



HAL
open science

Rôle de la protéine Damaged DNA Binding 2 dans la réponse des cellules tumorales mammaires aux agents thérapeutiques

Rémi Klotz

► **To cite this version:**

Rémi Klotz. Rôle de la protéine Damaged DNA Binding 2 dans la réponse des cellules tumorales mammaires aux agents thérapeutiques. Automatique / Robotique. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT: . tel-01750980v1

HAL Id: tel-01750980

<https://hal.science/tel-01750980v1>

Submitted on 3 Aug 2017 (v1), last revised 29 Mar 2018 (v2)

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 **Rémi KLOTZ**

**Rôle de la protéine Damaged DNA Binding 2 dans la réponse des cellules
tumoraux mammaires aux agents thérapeutiques**

Le 30 Octobre 2014

Membres du jury :

Président :	M. Jean-Yves JOUZEAU	Prof., UMR7365 CNRS-Université de Lorraine
Rapporteurs :	Mme Marie-Christine RIO	DR, IGBMC, Strasbourg
	M. Olivier MICHEAU	CR, LNC INSERM U866, Dijon
Examineurs :	Mme Iris BEHRMANN	Prof., LSRU, Luxembourg
	M. Philippe BECUWE	Prof., UMR7039 CNRS-Université de Lorraine, co-directeur de thèse
	Mme Stéphanie GRANDEMANGE	Dr., UMR7039 CNRS-Université de Lorraine, co-directeur de thèse

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 **Rémi KLOTZ**

**Rôle de la protéine Damaged DNA Binding 2 dans la réponse des cellules
tumoraux mammaires aux agents thérapeutiques**

Le 30 Octobre 2014

Membres du jury :

Président :	M. Jean-Yves JOUZEAU	Prof., UMR7365 CNRS-Université de Lorraine
Rapporteurs :	Mme Marie-Christine RIO	DR, IGBMC, Strasbourg
	M. Olivier MICHEAU	CR, LNC INSERM U866, Dijon
Examineurs :	Mme Iris BEHRMANN	Prof., LSRU, Luxembourg
	M. Philippe BECUWE	Prof., UMR7039 CNRS-Université de Lorraine, co-directeur de thèse
	Mme Stéphanie GRANDEMANGE	Dr., UMR7039 CNRS-Université de Lorraine, co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Plusieurs années à « chercher » à vos côtés. Vous m'avez enseigné, conseillé, aidé, soutenu et amusé tout au long de ma thèse. Une pensée pour tous ceux, qui ont d'une façon ou d'une autre apporté leur pierre à l'édifice. Je voulais vous dire à tous, que vos attentions et encouragements ont été très précieux. A vous, un grand merci.

Je tiens tout d'abord à remercier Philippe Bécuwe et Stéphanie Grandemange de m'avoir encadré tout au long de cette thèse, m'avoir accordé leur confiance et pour le temps qu'ils m'ont consacré. Leur expérience, leur enthousiasme et leurs conseils, ont été indispensables et instructifs. Je pense à Stéphanie, pour qui j'ai été le premier étudiant en thèse, je veux lui dire que travailler avec elle est sans doute la meilleure école scientifique et humaine qui soit. J'ai beaucoup apprécié sa bienveillance à mon égard, vis-à-vis de son BÉBÉ Rémi.

J'exprime mes remerciements à Mme Rio Marie-Christine, Directrice de Recherche à l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Strasbourg), Mme Iris Behrmann, Professeur à l'Université du Luxembourg, M. Micheau Olivier, Chargé de Recherche Inserm (Dijon) et M. Jouzeau Jean-Yves, Professeur à l'Université de Lorraine, d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Je pense aux « filles » : Vanessa et Emilie. Elles ont été accessibles et immédiatement à l'écoute, même pour mes questions les plus étranges. J'ai aimé nos discussions, nos pitreries et travailler avec elles. Beaucoup de bonne humeur grâce à elles et de grandes méditations « Si ces deux situations se présentaient à toi, tu préférerais laquelle ? » ; « Pourquoi ne faut-il pas lécher les papillons ? » ; « Peut-on former de la fumée bleue avec de la carboglace ? ». Merci pour leur aide, leur soutien et leur amitié.

Je pense aussi à « la relève » : Claire, Guillaume, Marie, avec qui j'ai passé des moments marquants, drôles et réconfortants. Nous avons partagé le même bureau, les mêmes angoisses, les mêmes galères. Merci à eux pour leur amitié, leurs rires et leur intérêt pour mes expérimentations ludiques. Bon courage à vous. Ils peuvent prendre mon bureau stratégique de « concierge », il est libre maintenant. Je pense également aux stagiaires, qui ont partagé avec moi les aléas de paillasse et sans trop rechigner accepté de répéter, répéter et encore

répéter leurs manips (dans le meilleur des cas). Je remercie en particulier Nicolas et Julie, pour leurs aides précieuses, j'ai apprécié leur rigueur, leur curiosité et leur motivation sans failles.

Une pensée particulière pour Nadège, Murielle et Lionel. Merci à eux, pour leur bonne humeur communicative, leurs rires, leurs conseils et encouragements. J'ai fait mes premiers pas dans le laboratoire en tant que stagiaire M1, sous la direction de Lionel, j'ai beaucoup apprécié ses qualités humaines et sa gentillesse. J'ai eu la chance de bénéficier de son savoir et son aide durant l'intégralité de ma thèse, merci à lui.

Je n'oublierai pas Sylvie et ses facéties. Toujours volontaire pour blaguer et mettre l'ambiance. Nous avons eu des discussions passionnantes et parfois même productives. J'ai apprécié sa sincérité, à mon tour d'être sincère avec elle : « Arrête de cuisiner Sylvie ! ». Je lui souhaite une bonne rentrée des classes.

Je souhaite remercier tous les membres du laboratoire, en particulier ceux du 9^{ème} étage pour m'avoir aidé par leurs remarques constructives lors de ce travail de thèse. Je remercie Sophie Pinel pour m'avoir initié à l'expérimentation animale et pour son aide précieuse. Avec le CRAN j'ai eu l'occasion de rencontrer David Brie, un passionné et passionnant spécialiste du traitement des signaux multidimensionnels, avec lequel nous avons collaboré sur un sujet pluridisciplinaire. Je le remercie lui et son équipe pour cette expérience enrichissante et fructueuse.

Enfin, tout naturellement je pense à mes proches, tout d'abord, mes parents qui m'ont permis d'en arriver jusque-là, merci pour toute l'aide et le soutien qu'ils m'ont apporté. Je remercie mes sœurs, ma famille et mes amis pour m'avoir toujours encouragé, soutenu et qui à leurs manières ont contribué à l'accomplissement de ce travail.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE.....	4
ABREVIATIONS.....	9
INTRODUCTION.....	14
I. LE DEVELOPPEMENT DES TUMEURS MAMMAIRES.....	15
1. <i>Epidémiologie.....</i>	15
2. <i>La carcinogenèse mammaire.....</i>	16
3. <i>Classification anatomopathologique et moléculaire des tumeurs mammaires.....</i>	17
3.1. Les différents types de tumeurs mammaires	17
3.2. Généralité sur la classification anatomopathologique des cancers du sein.....	18
3.3. Classification moléculaire des cancers du sein.....	19
4. <i>Les marqueurs moléculaires pronostiques dans le cancer du sein.....</i>	20
4.1. Généralités sur les marqueurs pronostiques et prédictifs.....	20
4.2. Marqueurs moléculaires pronostiques dans le cancer du sein	20
II. LES STRATEGIES THERAPEUTIQUES DANS LE CANCER DU SEIN	22
1. <i>Les différents traitements.....</i>	22
1.1. La chirurgie.....	22
1.2. La radiothérapie	22
1.3. La chimiothérapie	22
1.3.1. La doxorubicine	23
1.3.2. Le 5-Fluorouracile	24
1.3.3. Le paclitaxel.....	25
1.4. L'hormonothérapie.....	26
1.5. Les thérapies ciblées	26
2. <i>Les mécanismes de mort cellulaire chimio-induits.....</i>	27
2.1. Les altérations chimio-induites et réponses cellulaires.....	27
2.2. Les mécanismes de mort cellulaire	28
2.2.1. Mort cellulaire par apoptose	28
2.2.1.1. La voie des récepteurs de mort	29
2.2.1.2. La voie mitochondriale.....	29
2.2.1.3. Relation entre voie extrinsèque et intrinsèque	31
2.2.1.4. Rôles des caspases.....	32
2.2.2. Autres voies de mort cellulaire	33
2.3. Voies chimio-induites et mécanismes de chimiorésistance des cellules cancéreuses	34
2.3.1. Voie apoptotique chimio-induite.....	34
2.3.2. Voie non-apoptotique chimio-induite	34
2.3.3. Mécanismes de chimiorésistance des cellules cancéreuses	34

2.4. Conclusions.....	35
3. <i>Les marqueurs moléculaires prédictifs de la réponse aux traitements</i>	36
3.1. Prédiction multigénique ou signature.....	36
3.2. Prédiction mono-factorielle.....	36
III. LA PROTEINE DDB2 : ROLES BIOLOGIQUES ET IMPLICATIONS DANS LES CANCERS.....	39
1. <i>Caractéristiques structurales du gène et de la protéine</i>	39
2. <i>Régulation de l'expression du gène DDB2</i>	39
3. <i>Activités biologiques de DDB2 sur l'ADN</i>	40
3.1. Rôle dans la réparation de l'ADN.....	40
3.1.1. Complexe UV-DDB et réparation GGR.....	40
3.1.2. Régulation de l'activité de DDB2.....	41
3.2. Rôle dans la transcription génique.....	42
3.2.1. Remodelage de la chromatine.....	42
3.2.2. Régulation de l'activité transcriptionnelle de gènes cibles.....	43
4. <i>Activités biologiques de DDB2 dans les cancers</i>	44
4.1. Rôle de DDB2 comme suppresseur de tumeur.....	44
4.2. Rôle de DDB2 dans la prolifération des cellules tumorales.....	45
4.3. Rôle de DDB2 dans l'invasion tumorale.....	46
4.4. Rôle de DDB2 dans la sénescence et l'apoptose.....	47
4.4.1. Contrôle de la sénescence.....	47
4.4.2. Contrôle de l'entrée en apoptose.....	48
OBJECTIFS DU PROJET DE THESE	50
MATERIELS & METHODES	53
I. CULTURE CELLULAIRE ET CONDITIONS DE TRAITEMENT.....	53
1. <i>Lignées cellulaires et conditions de culture</i>	53
1.1. Lignées cellulaires.....	53
1.2. Conditions de culture.....	53
2. <i>Développement de modèles de cellules tumorales mammaires transgéniques</i>	54
2.1. Transfection d'un plasmide à l'aide d'agents polycationiques.....	54
2.2. Développement de modèles transgéniques par infection lentivirale.....	56
3. <i>Traitements des cellules tumorales mammaires</i>	57
3.1. Traitement avec des agents anticancéreux.....	57
3.2. Traitement avec le TNF α	57
3.3. Traitement à la 5-azacytidine et à la trichostatine-A.....	57
II. EXPERIMENTATION ANIMALE.....	58
1. <i>Animaux</i>	58
2. <i>Suivi de croissance tumorale</i>	58
III. ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES.....	59
1. <i>Evaluation au niveau transcriptionnel</i>	59
1.1. Extraction des ARN totaux.....	59
1.2. RT-PCR quantitative en temps réel.....	59
2. <i>Evaluation au niveau traductionnel</i>	61

2.1. Extraction et dosage protéique	61
2.2. Electrophorèse et transfert sur membrane	61
2.3. Détection immunologique	63
IV. MESURE DE L'ACTIVITE SUPEROXYDE DISMUTASE	64
V. ETUDE DES METHYLATIONS SUR LE PROMOTEUR DE DDB2	64
1. <i>Traitements au bisulfite de sodium et séquençage du promoteur de DDB2</i>	65
1.1. Extraction de l'ADN génomique et traitement au bisulfite de sodium	65
1.2. Clonage et séquençage du promoteur de DDB2 traité au bisulfite	65
1.2.1. Amplification de l'insert et purification sur gel	65
1.2.2. Clonage et Transformation bactérienne	66
1.2.3. Extraction plasmidique et séquençage	67
2. <i>Réactions de PCR spécifiques des méthylations (MSP)</i>	67
3. <i>Immunoprécipitation d'ADN méthylé (MeDIP)</i>	68
3.1. Extraction de l'ADN génomique et sonication	68
3.2. Immunoprécipitation de l'ADN méthylé	69
3.3. Analyse par PCR quantitative	70
VI. ANALYSE DE L'INTERACTION ET DE L'ACTIVITE DES PROTEINES NUCLEAIRES SUR L'ADN	70
1. <i>Analyse par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)</i>	70
1.1. Extraction et immunoprécipitation de la chromatine	70
1.2. Analyse par PCR semi-quantitative	72
1.3. Analyse par PCR quantitative en temps réel	72
2. <i>Analyse de l'activité transcriptionnelle des protéines nucléaires</i>	72
2.1. Présentation des plasmides	72
2.2. Transfection transitoire et mesure de l'activité luciférase	73
2.2.1. Transfections par la méthode Calcium-Phosphate	73
2.2.2. Transfection à l'aide d'un agent polycationique	74
2.2.3. Mesure de l'activité luciférase et β -galactosidase	74
VII. ANALYSE DE LA DE MORT CELLULAIRE PAR APOPTOSE	75
1. <i>Détection de la forme clivée de la protéine PARP par immunoréplique</i>	75
2. <i>Marquage des phosphatidylsérines à l'annexine V</i>	75
3. <i>Analyse quantitative de la fragmentation nucléaire</i>	75
VIII. MESURE DE L'ACTIVITE MITOCHONDRIALE, DU METABOLISME ENERGETIQUE ET DES DERIVES REACTIFS DE L'OXYGENE	76
1. <i>Mesure de la consommation d'oxygène par polarographie</i>	76
2. <i>Mesure du métabolisme énergétique</i>	77
2.1. Dosage de l'ATP	77
2.2. Dosage du Lactate	77
3. <i>Mesure des dérivés réactifs de l'oxygène</i>	78
3.1. Par microscopie à fluorescence	78
3.2. Par cytométrie en flux	78
IX. ANALYSE STATISTIQUE	78

RESULTATS	80
I. INFLUENCE DE LA PROTEINE DDB2 SUR LA REPOSE DES CELLULES TUMORALES MAMMAIRES AUX AGENTS ANTICANCEREUX	80
1. <i>Présentation des modèles cellulaires dans lesquels l'expression de DDB2 a été modulée expérimentalement</i>	80
2. <i>Effet de la protéine DDB2 sur la sensibilité in vitro des cellules tumorales mammaires aux agents anticancéreux</i>	81
2.1. Effet sur la sensibilité à la doxorubicine	81
2.2. Effet sur la sensibilité au 5-Fluorouracile	84
2.3. Effet sur la sensibilité au paclitaxel.....	85
3. <i>Effet de la protéine DDB2 sur la sensibilité in vivo des cellules tumorales mammaires aux agents anticancéreux</i>	85
4. <i>Influence de la protéine DDB2 sur le pouvoir apoptogène du TNFα</i>	86
5. <i>Conclusion</i>	87
II. IDENTIFICATION DES MECANISMES ASSOCIES A L'ACTION CHIMIOTHERAPEUTIQUE DE DDB2	88
1. <i>Influence de DDB2 sur l'activité mitochondriale</i>	88
1.1. Effet sur la consommation d'oxygène par la chaîne respiratoire.....	88
1.2. Effet sur l'efficacité du couplage de la chaîne respiratoire.....	89
1.3. Effet sur l'activité métabolique.....	90
1.4. Influence de DDB2 sur le niveau de production de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO)	91
2. <i>Implication de la régulation transcriptionnelle du gène de la SODMn par DDB2</i>	92
3. <i>Implication de la régulation transcriptionnelle du gène IκBα par DDB2</i>	93
4. <i>Mise en évidence d'une relation entre la protéine DDB2 et le facteur anti-apoptotique Bcl-2</i>	94
4.1. Influence de DDB2 sur l'expression de Bcl-2 dans les cellules cancéreuses mammaires.....	94
4.2. Influence de DDB2 sur l'activité du promoteur du gène bcl-2.....	95
4.3. Interactions de la protéine DDB2 sur le promoteur du gène bcl-2	96
4.4. Influence de DDB2 sur la déacétylation des histones H3 dans le promoteur du gène bcl-2.....	96
5. <i>Conclusion</i>	98
III. REGULATION DE L'EXPRESSION DE DDB2 DANS LES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES	99
1. <i>Profils d'expression du gène ddb2 dans les cancers du sein</i>	99
2. <i>Influence des récepteurs aux œstrogènes sur l'activité du promoteur du gène ddb2</i>	99
3. <i>Régulation épigénétique de l'expression du gène ddb2</i>	100
3.1. Effet des inhibiteurs de méthylation de l'ADN et des histones désacétylases sur l'expression du gène ddb2	100
3.2. Recherche des méthylations au sein du promoteur du gène ddb2	101
4. <i>Conclusion</i>	103
DISCUSSION GENERALE	105
I. LA PROTEINE DDB2 MODULE LA SENSIBILITE DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES AUX AGENTS ANTICANCEREUX	105

II. RELATION ENTRE L'ACTIVITE MITOCHONDRIALE ET DDB2 DANS LA CHIMIOSENSIBILITE DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES.....	108
III. ROLE DE DDB2 DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE GENES CIBLES : CONSEQUENCES SUR LA CHIMIOSENSIBILITE DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES	109
1. <i>Le cas de la SODMn</i>	109
2. <i>Le cas d'IκBa</i>	111
3. <i>Le cas de Bcl-2</i>	112
IV. REGULATION DE L'EXPRESSION DE DDB2 DANS LES CANCERS DU SEIN	114
CONCLUSION & PERSPECTIVES	118
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	123
ANNEXE I : CURRICULUM VITEA	138
ANNEXE II : RESUMES DES PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES	140

ABBREVIATIONS

5,6,Δ

5-FU	5-Fluorouracile
5-AZA	5-Azacytidine
6-4PP	Photoproduit pyrimidine(6-4)pyrimidone
Δψm	Potentiel transmembranaire mitochondrial

A

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNmt	ADN mitochondriale
ADNn	ADN nucléaire
ADP	Adénosine diphosphate
AIF	Apoptosis inducing factor
Akt	Protein Kinase B
ANT	Acid nucleic transporter
AP-1	Activator protein1
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATM/ATR	Ataxia telangiectasia mutated/Ataxia telangiectasia and Rad3 related
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	ATP synthase

B

Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xl	B-cell lymphoma-extra large
BH	Bcl-2 Homology
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BRCA1/2	Breast Cancer 1/2
BSA	Bovine serum albumin

C

CI,II,III,IV,V	Complexe chaîne respiratoire I,II,III,IV et V
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CAD	Caspase activated-DNase
CBP	CREB-binding protein
CCCP	Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
CCIS	Carcinome canalaire <i>in situ</i>
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
c-FLIP	Cellular FLICE-like inhibitory protein
CO	Consommation d'oxygène

CO ₂	Dioxyde de carbone
CPD	Cyclobutane pyrimidine dimer
CS	Syndrome de Cockayne
CTL	Cellules contrôles transfectées avec plasmide vide
Cul-4A	Culline 4-A
CM-H2DCFHDA	Dichlorofluorescein-diacetate
Cyt C	Cytochrome C

D

DD	Death domain
DDB1/2	DNA Damaged-binding protein 1/2
DDB2-1/2	Cellules surexprimant la protéine DDB2
DDBP	Damaged DNA –binding protein
DISC	Death inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMF	Dimethylform-amide
DMSO	Dimethylsulfoxyde
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
D-PBS	Tampon phosphate salin
DRO	Dérivés réactifs de l'oxygène
DTT	Solution de dithiothréitol

E,F,G

E ₂	Oestradiol
E2F1	E2F transcription factor 1
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGF	Epidermal growth factor
EndoG	Endonuclease G
ERE	Estrogen response element
ERS1	Estrogen receptor 1
ER	Estrogen receptor
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases1/2
FADD	Fas associated death domain
FADH2	Flavine adénine dinucléotide
FasL	Fas ligand
FDA	Food and drug administration
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FLIP	FLICE-like inhibitory protein
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GGR	Global genome repair
Gpx	Glutathion peroxydase
GST-Pi	Glutathion S-transférase Pi

H,I,J

H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
H2A/3/4	Histones 2A/3/4
H3	Histone 3
H3K9	Lysine 9 de l'histone 3
HBSS	Hanks' Balanced Salt solution
HCl	Acide chlorhydrique

HDAC	Histone désacétylase
HER1/2	Human epidermal growth factor receptor 1/2
HMT	Histone méthyltransférase
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
ICAD	Inhibitor of caspase activated-DNase
IGF	Insulin like growth factor
IgG	Immunoglobuline G
IκBα	Inhibitor Kappa B alpha
INCa	Institut national du cancer
JNK	c-Jun N-terminal Kinase

K,M,N

KCl	Chlorure de potassium
KCN	Cyanure de potassium
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDR	Multi drug resistance
MeDIP	Methylated DNA immunoprecipitation
MEM	Membrane externe mitochondriale
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
MMP	Metalloproteinase matricielle
MOI	Multiplicity of infection
MSP	Methylation-specific PCR
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NAC	N-acétyl-cystéine
NaCl	Chlorure de sodium
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucléotide
NBT	Nitro blue tetrazolium
NER	Nucleotide Excision Repair
NF-1	Nuclear factor-1
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
NLS	Nuclear localisation site
NRMT	alpha-N-methyltransferase

O,P,Q

O ₂	Oxygène
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORF	Open reading frame
P1/P2	Promoteur 1 ou 2 du gène <i>bcl-2</i>
PAF	Paraformaldéhyde
PARP	Poly ADP-ribose polymérase
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase reaction chain
PEI	Polyéthylèneimine
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIASγ	Protein Inhibitor of Activated STAT
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PR	Progesterone receptor
PTP	Pore de transition de perméabilité
PVDF	Polyvinylidifluoride

qPCR Real-time PCR

R,S

RB Rétinoblastome
RNAi ARN interférence
RPA Replicative protein A
RPLPO Large ribosomal protein
RT Rétrotranscriptase
SDS Sodiumdodécylsulfate
shDDB2 ARN interférence anti-DDB2
shI κ B α ARN interférence anti-I κ B α
shRNA small hairpin RNA
SODMn Superoxyde Dismutase à Manganèse
SP1 Specificity protein 1
STAGA SPT3-TAF9-GCN5 acetyltransferase complex
Suv39h Histone-lysine N-methyltransferase Suv39h
SVF Sérum de veau foetal
SWI/SNF SWI κ ch/Sucrose NonFermentable

T,U,V

TBE Tris, Borate, EDTA
TBS Tampon Tris salin
TCR Transcription-coupled repair
TDD Trichothiodistrophie
TEM Transition épithélio-mésenchymateuse
TEMED Tetramethylethylenediamine
TFIIH Transcription factor II Human
TNF α Tumor necrosis factor α
TNFR TNF Receptor
TSA Trichostatin A
UBB Ubiquitin B
UCP Uncoupling Protein
URL Unité relative de luminescence
UV Ultraviolets
UV-DBB UV damaged DNA binding protein
VDAC Voltage-dependent anion channel
VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

W,X,Z

WD40 Tryptophan-Aspartic acid (W-D) dipeptide
WT Wild-type
XP Xeroderma pigmentosum
XPA/B/C/D/E xeroderma pigmentosum complementation group A/B/C/D/E
Zeb1 Zinc finger E-box-binding homeobox 1

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Pour l'année 2012, les chiffres publiés par l'organisation mondiale de la santé (OMS, GLOBOCAN 2012) révèlent 1,7 millions de nouveaux cas et 522 000 décès pour le cancer du sein, dans le monde. Malgré de nombreux progrès à la fois dans son diagnostic mais aussi sa prise en charge thérapeutique, le cancer du sein reste néanmoins, au premier rang des cancers chez la femme actuellement. Au cours des dix dernières années, des travaux sont menés dans l'intention d'améliorer nos connaissances des mécanismes moléculaires amenant les cellules cancéreuses mammaires à acquérir des propriétés invasives et à échapper aux thérapies existantes. Les résultats de ces travaux, conduisent à développer de meilleures capacités de prédiction d'évolution des tumeurs et de réponse ou non aux traitements anticancéreux.

