup>1,2</sup>, Angéline Razafitianamaharavo<sup>5,6</sup>, Rémi Klotz<sup>1,2</sup>, Rémi Pannequin<sup>1,2</sup>, David Brie<sup>1,2</sup>, Philippe Bécuwe<sup>1,2</sup>, Grégory Francius<sup>3,4\*</sup> and Stéphanie Grandemange<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Lorraine, Centre de Recherche en Automatique de Nancy, CRAN, UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France.

<sup>2</sup> CNRS, Centre de Recherche en Automatique de Nancy, CRAN, UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France.

<sup>3</sup> Université de Lorraine, Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, LCPME, UMR 7564, Villers-lès-Nancy, F-54600, France.

<sup>4</sup> CNRS, Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, LCPME, UMR 7564, Villers-lès-Nancy, F-54600, France.

<sup>5</sup> Université de Lorraine, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, LIEC, UMR 7360, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54500, France.

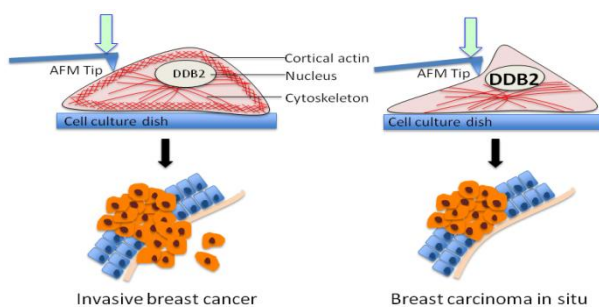
<sup>6</sup> CNRS, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, LIEC, UMR 7360, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54500, France.

\* Corresponding authors:

Email: [stephanie.grandemange@univ-lorraine.fr](mailto:stephanie.grandemange@univ-lorraine.fr) and [gregory.francius@univ-lorraine.fr](mailto:gregory.francius@univ-lorraine.fr)

### Graphical abstract

The decrease of invasiveness in DDB2 expressing breast cancer cell lines is associated with a decrease of cell adhesion, cell stiffness and cytoskeleton reorganization.



### Abstract



DDB2, known for its role in DNA repair, was recently shown to reduce mammary tumor invasiveness by inducing the transcription of *IκBα*, an inhibitor of NF-κB activity. Since cellular adhesion is a key event during the epithelial to mesenchymal transition (EMT) leading to the invasive capacities of breast tumor cells, the aim of this study was to investigate the role of DDB2 in this process. Thus, using low and high DDB2-expressing MDA-MB231 and MCF7 cells, respectively, in which DDB2 expression was modulated experimentally, we showed that DDB2 overexpression was associated with a decrease of adhesion abilities on glass and plastic area of breast cancer cells. Then, we investigated cell nanomechanical properties by atomic force microscopy (AFM). Our results revealed significant changes in the Young's Modulus value and the adhesion force in MDA-MB231 and MCF7 cells whether DDB2 was expressed or not. The cell stiffness decrease observed in MDA-MB231 and MCF7 expressing DDB2 was correlated with a loss of the cortical actin-cytoskeleton staining. To understand how DDB2 regulates these processes, an adhesion-related gene PCR-Array was performed. Several adhesion-related genes were differentially expressed according to DDB2 expression, indicating that important changes are occurring at the molecular level. Thus, this work demonstrates that AFM technology is an important asset to follow cellular changes during tumorigenesis. Moreover, our data revealed that DDB2 is involved in early events occurring during metastatic progression of breast cancer cells and will contribute to define this protein as a new marker of metastatic progression in this type of cancer.

**Keywords:**

Breast cancer cells, DDB2, Metastatic cells, Atomic Force Microscopy, Adhesion, Stiffness and Adhesion Force

## Introduction

Due to the high incidence and mortality rate of metastatic breast cancers, it is critical to understand the mechanisms behind metastasis formation. The invasive potential of cancer cells is often associated with different modifications such as morphology, adhesion to extracellular matrix, cytoskeleton organization and cell-to-cell interaction. However, molecular mechanisms involved in the invasive potential of cancer cells are not fully understood. Recently, increasing evidence point out the fact that the protein Damaged DNA Binding 2 (DDB2), originally known for its role in nucleotide excision repair after UV-DNA damages, plays an important role in breast cancer growth by a transcriptional regulation of target genes (Minig et al., 2009b)(Ennen et al., 2013)(Roy et al., 2013)(Zhao et al., 2014). DDB2 is constitutively overexpressed in non invasive breast cancer cells, whose proliferation increases by inhibiting the transcription of *sod2* gene encoding the manganese superoxide dismutase and prevents the acquisition of invasive properties by upregulating *I $\kappa$ B* gene expression which leads to a lower NF- $\kappa$ B activity (Ennen et al., 2013). In parallel, Roy and colleagues have shown that DDB2 overexpression prevented the epithelial to mesenchymal transition (EMT) of aggressive colon cancer cells. Indeed, DDB2 was found to be bound on the promoter of several genes encoding EMT-inducing factors (Roy et al., 2013), leading to a decrease of their expression. EMT is a key event in invasiveness of cancer cells as well as in tumor progression toward metastasis (De Craene and Berx, 2013). In accordance with these data, the expression of DDB2 was inversely correlated with the highest colon or breast tumor grade.

The Atomic Force Microscopy (AFM) approach has been widely used in biological research, particularly in cancer research area (Polyakov et al., 2011)(Lin et al., 2007)(Sirghi et al., 2008). This technology allows to get topographic information by scanning cell surfaces on their natural support as well as to measure cell adhesion forces. During tumorigenesis, cells are subjected to several modifications and differ from normal cells in terms of growth, morphology, adhesion to extracellular matrix, cytoskeleton organization and cell-to-cell interaction. Most of these changes are associated with particular mechanical properties of cell membranes that can be measured by AFM. In cancer research, AFM has been mainly used for exploratory research on cancer cell morphology (Canetta et al., 2014), cell elasticity (Lekka et al., 2012a) or to explore the real-time changes in the ultrastructure of the cell membrane following drug interactions (Cross et al., 2011). In addition, a recent study by Xu et al. demonstrates that cell stiffness, determined by AFM measurement, could be a potential

biomarker of ovarian cancer cells (Xu et al., 2012). Indeed, cell stiffness not only discriminates ovarian cancer cells from non-malignant cells but also distinguishes between high and low tumorigenic invasive cancer cells. In Accordance with this work, Plodinec et al. have shown in Nature Nanotechnology that breast cancer biopsies have a particular stiffness profile compared to normal tissues as attested by AFM measurements (Plodinec et al., 2012). Thus stiffness measurements by AFM could be an interesting tool in clinical diagnosis as well as in fundamental research.

EMT and cell invasiveness are associated with modifications of cancer cell adhesion by loss of epithelial characteristics including cell polarity and cell-cell contact. In this context, we hypothesize that DDB2 could play a role in mechanical and adhesion properties of breast cancer cells. Thus, using AFM technology, we demonstrate that the nuclear DDB2 protein modulates cell adhesion by i) strongly affecting the nanomechanical properties of breast tumor cells; ii) promoting a remodeling of the cortical actin-cytoskeleton; iii) inducing changes in the adhesion-related gene expression.

## **Materials and Methods**

### **1.1. Cell culture, transfection and infection**

Two human breast cancer cell lines, MCF7 and MDA-MB231 were purchased from European Collection of Cell Culture. Cells were grown in RPMI 1640 without phenol red (Gibco) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, 1% penicillin/ streptomycin and 2mM L-Glutamine at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. As described previously (Ennen et al., 2013), MCF7 cells, derived from non metastatic breast adenocarcinoma and expressing constitutively high level of DDB2, were infected with lentiviral particles containing either small hairpin RNA targeting DDB2 (MCF7 DDB2-) to inhibit DDB2 expression, or a nontargeting control sequence (MCF7 DDB2+), and puromycin resistance gene for selection (Santa Cruz). Infected cells were selected by puromycin treatment (1µg/mL) for 72 hours. MDA-MB231 cells, derived from metastatic breast adenocarcinoma and expressing low level of DDB2, were stably transfected with pcDNA3(+) expression vector containing the cDNA encoding DDB2 (MDA DDB2+) or not (MDA DDB2-), using Jet PEI reagent (PolyPlus Transfection), as described previously (Minig et al., 2009b). Resistant cells to 400 µg/ml G418 were isolated and screened for DDB2 expression by RT-qPCR and Western Blot analysis. Two days before AFM acquisition, cells were seeded at 8x10<sup>4</sup> cells/mL in a 10 cm<sup>2</sup> dish. At 50% confluency, acquisitions were done on adherent living cells maintained in RPMI 1640 medium.

### **1.2. Western blot analysis**

Cells were harvested, rinsed with ice-cold PBS and lysed into 10mM Tris-HCl buffer pH 7.4 containing 5mM EDTA, 1% Triton X-100 and protease inhibitors. After centrifugation, the total protein concentrations of supernatants were determined according to Bradford protein assay, using bovine serum albumin as a standard (Biorad). A total protein (50µg) was run on SDS-polyacrylamide gels according to Laemmli and transferred onto a PVDF membrane. After blocking with milk (5%) in 60mM Tris buffer containing 150mM NaCl and Tween (0.1%) (TBS-Tween), immunoblot analysis was then carried out by incubating membranes with either rabbit polyclonal antibody anti-DDB2 (Abcam) or rabbit monoclonal antibody anti  $\alpha$ -tubulin (Abcam) diluted in TBS-Tween containing 2.5% milk. After washings, bands corresponding to DDB2 or tubulin were detected using an anti-IgG polyclonal antibody conjugated to peroxydase and diluted in TBS-Tween containing 2.5% milk, and were visualized with a ChemiDoc system (Biorad) after exposition to a chemiluminescent substrate. Band intensities were quantified by densitometry with QuantityOne software (Biorad). Relative DDB2 expression was the result of the ratio between densitometry corresponding to DDB2 on tubulin.

### 1.3. Cell adhesion assay

Cells were seeded at  $2.5 \times 10^4$  per well in a 96 well-plate which was previously coated with either fibronectin (10µg/cm<sup>2</sup>), collagens I and IV (20µg/cm<sup>2</sup>), laminin (4µg/cm<sup>2</sup>), vitronectin (0.2µg/cm<sup>2</sup>) or matrigel (10.5µg/cm<sup>2</sup>) in PBS containing Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>. A control was done, corresponding to the ability of cells to adhere on plastic or glass coverslip in PBS Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>. After 30 min (or 1.5 hours for cell adhesion on glass) at 37°C, adherent cells were washed with PBS Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>, then fixed in paraformaldehyde 4% before to be stained with Crystal Violet 0.1% in ethanol 0.4%. After staining, adherent cells were resuspended in 10% acetic acid during 10 min and quantified by reading absorbance at 595 nm using a microplate reader (Perkin Elmer). For each cell line, the percentage of adherent cells for each condition was calculated as mean percentages of control values corresponding to the 100% seeded and stained cells.

### 1.4. Measurements of elastic modulus by AFM nanoindentation

Force measurements were carried out using a MFP3D-BIO instrument (Asylum Research Technology, Atomic Force F & E GmbH, Mannheim, Germany). The nanoindentation method provides the Young's modulus calculated from the force vs. indentation curve. Triangular cantilevers were purchased from Bruker (MLCT, Bruker-nano

AXS, Palaiseau, France). The spring constants of the cantilevers measured using the thermal noise method were calculated in the range of 12- 16 pN/nm. Experiments were performed in RPMI 1640 medium at room temperature. Maps of mechanical properties (FVI for Force Volume Image) were obtained by recording a grid map of 50-by-50 force curves at different locations of 80  $\mu\text{m}$   $\times$  80  $\mu\text{m}$  on the Petri dish surface containing at least six cells. The maximum loading force was 5 nN. Maps of mechanical and adhesive properties and the corresponding histograms (statistical distribution) were estimated from the analysis of the approach curves according to the Sneddon model (1):

$$F = \frac{4E}{\pi(1-\nu^2)} \text{Tan}(\alpha)\delta^2$$

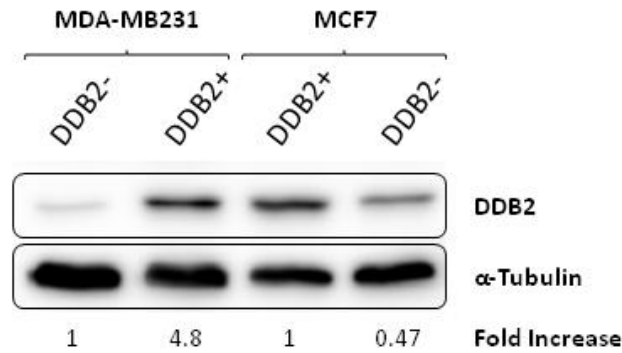
where  $E$  is the Young modulus,  $\delta$  is the indentation depth,  $\nu$  the Poisson coefficient and  $\alpha$  the semi-top angle of the apex of the AFM-tip. FVI were performed at 0.5 Hz scan rate and with maximal loading/pulling speed of about 10  $\mu\text{m/s}$ . Then they were analyzed by means of an automatic Matlab algorithm described elsewhere (Polyakov et al., 2011). Briefly, the physicochemical parameters involved in (1) are estimated from the raw data using a nonlinear regression procedure. The method used is based on advanced tools for “segmenting” the force curves i.e., automatically detecting the tip-to-surface contact point with accuracy.

### 1.5. Actin cytoskeleton staining

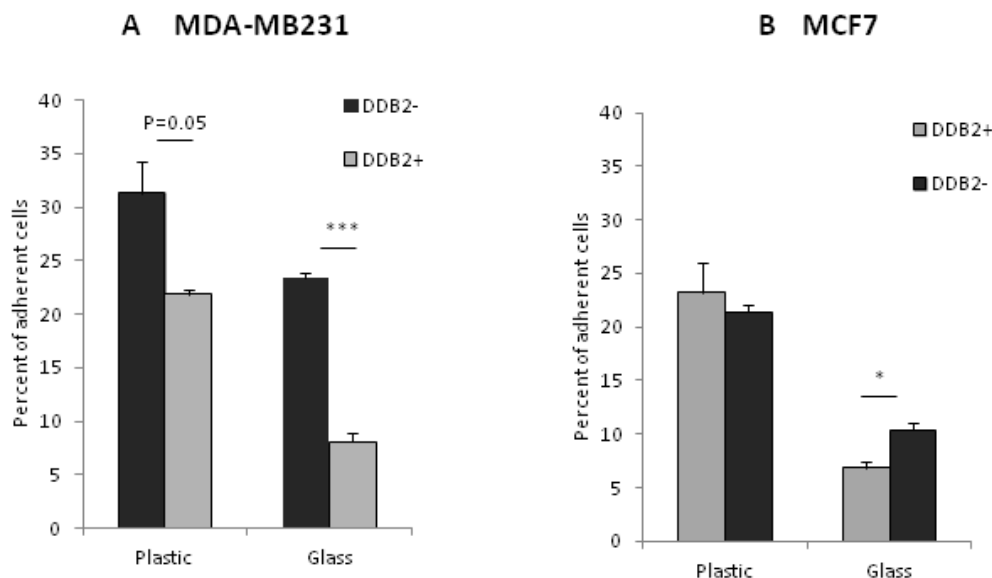
Cells were harvested on glass coverslips in 12-well plate. MCF7 and MDA-MB231 cells were seeded at  $10^5$  and  $1.5 \times 10^5$  cells per well, respectively. Twenty hours after seeding, cells were fixed with paraformaldehyde 4% at room temperature. Then, cells were blocked and permeabilized with PBS containing 3% BSA and 0,2% Triton X-100 during 20 minutes. Actin cytoskeleton was stained with Alexa Fluor 488 phalloidin (Invitrogen) diluted at 1:50 in PBS at room temperature in the darkness. After three washes with PBS, nuclei were stained with Hoechst 33342 (Invitrogen) diluted at 1:10000 in PBS. Coverslips were mounted in antifading medium (FluorSafe, Merck) and observed with an epifluorescent microscope Eclipse 80i equipped with x100 objective (Nikon). Images were collected with a digital camera (Nikon80i) after the same time exposure for each cell line.

### 1.6. PCR Array

Expression level of 84 adhesion-related genes was evaluated by a quantitative PCR Array (Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array, Qiagen) and



**Figure 1: DDB2 expression level in MDA-MB231 and MCF7 breast cancer cell lines.** MDA-MB231 cells were transfected stably with an empty vector (MDA DDB2-) or a plasmid containing DDB2 gene (MDA DDB2+). MCF7 cells were infected with lentiviral particles containing a plasmid expressing a shRNA control (MCF7 DDB2+) or a shRNA directed against DDB2 (MCF7 DDB2-). DDB2 expression was analyzed by Western blot with 50 µg of total protein from each cells. The density of each band was measured and compared with the density of tubulin bands used as loading control. Results are presented as the fold increase or decrease over control cells fixed to 1 and correspond to the mean value of three independent experiments.



**Figure 2: Correlation between DDB2 expression and loss of adhesion abilities on culture areas of breast cancer cells.** (A) Number of adherent MDA-MB231 and (B) MCF7 cells onto plastic and glass was estimated by cell adhesion assay. For each substrate, DDB2 + cells (grey bars) were compared with DDB2- cells (black bars). Results are expressed as the percent of adherent cells from total cells and are presented as a mean value of 3 independent experiments ± SEM. Differences between DDB2+ and DDB2- cells were statistically significant for \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

compared to 5 housekeeping genes. RNAs were extracted from 70-80% confluent cells with ReliaPrep RNA Miniprep columns (Promega) according to manufacturer's instructions without modifications. Their quantity and quality were determined spectroscopically using a nanodrop 2000c (Thermo Scientific, France). Reverse transcription was performed using 1µg of RNA with RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen), according to manufacturer's recommendations. Quantitative PCR was conducted using diluted cDNA in RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermix (Qiagen). PCR reactions were run on the iCycler real-time PCR instrument (Opticon 2, Bio-Rad), according to the manufacturer instructions. Specificity of the products was assured by melting curve analysis. The relative transcript level, based on cycle threshold (Ct), was quantified by calculating the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Briefly, the  $2^{-\Delta Ct}$  was obtained by calculating the  $2^{-Ct}$  value for each adhesion-related gene and normalized with average of the  $2^{-Ct}$  value of housekeeping genes. The  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  was finally obtained by dividing the  $2^{-\Delta Ct}$  in DDB2 overexpressing cells ( $2^{-\Delta Ct}_{DDB2+}$ ) by the  $2^{-\Delta Ct}_{DDB2-}$  in low DDB2 expressing cells, and that for each adhesion-related gene. This ratio was lower than 1 for gene repression and conversely, higher than 1 for gene overexpression in DDB2 overexpressing cells.

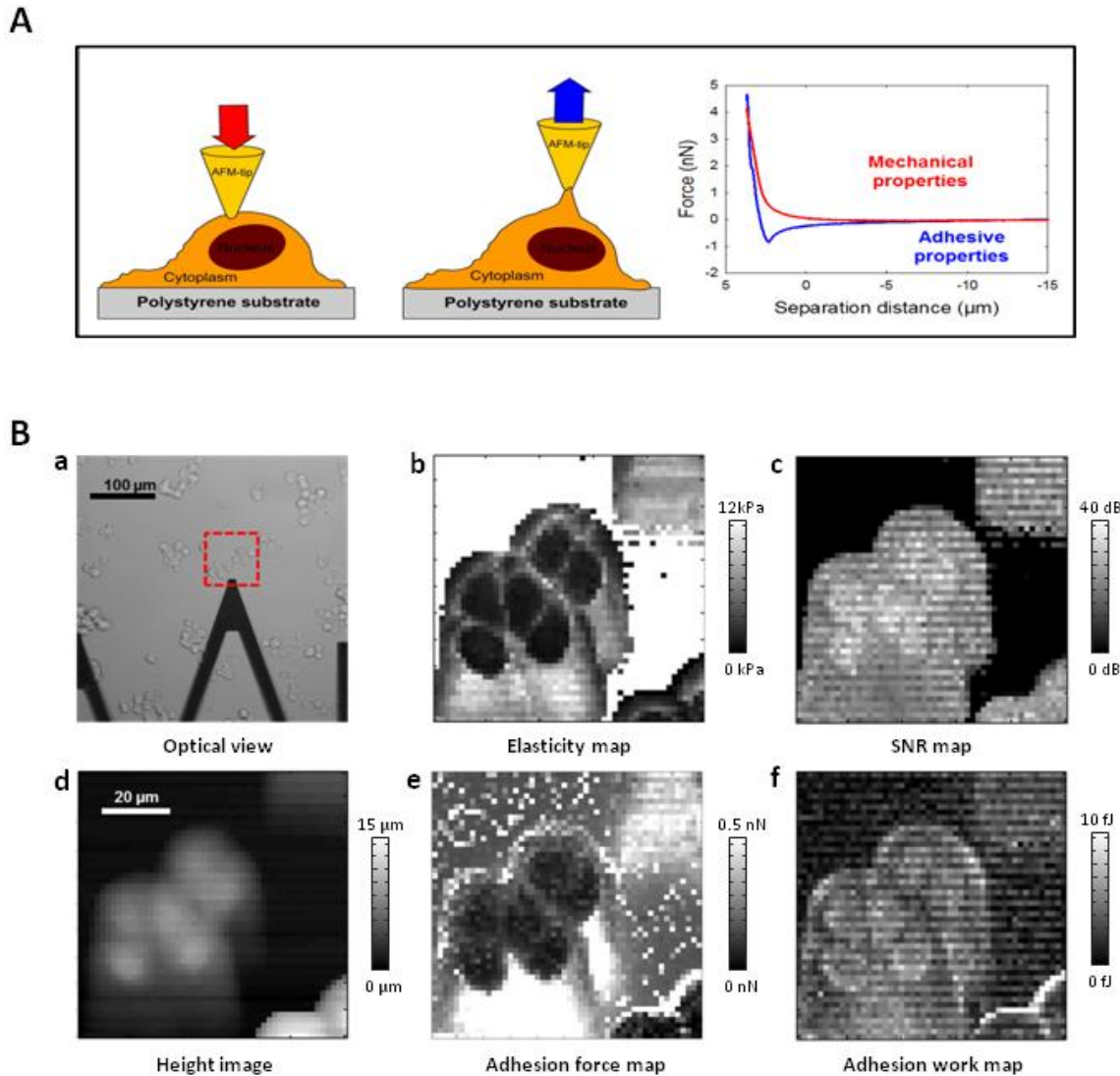
### 1.7. Statistical Analysis

All results are represented as mean value  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed by using Student's *t* test which compared DDB2- *versus* DDB2+ cells for each cell line (MDA-MB231 and MCF7). Statistically significant results were represented as follows: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 2. Results and discussion

### 2.1. DDB2 expression in breast cancer cells correlates with a loss of adhesion properties.

Since migration and invasiveness are closely linked to cell adhesion modifications, we focused on the ability of DDB2 protein to modulate adhesion properties in breast cancer cell lines expressing or not DDB2. To do so, two cell lines were used: MDA-MB231 cells expressing an empty vector (MDA DDB2-) *versus* cells expressing the cDNA encoding DDB2 protein (MDA DDB2+) and MCF7 cells stably transfected with a scramble shRNA (MCF7 DDB2+) *versus* cells stably transfected with shRNA targeting DDB2 mRNA (MCF7 DDB2-). As shown in Figure 1, DDB2 expression was increased by 4.8-fold in MDA DDB2+ in contrast to MDA DDB2-, while it was reduced by 2.1-fold in MCF7 DDB2- in contrast to MCF7 DDB2+.



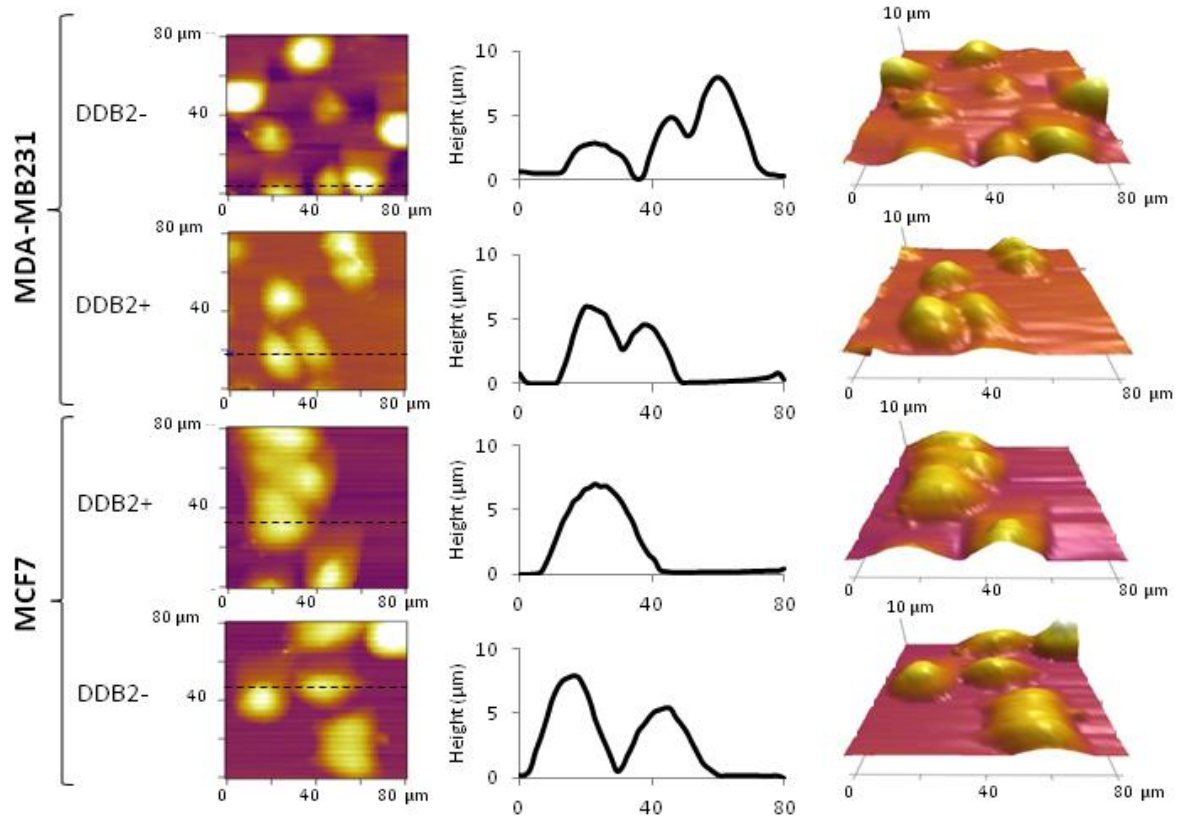
**Figure 3: Principle of AFM measurements and related data.** The upper panel (A) represents applied methods for AFM force-volume acquisitions in the approach (left) and retraction (center) phases. The right subfigure shows representative force curves. The lower panel (B) displays each image reconstructed after some acquisition. (a) Optical view of cell monolayer. (d) Height map representing the cell topography. The other subfigures represent maps of the physico-chemical parameters extracted using the signal processing software. The Young modulus (b) is obtained in the approach phase whereas the force (e) and work of adhesion (f) are estimated in the retraction phase. (c) Signal-to-noise ratio (SNR), a factor of confidence of the reconstructed values of Young's modulus shown in (b). For pixels laying in the cell regions, most of SNR values are greater than 25dB, which means that the force curve analysis (nonlinear regression algorithm) is reliable, and the related values of the Young modulus are then accurate.



As DDB2 protein was shown to negatively control the migratory and invasive abilities of breast cancer cell lines by positively regulating the *IκBα* gene expression, we hypothesized that DDB2 expression could also be associated with some modifications of cell adhesion. Thus we measured adhesion properties of MDA DDB2+ cells *vs* control MDA DDB2- cells as well as MCF7 DDB2- cells *vs* control MCF7 DDB2+ cells by counting adherent cells on different substrates including glass, plastic, and several extracellular matrix proteins (fibronectin, collagen I and IV, laminin and vitronectin). The number of adherent cells on neutral support, such as plastic and glass, was significantly decreased in MDA DDB2+ cells as compared to MDA DDB2- cells (Figure 2A). Conversely, a significant increase in the number of adherent cells was only observed on glass support for MCF7 DDB2- cells compared with MCF7 DDB2+ cells (Figure 2B). No significant differences in the adhesion of cells on extracellular matrix proteins were observed for both cell lines (data not shown). Thus, DDB2 leads to modifications in the adhesion properties of breast cancer cells that we attempted to link to physico-chemical modifications of cellular plasma membrane, as already reported (Sun et al., 2007).