Le sujet de ce travail s'inscrit dans ce contexte et aide à l'identification d'un nouveau marqueur moléculaire d'aide à la décision thérapeutique. Des données apportées par l'équipe STICMo du laboratoire CRAN ont permis d'identifier la protéine DDB2 (Damaged DNA-Binding 2) comme étant impliqué dans le contrôle de la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses mammaires. L'expertise déjà menée sur l'influence de cette protéine dans les cancers par le laboratoire, mais également par d'autres équipes de chercheurs, conduit à penser que DDB2 pourrait être impliqué dans la réponse des cellules cancéreuses mammaires aux traitements anticancéreux. En apportant la preuve expérimentale de l'implication de cette protéine sur la chimiosensibilité des cellules cancéreuses mammaires avec la compréhension des mécanismes moléculaires associés, ce travail contribuerait à montrer l'intérêt clinique de DDB2 dans le cancer du sein, comme marqueur prédictif de réponse aux traitements.

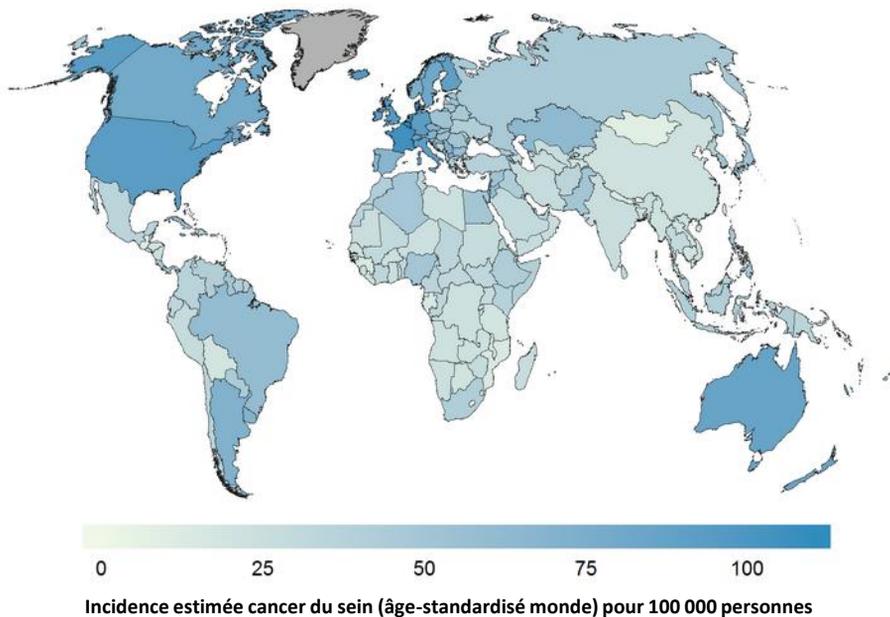


Figure 1 : Variation du taux d'incidence du cancer du sein chez la femme dans le monde en 2012. Le taux d'incidence standardisé-monde, pour 100 000 personnes est légendé selon un code couleur bleu. Pour les plus fort taux d'incidence (bleu foncé) on retrouve des pays développés et industrialisés (Amérique du Nord, Europe, Australie). Le continent Africain enregistre le taux d'incidence le plus faible (bleu clair). D'après GLOBOCAN 2012.

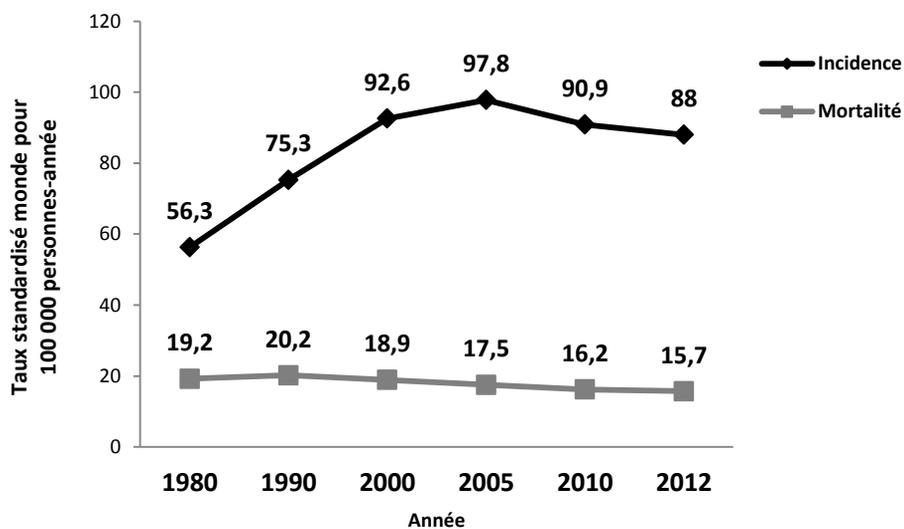


Figure 2 : Evolution du taux d'incidence et de mortalité du cancer du sein en France entre 1980 et 2012. Taux standardisé monde, pour 100 000 personnes-année de l'incidence et de la mortalité du cancer du sein pour les femmes en France. Après une forte augmentation du taux d'incidence entre 1980 et 2000, ce taux se stabilise jusqu'en 2005 avant de diminuer. De 1980 à 2000 le taux de mortalité reste stable, puis diminue légèrement jusqu'en 2012. D'après INCa « Les cancers en France Edition 2013 ».

I. LE DEVELOPPEMENT DES TUMEURS MAMMAIRES

1. Epidémiologie

En 2012, le cancer du sein reste au premier rang des cancers chez la femme, dans le monde (OMS, GLOBOCAN 2012), et représente 25 % des cancers. Dans les pays développés, le cancer du sein chez la femme se place au 2^{ème} rang des décès par cancer (après le cancer du poumon). Il existe une disparité géographique du taux d'incidence des cancers du sein. Le taux d'incidence tend à être plus important dans les pays au nord de l'équateur et particulièrement en Amérique du Nord et en Europe de l'ouest (**Figure 1**).

En France métropolitaine, on estime à 48 763 le nombre de nouveaux cas de cancer du sein en 2012 (INCa ; Les cancers en France, édition 2013) et 11 886 décès. Ces données épidémiologiques ne concernent que les cancers du sein invasifs. On estime que les cancers non-invasifs en France représentent 5 à 10 % des cancers du sein. Toujours en France, plus de 80% des femmes atteintes d'un cancer du sein sont âgées de 50 ans et plus. L'âge médian au diagnostic est estimé en 2012 à 63 ans, et celui au décès à 73 ans. Le cancer du sein est un cancer de bon pronostic avec pour sa survie nette à 5 et 10 ans, 86% et 76% respectivement (cancers diagnostiqués entre 1989 et 2004). Un cancer du sein chez l'homme peut être diagnostiqué, mais cela reste extrêmement rare, avec moins de 1% des cancers du sein.

Entre 1980 et 2000, le nombre de nouveaux cas de cancer du sein chez la femme en France, a doublé (INCa) (**Figure 2**). L'incidence entre 2000 et 2005 s'est stabilisée avant de diminuer de -1,5% par an entre 2005 et 2012. Cette diminution concerne surtout les tumeurs dépistées à un stade précoce et pour des femmes âgées de 50 à 74 ans (Daubisse-Marliac et al., 2011). Plusieurs facteurs sont avancés afin d'expliquer cette baisse de l'incidence, en particulier la diminution des prescriptions de traitements hormonaux de la ménopause (Daubisse-Marliac et al., 2011). Depuis les années 2000, en France, mais aussi plus largement en Europe et en Amérique du Nord, la mortalité diminue en moyenne de -1,5% par an (entre 2005 et 2012).

La baisse de la mortalité peut s'expliquer en partie par une prise en charge plus précoce des cancers du sein, grâce à l'amélioration des techniques de dépistage et l'organisation de campagnes de sensibilisation auprès du Grand Public. Une meilleure prise

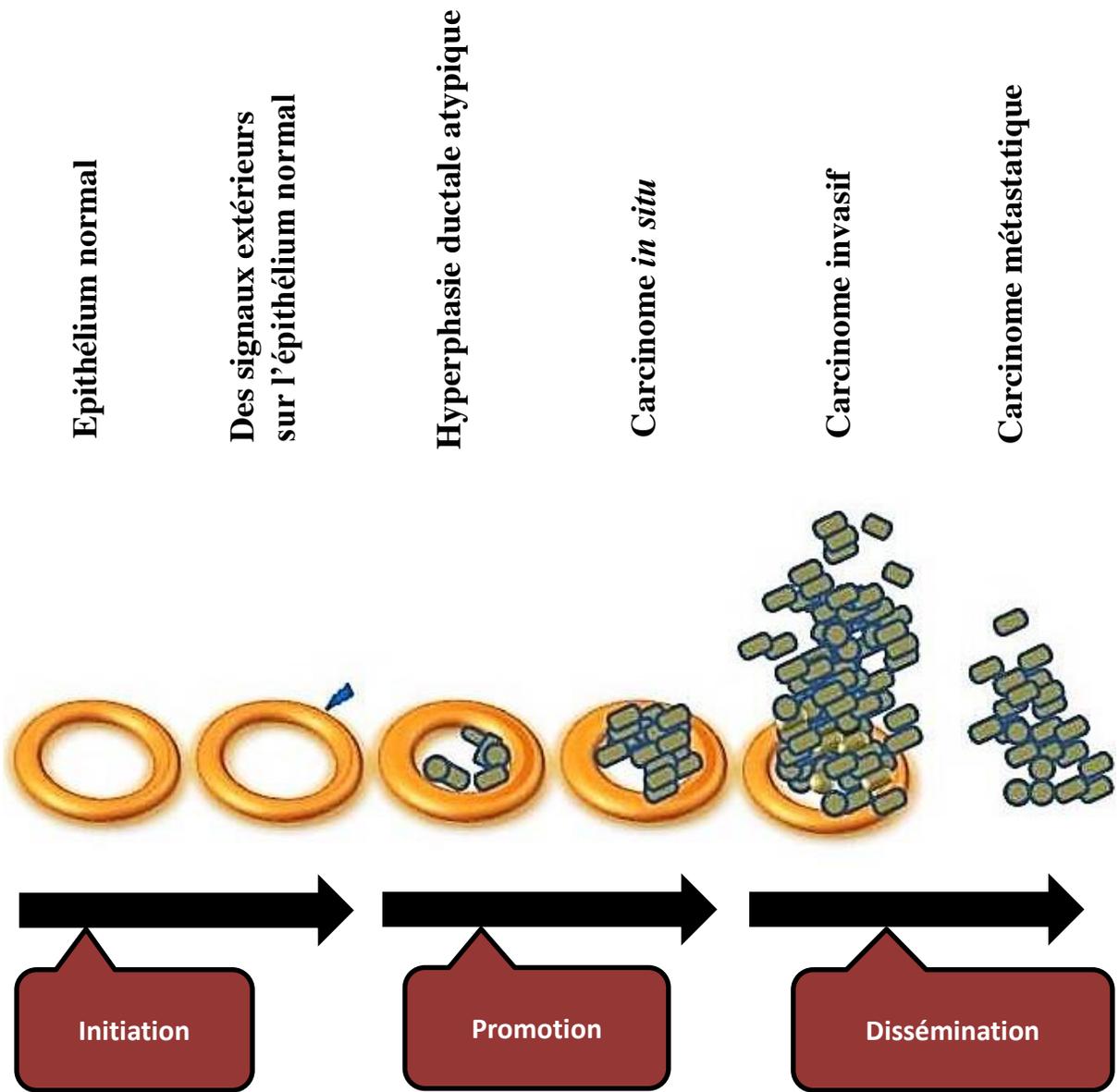


Figure 3 : Représentation schématique des stades de la cancérisation mammaire. Au cours de l'initiation, les cellules du tube épithélial sain vont proliférer de façon anarchique sous l'influence de divers signaux. Puis lors de leur promotion, les cellules dédifférenciées, acquièrent des changements morphologiques et prolifèrent localement pour donner un carcinome *in situ*. Par la suite d'autres modifications permettront aux cellules cancéreuses de traverser la lame basale afin de se disséminer et développer des carcinomes invasifs et métastatiques.

en charge thérapeutique, explique également la diminution de la mortalité par cancer du sein. Les thérapies existantes se sont améliorées et d'autres se sont développées, en particulier l'émergence des soins personnalisés, qui consistent à traiter chaque patiente de manière spécifique. La médecine personnalisée du cancer du sein a comme rationnel, l'observation d'une hétérogénéité tumorale à l'échelle moléculaire, se basant sur le fait que chaque tumeur est unique.

2. La carcinogenèse mammaire

Classiquement, la cancérogenèse mammaire se décompose en 3 étapes : l'initiation qui correspond à la première mutation, la progression qui est l'étape de constitution et de développement de la tumeur mammaire, puis la dissémination (**Figure 3**).

De multiples facteurs peuvent être à l'origine de la cancérogenèse mammaire (âge, mode de vie, prédispositions génétiques, agents environnementaux chimiques ou physiques). Dans les cancers du sein, comme dans la majorité des cancers, les altérations génétiques sont somatiques, uniquement présentes dans les cellules tumorales et peuvent toucher un très grand nombre de gènes. Ainsi, une étude de 2010, a permis de répertorier 33 000 mutations dans une tumeur de la peau (Pleasant et al., 2010a) et 23 000 dans une tumeur du poumon (Pleasant et al., 2010b). Malgré cette grande diversité d'altérations génétiques, les gènes impliqués ne touchent qu'un nombre limité de processus cellulaires, qui contrôlent la prolifération, la synthèse de facteurs de croissance et l'échappement à l'apoptose. Très schématiquement, ces altérations ont pour effet d'activer des oncogènes ou proto-oncogènes (ex : amplification des gènes codant HER2, le co-récepteur membranaire du facteur de croissance épithélial (EGF) (Phillips et al., 2008), ou d'inactiver des gènes suppresseurs de tumeurs (ex : mutation du gène codant la p53, (Olivier et al., 2004).

Il existe néanmoins chez des femmes, des altérations génétiques constitutionnelles, présentes dans toutes les cellules de l'organisme et transmissibles à la descendance, ce qui les prédisposent génétiquement à un cancer du sein. Ces altérations sont à l'origine d'environ 5 à 10 % des cancers du sein (McPherson et al., 2000). Parmi les gènes touchés, on trouve le plus souvent les gènes *BRCA1* et *BRCA2* (Breast Cancer 1 et 2), associés à un fort risque de développer un cancer du sein ou de l'ovaire (10 à 60% selon les populations).

Les principaux signaux de prolifération des cellules tumorales mammaires sont d'origine endocrine (hormones sexuelles : les œstrogènes et la progestérone) (Anderson, 2002), paracrine ou autocrine (facteurs de croissance : EGF et IGF pour Insulin like growth factor) (LeRoith and Roberts Jr, 2003). Ces signaux sont souvent à l'origine de dérégulations du cycle cellulaire et peuvent également permettre aux cellules cancéreuses d'échapper à l'apoptose. En effet, des mutations du gène p53 (Lacroix et al., 2006), l'expression de Bcl-2 dépendante des œstrogènes (Riggins et al., 2005), ou encore l'activation constitutive de la voie de survie déclenchée par l'EGF (Baldwin, 2001), sont impliquées dans cet échappement à l'apoptose.

Au cours de leur prolifération, les cellules cancéreuses mammaires peuvent subir une dédifférenciation importante leur permettant d'acquérir des propriétés migratrices et invasives. Ces nouvelles propriétés, définies sous le terme de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), correspondent à des modifications des interactions cellulaires, de la composition de la matrice extracellulaire, à un changement important dans l'expression des gènes et à la formation de néo-vaisseaux. Ces capacités migratrices et invasives s'accompagnent, d'une sécrétion importante de métalloprotéases matricielles (MMP) (Radisky and Radisky, 2010), responsables de la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire. Une production importante de facteurs angiogéniques, dont le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), est également observée pendant la TEM et permet de stimuler la néo-angiogenèse (Dj et al., 2001). Généralement, l'acquisition de capacités migratrices et invasives s'accompagne d'un changement important dans la sensibilité des cellules tumorales mammaires aux agents thérapeutiques (Singh and Settleman, 2010).

3. Classification anatomopathologique et moléculaire des tumeurs mammaires

3.1. Les différents types de tumeurs mammaires

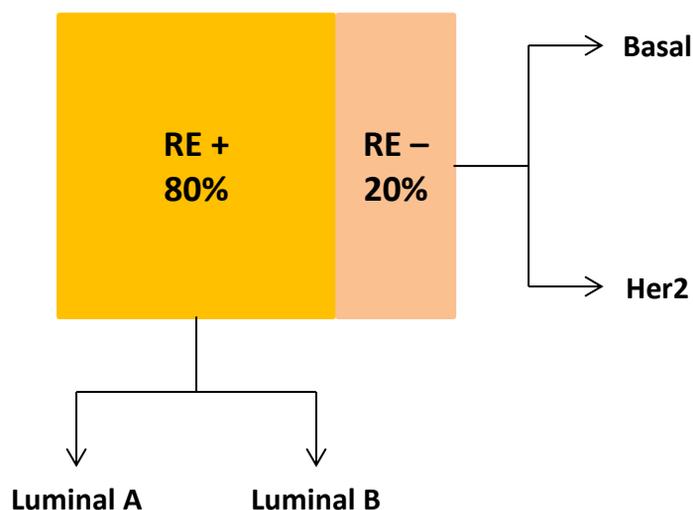
Dans la majorité des cas (95%), les cancers du sein sont des adénocarcinomes, signifiant qu'ils se développent à partir des cellules épithéliales de la glande mammaire. Les tumeurs mammaires peuvent se développer à partir des cellules des lobules ou des canaux de la glande mammaire, on parle alors de carcinomes lobulaires ou canaux. Ces deux types histologiques représentent les formes les plus fréquentes des cancers du sein. Le plus souvent, les adénocarcinomes sont d'origine canaux.

Les différents types de cancers du sein peuvent être divisés en deux grandes catégories : (i) les carcinomes non invasifs (*in situ*), (ii) les carcinomes invasifs (infiltrants) **(Figure 3)**

- i) Les carcinomes non-invasifs représentent une forme de cancer très précoce. Le type CCIS (**Carcinome Canalaire *In Situ***) est le plus représentatif (90% des cancers non invasifs). Dans cette catégorie de tumeurs mammaires, les cellules cancéreuses de l'épithélium n'ont pas franchi la membrane basale qui les entoure et par conséquent les tumeurs se trouvent bien délimitées et ne se développent pas dans le tissu voisin. Les carcinomes non-invasifs sont de bon pronostic pour une guérison. Sans traitements soutenus, ils poursuivent leurs développements et peuvent devenir « infiltrants ».
- ii) Les carcinomes infiltrants regroupent plusieurs types histologiques : le **carcinome canalaire infiltrant** (le plus fréquent), **lobulaire infiltrant**, **mucineux** (rare, formé de cellules qui sécrètent du mucus), **tubulaire** (rare, se reconnaît par une disposition des cellules cancéreuses en tubules), **médullaire** (1% des cancers du sein infiltrant, présence de cellules lymphoïdes dans le stroma) et **papillaire** (1 à 2% des carcinomes mammaires infiltrants, présence de structure infiltrantes en forme de papilles). Leurs différences trouvent une origine dans les types de cellules qui les composent et l'architecture de la tumeur. On parle de cancers infiltrants lorsque les cellules cancéreuses ont infiltré le tissu voisin. Pendant leur développement, ces carcinomes peuvent se propager vers les ganglions axillaires et parfois d'autres parties du corps (métastases).

3.2. *Généralité sur la classification anatomopathologique des cancers du sein*

Le cancer du sein lors de son diagnostic est classé selon des critères anatomiques ; organe touché, type histologique, taille de la tumeur, grade. Cette classification « anatomique » des cancers du sein, permet de définir des groupes de patientes, qui seront traités de manière semblables, avec une ou deux thérapies de références. En 2003, la classification des cancers du sein de l'OMS, dénombrait 21 types de carcinome mammaire infiltrant. L'indice TNM propose également une classification anatomo-clinique du cancer du sein en fonction de la taille de la tumeur (lettre T), des anomalies ganglionnaires (N) et de la présence ou non de métastase (M). Le grade SBR, (de Scarff Bloom et Richardson) est une



Luminal A	Luminal B	Basal	Her2
Expression ER et gènes cibles ++	Expression ER et gènes cibles +	Triple négatif	Expression ER et gènes cibles -
Expression gènes de prolifération -	Expression gènes de prolifération +	Expression ER et gènes cibles -	Expression gènes de prolifération ++
p53 muté à 13%	Expression +/- Her2	Expression gènes de prolifération ++	Expression amplicon 17p12 Her2 ++
	p53 muté à 66%	Expression gènes de kératines, laminine ++	p53 muté à 71%
		p53 muté à 82%	
60% des cancers du sein	20% des cancers du sein	10% des cancers du sein (opérés)	10% des cancers du sein (opérés)
Pronostic favorable	Pronostic intermédiaire	Pronostic défavorable	Pronostic intermédiaire

Figure 4 : Principales caractéristiques géniques et cliniques des sous-types moléculaire des cancers du sein (Sorlie et Perou 2000). Une nouvelle classification des cancers du sein à l'échelle moléculaire est proposée à l'issu des travaux de Sorlie et Perou (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2003). Elle classe les carcinomes mammaires en cinq sous-types moléculaires, selon leurs profils d'expression pour environ 500 gènes. Les sous-types luminal A et B sont les plus représentés (80%) et expriment les récepteurs aux œstrogènes (ER), contrairement aux deux autres sous-types, basal et Her2. Le sous-type basal regroupe les cancers triples négatifs, c'est-à-dire n'exprimant pas les récepteurs hormonaux (œstrogènes et progestérone) et Her2. Il représente le sous-type ayant le plus mauvais pronostic.

autre classification des cancers mammaires et repose sur des observations de l'architecture tissulaire et cellulaire. Les tumeurs sont classées selon trois grades SBR différents, allant du grade I pour les tumeurs les moins agressives jusqu'à un grade III pour les plus agressives. Le grade SBR II correspond à un grade intermédiaire. Jusqu'au début des années 2000, les stratégies thérapeutiques étaient guidées par l'utilisation de ces classifications. Cependant, pour un type de cancer du sein, seule une partie des patientes vont répondre favorablement à un traitement donné. Des cancers du sein qui sembleront identique d'un point de vu anatomique, vont pourtant répondre de manière très différente à un même traitement. Pour exemple, un traitement par hormonothérapie, sur des cancers du sein avancés, ne va avoir d'effets bénéfiques que sur 30% environ des patientes (Hortobagyi, 1998). La classification anatomopathologique classique des cancers du sein ne permet pas de prédire de façon satisfaisante l'évolution des tumeurs durant un traitement. Une amélioration de cette classification est devenue possible grâce à la compréhension des anomalies et mécanismes moléculaires impliqués dans le développement tumoral et la prise en compte des caractéristiques biologiques de chaque tumeur.

3.3. Classification moléculaire des cancers du sein

Les améliorations des techniques d'étude du génome et de l'expression génique à haut débit, ont été utiles pour décrypter à l'échelle moléculaire les tumeurs mammaires. Les résultats d'études par puce à ADN, ont permis de montrer au niveau moléculaire l'hétérogénéité et la complexité des cancers du sein. Une caractérisation moléculaire des tumeurs, issue des études génomiques est venue compléter les méthodes de classification classique des différents types de cancer du sein. Les travaux de Sorlie et Pérou ont été les premiers à proposer un classement des cancers mammaires en sous-types moléculaires (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2003). Ils ont analysé les profils d'expression de 115 tumeurs de patients sur des microarray à ADN complémentaire portant les sondes de 8102 gènes. Une liste de 534 gènes d'intérêt a été retenue et sert de base à la classification en cinq sous-types moléculaires : luminal A, luminal B, HER2, normal-like et basal-like. Les principales caractéristiques génomiques et cliniques de ces sous-types sont données dans la **figure 4**. Le sous-type normal-like s'est avéré plus tard être un biais de sélection correspondant à du tissu mammaire non tumoral (Hu et al., 2006) et fut donc écarté. Plus récemment, cette classification a été affinée et complétée par quatre sous-types supplémentaires, dont le sous-type *claudin-low* par exemple (Prat et al., 2010; Weigelt et al., 2008).

4. Les marqueurs moléculaires pronostiques dans le cancer du sein

4.1. Généralités sur les marqueurs pronostiques et prédictifs

Depuis les travaux de Sorlie et Perou, le décryptage moléculaire des tumeurs mammaires s'est accéléré et a permis de mieux affiner des groupes de patients présentant des « signatures » moléculaires semblables. Actuellement, ces signatures ont démontré leur intérêt clinique dans le cancer du sein, car elles possèdent un lien avec le pronostic de la tumeur et la prédiction d'une réponse aux traitements. Elles permettent d'identifier des marqueurs pronostiques de l'évolution métastatique du cancer, et prédictifs de l'efficacité des traitements anticancéreux.