## **2.2. DDB2 expression is associated with changes in physical and mechanical properties of breast cancer cell plasma membrane.**

Modifications in physical and mechanical properties of plasma membrane are related to different cellular processes such as adhesion to extracellular matrix, cell-to-cell interaction but also in tumorigenesis (Müller and Dufrêne, 2011)(Suresh, 2007). Thus, AFM experiments were performed in order to quantify the mechanical and adhesion properties of the cells overexpressing or not DDB2, as illustrated in Figure 3, Table 1 and 2. Mechanical properties were extracted from the approach force curves (red lines in Figure 3A) by using Sneddon's model whereas the adhesion forces between the cell and AFM-tip were measured from the analysis of the retraction force curves (blue lines in Figure 3A). In addition, the force-volume mode of the AFM was used to spatially perform resolved grid of  $50 \times 50$  force curves on surfaces of  $80 \times 80 \mu\text{m}^2$  to entirely scan several cells as illustrated in Figure 3B. The analysis of spatially resolved force curves allows the construction of several maps of topography (Figure 4), elasticity, adhesion and cells work's adhesion. So the cell physical properties can be quantified and correlated to their specific location with high resolution, *e.g.* elasticity or adhesion values can be attributed to both the nucleus and the cytoplasm. This point is very

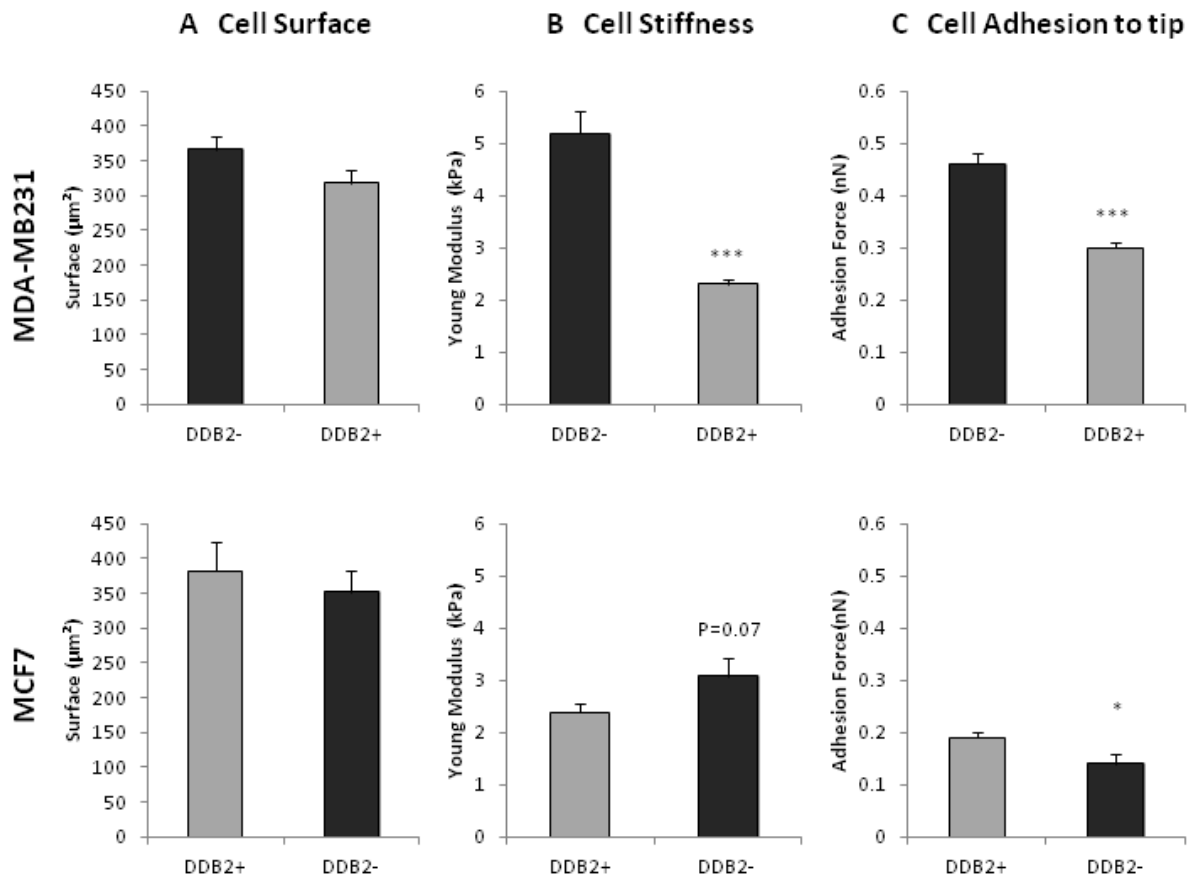


**Figure 4: Height-map cell morphologies are not affected after the modulation of DDB2 expression.** Height maps obtained by AFM measurements are shown. Pictures (left column) result from a scan of 80x80 μm with a resolution of 50x50 pixels. The dotted line identifies the section realized in middle graphs. The right column displays the same picture in three dimensions. Several acquisitions have been performed and most representative pictures were selected.

important since Young's modulus and adhesion forces calculated on cell surface depend on intracellular structures, such as the cytoskeleton, the presence of underlying organelles (Roduit et al., 2009), as well as cell membrane glycoproteins (Roduit et al., 2008), that contribute to the stiffening/adhesion properties of the cell surface (Tschaharganeh et al., 2014)(Guilak et al., 2000). Furthermore, AFM measurements are the most suitable technique to investigate and quantify *in-situ* the physico-chemical properties of the whole living cells under physiological conditions without any treatment, contrary to fluorescence and others microscopies (Kuznetsova et al., 2007)(Lekka et al., 2012b).

The analysis of cell morphology depicted in Figure 5A (upper panel) shows that MDA-MB231 cells are characterized by an average surface area of about 367 and 319  $\mu\text{m}^2$  expressing or not DDB2, respectively. In the case of MCF7 cells (Figure 5A, lower panel), an average surface area of 352 and 382  $\mu\text{m}^2$  is evaluated for the spreading cells in which DDB2 is repressed or not, respectively. These results point out that the modulation of DDB2 expression is not associated with morphological differences neither in MDA-MB231 nor in MCF7 cells.

The statistical analysis of cell stiffness and adhesion to tip measured by AFM and described in Figure 5 B and C shows important variations when DDB2 is overexpressed. In Figure 5B, cell stiffness decreased from 5 to 2 kPa and from 3 to 2.5 kPa for MDA-MB231 and MCF7 cells, respectively, when DDB2 is expressed. However the effect was more intense in MDA-MB231 cells as compared to MCF7. This could be due to the stronger differential expression level of DDB2 in MDA DDB2- *versus* MDA DDB2+ cells compared to MCF7 DDB2+ *versus* MCF7 DDB2- as indicated in figure 1. Thus these data point out that the expression of DDB2, known to be correlated with an inhibition of the migratory and invasiveness properties of breast cancer cells, is associated with a decrease of the cell stiffness. Interestingly, some previous works highlighted a negative correlation between invasiveness and stiffness in different types of cancer cells (Cross et al., 2007)(Xu et al., 2012)(Baker et al., 2010). Nevertheless, experimental conditions need to be considered. For example, cell indentation performed in the perinuclear region of individual cell could lead to extremely different results in contrast to entirely scanned cells. Moreover, culture conditions could also lead to opposite effect as well as if stiffness measurements are realized on living or fixed cells (Corbin et al., 2015). Indeed, support adhesion processes are associated with multiple modifications of biophysical characteristics of plasma membrane (such as plasma membrane glycoprotein expression/activation, cytoskeleton reorganization and physical



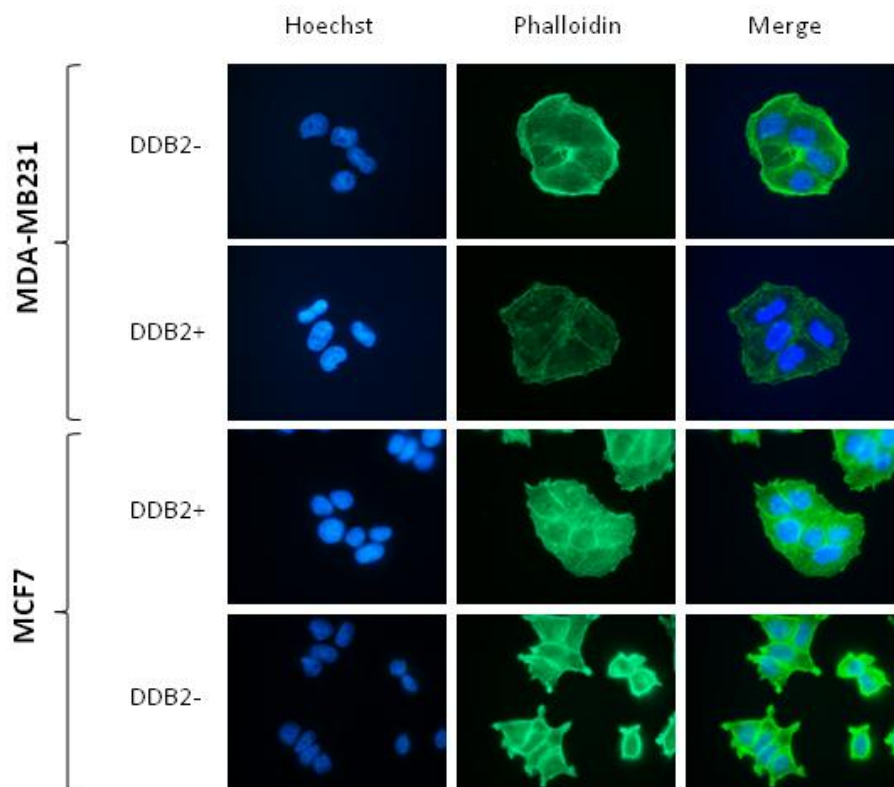
**Figure 5: Nanomechanical properties of breast cancer cells according to the DDB2 expression level.** From the left to the right, the surface, the Young’s Modulus value and the adhesion force for MDA-MB231 and MCF7 cells are presented. Low-DDB2 expressing cells (DDB2-) are represented with black bars and DDB2 expressing cells (DDB2+) are represented with grey bars. These physico-chemical parameters were figured out from at least 29 cells (see Tables 1 and 2). Data are represented as the average value  $\pm$  SEM from 3 independent experiments and are indicated statistically significant for \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

interaction with extra-cellular matrix proteins). In this sense, a study from Teng and colleagues has shown that the adhesion of cells on different extra-cellular matrix compounds is associated with Young's modulus modifications (Baker et al., 2010)(Teng et al., 2012). In contrast, the stiffness was increased when the modulation of myoferlin and SV40T expression was associated with an increase of the cell invasiveness (Rathje et al., 2014)(Volakis et al., 2014). Interestingly, membrane stiffness analysis was done between the nucleus and the most peripheral border of the normal cells *versus* SV40T expressing cells to avoid the underlying nucleus rigidity. Furthermore, a recent paper from Wu and colleagues, revealed that a treatment of lung carcinoma cells with TGF $\beta$ 1, which is known to induce EMT (Zarzynska, 2014)(Massagué, 2012), was associated with an increase in the cell stiffness and adhesion force (Wu et al., 2014).

To evaluate changes in cell surface adhesion, we measured the cellular adhesive force that depends on the mechanical properties of the existing adhesive molecules into the plasma membrane. In figure 5C, a significant decrease in the adhesion to tip was observed in breast tumor cells expressing DDB2: from 0.46 nN in MDA DDB2- to 0.3nN in MDA DDB2+ cells) and 0.19nN in MCF7 DDB2+ to 0.14nN in MCF7 DDB2- cells. These results are in agreement with the cell adhesion measurement to plastic and glass support presented in figure 2. Indeed, these two different experiments demonstrate a significant decrease of the adhesion properties of DDB2 expressing cells.

The cytoskeleton organization, depending mainly on the actin network, is a common indicator of cell stiffness (Collinsworth et al., 2002)(Buckley et al., 2012). To verify the organization of the actin cytoskeleton, actin network was stained using phalloidin and observed by fluorescence imaging (Figure 6). A drop in actin staining, particularly in the cortical area under the plasma membrane was observed in DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells in contrast to MDA-MB231 DDB2- cells. Conversely and in accordance with these results, we observed a higher staining of cortical actin cytoskeleton in DDB2-downregulated MCF7 cells than in control MCF7 that expressed DDB2. Since F-actin is closely linked to the cellular morphology and to the mechanical properties of cells, these data could thus explain that DDB2 expressing cells (MDA-MB231 and MCF7) are less stiff than DDB2-low expressing cells, as indicated above (Figure 5).

### **2.3. DDB2 expression is associated with modification of adhesion-related gene expression.**



**Figure 6: Reorganization of cortical actin-cytoskeleton according to the DDB2 expression in breast cancer cells.** After the fixation of MDA-MB231 and MCF7 cells expressing or not DDB2, nuclei and F-actin filaments were stained with Hoechst and Phalloidin, respectively. Cells were observed by epifluorescence microscopy and images from nuclei (left images) and cytoskeleton (middle images) were merged (right images). These pictures are representative of at least three independent experiments (magnification x1000).

To better understand molecular mechanisms that could lead to DDB2-dependent changes in adhesion of breast cancer cells, we performed a PCR array including 84 different adhesion-related genes and 5 housekeeping genes in breast cancer cell lines expressing or not DDB2 (Table 3). We observed changes in the expression of several genes according to DDB2 expression as reported in Table 3 A & B). Among 84 adhesion-related genes analyzed, only 14 of them were modulated when DDB2 was overexpressed in MDA-MB231 cells (MDA DDB2+). Most of them were downregulated, except for ICAM1 and SELL which were significantly upregulated in MDA DDB2+ cells. Concerning the analysis of MCF7 cells, 20 out of 84 genes analyzed were modulated when DDB2 expression was inhibited, and only 6 were downregulated in MCF7 DDB2+ compared to MCF7 DDB2- cells (Table 3A and B). Probably due to the different phenotype between the epithelial MCF7 cells and mesenchymal MDA cells, only 3 common genes, ICAM1 (intracellular adhesion molecule 1), CTGF (connective tissue growth factor) and TGF $\beta$ 1 (transforming growth factor beta 1), were modulated similarly in both cell lines, suggesting that DDB2 would modulate adhesion-related gene expression in a cell specific manner.

CTGF, TGF $\beta$ 1 and ICAM1 genes are known to be largely implicated in adhesion as well as invasion and migration of tumor cells. Indeed, CTGF expression seems to be associated with a poor prognosis in breast cancers and its overexpression has been linked to an increase of migratory properties of breast cancer cells (Chien et al., 2011)(Xie et al., 2001). Furthermore, TGF $\beta$ 1 is a potent secreted factor that drives cancer progression. While it is known to act as tumor suppressor by inhibiting epithelial cell proliferation, it plays a key role in breast tumor progression toward metastasis by inducing EMT and invasive properties *in vitro* (Kubiczkova et al., 2012)(Barcellos-Hoff and Akhurst, 2009)(Padua and Massagué, 2009). Both TGF $\beta$ 1 and CTGF have been shown to be associated with an increase of bone and pulmonary metastasis formation *in vivo* (Mourskaia et al., 2009)(Chien et al., 2011). CTGF being a TGF $\beta$ 1 responsive gene, we may speculate that the downregulation of this gene is related to DDB2-dependent TGF $\beta$ 1 gene downregulation in breast cancer DDB2+ cells (Grotendorst et al., 1996). However, even if growing evidence show that DDB2 is acting as a transcriptional regulator, its direct involvement in regulation of such adhesion-related gene expression needs to be further investigated.

Finally, our data highlighted that both DDB2+ cell lines expressed higher ICAM1 mRNA levels. Interestingly, the role of this gene in cancer cells is quite controversial. It has been shown that the downregulation of ICAM1 could be associated with a decrease of breast

A

Downregulated genes in MDA-MB231 DDB2+			
Gene abbreviation	Fold Change	SEM	p value
COL5A1	0.18	0.06	0.005
COL6A1	0.34	0.05	0.014
VCAN	0.10	0.03	0.023
<b>CTGF</b>	<b>0.52</b>	<b>0.12</b>	<b>0.023</b>
FN1	0.32	0.08	0.006
ITGA2	0.55	0.10	0.026
ITGA6	0.54	0.09	0.032
ITGB4	0.40	0.06	0.013
MMP1	0.37	0.14	0.025
SPP1	0.34	0.09	0.014
<b>TGFBI</b>	<b>0.20</b>	<b>0.05</b>	<b>0.001</b>
TNC	0.52	0.17	0.048
Upregulated genes in MDA-MB231 DDB2+			
<b>ICAM1</b>	<b>2.39</b>	<b>0.26</b>	<b>0.001</b>
SELL	3.70	1.54	0.025

B

Downregulated genes in MCF7 DDB2+			
Gene abbreviation	Fold Change	SEM	p value
<b>CTGF</b>	<b>0.41</b>	<b>0.00</b>	<b>0.018</b>
ITGA1	0.51	0.01	0.002
SELE	0.31	0.10	0.012
SELL	0.56	0.00	p<0.001
SGCE	0.20	0.00	p<0.001
<b>TGFBI</b>	<b>0.51</b>	<b>0.03</b>	<b>0.003</b>
Upregulated genes in MCF7 DDB2+			
CD44	3.70	0.32	p<0.001
COL16A1	2.41	0.08	p<0.001
COL6A2	2.11	0.10	0.003
ECM1	3.29	1.14	0.024
<b>ICAM1</b>	<b>3.18</b>	<b>0.08</b>	<b>p&lt;0.001</b>
ITGA5	2.08	0.22	0.002
ITGAL	1.93	0.29	0.005
ITGAM	2.18	0.12	0.001
KAL1	2.93	0.71	0.011
MMP8	1.96	0.44	0.047
NCAM1	2.77	0.18	p<0.001
SPARC	1.89	0.67	0.044
TIMP2	2.06	0.17	0.003
TNC	1.86	0.40	0.019

**Table 1: Changes in the adhesion-related gene expression according to DDB2 expression.** A PCR Array targeting 84 adhesion and extracellular matrix related genes was performed, using total RNA extracted from cells. Quantification of each gene expression level was based on cycle threshold and a fold change between MDA-MB231 (A) and MCF7 (B) DDB2+ and DDB2- cells. Genes are downregulated or upregulated, when the ratio is lower or higher than 1, respectively in DDB2 overexpressing cells, in contrast to the DDB2- cells. Fold changes are presented as a mean value  $\pm$  SEM of three independent experiments. Differences between DDB2+ and DDB2- cells for differentially expressed genes are statistically significant for p<0.05, p<0.01, and p<0.001.



cancer invasion (Rosette et al., 2005). However, other studies have reported an opposite effect of ICAM1 in tumorigenesis, by associating its expression with a relatively good prognosis in breast cancers (Ogawa et al., 1998)(Donadio et al., 2002)(Donadio et al., 2002)). They have shown that a decrease in the ICAM1 expression was associated with breast tumor cell dissemination, favoring development of metastases in order to escape from immune surveillance (Mukai et al., 1999). Consistent with all these data, our results showing the downregulation of CTGF and TGF $\beta$ 1 expression and the upregulation of ICAM1 are in accordance with previous data showing a higher proliferative rate, an inhibition of the migratory and invasive properties as well as a better outcome of colon and breast cancers overexpressing DDB2 (Kattan et al., 2008a)(Ennen et al., 2013)(Roy et al., 2013).

Moreover, the decrease in the cell stiffness observed in DDB2+ cells could be related to the downregulation of some adhesion related genes in MDA DDB2+ cells such as those encoding the integrin isoforms ITGA2, ITGA6 and ITGB4 (Table 3). Integrins are transmembrane proteins well known for their role as adhesion molecules by interacting with extracellular matrix but also by acting on actin cytoskeleton organization and transduction of intracellular signal regulating many cellular functions such as proliferation, migration and invasion (Huttenlocher and Horwitz, 2011). Integrins are linked to the actin cytoskeleton *via* a scaffold protein complex under the plasma membrane (DeMali et al., 2003)(Delon and Brown, 2007)(Galbraith et al., 2007). Thus, the cytoskeletal reorganization observed in DDB2 expressing cells compared to their counterparts could be related to the decrease in the expression of integrins, as referred in Table 3.

Finally, the modulation of cellular adhesive force and adhesion properties in cells expressing or not DDB2 could also be explained by the modification of membrane proteins and other relative amounts of adhesive compounds as it was assessed by Cross *et al.* (Cross et al., 2008) and Pi *et al.* (Pi et al., 2014). In this sense, DDB2 has been involved in the induction of the epithelial to mesenchymal transition in colon cancer (Roy et al., 2013) associated with modulation of specific adhesion markers such as E-cadherin and N-cadherin. Interestingly, these adhesive markers have already been related to stiffness and adhesion force in breast cancer cells (Omidvar et al., 2014).

### 3. Conclusion

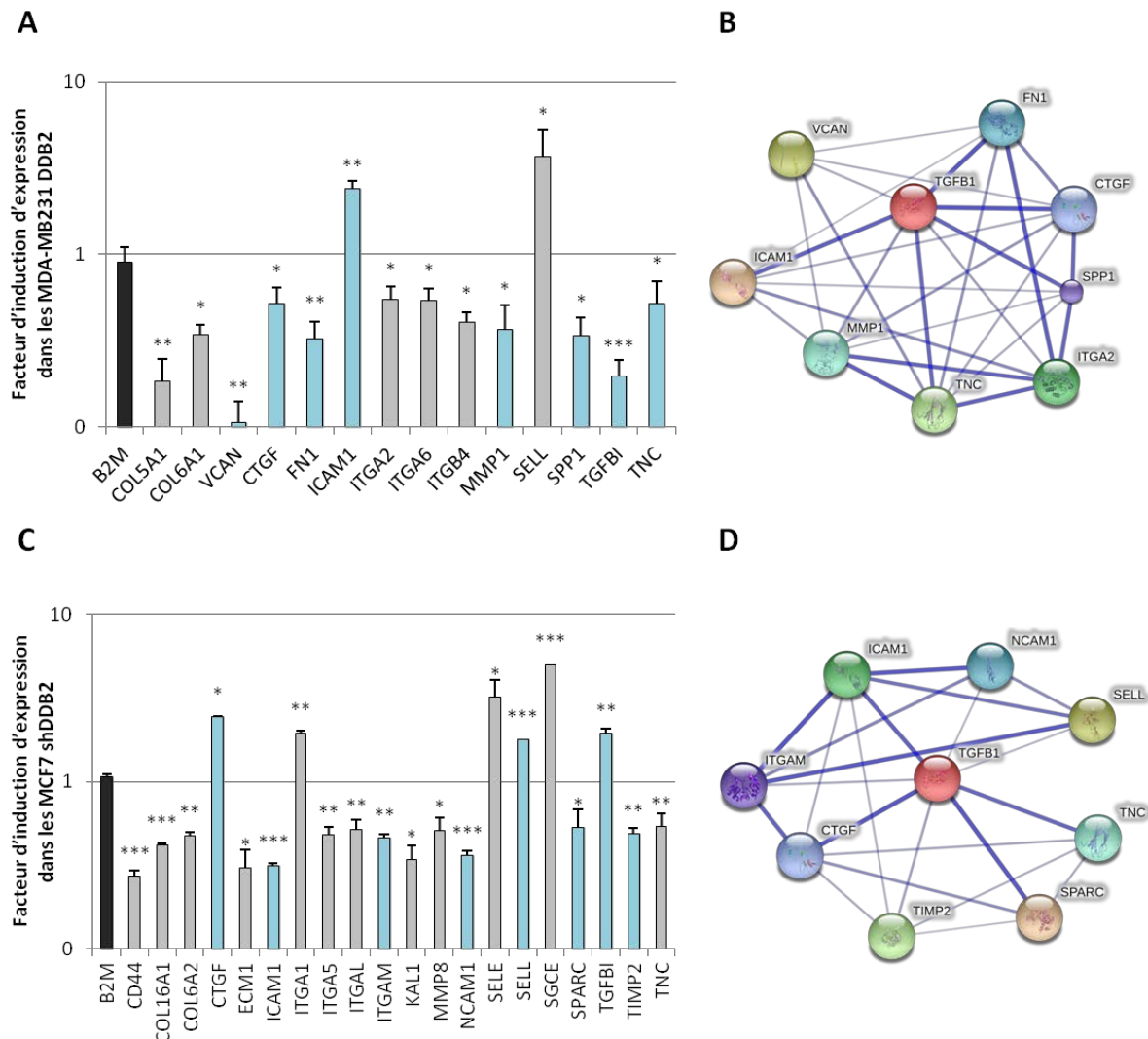
In the present work we showed that DDB2, a nuclear protein commonly known for its major role in DNA repair and more recently involved in the control of the invasive abilities of

breast cancer cells, is associated with cell adhesion by modulating membrane mechanical properties. We observed upon microscale and nanoscale analysis by AFM, PCR-Array and fluorescence microscopy that expression of DDB2 modulates cancer cell stiffness and strongly impacts the cortical actin-cytoskeleton organization. Indeed, we demonstrated quantitatively that expression of DDB2 decreases cell adhesion, Young modulus and the spreading of MCF7 and MDA-MB231 cells. These modifications could be related to modulation of the specific adhesion related gene expression in DDB2 overexpressing cells as compared to DDB2- cells, in accordance with previous studies showing that this protein is a new transcriptional regulator (Minig et al., 2009b) (Roy et al., 2013)(Ennen et al., 2013)(Zhao et al., 2014). Furthermore, these data indicate that nanomechanical properties of cancer cell measured by AFM could be useful to follow the changes occurring during tumorigenesis.

It has been already shown that DDB2 plays a role in tumorigenesis by preventing cells to acquire invasive abilities in colon and breast cancer *via* the regulation of EMT inducing factors and  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , the cytoplasmic inhibitor of  $\text{NF}\kappa\text{B}$  transcription factor. Taken together, these data indicate a new role of DDB2 in adhesion and mechanical properties of cancer cells that are the early events occurring during tumor progression toward metastasis. Thus our results bring new insight that DDB2 could be a relevant clinical marker of breast cancer progression.

### **Acknowledgments**

This work was supported by the CNRS and the University of Lorraine (PEPS Mirabelle) and the “Ligue contre le cancer” (Comité de Meurthe et Moselle). The fellowship of Claire Barbieux was given by the French Research Ministry (contrat doctoral de l’Université de Lorraine). The authors thank Dr S. Kaminski for critical reading of the article.



**Figure 26 : L'expression de DDB2 dans les cellules tumorales mammaires affecte le niveau d'expression de différents gènes impliqués dans la voie du TGFβ1.** Une PCR-Array ciblant 84 gènes impliqués dans l'adhérence a été réalisée dans les MDA-MB231 (A) et les MCF7 (C). La quantification du niveau d'expression de chaque gène est basée sur la différence d'expression d'une part entre les MDA-MB231 DDB2 et CTL, d'autre part entre les MCF7 shDDB2 et shCTL. Les gènes présentant un ratio inférieur à 1 sont sous-exprimés dans les cellules dont l'expression de DDB2 est modulée. Au contraire un ratio supérieur à 1 reflète la surexpression de ce gène dans les cellules DDB2 ou shDDB2. La significativité des résultats est donnée par \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Les gènes différentiellement exprimés ont été soumis à une analyse par le logiciel STRING (<http://string-db.org/>) afin de mettre en évidence les liens connus entre eux. Les gènes représentés en bleu se sont révélés être particulièrement connectés. Que ce soit pour les MDA-MB231 (B) ou les MCF7 (D), ces gènes sont en relation avec la voie du TGFβ1.

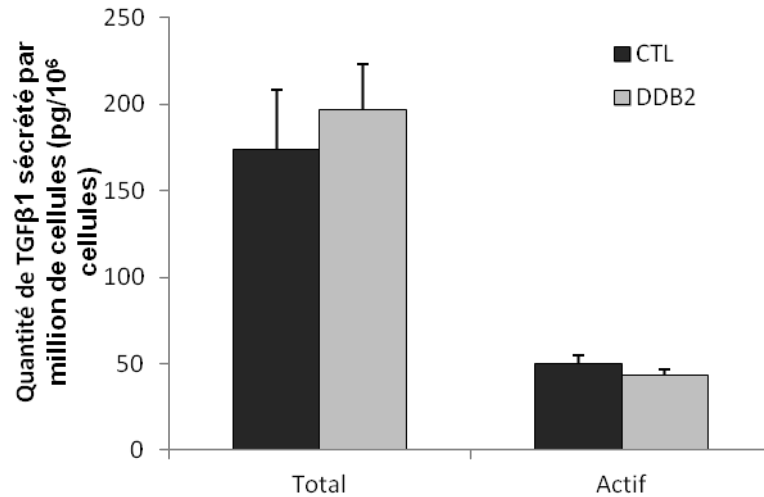
Sur la base de cette étude, et dans le but d'établir un lien entre la protéine DDB2 et les gènes régulant les propriétés d'adhérence des cellules (analyser par PCR array), nous avons cherché à identifier les mécanismes moléculaires à l'origine des modifications des propriétés d'adhérence. Pour cela, nous nous sommes focalisés en particulier sur l'influence de DDB2 sur l'expression du TGF $\beta$  ainsi que sur sa voie de signalisation.

## II. Mise en évidence d'une relation entre DDB2 et la voie de signalisation du TGF $\beta$

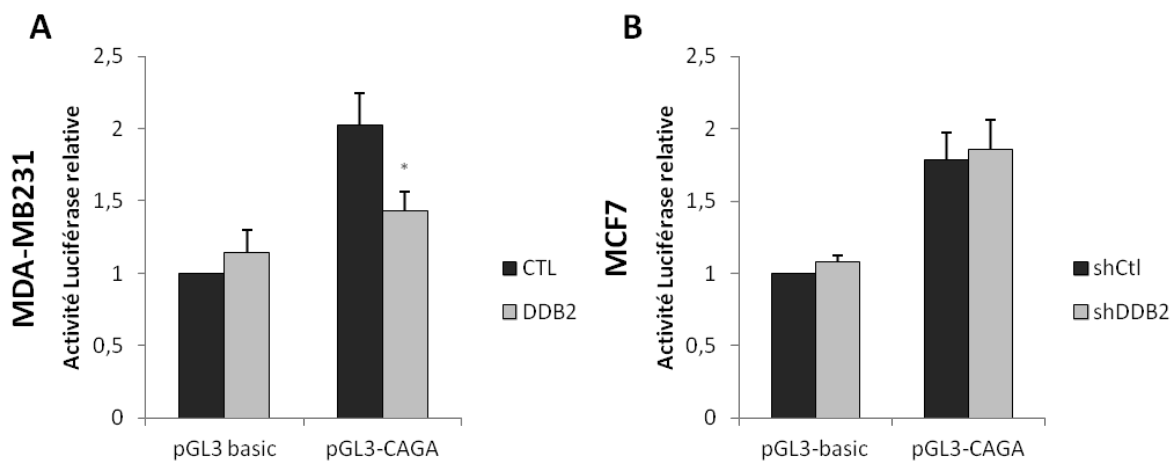
### A. Influence de DDB2 sur l'expression du TGF $\beta$ 1

Lors de l'étude de l'influence de DDB2 sur les propriétés d'adhérence des cellules tumorales mammaires, une PCR-Array ciblant 84 gènes impliqués dans l'adhérence a été réalisée (cf Matériel et Méthodes Tableau 1). Les résultats révèlent l'expression de nombreux gènes modulée selon celle de DDB2. Nous avons rapporté en partie I des résultats, que, parmi l'ensemble des 84 gènes analysés, seuls trois d'entre eux sont différentiellement exprimés, à la fois dans les MDA-MB231 DDB2 et les MCF7 shDDB2 (**Figure 26 A et C**). En effet, l'expression des gènes codant le TGF $\beta$ 1 et le CTGF est significativement diminuée dans les MDA-MB231 surexprimant DDB2, tandis qu'elle est augmentée dans les MCF7 shDDB2. De la même manière, le niveau d'expression du gène codant ICAM-1 est augmenté dans les MDA-MB231 DDB2, tandis qu'il est diminué dans les MCF7 dont l'expression de DDB2 est inhibée. Toutefois, cette analyse a mis en évidence respectivement, 14 et 20 gènes différentiellement exprimés dans les cellules MDA-MB231 et les MCF7 (**Figure 26 A et C**), sans laisser apparaître de points communs évidents et pouvant expliquer cependant l'impact de DDB2 sur les propriétés d'adhérence et nanomécaniques de ces cellules.

Devant le nombre et la diversité des gènes dont le niveau d'expression est modulé avec celui de DDB2, une analyse utilisant le logiciel STRING a été réalisée, afin de mettre en évidence des liens existant entre ces différents gènes (**Figure 26**). De cette analyse, nous révélons que les gènes *CTGF*, *FNI*, *ITGA2*, *ICAM1*, *MMP1*, *SPPI*, *TGFBI*, *TNC* et *VCAN* forment un réseau étroitement lié, concernant les cellules MDA-MB231 (**Figure 26B**). Un réseau d'interaction similaire, composé des gènes *CTGF*, *ICAM1*, *ITGAM*, *NCAM1*, *SELL*, *SPARC*, *TGFBI*, *TIMP2* et *TNC* est également observé pour les cellules MCF7 (**Figure 26D**).