Entre un marqueur pronostique et prédictif une confusion est parfois commise. Les deux marqueurs sont employés pour définir l'évolution probable d'une tumeur, mais le marqueur prédictif est utilisé pour fournir la probabilité de réponse ou de non-réponse à un traitement donné, alors que les marqueurs pronostiques permettent d'identifier un risque de rechute locale ou à distance (métastase) en absence de traitement. En pratique, certains marqueurs peuvent être pronostique et prédictif à la fois.

4.2. Marqueurs moléculaires pronostiques dans le cancer du sein

Une étude visant à évaluer la valeur pronostique de survie sur 10 ans, de la classification moléculaire de Sorlie et Perou a été menée sur 860 patientes américaines (Carey LA et al., 2006). L'expression du gène du récepteur au œstrogène, de HER1 et HER2 ainsi que celle du gène de la cytokératine 5 ont été mesurée par immunohistochimie et ont servi de base au classement des tumeurs en 4 sous-types moléculaires : Luminal A, Luminal B, Basal et HER2. La survie des patientes atteintes de tumeurs de sous-types Luminal A et B est la meilleure, avec en moyenne 90% de survie. Pour les sous-types, basal et HER2, la survie après 10 ans se situe entre 60% et 75%. Beaucoup de facteurs limitent l'interprétation de ces résultats (absence de données clinicopathologiques, hétérogénéité des traitements...) mais ils contribuent à démontrer l'intérêt clinique des marqueurs moléculaires, comme facteurs pronostics dans le cancer du sein. De plus, cette étude montre que ces signatures moléculaires sont stables lors de la progression tumorales, elles sont identiques du stade *in-situ* au stade métastatique.

On distingue parmi les signatures moléculaires pronostiques, des signatures de bas débit (immunohistochimie) et moyen débit (RT-qPCR) permettant d'établir le profil d'expression pour 5 à 20 gènes mais aussi des signatures de haut débit, obtenue par puce à ADN (transcriptome de 20 à 70 gènes). C'est le cas par exemple de la signature MammaPrintTM qui propose le transcriptome de 70 gènes. Elle a été développée par une équipe d'Amsterdam (van't Veer et al., 2002) initialement sur 78 patientes, mais elle a été récemment confirmée au cours d'un essai clinique pilote européen de 6 000 patientes (Rutgers et al., 2011). Les signatures sont obtenues grâce à des puces à ADN commerciale, contenant les 70 gènes identifiés par les travaux de Van't Veer et al, (MammaPrintTM). Cette signature évalue le risque pour les patientes ayant un cancer du sein sans envahissement ganglionnaire de développer des métastases, avec une valeur pronostique plus forte que la classification de Saint-Gallen (Buyse et al., 2006). Depuis ces travaux, d'autres signatures moléculaires pronostiques ont été développées et certaines validées par la FDA (Food and Drug Administration). Des études comparatives des différentes signatures moléculaires des cancers du sein ont été investies et montrent qu'un nombre réduit de gènes sont communs (de Cremoux, 2010). Mais toutes les signatures comportent des gènes impliqués dans la prolifération.

Des signatures moléculaires pronostiques, reconsidérées par la suite dans des études rétrospectives, ont montré leurs valeurs prédictives de réponse à la chimiothérapie ou à une hormonothérapie (Bonnetoi and Cremoux, 2008). L'analyse à haut débit des profils d'expression des cancers du sein plus ou moins chimiosensibles ou chimiorésistants permet de repérer des différences et de développer des marqueurs prédictifs de réponse aux traitements. Des exemples de marqueurs moléculaires prédictifs dans le cancer du sein seront abordés dans la partie **II. LES STRATEGIES THERAPEUTIQUES**. L'objectif de ces marqueurs est de pouvoir proposer des traitements anticancéreux adaptés à chaque patiente et à chaque tumeur. Leur utilité peut s'appliquer à l'ensemble des stratégies thérapeutiques dans le cancer du sein.

II. LES STRATEGIES THERAPEUTIQUES DANS LE CANCER DU SEIN

Plusieurs traitements des cancers du sein sont disponibles. On distinguera essentiellement, la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie et les thérapies ciblées. Ils peuvent avoir selon les cas, différents objectifs, et être utilisés seuls ou en association. Les stratégies les plus efficaces sont celles qui permettent d'affecter sensiblement les cellules cancéreuses tout en épargnant les cellules saines. Les traitements existants s'approchent de cet objectif mais n'y parviennent pas encore selon les nombreux et contraignants effets secondaires souvent observés. Les thérapies ciblées sont apparues plus récemment dans l'arsenal thérapeutique, et permettent de bloquer spécifiquement un mécanisme impliqué dans les cellules cancéreuses.

1. Les différents traitements

1.1. *La chirurgie*

La chirurgie est efficace pour traiter les tumeurs localisées et reste le meilleur moyen de traiter le centre peu vascularisé des grosses tumeurs, là où les autres stratégies thérapeutiques ont du mal à accéder. Dans le cadre du cancer du sein, la chirurgie peut être conservatrice (tumorectomie), visant à ne retirer que la tumeur, ou alors non conservatrice (mastectomie) où la totalité du sein est retirée. Selon les cas, il peut être nécessaire de retirer un ou plusieurs ganglions lymphatiques axillaires.

1.2. *La radiothérapie*

Comme pour la chirurgie, la radiothérapie est un traitement local. Il s'agit d'irradier les cellules tumorales avec un rayonnement de forte énergie pour endommager l'ADN et d'autres constituants cellulaires, soit directement ou alors indirectement, afin d'engager un processus de mort cellulaire. Les rayonnements utilisés peuvent être par électrons, par photons ou de manière plus restreinte par protons.

1.3. *La chimiothérapie*

Lorsque le cancer du sein tend à se développer ailleurs dans l'organisme, faisant apparaître de nouvelles tumeurs (métastases), la chirurgie et la radiothérapie ne suffisent plus. La chimiothérapie a pour objectifs de détruire les cellules cancéreuses résiduelles afin de

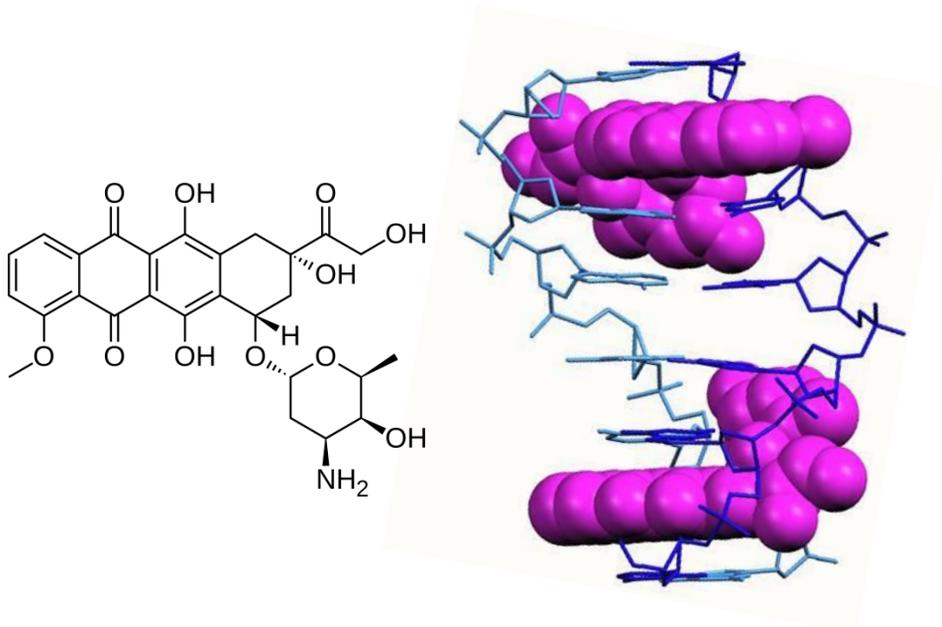


Figure 5 : Représentation de la structure chimique de la doxorubicine et de son interaction avec l'ADN. La doxorubicine est une anthracycline, qui, par sa nature chimique composée de plusieurs noyaux aromatiques condensés lui donnant une structure plane, agit en s'intercalant dans l'ADN. L'architecture supramoléculaire d'une double d'hélice d'oligonucléotides d'ADN avec deux molécules de doxorubicine (structures roses) est obtenue par l'équipe du professeur Michael John Hannon (M. J. Hannon, 2007).

réduire le risque de récurrence après la chirurgie (chimiothérapie adjuvante), de diminuer le volume de la tumeur avant la chirurgie (chimiothérapie néoadjuvante), ou encore de traiter de façon curative les cancers du sein métastatiques.

Il existe un large éventail de médicaments différents utilisés en chimiothérapie dans le cancer du sein, qui sont classés en fonction de leur mode d'action cellulaire. Certains interagissent directement avec l'ADN, d'autres agissent en amont de la biosynthèse des acides nucléiques, d'autres enfin ont pour cible des protéines spécifiques. Parmi les agents thérapeutiques les plus fréquemment utilisés en chimiothérapie adjuvante ou néoadjuvante dans le cancer du sein, on trouve : une anthracycline comme la doxorubicine ou l'adriamycine, un antimétabolite comme le 5-fluorouracile et un taxane comme le paclitaxel.

1.3.1. La doxorubicine

Dans le traitement des cancers du sein par chimiothérapie, les anthracyclines sont fréquemment utilisées, en particulier la doxorubicine et l'épirubicine. La doxorubicine, par sa nature chimique composée de plusieurs noyaux aromatiques condensés lui donnant une structure plane, agit en s'intercalant dans l'ADN (**Figure 5**). Elle entraîne ainsi des modifications structurales de la double hélice à l'origine d'un blocage de la progression des ARN et ADN polymérase et donc d'une inhibition, respectivement de la réplication et de la transcription (Gewirtz, 1999). La doxorubicine est capable par exemple de former des adduits à l'ADN (liaison covalente de la molécule à l'ADN) (Cutts et al., 2005). Elle a également pour cible la topoisomérase II, une enzyme impliquée dans la réplication. En inhibant l'activité topoisomérase, la doxorubicine est à l'origine de cassure simple et double brins de l'ADN (Lyu et al., 2007). Enfin, la doxorubicine agit également sur les cellules tumorales en générant des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO), lorsqu'elle est métabolisée par les cytochromes P450 réductases (Bartoszek, 2002). La génération d'un stress oxydant est également dépendante d'une altération de l'activité mitochondriale des cellules cancéreuses mammaires traitées à la doxorubicine (Kuznetsov et al., 2011). En effet, la doxorubicine semble être capable d'entraîner des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire mitochondriale, avec pour conséquence, une dépolarisation de l'organite et l'augmentation de la production de DRO par les mitochondries. L'utilisation des anthracyclines comme la doxorubicine est associée à l'engagement des cellules cancéreuses vers un processus de mort cellulaire par apoptose.

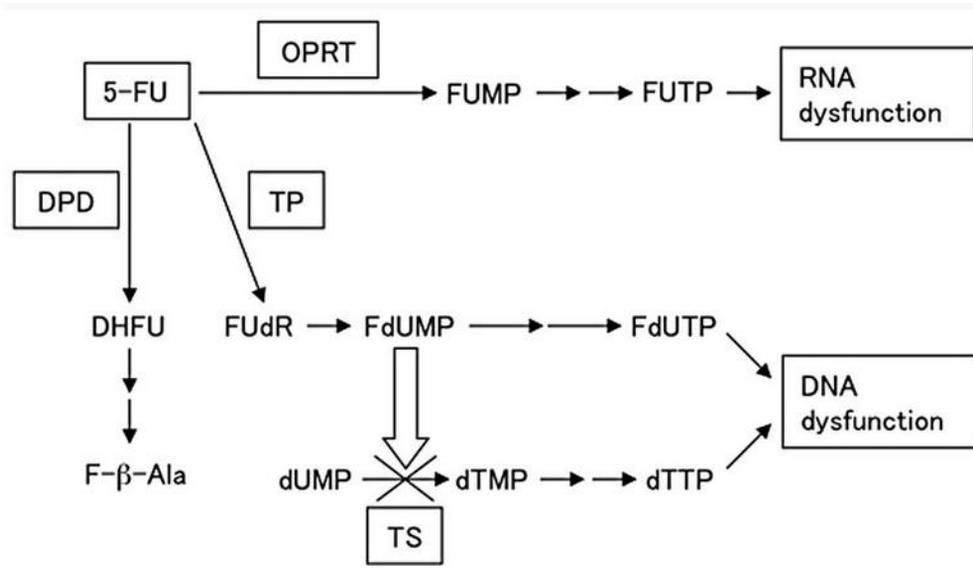


Figure 6 : Schéma d'illustration des voies de métabolisation intracellulaire du 5-Fluorouracile (5-FU).

OPRT, orotate phosphoribosyltransférase ; FUMP, 5-fluorouridine monophosphate; FUTP, 5-fluorouridine triphosphate; TP, thymidine phosphorylase; FUdR, 5-fluorodésoxyuridine; FdUMP, 5-fluorodésoxyuridine monophosphate; FdUTP, 5-fluorodésoxyuridine triphosphate; TS, thymidylate synthase; dUMP, désoxyuridine monophosphate; dTMP, désoxythymidine monophosphate; dTTP, désoxythymidine triphosphate; DPD, dihydropyrimidine déshydrogénase; DHFU, 5-fluoro-dihydrouracile; F-β-Ala, α-fluoro-β-alanine. D'après Tamatani, 2012.

Plusieurs mécanismes de résistance aux anthracyclines ont été décrits, comme une augmentation de son efflux des cellules tumorales surexprimant la glycoprotéine P (phénotype MDR pour Multi Drug Resistance), qui correspond à une pompe à activité ATPasique au niveau de la membrane plasmique (Gouazé et al., 2005). La chimiosensibilité à la doxorubicine est influencée par le niveau d'expression de la topoisomérase II α dans les cellules cancéreuses mammaires (Järvinen et al., 2000). Une forte expression de la protéine est associée à une meilleure sensibilité des cellules à la doxorubicine. Enfin, la surexpression d'enzymes antioxydantes, telles que la superoxyde dismutase mitochondriale (SODMn) (Kinnula and Crapo, 2004), la glutathion peroxydase (GPx) (Gouazé et al., 2001), ou encore la glutathion S-transférase Pi (GST-Pi) (Moscow et al., 1989) semble associée à l'adaptation des cellules tumorales aux DRO générés par le métabolisme de la doxorubicine.

1.3.2. *Le 5-Fluorouracile*

C'est un analogue chimique fluoré de l'uracile, un précurseur de la thymine (**Figure 6**) qui appartient à la classe thérapeutique des antimétabolites. Il nécessite une activation métabolique intracellulaire en composés nucléosidiques, les 5-fluorodésoxyuridine monophosphate (FdUMP) et 5-fluorouridine triphosphate (FUTP), qui agissent en inhibant la biosynthèse des acides nucléiques (**Figure 6**) (Tamatani, 2012). Trois enzymes clés sont nécessaires à la métabolisation du 5-Fluorouracile (5-FU) : la thymidine phosphorylase (TP), la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) et l'orotate phosphoribosyltransférase (OPRT). La formation de FdUMP par la TP est responsable d'une inhibition de l'activité de la thymidylate synthase (TS) *via* la formation d'un complexe covalent avec le 5,10-méthylènetétrahydrofolate (CH₂THF). En affectant l'activité TS, le 5-FU entraîne une inhibition de la synthèse d'ADN. La voie de biosynthèse des ARN est également altérée par la conversion du 5-FU par l'OPRT en 5-fluorouridine triphosphate (FUTP, **Figure 6**). Le FUTP est incorporé aux ARN et affecte leurs rôles dans la cellule (Tamatani, 2012).

Les principaux mécanismes de résistance au 5-FU correspondent soit à la surexpression de la thymidylate synthase (Ishikawa et al., 2008), soit à des modifications des activités des enzymes intervenant dans son activation métabolique ou son catabolisme. La dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) est responsable du catabolisme du 5-FU en métabolite inactif, le 2-fluoro- β -alanine dans le foie (Tamatani, 2012, **Figure 6**). En fonction de son expression, cette enzyme peut dégrader jusqu'à 85% du 5-FU administrée (Ando et al., 2008) et diminuer en conséquence l'efficacité antitumorale du traitement.

1.3.3. *Le paclitaxel*

Le paclitaxel et le docétaxel appartiennent à la famille des taxanes, respectivement dérivés de l'écorce de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*) et de la feuille de l'if Européen (*Taxus baccata*). Ils sont actuellement utilisés dans le traitement des cancers du sein métastatiques. Au cours des dix dernières années, le paclitaxel a fait l'objet de nombreux essais cliniques, démontrant l'effet bénéfique de son utilisation couplée avec d'autres agents anticancéreux dans plusieurs types de cancer. Sur des patientes atteintes de cancers du sein, les anthracyclines et taxanes sont souvent associés pour un traitement adjuvant des tumeurs (Wildiers et al., 2010). Cette association donne souvent de meilleurs résultats (temps sans progression et survie) par rapport à un traitement associant 5-Fluorouracile-doxorubicine (Jassem et al., 2001; Wildiers et al., 2010). Les éléments motivants son utilisation en complément d'autres médicaments, sont d'une part sa relative faible résistance croisée dans les cancers du sein et d'autre part liés à son monde d'action qui diffère des autres médicaments anticancéreux (anthracyclines, antimétabolites...).

Les taxanes bloquent les cellules en prolifération au niveau de la mitose, en empêchant la dépolymérisation et la réorganisation des microtubules du fuseau mitotique. Les microtubules sont polymérisés grâce à l'assemblage d'hétérodimère de tubuline α et β . Le paclitaxel se fixe de manière réversible sur la tubuline β (Löwe et al., 2001) et contribue à stabiliser l'hétérodimère de tubulines $\alpha\beta$. *In vitro*, le paclitaxel est capable de se lier aux polymères de microtubules et de stimuler la polymérisation de la tubuline (Orr et al., 2003). Les microtubules formés en présence de paclitaxel sont désorganisés et résistants à la dépolymérisation. Les cellules cancéreuses traitées au paclitaxel, développent finalement un mécanisme de mort par apoptose.

Des altérations de la tubuline par mutation de son gène ont été décrites et sont responsables d'une résistance au paclitaxel dans le cancer du sein. Des modifications post-traductionnelles ou des modifications de sous-types de tubulines qui composent les microtubules, peuvent diminuer la sensibilité des cellules au paclitaxel. Dans une étude de 2002, la lignée cancéreuse mammaire MCF-7 est sélectionnée afin d'isoler des cellules résistantes au paclitaxel. La résistance à ce taxane est corrélée à une forte expression des formes α -tubuline tyrosinée et des sous-types beta(III) et beta(IV)-tubuline (Banerjee, 2002). Par ailleurs, certaines données *in vitro*, montrent que la résistance au paclitaxel peut être

également associée à l'augmentation de son efflux, par surexpression de la glycoprotéine P dans les cellules cancéreuses mammaires (Mechetner et al., 1998).

1.4. L'hormonothérapie

Les hormones, produites naturellement par l'organisme, exercent sur les cellules des effets sur la croissance, la différenciation et la survie. Dans certains cancer du sein, dits hormono-dépendants, les cellules cancéreuses expriment les récepteurs hormonaux, notamment celui des œstrogènes (ER) et de la progestérone (PR). La prolifération et la survie des cellules cancéreuses seront donc soutenues par la production d'hormones par l'organisme. L'hormonothérapie consiste à réduire cette influence hormonale pour inhiber la croissance tumorale et stimuler la mort des cellules cancéreuses mammaires. Un examen de prélèvements tumoraux permet de déterminer si les cellules tumorales expriment les récepteurs ER et/ou PR. En l'absence ou lors d'une faible expression des récepteurs, l'hormonothérapie n'est pas prescrite. En cas de cancers du sein hormono-dépendants, deux stratégies sont applicables : neutraliser l'action des hormones sur leurs récepteurs (Ex ; le tamoxifène, un antagoniste de ER α) ou diminuer la synthèse des hormones (Ex ; anti-aromatase). Plusieurs mécanismes de résistance à l'hormonothérapie ont été décryptés dans les cellules cancéreuses mammaires : une baisse ou perte de l'expression de ER, une perte de l'expression de PR et la surexpression des récepteurs aux facteurs de croissance EGFR/HER2 (Osborne and Schiff, 2011).

1.5. Les thérapies ciblées

Les thérapies ciblées sont apparues plus récemment, et sont développées grâce à un décryptage approfondie des caractéristiques moléculaires tumorales. L'amélioration des techniques de biologie moléculaire à haut débit, a permis de dresser la carte d'identité des tumeurs et d'identifier les anomalies en cause. L'objectif des thérapies ciblées est de cibler spécifiquement ces anomalies. Elle intègre l'utilisation de molécules ciblant une protéine ou plus largement un mécanisme impliqué dans le développement tumoral ou sa résistance aux traitements. Cette thérapie affecte plus spécifiquement les cellules tumorales et entraîne peu d'effets secondaires, car elle épargne les cellules saines.

Parmi les principales classes de thérapies ciblées utilisés dans le cancer du sein, on retrouve celle des anti-HER2. Le gène *HER2* est amplifié ou surexprimé dans 15 à 20% des cancers du sein (Molnar-Stanciu et al., 2012) et est associé à des tumeurs ayant un fort taux de

prolifération et à un risque important de récurrence ou de décès. Le gène *HER2* code un récepteur transmembranaire à EGF (Epidermal Growth Factor), et appartient aux récepteurs de type tyrosine kinase, impliqués dans la régulation de la prolifération. Le trastuzumab est un anticorps monoclonal humain anti-HER2, employé comme thérapie ciblée chez des patientes porteuses de tumeurs surexprimant HER2. Il se fixe alors sur la partie extracellulaire du récepteur et entre en compétition avec l'EGF et empêche l'activation du signal mitogène de ce dernier. Du côté intracellulaire, l'activité tyrosine kinase du récepteur HER2 peut être altérée directement par une molécule inhibitrice, le lapatinib. L'utilisation du lapatinib permet de contourner la résistance de certaines cellules cancéreuses mammaires au trastuzumab (Scaltriti et al., 2007).

Malgré une application encore restreinte et un nombre limité de molécules, les thérapies ciblées font partie intégrante des soins appliqués pour les cancers du sein. En 2011, 28 plateformes de génétique des tumeurs étaient disponibles en France et ont permis de caractériser les tumeurs de 55 000 patients (tous cancers confondus) afin de leur faire bénéficier d'une thérapie ciblée.

2. Les mécanismes de mort cellulaire chimio-induits

L'objectif final pour tous traitements par chimiothérapie est de provoquer la mort des cellules cancéreuses *via* des mécanismes intrinsèques. Selon les cibles moléculaires, l'ADN, des ARN, ou des protéines, les agents de chimiothérapie utilisés, provoqueront des dommages multiples, responsables de la mort des cellules tumorales. Les mécanismes de mort cellulaire mettent en jeu des gènes et des voies de signalisation similaires, qui représentent des perspectives de développement thérapeutique intéressantes en oncologie.

2.1. Les altérations chimio-induites et réponses cellulaires

En général, la chimiothérapie inhibe la division des cellules cancéreuses en diminuant la biosynthèse des nucléotides, en bloquant la réplication ou en induisant des cassures de l'ADN, ou encore en perturbant la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose. Les dommages de l'ADN peuvent être corrigés par les cellules grâce à des mécanismes de réparation. Toutefois, l'effet recherché pour un traitement permet de dépasser les capacités normales de réparation et de provoquer un arrêt du cycle cellulaire, puis la mort des cellules.

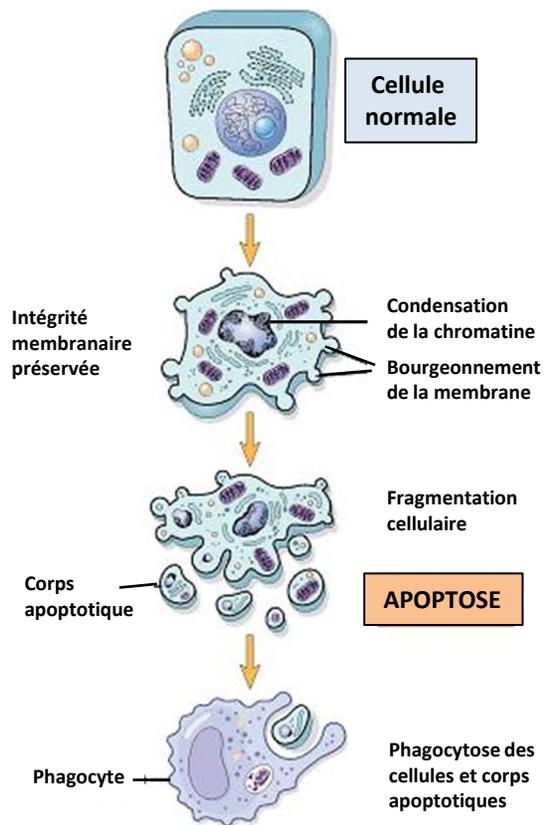


Figure 7 : Représentation schématique des principaux événements cellulaires spécifiques à l'apoptose.

Morphologiquement, les cellules apoptotiques sont caractérisées par un rétrécissement du volume cellulaire, accompagné d'un bourgeoisement de la membrane plasmique. Une fragmentation des cellules apoptotiques permet la formation de corps apoptotiques. L'intégrité de la membrane plasmique est néanmoins conservée et évite le relargage de composés cytoplasmiques. Dans le compartiment intracellulaire, l'apoptose se manifeste par une condensation de la chromatine, une fragmentation de l'ADN et le clivage de protéines. La mort cellulaire par apoptose est considérée comme immunologiquement silencieuse grâce à une phagocytose précoce des cellules et des corps apoptotiques *in vivo* par des phagocytes. D'après Robbins and Cotran's Pathologic Basis of Disease 7th Edition (2005).

Certaines chimiorésistances sont cependant liées à une augmentation des capacités de réparation de l'ADN dans les cellules cancéreuses (Ozkan et al., 2012).

Certains agents de chimiothérapie, comme la doxorubicine, sont capables d'induire un stress oxydatif en provoquant directement ou indirectement la production de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO). L'amplification des défenses anti-oxydantes dans les cellules cancéreuses diminue la mort cellulaire induite par un traitement de chimiothérapie, suggérant que la génération de radicaux oxygénés participe à l'effet anti-tumoral (Trachootham et al., 2009). En condition de stress oxydatif, les DRO entraînent des altérations, du fait de leurs réactivités sur les lipides, les protéines et les acides nucléiques. La perte des fonctions biologiques des composants cellulaires affectés entraînera un arrêt de la prolifération et une mort cellulaire.

2.2. Les mécanismes de mort cellulaire

La cytotoxicité d'une chimiothérapie conduit la plupart du temps à une mort par apoptose, et dans une moindre mesure par nécrose. Malgré des caractéristiques propres, ces deux modalités de mort cellulaire peuvent coexister et participer à l'effet cytotoxique global. Plusieurs travaux suggèrent la participation de l'autophagie dans la mort cellulaire chimio-induite (Gewirtz, 2014; Notte et al., 2011). Même s'il ne s'agit pas d'un mécanisme de mort cellulaire proprement dit, l'autophagie contribue à accélérer la mort par apoptose ou nécrose.

2.2.1. Mort cellulaire par apoptose

L'apoptose se caractérise par trois événements : (i) des modifications morphologiques, (ii) des modifications de la membrane plasmique et (iii) une protéolyse intracellulaire et une fragmentation de l'ADN. Les différentes étapes sont résumées dans la **figure 7**.

Classiquement, deux étapes distinctes précèdent la phase de dégradation de la cellule au cours de l'apoptose : une étape d'induction et une étape d'exécution. Deux voies principales d'induction de l'apoptose existe : il s'agit de la voie des récepteurs de mort (voie extrinsèque) et la voie mitochondriale (voie intrinsèque) (Kaufmann and Earnshaw, 2000). Les médiateurs et les événements moléculaires à l'origine de ces deux voies sont schématisés dans la **figure 8**.

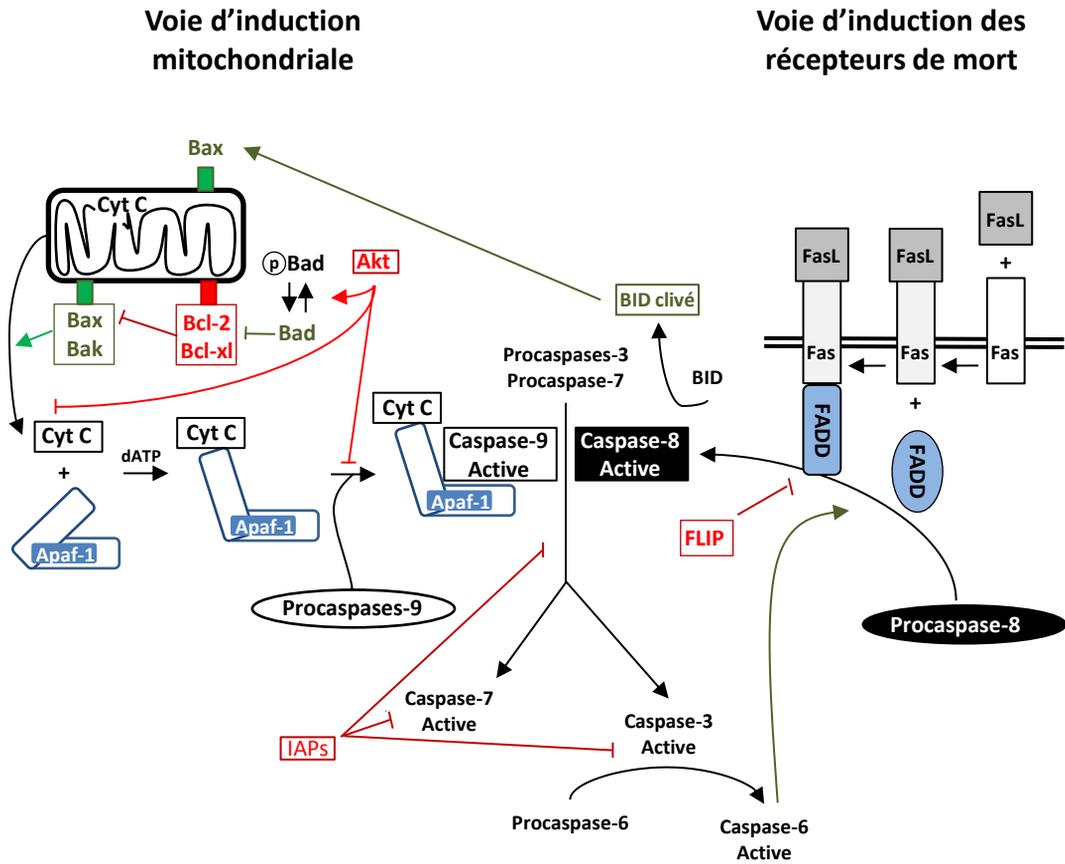


Figure 8 : Représentation schématique des deux voies d'induction de l'apoptose dans les cellules de mammifères. La voie des récepteurs de mort est activée après oligomérisation des récepteurs de type TNFR (Fas) liés à un ligand apoptogène (FasL). Un domaine intracellulaire des récepteurs de mort activés permet le recrutement de la molécule adaptatrice FADD et l'activation de la pro-caspase 8. Le facteur FLIP est capable d'interagir avec la partie intracellulaire des récepteurs de mort et entre en compétition avec l'activation de la pro-caspase 8. La deuxième voie d'induction implique la libération dans le cytosol de facteurs apoptogènes (cytochrome c) par la perméabilisation des membranes mitochondriales. La formation d'un complexe protéique contenant le cytochrome c (Cyt c) et Apaf-1 permet l'activation de la pro-caspase 9. Le relargage du cytochrome c est contrôlé par les protéines de la famille Bcl-2. Parmi ces protéines, certaines sont dites pro-apoptotiques, elles facilitent la perméabilisation des membranes mitochondriale (Bax, Bak, Bad), d'autres à l'inverse inhibent l'induction de l'apoptose et sont dites anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl, Bid). La voie de signalisation Akt (voie de survie) ou encore les protéines IAP et FLIP permettent de réguler négativement l'activation du signal apoptotique. Le clivage de la protéine Bid au cours de l'activation des récepteurs de mort est responsable de l'amplification du signal apoptotique par l'induction de la voie mitochondriale. D'après Kaufmann and Earnshaw, 2000.

2.2.1.1. *La voie des récepteurs de mort*

La fixation de ligands de type cytokines (FasL, TNF, etc...) sur des récepteurs à la surface des cellules, appelés récepteurs de mort permet l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose. Ces récepteurs, appartiennent à la superfamille des récepteurs du Tumor Necrosis Factor (TNFR). Cet événement est suivi par la formation d'un complexe protéine appelé Death Inducing Signaling Complex (DISC) sur une région cytoplasmique du récepteur, correspondant à un motif conservé nommé Death Domain (DD) (**Figure 8**). L'ensemble de ce complexe protéique conduit à l'activation des pro-caspases-8 et -10. Les caspases appartiennent à la famille des protéases à cystéine clivant leur substrat du côté C-Terminal d'un acide aspartique. Au cours de l'activation de la voie extrinsèque, les caspases-8 et -10 sont d'abord sous une forme inactive (pro-caspases ou zymogène), puis convertis par le complexe DISC en forme active grâce à un auto-clivage. Les caspases initiateuses activées pourront alors entraîner l'étape d'exécution de l'apoptose.

Le premier paramètre à considérer pour évaluer l'importance de cette voie dans la mort cellulaire induite, c'est le niveau d'expression des récepteurs de mort. Une très grande variabilité d'expression intercellulaire existe pour ces récepteurs et conditionne ainsi la sensibilité de cette voie à induire l'apoptose. Deuxièmement, certaines cellules expriment des récepteurs de mort mutés ou tronqués, incapables d'activer la voie apoptotique malgré la fixation des ligands (Kaufmann and Earnshaw, 2000).

Du côté intracellulaire, des mécanismes de régulation de l'activation de la voie extrinsèque existent également (**Figure 8**). En particulier, l'activation de la caspase-8 peut être inhibée par la protéine FLIP (Flice-like inhibitory protein) ou les protéines IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins) (Hotchkiss et al., 2009; Wei et al., 2008).

2.2.1.2. *La voie mitochondriale*

Présentes dans toutes les cellules eucaryotes, les mitochondries, constituent la principale source d'énergie sous forme d'ATP. Elles sont composées d'un double système membranaire (membrane externe et interne) définissant deux compartiments, l'espace intermembranaire et la matrice. La chaîne respiratoire composée de quatre complexes (I à IV) est localisée au niveau de la membrane interne de l'organite. Le cinquième complexe correspond à l'ATP synthase, qui est une pompe à proton responsable de la synthèse de

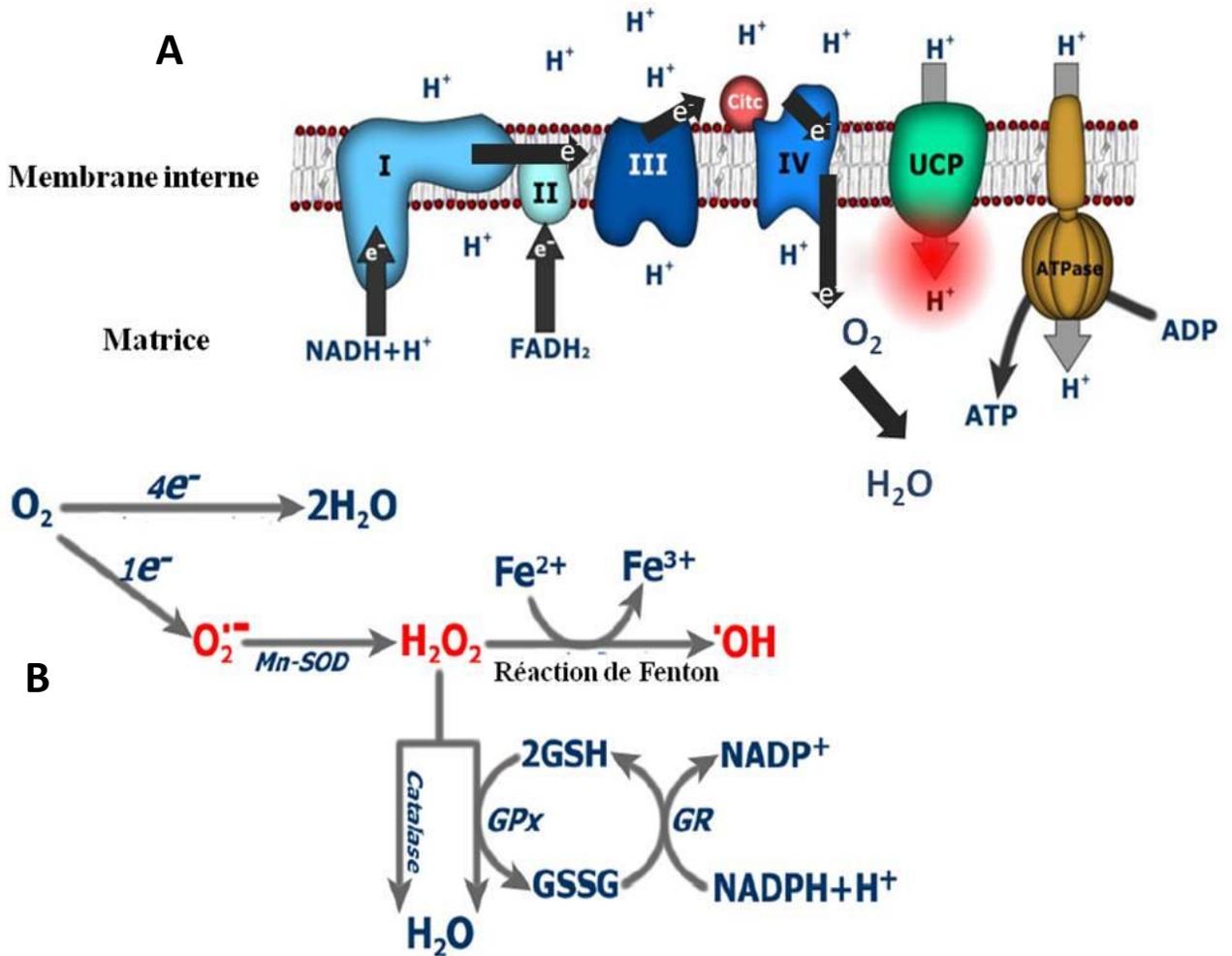


Figure 9 : A, Représentation schématique de la chaîne respiratoire. La production énergétique assurée par les mitochondries, nécessite l'oxydation de nutriments permettant de fournir à la chaîne respiratoire des co-enzymes réduites sous forme de NADH+H⁺ et de FADH₂. Les électrons des co-enzymes réduites subissent des chutes successives de potentiel au niveau de la chaîne respiratoire, avant de se combiner avec l'oxygène pour former des molécules d'eau. Au niveau des complexes I, III et IV, le transfert des électrons est couplé à la translocation de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, générant ainsi un gradient de proton, à l'origine du potentiel de membrane mitochondriale. La dissipation de ce gradient au niveau de l'ATP synthase est couplée à la phosphorylation de l'ADP en ATP. Dans ce processus, l'oxydation des substrats est donc couplée à la synthèse d'ATP d'où le nom de phosphorylation oxydative. Des protéines découplantes (UCP), localisées dans la membrane interne, sont responsables d'une entrée de protons de l'espace intermembranaire vers la matrice, à l'origine d'un découplage entre la respiration et la synthèse d'ATP. **B, Représentation schématique de la production des dérivés réactifs de l'oxygène et du système de détoxification intramitochondriale.** (GPx : glutathion peroxydase ; GR: glutathion réductase ; GSH: glutathion; Mn SOD : superoxyde dismutase à manganèse). (D'après Valle and al., 2010).

production énergétique sous forme d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (**Figure 9.A**).

Par ailleurs, la chaîne respiratoire mitochondriale est une source majeure d' O_2^- , produit à partir de 2% de l'oxygène moléculaire, qui est réduit de manière incomplète (Sugioka et al., 1988). Ces O_2^- peuvent être à l'origine d'autres DRO comme les hydroperoxydes (le peroxyde d'hydrogène : H_2O_2 et le radical hydroxyl : OH) (**Figure 9.B**). Ces composés jouent un rôle important dans l'activation des voies de signalisation intracellulaire. En cas de production excessive, ils peuvent être à l'origine d'un stress oxydant et entraînent des effets délétères dans la cellule en oxydant les molécules biologiques (Lee and Wei, 2009). Cependant, les cellules possèdent des enzymes antioxydantes, dont principalement les superoxydes dismutases (mitochondriale et cytosolique réduisant l' O_2^- en H_2O_2), la glutathion peroxydase et la catalase réduisant l' H_2O_2 en H_2O .

Quel que soit le type cellulaire ou le signal inducteur, les mitochondries jouent un rôle clé au cours des différentes étapes de l'apoptose. L'activation de la voie mitochondriale (voie intrinsèque) débute par une altération de la membrane mitochondriale externe permettant la libération dans le cytosol de protéines apoptogènes initialement localisées dans l'espace intermembranaire (Hotchkiss et al., 2009). Le relargage de ces protéines mitochondriales (cytochrome c, AIF pour apoptosis inducing factor) est associé à une modification de la perméabilité de la membrane externe. Au cours de l'apoptose le relargage du cytochrome c permet la formation d'un complexe protéique cytosolique, appelé apoptosome, constitué du cytochrome c, des protéines Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) et de la pro-caspase-9 (**Figure 8**). Au sein de l'apoptosome, la nouvelle conformation de la protéine pro-caspase-9 stimule son activité protéasique et sa conversion en caspase-9, sa forme active, *via* son auto-clivage.

Le déclenchement du signal apoptotique par les mitochondries va dépendre d'une variation de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MEM) responsable du relargage des protéines apoptogènes. La perméabilisation de la MEM conduit à une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$). Cette diminution du $\Delta\psi_m$ est un événement caractéristique des cellules en cours d'apoptose (Estaquier et al., 2012). Le contrôle de la perméabilité de la MEM va relever d'un équilibre entre des protéines dites, pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. Ces protéines appartiennent à la famille Bcl-2 qui compte 30 membres. Le premier membre à avoir été caractérisé est le gène Bcl-2 (B Cell Lymphoma)

qu'on retrouve dans plusieurs espèces, (Estaquier et al., 2012) et dont sa surexpression est associée à une inhibition de l'apoptose dans plusieurs modèles de cellules eucaryotes. Les autres membres de la famille Bcl-2 partagent des domaines conservés appelés BH (Bcl-2 homology) et peuvent être subdivisés en trois catégories.

- les protéines anti-apoptotiques avec quatre domaines BH (BH1 à BH4) : Bcl-2 et Bcl-xl par exemple.
- les protéines pro-apoptotiques avec trois domaines BH (BH1 à BH3) : Bak et Bax
- les protéines pro-apoptotiques avec un seul domaine BH3 : Bad, Bid et Bim

Le relargage du cytochrome c va être initié grâce à l'oligomérisation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak (Estaquier et al., 2012) à la surface de la MEM. En condition normale, la protéine Bak se localise à la MEM grâce à un domaine transmembranaire en position C-terminal, tandis que Bax se trouve dans le cytosol. La formation d'oligomères Bak/Bax est facilitée et amplifiée par les protéines pro-apoptotiques à un seul domaine BH3 (Bid, Bim, etc...). A l'inverse, les protéines anti-apoptotique (Bcl-2, Bcl-xl) vont pouvoir déstabiliser les complexes Bak/Bax et empêcher le relargage du cytochrome c.

Plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer comment l'oligomérisation de Bak/Bax contrôlait la perméabilisation de la MEM (Kroemer et al., 2007). Même si le rôle de ces mécanismes sur l'activation du signal apoptotique mitochondrial a été en partie vérifié, l'implication de certains mécanismes reste néanmoins controversée. L'importance de chacun de ces modèles de régulation dans l'induction de la voie apoptotique mitochondriale n'est pas encore claire, mais le rôle assuré par les protéines de la famille Bcl-2 est central.

2.2.1.3. Relation entre voie extrinsèque et intrinsèque

Selon le type cellulaire ou la nature du signal, les deux voies d'induction, extrinsèque et intrinsèque, participent à la signalisation apoptotique (Ozoren and El-Deiry, 2002). Lorsque la voie extrinsèque est activée, la protéine Bid (appartenant à la famille des protéines Bcl-2) permet de faire le lien avec la voie mitochondriale, afin de générer un signal apoptotique plus intense. En absence d'apoptose, la protéine Bid se localise dans le cytosol sous une forme inactive (**Figure 8**). Au cours de l'apoptose, son clivage par la caspase-8, lui permet d'exposer un domaine BH3. Cette forme tronquée et active de Bid, va provoquer un changement de conformation de la protéine Bax, qui pourra alors être transloquée vers la membrane mitochondriale et faciliter le relargage du cytochrome c.

2.2.1.4. Rôles des caspases

L'étape d'exécution, qui fait le lien entre l'activation de la voie intrinsèque ou extrinsèque et l'étape de dégradation, est souvent considérée comme caspases-dépendante. La plupart des modifications et altérations cellulaires caractéristiques de l'apoptose sont le résultat de l'activation d'une unique famille de protéase, les caspases. Les caspases responsables de la dégradation des cellules apoptotiques, sont dites caspases effectrices, et possèdent les mêmes propriétés d'activation et d'action que les caspases initiateuses 9, 8 et 10 vues précédemment. Les caspases initiateuses activées au cours de l'étape d'induction de l'apoptose (caspase-9 pour la voie intrinsèque et caspases-8 et -10 pour la voie extrinsèque) sont capables à leur tour d'activer les caspases effectrices. Il existe trois caspases effectrices fortement impliquées dans la dégradation des cellules en apoptose : la caspase-3, -6 et -7. Contrairement aux caspases initiateuses, les caspases-3, -6 et -7 ont une multitude de substrats (Fischer et al., 2003).

Parmi les substrats des caspases effectrices on trouve :

- la protéine poly(ADP-ribose) polymérase (PARP). La fonction de cette protéine est d'assurer le maintien de l'intégrité de l'ADN, mais sous sa forme clivée cette fonction est inactive (Hotchkiss et al., 2009).
- la protéine chaperonne ICAD (inhibitor of Caspase activated-DNase). Cette protéine se lie à la nucléase CAD (Caspase activated-DNase) et la maintient sous une conformation inactive. Son clivage par les caspases libère la nucléase, qui forme alors des dimères actifs, capables de couper l'ADN génomique.
- les protéines de structure du noyau (NuMA pour Nuclear Matrix) comme les laminines. Expliquent la condensation nucléaire des cellules apoptotiques.
- des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et la prolifération, et la voie de survie. Par exemple, la protéine p21Cip/Waf, la protéine du rétinoblastome pRB, ou encore les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL (Earnshaw et al., 1999)

À côté de cette étape d'exécution dite caspases-dépendante, il faut noter qu'il existe également une voie d'exécution indépendante des caspases. (Candé et al., 2002; van Loo et al., 2001).

2.2.2. *Autres voies de mort cellulaire*

A côté de l'apoptose, d'autres modalités de mort cellulaire chimio-induites sont observées en condition physiologique. Dans la plupart des cas, elles vont se développer en prélude à l'apoptose, ou en aval d'un processus apoptotique tardif.

La nécrose, possède des caractéristiques propres et se manifeste le plus souvent après un phénomène d'apoptose. Ses effets viennent amplifier l'action du traitement anticancéreux et se manifestent par :

- une augmentation du volume de la cellule et une rupture de la membrane plasmique. La perte du contenu intracellulaire est susceptible de déclencher une réponse inflammatoire.
- une déplétion en ATP et une perméabilisation des membranes mitochondriale.
- l'absence d'activation des caspases et de fragmentation nucléaire

La nécrose se rencontre principalement suite à une agression extérieure, comme un stress mécanique (traumatisme) ou lors d'épisode ischémique. Certaines études ont montré l'intérêt de cette voie de mort cellulaire pour le traitement anticancéreux, en particulier par sa capacité à stimuler le système immunitaire (Galluzzi et al., 2009).

L'autophagie ne représente pas un processus de mort cellulaire, mais permet au contraire la survie des cellules dans la plupart des cas. Il s'agit un mécanisme de recyclage des composants intracellulaires (autocatabolisme) assurant le maintien du métabolisme en cas de baisse des apports énergétiques. En oncologie, le rôle de l'autophagie sur la chimiosensibilité des cellules cancéreuses est encore discuté. Dans certaines données, il apparaît, qu'en réponse à une chimiothérapie, l'autophagie peut éviter l'entrée en apoptose et permettre la survie des cellules cancéreuses (Jennifer S Carew, 2007). Néanmoins, d'autres travaux montrent l'intérêt de l'autophagie au cours d'une réponse aux traitements anticancéreux, notamment grâce à l'induction d'une réponse immunitaire intra-tumorale (Mickaël Michaud, 2011).