**Figure 27 : Etude de la sécrétion de TGFβ1 par les cellules tumorales mammaires MDA-MB231.** La quantité de TGFβ1 total et actif sécrété par les MDA-MB231 CTL et DDB2 a été mesurée par test ELISA. Les résultats sont représentés par la moyenne de trois expériences indépendantes de la quantité (en pg) de TGFβ1 sécrété par million de cellules ± l'erreur standard à la moyenne.



**Figure 28 : Analyse de l'activité transcriptionnelle basale des Smads 2/3 dans les cellules tumorales mammaires exprimant ou non DDB2.** Les cellules MDA-MB231 (A) et MCF7 (B) sont transfectées durant 24 heures avec des plasmides contenant la séquence codant la luciférase firefly sous le contrôle de l'élément de réponse CAGA, spécifique des Smads 2/3. Le plasmide contenant le gène de la luciférase renilla est également introduit dans les cellules pour vérifier et normaliser l'efficacité de la transfection. L'activité de l'élément de réponse est calculée en fonction des cellules contrôles MDA-MB231 CTL et MCF7 shCTL, transfectées avec le plasmide vide pGL3 basic. Les résultats correspondent à la moyenne ± l'erreur standard à la moyenne de 4 expériences indépendantes. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

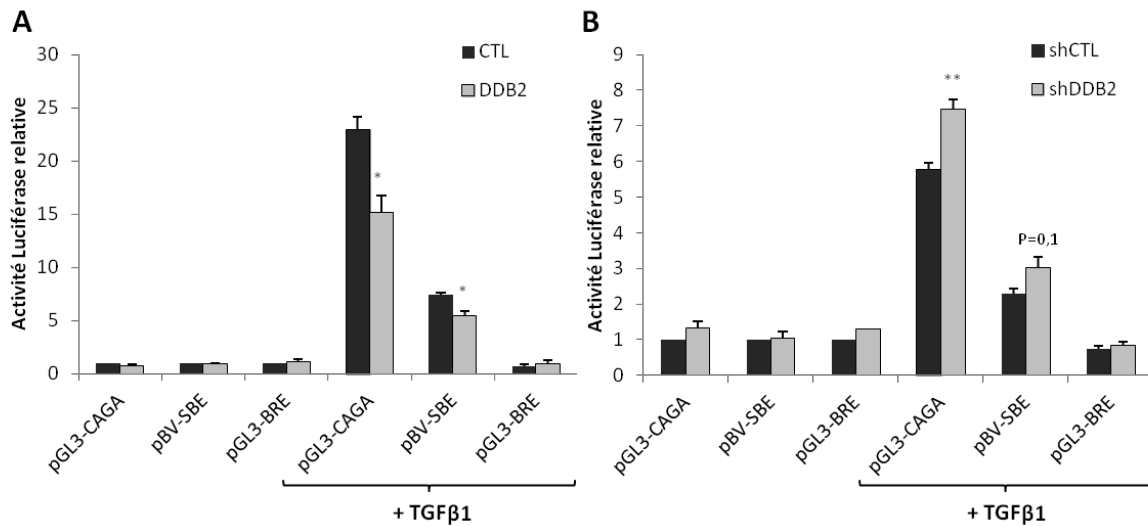
Bien que les gènes différentiellement exprimés selon le niveau d'expression de DDB2 semblent dépendre du type cellulaire, les interactions existant entre eux dans les cellules MDA-MB231 comme dans les MCF7 ont pour point central, le TGF $\beta$ 1. En effet, l'ensemble des gènes surlignés en bleu dans la figure 36 A et C, dont l'expression est modulée selon celle de DDB2, sont associés à la voie de signalisation du TGF $\beta$ 1. De plus, l'expression du gène codant le TGF $\beta$ 1 lui-même est également modulée selon celle de DDB2. L'ensemble de ces résultats semble donc indiquer que DDB2 pourrait interférer avec la voie de signalisation de ce facteur de croissance.

Sur la base de ces données de PCR-Array, montrant l'influence de DDB2 sur l'expression du gène codant le TGF $\beta$ 1, nous avons cherché à confirmer ce résultat en analysant le niveau de sécrétion de ce facteur de croissance. Cependant, aucune différence significative dans la sécrétion du TGF $\beta$ 1 n'est observée entre les cellules tumorales mammaires exprimant ou non DDB2 (**Figure 27**).

### **B. Influence de DDB2 sur l'activité transcriptionnelle des Smads 2/3**

En parallèle de l'analyse du niveau d'expression du TGF $\beta$ 1, des expériences de gènes rapporteurs ont été réalisées afin de déterminer le niveau d'activation endogène de la voie de signalisation de ce facteur de croissance dans les cellules exprimant ou non DDB2. Ainsi, nous avons observé une activité transcriptionnelle des Smads 2/3 sans ajout de TGF $\beta$ 1, mais présent à 1ng/mL dans le milieu de culture, dans les cellules MDA-MB231 CTL transfectées avec un plasmide portant le gène de la luciférase sous contrôle de 12 répétitions CAGA (pGL3-CAGA). Cette activité transcriptionnelle est inhibée de 25% dans les cellules MDA-MB231 surexprimant DDB2 (**Figure 28A**). Ce résultat n'a pu être confirmé dans les cellules MCF7, car aucune différence significative dans l'activité transcriptionnelle endogène des Smads 2/3 n'est observée entre les MCF7 shDDB2 et shCTL (**Figure 28B**).

Afin de vérifier l'importance de l'influence de DDB2 sur la voie de signalisation du TGF $\beta$ 1 dans les cellules MDA-MB231, nous avons réalisé ces mêmes expériences en traitant les cellules tumorales mammaires avec du TGF $\beta$ 1 exogène. Cette analyse a été réalisée à l'aide d'un gène rapporteur de type luciférase, dont l'expression est sous le contrôle d'éléments spécifiques de fixation à l'ADN de type SBE pour les Smads 2/3 ou BRE pour les Smads 1/5/8. Un contrôle positif correspondant à 12 répétitions de la séquence consensus

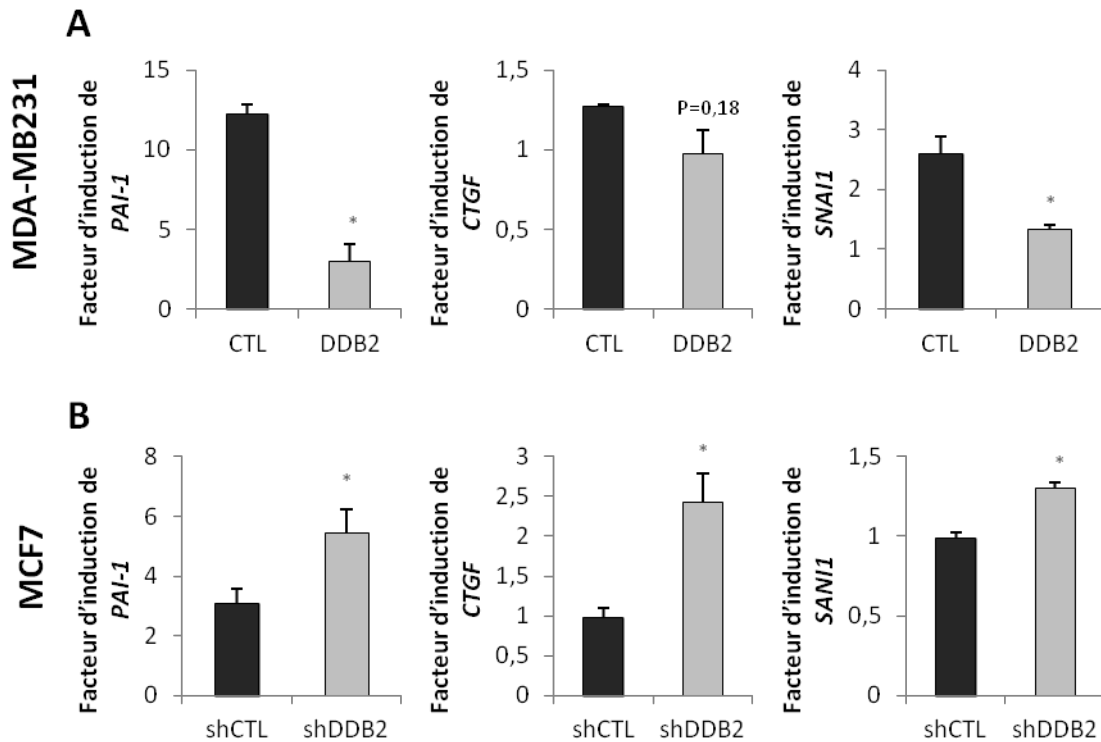


**Figure 29 : Inhibition de l'activité transcriptionnelle des Smads 2/3 induite par le TGFβ1 dans les cellules tumorales mammaires surexprimant DDB2.** Les cellules MDA-MB231 (A) et MCF7 (B) sont transfectées avec des plasmides contenant la séquence codant la luciférase firefly sous le contrôle de différents éléments de réponse aux Smads : CAGA et SBE pour les Smads 2/3 et BRE pour les Smads 1/5/8 (A et B). Douze heures après la transfection, les cellules sont traitées ou non avec du TGFβ1 à 5ng/mL pendant 24 heures. Le plasmide contenant le gène de la luciférase renilla est également introduit dans les cellules pour vérifier et normaliser l'efficacité de la transfection. L'activité de chaque élément de réponse est calculée en fonction du contrôle non traité. Les résultats correspondent à la moyenne ± l'erreur standard à la moyenne de 4 expériences indépendantes. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

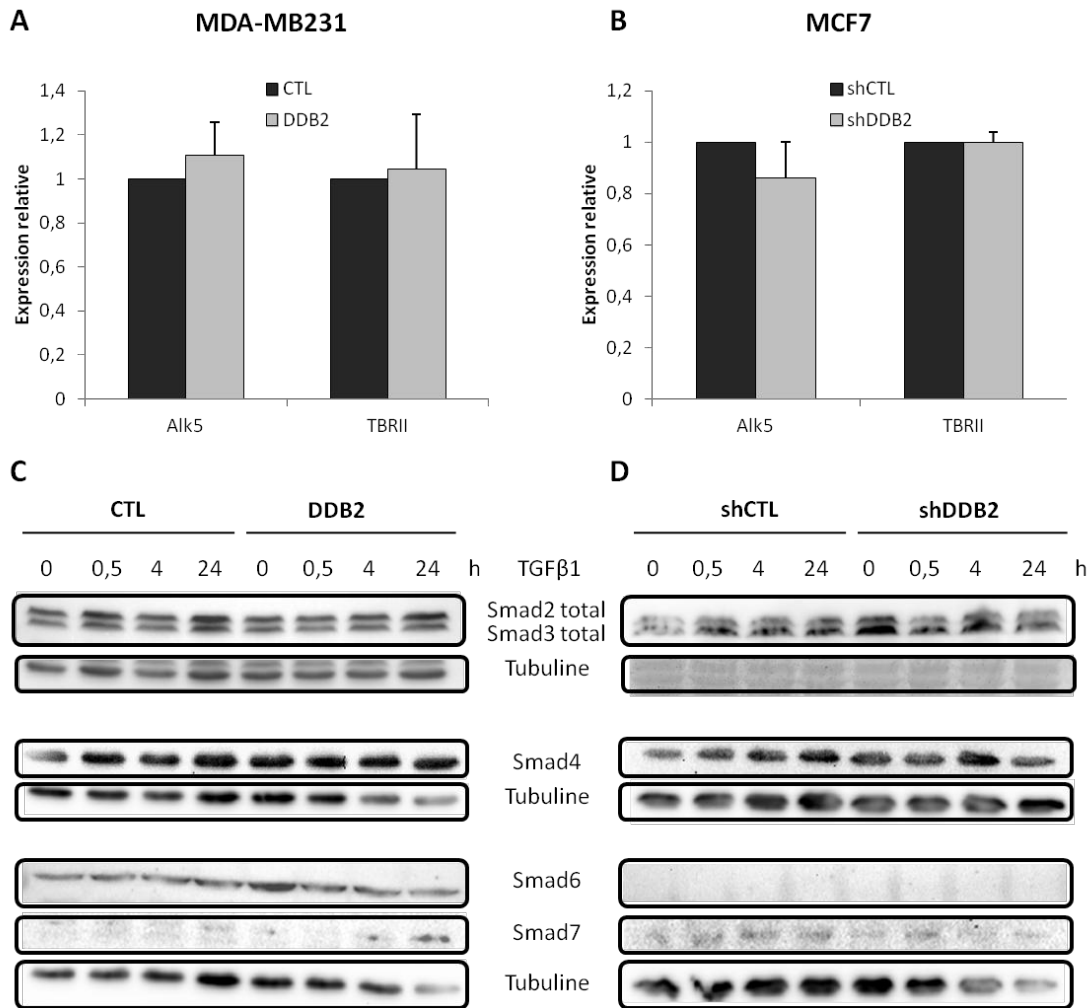
CAGA, répondant fortement aux Smads 2/3, a également été utilisé en parallèle. Les cellules tumorales mammaires MDA-MB231 et MCF7, dont l'expression de DDB2 est modulée, ont été transfectées de façon transitoire avec ces trois constructions plasmidiques, et mises en présence ou non de TGF $\beta$ 1 pendant 24 heures. Dans les MDA-MB231 CTL, le TGF $\beta$ 1 active uniquement l'activité transcriptionnelle des Smads 2/3, puisque seules les activités luciférase sous le contrôle des éléments CAGA et SBE sont significativement augmentées respectivement de 23 et 7 fois (**Figure 29A**). Par contre, cette activité transcriptionnelle des Smads 2/3 activée par le TGF $\beta$ 1 est significativement diminuée dans les cellules MDA DDB2, de 35% et 30% lorsqu'elle dépend respectivement des éléments CAGA et SBE. Inversement, seule l'activité transcriptionnelle des Smads 2/3 dépendante des éléments CAGA et SBE est augmentée d'environ 30% dans les cellules MCF7 shDDB2 par rapport aux cellules shCTL, en présence de TGF $\beta$ 1 (**Figure 29B**). Ces données indiquent donc que la protéine DDB2 est capable d'inhiber l'action du TGF $\beta$ 1 sur l'activité transcriptionnelle des Smads 2/3.

Ces résultats sont confirmés par une analyse de l'expression par RT-PCR en temps réel de 3 gènes cibles des Smads 2/3, activées en présence de TGF $\beta$ 1, dans les cellules tumorales mammaires ayant une expression de DDB2 modulée expérimentalement. Ces 3 gènes, *PAI-1*, *SNAIL* et *CTGF*, possèdent dans leur région promotrice respective, des éléments de fixation des Smads décrits dans la littérature (Brandl et al., 2010; Vayalil et al., 2007)(Grotendorst et al., 1996). Le traitement des cellules MDA-MB231 CTL durant 24 heures avec du TGF $\beta$ 1 confirme bien l'induction, d'environ 12, 1,3 et 2,6 fois respectivement, de l'expression des gènes codant PAI-1, CTGF et SNAIL. Excepté pour le gène codant CTGF, cette induction par le TGF $\beta$ 1 est significativement réduite et n'est que de 3 fois pour PAI-1 et de 1,4 fois pour *SNAIL* dans les cellules MDA-MB231 surexprimant DDB2 (**Figure 30A**). Dans le cas des cellules MCF7 shCTL, seule l'expression du gène codant PAI-1 est induite de 3 fois par le traitement avec du TGF $\beta$ 1 durant 24 heures, comparativement aux cellules non traitées. Lorsque l'expression de DDB2 est inhibée par ARN interférence, l'induction de l'expression du gène codant PAI-1 par le TGF $\beta$ 1 est significativement plus importante dans les cellules MCF7 shDDB2 (5,5 fois) que dans les mêmes cellules non traitées (**Figure 30B**). De façon surprenante, l'expression des deux autres gènes, qui n'est pas induite par le traitement des cellules MCF7 shCTL avec le TGF $\beta$ 1, est induite significativement (2,5 fois pour *CTGF* et 1,3 fois pour *SNAIL*) dans les cellules MCF7 shDDB2 traitées avec le facteur de croissance (**Figure 30B**).





**Figure 30 : Inhibition de l'expression de gènes cibles du TGFβ1 dans les cellules tumorales mammaires surexprimant DDB2.** Les ARNm sont extraits de cellules traitées ou non avec 5ng/mL de TGFβ1 pendant 24 heures. Le niveau d'expression de 3 gènes cibles (*PAI-1*, *SNAI1* et *CTGF*) de la voie du TGFβ1 est évalué dans les MDA-MB231 (**A**) et dans les MCF7 (**B**) par RT-PCR en temps réel, à partir d'ARNm extraits des cellules. Le niveau d'expression de chaque gène est normalisé par celui de 2 gènes de référence : UBB et RPLPO. Les résultats sont exprimés comme le facteur d'induction de l'expression du gène dans les cellules traitées avec le TGFβ1, comparé aux cellules non traitées. Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes ± l'erreur standard à la moyenne de 4 expériences indépendantes. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figure 31 : Influence de DDB2 sur l'expression des récepteurs et des effecteurs de la voie de signalisation du TGFβ1 dans les cellules tumorales mammaires.** Le niveau d'expression des récepteurs de type I (Alk5) et de type II (TBR11) est évalué par RT-PCR en temps réel à partir d'ARNm extraits des cellules MDA-MB231 CTL et DDB2 (A) et MCF7 shCTL et shDDB2 (B). Les résultats sont normalisés par le niveau d'expression de 2 gènes de référence UBB et RPLPO et correspondent à la valeur moyenne de 4 expériences indépendantes ± l'erreur standard à la moyenne. L'expression des Smads effectrices (Smad 2, 3, 4) ou inhibitrices (Smad 6 et 7) est étudiée par Western-Blotting à partir d'extraits de protéines totales des cellules MDA-MB231 (C) et MCF7 (D), traitées ou non avec 5ng/mL de TGFβ1 pendant 0,5, 4 ou 24 heures. L'homogénéité des dépôts est vérifiée en utilisant l'anticorps anti α-tubuline.

L'ensemble de ces résultats confirme bien que la protéine DDB2 exerce un contrôle négatif sur la voie de signalisation du TGF $\beta$ 1, avec pour conséquence une inhibition de l'activité transcriptionnelle des Smads 2/3 et de l'expression des gènes cibles correspondants.

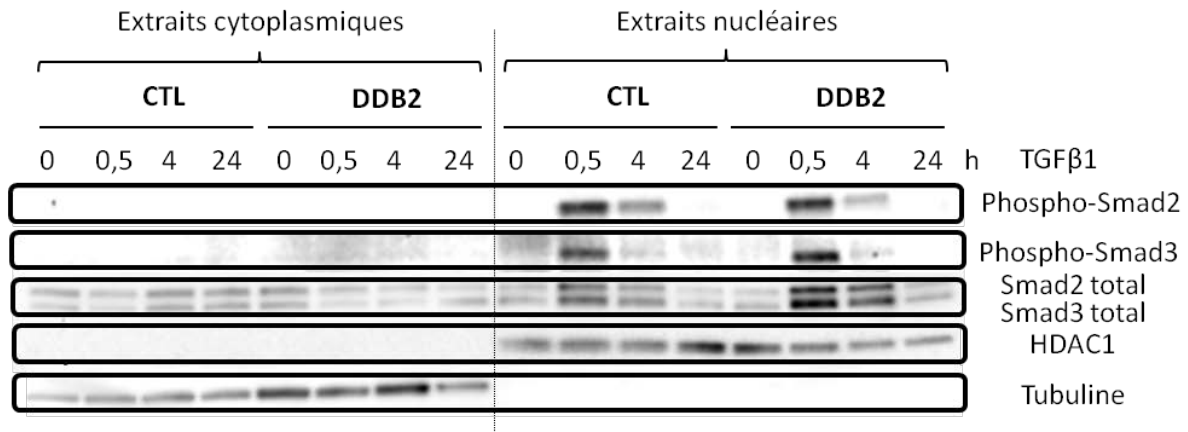
### C. Influence de DDB2 sur l'expression des différents acteurs de la voie de signalisation du TGF $\beta$ 1

Dans la suite de ce travail, notre démarche a consisté à rechercher comment la protéine DDB2 peut inhiber la voie de signalisation du TGF $\beta$ 1. Nous avons donc analysé le niveau d'expression de chaque acteur impliqué dans cette voie de signalisation jusqu'à l'activation des Smads et leur interaction avec le promoteur de leurs gènes cibles.

Dans un premier temps, nous avons vérifié si la diminution de l'activité transcriptionnelle des Smads 2/3, lorsque DDB2 est exprimée, est due à un changement dans l'expression d'un ou de plusieurs acteurs moléculaires de la voie de signalisation du TGF $\beta$ 1. Des travaux précédents ont en effet montré que DDB2 intervient dans la régulation de l'expression de gènes cibles (Minig et al., 2009b; Roy et al., 2013; Zhao et al., 2014), suggérant l'hypothèse que cette protéine pourrait agir sur l'expression des acteurs de cette voie de signalisation. Ainsi, nous avons analysé l'expression des récepteurs de type I (Alk5) et II (TBR11) du TGF $\beta$ 1 par RT-PCR en temps réel dans les deux lignées de cellules tumorales mammaires, dont l'expression de DDB2 est modulée. L'expression de DDB2 n'entraîne pas de changement dans celle des gènes codant les récepteurs Alk5 et TBR11 dans les cellules MDA-MB231 (**Figure 31A**). De même, aucune différence significative n'est observée dans les cellules MCF7 shCTL et shDDB2 (**Figure 31B**).

Nous avons également analysé l'expression des Smads effectrices (2, 3 et 4) et inhibitrices (6 et 7) par Western blotting dans les cellules MDA-MB231 et MCF7 exprimant ou non DDB2 expérimentalement et préalablement cultivées en présence de TGF $\beta$ 1 pendant 0,5, 4 ou 24 heures. Quelque-soit la durée du traitement avec le TGF $\beta$ 1, aucune différence dans l'expression des Smads effectrices et inhibitrices n'est observée à la fois, dans les cellules MDA-MB231 CTL et DDB2, et les MCF7 shCTL et shDDB2 (**Figure 31 C et D**). Il est à noter que les Smads inhibitrices sont parfois trop faiblement exprimées dans les cellules tumorales mammaires pour être détectées par Western blotting.

Ces données indiquent donc que l'inhibition de la voie du TGF $\beta$ 1 par DDB2 ne résulte pas de modifications dans l'expression des principaux acteurs de cette voie de signalisation.



**Figure 32 : Influence de DDB2 sur la phosphorylation et la translocation nucléaire des Smads 2 et 3 activées par le TGFβ1 dans les cellules tumorales mammaires.** Après traitement ou non avec le TGFβ1 à 5ng/mL pendant 0, 5, 4 ou 24 heures, les protéines nucléaires ou cytoplasmiques sont extraites à partir de cellules MDA-MB231 CTL et DDB2. La phosphorylation et la translocation nucléaire des Smads 2 et 3 sont ensuite analysées par Western-Blotting à l'aide d'anticorps dirigés contre les formes phosphorylées ou non. L'anticorps anti  $\alpha$ -Tubuline et anti HDAC1 permettent de vérifier respectivement, la pureté des extraits cytoplasmiques et nucléaires, ainsi que l'homogénéité des dépôts.

#### D. Influence de DDB2 sur la phosphorylation et la translocation nucléaire des Smads 2/3

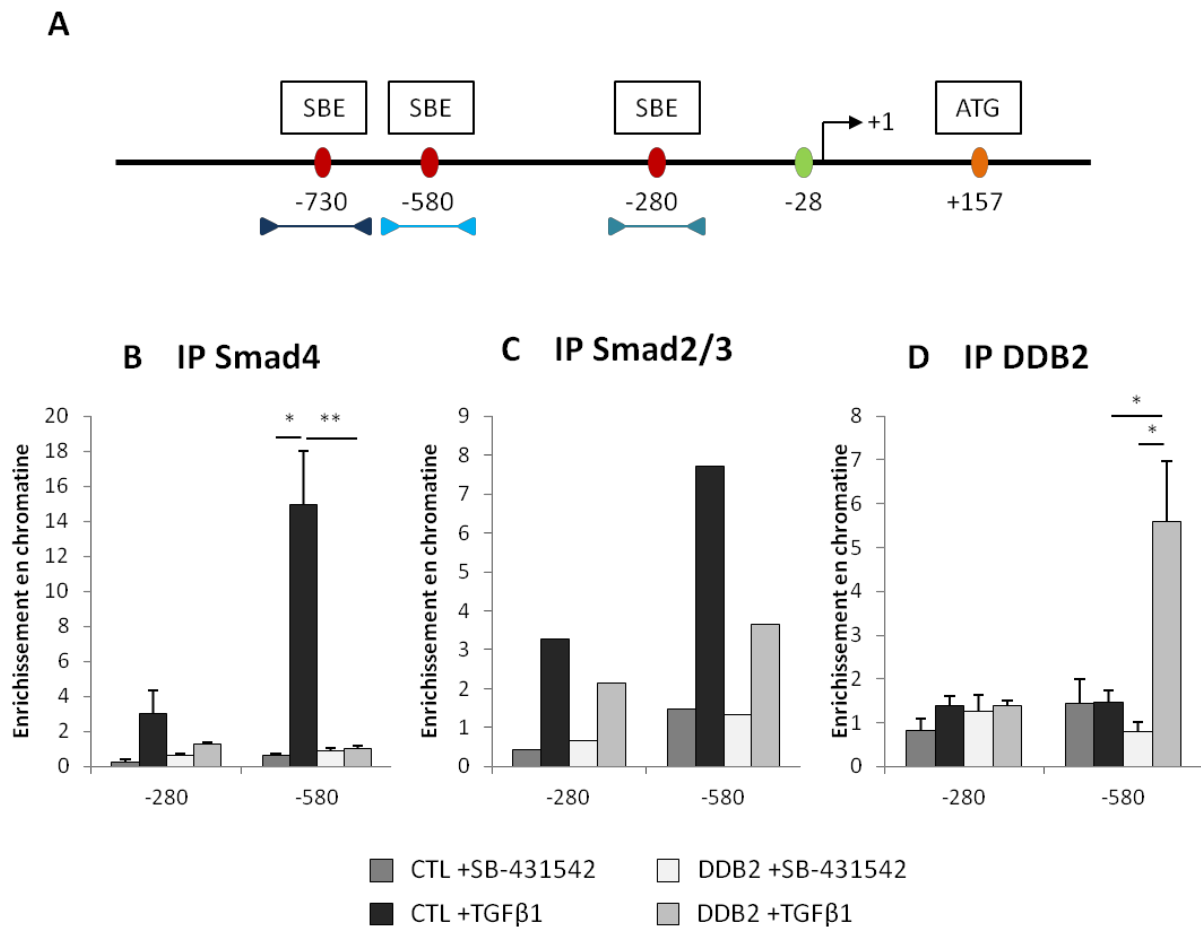
Nous avons vérifié si DDB2 diminuait l'activité transcriptionnelle des Smads 2/3 en s'opposant en particulier à leur phosphorylation, puis leur translocation nucléaire en présence de TGF $\beta$ 1. Ces deux étapes, essentielles dans l'acquisition de l'activité transcriptionnelle de ces facteurs de transcription, ont été étudiées par Western-blotting sur des extraits protéiques d'origine cytoplasmique et nucléaire issus de cellules traitées avec du TGF $\beta$ 1 pendant 0,5, 4 ou 24 heures.

Dès 30 minutes de traitement avec le TGF $\beta$ 1, nous observons, de façon transitoire, la phosphorylation des Smads 2/3 et leur translocation nucléaire dans les cellules MDA-MB231 CTL (**Figure 32**). De manière intéressante, cette phosphorylation des Smads 2/3 induite par le TGF $\beta$ 1, ainsi que leur translocation dans le noyau semblent être identiques dans les cellules MDA-MB231 sureprimant DDB2, comparées aux cellules CTL.

Ces résultats restent à confirmer dans le modèle de cellules MCF7 dont l'expression de DDB2 est inhibée. Toutefois, sur la base de ces premiers résultats, l'activité inhibitrice de DDB2 sur la voie de signalisation du TGF $\beta$ 1 ne semble pas dépendre d'une influence sur la phosphorylation et en conséquence sur la translocation nucléaire des Smads 2/3.