2.3. Voies chimio-induites et mécanismes de chimiorésistance des cellules cancéreuses

2.3.1. Voie apoptotique chimio-induite

La chimiothérapie exerce ses effets anti-tumoraux, principalement en stimulant l'apoptose des cellules cancéreuses (Fulda and Debatin, 2006). Des mutations de certains gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose sont parfois retrouvées dans les cellules tumorales et sont responsables d'une résistance au traitement (Fulda, 2009). Au regard des altérations génétiques identifiées, il semble que la voie intrinsèque participe à l'induction de l'apoptose chimio-induite (Mestre-Escorihuela et al., 2007; Tagawa et al., 2005; Wang et al., 2007). Toutefois d'autres travaux ont rapporté des altérations génétiques et des altérations dans l'expression de marqueurs spécifiques à la voie extrinsèque dans les cellules cancéreuses (FasL, FADD, pro-caspase-8) (Dechant et al., 2004; Ghavami et al., 2009; Seitz et al., 2002). L'implication de cette voie d'induction dans l'apoptose chimio-induite reste néanmoins controversée. La plupart des études ont été réalisées *in vitro* et à des doses d'agents anticancéreux souvent hautes.

2.3.2. Voie non-apoptotique chimio-induite

La cytotoxicité d'un traitement par chimiothérapie, peut, en plus de l'apoptose, être dirigée par la nécrose ou l'autophagie (Brown and Attardi, 2005). L'activation de ces voies non-apoptotiques au cours de la réponse des cellules tumorales aux traitements, semble être très dépendante de contextes bien spécifiques (type cellulaire, génotype des cellules, type de dommages, dose de l'agent de chimiothérapie). La relative contribution de ces voies de mort cellulaire est encore discutée et fait l'objet de nombreux travaux. Une meilleure connaissance des aspects moléculaires de ces voies de mort cellulaire, permettra d'améliorer la prise en charge thérapeutique des tumeurs résistantes aux voies apoptotiques chimio-induite.

2.3.3. Mécanismes de chimiorésistance des cellules cancéreuses

Il existe plusieurs altérations des voie d'induction de l'apoptose dans les cancers, qui conduisent le plus souvent à une augmentation de la survie des cellules cancéreuses (Fulda and Debatin, 2006). La surexpression du gène anti-apoptotique Bcl-2 par exemple, a été associée au développement des tumeurs, en favorisant la transformation tumorale et la survie

cellulaire (Fulda and Debatin, 2006). Dans les tumeurs mammaires, l'expression de Bcl-2 est inversement corrélée à l'efficacité du traitement par chimiothérapie (Buchholz et al., 2005).

Des altérations de l'expression d'autres gènes de la famille Bcl-2 sont également couramment décrites dans les tumeurs mammaires. Elles sont souvent causées par une perturbation des régulateurs transcriptionnels des gènes anti- et pro-apoptotiques, comme le suppresseur de tumeur p53 ou le facteur de transcription NF- κ B. Lors d'un traitement à la doxorubicine, les dommages provoqués sur l'ADN génomique entraînent un arrêt de la division des cellules selon un mécanisme dépendant de la protéine p53. L'activation de ce facteur de transcription permet également l'augmentation des gènes pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 et l'engagement des cellules vers la mort (Fulda and Debatin, 2006). La perte de fonction de la protéine p53 est observée dans 20 à 35% des cancers du sein (Lacroix et al., 2006) et a pour conséquence la survie des cellules cancéreuses à la mort.

Plus en aval de la voie de signalisation de l'apoptose, l'altération de l'activité des caspases dans les cancers est également fréquemment observée. Des mutations des gènes de plusieurs caspases (8, 9, 3, 7, 2) ont été identifiées dans plusieurs cancers dont celui du sein (Ghavami et al., 2009). L'inactivation de cette famille de protéase dans les cellules cancéreuses mammaires peut être favorisée par une surexpression de protéines inhibitrices des caspases, comme les cIAP (Fulda and Debatin, 2006; Stanculescu et al., 2010).

2.4. Conclusions

La caractérisation des voies de signalisation de mort cellulaire, activées par les agents de chimiothérapie apparaît essentielle pour plusieurs raisons. En premier lieu, elle contribue au développement de nouvelles pistes thérapeutiques antitumorales, dont l'objectif est d'agir directement sur l'activation des voies d'induction de la mort cellulaire. En deuxième lieu, la compréhension des mécanismes de mort associés aux traitements permet d'identifier des marqueurs moléculaires prédictifs d'une chimiosensibilité des cellules cancéreuses. Les niveaux d'expression des gènes de la famille Bcl-2 ou des protéines inhibitrices de l'activation des caspases (FLIP, cIAP, ...) possèdent par exemple, une valeur prédictive de réponse aux traitements, significative. De plus, l'activation des mécanismes de mort au cours d'une chimiothérapie peut être mesurée afin de vérifier l'efficacité antitumorale et de pouvoir adapter en conséquence le traitement.

3. Les marqueurs moléculaires prédictifs de la réponse aux traitements

La valeur prédictive des marqueurs recherchés peut être testée de deux manières différentes : sur la chimiosensibilité des tumeurs, quel que soit le type d'agent de chimiothérapie, ou alors sur la chimiosensibilité des tumeurs à un traitement spécifique.

3.1. *Prédiction multigénique ou signature*

La réponse des cellules tumorales mammaires à une combinaison de plusieurs agents de chimiothérapie va faire intervenir une multitude de voie de signalisation et de gènes. Aussi, des études utilisant des outils de biologie moléculaire à haut débit semblent dans ce contexte, les mieux adaptées. C'est le cas par exemple d'une étude menée par Ayers et al. (2004), où les profils d'expression de tumeurs de 24 patientes ont été analysés par puce à ADN. Une signature génique prédictive incluant 74 gènes a été corrélée avec la réponse complète pathologique des patientes à un traitement de chimiothérapie comportant du paclitaxel suivi d'un mélange 5-fluorouracile, doxorubicine et cyclophosphamide. Le pouvoir prédictif de ce groupe de gènes a été estimé à 73% sur un échantillon test de 21 patientes. Les gènes identifiés dans cette étude possèdent des rôles dans la prolifération, le métabolisme, l'inflammation et l'organisation des microtubules (Ayers et al., 2004). D'autres signatures multigéniques prédictives d'une réponse à la chimiothérapie ont été publiées ou sont en cours de développement. Certaines signatures moléculaires initialement décrites pour pronostiquer l'évolution tumorale, ont été validées plus tard pour leurs valeurs prédictives de réponse à la chimiothérapie. La signature pronostique Oncotype DX[®] (21 gènes) permet d'évaluer le risque de rechute à 10 ans de patientes atteintes d'un cancer du sein sans envahissement ganglionnaire. Plusieurs études ont suggéré son pouvoir prédictif de chimiosensibilité dans les cancers mammaires (Albain et al., 2010). Plus tard, une étude prospective, TAILORx, a été entamée sur 10 000 patientes dans le but de confirmer l'utilité de cette signature dans la prise en charge thérapeutique. Les résultats définitifs de cet essai sont attendus pour 2015.

3.2. *Prédiction mono-factorielle*

Les travaux présentés jusqu'à maintenant révèlent l'intérêt d'étudier les marqueurs prédictifs de réponse aux traitements de manière combinés, sous forme de signatures. D'autres données suggèrent l'utilité de considérer également ces marqueurs de façon isolée.

Un des plus anciens et plus décrit de ces marqueurs, est le récepteur aux œstrogènes (ER). Il est prédictif d'une réponse à l'hormonothérapie mais est également un bon marqueur pronostique d'évolution des cancers du sein (Duffy, 2005). Indépendamment de l'agent d'hormonothérapie utilisé (tamoxifène, inhibiteurs d'aromatase, etc...), seulement 30% des patientes (non sélectionnées pour le statut ER) atteintes d'un cancer du sein métastatique répondent favorablement au traitement (Buzdar and Hortobagyi, 1998). Pourtant, si cette même thérapie est employée uniquement sur des patientes atteintes de tumeurs exprimant ER, ce chiffre monte à 50-60%. Seulement 5 à 10% des tumeurs n'exprimant pas le récepteur régressent avec l'hormonothérapie. La corrélation entre l'expression du récepteur aux œstrogènes (isoforme α et β) dans les tumeurs et leurs réponses au tamoxifène a clairement été établie dans une étude incluant 37 000 patientes (Duffy, 2005). Des travaux plus récents, ont démontré que l'expression combinée de ER et du récepteur à la progestérone (PR) était de meilleur pronostic d'une réponse au tamoxifène (Bardou et al., 2003) que l'expression de ER seule.

Le gène *HER2* fait partie des oncogènes les plus connus de la cancérogenèse mammaire. Son implication est à l'origine de son ciblage thérapeutique par le trastuzumab. Le gène *HER2* est amplifié dans 15 à 30% des tumeurs mammaires, avec pour conséquence, une augmentation significative du nombre de récepteurs à la surface des cellules cancéreuses. Il est généralement admis que son amplification et/ou sa surexpression sont/est requise(s) pour un traitement des patientes au trastuzumab. Son rôle prédictif de chimiosensibilité, en dehors de l'utilisation de trastuzumab a fait l'objet de plusieurs études. En 2008, Pritchard et al. montrent dans une étude rétrospective, un effet bénéfique d'une amplification de *HER2* sur la réponse tumorale de 710 patientes, aux anthracyclines (Pritchard et al., 2008). La sensibilité aux anthracyclines ne semblerait pas être directement associée à l'amplification du gène de *HER2* mais plutôt liée à celle du gène de la topoisomérase II α (Knoop et al., 2005). Les deux gènes sont situés sur la même région du chromosome 17 et l'amplification du gène *HER2* est fréquemment accompagnée d'une amplification du gène de la topoisomérase II α .

D'autres travaux ont été menés dans ce sens et ont permis de caractériser plusieurs marqueurs prédictifs de réponse aux traitements dans les cancers du sein. Le gène TP53 est particulièrement étudié pour son pouvoir prédictif de réponse aux anthracyclines (Bonnetfoi and Cremoux, 2008). La chimiorésistance associée à l'expression des transporteurs ATP-dépendant est également couramment étudiée. Cette liste de marqueurs, mais c'est le cas également pour les signatures prédictives, ne peut être exhaustive, tant le nombre d'études et

de plateformes d'analyses se sont multipliées au cours de ces dernières années. Les travaux réalisés jusqu'à ce jour se sont essentiellement portés sur l'étude des transcriptomes. Mais l'analyse à haut débit des protéines (protéomique) et de l'ADN (CGH et SNP arrays) actuellement en cours, apportera de nouvelles pistes pour la prédiction de l'efficacité des traitements dans les cancers du sein.

L'identification d'un marqueur de chimiosensibilité se base le plus souvent sur l'observation d'une corrélation entre l'expression de ce marqueur et la réponse tumorale aux traitements. La prise en compte du rôle biologique d'un potentiel marqueur représente également un critère de sélection important. Dans ce sens, l'étude de facteurs impliqués dans la réparation de l'ADN, la progression tumorale et la réponse aux traitements anticancéreux représente une voie intéressante pour la recherche de marqueurs prédictifs.

C'est pourquoi, le laboratoire s'intéresse aujourd'hui à l'étude d'une protéine appelée Damaged DNA-Binding 2 (DDB2), dans le but de montrer son intérêt en tant que marqueur prédictif de la réponse aux thérapies anticancéreuses dans le cancer du sein. Cette protéine présente des activités biologiques diverses, dépendantes de ses capacités à interagir avec d'autres partenaires, mais également des mécanismes de régulation de son activité.

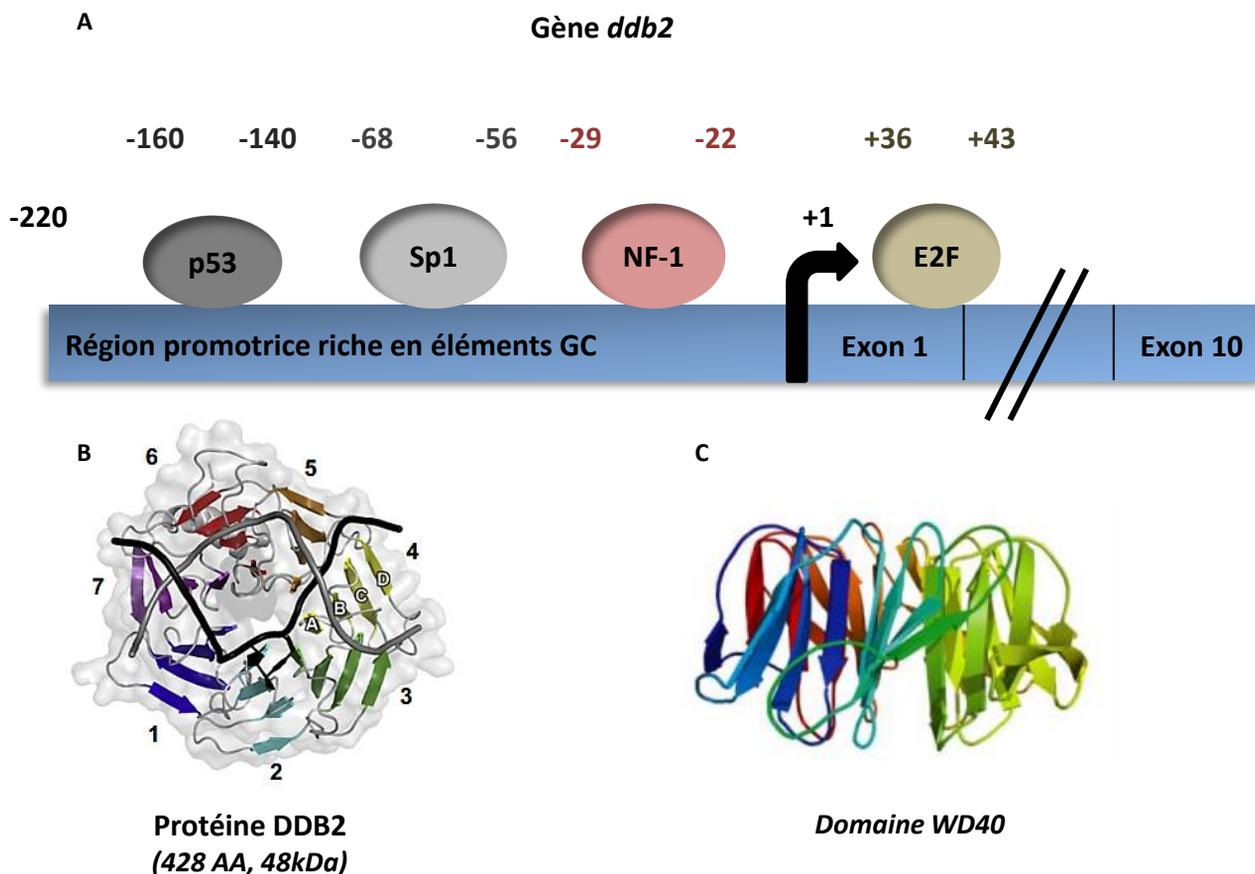


Figure 10 : Représentation schématique de la structure du gène et de la protéine humaine DDB2. Le gène codant la protéine DDB2 est constitué de 10 exons et code une protéine de 48 kDa (A). La région promotrice du gène présente de multiples éléments de réponses de facteurs de transcription, comme p53, NF-1, Sp1 ou encore E2F. La protéine DDB2 est constituée de 7 domaines répétés (annotés de 1 à 7), de type WD40 comportant 4 feuillets β (annotés de A à D) (B). La structure de la protéine en interaction avec un fragment d'ADN endommagé (6-4PP, brins noir et gris) est obtenue par cristallographie. Les domaines WD40 offrent de nombreuses surfaces pour les interactions avec des protéines, des peptides ou des acides nucléiques (C). Les domaines répétés de type WD40 sont organisés en séquences de 44 à 66 acides aminés contenant une région variable de 11 à 24 acides aminés suivie d'un dipeptide glycine-histidine à l'extrémité N-terminale et se terminent par un dipeptide tryptophane-acide aspartique (WD). D'après Scrima and al., 2008; Tan and Chu, 2002; Nichols and al., 2003; Stirnimann and al., 2010.

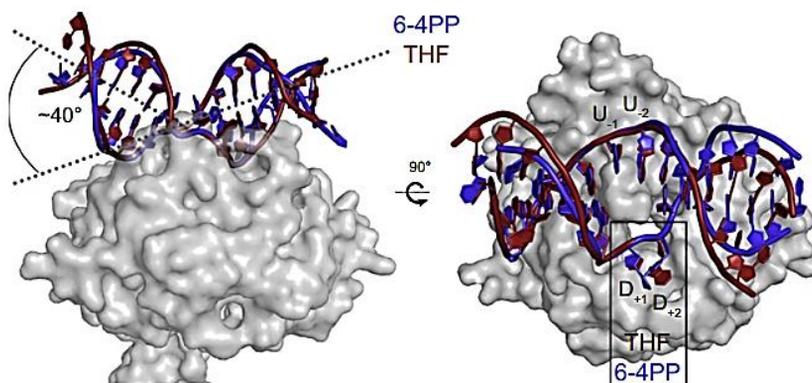


Figure 11 : Modélisation cristallographique de l'interaction entre la protéine humaine DDB2 et un photoproduit 6-4PP. La protéine DDB2 grâce à ses interactions protéiques au sein du complexe UV-DDB et ses domaines WD40, est capable de reconnaître les lésions de l'ADN comme les photoproduits de pyrimidines pyrimidones (6-4PP). La structure de la protéine DDB2 est représentée par un nuage gris au contact d'un fragment d'ADN contenant une lésion 6-4PP (brins rouge et bleu). D'après Scrima and al., 2008.

III. LA PROTEINE DDB2 : ROLES BIOLOGIQUES ET IMPLICATIONS DANS LES CANCERS

1. Caractéristiques structurales du gène et de la protéine

Le gène codant la protéine DDB2, localisé sur le chromosome 11, est constitué de 10 exons et code pour une protéine de 48 kDa (Tang and Chu, 2002) (**Figure 10**). La transcription du gène *ddb2* est capable de générer cinq isoformes différents par épissage alternatif (Inoki et al., 2004). L'isoforme 1 est majoritaire et est le plus fortement exprimé dans tous les types cellulaires. Les isoformes D2, D3 et D4 sont faiblement exprimés quelle que soit le type cellulaire. L'isoforme D1 est fortement exprimé dans le cerveau et le cœur. Uniquement identifiée chez les mammifères, la protéine DDB2 est présente exclusivement dans le noyau, grâce à la présence de deux séquences d'adressage. Composée de 428 acides aminés, la protéine DDB2 présente un domaine N-terminal de type hélice-boucle-hélice et possède sept motifs répétés, de type WD40 (**Figure 10**) formant un ensemble nommé, domaine WD40 (Scrima et al., 2008). Ces motifs sont organisés en feuillets β (β propeller domain) et contiennent une séquence d'environ 40 acides aminés avec une région variable de 11 acides aminés et se termine par un dipeptide tryptophane-acide aspartique (WD) (Stirnemann et al., 2010). Connus pour être impliqué dans les interactions protéine-protéine, le domaine WD40 permet à DDB2 d'interagir avec des protéines comme celles intervenant dans la réparation de l'ADN, telles que DDB1. La protéine DDB2 est également capable de maintenir une interaction avec les lésions de l'ADN induites par les UV, par l'intermédiaire du domaine WD40 (Scrima et al., 2008) (**Figure 10 et 11**).

2. Régulation de l'expression du gène DDB2

La régulation de l'expression de ce gène est peu connue. Lors de l'exposition de cellules normales aux ultraviolets (UV), l'induction de l'expression de *ddb2* fait intervenir la protéine p53 (Tan and Chu, 2002) et TAp63 γ (Liu et al., 2012), qui se lie à une séquence spécifique de la région proximale du promoteur, en présence de la protéine BRCA1 (Breast Cancer 1) (Takimoto et al., 2002). D'autres travaux ont mis évidence de multiples éléments de réponses de facteurs de transcription, comme NF-1, Sp1 ou encore E2F (Nichols et al., 2003) (**Figure 10**). En 2010, une équipe a montré qu'une augmentation de l'expression de DDB2 est également inductible par les DRO dans des fibroblastes embryonnaires murins (Roy et al.,

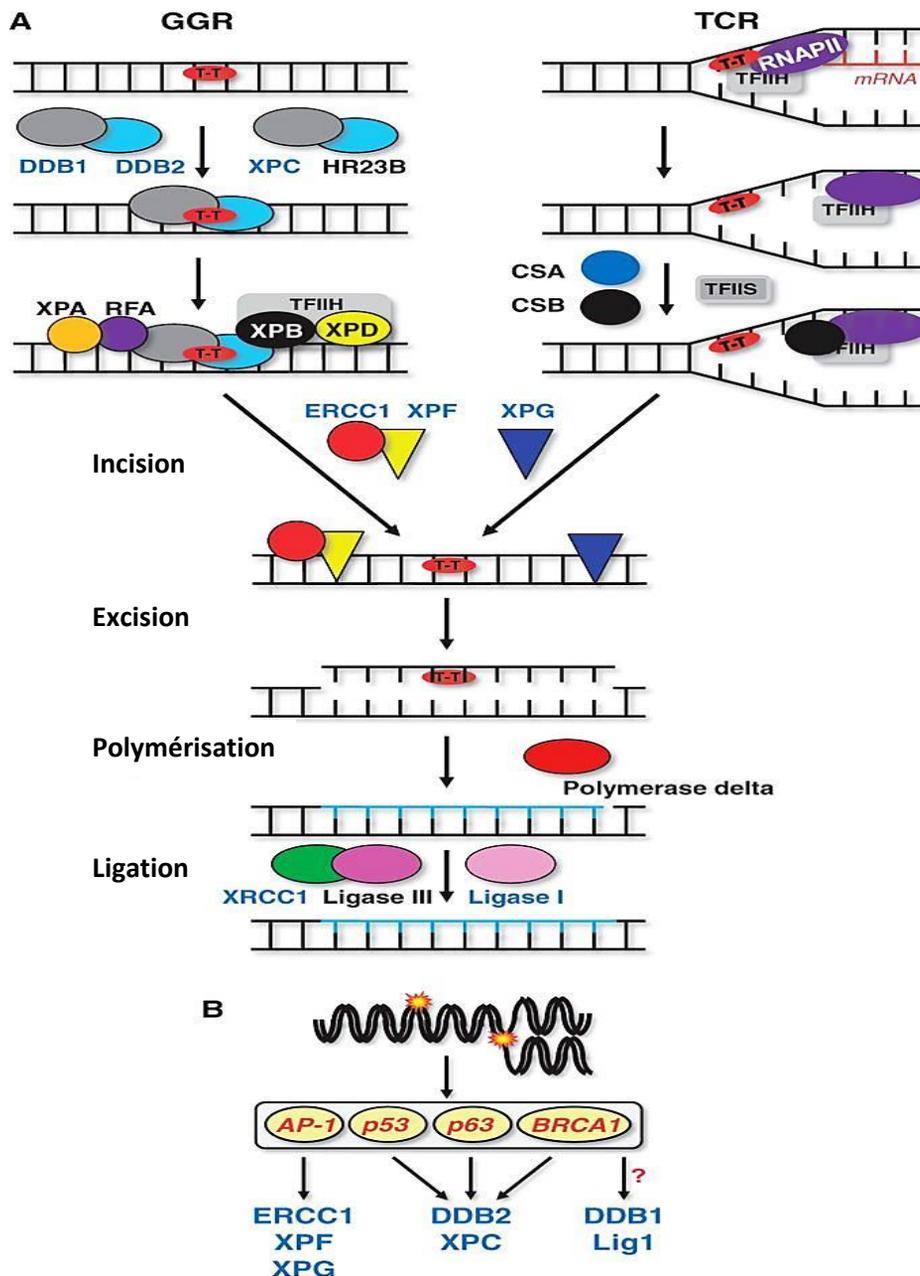


Figure 12 : A, Représentation schématique du mécanisme de réparation par excision de nucléotides (NER). Les dommages de l'ADN causés par les UV, les radiations ionisante ou les agent alkylants sont réparés par le système NER. Dans la voie globale de réparation (GGR), les lésions de l'ADN sont reconnues par le complexe protéique formé des protéines DDB2 et DDB1. Un second complexe de détection des lésions dans cette voie est composé des protéines XPC et hRad23B. La reconnaissance des lésions par ces complexes permet le recrutement d'autres protéines, comme les hélicases XPD et XPB et le facteur de transcription TFIIH. Par la suite, le complexe UV-DDB se détache de l'ADN et la protéine DDB2 est rapidement ubiquitinylée, puis dégradée par le protéasome. Après ouverture de la chromatine, les protéines impliquées dans la réparation vont intervenir selon une succession d'étapes d'excision, de polymérisation et de ligation. Il existe une autre voie de reconnaissance des dommages dans le système NER, la voie TCR, pour Réparation Couplée à la Transcription. Ici, la reconnaissance des lésions est médiée par l'ARN polymérase et les protéines CSA et CSB. **B, Régulation de l'expression des protéines clés du système NER.** Les dommages générés sur l'ADN activent l'expression du gène codant DDB2 *via* une voie dépendante des protéines p53 et p63, qui se lie sur une séquence spécifique de la région promotrice, en présence de la protéine BRCA1. D'après Takimoto et al., 2002; Christmann and Kaina, 2013.

2010). Toutefois, les facteurs moléculaires responsables de cette induction n'ont pas encore été identifiés. L'expression de DDB2 induite par les UV n'est observée que transitoirement dans les cellules normales. Après une augmentation, l'expression de la protéine diminue finalement suite à sa dégradation par le protéasome. De même, les transcrits du gène *ddb2* ont une courte durée de vie et sont rapidement dégradés de manière contrôlée par un élément *cis*-régulateur de 25 nucléotides situé en 3'UTR (Melanson et al., 2013).

Dans les cellules normales, l'expression basale (en absence d'UV) de la protéine DDB2 est relativement faible, voire nulle, tandis que dans les cellules cancéreuses mammaires son expression est très variable. Dans les lignées cancéreuses mammaires MCF7 ou T47D par exemple, en absence d'exposition aux UV, l'expression de DDB2 est fortement induite, contrairement à d'autres lignées, comme la lignée MDA-MB-231 et SK-BR-3 dans lesquelles elle reste faible (Kattan et al., 2008a). Les mécanismes à l'origine de l'expression de DDB2 dans les cellules cancéreuses mammaires ne sont actuellement pas identifiés.

3. Activités biologiques de DDB2 sur l'ADN

3.1. Rôle dans la réparation de l'ADN

3.1.1. Complexe UV-DDB et réparation GGR

La protéine DDB2 participe à la réparation de l'ADN par excision des nucléotides (NER) lésés par les ultraviolets (UV), les radiations ionisantes et les agents alkylants. La réparation par NER s'effectue en trois étapes principales : la reconnaissance des lésions, l'incision de part et d'autre du dommage et la polymérisation d'une séquence au site lésé (**Figure 12**). La protéine DDB2 est impliquée dans l'étape de reconnaissance des dommages de l'ADN. Il existe deux voies différentes de reconnaissance des dommages dans le système NER, une voie générale de reconnaissance sur l'ensemble du génome (GGR) et une autre voie, où la détection des lésions est couplée à la transcription (TCR) (**Figure 12**). DDB2 participe uniquement au système de reconnaissance GGR en formant un complexe appelé UV-DDB avec la protéine DDB1, ROC1 et la culline 4A (Cul-4A) (Tang and Chu, 2002). L'interaction entre les protéines DDB1 et DDB2 se fait grâce à la structure hélice-boucle-hélice de DDB2 en N-terminal qui vient se loger entre deux des trois domaines WD40 de la protéine DDB1 (Scrima et al., 2008). Au sein de ce complexe, DDB2 est alors capable de reconnaître les lésions de l'ADN, comme les dimères de cyclobutane pyrimidique (CPD) et

les photoproduits de pyrimidines pyrimidones (6-4PP) (Christmann and Kaina, 2013) (**Figure 12**).

Lorsque les nucléotides endommagés par les UV sont reconnus par le complexe UV-DDB, ce dernier s'associe avec un autre complexe protéique de reconnaissance des lésions de l'ADN, le complexe XPC-hHR23B. Ces interactions protéiques vont être indispensables au recrutement des protéines directement impliquées dans la réparation de l'ADN. Après l'étape de reconnaissance, le complexe UV-DDB se détache de l'ADN lésé et la protéine DDB2 est rapidement ubiquitinylée par le complexe E3 ubiquitine ligase de la Culline-4A (Cul-4A), puis dégradée par le protéasome 26S (Rapic-Otrin et al., 2003). Un défaut d'ubiquitylation de DDB2 entraîne sa rétention sur le site lésé de l'ADN et bloque la réparation des dommages (Puumalainen et al., 2014).

Plusieurs travaux ont précisé le niveau d'importance de la protéine DDB2 dans l'étape de reconnaissance des dommages du système NER. En effet, le complexe UV-DDB ne constitue pas le seul complexe de reconnaissance des dommages de l'ADN induits par les UV. Selon le type de lésion et le type cellulaire, l'étape de reconnaissance peut faire intervenir soit les protéines XPA et RPA (replication protein A), soit XPC, ou encore XPC et UV-DDB (Petruseva et al., 2014). Les travaux de Reardon et Sancar, (2003) indiquent que les protéines XPA, XPC et DDB2 agiraient d'avantage en coopération pour la reconnaissance initiale des dommages dans le système NER, mais que néanmoins la protéine DDB2 ne semble pas indispensable (Reardon and Sancar, 2003). Les facteurs XPA et XPC posséderaient la meilleure efficacité à initier la réparation des dommages et DDB2 jouerait plutôt un rôle accessoire dans la reconnaissance en facilitant l'ouverture de la chromatine (Petruseva et al., 2014; Wakasugi et al., 2001). Le modèle de reconnaissance des dommages dans le système NER reste encore à élucider et semble très dépendant des conditions expérimentales.

3.1.2. Régulation de l'activité de DDB2

La formation du complexe UV-DDB est stimulée par la génération de lésions sur l'ADN et semble dépendre de l'activité de protéines kinases (Christmann and Kaina, 2013; Zhao et al., 2008). Le complexe ATM/ATR peut par exemple, en cas de stress génotoxique, être responsable d'une phosphorylation activatrice du facteur de transcription p53, lui-même responsable de l'augmentation de l'expression du gène *ddb2* (**Figure 12**).

A côté des modulations de son expression, l'activité de DDB2 dans la réparation peut être régulée par des modifications post-traductionnelles. En 2013, une équipe montre qu'après exposition aux UV, la protéine DDB2 subit une SUMOylation par l'enzyme SUMO E3 ligase PIAS γ (Tsuge et al., 2013) dans les cellules cancéreuses HeLa. Une perte d'activité de l'enzyme PIAS γ dans ces cellules s'accompagne d'une diminution des réparations des dimères de cyclobutane pyrimidique. De même, très récemment, il a été démontré que la localisation de DDB2 dans le noyau et au niveau des sites lésés de l'ADN dépendait d'une α -N-méthylation de la protéine en position N-terminale. Cette modification post-traductionnelle est catalysée par la N-terminale RCC1 méthyltransférase (NRMT) et semble nécessaire à la réparation des dommages induits par les UV (Cai et al., 2014).

L'interaction entre DDB2 et DDB1 peut être altérée par la présence des isoformes D1 et D2 générés par épissage alternatif du gène codant *ddb2*. Ces isoformes agissent en tant que dominant négatif, en séquestrant la protéine DDB1 et en empêchant son import nucléaire et finalement la formation du complexe UV-DDB (Inoki et al., 2004).

L'activité de DDB2 dans le système de réparation GGR nécessite plusieurs interactions protéiques. En plus des protéines du complexe UV-DDB, d'autres ont été identifiées comme interagissant avec DDB2 et permettant d'améliorer l'étape de reconnaissance des lésions. Récemment, une interaction entre DDB2 et la protéine PARP-1 a été décrite sur des lésions de l'ADN et participe au recrutement des protéines de réparation (Robu et al., 2013). L'enzyme nucléaire PARP-1 est connue pour son implication dans plusieurs mécanismes de réparation mais son rôle dans la réparation NER n'avait pas encore été identifié. En présence de dommages sur l'ADN, PARP-1 agit en modifiant les protéines nucléaires par une réaction de poly ADP-ribosylation. Dans le système GGR, l'association de cette enzyme sur les sites endommagés entraîne une modification post-traductionnelle de DDB2 et des histones par poly ADP-ribosylation et favorise ainsi la réparation des lésions.

3.2. Rôle dans la transcription génique

3.2.1. Remodelage de la chromatine

La présence des domaines répétés de type WD40 dans la structure de la protéine DDB2 a conduit à penser que cette protéine pouvait jouer un rôle dans le remodelage de la chromatine. En effet, ces répétitions sont présentes dans des protéines telles que le complexe CBP/p300, qui appartient à la famille des histones acétyltransférases et qui participe

activement au remodelage de la chromatine (Otrin et al., 1997). Au cours des étapes initiales du GGR, la chromatine subit un relâchement de sa structure, favorisant le recrutement des protéines de réparation. Des travaux ont démontré que la protéine DDB2 participe au remodelage de la chromatine au niveau des sites lésés en activant des modifications post-traductionnelles sur les histones (Luijsterburg et al., 2012). La modification des histones est alors responsable d'une désorganisation des nucléosomes et de l'ouverture de la chromatine dans la région endommagée. L'activité de DDB2 dans le remodelage de la chromatine semble dépendre de son interaction avec des protéines spécifiques. D'abord au sein du complexe UV-DDB, la protéine DDB2 est alors capable de diriger la mono-ubiquitylation des histones H2A, H3 et H4 (Kapetanaki et al., 2006; Wang et al., 2006). Il a également été décrit que la protéine DDB2 pouvait interagir avec des complexes de remodelage de la chromatine, comme le complexe SWI/SNF (SWItch/Sucrose NonFermentable) ou encore le complexe d'histones acétyltransférase STAGA (SPT3-TAF9-GCN5 acetyltransferase complex) sur l'ADN endommagé (Martinez et al., 2001; Zhao et al., 2009). Le recrutement de ces facteurs de remodelage s'accompagne d'une relaxation de la chromatine, nécessaire à la réparation.

Par ailleurs l'implication de la protéine DDB2 dans le remodelage de la chromatine, permet de supposer un rôle de cette protéine dans l'activation transcriptionnelle de gènes. En effet, l'interaction de DDB2 avec des complexes protéiques, tels que les histones acétyltransférases CBP/p300 ou STAGA (Datta et al., 2001; Martinez et al., 2001), permet un remodelage de la chromatine favorable au recrutement de l'ARN polymérase.

3.2.2. Régulation de l'activité transcriptionnelle de gènes cibles

La présence des domaines WD40 dans la structure de la protéine DDB2 est à l'origine de son interaction avec le facteur de transcription E2F1. La protéine DDB2 est alors capable d'augmenter l'activité transcriptionnelle de E2F1 et l'expression de ces gènes cibles (Nichols et al., 2003). Récemment, il a été confirmé dans le laboratoire, que DDB2 participe à la transcription de gènes cibles. En effet, des travaux ont montré qu'elle agit négativement sur la transcription basale du gène codant la superoxyde dismutase à manganèse (SODMn) dans les cellules tumorales mammaires, d'une part en se fixant sur une séquence d'ADN correspondant à une répétition d'un pentanucléotide, séparé par deux nucléotides charnières, d'autre part en favorisant à la fois la diminution de l'acétylation des histones et le recrutement d'un répresseur transcriptionnel tel que l'activator protein-2 alpha sur la région promotrice (Minig et al., 2009). La mise en évidence de l'activité de DDB2 dans la transcription génique

a conduit le laboratoire à rechercher d'autres gènes cibles. Récemment, le laboratoire a identifié l'existence d'un autre gène cible, celui codant IkappaBalpha ($I\kappa B\alpha$), l'inhibiteur cytoplasmique du facteur de transcription NF- κB . La protéine DDB2 est capable de se fixer sur la séquence TCCCCTA en position -491 et -483 pb du site d'initiation de la transcription, de la région proximale du promoteur du gène codant $I\kappa B\alpha$ (Ennen et al., 2013).

Sur la base des travaux réalisés par le laboratoire, d'autres équipes ont confirmé l'activité de DDB2 dans la transcription des gènes. Il a été montré que cette protéine agit négativement sur l'expression du gène codant la catalase, une enzyme antioxydante transformant les peroxydes d'hydrogène en eau, en entraînant le recrutement de la culline 4A et le complexe histone méthyltransférase Suv39h, responsables d'une tri-méthylation de l'histone H3 (H3K9) (Roy et al., 2010). C'est la même équipe qui a montré que DDB2 exerce une répression sur les gènes codants le VEGF, Snail et Zeb1, des marqueurs de la TEM, en se fixant sur des séquences spécifiques de leur promoteur pour activer la déacétylation des histones H3, H4 (Fantozzi et al., 2014; Sánchez-Tilló et al., 2010; Wang et al., 2013). Très récemment, une autre équipe a identifié le gène codant Bcl2 comme cible de DDB2, en association avec la protéine DDB1. DDB2 réprime le gène *bcl2* en se fixant sur une séquence de 12 nucléotides située dans son promoteur P1 et en activant le recrutement de l'histone désacétylase HDAC1 (Zhao et al., 2014).

4. Activités biologiques de DDB2 dans les cancers

4.1. Rôle de DDB2 comme suppresseur de tumeur

La première preuve d'une implication de la protéine DDB2 dans le développement tumoral est issue des observations du phénotype de patients atteints de déficience des protéines du système NER. Ces pathologies sont associées principalement à trois maladies génétiques autosomiques récessives : le *Xeroderma Pigmentosum* (XP), le syndrome de Cockayne (CS), et la Trichothiodystrophie (TTD). Dans le cas du *Xeroderma Pigmentosum*, cette maladie multigénique et multiallélique a, comme principale caractéristique, une hypersensibilité des patients aux UV associée à un risque accru de cancer de la peau (Lehmann et al., 2011). Les travaux sur cette maladie ont permis de mettre en évidence 7 groupes de complémentation, XP-A à XP-G. Les malades porteurs de mutations au niveau de l'un de ces 7 gènes sont donc déficients pour le système de réparation NER. Le groupe E (XP-E) présente une déficience de l'activité UV-DDB due à des mutations de la partie codante du

gène *ddb2* (Tang and Chu, 2002). La caractérisation de ces altérations génétiques montre que les patients XP-E ne partagent pas une forme unique de mutation du gène *ddb2* mais au contraire se distinguent par des mutations différentes. Globalement il s'agit d'une seule mutation ponctuelle faux sens affectant préférentiellement les exons 6, 7 ou 8 (Oh et al., 2011). La plupart des mutations se retrouvent au niveau des régions d'interactions avec soit l'ADN ou avec la protéine DDB1 (Scrima et al., 2008). Dans les cellules provenant de patients XP-E, l'expression du gène *ddb2* est perturbée, en effet, malgré un niveau anormalement haut de ARNm, la forme protéique de DDB2 est absente, même après exposition aux UV (Itoh et al., 2001). D'autres données confèrent à DDB2 un rôle plutôt suppresseur de tumeur. En effet, l'inactivation du gène *ddb2* dans des souris homozygotes entraîne une hypersensibilité aux UV et le développement de mélanomes (Yoon et al., 2005). En absence d'UV, le développement de tumeurs spontanées dans de nombreux tissus est observé chez des souris homozygotes invalidées pour *ddb2* (Itoh et al., 2007).

Le rôle de DDB2 dans le développement tumoral a d'abord été associé à son activité de reconnaissance des lésions de l'ADN. Cependant, plus récemment, son activité sur la transcription génique a également été mise en cause. En effet, l'influence de DDB2 sur la transcription de ses gènes cibles (cf paragraphes 3.2.2) a été corrélée à des modifications des propriétés prolifératives et/ou invasives de différentes lignées cancéreuses (Ennen et al., 2013; Minig et al., 2009; Roy et al., 2013). Dans ce sens, le niveau d'expression du gène *ddb2* dans les cellules cancéreuses mammaires varie en fonction du niveau d'expression du récepteur aux œstrogènes qui est lui-même corrélé au statut métastatique et prolifératif de ces cellules (Platet et al., 2004). Comme l'indique la **figure 13**, le gène codant DDB2 est exprimé dans les lignées cancéreuses mammaires non métastatiques ER positives (ER+). Par contre l'expression de ce gène est faible voire nulle dans les lignées cancéreuses mammaires métastatiques ER-. Ces observations renforcent l'idée d'une implication de la protéine DDB2 sur la régulation des capacités prolifératives et invasives des cellules tumorales mammaires.

4.2. Rôle de DDB2 dans la prolifération des cellules tumorales

Au cours du cycle cellulaire l'expression de DDB2 varie dans les cellules normales de mammifères et laisse supposer un rôle important de cette protéine dans la régulation du cycle cellulaire. Son expression, qui n'est pas détectable dans les cellules ne se divisant pas, est au plus haut niveau à la fin de la phase G1 et diminue fortement au cours de la phase S du cycle cellulaire (Nag et al., 2001). De plus, DDB2 s'associe avec des protéines impliquées dans la

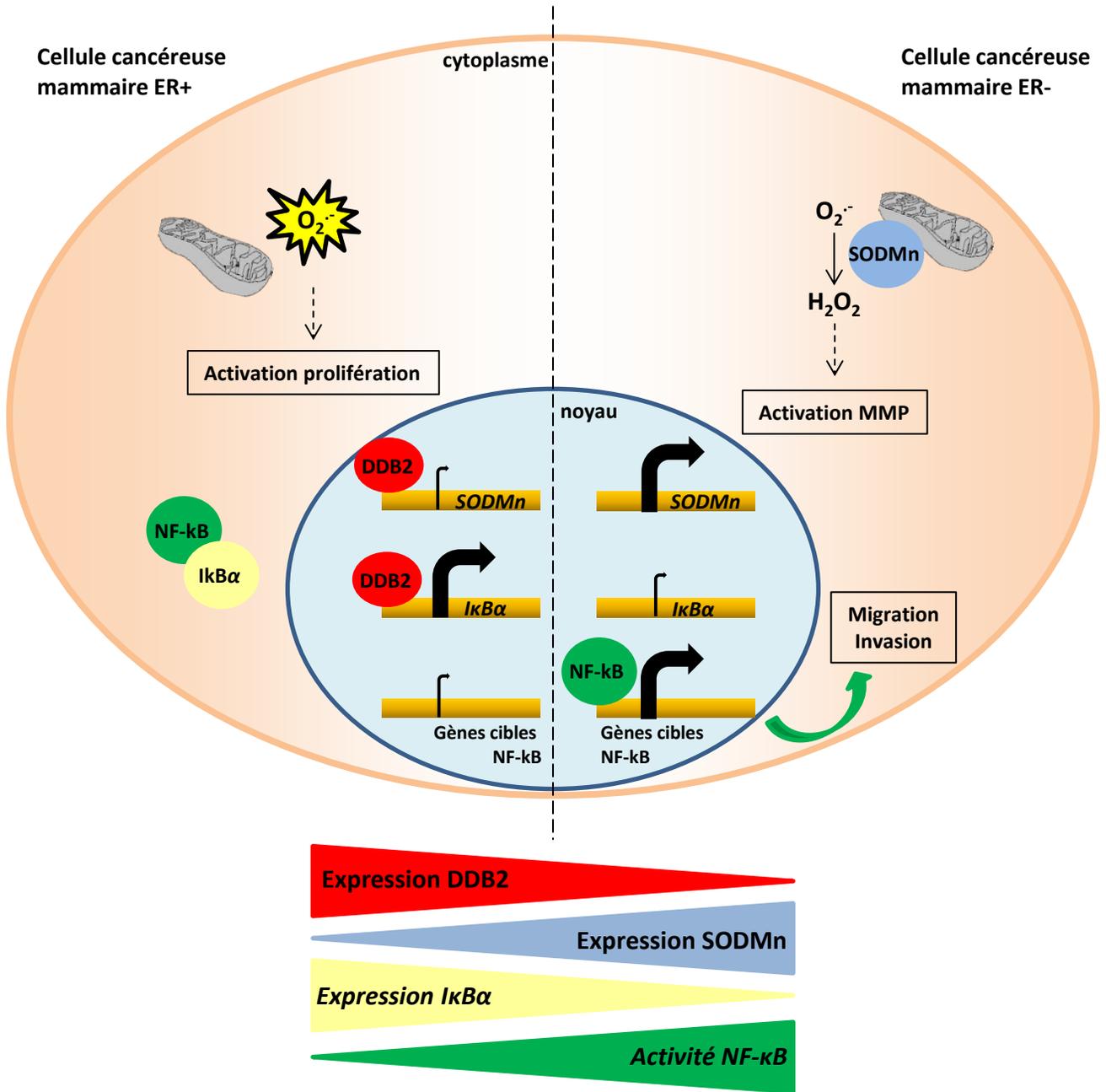


Figure 13 : Représentation schématique du rôle de DDB2 dans la croissance tumorale mammaires. Les cellules cancéreuses mammaires exprimant les récepteurs aux œstrogènes présentent une forte expression de la protéine DDB2, contrairement aux cellules cancéreuses ER négatives. Cette différence est corrélée avec les capacités prolifératives et invasives des cellules. En effet, la protéine DDB2 exerce un rôle suppresseur sur la migration et l'invasion, favorisant d'avantage la prolifération des cellules cancéreuses mammaires. Les mécanismes à l'origine du contrôle de DDB2 sur la croissance tumorale mammaires dépendent du rôle de DDB2 sur la régulation de l'expression des gènes codant IkappaBalphalpha ($I\kappa B\alpha$) et de l'enzyme antioxydante SODMn. En agissant directement sur la région promotrice de ces gènes, DDB2 maintient un niveau faible d'expression du gène SODMn et au contraire induit l'expression de $I\kappa B\alpha$ qui empêche alors l'activation de NF- κB . L'implication du facteur de transcription NF- κB et de la SODMn sur la prolifération, la migration et l'invasion, explique en partie comment DDB2 contrôle la croissance tumorale mammaire. D'après Kattan et al, 2008a, Kattan et al, 2008b et Ennen et al, 2013.

régulation du cycle cellulaire telle que la Culline 4A, qui appartient à une famille de protéines responsables de l'entrée des cellules en phase S (Nag et al., 2001). C'est également le cas de l'interaction entre DDB2 et le facteur de transcription E2F1, qui contrôle l'expression des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN et l'entrée en phase S (Nichols et al., 2003). Cette dernière interaction serait dépendante d'une séquence homologue à la protéine du rétinoblastome RB présente dans la protéine DDB2, et conduirait à une augmentation de l'expression des gènes cibles de E2F1 (Hayes et al., 1998).

Au sein du laboratoire, des travaux ont montré que DDB2 participe à la croissance des cellules tumorales mammaires exprimant le récepteur aux œstrogènes (ER positives). Dans ces cellules, DDB2 est surexprimée et joue un rôle important dans leur prolifération, en activant l'entrée dans la phase de transition G1/S et leur progression dans la phase S du cycle cellulaire (Kattan et al., 2008a). L'équipe a montré que DDB2 exerce en partie cette activité en régulant négativement l'expression basale de la SODMn. Cette dernière est une enzyme antioxydante qui catalyse la réaction de dismutation des anions superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et qui est connue pour son rôle dans le développement de plusieurs types de tumeurs (Dhar and St. Clair, 2012). Le laboratoire a montré, qu'en absence d'expression de DDB2, le niveau de la SOD Mn est fortement élevé et entraîne ainsi une accumulation d' H_2O_2 , qui est capable de stimuler les capacités invasives des cellules tumorales mammaires, en activant en particulier la métalloprotéase matricielle 9 (MMP9) (**Figure 13**). Au contraire, l'expression forte de DDB2 maintient un niveau faible de la SODMn, qui entraîne une accumulation d'anions superoxyde, un DRO connu pour activer des voies de signalisation impliquées dans la prolifération (Dhar and St. Clair, 2012; Reuter et al., 2010) (**Figure 13**).

4.3. *Rôle de DDB2 dans l'invasion tumorale*

Le laboratoire a montré que, la surexpression expérimentale de DDB2 entraîne une diminution des capacités invasives et migratrices *in vitro* des cellules tumorales mammaires ER négatives et hautement métastatiques (MDA-MB-231 et SK-BR-3), mais également réduit leur capacité à former des métastases pulmonaires *in vivo*. Ces résultats sont confortés par une analyse rétrospective sur 92 tumeurs provenant de patientes atteintes d'un cancer du sein, où le niveau d'expression de DDB2 est inversement corrélé avec le haut grade SBR ($SBR \geq 3$) (Ennen et al., 2013).