#### E. Mise en évidence de l'interaction de la protéine DDB2 avec le promoteur du gène *PAI-1*, cible du TGF $\beta$ 1

En parallèle, nous avons émis l'hypothèse que DDB2 pourrait influencer l'activité transcriptionnelle des Smads 2/3 et 4, en interagissant avec la région promotrice des gènes cibles du TGF $\beta$ 1. Cette hypothèse repose sur le fait que cette protéine peut intervenir de cette manière dans la régulation de l'expression des gènes codant SOD2, Bcl-2 et ZEB1 (Minig et al., 2009b; Roy et al., 2013; Zhao et al., 2014). Nous avons choisi le gène codant PAI-1, dont la région promotrice contient trois sites de fixation des Smads décrits dans la littérature (Vayalil et al., 2007) et situés respectivement à 280, 580 et 730 paires de base en amont du site d'initiation de la transcription, comme le montre la **Figure 33A**. La présence des Smads 2/3 et 4 ainsi que celle de DDB2 sur ces différents éléments de fixation a été étudiée par immunoprécipitation de chromatine, à partir des cellules MDA-MB231 CTL et DDB2 traitées avec du TGF $\beta$ 1 ou son inhibiteur SB-431542, et à l'aide des anticorps spécifiques correspondants. La chromatine précipitée est analysée par PCR en temps réel à l'aide de



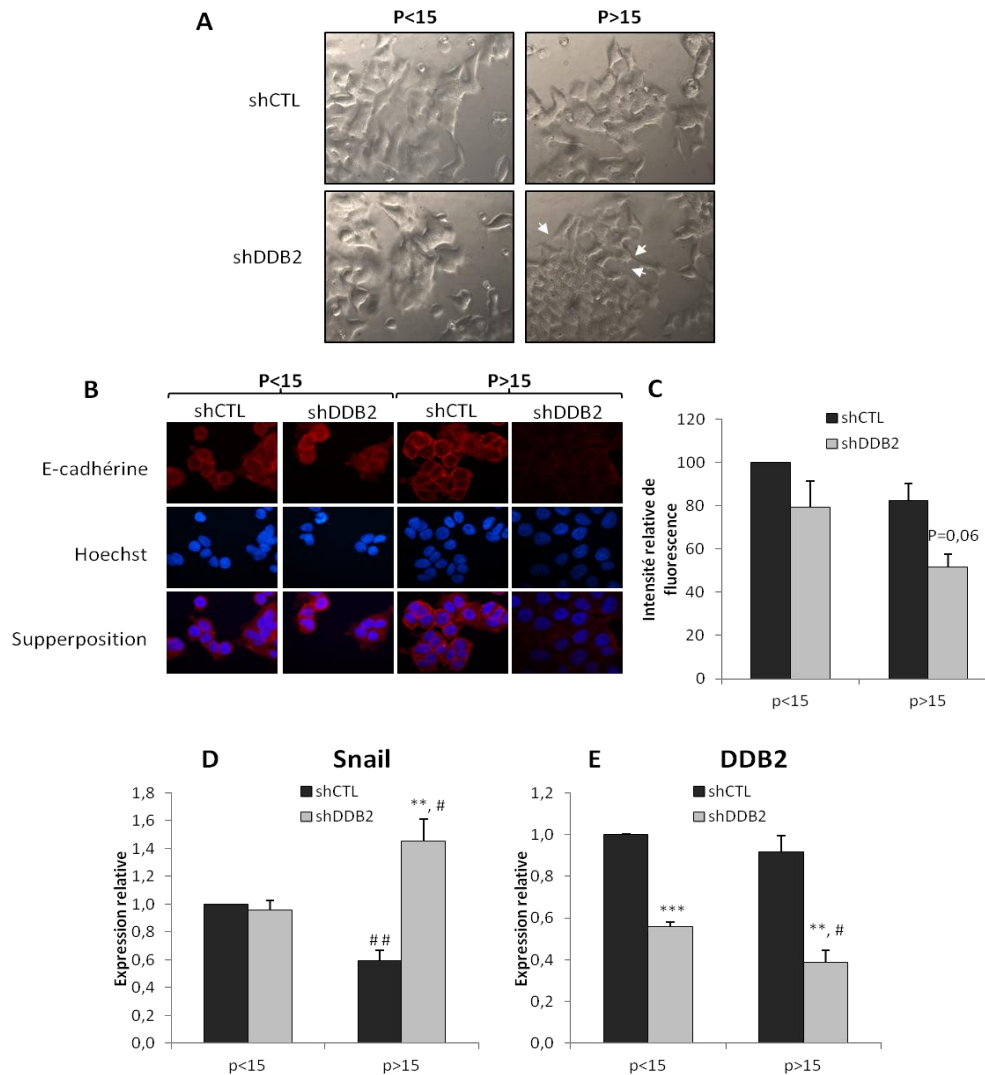
**Figure 33 : Interaction de la protéine DDB2 avec le promoteur du gène *PAI-1* dans la région des sites de fixation des Smads 2, 3 et 4.** Cette représentation schématique du promoteur du gène *PAI-1* indique les 3 régions 730 pb, 580 pb et 280 pb en amont du site d'initiation de la transcription, comportant chacune un site de fixation des Smads 2/3 et 4 (SBE), désigné par un point rouge et déjà décrits dans la littérature. La boîte TATA (-28 pb) et le site d'initiation de la traduction (ATG +157) sont désignés respectivement par un point vert et orange (A). La chromatine, extraite à partir de cellules MDA-MB231 CTL et DDB2 traitées avec 10 $\mu$ M d'inhibiteur SB-431542 ou 5ng/mL de TGF $\beta$ 1, est immunoprécipitée (IP) à l'aide d'un IgG contrôle, d'un anticorps anti-Smad4 (B), anti-Smad2/3 (C) ou anti-DDB2 (D). L'ADN immunoprécipité est ensuite amplifié par PCR en temps réel à l'aide des amorces représentées en bleu sur la partie A de la figure. L'enrichissement en chromatine est normalisé par la chromatine ayant été précipitée par l'IgG contrôle. Les résultats correspondent à la moyenne  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne de 5 expériences indépendantes, excepté 2 expériences seulement pour les IP Smad2/3. Les différences significatives sont représentées par \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

couples d'amorces répertoriés dans le tableau 2. Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec une immunoglobuline (IgG) non spécifique servant de contrôle. Les résultats obtenus montrent que le traitement des cellules MDA-MB231 CTL avec du TGF $\beta$ 1 pendant une heure entraîne une fixation des protéines Smads 2/3 et 4 sur les régions -280 et -580 pb du promoteur du gène *PAI-1*. Toutefois, cette fixation, exprimée en facteur d'enrichissement de la chromatine immunoprécipitée, est plus prononcée pour la région -580 pb, de 15 et 8 fois, contre 3 et 3,3 fois pour celle de -280 pb, respectivement pour les protéines Smad4 et Smads 2/3. Cette fixation n'est pas observée en présence de l'inhibiteur SB-431542. La même expérience réalisée avec les cellules MDA-MB231 DDB2 montre clairement que la fixation de la protéine Smad4 est abolie aussi bien dans la région -280 que -580 pb après traitement avec le TGF $\beta$ 1. De même, la fixation des Smads 2/3 est fortement diminuée d'un facteur 1,6 et 2,3, respectivement dans la région -280 et -580 pb dans les cellules MDA-MB231 DDB2, traitées avec le TGF $\beta$ 1 (**Figure 33 B et C**).

La même analyse, réalisée cette fois avec un anticorps spécifiquement dirigé contre DDB2, révèle la présence de cette protéine uniquement au niveau de la région -580 pb dans les cellules MDA-MB231 DDB2. Le facteur d'enrichissement de la chromatine est augmenté d'un facteur 6 fois lorsque les cellules MDA-MB231 DDB2 sont traitées avec du TGF $\beta$ 1, par rapport à ce qui est observé dans les mêmes cellules traitées avec SB-431542 (**Figure 33D**). L'analyse de la région -780 pb n'est pas montrée mais n'a révélé aucune interaction spécifique, quelque-soit la protéine ciblée, en présence ou non de TGF $\beta$ 1.

L'ensemble de ces données indique donc que la surexpression de DDB2 entraîne une diminution de la fixation des Smads 2/3 et 4 au niveau de leur site d'ADN au sein du promoteur de leur gène cible *PAI-1*. Ces données sont à relier avec la diminution de l'activité transcriptionnelle de ce complexe Smad et de l'expression de leurs gènes cibles, que nous avons rapportée plus haut. Cependant, il reste à démontrer que la fixation de DDB2, au niveau ou à proximité du site spécifique des Smads, est bien la conséquence de cette interférence de notre protéine sur la voie du TGF $\beta$ 1.

A la suite de ce travail, il sera impératif d'identifier l'importance biologique de l'inhibition de la voie du TGF $\beta$ 1 par la protéine DDB2. Or comme nous l'avons décrit dans l'introduction cette voie de signalisation intervient dans le contrôle de nombreux processus biologiques. Néanmoins, nous avons constaté que les cellules MCF7 shDDB2 présentaient des changements phénotypiques au cours des passages en culture cellulaire. Sur la base que



**Figure 34 : L'inhibition de DDB2 est associée à une induction spontanée de la TEM dans les cellules MCF7.** La morphologie des cellules shCTL et shDDB2 est analysée à des passages précoces (p<15) et tardifs (p>15) par microscope à contraste de phase au grossissement x1000 (A). L'expression du marqueur épithélial, E-cadhérine est analysée par immunocytofluorescence au grossissement x1000 (B), et quantifiée par cytométrie en flux (C) à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique. L'intensité de fluorescence relative, quantifiée par cytométrie en flux, d'une part dans les cellules shDDB2, d'autre part dans les shCTL à passages tardifs est comparée à celle obtenue et fixée à 100 pour les cellules shCTL à passages précoces. L'expression de Snail, facteur inducteur de la TEM (D) et de DDB2 (E) est analysée par RT-PCR en temps réel, à l'aide d'ARNm extraits de cellules ou tardifs. Le niveau d'expression de chaque gène est normalisé par celui des 2 gènes de référence, UBB et RPLPO, puis comparé à celui obtenu et fixé à 1 dans les cellules shCTL à passages précoces. Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne de 4 expériences indépendantes. La significativité des résultats est représentée par une étoile pour les cellules shCTL *versus* les shDDB2, ou par un astérisque pour les passages précoces *versus* les tardifs d'un même type cellulaire. \* ou # p<0,05, \*\* ou ## p<0,01, \*\*\* p<0,001.

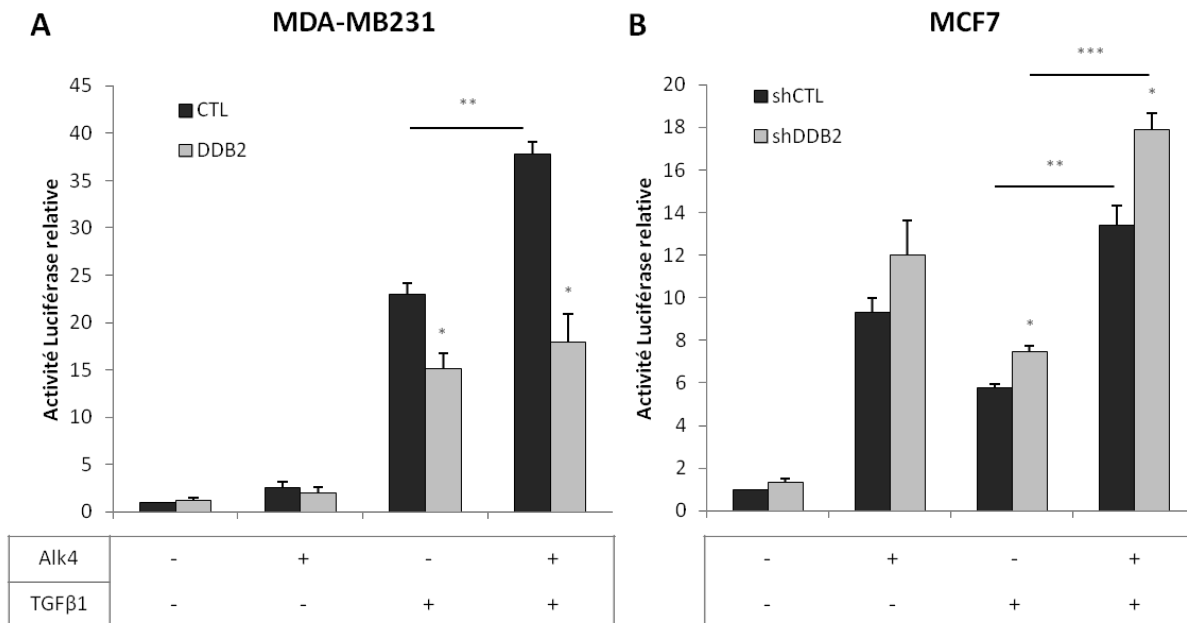


les cellules MCF7 n'ont pas subi la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et que le TGF $\beta$ 1 est un important régulateur de celle-ci, ces observations nous ont donc amenés à étudier si les modifications phénotypiques pourraient être dues à l'induction de la TEM dans ces cellules. La TEM est un processus physiologique finement régulé, caractérisé par une perte d'adhérence et un gain de capacités invasives des cellules tumorales. La TEM se caractérise par des changements à la fois morphologiques, comme l'étirement des cellules avec des extensions semblables à des filopodes, et moléculaires, tels que la répression de la cadhérine E et l'induction du facteur de transcription Snail.

#### F. DDB2 et la transition épithélio-mésenchymateuse dans les cellules tumorales mammaires

Ainsi, nous avons suivi l'apparition de la TEM avec le temps de culture correspondant au nombre de passages des cellules MCF7 shCTL et shDDB2. A des passages précoces, c'est à dire inférieurs à 15, aucune différence n'est observée entre les cellules MCF7 shCTL et shDDB2, aussi bien au niveau morphologique que moléculaire. L'expression de la cadhérine E, analysée par immunofluorescence et par cytométrie de flux est quasiment identique dans les cellules shCTL et shDDB2 (**Figure 34 B et C**). De même, l'expression de Snail par RT-PCR en temps réel est identique dans les 2 types cellulaires (**Figure 34D**). Par contre, après 15 passages en culture, les cellules MCF7 shDDB2 présentent de nombreuses extensions cytoplasmiques semblables à des filopodes, alors que les cellules shCTL conservent une morphologie proche de celle des cellules à faibles passages en culture (**Figure 34A**). Ces observations sont confirmées au niveau moléculaire, avec une expression significativement réduite de la cadhérine E par cytométrie en flux (**Figure 34C**) et une augmentation de l'expression de Snail (2,5 fois) par RT-PCR en temps réel (**Figure 34D**), dans les cellules MCF7 shDDB2, par rapport aux cellules contrôles. De même, l'immuno-marquage ciblant la cadhérine E est fortement réduit pour les cellules shDDB2, alors qu'il est identique pour les cellules shCTL, quelque-soit le nombre de passages en culture (**Figure 34B**). Il est à noter que le niveau d'expression de DDB2 est significativement plus inhibé dans les cellules MCF7 shDDB2 à passages tardifs qu'à passages précoces, tandis qu'aucune différence significative n'est observée pour les cellules shCTL quelque-soit le temps en culture (**Figure 34E**).

L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'inhibition de l'expression de DDB2 entraîne avec le temps, les cellules tumorales mammaires MCF7 progressivement vers la TEM, contrairement aux cellules contrôles, et ce dans les mêmes conditions de culture.



**Figure 35 : Influence de DDB2 sur l'activité transcriptionnelle des Smads 2/3 en présence du récepteur de type I à l'activine (Alk4) et du TGFβ1 dans les cellules tumorales mammaires.** Les cellules MDA-MB231 (A) et MCF7 (B) sont transfectées avec un plasmide contenant le gène d'Alk4 et un autre exprimant le gène codant la luciférase firefly, placé sous le contrôle de l'élément CAGA spécifique des Smads 2/3. Douze heures après transfection, les cellules sont traitées ou non avec du TGFβ1 à 5ng/mL pendant 24 heures. Le plasmide contenant le gène de la luciférase renilla est également introduit dans les cellules pour vérifier et normaliser l'efficacité de la transfection avec le plasmide exprimant la luciférase firefly. Les résultats sont exprimés en fonction des cellules contrôles n'exprimant pas Alk4 et non traitées avec le TGFβ1, et correspondent à la moyenne de 4 expériences indépendantes ± l'erreur standard à la moyenne. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

### III. Mise en évidence d'une relation entre DDB2 et l'activine A

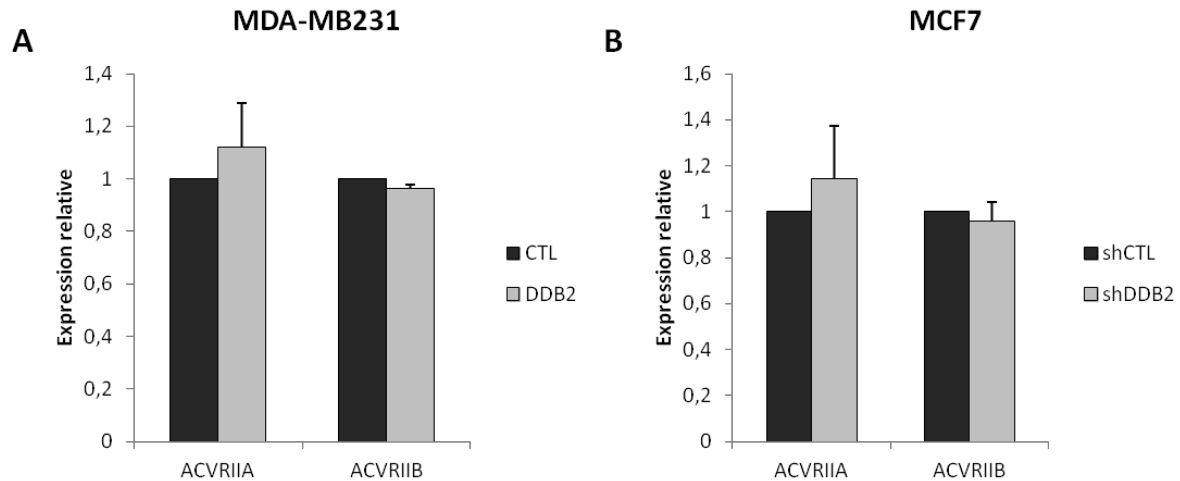
#### A. Influence de DDB2 sur l'activité transcriptionnelle des Smads 2/3 en présence du récepteur Alk4 de l'activine A et du TGFβ1

L'étude de l'influence de DDB2 sur l'activité transcriptionnelle des Smads nous a conduits à co-transfecter un plasmide contenant la séquence codante du récepteur de type I de l'activine, appelé Alk4, afin de vérifier la fonctionnalité de la construction plasmidique pGL3-CAGA. En effet, d'après (Mazerbourg et al., 2004), l'activité transcriptionnelle sur l'élément de réponse CAGA augmente fortement en présence de Alk4.

Contrairement à ce qui était attendu, aucune activité transcriptionnelle sur les éléments CAGA n'est observée dans les cellules MDA-MB231 CTL ou DDB2, exprimant Alk4. Cependant, l'expression d'Alk4 en présence du TGFβ1, entraîne une augmentation significative de l'activité transcriptionnelle sur les éléments de réponse CAGA dans les cellules MDA-MB231 CTL, comparativement au traitement avec le TGFβ1 seul. De façon surprenante, cette activité transcriptionnelle, en présence du TGFβ1 et lorsque Alk4 est exprimé, est diminuée d'environ 50% dans les cellules surexprimant DDB2 (**Figure 35A**). Concernant les cellules MCF7, l'activité transcriptionnelle sur les éléments CAGA est augmentée de 10 fois dans les cellules shCTL exprimant Alk4, par rapport à celles ne l'exprimant pas, comme cela était attendu (**Figure 35B**). Cette activité transcriptionnelle est d'autant plus augmentée, lorsque les cellules shCTL exprimant Alk4 sont exposées au TGFβ1. Les mêmes expériences réalisées avec les cellules MCF7 shDDB2 exprimant Alk4, révèlent que l'activité transcriptionnelle sur les éléments de réponse CAGA est significativement augmentée en présence ou non du TGFβ1, lorsque l'expression de DDB2 est inhibée, confirmant ainsi les résultats obtenus avec les cellules MDA-MB231. Ces résultats suggèrent donc que, non seulement le TGFβ1 semble activer la voie de signalisation de l'activine A dans les cellules tumorales mammaires, mais que cette dernière est également inhibée par la protéine DDB2.

#### B. Influence de DDB2 sur l'expression des récepteurs de l'activine A

Le récepteur Alk4 forme un hétéro-tétramère avec les récepteurs de type II à l'activine ACVRIIA et ACVRIIB. Dans l'hypothèse que l'influence de DDB2 sur l'activité transcriptionnelle des Smads 2/3 lorsque Alk4 est exprimée, dépend d'une modification de



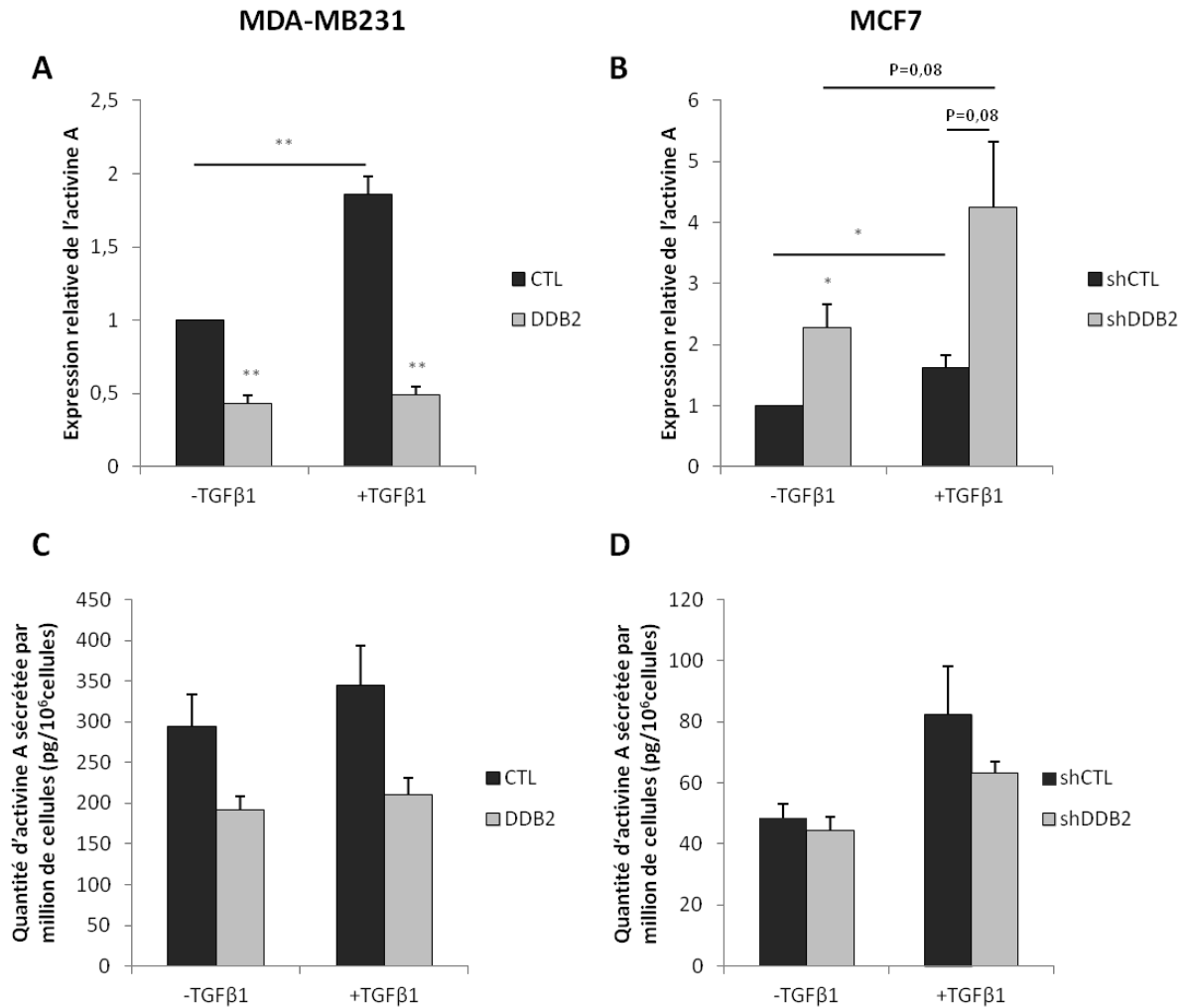
**Figure 36 : Influence de DDB2 sur l'expression des récepteurs de type II de l'activine A dans les cellules tumorales mammaires.** L'expression des récepteurs de type II de l'activine A (ACVRIIA et ACVRIIB) est étudiée par RT-PCR quantitative à partir d'ARNm extraits des cellules MDA-MB231 CTL et DDB2 (A), ainsi que des cellules MCF7 shCTL et shDDB2 (B). Le niveau d'expression de chaque gène est normalisé par celui des 2 gènes de référence, UBB et RPLPO. Les résultats sont exprimés en fonction du niveau d'expression fixé à 1 des gènes ACVRIIA et ACVRIIB dans les cellules contrôles et correspondent à la valeur moyenne de 4 expériences indépendantes  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne.

l'expression des récepteurs ACVRIIA et ACVRIIB dans les cellules tumorales mammaires, l'expression de ces derniers a été analysée par RT-PCR en temps réel. Cependant, les résultats ne montrent aucune différence significative de l'expression de ces deux récepteurs, aussi bien dans les cellules MDA-MB231 CTL et DDB2, que dans les cellules MCF7 shCTL et shDDB2 (**Figure 36**).

### C. Recherche du mécanisme à l'origine de l'influence de DDB2 sur la voie de signalisation issue d'Alk4

Nous avons émis l'hypothèse que DDB2 pourrait interférer avec la voie de signalisation issue du récepteur Alk4, en influençant l'expression des ligands activine A ou myostatine du récepteur. Ainsi, les niveaux d'expression des gènes codant l'activine A et la myostatine ont été étudiés par RT-PCR en temps réel dans les cellules tumorales, dont l'expression de DDB2 est modulée, et mises en présence du TGF $\beta$ 1 pendant 24 heures. Concernant la myostatine, son expression étant trop faible, celle-ci n'est pas détectée en RT-PCR en temps réel dans les 2 types de cellules tumorales mammaires, quelque-soit l'expression de DDB2 et la présence ou non du TGF $\beta$ 1. En revanche, l'expression de l'activine A est inhibée de 50% dans les MDA-MB231 exprimant DDB2, par rapport aux cellules contrôles, sans traitement avec le TGF $\beta$ 1. Cette inhibition est d'autant plus marquée dans les cellules MDA-MB231 DDB2, en présence de TGF $\beta$ 1, puisque l'expression de l'activine A est induite d'un facteur 2 dans les cellules MDA-MB231 CTL exposées au facteur de croissance (**Figure 37A**). Ces résultats sont confirmés avec les cellules MCF7, dans lesquelles l'expression de l'activine A est augmentée de 2,4 fois en absence de traitement avec le TGF $\beta$ 1, dans les cellules MCF7 shDDB2 par rapport aux cellules shCTL. De même, la différence persiste entre les cellules MCF7 shDDB2 et shCTL, après traitement avec le TGF $\beta$ 1 qui induit l'expression de l'activine A dans les deux cas, même si elle n'est pas significative pour un  $p=0,08$  (**Figure 37B**).

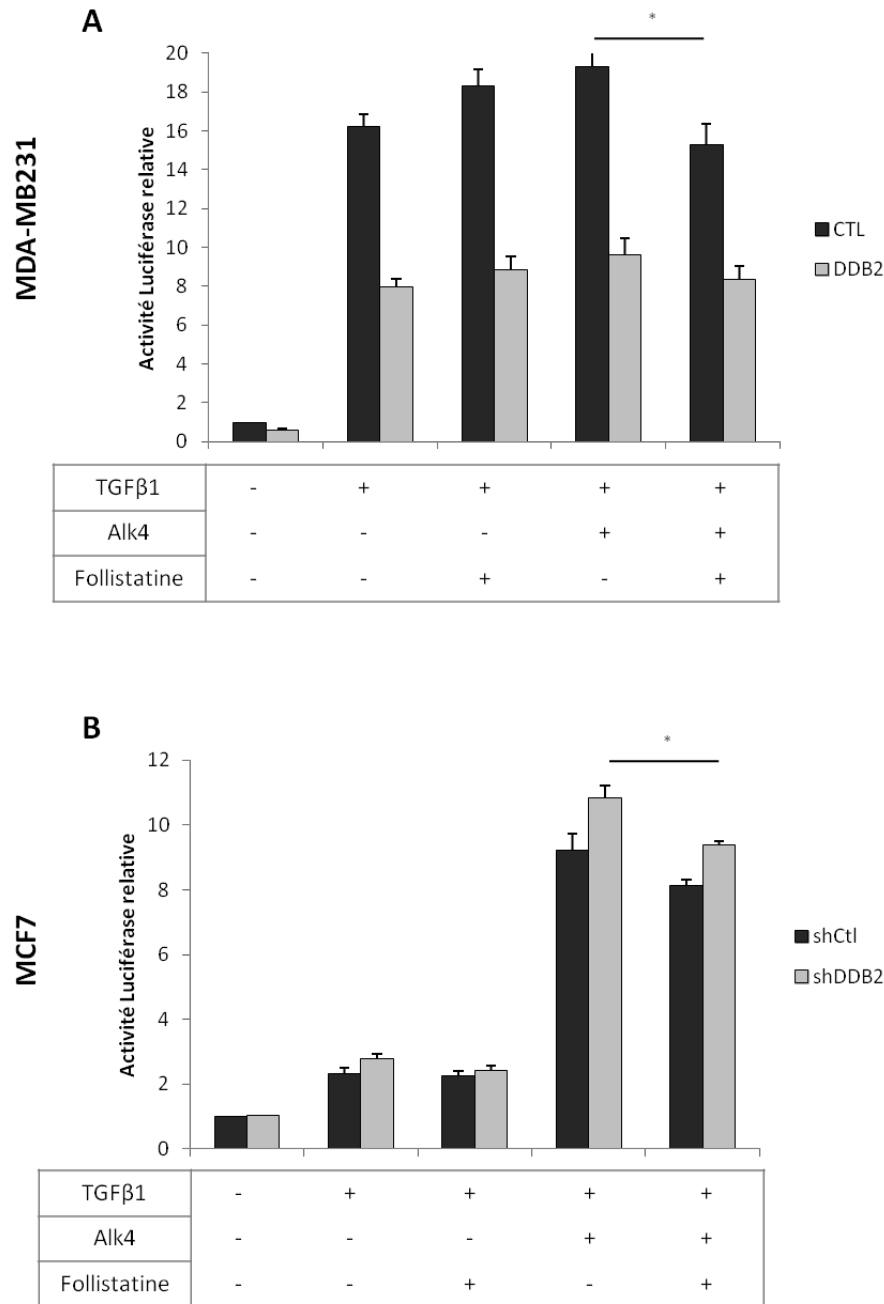
Nous avons analysé le niveau protéique de l'activine A, en mesurant son niveau de sécrétion dans le milieu de culture des cellules tumorales mammaires, grâce à un test ELISA. En accord avec les résultats obtenus en RT-PCR quantitative, nous montrons que les cellules MDA-MB231 DDB2 sécrètent moins, mais de manière non significative, d'activine A (200pg/million de cellules) que les cellules CTL (300pg/million de cellules). Cette différence est également observée lorsque les cellules sont traitées avec le TGF $\beta$ 1, qui entraîne une légère augmentation mais non significative de la sécrétion de l'activine A (**Figure 37C**). En



**Figure 37 : Influence de DDB2 sur l'expression et la sécrétion de l'actinine A dans les cellules tumorales mammaires.** L'expression de l'actinine A est étudiée par RT-PCR en temps réel à partir d'ARNm extraits des cellules MDA-MB231 CTL et DDB2 (A), ainsi que des cellules MCF7 shCTL et shDDB2 (B), traitées ou non avec le TGFβ1 à 5ng/mL pendant 24 heures. Le niveau d'expression de l'actinine A est normalisé par celui des 2 gènes de référence, UBB et RPLPO. Les résultats sont exprimés en fonction du niveau d'expression fixé à 1 de l'actinine A dans les cellules contrôles et non traitées avec le TGFβ1, et correspondent à la moyenne de 4 expériences indépendantes ± l'erreur standard à la moyenne. Le niveau de sécrétion de l'actinine A est évalué par un test ELISA. Après 48 heures, le milieu de culture des cellules MDA-MB231 (C) et MCF7 (D), traitées ou non avec le TGFβ1, est récupéré pour doser l'actinine A par le test ELISA. Les résultats sont exprimés en picogrammes d'actinine A par million de cellules comme la moyenne de 3 expériences indépendantes ± l'erreur standard à la moyenne. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

revanche, le niveau de sécrétion de l'activine A par les cellules MCF7 shCTL ou shDDB2 est très faible et à la limite inférieure de la gamme de dilution, contrairement aux cellules MDA-MB231. Aucune différence n'est observée entre les cellules MCF7 shCTL et shDDB2 en absence de TGF $\beta$ 1. Néanmoins, cette sécrétion d'activine A est augmentée d'environ un facteur 2, lorsque les cellules MCF7 sont traitées avec le TGF $\beta$ 1, avec une tendance plus élevée pour les cellules shCTL (**Figure 37D**).