Cellules cancéreuses
phénotype épithéliale

Cellules cancéreuses
phénotype mésenchymateux

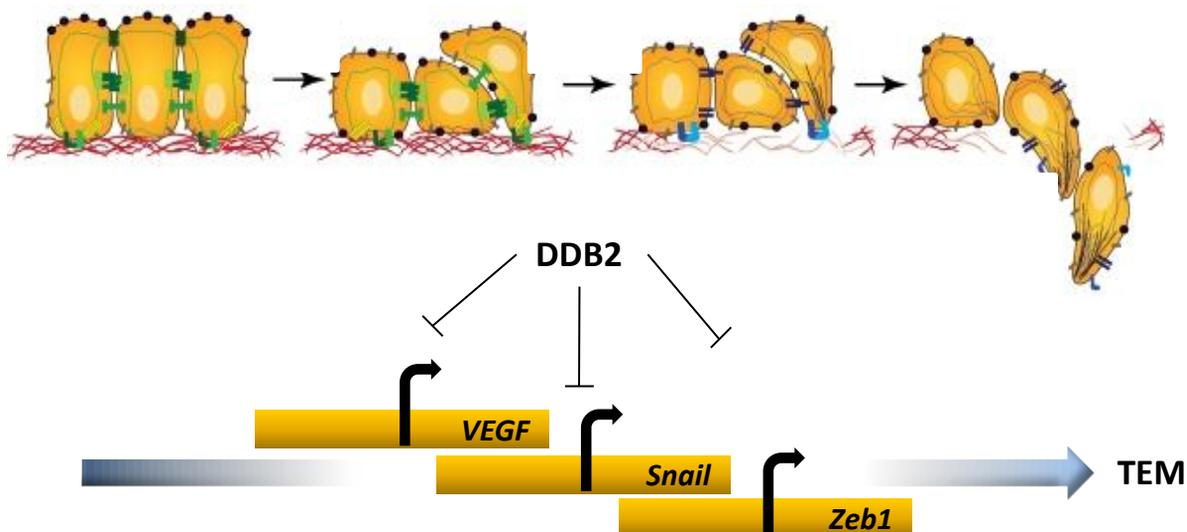


Figure 14 : Représentation schématique du rôle de DDB2 dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Au cours de la TEM, les cellules cancéreuses d'origine épithéliale perdent leur polarité apico-basale et rompent leurs jonctions intercellulaires. Les cellules acquièrent un phénotype mésenchymateux qui leur confère des capacités migratrices et invasives. DDB2 exerce un rôle suppresseur sur la TEM dans les cellules cancéreuses de côlon en régulant négativement l'expression des gènes VEGF, Snail et Zeb1. D'après Micalizzi et al, 2010 ; Roy et al, 2013.

La laboratoire a également montré dans la suite de son travail, que le contrôle de l'invasion et de la migration par DDB2 dépend en partie de son rôle dans la régulation de l'expression du gène codant la SODMn (cf paragraphe 4.1) mais également celui codant IkappaBalpha (IkBa) (Ennen et al., 2013). Dans les cellules tumorales mammaires ER positives et non métastatiques, la protéine DDB2, en agissant positivement sur l'expression d'IkBa, maintient une activité très faible du facteur de transcription NF-κB. (**Figure 13**). Ce dernier est en effet connu pour être impliqué dans la migration et l'invasion des cellules tumorales mammaires métastatiques, en régulant l'expression de gènes cibles tels que ceux codant des métalloprotéases matricielles, mais également des facteurs de transcription responsables de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Zubair and Frieri, 2013).

La TEM, au cours du développement tumoral, permet aux cellules cancéreuses d'origine épithéliale d'acquérir, par des altérations d'expression génique, des caractéristiques de cellules mésenchymateuses. Parmi ces caractéristiques, on observe une perte des interactions intercellulaires, un gain de mobilité et d'invasion. Cette étape dans le développement tumoral constitue un événement clé pour la formation de métastases. Récemment, une équipe américaine a montré que la protéine DDB2 s'oppose à l'apparition du phénotype mésenchymateux, caractéristique de la TEM, dans les cellules d'adénocarcinome colique, à la fois en favorisant l'expression de gènes caractéristiques de cellules épithéliales, mais également en exerçant une répression des gènes codant le VEGF, Snail et Zeb1 (**Figure 14**) (Fantozzi et al., 2014; Roy et al., 2013; Sánchez-Tilló et al., 2010; Wang et al., 2013).

4.4. Rôle de DDB2 dans la sénescence et l'apoptose

4.4.1. Contrôle de la sénescence

La sénescence se définit comme un processus physiologique d'arrêt de la croissance qui peut être induit par différents stimuli, comme des traitements de chimiothérapie, les UV ou un stress oxydant. Elle constitue un mécanisme de barrière contre la transformation des cellules vers un phénotype tumoral, en inhibant la prolifération des cellules endommagées par le vieillissement cellulaire ou des facteurs exogènes comme un traitement par chimiothérapie. Dans des travaux étudiant le rôle de DDB2 dans la régulation de la production de dérivés réactifs de l'oxygène, plusieurs résultats ont permis d'impliquer cette protéine dans l'induction de la sénescence précoce. En effet, il a été montré qu'un stress oxydant induit une augmentation de l'expression de DDB2, qui est suffisante pour entraîner des cellules de

fibroblastes murins et de carcinomes humains vers la sénescence. En effet, la diminution de l'expression de DDB2 s'accompagne d'une résistance de ces cellules à rentrer en sénescence (Roy et al., 2010). Le mécanisme, par lequel DDB2 entraîne les cellules vers la sénescence semble dépendre de son action négative sur l'expression des enzymes anti-oxydantes, la SODMn et la catalase, qui génère une accumulation de DRO (Colavitti and Finkel, 2005; Minig et al., 2009; Roy et al., 2012). Ces derniers, en particulier l'anion superoxyde et H₂O₂, sont capables d'activer p53, P38MAPK, JNK et ERK1/2, qui sont responsables d'un arrêt irréversible des cellules en phase G1 (Benhar et al., 2002).

4.4.2. *Contrôle de l'entrée en apoptose*

Le contrôle de l'entrée en apoptose est un processus hautement régulé et qui fait l'objet de nombreuses études en oncologie. Dans ce contexte, plusieurs données récentes ont impliqué la protéine DDB2 dans l'entrée en apoptose des cellules normales et cancéreuses lors d'une exposition aux UV ou à un traitement anticancéreux.

Dans un premier temps, son rôle sur l'entrée en apoptose a été étudié au cours de sa participation à la réparation des lésions de l'ADN (GGR). Des travaux utilisant des fibroblastes de peau, provenant de patients atteints de mutation pour le gène *ddb2* (cultures primaires XP2RO, XP82TO, Ops1, GM01389 et XP3RO), rapportent une déficience de ces cellules à entrer en apoptose après exposition aux UV (Itoh et al., 2003). La baisse du niveau d'apoptose induite par les UV est causée par une réduction de l'activité du suppresseur de tumeur p53 dans ces cellules. La protéine p53 est connue pour réguler la réponse cellulaire après des dommages de l'ADN, en contrôlant l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée des cellules en apoptose (Lacroix et al., 2006). Une surexpression du gène p53 ou de *ddb2* non muté permet de restaurer l'entrée en apoptose des fibroblastes XP-E^{-/-}, après exposition aux UV. Cette étude montre, qu'au cours de la réparation, la protéine p53 stimule l'expression de la protéine DDB2 et que cette dernière, une fois exprimée, maintient à son tour positivement l'expression de p53. Cette régulation mise en évidence par les auteurs de cette étude reste encore complexe et non élucidée, mais permet néanmoins de comprendre comment DDB2 contrôle l'entrée en apoptose après exposition aux UV selon un mécanisme dépendant de p53.

D'autres travaux plus récents montrent que DDB2 est impliquée dans l'entrée des cellules en apoptose après l'induction de dommages à l'ADN par des UV ou un agent anticancéreux tel que le cisplatine, selon des mécanismes différents. Il a été montré que

DDB2 active l'apoptose de fibroblastes murins embryonnaires exposés à des UV, en contrôlant la protéolyse d'un régulateur du cycle cellulaire, p21waf1/Cip1 (Stoyanova et al., 2009). De même, la surexpression de DDB2 entraîne une sensibilité plus importante des cellules tumorales de l'ovaire au cisplatine, en diminuant l'expression du gène codant la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Barakat et al., 2009). Dans cette dernière étude, les auteurs montrent que le rôle apoptotique de DDB2 dans les cellules d'adénocarcinome ovarien après un traitement au cisplatine est indépendant de son activité dans la réparation GGR. En effet, dans ces cellules cancéreuses, la réparation des dommages causés par le cisplatine ne nécessite pas la protéine DDB2.

A l'heure actuelle, une seule étude montre au contraire que DDB2 diminue la sensibilité des cellules d'adénocarcinome du col utérin HeLa exposées aux UV d'une manière dépendante de la protéine antiapoptotique c-FLIP (Sun et al., 2010). Dans ces cellules l'expression de c-FLIP est induite par DDB2 entraînant une baisse de la sensibilité aux UV. Ainsi, le mécanisme exact impliquant DDB2 dans l'entrée en apoptose des cellules cancéreuses n'est pas clairement défini et semble être indépendant de la voie de réparation de l'ADN dans plusieurs études.

OBJECTIFS DU PROJET DE THESE

L'échappement des cellules tumorales aux agents thérapeutiques est souvent associé à une évolution métastatique des cancers du sein et trop peu de facteurs protéiques permettent actuellement de le prédire. Aussi, la recherche de marqueurs prédictifs de réponse aux traitements représente une des voies les plus prometteuses. Elle répond à une préoccupation clinique majeure en oncologie qui est de pouvoir déterminer pour chaque tumeur et patiente, le traitement le plus adapté. Dans ce contexte, la recherche de ces facteurs prédictifs représente la thématique principale de l'équipe d'accueil. L'identification récente au sein de cette équipe, de la protéine DDB2 et de ses nouvelles activités biologiques sont les résultats de cette recherche de marqueurs.

Dans les cellules cancéreuses mammaires, la protéine DDB2 contribue au développement des capacités prolifératives et invasives en régulant l'expression transcriptionnelle de gènes cibles (**Figure 13**). Les résultats déjà obtenus par le laboratoire renforcent l'idée que DDB2 présente un intérêt clinique, comme marqueur pronostique de la progression métastatique des tumeurs mammaires. Son implication dans la réponse aux agents anticancéreux n'a fait l'objet que de quelques études récentes, qui montrent que DDB2 augmente la sensibilité des cellules de carcinome ovarien au cisplatine *in vitro* (Barakat et al., 2009; Zhao et al., 2014). Néanmoins, son implication dans la réponse aux traitements dans le cancer du sein n'a encore jamais été étudiée.

L'hypothèse de ce projet de thèse est que la protéine DDB2 pourrait être impliquée dans la réponse aux agents anticancéreux couramment utilisés dans le traitement des cancers du sein, la doxorubicine, le 5-FU et le paclitaxel. Elle repose sur plusieurs observations :

- Des études rapportant que l'expression de DDB2 dans des lignées cancéreuses mammaires est chimio-inductible et en corrélation positive avec la chimiosensibilité *in vitro* (Christmann and Kaina, 2013; Dan et al., 2002).

OBJECTIFS DU PROJET DE THESE

- Le rôle de DDB2 dans la prolifération des cellules tumorales mammaires en agissant au niveau de la phase S du cycle cellulaire, phase sensible aux agents anti-prolifératifs (Kattan et al., 2008a).
- Le contrôle de DDB2 sur les capacités invasives par son action négative sur NF- κ B, lui-même impliqué dans la réponse aux agents thérapeutiques (Ennen et al., 2013).
- L'activité de DDB2 dans la régulation de l'expression du gène anti-apoptotique Bcl-2 dans les cellules cancéreuses ovariennes (Barakat et al., 2009; Zhao et al., 2014).
- Les résultats d'une analyse transcriptomique comparative réalisée entre les cellules tumorales mammaires ER-positives, surexprimant naturellement la protéine DDB2, et la même lignée, dont l'expression de DDB2 est inhibée de façon stable par ARN interférence, qui révèlent l'existence d'autres gènes cibles potentiels de DDB2, dont certains codent des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale. DDB2 pourrait jouer un rôle dans le contrôle de l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose, en influençant l'activité de l'organite (données non publiées du laboratoire).

Les objectifs principaux de ce travail seront donc ; (i) d'évaluer l'importance de DDB2 sur la chimiosensibilité des cellules cancéreuses mammaires *in vitro* et *in vivo* ; (ii) d'identifier les mécanismes moléculaires associés, en étudiant le rôle de DDB2 sur la régulation de l'expression de gènes cibles déjà caractérisés et encore potentiels ; (iii) enfin, d'étudier les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression du gène *ddb2* dans les cellules cancéreuses mammaires.

MATERIEL

&

METHODES

MATERIELS & METHODES

I. CULTURE CELLULAIRE ET CONDITIONS DE TRAITEMENT

1. Lignées cellulaires et conditions de culture

1.1. Lignées cellulaires

Les lignées de cellules d'adénocarcinomes mammaires utilisées dans ce travail ainsi que leurs principales caractéristiques sont présentées dans le tableau suivant (**Tableau 1**). Deux lignées cancéreuses mammaires n'exprimant pas les récepteurs aux œstrogènes et ne présentant peu ou pas d'expression de la protéine DDB2 ont servi de modèles pour ce travail. Il s'agit des lignées MDA-MB-231 et SK-BR-3. En parallèle, la lignée T-47D, hormono-dépendante, a servi quant à elle de modèle positif d'expression de *DDB2*. Des études d'activité transcriptionnelle par gène rapporteur ont été menées en utilisant pour modèle cellulaire, la lignée HEK-293 (Human Embryonic Kidney Cells), facilement transfectable (ATCC).

Lignées	Fournisseurs	Statut ER	Statut DDB2	Statut p53	Sous-types
MDA-MB-231	ATCC	négatif	négatif	p53R280K (-)	Post-TEM basal-like
SK-BR-3	ATCC	négatif	négatif	p53R175M (-)	Luminal
T47D	ATCC	positif	positif	p53L194F (-)	Luminal

Tableau 1 : Lignées cancéreuses mammaires utilisées et principales caractéristiques. Caractérisation par les profils d'expression des gènes des récepteurs aux œstrogènes de *ddb2* et du statut p53. Les trois lignées portent une mutation ponctuelle dans la séquence du gène codant p53. Ces mutations faux sens provoquent une substitution d'un acide aminé au sein de la protéine p53, une lysine (K) est par exemple substituée à une arginine (R) dans les cellules MDA-MB-231. La mutation de la protéine p53 dans ces lignées entraîne la perte de fonction suppresseur de tumeur pour cette protéine (-). La position du codon affecté est inscrite entre les codes des acides aminés. La lignée MDA-MB-231 présente un sous-type post-TEM (Transition Epithélio-Mésenchymateuse) et un statut triple négatif (basal-like).

1.2. Conditions de culture

Les lignées de cellules d'adénocarcinomes mammaires MDA-MB-231, SK-BR-3 et T-47D sont cultivées en monocouche dans un milieu RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen, UK), contenant 2mM de glutamine, 0,1 mg/ml de gentamicine (Gibco) et 10% (v/v) de sérum de

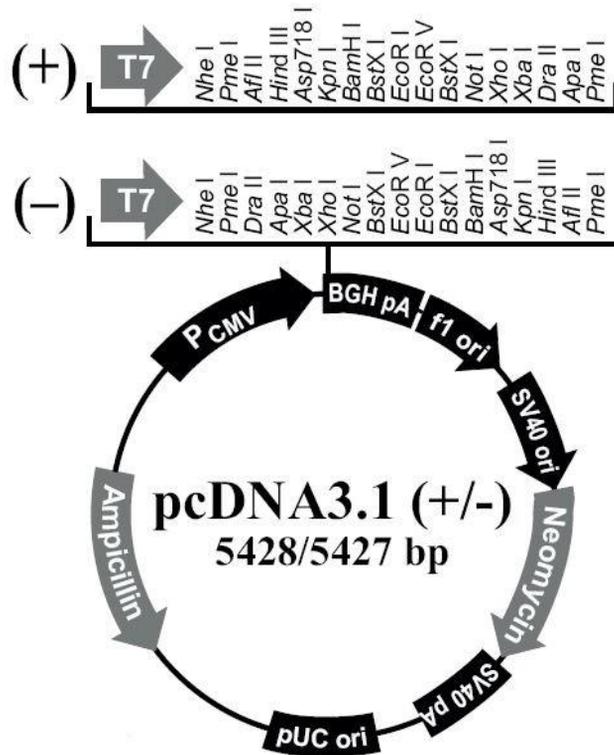


Figure 15 : Représentation schématique du plasmide pcDNA3.1 (+). Ce plasmide a été utilisé pour insérer l'ADNc du gène codant DDB2, dans le but d'établir un modèle de surexpression dans les cellules cancéreuses mammaires. L'insert de 1300 paires de bases a été cloné entre les sites KpnI et XbaI. D'après Life Technologies, pcDNA3.1 (+) Manuals and Protocols.

veau fœtal (SVF) (Sigma, France), préalablement décomplémenté à 56°C pendant 30 min. La culture cellulaire est réalisée à 37°C sous atmosphère humide maintenue à 5% de CO₂. Le milieu de culture est renouvelé tous les 2 jours. Après 4 jours de culture, les cellules à sub-confluence sont mises en suspension par dissociation à l'aide d'une solution de trypsine 0,1%-10µM EDTA diluée dans un tampon phosphate salin (D-PBS, Gibco). Les cellules sont ensuite réensemencées à 10⁵ cellules/ml de milieu de culture. Les cellules T47D hormono-dépendante sont cultivées en présence de 100 nM d'œstradiol ajouté au milieu complet. Une recherche de mycoplasmes est réalisée deux fois par mois sur les cellules, à l'aide d'un marquage au Hoechst 33342 (Invitrogen). L'ensemble des expériences ont été menées sur des cultures sans mycoplasmes et n'excédant jamais 80 % de confluence.

La lignée HEK-293 a été utilisée dans le cadre de l'étude des effets des récepteurs aux œstrogènes sur l'activité du promoteur de *ddb2*. Les cellules HEK-293 sont cultivées dans du milieu DMEM sans rouge phénol (Gibco) complété avec 2 mM de glutamine, 0,1 mg/ml de gentamicine (Gibco) et 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) (Sigma, France), préalablement décomplémenté. Avant et pendant la transfection, le milieu de culture est remplacé par un milieu contenant du sérum de veau traité au charbon actif. Ainsi, les stéroïdes contenus dans le sérum sont éliminés et donc absents dans le milieu de culture. Brièvement, avant d'être utilisé, le charbon actif (Sigma) est lavé 3 fois dans un tampon contenant 1 M de Tris-HCl pH 8,0 et 25 mg/l de Dextran T70. Pour traiter 50 ml de sérum, 250 mg de charbon actif sont nécessaires. Le sérum est traité durant 30 min à 56°C, puis le charbon est éliminé par centrifugation. Le traitement est répété une seconde fois en incubant 30 min à 37°C. Après avoir éliminé le charbon par centrifugation, le sérum est stérilisé par filtration

2. Développement de modèles de cellules tumorales mammaires transgéniques

2.1 Transfection d'un plasmide à l'aide d'agents polycationiques

Pour chaque modèle de surexpression développé par cette méthode, les cellules transfectées ainsi que les plasmides utilisés sont répertoriés dans le **tableau 2**. Le plasmide pcDNA3.1(+) (Invitrogen, **Figure 15**) contenant l'ADNc du gène étudié, a été transfecté aux cellules tumorales mammaires à l'aide d'un agent de transfection, le poly-éthylèneimine linéaire (JetPEI PolyPlus transfection). Avant transfection, le vecteur plasmidique (3 µg) est incubé avec 100 µl de NaCl 150 mM contenant 1/50^{ème} de PEI durant 30 min à température ambiante.

Lignée	Objectif	Méthode	Sélection	Nom du modèle et référence
MDA-MB-231	Surexpression DDB2	Tranfection JetPEI plasmide pcDNA3.1(+) vide ou contenant ADNc <i>ddb2</i>	Néomycine Sélection clonale	Clones MDA CTL-1 et CTL-2 (plasmide vide) Clones MDA DDB2-1 et DDB2-2 (plasmide <i>ddb2</i>) (Kattan et al., 2008a)
MDA DDB2-2	Surexpression SODMn	Tranfection JetPEI plasmide pcDNA3.1(+) vide ou contenant ADNc SODMn	Hygromycine Sélection polyclonale	Culture polyclonale MDA DDB2 Ctl. (plasmide vide) Culture polyclonale MDA DDB2 SODMn (plasmide SODMn)
MDA DDB-2	Surexpression Bcl-2	Infection lentivirale Particules contrôles LP-NEG-Lv105-200 (GeneCopoeia™) Particules ORF BCL-2 LP-H3307-LV105-0200 (GeneCopoeia™)	Puromycine Sélection polyclonale	Culture polyclonale MDA DDB2 Ctl. (particules contrôles) Culture polyclonale MDA DDB2 Bcl-2 (particules ORF BCL-2)
MDA DDB2-2	Knock down IκBα	Infection lentivirale Particules ARNsh contrôles (sc-108080, Santa Cruz) Particules ARNsh anti-IκBα (sc-29360-V, Santa Cruz)	Puromycine Sélection clonale	Clone contrôle MDA DDB2 shCTL Clone MDA DDB2 shIκBα (Ennen et al., 2013)
T47D	Knock down DDB2	Infection lentivirale Particules ARNsh contrôles (sc-108080, Santa Cruz) Particules ARNsh anti- <i>ddb2</i> (sc-37799-V, Santa-Cruz)	Puromycine Sélection polyclonale	Cultures polyclonales T47D CTL-1 et CTL-2 (particule contrôles) Cultures polyclonale T47D shDDB2-1 et shDDB2-2
SK-BR-3	Surexpression DDB2	Tranfection JetPEI plasmide pcDNA3.1(+) vide ou contenant ADNc <i>ddb2</i>	Néomycine Sélection clonale	Clone SK-BR-3 CTL (plasmide vide) Clone SK-BR-3 DDB2 (plasmide <i>ddb2</i>) (Ennen et al., 2013)

Tableau 2 : Ensemble des modèles de cellules tumorales mammaires transgéniques développés pour cette étude. Plusieurs lignées de cellules cancéreuses mammaires ont été modifiées afin d'étudier l'influence d'un gène cible. L'expression du gène étudié a été soit augmentée (surexpression) ou diminuée (knock down) stablement dans les cellules. Deux méthodes d'introduction du vecteur plasmidique ont été utilisées, une se basant sur l'utilisation d'agents polycationiques (JetPEI) et une autre sur l'utilisation de particules lentivirales. Après transfection ou infection les cellules sont sélectionnées avec un antibiotique approprié dans le but d'établir des cultures polyclonales ou clonales.

Le mélange est ajouté à une culture de cellules ensemencées 24 heures auparavant en plaque 6 puits, de telle sorte qu'elle soit à 60 % de confluence au moment de la transfection. Après 24 heures, les cellules tumorales, dont l'expression du plasmide est stable dans le temps, sont sélectionnées durant 3 semaines avec 400 µg/ml de néomycine (Gibco) ou 750 µg/ml d'hygromycine. En parallèle, des cellules contrôles ont été établies par transfection du vecteur vide. Nos travaux ont été menés simultanément sur deux clones contrôles (CTL-1 et CTL-2) et deux clones de surexpression du gène cible.

2.2. Développement de modèles transgéniques par infection lentivirale

Le détail des modèles développés par cette méthode est disponible dans le **tableau 2**. Cette méthode consiste à obtenir rapidement et efficacement des modèles de surexpression ou d'inhibition d'expression (ARN interférence) d'un gène cible. Elle repose sur l'utilisation de particules lentivirales commerciales contenant un plasmide portant l'ORF d'un gène d'intérêt (modèle de surexpression) ou 3 constructions spécifiques, permettant chacune, la synthèse d'un shRNA spécifique d'un ARNm cible (modèle d'inhibition d'expression).

Les cellules sont ensemencées dans une plaque 24 puits avec 5×10^4 cellules/puits dans du milieu RPMI. Après 24 heures, les cellules à 50 % de confluence sont infectées avec les particules lentivirales à une MOI (multiplicity of infection) de 2. Afin d'améliorer l'efficacité de l'infection, un polymère cationique, le polybrene (Santa Cruz), est ajouté simultanément avec les particules lentivirales à une concentration finale de 5 µg/ml. Après 24 heures, le milieu est remplacé et les cellules tumorales sont sélectionnées durant 7 jours avec 2,5 µg/ml de puromycine (Santa Cruz).

Deux clones pour lesquels l'efficacité de la surexpression ou de l'ARN interférence a été validée par PCR en temps réel et western-blotting, ont servi de modèle pour cette étude. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus sur les cellules infectées par des particules lentivirales contenant un plasmide vide ou permettant la synthèse d'un shRNA contrôle, non spécifique (sc-108080, Santa Cruz). Après sélection à la puromycine, deux clones contrôle ont été retenus.