Ces données restent à confirmer, mais suggèrent déjà que le TGF $\beta$ 1 semble induire l'expression de l'activine A dans les cellules tumorales mammaires, pouvant expliquer l'activation du récepteur Alk4 en sa présence, et l'inhibition exercée par la protéine DDB2 selon les résultats présentés précédemment. Afin de vérifier cela, nous avons évalué l'activité transcriptionnelle des Smads 2/3 par des expériences de transfection des cellules avec les gènes rapporteurs de type luciférase et le gène codant Alk4, en présence ou non de follistatine, un inhibiteur de l'activine A. Celui-ci interagit avec le ligand et l'empêche ainsi de se fixer sur son récepteur Alk4. Les cellules tumorales mammaires, dont l'expression de DDB2 est modulée, sont ainsi transfectées ou non avec le gène codant Alk4 et traitées ou non pendant 24 heures avec le TGF $\beta$ 1 et/ou la follistatine. Les résultats montrent que l'addition de follistatine inhibe de façon significative l'activité transcriptionnelle des Smads 2/3 induite par le TGF $\beta$ 1 mais seulement lorsque les cellules MDA-MB231 CTL expriment Alk4. Comme précédemment, l'activité transcriptionnelle des Smads 2/3 est au moins 2 fois plus faible dans les cellules MDA-MB231 DDB2, quelque-soit la présence ou non du TGF $\beta$ 1 et la follistatine, ou l'expression d'Alk4 (**Figure 38A**). De la même manière, l'addition de follistatine inhibe de façon significative mais faiblement, l'activité transcriptionnelle des Smads 2/3 induite par le TGF $\beta$ 1, seulement lorsque les cellules MCF7 shCTL ou shDDB2 expriment Alk4. Nous retrouvons une activité transcriptionnelle des Smads 2/3 plus élevée dans les cellules MCF7 shDDB2, comme précédemment, lorsqu'elles expriment Alk4 et après traitement avec le TGF $\beta$ 1, mais faiblement inhibée par la follistatine (**Figure 38B**).



**Figure 38 : Influence de DDB2 sur la voie de signalisation dépendante de Alk4 et induite par le TGFβ1 dans les cellules tumorales mammaires.** Les cellules MDA-MB231 (A) et MCF7 (B) sont transfectées avec un plasmide contenant le gène d'Alk4 et un autre exprimant le gène de la luciférase firefly, placé sous le contrôle de l'élément CAGA spécifique des Smads 2/3. Douze heures après transfection, les cellules sont traitées ou non pendant 24 heures avec du TGFβ1 à 5ng/mL et de la follistatine à 400ng/mL. Le plasmide contenant le gène codant la luciférase renilla est également introduit dans les cellules pour vérifier et normaliser l'efficacité de la transfection avec le plasmide exprimant la luciférase firefly. Les résultats sont exprimés en fonction des cellules contrôles non traitées avec le TGFβ1 et la follistatine, et n'exprimant pas Alk4, et correspondent à la valeur moyenne de 4 expériences indépendantes ± l'erreur standard à la moyenne. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.



Ces résultats, utilisant la follistatine, semblent bien nous indiquer que le TGF $\beta$ 1 aurait pour nouveau gène cible celui codant l'activine A, qui à son tour activerait une voie de signalisation dépendante du récepteur Alk4 dans les cellules tumorales mammaires. Il restera à définir la réponse biologique déclenchée sur les cellules tumorales mammaires, dépendante de l'activine A. Enfin, cette voie de signalisation serait contrôlée négativement dans les cellules tumorales mammaires qui expriment DDB2, puisque nous avons décrit plus haut dans ce travail, l'influence négative qu'exerce cette protéine sur la voie de signalisation du TGF $\beta$ 1.

# DISCUSSION

## **I. Modulation par DDB2 des propriétés nanomécaniques et des capacités d'adhérence des cellules tumorales mammaires**

En plus de son rôle dans la réparation de l'ADN, la protéine DDB2 est également impliquée dans la tumorigenèse mammaire en régulant notamment les capacités prolifératives et invasives des cellules tumorales mammaires. Ses nouvelles activités biologiques viennent de ses capacités à influencer l'expression de gènes cibles, en particulier ceux codant la superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD) et l'inhibiteur du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ). Les travaux réalisés au laboratoire ont notamment mis en évidence que l'expression de la protéine DDB2 dans les cellules tumorales mammaires est associée à une diminution de l'activité du facteur NF- $\kappa$ B et par conséquent à une baisse des capacités migratrices et invasives. En parallèle, une autre étude, menée par Roy et collaborateurs sur des cellules de cancer du colon, a démontré que l'expression de DDB2 s'oppose à la TEM. En effet, ces travaux ont permis de montrer que la protéine DDB2 était capable de réguler négativement l'expression des facteurs de transcription, impliqués dans ces processus, Snail et Zeb1, en se fixant directement sur une région promotrice de ces derniers. La TEM permet l'acquisition des capacités migratrices et invasives, en affectant profondément l'organisation du cytosquelette et les propriétés d'adhérence des cellules. Cependant, même si plusieurs travaux se sont intéressés au rôle de DDB2 dans les capacités invasives de cellules tumorales, son implication dans les capacités d'adhérence n'est pas connue à ce jour. C'est dans ce contexte que s'est inscrit le premier objectif de ce travail de thèse qui vise à étudier les propriétés d'adhérence des cellules tumorales mammaires selon le niveau d'expression de la protéine.

Les capacités d'adhérence à différentes protéines matricielles ont été analysées dans deux lignées d'adénocarcinomes mammaires, les cellules MDA-MB231 et les MCF7, dans lesquelles l'expression de DDB2 a été modulée. Nos résultats montrent qu'il n'existe aucune différence d'adhérence sur les protéines matricielles en fonction de l'expression de DDB2. En revanche, l'expression de DDB2 semble être associée à une perte d'adhérence des cellules tumorales mammaires sur des surfaces telles que le plastique ou le verre. Dans ce sens, la mesure de la force d'adhérence des cellules à la pointe du microscope de force atomique, composée de silice, démontre une baisse de cette dernière dans les cellules exprimant DDB2. La silice ayant des propriétés physico-chimiques assez proches du verre, ces résultats

confirment ainsi la modification de l'adhésion des cellules sur le verre. Ainsi, nos résultats montrent que DDB2 semble réduire les capacités d'adhérence non spécifiques des cellules tumorales mammaires. Ces modifications nous ont amenés à penser que l'expression de DDB2 pourrait être responsable de modifications de la composition membranaire et/ou des propriétés nanomécaniques des membranes intervenant dans les interactions électrostatiques et hydrophiles mises en jeu. En effet, certaines études ont démontré que la composition des membranes et notamment la quantité de cholestérol dans les membranes pouvait affecter l'adhésion des cellules sur le plastique (Ramprasad et al., 2007). Par ailleurs, la distribution des protéines membranaire (Nicolson, 2014), phénomène directement relié à la fluidité des membranes, ainsi que la production de certaines glycoprotéines (Komatsu et al., 1997) peuvent également affecter l'adhésion cellulaire. C'est dans ce contexte que nous avons mesuré les propriétés nanomécaniques des membranes plasmiques par microscopie de force atomique dans les cellules exprimant ou non DDB2. De manière intéressante, cette étude a révélé que l'expression de DDB2 dans les cellules tumorales mammaires est associée à une augmentation de l'élasticité de la membrane plasmique. L'organisation du cytosquelette, et en particulier celui d'actine, est largement décrit comme un facteur influençant directement la rigidité de la membrane plasmique (Collinsworth et al., 2002; Liu et al., 2014). Dans ce sens, nous nous sommes intéressés à l'organisation du cytosquelette d'actine dans nos modèles cellulaires. Qu'il s'agisse des cellules MDA-MB231 ou MCF7, l'expression de DDB2 dans ces cellules est associée à une diminution du réseau d'actine corticale, pouvant être l'origine de l'augmentation de l'élasticité membranaire observée par microscopie de force atomique. Dans ce sens, une analyse transcriptomique, réalisée précédemment au laboratoire sur des cellules MCF7 dont l'expression de DDB2 est inhibée, a révélé que l'expression de différents gènes codant des protéines en lien avec le cytosquelette d'actine est modulée en fonction du statut DDB2. C'est notamment le cas du gène codant la destrine, un facteur de dépolymérisation de l'actine (Klose et al., 2012). Son expression est augmentée lorsque DDB2 est exprimée, événement qui pourrait être à l'origine de la perte d'actine corticale observée dans les cellules tumorales mammaires exprimant DDB2. L'influence de DDB2 sur l'expression de cette protéine et son rôle potentiel dans l'organisation du cytosquelette, devront néanmoins être vérifiés par la suite.

Dans le cadre de ce travail, ces données de puces à ADN ont été complétées par une analyse transcriptomique plus restreinte, par PCR-Array, ciblant spécifiquement l'expression de gènes impliqués dans l'adhérence. Cette analyse a eu pour but d'identifier les voies de

signalisation, potentiellement à l'origine de la modulation des capacités d'adhérence et des propriétés nanomécaniques dans les cellules tumorales exprimant DDB2. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que le niveau d'expression de trois gènes est modulé en fonction du statut DDB2, que ce soit dans les cellules MDA-MB231 ou dans les MCF7. Ces gènes codent deux types de protéines : des facteurs de croissance que sont le TGF $\beta$ 1 et le CTGF et dont l'expression est diminuée lorsque DDB2 est exprimée, et une protéine transmembranaire ICAM-1 qui elle, au contraire, est augmentée en présence de la protéine DDB2. De nombreuses études rapportent l'implication de ces protéines dans les capacités d'adhérence et les processus invasifs des cellules tumorales (Chien et al., 2011; Mourskaia et al., 2009; Rosette et al., 2005) et sont en accord avec l'effet négatif de DDB2 sur les capacités migratrices et invasives des cellules tumorales mammaires. Néanmoins, parmi ces trois gènes, différenciellement exprimés en fonction de DDB2, celui codant le TGF $\beta$ 1 a particulièrement retenu notre attention. En effet, celui-ci est décrit dans la littérature pour induire une réorganisation du cytosquelette d'actine et une augmentation du module d'Young (Buckley et al., 2012; Wu et al., 2014).

## **II. Inhibition par DDB2 de la voie de signalisation induite par le TGF $\beta$ 1 et conséquences biologiques possibles sur les cellules tumorales mammaires**

L'analyse par PCR-Array, ciblant des gènes impliqués dans l'adhérence, suivie d'une analyse par le logiciel STRING, révèle que, malgré la grande diversité des gènes différenciellement exprimés dans les deux types cellulaires, un certain nombre d'entre eux se sont avérés être en lien avec la voie du TGF $\beta$ . Comme cette voie de signalisation a été particulièrement impliquée dans la régulation de différents processus biologiques, nous avons étudié l'influence de DDB2 sur cette voie. Les résultats obtenus ont permis de révéler, que DDB2 pourrait être un nouveau régulateur du TGF $\beta$ 1, en inhibant l'activité transcriptionnelle des Smads et donc l'expression de nombreux gènes cibles dans les cellules d'adénocarcinomes mammaires MDA-MB231 et MCF7. Cette activité inhibitrice de DDB2 ne dépend pas d'une action sur l'expression d'effecteurs de la voie du TGF $\beta$ 1, ni sur l'expression autocrine de ce facteur de croissance. Pour ce dernier point, même si une diminution de l'expression endogène du TGF $\beta$ 1 est observée en PCR array, elle ne se traduit pas par une diminution de la sécrétion de la protéine, qui s'avère être faiblement sécrétée par

les cellules tumorales, MDA-MB231 et MCF7. Le TGF $\beta$ 1, par l'intermédiaire de ses gènes cibles, est impliqué, dans les modifications des propriétés adhérentes, migratrices et invasives, dans l'inhibition de la prolifération cellulaire, ainsi que dans la réponse aux traitements anticancéreux.

Dans notre travail, même si l'inhibition de la voie du TGF $\beta$  ne semble pas associée à des modifications des propriétés d'adhérence, nous ne pouvons pas exclure qu'elle soit un mécanisme par lequel DDB2 intervienne dans les propriétés nanomécaniques des membranes des cellules tumorales mammaires. En effet, une étude révèle que des cellules épithéliales alvéolaires pulmonaires traitées avec du TGF $\beta$ 1 présentent un remaniement du cytosquelette d'actine et une augmentation de la rigidité de leur membrane plasmique (Buckley et al., 2012). Ainsi, les cellules MDA-MB231 exprimant ou non DDB2 présentent une variation de sensibilité au TGF $\beta$  contenu dans le sérum de leur milieu de culture, qui pourrait expliquer la modulation des propriétés nanomécaniques mises en évidence par microscopie de force atomique.

En plus des propriétés d'adhérence et nanomécaniques des membranes, le TGF $\beta$  est également décrit pour conduire les cellules tumorales à acquérir des capacités migratrices et invasives, souvent responsables des capacités métastatiques, en induisant la TEM. Dans ce travail, notre étude montre que DDB2 est capable de s'opposer à la mise en place de la TEM dans les cellules tumorales mammaires MCF7 au fil de leur passage en culture. L'activité inhibitrice de DDB2 sur la TEM peut être reliée à son action inhibitrice sur la voie du TGF $\beta$ , et ce notamment de part son implication dans la régulation de l'expression de gènes tels que *SNAI1*, *ZEB1*, *PAIL*, etc... (Brandl et al., 2010; Joseph et al., 2014; Vayalil et al., 2007). L'induction de la TEM dans les cellules MCF7 a été décrite comme particulièrement difficile, et ce notamment dû à une chromatine fermée au niveau du promoteur de gènes inducteurs de ce processus, tel que celui de *ZEB1* (Brown et al., 2004; Chaffer et al., 2013). Néanmoins, d'autres études ont au contraire démontré que les cellules MCF7 peuvent subir spontanément une TEM, notamment en culture prolongée sous forme de mammosphères (Guttilla et al., 2012), ou en exprimant la protéine à homéodomaine Six1 suite à une suractivation de la voie de signalisation du TGF $\beta$  (Micalizzi et al., 2009). De plus, le fait que les cellules MCF7 shDDB2 subissent au cours du temps la TEM plus rapidement que les MCF7 shCTL, nous laisse penser que cet effet soit sous l'influence du TGF $\beta$  contenu dans le sérum lorsque l'expression de DDB2 est inhibée expérimentalement. Les cellules MCF7 shDDB2 présentent spontanément des modifications moléculaires et morphologiques s'apparentant à la TEM, à

savoir une induction de l'expression de Snail et une perte de la E-cadhérine membranaire. De même, les cellules MDA-MB231 DDB2 expriment moins en conséquence le gène *SNAIL*, induit en présence de TGF $\beta$ 1. Cependant, il faudra vérifier si cette variation d'expression de Snail, en présence de TGF $\beta$ 1, est dépendante d'une interaction directe de DDB2 sur le promoteur de ce gène. Il a été montré récemment que DDB2, en se fixant sur le promoteur de gènes, dont celui codant Snail, inhibe son expression et s'oppose ainsi à la TEM dans les cellules d'adénocarcinome colique (Roy et al., 2013), et ce indépendamment du TGF $\beta$ 1.

Les observations montrant que DDB2 s'oppose à la TEM, viennent compléter les données récemment publiées par le laboratoire et d'autres, qui montrent que cette protéine empêche les cellules tumorales d'acquérir des capacités migratrices et invasives (Ennen et al., 2013). Or, l'acquisition et le maintien de ces propriétés sont souvent sous le contrôle de la voie de signalisation induite par le TGF $\beta$ 1. Ce facteur de croissance joue un rôle essentiel dans le développement de métastases, en particulier au niveau de l'os par les cellules tumorales d'origine mammaire (Mourskaia et al., 2009; Xu et al., 2015). De plus, cette voie de signalisation est responsable de l'induction de nombreux gènes cibles, dont les protéines correspondantes jouent un rôle particulièrement important dans les processus invasifs et métastatiques des cellules tumorales. Parmi ces gènes, trois d'entre eux ont été étudiés dans le cadre de ce travail, dont l'expression induite par le TGF $\beta$ 1 est fortement diminuée dans les cellules tumorales mammaires exprimant DDB2. Nous venons de parler de *SNAIL*. Le 2<sup>ème</sup> est celui codant le CTGF, qui joue un rôle important dans le développement des métastases pulmonaires par les cellules tumorales d'origine mammaire (Chien et al., 2011). L'inhibition de son expression induite en présence du TGF $\beta$ 1 dans les cellules tumorales MDA-MB231 DDB2 expliquerait que ces cellules développent beaucoup moins de métastases dans le parenchyme pulmonaire (Ennen et al., 2013). Ce mécanisme pourrait donc s'ajouter à celui mis en évidence lors de cette étude, qui correspond au contrôle négatif qu'exerce DDB2 sur l'activité de NF- $\kappa$ B, en induisant le gène codant I $\kappa$ B $\alpha$ . Par ailleurs, comme le CTGF semble également favoriser les métastases ostéolytiques, caractéristiques des tumeurs mammaires (Shimo et al., 2006), il pourrait être intéressant d'étudier l'influence de DDB2 sur le développement des métastases osseuses. Le 3<sup>ème</sup> gène cible du TGF $\beta$  étudié durant ce travail est celui codant PAI-1, dont l'expression élevée dans les tumeurs mammaires est considérée dans la littérature comme de mauvais pronostic, car la protéine correspondante joue un rôle important dans le processus de migration et d'invasion des cellules tumorales et favorise ainsi le développement de métastases (Duffy et al., 2014; Meryet-Figuières et al., 2007).

L'inhibition de son expression, induite par le TGF $\beta$ 1, en présence de DDB2 concorde également avec le fait que cette dernière s'oppose donc aux capacités invasives *in vitro* et *in vivo* des cellules tumorales mammaires (Ennen et al., 2013).

Nous pouvons relier l'action inhibitrice de DDB2 sur la voie du TGF $\beta$ 1 à une autre conséquence biologique, étudiée lors de travaux antérieurs du laboratoire. Il s'agit de l'action stimulatrice de DDB2 sur la prolifération des cellules tumorales mammaires (Ennen et al., 2013; Kattan et al., 2008a). En effet, le TGF $\beta$ 1 est bien connu pour son action cytotatique, en particulier sur les cellules normales en prolifération, en induisant l'expression de gènes cibles tels que p15<sup>*INK4B*</sup> et p21<sup>*CIP1*</sup>, des inhibiteurs de CDK associées aux cyclines du cycle cellulaire (Gomis et al., 2006; Seoane et al., 2004). En accord avec nos résultats, plusieurs études révèlent que des lignées cellulaires tumorales ER positives du sein (MCF7 et T47D), qui surexpriment naturellement DDB2, sont insensibles à l'effet cytotatique du TGF $\beta$  (Bouquet et al., 2011; Lynch et al., 2001). Cette insensibilité pourrait donc être due à l'action inhibitrice qu'exerce DDB2 sur cette voie et conforterait les données antérieures du laboratoire, démontrant l'influence négative de DDB2 sur l'expression de la MnSOD, une enzyme antioxydante connue pour son rôle dans le développement des tumeurs (Minig et al., 2009). Ces travaux de 2009 constituait le premier travail ayant permis de démontrer que DDB2 pouvait contrôler la transcription de gènes cibles en se fixant sur une séquence d'ADN spécifique. Concernant les cellules MDA-MB231, les études menées sur l'action inhibitrice du TGF $\beta$ 1 sur la prolifération de ces cellules tumorales mammaires triple-négatives sont plus controversées (Chen et al., 2001; Gomis et al., 2006). Tandis que les cellules de la lignée Hs578T montrent une sensibilité nette au TGF $\beta$ , celles de la lignée MDA-MB231 sont tour à tour identifiées sensibles et insensibles à l'inhibition de la prolifération cellulaire par le facteur de croissance ((Lynch et al., 2001). Dans ce travail, nous avons montré que les cellules MDA-MB231, en mesurant l'activité transcriptionnelle des Smads sont sensibles au TGF $\beta$ 1 ajouté ou déjà contenu dans le sérum et que cette activité est inhibée lorsque DDB2 est surexprimée. Ceci pourrait également expliquer en partie, comme pour les cellules MCF7, que les cellules MDA-MB231 ont des capacités prolifératives augmentées lorsqu'elles surexpriment DDB2 (Kattan et al., 2008). Une autre étude très récente a mis en évidence une relation entre la protéine DDB2 et le TGF $\beta$  dans un modèle de cellules tumorales ovariennes. Contrairement au modèle de cellules tumorales mammaires, DDB2 semble responsable d'une baisse de la prolifération des cellules tumorales ovariennes en favorisant l'activation de la voie de transduction du TGF $\beta$ . Les auteurs ont montré que DDB2 active cette voie, en



intervenant négativement sur l'expression de NEDD4L, une ubiquitine ligase qui entraîne la dégradation du récepteur du TGF $\beta$  et donc une baisse de la sensibilité des cellules à ce facteur de croissance (Zhao et al., 2015a).

Nous pouvons également relier l'action inhibitrice de DDB2 sur la voie du TGF $\beta$ 1 au rôle chimiosensibilisant de cette protéine sur les cellules tumorales. En effet, il a été démontré que cette protéine, lorsqu'elle est surexprimée, augmente la sensibilité *in vitro* de lignées de cellules de carcinome ovarien à un agent anti-cancéreux comme le cisplatine, en inhibant l'expression du gène anti-apoptotique *bcl-2* (Barakat et al., 2010; Zhao et al., 2014). Dans un même temps, une étude menée au laboratoire démontre, à la fois *in vitro* et *in vivo*, que DDB2 conduit les cellules tumorales mammaires à une plus grande sensibilité à la doxorubicine et au 5-Fluorouracile, ainsi qu'à un agent inducteur de l'apoptose, le TNF $\alpha$ , et ce de manière dépendante de l'inhibition de l'expression du gène *bcl-2* (Thèse de R. Klotz, Octobre 2014). Cependant, DDB2 pourrait également jouer son rôle dans la chimiosensibilisation des cellules tumorales mammaires aux agents anticancéreux, en exerçant son action négative sur la voie de transduction du TGF $\beta$ . En effet, la participation de ce facteur de croissance, dans les phénomènes de résistances des cellules tumorales à différentes thérapies anticancéreuses, a largement été décrite. En activant sa voie de signalisation, le TGF $\beta$  est à l'origine d'une diminution de la sensibilité des cellules tumorales mammaires, en particulier les triple-négatives, à la doxorubicine ou au paclitaxel (Bandyopadhyay et al., 2010; Bhola et al., 2013). De plus, la sensibilité aux différents agents anticancéreux peut être restaurée en bloquant la voie du TGF $\beta$  grâce à un inhibiteur de l'activité kinase du récepteur membranaire de type I (Bandyopadhyay et al., 2010; Bhola et al., 2013; Kim et al., 2012). Ceci a également été montré vis-à-vis du cisplatine, d'anti-métabolites (5-Fluorouracile et Gemcitabine) et de la doxorubicine dans des cellules d'adénocarcinome colique et pancréatique (Brunen et al., 2013; Kim et al., 2012). Cette activité semble être reliée à la capacité du TGF $\beta$  d'induire la TEM, un phénotype souvent associé à une diminution de la sensibilité, voire à une résistance aux traitements anticancéreux (Li et al., 2015). De même, cette activité peut être également reliée à l'action cytostatique du TGF $\beta$ , puisque les traitements ciblent particulièrement les cellules ayant des capacités prolifératives élevées.

### III. DDB2 : un nouveau co-répresseur des Smads activées par le TGF $\beta$ 1 ?

La suite de ce travail a consisté à comprendre comment DDB2 est capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle des Smads induite par le TGF $\beta$ 1. Même si DDB2 a été montrée capable de participer à la régulation de l'expression de certains gènes cibles, nos résultats montrent que l'inhibition de DDB2 sur l'activité transcriptionnelle des Smads ne dépend pas d'une variation de l'expression du TGF $\beta$ 1, ni de celle d'effecteurs intervenant dans sa voie de signalisation. Une variation de l'expression des récepteurs du TGF $\beta$ 1 aurait pu être à l'origine de cette action négative de DDB2, sur la base d'études qui rapportent que les cellules tumorales mammaires insensibles au TGF $\beta$ , présentent une baisse du niveau d'expression transcriptionnelle des gènes codant le récepteur de type I et II du facteur de croissance (Kalkhoven et al., 1995; Lynch et al., 2001). Or dans nos conditions expérimentales, DDB2 n'affecte l'expression d'aucun de ces gènes. Les protéines Smads étant les médiateurs de la voie de signalisation du TGF $\beta$ 1, nous avons également analysé leur niveau d'expression. Aucune variation de leur expression n'a été observée en fonction du niveau d'expression de DDB2. Une variation dans l'expression des Smads effectrices 2, 3 et 4 est rarement observée, même dans des cellules tumorales mammaires insensibles au TGF $\beta$  (Xie et al., 2002). Concernant les protéines Smads inhibitrices 6 et 7, leur expression ne semble pas non plus affectée par la présence de la protéine DDB2, ne pouvant ainsi expliquer l'inhibition de la voie du TGF $\beta$  dans les cellules la surexprimant.

Un des mécanismes pouvant expliquer l'action inhibitrice de DDB2 sur l'activité des Smads, en dehors de leur expression, est une variation de leur phosphorylation et en conséquence de leur translocation nucléaire. Ces deux événements sont importants dans la transduction du signal dépendant du TGF $\beta$ . Dans notre modèle, la phosphorylation et la translocation nucléaire des Smads 2/3 ne semblent toutefois pas être inhibées dans les cellules MDA-MB231 exprimant DDB2. L'inactivation de la voie de signalisation induite par le TGF $\beta$ 1 peut résulter de deux phénomènes : la déphosphorylation des Smads et leur dégradation par le protéasome. En effet, il est connu que les Smads activées dans le noyau peuvent être déphosphorylées par une phosphatase appelée PPM1A (Lin et al., 2006), ou dégradées suite à l'ajout de groupement ubiquitine par NEDD4L (Gao et al., 2009). Bien que DDB2 ait déjà été démontrée capable d'induire la dégradation de facteurs de transcription (Chang et al., 2012), l'inhibition de l'activité transcriptionnelle des Smads par DDB2 ne semble pas faire intervenir une déphosphorylation ou une dégradation des Smads. Ces

résultats devront être confirmés dans les cellules MCF7 dont l'expression de DDB2 est inhibée.

L'autre mécanisme susceptible d'expliquer l'action inhibitrice de DDB2 sur la voie de signalisation du TGF $\beta$  est son interaction sur le promoteur des gènes cibles de cette dernière. Les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine révèlent que lorsque DDB2 est présent sur le promoteur du gène cible du TGF $\beta$ , *PAI-1*, à proximité des sites de fixation SBE, les Smads 2 et 3 sont également retrouvées mais la présence de Smad4 n'est pas détectée sur ce promoteur. Au sein de ce mécanisme situé sur le promoteur du gène *PAI-1*, il n'est pas exclu également que DDB2 interagissent directement avec les Smads, fixée ou non sur l'ADN, ce que ne permet pas de révéler l'expérience d'immunoprécipitation de la chromatine. Ainsi, l'absence de Smad4 sur le promoteur de *PAI-1*, lorsque la protéine DDB2 est exprimée permet d'envisager un mécanisme de régulation similaire à celui mis en jeu par les protéines Ski et SnoN. En effet, ces protéines entrent en compétition avec Smad4 dans la formation du complexe R-Smads/Smad4 et inhibent ainsi l'activité transcriptionnelle des Smads (Stroschein et al., 1999b; Wu et al., 2002). De plus, les Smads 2 et 3 perdent également leur activité transcriptionnelle induite par le TGF $\beta$ , en interagissant avec la protéine STRAP (Serine-threonine kinase receptor associated-protein), qui comprend dans sa structure des répétitions WD40 (Datta and Moses, 2000). La découverte d'une telle interaction permet donc d'émettre l'hypothèse qu'elle puisse exister entre les Smads et la protéine DDB2, qui comprend également dans sa structure des répétitions WD40.

D'autre part, certains modes de régulation de l'activité transcriptionnelle des Smads mettent en jeu des protéines capables d'interagir avec DDB2. C'est le cas par exemple de PARP1 et de HDAC1. La protéine PARP1 greffe des groupements poly-ADP-riboses sur des protéines intervenant principalement dans la réparation de l'ADN pour augmenter leur activité. Au cours de la réparation au niveau de l'ADN lésé, la protéine DDB2 se retrouve ADP-Ribosylée par PARP1 avec qui elle interagit (Pines et al., 2012). De même, la protéine PARP1 peut interagir avec les Smads 2, 3 et 4, avec pour conséquence une ADP-Rybosylation des Smads 3 et 4, entraînant une inhibition de leur activité transcriptionnelle en déstabilisant leur interaction avec l'ADN (Lönn et al., 2010). Dans le cas de HDAC1, son interaction avec DDB2 est décrite comme l'origine de la régulation négative qu'exerce cette dernière sur l'expression du gène codant Bcl-2 (Zhao et al., 2014). La protéine HDAC1 intervient également dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des Smads, via son

recrutement par un facteur induit par le TGF $\beta$ , appelé TGIF qui interagit également avec les Smads 2 et 3 (Wotton et al., 1999a, 1999b). HDAC1 peut également être recrutée par l'intermédiaire de la protéine PIASy (Protein Inhibitor of Activated STAT) qui interagit aussi avec les protéines Smads 2, 3 et 4 (Long et al., 2003). L'inhibition de la voie de signalisation du TGF $\beta$ 1 par DDB2 pourrait donc dépendre du recrutement sur le promoteur du gène *PAI-1*, de la protéine PARP1 ou HDAC1 ou les deux, à proximité du complexe des Smads.

#### **IV. Relation entre les voies de signalisation du TGF $\beta$ 1 et de l'activine A, inhibées par DDB2**

Au cours de l'étude de l'influence de DDB2 sur la signalisation induite par le TGF $\beta$ 1, nous avons également utilisé des co-transfections du plasmide pGL3-CAGA avec un plasmide d'expression dans lequel se trouve la séquence codant le récepteur de type I à l'activine, Alk4. L'utilisation de ce plasmide devait nous permettre de vérifier la fonctionnalité de la construction pGL3-CAGA. En effet, le travail de Mazerbourg et collaborateurs a montré que la simple expression de Alk4, et sans ajout d'un quelconque ligand, induisait une activité transcriptionnelle des 12 répétitions CAGA (Mazerbourg et al., 2004). Cependant, dans nos modèles cellulaires, seule la lignée MCF7 présente une activation de l'élément CAGA lorsque le récepteur Alk4 est exprimé. Le récepteur de type I transfecté dans ce cas n'étant pas constitutivement actif, son activation requière la fixation du ligand. L'absence d'activité des Smads 2 et 3 dans les cellules MDA-MB231 exprimant Alk4 pourrait s'expliquer par une disponibilité réduite d'activine. En effet, une étude a rapporté qu'il existait une corrélation négative entre le grade de la tumeur et l'expression de l'activine A (Mylonas et al., 2005). Par ailleurs, le travail de Jeruss et collègues a montré une baisse du niveau d'expression du récepteur de type II de l'activine dans les tumeurs mammaires de haut grade (Jeruss et al., 2003). Ces deux éléments pourraient expliquer l'absence d'activation dépendante de Alk4 de l'élément CAGA dans les cellules MDA-MB231. D'autre part, nous avons également mis en évidence que les cellules exprimant le récepteur Alk4 et traitées avec du TGF $\beta$ 1 présentent une suractivation de l'élément CAGA, qui est réduite lorsque la protéine DDB2 est exprimée. Cependant, et de manière identique à la voie du TGF $\beta$ 1, cette inhibition ne relève pas d'une différence d'expression des récepteurs de type II à l'activine.

Par la suite, nous avons voulu comprendre les causes de la suractivation de l'élément CAGA en présence de Alk4 et de TGF $\beta$ 1. Certaines études ont pu observer au préalable qu'un traitement avec du TGF $\beta$ 1 de cellules stromales de la moëlle osseuse, mais aussi de cellules ovariennes induisait une augmentation de l'expression de l'activine A (Drummond et al., 2000; Maguer-Satta et al., 2001). Dans ce sens, nous avons analysé le niveau d'expression de l'activine A dans nos modèles de cellules cancéreuses mammaires, dont l'expression de DDB2 est modulée et traitées ou non avec du TGF $\beta$ 1. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que l'expression de l'activine A était induite par un traitement au TGF $\beta$ 1 et que cette induction était moins importante lorsque la protéine DDB2 est exprimée. La sécrétion d'activine A semble être augmentée en présence de TGF $\beta$ 1 mais ne paraît pas être influencée par l'expression de DDB2. Toutefois, l'utilisation d'un inhibiteur de l'activine A, la follistatine est associée à une perte partielle de la suractivation de l'élément CAGA en présence de TGF $\beta$ 1 et de Alk4. Cet effet de la follistatine a uniquement été observé dans les cellules exprimant faiblement DDB2 témoignant ainsi d'une augmentation de la sécrétion d'activine A par ces cellules. Ces résultats sont en accord avec une étude récente révélant que la traduction de l'ARNm codant l'activine A et sa sécrétion étaient stimulées par l'action du TGF $\beta$ 1 (Howley et al., 2015). L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'activine A constituerait un nouveau gène cible de la voie de signalisation du TGF $\beta$ 1, avec laquelle interfère la protéine DDB2. De plus, des sites potentiels de fixation des Smads ont été identifiés à l'aide d'un outil bioinformatique dans la région 5'-UTR du gène codant l'activine A. Cependant, cette hypothèse devra être approfondie par la suite en identifiant notamment les éléments de fixation des Smads sur le promoteur du gène codant l'activine A.

D'un point de vue biologique, l'activine A a des effets similaires à ceux induits par le TGF $\beta$ 1. En effet, l'activine A a également été décrite comme un facteur de croissance bloquant la progression dans le cycle cellulaire. Ces effets ont pu être observés dans plusieurs modèles cellulaires, qu'il s'agissent aussi bien de cellules de cancer du sein ou de la prostate (Burdette et al., 2005; Wang et al., 1999). Les mécanismes mis en œuvre dans l'arrêt de la prolifération cellulaire par l'activine A sont proches de ceux mis en place par le TGF $\beta$ 1. Une étude menée sur les cellules d'adénocarcinomes mammaires T47D a montré que l'effet cytotatique de l'activine A résultait de l'augmentation de l'expression des protéines p21, p27 et p15<sup>INK4B</sup> ainsi que de l'inhibition de l'expression de la cycline A (Loomans and Andl, 2014). Tout comme le TGF $\beta$ 1, l'activine A est également capable de favoriser l'invasion et la migration des cellules tumorales. Ce pouvoir pro-tumoral de l'activine A a notamment été

démonstré sur des lignées de cancers ovarien et mammaire (Bashir et al., 2015; Steller et al., 2005). Dans les carcinomes oesophagiens, la voie de signalisation de l'activine A favorise les capacités invasives des cellules tumorales en induisant l'expression d'une métallo-protéase matricielle, la MMP7 ainsi que celle de la N-cadhérine (Yoshinaga et al., 2004, 2008). Par ailleurs, l'action de l'activine A sur les cellules du système immunitaire favorise également l'échappement métastatique des cellules tumorales mammaires. En effet, ce facteur de croissance rend le micro-environnement tumoral favorable à la tumeur en réduisant la réponse cytotoxique des lymphocytes T et de cellules Natural Killer ainsi qu'en favorisant la sécrétion de MMPs par les macrophages (Loomans and Andl, 2014). Les conséquences biologiques de l'activine A sont proches de celles du TGF $\beta$ 1 et ces deux facteurs de croissance semblent pouvoir agir en synergie. En effet, le TGF $\beta$ 1 induit l'expression protéique et la sécrétion de l'activine A dans les cellules tumorales mammaires (Howley et al., 2015). L'ensemble de ces données suggèrent que la voie de signalisation du TGF $\beta$ 1 active celle de l'activine A, agissant ensuite de manière synergique et dont les effets sont inhibés par la protéine DDB2 dans les cellules tumorales mammaires.

# **CONCLUSION & PERSPECTIVES**

L'Institut National contre le Cancer (INCa) a défini 6 actions prioritaires dans la recherche contre le cancer, parmi lesquelles figure une action visant à comprendre les mécanismes moléculaires régissant les cancers. C'est dans ce contexte que s'inscrit la thématique du laboratoire qui vise à comprendre l'implication de la protéine DDB2 dans la tumorigenèse mammaire. Ce travail a permis d'apporter de nouveaux éléments quant au mode d'action de DDB2, permettant de mieux comprendre la diversité de ses rôles biologiques, dans la prolifération, les capacités invasives et la sensibilité aux agents thérapeutiques des cellules tumorales mammaires. Nous avons démontré que la protéine DDB2 est capable de modifier les capacités d'adhérence des cellules tumorales mammaires et de moduler leurs propriétés nanomécaniques, ce qui peut être relié au fait que cette protéine influence les capacités migratrices et invasives des cellules. L'augmentation de l'élasticité membranaire observée dans les cellules exprimant DDB2 pourrait résulter d'une perte du réseau d'actine corticale. Cependant, le mécanisme moléculaire à l'origine du remaniement du cytosquelette d'actine et des modifications des propriétés physico-chimiques des membranes en présence de DDB2 n'est pas connu et devra être éclairci.

Au cours de cette étude, nous nous sommes exclusivement intéressés aux courbes d'approches acquises par microscopie de force atomique. Il serait pertinent de traiter par la suite les courbes de retrait qui devraient nous fournir des informations supplémentaires quant aux capacités d'adhérence des cellules tumorales mammaires et notamment quant à la présence de protéines transmembranaires caractéristiques. Cette étude pourra par la suite être complétée par une analyse de la composition des membranes plasmiques, notamment de la présence et de la nature des glycosylations extracellulaires et de leur composition lipidique. Ces données supplémentaires pourraient nous permettre de comprendre la baisse des capacités d'adhérence au plastique et au verre des cellules tumorales mammaires exprimant DDB2 et de les corrélérer aux modifications des propriétés nanomécaniques que nous avons observées. Par ailleurs, des acquisitions réalisées par des pointes fonctionnalisées avec des protéines matricielles peuvent être envisagées afin d'évaluer de manière plus précise les capacités d'adhérence aux différentes protéines matricielles des cellules tumorales mammaires ayant une expression de DDB2 modulée. De plus, nous avons mis en évidence que l'expression de gènes impliqués dans l'adhérence était modulée en fonction de l'expression de DDB2. Afin de comprendre leur importance dans les capacités d'adhérence, il est nécessaire de vérifier dans un premier temps leur expression au niveau traductionnel afin d'identifier les plus pertinents, pouvant être responsable de la baisse des capacités d'adhérence.

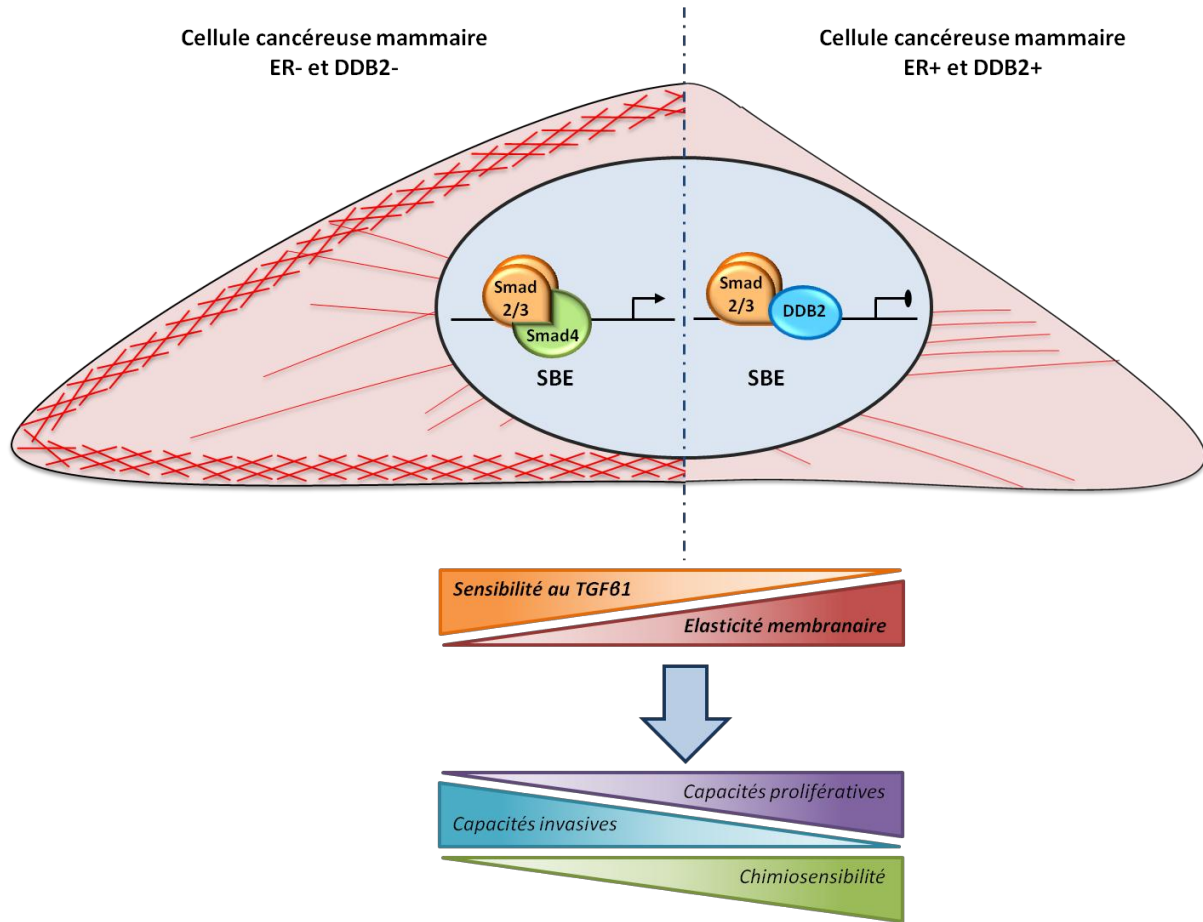


Suite à l'étude des capacités d'adhérence, nous nous sommes particulièrement intéressés à la voie de signalisation induite par le TGF $\beta$ 1 puisque de nombreux gènes y étant associés voyaient leur niveau d'expression modulé en fonction de l'expression de DDB2. Nos résultats ont également montré que la protéine DDB2 inhibe l'activité transcriptionnelle des Smads 2/3 activées par le TGF $\beta$ 1. Cependant, certains éléments concernant le mécanisme moléculaire et les conséquences biologiques restent encore à approfondir. Dans un premier temps, il nous faudra confirmer certains résultats préliminaires. En particulier, l'état de la phosphorylation des Smads 2 et 3 en présence de DDB2 devra être confirmée dans les cellules MCF7. De la même manière, le maintien de la fixation des Smads 2 et 3 sur le promoteur du gène *PAI-1*, malgré la présence de la protéine DDB2 sur celui-ci, devra être vérifiée. Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier la fixation de DDB2 sur d'autres promoteurs de gènes cibles du TGF $\beta$ 1. L'analyse d'autres promoteurs nous permettrait ainsi de savoir si la protéine DDB2 est capable d'interférer de manière ubiquitaire sur l'activité des Smads ou si cette inhibition est spécifique de certains gènes cibles. D'autre part, nos résultats d'immunoprécipitation de chromatine ont mis en évidence que la protéine DDB2 se fixait à proximité d'un des sites de fixation des Smads sur le promoteur du gène codant *PAI-1*. Toutefois, ces expériences ne permettent pas de savoir si DDB2 interagit directement avec les Smads sur leur site de fixation. Dans ce sens, des expériences d'immunoprécipitation et de gel retard seront réalisées prochainement afin de préciser le mode de régulation des Smads par DDB2.

Aux vues de l'inhibition de la voie du TGF $\beta$ 1 par DDB2 et de l'influence de ces deux protéines dans l'acquisition des propriétés invasives des cellules cancéreuses, il conviendra par la suite d'analyser l'impact de DDB2 sur la TEM induite par le TGF $\beta$ 1. Les travaux de Roy et collègues ont déjà démontré que l'inhibition de l'expression de DDB2 dans des cellules de cancers coliques menait ces cellules vers la TEM (Roy et al., 2013). D'autre part, nous avons également pu observer qu'après 15 passages en culture, les cellules MCF7 dont l'expression de DDB2 est inhibée subissent des modifications morphologiques et moléculaires similaires à la TEM. Ces premières observations devront être approfondies, en étudiant notamment l'expression d'autres marqueurs de la TEM (N-cadhérine, Vimentine, Zeb1). De plus, l'origine de cette transition spontanée, et en particulier l'implication du TGF $\beta$ 1, devra être éclaircie. L'influence de DDB2 sur la TEM induite par le TGF $\beta$ 1 sera également étudiée dans un modèle de cellules mammaires normales, les MCF10A dans lesquelles la protéine DDB2 sera surexprimée.

D'autre part, au cours de ce travail nous avons mis en évidence que le TGF $\beta$ 1 semblait induire l'expression de l'activine A, induction qui est diminuée lorsque la protéine DDB2 est exprimée. Ces résultats semblent suggérer que l'activine A constituerait un nouveau gène cible des Smads 2/3 activées par le TGF $\beta$ 1. L'induction de l'expression de l'activine A en présence de TGF $\beta$ 1 a déjà été observée précédemment (Drummond et al., 2000; Maguer-Satta et al., 2001), sans que le mécanisme n'ait jamais été décrit. L'activine A ayant des conséquences biologiques similaires à celles du TGF $\beta$ 1, il serait intéressant de comprendre comment son expression est régulée par la voie de signalisation du TGF $\beta$ 1. De plus, il sera nécessaire de comprendre comment la protéine DDB2 inhibe l'expression du gène codant l'activine A.

L'influence de la protéine DDB2 sur la voie du TGF $\beta$ 1 est particulièrement intéressante puisque cette voie de signalisation fait actuellement l'objet de nouvelles thérapies ciblées (Connolly et al., 2012; Neuzillet et al., 2015). Ainsi, l'effet de DDB2 sur la voie du TGF $\beta$ 1 représente un intérêt clinique futur dans l'utilisation de ces nouvelles thérapies ciblées. Toutefois, la protéine DDB2 étant différentiellement exprimée dans les tumeurs mammaires, la compréhension des mécanismes régulant son expression représente une perspective particulièrement intéressante, qui pourrait permettre de limiter la progression des tumeurs mammaires.



**Figure 39 : Schéma de synthèse montrant la relation entre DDB2 et le TGF $\beta$  et les conséquences biologiques potentielles sur les cellules tumorales mammaires.** Dans les cellules tumorales mammaires, DDB2 est associée avec une perte du réseau d'actine corticale, en partie à l'origine d'un assouplissement de la membrane plasmique des cellules exprimant DDB2. Cette protéine semble donc avoir des conséquences sur l'architecture cellulaire. DDB2, en se fixant sur l'ADN à proximité des sites de fixation des Smads, inhibe la voie du TGF $\beta$ 1 dans les cellules tumorales mammaires. L'inhibition de la voie du TGF $\beta$ 1 par DDB2 semble être une piste prometteuse pouvant expliquer ces modifications des propriétés nanomécaniques, puisque le TGF $\beta$ 1 est un facteur connu pour induire la réorganisation du cytosquelette d'actine. L'interférence de DDB2 avec la voie de signalisation du TGF $\beta$ 1 pourrait constituer un autre mode de régulation des capacités prolifératives et invasives ainsi que de la chimiosensibilité des cellules tumorales mammaires.

En conclusion, ce travail de thèse a permis de mettre en évidence qu'au-delà des propriétés migratrices et invasives, DDB2 est capable de modifier les capacités d'adhérence des cellules tumorales mammaires, ainsi que les propriétés nanomécaniques de leur membrane plasmique. La recherche du mécanisme moléculaire responsable des ces modifications a permis de révéler que la voie de signalisation induite par le TGF $\beta$ 1 était inhibée dans les cellules exprimant DDB2. Ces données viennent compléter les résultats du laboratoire et permettent de préciser le mode d'action DDB2 dans la tumorigenèse mammaire, représenté sur la **figure 39**. Nos résultats renforcent l'intérêt clinique de la protéine DDB2 en tant que marqueur prédictif de la progression des tumeurs mammaires, au travers de sa relation avec le TGF $\beta$ , qui est bien décrit dans le développement des métastases. Par ailleurs, son influence négative sur la voie de signalisation du TGF $\beta$ 1 lui confère un rôle potentiel, prédictif de la réponse aux thérapies ciblant cette voie de signalisation, qui constituent actuellement de nouvelles pistes dans le traitement des tumeurs mammaires.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

**A, B**

Agricola, E., Randall, R.A., Gaarenstroom, T., Dupont, S., and Hill, C.S. (2011). Recruitment of TIF1 $\gamma$  to chromatin via its PHD finger-bromodomain activates its ubiquitin ligase and transcriptional repressor activities. *Mol. Cell* 43, 85–96.

Alarcón, C., Zaromytidou, A.-I., Xi, Q., Gao, S., Yu, J., Fujisawa, S., Barlas, A., Miller, A.N., Manova-Todorova, K., Macias, M.J., et al. (2009). Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. *Cell* 139, 757–769.

Aloraifi, F., Boland, M.R., Green, A.J., and Geraghty, J.G. (2015). Gene analysis techniques and susceptibility gene discovery in non-BRCA1/BRCA2 familial breast cancer. *Surg. Oncol.* 24, 100–109.

Anan, K., Tanaka, M., Yoshinaga, Y., Maeda, S., Yamaguchi, Y., Hayashi, M., Tanaka, M., Kamata, Y., Mashino, K., Yamamoto, Y., et al. (2015). [Effect of weekly paclitaxel followed by 5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide as neoadjuvant treatment for patients with triple-negative and luminal-type breast cancer - a multicenter study]. *Gan To Kagaku Ryoho* 42, 45–50.

Aragón, E., Goerner, N., Zaromytidou, A.-I., Xi, Q., Escobedo, A., Massagué, J., and Macias, M.J. (2011). A Smad action turnover switch operated by WW domain readers of a phosphoserine code. *Genes Dev.* 25, 1275–1288.

Arpino, G., Laucirica, R., and Elledge, R.M. (2005). Premalignant and In Situ Breast Disease: Biology and Clinical Implications. *Ann. Intern. Med.* 143, 446–457.

Atena, M., Reza, A.M., and Mehran, G. (2014). A Review on the Biology of Cancer Stem Cells. *Stem Cell Discov.* 04, 83–89.

Bailey, C.K., Mittal, M.K., Misra, S., and Chaudhuri, G. (2012). High Motility of Triple-negative Breast Cancer Cells Is Due to Repression of Plakoglobin Gene by Metastasis Modulator Protein SLUG. *J. Biol. Chem.* 287, 19472–19486.

Baker, E.L., Lu, J., Yu, D., Bonnacaze, R.T., and Zaman, M.H. (2010). Cancer cell stiffness: integrated roles of three-dimensional matrix stiffness and transforming potential. *Biophys. J.* 99, 2048–2057.

Bandyopadhyay, A., Wang, L., Agyin, J., Tang, Y., Lin, S., Yeh, I.-T., De, K., and Sun, L.-Z. (2010). Doxorubicin in combination with a small TGFbeta inhibitor: a potential novel therapy for metastatic breast cancer in mouse models. *PloS One* 5, e10365.

Barakat, B.M., Wang, Q.-E., Han, C., Milum, K., Yin, D.-T., Zhao, Q., Wani, G., Arafa, E.-S.A., El-Mahdy, M.A., and Wani, A.A. (2010). Overexpression of DDB2 enhances the sensitivity of human ovarian cancer cells to cisplatin by augmenting cellular apoptosis. *Int. J.*

Cancer J. Int. Cancer *127*, 977–988.

Barcellos-Hoff, M.H., and Akhurst, R.J. (2009). Transforming growth factor-beta in breast cancer: too much, too late. *Breast Cancer Res. BCR* *11*, 202.

Baselga, J. (2011). Targeting the Phosphoinositide-3 (PI3) Kinase Pathway in Breast Cancer. *The Oncologist* *16*, 12–19.

Bashir, M., Damineni, S., Mukherjee, G., and Kondaiiah, P. (2015). Activin-A signaling promotes epithelial–mesenchymal transition, invasion, and metastatic growth of breast cancer. *Npj Breast Cancer* *1*, 15007.

Batut, J., Schmierer, B., Cao, J., Raftery, L.A., Hill, C.S., and Howell, M. (2008). Two highly related regulatory subunits of PP2A exert opposite effects on TGF-beta/Activin/Nodal signalling. *Dev. Camb. Engl.* *135*, 2927–2937.

Bhola, N.E., Balko, J.M., Dugger, T.C., Kuba, M.G., Sánchez, V., Sanders, M., Stanford, J., Cook, R.S., and Arteaga, C.L. (2013). TGF- $\beta$  inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer. *J. Clin. Invest.* *123*, 1348–1358.

Boudreau, H.E., Casterline, B.W., Rada, B., Korzeniowska, A., and Leto, T.L. (2012). Nox4 involvement in TGF-beta and SMAD3-driven induction of the epithelial-to-mesenchymal transition and migration of breast epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* *53*, 1489–1499.

Bouquet, F., Pal, A., Pilonis, K.A., Demaria, S., Hann, B., Akhurst, R.J., Babb, J.S., Lonning, S.M., DeWyngaert, J.K., Formenti, S.C., et al. (2011). TGF $\beta$ 1 inhibition increases the radiosensitivity of breast cancer cells in vitro and promotes tumor control by radiation in vivo. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *17*, 6754–6765.

Brandl, M., Seidler, B., Haller, F., Adamski, J., Schmid, R.M., Saur, D., and Schneider, G. (2010). IKK $\alpha$  controls canonical TGF $\beta$ –SMAD signaling to regulate genes expressing SNAIL and SLUG during EMT in Panc1 cells. *J. Cell Sci.* *123*, 4231–4239.

Brown, K.A., Aakre, M.E., Gorska, A.E., Price, J.O., Eltom, S.E., Pietenpol, J.A., and Moses, H.L. (2004). Induction by transforming growth factor-beta1 of epithelial to mesenchymal transition is a rare event in vitro. *Breast Cancer Res. BCR* *6*, R215–R231.

Bruce, D.L., and Sapkota, G.P. (2012). Phosphatases in SMAD regulation. *FEBS Lett.* *586*, 1897–1905.

Brunen, D., Willems, S.M., Kellner, U., Midgley, R., Simon, I., and Bernards, R. (2013). TGF- $\beta$ . *Cell Cycle* *12*, 2960–2968.

Buckley, S.T., Medina, C., Davies, A.M., and Ehrhardt, C. (2012). Cytoskeletal re-arrangement in TGF- $\beta$ 1-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition studied by atomic force microscopy and high-content analysis. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* *8*, 355–364.

Burdette, J.E., Jeruss, J.S., Kurley, S.J., Lee, E.J., and Woodruff, T.K. (2005). Activin A mediates growth inhibition and cell cycle arrest through Smads in human breast cancer cells. *Cancer Res.* *65*, 7968–7975.

Burris, H.A. (2013). Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *71*, 829–842.

## C, D

de Caestecker, M. (2004). The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* *15*, 1–11.

Cai, Q., Fu, L., Wang, Z., Gan, N., Dai, X., and Wang, Y. (2014).  $\alpha$ -N-Methylation of Damaged DNA-binding Protein 2 (DDB2) and Its Function in Nucleotide Excision Repair. *J. Biol. Chem.* *289*, 16046–16056.

Canetta, E., Riches, A., Borger, E., Herrington, S., Dholakia, K., and Adya, A.K. (2014). Discrimination of bladder cancer cells from normal urothelial cells with high specificity and sensitivity: combined application of atomic force microscopy and modulated Raman spectroscopy. *Acta Biomater.* *10*, 2043–2055.

Castaño, Z., Marsh, T., Tadipatri, R., Kuznetsov, H.S., Al-Shahrour, F., Paktinat, M., Greene-Colozzi, A., Nilsson, B., Richardson, A.L., and McAllister, S.S. (2013). Stromal EGF and igf-I together modulate plasticity of disseminated triple-negative breast tumors. *Cancer Discov.* *3*, 922–935.

Chaffer, C.L., Marjanovic, N.D., Lee, T., Bell, G., Kleer, C.G., Reinhardt, F., D'Alessio, A.C., Young, R.A., and Weinberg, R.A. (2013). Poised Chromatin at the ZEB1 Promoter Enables Breast Cancer Cell Plasticity and Enhances Tumorigenicity. *Cell* *154*, 61–74.

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

Chen, C.R., Kang, Y., and Massagué, J. (2001). Defective repression of c-myc in breast cancer cells: A loss at the core of the transforming growth factor beta growth arrest program. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 992–999.

Chen, C.-R., Kang, Y., Siegel, P.M., and Massagué, J. (2002). E2F4/5 and p107 as Smad Cofactors Linking the TGF $\beta$  Receptor to c-myc Repression. *Cell* *110*, 19–32.

Chen, P.-S., Wang, M.-Y., Wu, S.-N., Su, J.-L., Hong, C.-C., Chuang, S.-E., Chen, M.-W., Hua, K.-T., Wu, Y.-L., Cha, S.-T., et al. (2007). CTGF enhances the motility of breast cancer cells via an integrin- $\alpha$ v $\beta$ 3-ERK1/2-dependent S100A4-upregulated pathway. *J. Cell Sci.* *120*, 2053–2065.

Chiechi, A., Waning, D.L., Stayrook, K.R., Buijs, J.T., Guise, T.A., and Mohammad, K.S.



- (2013). Role of TGF- $\beta$  in breast cancer bone metastases. *Adv. Biosci. Biotechnol. Print* 4, 15–30.
- Chien, W., O’Kelly, J., Lu, D., Leiter, A., Sohn, J., Yin, D., Karlan, B., Vadgama, J., Lyons, K.M., and Koeffler, H.P. (2011). Expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in breast cancer cells is associated with increased migration and angiogenesis. *Int. J. Oncol.* 38, 1741–1747.
- Christmann, M., and Kaina, B. (2013). Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. *Nucleic Acids Res.* 41, 8403–8420.
- Collins, J.A., Blake, J.M., and Crosignani, P.G. (2005). Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment. *Hum. Reprod. Update* 11, 545–560.
- Collinsworth, A.M., Zhang, S., Kraus, W.E., and Truskey, G.A. (2002). Apparent elastic modulus and hysteresis of skeletal muscle cells throughout differentiation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, C1219–C1227.
- Connolly, E.C., Freimuth, J., and Akhurst, R.J. (2012). Complexities of TGF- $\beta$  Targeted Cancer Therapy. *Int. J. Biol. Sci.* 8, 964–978.
- Corbin, E.A., Kong, F., Lim, C.T., King, W.P., and Bashir, R. (2015). Biophysical properties of human breast cancer cells measured using silicon MEMS resonators and atomic force microscopy. *Lab. Chip* 15, 839–847.
- Cross, S.E., Jin, Y.-S., Rao, J., and Gimzewski, J.K. (2007). Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat. Nanotechnol.* 2, 780–783.
- Cross, S.E., Jin, Y.-S., Tondre, J., Wong, R., Rao, J., and Gimzewski, J.K. (2008). AFM-based analysis of human metastatic cancer cells. *Nanotechnology* 19, 384003.
- Cross, S.E., Jin, Y.-S., Lu, Q.-Y., Rao, J., and Gimzewski, J.K. (2011). Green tea extract selectively targets nanomechanics of live metastatic cancer cells. *Nanotechnology* 22, 215101.
- Dai, W., Ma, W., Li, Q., Tao, Y., Ding, P., Zhu, R., and Jin, J. (2015). The 5’-UTR of DDB2 harbors an IRES element and upregulates translation during stress conditions. *Gene*.
- Datta, P.K., and Moses, H.L. (2000). STRAP and Smad7 Synergize in the Inhibition of Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3157–3167.
- Davis, N.M., Sokolosky, M., Stadelman, K., Abrams, S.L., Libra, M., Candido, S., Nicoletti, F., Polesel, J., Maestro, R., D’Assoro, A., et al. (2014). Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention. *Oncotarget* 5, 4603–4650.
- De Craene, B., and Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat. Rev. Cancer* 13, 97–110.

- Delon, I., and Brown, N.H. (2007). Integrins and the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* *19*, 43–50.
- DeMali, K.A., Wennerberg, K., and Burridge, K. (2003). Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 572–582.
- Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S., and Gauthier, J.M. (1998). Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J.* *17*, 3091–3100.
- Di Guglielmo, G.M., Le Roy, C., Goodfellow, A.F., and Wrana, J.L. (2003). Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat. Cell Biol.* *5*, 410–421.
- Donadio, A.C., Remedi, M.M., Frede, S., Bonacci, G.R., Chiabrando, G.A., and Pistoresi-Palencia, M.C. (2002). Decreased expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) is associated with tumor cell spreading in vivo. *Clin. Exp. Metastasis* *19*, 437–444.
- Drummond, A.E., Dyson, M., Thean, E., Groome, N.P., Robertson, D.M., and Findlay, J.K. (2000). Temporal and hormonal regulation of inhibin protein and subunit mRNA expression by post-natal and immature rat ovaries. *J. Endocrinol.* *166*, 339–354.
- Dualan, R., Brody, T., Keeney, S., Nichols, A.F., Admon, A., and Linn, S. (1995). Chromosomal Localization and cDNA Cloning of the Genes (DDB1 and DDB2) for the p127 and p48 Subunits of a Human Damage-Specific DNA Binding Protein. *Genomics* *29*, 62–69.
- Duffy, M.J., McGowan, P.M., Harbeck, N., Thomssen, C., and Schmitt, M. (2014). uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res. BCR* *16*, 428.
- Dupont, S., Mamidi, A., Cordenonsi, M., Montagner, M., Zacchigna, L., Adorno, M., Martello, G., Stinchfield, M.J., Soligo, S., Morsut, L., et al. (2009). FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell* *136*, 123–135.
- Dvorkin-Gheva, A., and Hassell, J.A. (2014). Identification of a novel luminal molecular subtype of breast cancer. *PloS One* *9*, e103514.

## E, F, G

- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., and Miyazono, K. (2001). Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J. Biol. Chem.* *276*, 12477–12480.
- Engel, C., and Fischer, C. (2015). Breast cancer risks and risk prediction models. *Breast Care Basel Switz.* *10*, 7–12.

- Ennen, M., Klotz, R., Touche, N., Pinel, S., Barbieux, C., Besancenot, V., Brunner, E., Thiebaut, D., Jung, A.C., Ledrappier, S., et al. (2013). DDB2: a novel regulator of NF- $\kappa$ B and breast tumor invasion. *Cancer Res.* *73*, 5040–5052.
- Fattet, L., Ay, A.-S., Bonneau, B., Jallades, L., Mikaelian, I., Treilleux, I., Gillet, G., Hesling, C., and Rimokh, R. (2013). TIF1 $\gamma$  requires sumoylation to exert its repressive activity on TGF $\beta$  signaling. *J. Cell Sci.* *126*, 3713–3723.
- Feng, X.H., and Derynck, R. (1997). A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity. *EMBO J.* *16*, 3912–3923.
- Feng, X.-H., Lin, X., and Derynck, R. (2000). Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15Ink4B transcription in response to TGF- $\beta$ . *EMBO J.* *19*, 5178–5193.
- Fontana, L., Chen, Y., Prijatelj, P., Sakai, T., Fässler, R., Sakai, L.Y., and Rifkin, D.B. (2005). Fibronectin is required for integrin  $\alpha$ v $\beta$ 6-mediated activation of latent TGF-beta complexes containing LTBP-1. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *19*, 1798–1808.
- Frasor, J., Danes, J.M., Komm, B., Chang, K.C.N., Lyttle, C.R., and Katzenellenbogen, B.S. (2003). Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology* *144*, 4562–4574.
- Galat, A. (2011). Common structural traits for cystine knot domain of the TGF $\beta$  superfamily of proteins and three-fingered ectodomain of their cellular receptors. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *68*, 3437–3451.
- Galbraith, C.G., Yamada, K.M., and Galbraith, J.A. (2007). Polymerizing Actin Fibers Position Integrins Primed to Probe for Adhesion Sites. *Science* *315*, 992–995.
- Gao, S., Alarcón, C., Sapkota, G., Rahman, S., Chen, P.-Y., Goerner, N., Macias, M.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Massagué, J. (2009). Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated Smad2/3 to limit TGF-beta signaling. *Mol. Cell* *36*, 457–468.
- Gomis, R.R., Alarcón, C., Nadal, C., Van Poznak, C., and Massagué, J. (2006). C/EBPbeta at the core of the TGFbeta cytostatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells. *Cancer Cell* *10*, 203–214.
- Graham, H., and Peng, C. (2006). Activin receptor-like kinases: structure, function and clinical implications. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* *6*, 45–58.
- Grotendorst, G.R., Okochi, H., and Hayashi, N. (1996). A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *7*, 469–480.
- Guilak, F., Tedrow, J.R., and Burgkart, R. (2000). Viscoelastic properties of the cell nucleus.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 269, 781–786.

Guttilla, I.K., Phoenix, K.N., Hong, X., Tirnauer, J.S., Claffey, K.P., and White, B.A. (2012). Prolonged mammosphere culture of MCF-7 cells induces an EMT and repression of the estrogen receptor by microRNAs. *Breast Cancer Res. Treat.* 132, 75–85.

## H, I, J

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.

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

Heikkinen, P.T., Nummela, M., Leivonen, S.-K., Westermarck, J., Hill, C.S., Kähäri, V.-M., and Jaakkola, P.M. (2010). Hypoxia-activated Smad3-specific Dephosphorylation by PP2A. *J. Biol. Chem.* 285, 3740–3749.

Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2012). Role of Smads in TGF $\beta$  signaling. *Cell Tissue Res.* 347, 21–36.

Herbst, R.S., and Khuri, F.R. (2003). Mode of action of docetaxel – a basis for combination with novel anticancer agents. *Cancer Treat. Rev.* 29, 407–415.

Herbst, A., Jurinovic, V., Krebs, S., Thieme, S.E., Blum, H., Göke, B., and Kolligs, F.T. (2014). Comprehensive analysis of  $\beta$ -catenin target genes in colorectal carcinoma cell lines with deregulated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *BMC Genomics* 15, 74.

Hesling, C., Fattet, L., Teyre, G., Jury, D., Gonzalo, P., Lopez, J., Vanbelle, C., Morel, A.-P., Gillet, G., Mikaelian, I., et al. (2011). Antagonistic regulation of EMT by TIF1 $\gamma$  and Smad4 in mammary epithelial cells. *EMBO Rep.* 12, 665–672.

Hinck, A.P. (2012). Structural studies of the TGF- $\beta$ s and their receptors - insights into evolution of the TGF- $\beta$  superfamily. *FEBS Lett.* 586, 1860–1870.

Hortobágyi, P.G.N. (2012). Anthracyclines in the Treatment of Cancer. *Drugs* 54, 1–7.

Howley, B.V., Hussey, G.S., Link, L.A., and Howe, P.H. (2015). Translational regulation of inhibin  $\beta$ A by TGF $\beta$  via the RNA-binding protein hnRNP E1 enhances the invasiveness of epithelial-to-mesenchymal transitioned cells. *Oncogene*.

Huang, F., and Chen, Y.-G. (2012). Regulation of TGF- $\beta$  receptor activity. *Cell Biosci.* 2, 9.

Huse, M., Chen, Y.G., Massagué, J., and Kuriyan, J. (1999). Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell* 96, 425–436.

Huttenlocher, A., and Horwitz, A.R. (2011). Integrins in Cell Migration. *Cold Spring Harb.*

Perspect. Biol. 3, a005074.

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

Imamura, T., Hikita, A., and Inoue, Y. (2012). The roles of TGF- $\beta$  signaling in carcinogenesis and breast cancer metastasis. *Breast Cancer Tokyo Jpn.* 19, 118–124.

Inman, G.J., and Hill, C.S. (2002). Stoichiometry of active smad-transcription factor complexes on DNA. *J. Biol. Chem.* 277, 51008–51016.

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

Isakoff, S.J. (2010). Triple Negative Breast Cancer: Role of Specific Chemotherapy Agents. *Cancer J. Sudbury Mass* 16, 53–61.

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

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

Jang, G.-B., Kim, J.-Y., Cho, S.-D., Park, K.-S., Jung, J.-Y., Lee, H.-Y., Hong, I.-S., and Nam, J.-S. (2015). Blockade of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling suppresses breast cancer metastasis by inhibiting CSC-like phenotype. *Sci. Rep.* 5.

Jeruss, J.S., Sturgis, C.D., Rademaker, A.W., and Woodruff, T.K. (2003). Down-regulation of activin, activin receptors, and Smads in high-grade breast cancer. *Cancer Res.* 63, 3783–3790.

Joseph, J.V., Conroy, S., Tomar, T., Eggens-Meijer, E., Bhat, K., Copray, S., Walenkamp, A.M.E., Boddeke, E., Balasubramanyian, V., Wagemakers, M., et al. (2014). TGF- $\beta$  is an inducer of ZEB1-dependent mesenchymal transdifferentiation in glioblastoma that is associated with tumor invasion. *Cell Death Dis.* 5, e1443.

## K, L

Kalkhoven, E., Roelen, B.A., de Winter, J.P., Mummery, C.L., van den Eijnden-van Raaij, A.J., van der Saag, P.T., and van der Burg, B. (1995). Resistance to transforming growth factor beta and activin due to reduced receptor expression in human breast tumor cell lines. *Cell Growth Differ.* 6, 1151.

Kamiya, Y., Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2010). Smad7 inhibits transforming growth factor-beta family type I receptors through two distinct modes of interaction. *J. Biol. Chem.*

285, 30804–30813.

Kang, J.S., Saunier, E.F., Akhurst, R.J., and Derynck, R. (2008). The type I TGF-beta receptor is covalently modified and regulated by sumoylation. *Nat. Cell Biol.* *10*, 654–664.

Kang, Y., Chen, C.-R., and Massagué, J. (2003). A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol. Cell* *11*, 915–926.

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

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

Kawamura, M., Itoh, Y., Sawaki, M., Kikumori, T., Tsunoda, N., Kamomae, T., Kubota, S., Okada, T., Nakahara, R., Ito, J., et al. (2015). A phase I/II trial of intraoperative breast radiotherapy in an Asian population: 5-year results of local control and cosmetic outcome. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* *10*, 150.

Khalil, N. (1999). TGF-β: from latent to active. *Microbes Infect.* *1*, 1255–1263.

Kim, Y.J., Hwang, J.S., Hong, Y.B., Bae, I., and Seong, Y.-S. (2012). Transforming Growth Factor Beta Receptor I Inhibitor Sensitizes Drug-resistant Pancreatic Cancer Cells to Gemcitabine. *Anticancer Res.* *32*, 799–806.

Kittaneh, M., Montero, A.J., and Glück, S. (2013). Molecular Profiling for Breast Cancer: A Comprehensive Review. *Biomark. Cancer* *5*, 61–70.

Kiyono, K., Suzuki, H.I., Matsuyama, H., Morishita, Y., Komuro, A., Kano, M.R., Sugimoto, K., and Miyazono, K. (2009). Autophagy is activated by TGF-beta and potentiates TGF-beta-mediated growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* *69*, 8844–8852.

Klose, T., Abiatari, I., Samkharadze, T., De Oliveira, T., Jäger, C., Kiladze, M., Valkovskaya, N., Friess, H., Michalski, C.W., and Kleeff, J. (2012). The actin binding protein destrin is associated with growth and perineural invasion of pancreatic cancer. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* *12*, 350–357.

Kojima, Y., Acar, A., Eaton, E.N., Mellody, K.T., Scheel, C., Ben-Porath, I., Onder, T.T., Wang, Z.C., Richardson, A.L., Weinberg, R.A., et al. (2010). Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 20009–20014.

Komatsu, M., Carraway, C.A., Fregien, N.L., and Carraway, K.L. (1997). Reversible disruption of cell-matrix and cell-cell interactions by overexpression of sialomucin complex.

J. Biol. Chem. 272, 33245–33254.

Korchynskiy, O., and ten Dijke, P. (2002). Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J. Biol. Chem.* 277, 4883–4891.

Kubiczkova, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., and Sevcikova, S. (2012). TGF- $\beta$  - an excellent servant but a bad master. *J. Transl. Med.* 10, 183.

Kuratomi, G., Komuro, A., Goto, K., Shinozaki, M., Miyazawa, K., Miyazono, K., and Imamura, T. (2005). NEDD4-2 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2) negatively regulates TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) signalling by inducing ubiquitin-mediated degradation of Smad2 and TGF- $\beta$  type I receptor. *Biochem. J.* 386, 461–470.

Kurisaki, A., Kose, S., Yoneda, Y., Heldin, C.H., and Moustakas, A. (2001). Transforming growth factor- $\beta$  induces nuclear import of Smad3 in an importin- $\beta$ 1 and Ran-dependent manner. *Mol. Biol. Cell* 12, 1079–1091.

Kuznetsova, T.G., Starodubtseva, M.N., Yegorenkov, N.I., Chizhik, S.A., and Zhdanov, R.I. (2007). Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron Oxf. Engl.* 1993 38, 824–833.

Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 178–196.

Lasorella, A., Benezra, R., and Iavarone, A. (2014). The ID proteins: master regulators of cancer stem cells and tumour aggressiveness. *Nat. Rev. Cancer* 14, 77–91.

Lekka, M., Pogoda, K., Gostek, J., Klymenko, O., Prauzner-Bechcicki, S., Wiltowska-Zuber, J., Jaczewska, J., Lekki, J., and Stachura, Z. (2012a). Cancer cell recognition--mechanical phenotype. *Micron Oxf. Engl.* 1993 43, 1259–1266.

Lekka, M., Gil, D., Pogoda, K., Dulińska-Litewka, J., Jach, R., Gostek, J., Klymenko, O., Prauzner-Bechcicki, S., Stachura, Z., Wiltowska-Zuber, J., et al. (2012b). Cancer cell detection in tissue sections using AFM. *Arch. Biochem. Biophys.* 518, 151–156.

Lewis-Wambi, J.S., and Jordan, V.C. (2009). Estrogen regulation of apoptosis: how can one hormone stimulate and inhibit? *Breast Cancer Res.* 11, 206.

Li, J., Liu, H., Yu, J., and Yu, H. (2015). Chemoresistance to doxorubicin induces epithelial-mesenchymal transition via upregulation of transforming growth factor  $\beta$  signaling in HCT116 colon cancer cells. *Mol. Med. Rep.* 12, 192–198.

Liao, D., Luo, Y., Markowitz, D., Xiang, R., and Reisfeld, R.A. (2009). Cancer Associated Fibroblasts Promote Tumor Growth and Metastasis by Modulating the Tumor Immune Microenvironment in a 4T1 Murine Breast Cancer Model. *PLoS ONE* 4, e7965.

- Lin, D.C., Dimitriadis, E.K., and Horkay, F. (2007). Robust strategies for automated AFM force curve analysis-II: adhesion-influenced indentation of soft, elastic materials. *J. Biomech. Eng.* *129*, 904–912.
- Lin, X., Liang, M., Liang, Y.-Y., Brunicardi, F.C., and Feng, X.-H. (2003). SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4. *J. Biol. Chem.* *278*, 31043–31048.
- Lin, X., Duan, X., Liang, Y.-Y., Su, Y., Wrighton, K.H., Long, J., Hu, M., Davis, C.M., Wang, J., Brunicardi, F.C., et al. (2006). PPM1A Functions as a Smad Phosphatase to Terminate TGF $\beta$  Signaling. *Cell* *125*, 915–928.
- Liu, H., Tan, Q., Geddie, W.R., Jewett, M.A.S., Phillips, N., Ke, D., Simmons, C.A., and Sun, Y. (2014). Biophysical characterization of bladder cancer cells with different metastatic potential. *Cell Biochem. Biophys.* *68*, 241–246.
- Liu, J., Lin, M., Zhang, C., Wang, D., Feng, Z., and Hu, W. (2012). TAp63 $\gamma$  enhances nucleotide excision repair through transcriptional regulation of DNA repair genes. *DNA Repair* *11*, 167–176.
- Long, J., Matsuura, I., He, D., Wang, G., Shuai, K., and Liu, F. (2003). Repression of Smad transcriptional activity by PIASy, an inhibitor of activated STAT. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 9791–9796.
- Longley, D.B., Harkin, D.P., and Johnston, P.G. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 330–338.
- Lönn, P., van der Heide, L.P., Dahl, M., Hellman, U., Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2010). PARP-1 attenuates Smad-mediated transcription. *Mol. Cell* *40*, 521–532.
- Loomans, H.A., and Andl, C.D. (2014). Intertwining of Activin A and TGF $\beta$  Signaling: Dual Roles in Cancer Progression and Cancer Cell Invasion. *Cancers* *7*, 70–91.
- Luijsterburg, M.S., Lindh, M., Acs, K., Vrouwe, M.G., Pines, A., van Attikum, H., Mullenders, L.H., and Dantuma, N.P. (2012). DDB2 promotes chromatin decondensation at UV-induced DNA damage. *J. Cell Biol.* *197*, 267–281.
- Lv, M., Li, B., Li, Y., Mao, X., Yao, F., and Jin, F. (2011). Predictive role of molecular subtypes in response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients in Northeast China. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* *12*, 2411–2417.
- Lynch, M.A., Petrel, T.A., Song, H., Knobloch, T.J., Casto, B.C., Ramljak, D., Anderson, L.M., DeGroff, V., Stoner, G.D., Brueggemeier, R.W., et al. (2001). Responsiveness to transforming growth factor-beta (TGF-beta)-mediated growth inhibition is a function of membrane-bound TGF-beta type II receptor in human breast cancer cells. *Gene Expr.* *9*, 157–171.



**M, N**

- Macias, M.J., Martin-Malpartida, P., and Massagué, J. (2015). Structural determinants of Smad function in TGF- $\beta$  signaling. *Trends Biochem. Sci.* *40*, 296–308.
- Maguer-Satta, V., Bartholin, L., Jeanpierre, S., Gadoux, M., Bertrand, S., Martel, S., Magaud, J.P., and Rimokh, R. (2001). Expression of FLRG, a novel activin A ligand, is regulated by TGF-beta and during hematopoiesis [corrected]. *Exp. Hematol.* *29*, 301–308.
- Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H., and Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol. Ther.* *10*, 955–960.
- Marteijn, J.A., Lans, H., Vermeulen, W., and Hoeijmakers, J.H.J. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 465–481.
- Martinez, E., Palhan, V.B., Tjernberg, A., Lyman, E.S., Gamper, A.M., Kundu, T.K., Chait, B.T., and Roeder, R.G. (2001). Human STAGA complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 6782–6795.
- Massagué, J. (2012). TGF $\beta$  signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 616–630.
- Massagué, J., Seoane, J., and Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev.* *19*, 2783–2810.
- Mazerbourg, S., Klein, C., Roh, J., Kaivo-Oja, N., Mottershead, D.G., Korchynskiy, O., Ritvos, O., and Hsueh, A.J.W. (2004). Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *18*, 653–665.
- Melanson, B.D., Cabrita, M.A., Bose, R., Hamill, J.D., Pan, E., Brochu, C., Marcellus, K.A., Zhao, T.T., Holcik, M., and McKay, B.C. (2013). A novel cis-acting element from the 3'UTR of DNA damage-binding protein 2 mRNA links transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression. *Nucleic Acids Res.* *41*, 5692–5703.
- Meryet-Figuières, M., Resina, S., Lavigne, C., Barlovatz-Meimon, G., Lebleu, B., and Thierry, A.R. (2007). Inhibition of PAI-1 expression in breast cancer carcinoma cells by siRNA at nanomolar range. *Biochimie* *89*, 1228–1233.
- Micalizzi, D.S., Christensen, K.L., Jedlicka, P., Coletta, R.D., Barón, A.E., Harrell, J.C., Horwitz, K.B., Billheimer, D., Heichman, K.A., Welm, A.L., et al. (2009). The Six1 homeoprotein induces human mammary carcinoma cells to undergo epithelial-mesenchymal transition and metastasis in mice through increasing TGF- $\beta$  signaling. *J. Clin. Invest.* *119*, 2678–2690.

- Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M., and Ford, H.L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* *15*, 117–134.
- Minig, V., Kattan, Z., van Beeumen, J., Brunner, E., and Becuwe, P. (2009a). Identification of DDB2 protein as a transcriptional regulator of constitutive SOD2 gene expression in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* *284*, 14165–14176.
- Minig, V., Kattan, Z., van Beeumen, J., Brunner, E., and Becuwe, P. (2009b). Identification of DDB2 protein as a transcriptional regulator of constitutive SOD2 gene expression in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* *284*, 14165–14176.
- Mourskaia, A.A., Dong, Z., Ng, S., Banville, M., Zwaagstra, J.C., O'Connor-McCourt, M.D., and Siegel, P.M. (2009). Transforming growth factor-beta1 is the predominant isoform required for breast cancer cell outgrowth in bone. *Oncogene* *28*, 1005–1015.
- Moustakas, A., and Heldin, C.-H. (2009). The regulation of TGFbeta signal transduction. *Dev. Camb. Engl.* *136*, 3699–3714.
- Moustakas, A., and Heldin, C.-H. (2013). Coordination of TGF- $\beta$  signaling by ubiquitylation. *Mol. Cell* *51*, 555–556.
- Mu, D., Cambier, S., Fjellbirkeland, L., Baron, J.L., Munger, J.S., Kawakatsu, H., Sheppard, D., Broaddus, V.C., and Nishimura, S.L. (2002). The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. *J. Cell Biol.* *157*, 493–507.
- Mu, Y., Gudey, S.K., and Landström, M. (2012). Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res.* *347*, 11–20.
- Mueller, T.D., and Nickel, J. (2012). Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Lett.* *586*, 1846–1859.
- Mukai, S., Kagamu, H., Shu, S., and Plautz, G.E. (1999). Critical role of CD11a (LFA-1) in therapeutic efficacy of systemically transferred antitumor effector T cells. *Cell. Immunol.* *192*, 122–132.
- Müller, D.J., and Dufrêne, Y.F. (2011). Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. *Trends Cell Biol.* *21*, 461–469.
- Mylonas, I., Jeschke, U., Shabani, N., Kuhn, C., Friese, K., and Gerber, B. (2005). Inhibin/activin subunits (inhibin-alpha, -betaA and -betaB) are differentially expressed in human breast cancer and their metastasis. *Oncol. Rep.* *13*, 81–88.
- Nag, A., Bondar, T., Shiv, S., and Raychaudhuri, P. (2001). The xeroderma pigmentosum group E gene product DDB2 is a specific target of cullin 4A in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 6738–6747.

- Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., Cohen, R., Cros, J., Faivre, S., Raymond, E., and de Gramont, A. (2015). Targeting the TGF $\beta$  pathway for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* *147*, 22–31.
- Nichols, A.F., Itoh, T., Zolezzi, F., Hutsell, S., and Linn, S. (2003). Basal transcriptional regulation of human damage-specific DNA-binding protein genes DDB1 and DDB2 by Sp1, E2F, N-myc and NF1 elements. *Nucleic Acids Res.* *31*, 562–569.
- Nicolson, G.L. (2014). The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1838*, 1451–1466.
- Nik-Zainal, S., Van Loo, P., Wedge, D.C., Alexandrov, L.B., Greenman, C.D., Lau, K.W., Raine, K., Jones, D., Marshall, J., Ramakrishna, M., et al. (2012a). The life history of 21 breast cancers. *Cell* *149*, 994–1007.
- Nik-Zainal, S., Alexandrov, L.B., Wedge, D.C., Van Loo, P., Greenman, C.D., Raine, K., Jones, D., Hinton, J., Marshall, J., Stebbings, L.A., et al. (2012b). Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell* *149*, 979–993.

## O, P, Q, R

- Ogawa, K., Funaba, M., and Tsujimoto, M. (2008). A dual role of activin A in regulating immunoglobulin production of B cells. *J. Leukoc. Biol.* *83*, 1451–1458.
- Ogawa, Y., Hirakawa, K., Nakata, B., Fujihara, T., Sawada, T., Kato, Y., Yoshikawa, K., and Sowa, M. (1998). Expression of intercellular adhesion molecule-1 in invasive breast cancer reflects low growth potential, negative lymph node involvement, and good prognosis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *4*, 31–36.
- Omidvar, R., Tafazzoli-shadpour, M., Shokrgozar, M.A., and Rostami, M. (2014). Atomic force microscope-based single cell force spectroscopy of breast cancer cell lines: An approach for evaluating cellular invasion. *J. Biomech.* *47*, 3373–3379.
- Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. *Cell* *121*, 335–348.
- Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.-R., Zhang, Y., and Wrana, J.L. (2005). Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* *307*, 1603–1609.
- Padua, D., and Massagué, J. (2009). Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res.* *19*, 89–102.
- Paik, S., Shak, S., Tang, G., Kim, C., Baker, J., Cronin, M., Baehner, F.L., Walker, M.G., Watson, D., Park, T., et al. (2004). A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-

- treated, node-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* *351*, 2817–2826.
- Parker, J.S., Mullins, M., Cheang, M.C.U., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., et al. (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *27*, 1160–1167.
- Paruthiyil, S., Parmar, H., Kerekatte, V., Cunha, G.R., Firestone, G.L., and Leitman, D.C. (2004). Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res.* *64*, 423–428.
- Perlman, R., Schiemann, W.P., Brooks, M.W., Lodish, H.F., and Weinberg, R.A. (2001). TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat. Cell Biol.* *3*, 708–714.
- Perou, C.M. (2010). Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *The Oncologist* *15 Suppl 5*, 39–48.
- Perou, C.M. Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers.
- Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslén, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* *406*, 747–752.
- Pervaiz, S., and Clement, M.-V. (2007). Superoxide anion: oncogenic reactive oxygen species? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *39*, 1297–1304.
- Pi, J., Li, T., Liu, J., Su, X., Wang, R., Yang, F., Bai, H., Jin, H., and Cai, J. (2014). Detection of lipopolysaccharide induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages using atomic force microscope. *Micron Oxf. Engl.* *1993 65*, 1–9.
- Pines, A., Vrouwe, M.G., Marteijn, J.A., Typas, D., Luijsterburg, M.S., Cansoy, M., Hensbergen, P., Deelder, A., de Groot, A., Matsumoto, S., et al. (2012). PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1. *J. Cell Biol.* *199*, 235–249.
- Plodinec, M., Loparic, M., Monnier, C.A., Obermann, E.C., Zanetti-Dallenbach, R., Oertle, P., Hyotyla, J.T., Aebi, U., Bentires-Alj, M., Lim, R.Y.H., et al. (2012). The nanomechanical signature of breast cancer. *Nat. Nanotechnol.* *7*, 757–765.
- Polioudaki, H., Agelaki, S., Chiotaki, R., Politaki, E., Mavroudis, D., Matikas, A., Georgoulas, V., and Theodoropoulos, P.A. (2015). Variable expression levels of keratin and vimentin reveal differential EMT status of circulating tumor cells and correlation with clinical characteristics and outcome of patients with metastatic breast cancer. *BMC Cancer* *15*, 399.
- Polyakov, P., Soussen, C., Duan, J., Duval, J.F.L., Brie, D., and Francius, G. (2011). Automated force volume image processing for biological samples. *PloS One* *6*, e18887.
- Puumalainen, M.-R., Lessel, D., Rütthemann, P., Kaczmarek, N., Bachmann, K., Ramadan,

- K., and Naegeli, H. (2014). Chromatin retention of DNA damage sensors DDB2 and XPC through loss of p97 segregase causes genotoxicity. *Nat. Commun.* *5*, 3695.
- Qiao, S., Guo, W., Liao, L., Wang, L., Wang, Z., Zhang, R., Xu, D., Zhang, Y., Pan, Y., Wang, Z., et al. (2015). DDB2 is involved in ubiquitination and degradation of PAQR3 and regulates tumorigenesis of gastric cancer cells. *Biochem. J.* *469*, 469–480.
- Ramprasad, O.G., Srinivas, G., Rao, K.S., Joshi, P., Thiery, J.P., Dufour, S., and Pande, G. (2007). Changes in cholesterol levels in the plasma membrane modulate cell signaling and regulate cell adhesion and migration on fibronectin. *Cell Motil. Cytoskeleton* *64*, 199–216.
- Rathje, L.-S.Z., Nordgren, N., Pettersson, T., Rönnlund, D., Widengren, J., Aspenström, P., and Gad, A.K.B. (2014). Oncogenes induce a vimentin filament collapse mediated by HDAC6 that is linked to cell stiffness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 1515–1520.
- Roduit, C., van der Goot, F.G., De Los Rios, P., Yersin, A., Steiner, P., Dietler, G., Catsicas, S., Lafont, F., and Kasas, S. (2008). Elastic membrane heterogeneity of living cells revealed by stiff nanoscale membrane domains. *Biophys. J.* *94*, 1521–1532.
- Roduit, C., Sekatski, S., Dietler, G., Catsicas, S., Lafont, F., and Kasas, S. (2009). Stiffness tomography by atomic force microscopy. *Biophys. J.* *97*, 674–677.
- Rosette, C., Roth, R.B., Oeth, P., Braun, A., Kammerer, S., Ekblom, J., and Denissenko, M.F. (2005). Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* *26*, 943–950.
- Roy, N., Stoyanova, T., Dominguez-Brauer, C., Park, H.J., Bagchi, S., and Raychaudhuri, P. (2010). DDB2, an Essential Mediator of Premature Senescence. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 2681–2692.
- Roy, N., Bagchi, S., and Raychaudhuri, P. (2012). Damaged DNA Binding Protein 2 in Reactive Oxygen Species (ROS) Regulation and Premature Senescence. *Int. J. Mol. Sci.* *13*, 11012–11026.
- Roy, N., Bommi, P.V., Bhat, U.G., Bhattacharjee, S., Elangovan, I., Li, J., Patra, K.C., Kopanja, D., Blunier, A., Benya, R., et al. (2013). DDB2 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colon cancer. *Cancer Res.* *73*, 3771–3782.

## S, T

- Santibañez, J.F., Quintanilla, M., and Bernabeu, C. (2011). TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$  receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin. Sci. Lond. Engl.* *199*, 233–251.
- Schacter, J.L., Henson, E.S., and Gibson, S.B. (2014). Estrogen Regulation of Anti-Apoptotic Bcl-2 Family Member Mcl-1 Expression in Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* *9*, e100364.
- Scrima, A., Koníčková, R., Czyzewski, B.K., Kawasaki, Y., Jeffrey, P.D., Groisman, R.,

- Nakatani, Y., Iwai, S., Pavletich, N.P., and Thomä, N.H. (2008). Structural Basis of UV DNA-Damage Recognition by the DDB1–DDB2 Complex. *Cell* 135, 1213–1223.
- Scrima, A., Fischer, E.S., Lingaraju, G.M., Böhm, K., Cavadini, S., and Thomä, N.H. (2011). Detecting UV-lesions in the genome: The modular CRL4 ubiquitin ligase does it best! *FEBS Lett.* 585, 2818–2825.
- Seoane, J., Le, H.-V., Shen, L., Anderson, S.A., and Massagué, J. (2004). Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 117, 211–223.
- Sharma, P., and Nag, A. (2014). CUL4A ubiquitin ligase: a promising drug target for cancer and other human diseases. *Open Biol.* 4, 130217.
- Shi, W., Sun, C., He, B., Xiong, W., Shi, X., Yao, D., and Cao, X. (2004). GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *J. Cell Biol.* 164, 291–300.
- Shimo, T., Kubota, S., Yoshioka, N., Ibaragi, S., Isowa, S., Eguchi, T., Sasaki, A., and Takigawa, M. (2006). Pathogenic role of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in osteolytic metastasis of breast cancer. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 21, 1045–1059.
- Siemann, D.W. (2011). The Unique Characteristics of Tumor Vasculature and Preclinical Evidence for its Selective Disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. *Cancer Treat. Rev.* 37, 63–74.
- Singha, P.K., Pandeswara, S., Geng, H., Lan, R., Venkatachalam, M.A., and Saikumar, P. (2014). TGF- $\beta$  induced TMEPAI/PMEPA1 inhibits canonical Smad signaling through R-Smad sequestration and promotes non-canonical PI3K/Akt signaling by reducing PTEN in triple negative breast cancer. *Genes Cancer* 5, 320–336.
- Sirghi, L., Ponti, J., Broggi, F., and Rossi, F. (2008). Probing elasticity and adhesion of live cells by atomic force microscopy indentation. *Eur. Biophys. J. EBJ* 37, 935–945.
- Skandalis, S.S., Afratis, N., Smirlaki, G., Nikitovic, D., Theocharis, A.D., Tzanakakis, G.N., and Karamanos, N.K. (2014). Cross-talk between estradiol receptor and EGFR/IGF-IR signaling pathways in estrogen-responsive breast cancers: Focus on the role and impact of proteoglycans. *Matrix Biol.* 35, 182–193.
- Smith, B.N., Burton, L.J., Henderson, V., Randle, D.D., Morton, D.J., Smith, B.A., Taliaferro-Smith, L., Nagappan, P., Yates, C., Zayzafoon, M., et al. (2014). Snail Promotes Epithelial Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells in Part via Activation of Nuclear ERK2. *PLoS ONE* 9, e104987.
- Song, R.X.-D., Chen, Y., Zhang, Z., Bao, Y., Yue, W., Wang, J.-P., Fan, P., and Santen, R.J. (2010). Estrogen utilization of IGF-1-R and EGF-R to signal in breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 118, 219–230.

- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., et al. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 8418–8423.
- Sorrentino, A., Thakur, N., Grimsby, S., Marcusson, A., von Bulow, V., Schuster, N., Zhang, S., Heldin, C.-H., and Landström, M. (2008). The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat. Cell Biol.* *10*, 1199–1207.
- Steller, M.D., Shaw, T.J., Vanderhyden, B.C., and Ethier, J.-F. (2005). Inhibin resistance is associated with aggressive tumorigenicity of ovarian cancer cells. *Mol. Cancer Res. MCR* *3*, 50–61.
- Stoyanova, T., Roy, N., Kopanja, D., Bagchi, S., and Raychaudhuri, P. (2009). DDB2 decides cell fate following DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 10690–10695.
- Stoyanova, T., Roy, N., Bhattacharjee, S., Kopanja, D., Valli, T., Bagchi, S., and Raychaudhuri, P. (2012). p21 cooperates with DDB2 protein in suppression of ultraviolet ray-induced skin malignancies. *J. Biol. Chem.* *287*, 3019–3028.
- Stroschein, S.L., Wang, W., and Luo, K. (1999a). Cooperative Binding of Smad Proteins to Two Adjacent DNA Elements in the Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promoter Mediates Transforming Growth Factor  $\beta$ -induced Smad-dependent Transcriptional Activation. *J. Biol. Chem.* *274*, 9431–9441.
- Stroschein, S.L., Wang, W., Zhou, S., Zhou, Q., and Luo, K. (1999b). Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* *286*, 771–774.
- Sun, M., Northup, N., Marga, F., Huber, T., Byfield, F.J., Levitan, I., and Forgacs, G. (2007). The effect of cellular cholesterol on membrane-cytoskeleton adhesion. *J. Cell Sci.* *120*, 2223–2231.
- Sun, N.-K., Sun, C.-L., Lin, C.-H., Pai, L.-M., and Chao, C.C.K. (2010). Damaged DNA-binding protein 2 (DDB2) protects against UV irradiation in human cells and *Drosophila*. *J. Biomed. Sci.* *17*, 27.
- Suresh, S. (2007). Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Biomater.* *3*, 413–438.
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K.P., et al. (2015). STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* *43*, D447–D452.
- Takedachi, A., Saijo, M., and Tanaka, K. (2010). DDB2 Complex-Mediated Ubiquitylation around DNA Damage Is Oppositely Regulated by XPC and Ku and Contributes to the Recruitment of XPA. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 2708–2723.
- Takedachi, A., Saijo, M., and Tanaka, K. DDB2 Complex-Mediated Ubiquitylation around DNA Damage Is Oppositely Regulated by XPC and Ku and Contributes to the Recruitment of

XPA.

Takimoto, R., MacLachlan, T.K., Dicker, D.T., Niitsu, Y., Mori, T., and el-Deiry, W.S. (2002). BRCA1 transcriptionally regulates damaged DNA binding protein (DDB2) in the DNA repair response following UV-irradiation. *Cancer Biol. Ther.* 1, 177–186.

Tan, T., and Chu, G. (2002). p53 Binds and Activates the Xeroderma Pigmentosum DDB2 Gene in Humans but Not Mice. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3247–3254.

Tang, J., and Chu, G. (2002). Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein. *DNA Repair* 1, 601–616.

Teng, L., Zheng, Y., and Wang, H. (2008). BRCA1/2 associated hereditary breast cancer. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 9, 85–89.

Teng, Y., Qiu, J., Zheng, Y., Luo, X., Zhang, L., Chen, L., and Wang, G. (2012). Effects of Type I Collagen and Fibronectin on Regulation of Breast Cancer Cell Biological and Biomechanical Characteristics. *J. Med. Biol. Engineering* 62–68.

Thuault, S., Tan, E.-J., Peinado, H., Cano, A., Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2008). HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* 283, 33437–33446.

Tschaharganeh, D.F., Xue, W., Calvisi, D.F., Evert, M., Michurina, T.V., Dow, L.E., Banito, A., Katz, S.F., Kasthuber, E.R., Weissmueller, S., et al. (2014). p53-dependent Nestin regulation links tumor suppression to cellular plasticity in liver cancer. *Cell* 158, 579–592.

Tsuge, M., Masuda, Y., Kaneoka, H., Kidani, S., Miyake, K., and Iijima, S. (2013). SUMOylation of damaged DNA-binding protein DDB2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 438, 26–31.

## V, W

Valabrega, G., Montemurro, F., and Aglietta, M. (2007). Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 18, 977–984.

Vayalil, P.K., Iles, K.E., Choi, J., Yi, A.-K., Postlethwait, E.M., and Liu, R.-M. (2007). Glutathione suppresses TGF- $\beta$ -induced PAI-1 expression by inhibiting p38 and JNK MAPK and the binding of AP-1, SP-1, and Smad to the PAI-1 promoter. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 293, L1281–L1292.

van 't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y.D., Hart, A.A.M., Mao, M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., Witteveen, A.T., et al. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530–536.

Volakis, L.I., Li, R., Ackerman, W.E., Mihai, C., Bechel, M., Summerfield, T.L., Ahn, C.S., Powell, H.M., Zielinski, R., Rosol, T.J., et al. (2014). Loss of myoferlin redirects breast



- cancer cell motility towards collective migration. *PloS One* 9, e86110.
- Voudouri, K., Berdiaki, A., Tzardi, M., Tzanakakis, G.N., and Nikitovic, D. (2015). Insulin-Like Growth Factor and Epidermal Growth Factor Signaling in Breast Cancer Cell Growth: Focus on Endocrine Resistant Disease. *Anal. Cell. Pathol.* 2015, e975495.
- Wang, Q., Tabatabaei, S., Planz, B., Lin, C.W., and Sluss, P.M. (1999). Identification of an activin-follistatin growth modulatory system in the human prostate: secretion and biological activity in primary cultures of prostatic epithelial cells. *J. Urol.* 161, 1378–1384.
- Wang, R.N., Green, J., Wang, Z., Deng, Y., Qiao, M., Peabody, M., Zhang, Q., Ye, J., Yan, Z., Denduluri, S., et al. (2014). Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.* 1, 87–105.
- Watson, I.R., Takahashi, K., Futreal, P.A., and Chin, L. (2013). Emerging patterns of somatic mutations in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 14, 703–718.
- Walti, J., Loges, S., Dimmeler, S., and Carmeliet, P. (2013). Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J. Clin. Invest.* 123, 3190–3200.
- Witsch, E., Sela, M., and Yarden, Y. (2010). Roles for growth factors in cancer progression. *Physiol. Bethesda Md* 25, 85–101.
- Wotton, D., Lo, R.S., Lee, S., and Massagué, J. (1999a). A Smad Transcriptional Corepressor. *Cell* 97, 29–39.
- Wotton, D., Lo, R.S., Swaby, L.A., and Massagué, J. (1999b). Multiple modes of repression by the Smad transcriptional corepressor TGIF. *J. Biol. Chem.* 274, 37105–37110.
- Wotton, D., Knoepfler, P.S., Laherty, C.D., Eisenman, R.N., and Massagué, J. (2001). The Smad transcriptional corepressor TGIF recruits mSin3. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 457–463.
- Wrighton, K.H., Willis, D., Long, J., Liu, F., Lin, X., and Feng, X.-H. (2006). Small C-terminal Domain Phosphatases Dephosphorylate the Regulatory Linker Regions of Smad2 and Smad3 to Enhance Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling. *J. Biol. Chem.* 281, 38365–38375.
- Wu, J.-W., Krawitz, A.R., Chai, J., Li, W., Zhang, F., Luo, K., and Shi, Y. (2002). Structural Mechanism of Smad4 Recognition by the Nuclear Oncoprotein Ski: Insights on Ski-Mediated Repression of TGF- $\beta$  Signaling. *Cell* 111, 357–367.
- Wu, T.-H., Chou, Y.-W., Chiu, P.-H., Tang, M.-J., Hu, C.-W., and Yeh, M.-L. (2014). Validation of the effects of TGF- $\beta$ 1 on tumor recurrence and prognosis through tumor retrieval and cell mechanical properties. *Cancer Cell Int.* 14, 20.

## X, Y, Z

- Xia, Y., and Schneyer, A.L. (2009). The Biology Of Activin: Recent Advances In Structure, Regulation And Function. *J. Endocrinol.* *202*, 1–12.
- Xie, D., Nakachi, K., Wang, H., Elashoff, R., and Koeffler, H.P. (2001). Elevated levels of connective tissue growth factor, WISP-1, and CYR61 in primary breast cancers associated with more advanced features. *Cancer Res.* *61*, 8917–8923.
- Xie, W., Mertens, J.C., Reiss, D.J., Rimm, D.L., Camp, R.L., Haffty, B.G., and Reiss, M. (2002). Alterations of Smad Signaling in Human Breast Carcinoma Are Associated with Poor Outcome A Tissue Microarray Study. *Cancer Res.* *62*, 497–505.
- Xu, J., Acharya, S., Sahin, O., Zhang, Q., Saito, Y., Yao, J., Wang, H., Li, P., Zhang, L., Lowery, F.J., et al. (2015). 14-3-3 $\zeta$  turns TGF- $\beta$ 's function from tumor suppressor to metastasis promoter in breast cancer by contextual changes of Smad partners from p53 to Gli2. *Cancer Cell* *27*, 177–192.
- Xu, W., Mezencev, R., Kim, B., Wang, L., McDonald, J., and Sulchek, T. (2012). Cell stiffness is a biomarker of the metastatic potential of ovarian cancer cells. *PloS One* *7*, e46609.
- Xue, J., Lin, X., Chiu, W.-T., Chen, Y.-H., Yu, G., Liu, M., Feng, X.-H., Sawaya, R., Medema, R.H., Hung, M.-C., et al. (2014). Sustained activation of SMAD3/SMAD4 by FOXM1 promotes TGF- $\beta$ -dependent cancer metastasis. *J. Clin. Invest.* *124*, 564–579.
- Yang, F., Petsalaki, E., Rolland, T., Hill, D.E., Vidal, M., and Roth, F.P. (2015). Protein Domain-Level Landscape of Cancer-Type-Specific Somatic Mutations. *PLoS Comput Biol* *11*, e1004147.
- Yersal, O., and Barutca, S. (2014). Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J. Clin. Oncol.* *5*, 412–424.
- Yilmaz, M., and Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* *28*, 15–33.
- Yoshinaga, K., Inoue, H., Utsunomiya, T., Sonoda, H., Masuda, T., Mimori, K., Tanaka, Y., and Mori, M. (2004). N-cadherin is regulated by activin A and associated with tumor aggressiveness in esophageal carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *10*, 5702–5707.
- Yoshinaga, K., Mimori, K., Inoue, H., Kamohara, Y., Yamashita, K., Tanaka, F., and Mori, M. (2008). Activin A enhances MMP-7 activity via the transcription factor AP-1 in an esophageal squamous cell carcinoma cell line. *Int. J. Oncol.* *33*, 453–459.
- Young, G.D., and Murphy-Ullrich, J.E. (2004). The tryptophan-rich motifs of the thrombospondin type 1 repeats bind VLAL motifs in the latent transforming growth factor-beta complex. *J. Biol. Chem.* *279*, 47633–47642.
- Yu, Y., Xiao, C.-H., Tan, L.-D., Wang, Q.-S., Li, X.-Q., and Feng, Y.-M. (2014). Cancer-

associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- $\beta$  signalling. *Br. J. Cancer* 110, 724–732.

Zarzynska, J.M. (2014). Two Faces of TGF-Beta1 in Breast Cancer. *Mediators Inflamm.* 2014, e141747.

Zawel, L., Dai, J.L., Buckhaults, P., Zhou, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Kern, S.E. (1998). Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol. Cell* 1, 611–617.

Zhang, J., Zhang, X., Xie, F., Zhang, Z., van Dam, H., Zhang, L., and Zhou, F. (2014). The regulation of TGF- $\beta$ /SMAD signaling by protein deubiquitination. *Protein Cell* 5, 503–517.

Zhang, Y., Moerkens, M., Ramaiahgari, S., Bont, H. de, Price, L., Meerman, J., and Water, B. van de (2011). Elevated insulin-like growth factor 1 receptor signaling induces antiestrogen resistance through the MAPK/ERK and PI3K/Akt signaling routes. *Breast Cancer Res.* 13, R52.

Zhao, Q., Barakat, B.M., Qin, S., Ray, A., El-Mahdy, M.A., Wani, G., Arafa, E.-S., Mir, S.N., Wang, Q.-E., and Wani, A.A. (2008). The p38 mitogen-activated protein kinase augments nucleotide excision repair by mediating DDB2 degradation and chromatin relaxation. *J. Biol. Chem.* 283, 32553–32561.

Zhao, Q., Wang, Q.-E., Ray, A., Wani, G., Han, C., Milum, K., and Wani, A.A. (2009). Modulation of nucleotide excision repair by mammalian SWI/SNF chromatin-remodeling complex. *J. Biol. Chem.* 284, 30424–30432.

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

Zhao, R., Cui, T., Han, C., Zhang, X., He, J., Srivastava, A.K., Yu, J., Wani, A.A., and Wang, Q.-E. (2015a). DDB2 modulates TGF- $\beta$  signal transduction in human ovarian cancer cells by downregulating NEDD4L. *Nucleic Acids Res.*

Zhao, X., Liu, Y., Du, L., He, L., Ni, B., Hu, J., Zhu, D., and Chen, Q. (2015b). Threonine 32 (Thr32) of FoxO3 is critical for TGF- $\beta$ -induced apoptosis via Bim in hepatocarcinoma cells. *Protein Cell* 6, 127–138.

Zielinski, R., Przytycki, P.F., Zheng, J., Zhang, D., Przytycka, T.M., and Capala, J. (2009). The crosstalk between EGF, IGF, and Insulin cell signaling pathways - computational and experimental analysis. *BMC Syst. Biol.* 3, 88.

Zu, X., Zhang, Q., Cao, R., Liu, J., Zhong, J., Wen, G., and Cao, D. (2012). Transforming growth factor- $\beta$  signaling in tumor initiation, progression and therapy in breast cancer: an update. *Cell Tissue Res.* 347, 73–84.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Zubair, A., and Frieri, M. (2013). Role of nuclear factor- $\kappa$ B in breast and colorectal cancer. *Curr. Allergy Asthma Rep.* *13*, 44–49.

# ANNEXES

## Liste des productions scientifiques

### Publications :

- ❖ **DDB2 (Damaged-DNA Binding 2) protein: a new modulator of nanomechanical properties of breast cancer cells.**

**Barbieux C.**, Bacharouche J., Soussen C., Razafitianamaharavo A., Klotz R., Pannequin R., Brie D., Bécuwe P., Francius G. and Grandemange S. (2015) *Nanoscale* (En révisions)

Abstract: DDB2, known for its role in DNA repair, was recently shown to reduce mammary tumor invasiveness by inducing the transcription of *I $\kappa$ B $\alpha$* , an inhibitor of NF- $\kappa$ B activity. Since cellular adhesion is a key event during the epithelial to mesenchymal transition (EMT) leading to the invasive capacities of breast tumor cells, the aim of this study was to investigate the role of DDB2 in this process. Thus, using low and high DDB2-expressing MDA-MB231 and MCF7 cells, respectively, in which DDB2 expression was modulated experimentally, we showed that DDB2 overexpression was associated with a decrease of adhesion abilities on glass and plastic area of breast cancer cells. Then, we investigated cell nanomechanical properties by atomic force microscopy (AFM). Our results revealed significant changes in the Young's Modulus value and the adhesion force in MDA-MB231 and MCF7 cells whether DDB2 was expressed or not. The cell stiffness decrease observed in MDA-MB231 and MCF7 expressing DDB2 was correlated with a loss of the cortical actin-cytoskeleton staining. To understand how DDB2 regulates these processes, an adhesion-related gene PCR-Array was performed. Several adhesion-related genes were differentially expressed according to DDB2 expression, indicating that important changes are occurring at the molecular level. Thus, this work demonstrates that AFM technology is an important asset to follow cellular changes during tumorigenesis. Moreover, our data revealed that DDB2 is involved in early events occurring during metastatic progression of breast cancer cells and will contribute to define this protein as a new marker of metastatic progression in this type of cancer.

- ❖ **Interaction of Iron II Complexes with B-DNA. Insights from Molecular Modeling, Spectroscopy and Cellular Biology.**

Gattuso H, Duchanois T, Besancenot V, **Barbieux C**, Assfeld X, Becuwe P, Gros PC, Grandemange S and Monari A (2015). *Front. Chem.* 3:67.

Abstract: We report the characterization of the interaction between B-DNA and three terpyridin iron II complexes. Relatively long time-scale molecular dynamics is used in order to characterize the stable interaction modes. By means of molecular modeling and UV-vis spectroscopy, we prove that they may lead to stable interactions with the DNA duplex. Furthermore, the presence of larger  $\pi$ -conjugated moieties also leads to the appearance of intercalation binding mode. Non-covalent stabilizing interactions between the iron complexes and the DNA are also characterized and evidenced by the analysis of the gradient of the electronic density. Finally, the structural deformations induced on the DNA in the different binding modes are also evidenced. The synthesis and chemical characterization of the three

complexes is reported, as well as their absorption spectra in presence of DNA duplexes to prove the interaction with DNA. Finally, their effects on human cell cultures have also been evidenced to further enlighten their biological effects.

❖ **Manganese superoxide dismutase in breast cancer: from molecular mechanisms of gene regulation to biological and clinical significance.**

Becuwe, P., Ennen, M., Klotz, R., **Barbieux, C.**, and Grandemange, S. (2014). *Free Radic. Biol. Med.* 77, 139–151.

Abstract: Breast cancer is one of the most common malignancies of all cancers in women worldwide. Many difficulties reside in the prediction of tumor metastatic progression because of the lack of sufficiently and reliable predictive biological markers and are a permanent preoccupation for clinicians. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) may represent a rational candidate as a predictive biomarker of breast tumor metastatic progression, because its gene expression is profoundly altered between early and advanced breast cancer, in contrast to expression in the normal mammary gland. In this review, we report the characterization of some gene polymorphisms and molecular mechanisms of SOD2 gene regulation which allows a better understanding of how MnSOD is decreased in early breast cancer and increased in advanced breast cancer. Several studies display the biological significance of MnSOD level in proliferation as well as in invasive and angiogenic abilities of breast tumor cells by controlling superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Particularly, they report how these ROS may activate some signalling pathways involved in breast tumor growth. Emerging understanding of these findings provides an interesting framework for guiding translational research and suggests to define precisely the clinical interest of MnSOD, as prognostic and/or predicting marker in breast cancer, by associating with some regulators involved in SOD2 gene regulation and other well known biomarkers, in addition to the typical clinical parameters.

❖ **DDB2: a novel regulator of NF-κB and breast tumor invasion.**

Ennen, M., Klotz, R., Touche, N., Pinel, S., **Barbieux, C.**, Besancenot, V., Brunner, E., Thiebaut, D., Jung, A.C., Ledrappier, S., et al. (2013). *Cancer Res.* 73, 5040–5052.

Abstract: The DNA repair protein damaged DNA-binding 2 (DDB2) has been implicated in promoting cell-cycle progression by regulating gene expression. DDB2 is selectively overexpressed in breast tumor cells that are noninvasive, but not in those that are invasive. We found that its overexpression in invasive human breast tumor cells limited their motility and invasiveness in vitro and blocked their ability to colonize lungs in vivo, defining a new function for DDB2 in malignant progression. DDB2 overexpression attenuated the activity of NF-κB and the expression of its target matrix metalloprotease 9 (MMP9). Mechanistic investigations indicated that DDB2 decreased NF-κB activity by upregulating expression of IκBα by binding the proximal promoter of this gene. This effect was causally linked to invasive capacity. Indeed, knockdown of DDB2-induced IκBα gene expression restored NF-κB activity and MMP9 expression, along with the invasive properties of breast tumor cells overexpressing DDB2. Taken together, our findings enlighten understanding of how breast cancer cells progress to an invasive phenotype and underscore potential clinical interest in DDB2 as a prognostic marker or therapeutic target in this setting.

## **Communications :**

**Barbieux, C.**, Francius, G., Klotz R., Besancenot V., Brunner E., Soussen C., Brie D., Kaminski S., Becuwe P. et Grandemange S. Rôle de DDB2 dans l'adhérence des cellules tumorales mammaires: relation avec la voie du TGF $\beta$ -1. Journée d'Echanges en Cancérologie, 6 Novembre 2015. Institut de Cancérologie de Lorraine, Nancy, France. (**Communication orale**)

**Barbieux, C.**, Francius, G., Klotz R., Besancenot V., Brunner E., Soussen C., Brie D., Kaminski S., Becuwe P. et Grandemange S. The transcriptional regulator DDB2 modulates TGF $\beta$ 1 signaling and membrane nanomechanics of breast cancer cells. CRCL Symposium, 21-23 Septembre 2015. Lyon, France. (**Poster**)

**Barbieux, C.**, Francius, G., Klotz R., Besancenot V., Brunner E., Soussen C., Brie D., Kaminski S., Becuwe P et Grandemange S. The Damaged DNA Binding 2 protein: a new modulator of TGF $\beta$ 1 signaling pathway and membrane nanomechanics in breast cancer cells. 40<sup>th</sup> FEBS Congress, 4-9 Juillet 2015. Berlin, Germany. (**Communication orale et poster, abstract publié *FEBS Journal*, Volume 282, Issue Supplement S1, page 36**)

**Barbieux, C.**, Francius, G., Klotz R., Besancenot V., Brunner E., Soussen C., Brie D., Kaminski S., Becuwe P et Grandemange S. The Damaged DNA Binding 2 protein: a new modulator of TGF $\beta$ -1 signaling pathway and membrane nanomechanics in breast cancer cells. DocSciLor 2015, 4 Juin 2015. Musée Aquarium de Nancy, France. (**Communication orale**)

**Barbieux, C.**, Francius, G., Klotz R., Besancenot V., Brunner E., Soussen C., Brie D., Kaminski S., Becuwe P et Grandemange S. DDB2: un nouveau régulateur de la voie de signalisation du TGF $\beta$ 1? Conséquences sur les propriétés d'adhérence des cellules tumorales mammaires. Journée de l'Ecole Doctorale BioSE, 25 Mars 2015. Nancy, France. (**Communication orale**) Prix de la meilleure communication orale.

**Barbieux, C.**, Francius, G., Klotz R., Ennen M., Besancenot V., Brunner E., Soussen C., Brie D., Mazerbourg S., Kaminski S., Grandemange S. et Becuwe P. The transcriptional regulator DDB2 modulates TGF $\beta$ -1 signaling and cell adhesion in breast cancer cells. 8<sup>ème</sup> Forum du Cancéropôle Grand-Est, Strasbourg, France. 20-21 Novembre 2014. (**Poster**)

**Barbieux, C.**, Francius, G., Klotz R., Ennen M., Besancenot V., Brunner E., Soussen C., Brie D., Mazerbourg S., Kaminski S., Grandemange S. et Becuwe P. Role of DDB2 protein in breast cancer cells adhesion. Journée d'Echanges en Cancérologie, 26 Septembre 2014. Institut de Cancérologie de Lorraine, Nancy, France. (**Communication orale**)



## RESUME

La compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de la progression métastatique des tumeurs mammaires reste une préoccupation constante dans la recherche en cancérologie et nécessite la découverte de nouveaux marqueurs prédictifs. Dans ce sens, le laboratoire a mis en évidence que la protéine DDB2 (Damaged-DNA Binding 2), connue pour son rôle dans la réparation de l'ADN, était impliquée dans la tumorigenèse mammaire. En effet, l'équipe a montré que la protéine DDB2, en régulant l'expression des gènes codant la MnSOD et  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , était associée à une augmentation des capacités prolifératives et à une diminution du pouvoir invasif des cellules tumorales mammaires. Les propriétés invasives des cellules étant étroitement liées à leurs capacités d'adhérence, nous nous sommes intéressés au rôle de DDB2 dans l'adhérence des cellules tumorales mammaires. Deux lignées ont été utilisées : les MDA-MB231 exprimant peu DDB2 et dans lesquelles celle-ci a été surexprimée, et les MCF7 exprimant naturellement la protéine DDB2 et dans lesquelles cette protéine a été inhibée.

Dans un 1<sup>er</sup> temps, l'étude des propriétés d'adhérence des cellules, présentant une modulation de l'expression de DDB2, a révélé une baisse de l'adhérence des cellules exprimant DDB2 sur des supports neutres (plastique et verre), suggérant que les propriétés et la composition membranaires seraient modulées. Ainsi, une analyse des propriétés nanomécaniques par microscopie de force atomique a démontré que l'expression de DDB2 est associée à une augmentation de l'élasticité membranaire des cellules tumorales mammaires. Ces variations d'élasticité membranaire peuvent en partie être dues à une baisse du réseau d'actine corticale observée par cytoimmunofluorescence. Afin de comprendre les mécanismes mis en jeu dans la modulation de ces propriétés, une analyse transcriptomique par PCR-Array, ciblant spécifiquement l'expression de gènes impliqués dans l'adhérence, a été réalisée. Celle-ci révèle que l'expression des gènes codant le TGF $\beta$ 1, le CTGF et ICAM-1 est modulée en fonction du niveau d'expression de DDB2 dans les deux lignées cellulaires.

Ainsi dans un 2<sup>nd</sup> temps, nous avons étudié l'influence de DDB2 sur la voie du TGF $\beta$ 1. Nos résultats montrent que DDB2, lorsqu'elle est exprimée, interfère avec l'activité transcriptionnelle des Smads et l'expression de gènes cibles induite par la voie du TGF $\beta$ 1. Nous avons tenté de rechercher comment DDB2 interfère avec cette voie. Nos résultats montrent que DDB2 semble diminuer la phosphorylation des protéines Smads. Par ailleurs, nous révélons par immunoprécipitation sur chromatine, que DDB2 entraîne une diminution forte de la présence des Smads sur le promoteur du gène *PAI-1* cible du TGF $\beta$ 1, en se fixant à proximité de leurs éléments de réponse.

L'ensemble de ces résultats indique que les propriétés nanomécaniques membranaires des cellules tumorales mammaires et la voie de signalisation induite par le TGF $\beta$ 1 seraient modulées par DDB2. Ce travail confirme donc l'importance de cette protéine DDB2 au cours de la tumorigenèse mammaire et contribue ainsi à mieux la définir comme un nouveau marqueur pronostique et/ou prédictif de la progression métastatique dans le cancer du sein.

**Mots Clés :** Damaged-DNA Binding 2 (DDB2) ; cancer du sein ; adhérence ; propriétés nanomécaniques ; microscopie de force atomique ; TGF $\beta$ 1

## ABSTRACT

Understanding of molecular mechanisms behind metastatic progression remains a major issue in cancer research and requires discovery of new predictive markers. Thus, the laboratory has highlighted that DDB2 protein (Damaged-DNA Binding 2), usually involved in DNA repair, is an important factor in breast tumorigenesis. Indeed DDB2, by regulating genes encoding MnSOD and  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , is associated with increased proliferation and reduced invasive abilities of breast tumor cells. Since migratory and invasive properties are closely related to adhesive properties, the aim of this work has been to study the involvement of DDB2 in breast cancer cell adhesion. To this end, two breast cancer cell lines have been used: low-DDB2 expressing MDA-MB231 cells, in which this protein was overexpressed and MCF7, which endogenously express DDB2 in which its expression was inhibited.

First, adhesive properties of cells in which DDB2 expression is modulated, has been assessed, and reveal that DDB2 expression is associated with a decrease of adhesion on neutral surfaces, suggesting that membrane properties and contents could be modified in these cells. Thus, an analysis of nanomechanical properties by atomic force microscopy indicates a decrease of cell stiffness in DDB2-expressing cells. These data could be related to the loss of cortical actin cytoskeleton observed by cytoimmunofluorescence. To understand molecular mechanisms involved in DDB2-dependent modulation of these properties, a transcriptomic study on adhesion-related encoding genes has been performed (PCR array). This investigation reveals that the transcript level of genes encoding TGF $\beta$ 1, CTGF and ICAM-1 are modulated according to DDB2 expression level in the two cell lines.

Second, we have studied the influence of DDB2 on the TGF $\beta$  signaling pathway. Our results show that DDB2, when it is overexpressed, promotes an inhibition of Smads transcriptional activity and the TGF $\beta$ 1-induced gene expression. We have attempted to understand how DDB2 interferes with this pathway. Our results show that DDB2 seems to decrease the phosphorylation of Smads. In addition, we show by chromatin immunoprecipitation that DDB2 promotes a strong decrease of Smads on the promoter of TGF $\beta$ 1-induced PAI1 gene, by binding near their specific response elements.

Taken together, these data indicate that the nanomechanical properties of breast tumor cell membranes and the TGF $\beta$ 1-induced signaling pathway would be modulated by DDB2. Also, the present work confirms the importance of DDB2 in breast tumorigenesis and contributes to better define this protein as a new prognostic and/or predictive marker of metastatic progression of breast cancer.

**Keywords:** Damaged-DNA Binding 2 (DDB2); breast cancer; adhesion; nanomechanical properties; atomic force microscopy; TGF $\beta$ 1