3. Traitements des cellules tumorales mammaires

3.1. *Traitement avec des agents anticancéreux*

Vingt-quatre heures après leur ensemencement à 5×10^4 cellules/ml, les cellules sont traitées avec différentes concentrations de doxorubicine (TEVA) 0, 50 et 100 ng/ml de milieu de culture, pendant 48 heures ou encore à 50 ng/ml pendant 24, 48 ou 72 heures, ceci à partir d'une solution mère de l'agent anticancéreux à 2 mg/ml diluée dans de l'eau stérile et protégée de la lumière. Dans le cas du 5-Fluorouracile, les cellules ensemencées à 10^5 cellules/ml, sont traitées avec différentes concentrations finales dans le milieu de culture (0, 25, 50 ou 100 μ M) de 5-fluorouracile (Sigma) pendant 72 heures, ou encore à 50 μ M pendant 24, 48 ou 72 heures, à partir d'une solution mère à 250 mM diluée dans du DMSO. Les cellules non traitées servant de témoins sont cultivées dans un milieu contenant 0,05 % de DMSO. Les cellules ensemencées avec 10^5 cellules/ml, sont également traitées avec différentes concentrations finales de paclitaxel (Sigma) (0, 2, 5 ou 10 nM) pendant 48 heures ou à 5 nM pendant 96 heures. La solution mère de paclitaxel est préparée à 250 μ M dans de l'éthanol absolu. Les cellules témoins sont cultivées dans un milieu contenant 0,02 % d'éthanol absolu.

3.2. *Traitement avec le TNF α*

Des cellules, ensemencées à 6×10^4 cellules/ml, sont traitées avec le TNF α (Invitrogen) à différentes concentrations (0, 10, 25 ng/ml) pendant 48 heures ou à 10 ng/ml de milieu de culture pendant 12, 24 et 48 heures, à partir d'une solution mère de TNF α à 25 μ g/ml diluée dans de l'eau stérile.

3.3. *Traitement à la 5-azacytidine et à la trichostatine-A*

Les cultures sont ensemencées à raison de 5×10^4 cellules/ml et traitées avec, soit de la 5-azacytidine, de la trichostatine-A ou en combinaison. Le milieu de culture est additionné avec 5 μ M de 5-azacytidine et le traitement est maintenu durant 72 heures. Pour la trichostatine-A, les cellules sont traitées avec 100 ng/ml pendant 24 heures. Un double traitement est réalisé en conservant les mêmes doses, selon le schéma suivant : après 24 heures d'ensemencement, traitement à la 5-azacytidine durant 72 heures, puis traitement à la trichostatine-A 24 heures avant l'arrêt des cultures.

II. EXPERIMENTATION ANIMALE

1. Animaux

Les animaux retenus pour cette étude ont été des souris femelles immuno-déficientes NMRI-nu (nu/nu) âgées de 5 semaines, obtenus auprès des Laboratoires Janvier (Le Genest-St-Isles, France). L'utilisation et l'hébergement des animaux ont respecté le cadre législatif en vigueur concernant l'expérimentation animale (Directive 2010/63/EU).

2. Suivi de croissance tumorale

Dans le but d'établir des xénogreffes de tumeurs mammaires, un lot restreint de souris reçoit une injection sous-cutanée, en position inguinale bilatérale, de 100 µl d'une suspension des cellules MDA-MB-231 CTL ou DDB2 (2×10^6 cellules/100 µl). Après établissement des tumeurs, le volume tumoral est suivi 3 fois par semaine à l'aide d'un pied à coulisse. Le volume des tumeurs est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Volume tumoral (mm}^3\text{)} = 0,5 \times a \times b^2$$

Où **a** représente le grand diamètre et **b** le petit diamètre. Lorsque les tumeurs atteignent un volume d'environ 1000 mm³, les souris sont sacrifiées et les tumeurs sont fragmentées en plusieurs morceaux de taille semblables. A partir des fragments de tumeurs, des xénogreffes sont alors implantées aux animaux anesthésiés, en position inguinale bilatérale. Les souris xénogreffées (Souris MDA CTL et souris MDA DDB2) sont assignées aléatoirement dans 3 groupes de traitement : non traitées, traitement anticancéreux dose 1, traitement anticancéreux dose 2. Le démarrage des traitements a lieu lorsque les volumes tumoraux atteignent 200-300 mm³ (V_0) et se poursuit durant 2 semaines selon le schéma d'administration suivant : La Doxorubine est administrée par voie intraveineuse à raison de 2 injections par semaine pendant 2 semaines avec une dose totale de 10 mg/kg ou 15 mg/kg ; Le 5-Fluorouracile est administré par voie intrapéritonéale à raison de 2 injections par semaine pendant 2 semaines avec une dose totale de 120 mg/kg ou 240 mg/kg. Le groupe de souris non traitées reçoit des injections de sérum physiologique. L'effet des différents traitements est évalué par un suivi du volume des tumeurs pendant 30 jours, à partir de la 1^{ère} injection. Les animaux sont sacrifiés lorsque la tumeur atteint 5 fois son volume initial V_0 , et le temps nécessaire pour $5V_0$ détermine le « temps de survie ».

III. ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES

1. Evaluation au niveau transcriptionnel

1.1. *Extraction des ARN totaux*

Des culots de cellules, obtenus après trypsination, sont d'abord lavés au D-PBS avant d'être lysés grâce au tampon de lyse fourni dans le kit d'extraction ReliaPrepTM RNA Cell Miniprep System (Promega). Les étapes suivantes respectent les instructions du fabricant, et permettent d'obtenir à travers une colonne une solution d'ARN totaux traités à la DNase I. Les échantillons sont ensuite dosés par spectrophotométrie au NanoDrop (Thermo Scientific) avant d'être conservés à -80°C.

1.2. *RT-PCR quantitative en temps réel*

Pour cette technique, **deux étapes** sont nécessaires.

La première consiste à synthétiser, à partir des ARN extraits, des ADN complémentaires (ADNc) grâce à une réaction de rétrotranscription. Pour cela, le kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad) est employé et permet la synthèse d'ADNc à partir d'1 µg d'ARN. La réaction s'effectue en tube PCR dans un thermocycleur (Bio-Rad) selon le protocole suivant : 5 minutes à 25°C (activation de l'enzyme), 30 minutes à 42°C (synthèse) et 5 minutes à 85°C (inactivation). Si les ADNc ne sont pas immédiatement utilisés pour la deuxième étape, ils sont conservés à -20°C.

La deuxième étape, permet la réalisation d'une réaction de polymérisation en chaîne, en temps réel (PCR en temps réel) à partir des ADNc. Pour une réaction, 1,5 µl d'échantillon d'ADNc (dilué au 1/10^{ème} ou 1/100^{ème} selon le gène testé) sont mélangés à 7,5 µl du mixte commercial iQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad) 2X, et à 300 nM d'amorces sens et anti-sens du gène à tester. Le volume réactionnel final est complété à 15 µl avec de l'eau. Chaque échantillon est testé en double et la moyenne des profils d'amplifications est retenue. Pour chaque couple d'amorces, une gamme standard d'ADNc dilués en cascade (1/10^{ème} au 1/100000^{ème}) est systématiquement réalisée afin de calculer l'efficacité d'amplification. Tous les couples d'amorces utilisés ont une efficacité comprise entre 1,9 et 2,05.

MATERIEL & METHODES

Nom	Amorce sens	Amorce anti-sens	Tm	Taille
Amorces RT-PCR				
DDB2	5'-CTCCTCAATGGAGGGAACAA-3'	5'-GTGACCACCATTTCGGCTACT-3'	57°C	132pb
Bcl-2	5'-ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA-3'	5'-ACAGTTCACAAAAGGCATCC-3'	60°C	136pb
IκBα	5'-ATCAGCCCTCATTGTTGC-3'	5'-ACCACTGGGGTTCAGTCACTC-3'	60°C	180pb
SODMn	5'-CGACCTGCCCTACGACTAC-3'	5'-TGACCACCACCATTGAACTTC-3'	45°C	198pb
ERα	5'-CAGGCTACCATTATGGAGT-3'	5'-CCAGGCTGTTCTTCTTAGAG-3'	54°C	342pb
UCP2	5'-GGTGGTCGGAGATACCAA-3'	5'-CTCGGGCAATGGTCTTGTAG-3'	60°C	52pb
UCP4	5'-AGCAACCTTTCCCCTGGAT-3'	5'-ACCGAGCAAGAGCTGCTTCT-3'	65°C	68pb
UBB	5'-GCTTTGTTGGGTGAGCTTGT-3'	5'-CGAAGATCTGCATTTGACCT-3'	60°C	98pb
RPLPO	5'-GAAGGCTGTGGTGCTGATGG-3'	5'-CCGGATATGAGGCAGCAGTT-3'	62°C	103pb
GAPDH	5'-TGGGGAAGGTGAAGGTCGGA-3'	5'-GGGATCTCGCTCCTGGAAGA-3'	47°C	245pb
Amorces ChIP				
Bcl-2 I	5'-GAAGGTGCCGGGGCT-3'	5'-GCTACGAAGTTCTCCCC-3'	65°C	200pb
Bcl-2 II	5'-AGAACTTCGTAGCAGTCATCCT-3'	5'-TCTGATTAAGTCCGAACAGCA-3'	65°C	200pb
Bcl-2 III	5'-GCATTTGCTGTTCCGGAGTTT-3'	5'-CGGTATTCGCAGAAGTCTGT-3'	53,2°C	200pb
Bcl-2 IV	5'-ACAGGACTTCTGCGAATACCG-3'	5'-AATGAATCAGGAGTCGCGGG-3'	65-55 TD	193pb
Bcl-2 V	5'-ACTCCCTCTCCCCGCGACT-3'	5'-GCATACACACTACAAGTAACA CGGC-3'	54°C	300pb
Bcl-2 VI	5'-TGIGTATGCCCTGCTTCACT-3'	5'-TTCTGGTGTTCCTCCCTGG-3'	53,2°C	212pb
Bcl-2 VII	5'-TCTCATGCCAAGGGGAAAC-3'	5'-AGCGTGCGCCATCCTTC-3'	65-55 TD	199pb
BCP1	5'-CCCCCTTTCAGAAAGTACAG-3'	5'-AGCGTATTTTAAAGCCCC-3'	52°C	125pb
DDB2 IP Sp1	5'-CCGTCTCTCCAGAAAAAGAA-3'	5'-CCACCTCAGCCTCCTAAGTA-3'	60°C	100pb
DDB2 IP 5mC	5'-CAAGGCTGGATGATCGCTTA-3'	5'-TTTAGCAACAGGTCTGGC-3'	60°C	259pb
ESR1 IP 5mC	5'-ACCTCGGGCTGTGCTTTTT-3'	5'-TTGGATCTGATGCAGTAGGGC-3'	60°C	209pb
BRDT	5'-CCCTTGGCCTTACCAACTT-3'	5'-GCCCTCCCTGAAGAAAAAC-3'	60°C	100pb
UBE2B	5'-CTCAGGGGTGGATTGTTGAC-3'	5'-TGTGGATTCAAAGACCACGA-3'	60°C	177pb
Amorces MSP				
PCR nichée 1	5'-GGTAGAGTTTAGTTTTAATTTA GG AAAGG-3'	5'-CTCCAAC TCCAAAAA ACTCCTA CTC-3'	62-52 TD	
PCR nichée 2 M	5'-GTAGAGGTTTGGTAGCGTCGC-3'	5'-GTACGCCACCACGCCCG-3'	68-66 TD	
PCR nichée 2 U	5'-TTTGTAGAGGTTTGGTAGTGTGT-3'	5'-AACATACACCACCACCCCA-3'	68-66 TD	
Amorces Clonage				
BisulfiteSeq	5'-GGGATTATTTTGTTTTAGGGAGGT TAG-3'	5'-CAAAAAACTCCTACTCCTTATT C-3'	62-52 TD	421pb

Tableau 3 : Liste répertoriant l'ensemble des couples d'amorces utilisés pour l'amplification par PCR. Les couples d'amorces sont classés en fonction de leur domaine d'application. Les conditions de température sont indiquées dans la colonne Tm, et l'utilisation de protocole d'hybridation plus particulier, comme les "touch down" sont indiqués par « Tm max – Tm min TD ». Les conditions d'utilisation sont développées d'avantages dans les sections matériels et méthodes correspondantes. La taille des fragments amplifiés est renseignée dans la colonne de droite.

L'incorporation de Sybr Green est mesurée grâce au thermocycleur iCycler Opticon2 (Bio-Rad) durant un programme généralement composé d'une étape initiale d'activation de l'enzyme de polymérisation à 95°C pendant 3 minutes, puis une répétition de 40 cycles, composés chacun de 15 secondes à 95°C, 20 secondes à la température d'hybridation des amorces (**Tableau 3**) et 15 secondes d'élongation à 72°C. La spécificité des amorces et la formation de dimères sont évaluées par une étape finale de courbe de fusion, avec une mesure de la fluorescence après chaque degré durant une montée en température allant de 50 à 90°C. Le niveau relatif pour chaque transcrit est calculé selon la méthode de Pfaffl (Pfaffl, 2001), grâce à la détermination des Ct et la normalisation avec deux gènes de références, UBB (Ubiquitin B) et RPLPO (Ribosomal Protein Large P0).

2. Evaluation au niveau traductionnel

2.1. Extraction et dosage protéique

Les cellules sont mises en suspension par grattage, puis centrifugées à 500 g, pendant 10 min à 4°C. Après un lavage du culot cellulaire dans du PBS, les cellules sont resuspendues et lysées dans un tampon de lyse (10 mM TrisHCl pH 7,4, 5 mM EDTA, triton 1 % (v/v triton X100)) contenant des inhibiteurs de protéases, pendant 20 min sur la glace. Après une centrifugation à 10000 g pendant 5 min à 4°C, le surnageant est récupéré et la concentration protéique est ensuite déterminée par spectrophotométrie à 595 nm selon la méthode de Bradford, en utilisant une gamme étalon correspondant à différentes concentrations connues d'albumine sérique bovine (BSA) et à l'aide d'une solution de dosage commerciale (BioRad). Les échantillons protéiques sont ensuite conservés à -20°C.

2.2. Electrophorèse et transfert sur membrane

Les protéines totales (50 µg) sont dénaturées à 100°C durant 5 min dans 62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8) contenant 2% de sodium Dodécyl Sulfate (SDS), 8% de glycérol, 75 mM de dithiothréitol et du bleu de bromophénol, selon la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970). Les protéines dénaturées sont déposées dans un gel de concentration contenant 5 % de polyacrylamide préparé dans un tampon 0,25 M Tris/HCl (pH 6,8) contenant 0,1% de SDS, puis sont séparées dans un gel de séparation contenant 10% de polyacrylamide, préparé dans un tampon 0,375 M Tris/HCl (pH 8,8) contenant 0,1% de SDS.

Nom	Fournisseur	Numéro Réf.	Dilution/Quantité	Taille (kDa)
Western-blot				
Anti-Bcl-2	Santa Cruz	sc-509	1/1000	26
Anti-DDB2	Abcam	ab77765	1/1000	48
Anti-PARP clivée	BD Biosciences	552596	1/2000	89
Anti-I κ B α	Sigma	K4803	1/1000	35
Anti-SODMn	Abfrontier	LF-PA0021	1/2000	24
OXPPOS	MitoSciences	MS604	1/2000	18, 22, 29, 48 et 54
Anti- α Tubuline	Abcam	ab52866	1/1000	50
Anti-Rabbit IgG-Peroxidase	Sigma	A9169	1/10000	
Anti-Mouse IgG-Peroxidase	Sigma	A9044	1/10000	
ChIP-MeDIP				
Anti-DDB2	Santa Cruz	sc25386	2 μ g/IP	
Anti-acetyl-H3K9/14	Diagenode	C15410005	2 μ g/IP	
Anti-acetyl-H3K27	Diagenode	C15410174	2 μ g/IP	
Anti-5mC	Diagenode	Mab-006-100	4 μ g/IP	
Anti-Sp1	Santa Cruz	sc-59 PEP2	2 μ g/IP	
IgG control	Active Motif	53010	2 μ g/IP	

Tableau 4 : Liste des différents anticorps utilisés selon le domaine d'application. Les conditions de dilution des anticorps pour l'immunodétection sur membrane sont indiquées, ainsi que les quantités d'anticorps mobilisées par immunoprécipitation. Les tailles des protéines détectées par western-blotting sont renseignées dans la colonne de droite.

L'électrophorèse est ensuite réalisée à 170 V durant 1 h dans un tampon de migration 0,05 M Tris, 0,384 M glycine et contenant 0,1% de SDS (pH 8,3). Les protéines sont ensuite transférées du gel sur une membrane de PVDF (Bio-Rad) par transfert liquide entre deux piles de feuilles de papier Whatman et des éponges imbibées de tampon Tris (0,05 M), Glycine (0,384 M) (pH 7,9) contenant 0,1% de SDS et 20% de méthanol, pendant 1h15 à 100 V. La membrane est calibrée à l'aide de marqueurs de masse moléculaire connue et pré-colorés (Bio-Rad).

2.3. *Détection immunologique*

La présence des protéines étudiées est détectée immunologiquement sur la membrane à l'aide de l'anticorps approprié en utilisant une solution commerciale de révélation par chimioluminescence (ClarityTM ECL Substrate, Bio-Rad). La membrane est préalablement saturée grâce à un agent bloquant (lait 5%) dilué dans du TBS Tween (Tris/HCl 50 mM, pH 7,5 contenant 150 mM de NaCl, Tween 20 à 0,1%) pendant 45 minutes sous agitation, avant d'être incubée à nouveau pendant la nuit à 4°C, avec les anticorps polyclonaux ou monoclonaux, dilués dans du TBS-0,1 % Tween 20 contenant 2,5 % d'agent bloquant. Pour chacun des anticorps utilisés, la dilution optimale est préalablement définie et rapportée dans le **tableau 4**. Après 3 lavages de 5 min chacun avec du tampon TBS-0,1% Tween 20, la membrane est incubée pendant 30 min à température ambiante avec les anticorps anti-immunoglobulines adaptés à 0,04 U/ml, couplés à la peroxydase (A9169, A9044 Sigma) dilués dans du TBS-0,1% Tween 20 contenant 2,5% d'agent bloquant. Après 3 lavages de 5 min chacun avec du TBS-0,1% Tween, l'activité de la peroxydase est révélée à l'aide du substrat chimioluminescent. La bande correspondant à la protéine spécifique reconnue par l'anticorps primaire est mise en évidence et quantifiée grâce à une acquisition sur ChemiDoc (Bio-Rad).

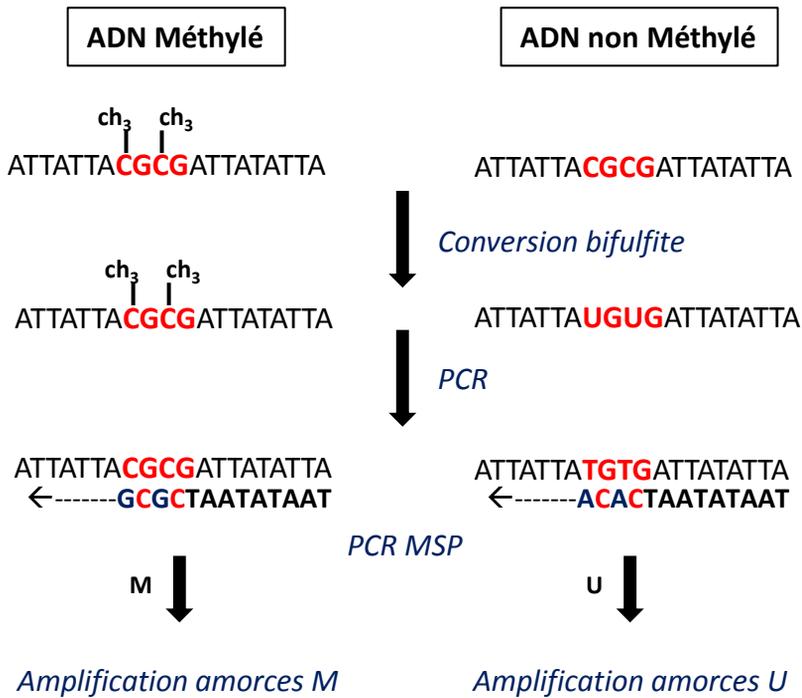


Figure 16 : Principe de la conversion par le bisulfite de sodium de l'ADN génomique. Les cytosines de l'ADN génomique sont converties en uraciles après traitement au bisulfite de sodium, alors que les cytosines méthylées sont protégées. Après les réactions d'amplification, la séquence de l'ADN génomique non méthylé est modifiée, par la substitution des cytosines en thymines. Les conversions générées par le bisulfite, peuvent être identifiées par PCR MSP (Methylation Specific PCR) en utilisant deux couples d'amorces, l'un désigné à n'amplifier une séquence que si elle est méthylée (M), l'autre ne pouvant amplifier qu'une séquence non méthylée (U).

IV. MESURE DE L'ACTIVITE SUPEROXYDE DISMUTASE

Les culots cellulaires préalablement lavés au PBS, sont lysés dans un tampon phosphate 50 mM, pH 7,8 contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases, par trois cycles de congélation et décongélation. Après une centrifugation à 10000 g à 4°C, le surnageant est conservé puis dosé grâce à la méthode de Bradford, décrite plus haut. Des dépôts de 50 µg de protéines sont préparés dans un tampon Tris/Glycine contenant 20% de saccharose et du bleu de bromophénol, puis sont déposés sur gel. Chaque gel comporte en sa phase supérieure un gel de concentration (5% polyacrylamide, 0,25 M Tris/HCl pH 6,8), puis un gel de séparation (10% polyacrylamide, 0,375 M Tris/HCl pH 8,8). Une migration à 120 V durant 2 heures dans un tampon de migration (0,05 M Tris, 0,384 M glycine) permet la séparation des protéines. L'électrophorèse est ensuite suivie d'une incubation des gels dans une solution de NBT (Nitrobleu de Tétrazolium) à 0,25 mg/ml dans l'eau pendant 20 minutes. Les gels sont ensuite incubés dans un tampon phosphate 50 mM, pH 7,8 contenant 28 µM de Riboflavine et 417 µl/ml de TEMED durant 15 minutes à l'abri de la lumière. L'activité des SOD (Mn et Cu/Zn) est révélée par la formation de bandes décolorées sur le gel. Une capture d'image du gel est réalisée à l'aide du ChemiDoc (Bio-Rad).

V. ETUDE DES METHYLATIONS SUR LE PROMOTEUR DE DDB2

Cette étude des méthylations de l'ADN génomique est basée sur l'utilisation du bisulfite de sodium, capable de convertir les cytosines non méthylées en uraciles (**figure 16**). Les cytosines méthylées ne sont pas modifiées par le bisulfite de sodium et sont reconnues comme des cytosines pendant une réaction de PCR alors que les cytosines non méthylées et converties sont reconnues comme des thymines durant l'amplification. Les modifications provoquées par le bisulfite peuvent être détectées par séquençage (bisulfite sequencing) ou par PCR spécifiques des méthylations (MSP)

1. Traitements au bisulfite de sodium et séquençage du promoteur de DDB2

1.1. Extraction de l'ADN génomique et traitement au bisulfite de sodium

L'extraction de l'ADN génomique et la conversion au bisulfite s'effectuent à l'aide du kit EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit (Qiagen), selon les instructions du fabricant. Brièvement, 10^5 cellules sont resuspendues dans 30 μ l de tampon de lyse, contenant de la protéinase K, et incubées durant 2 heures à 56°C. A partir des lysats, 40 μ l sont directement prélevés pour être convertis au bisulfite, avec 85 μ l du mélange réactionnel « Bisulfite mix » et 15 μ l de solution stabilisatrice de l'ADN. Le mélange est incubé en tube PCR, dans un thermocycleur, selon le programme décrit dans le **tableau 5**.

Etape	Temps	Température
Dénaturation	5 min	95°C
Incubation	25 min	60°C
Dénaturation	5 min	95°C
Incubation	85 min	60°C
Dénaturation	5 min	95°C
Incubation	175 min	60°C

Tableau 5 : Programme d'incubation des extraits d'ADN génomique durant la conversion au bisulfite de sodium.

L'ADN converti est ensuite lavé et purifié à travers les colonnes MinElute® DNA du kit de bisulfite. Plusieurs lavages permettent d'éliminer les sels de bisulfite et l'ADN est finalement élué avec 15 μ l d'eau et dosé au NanoDrop avant d'être stocké à -20°C.

1.2. Clonage et séquençage du promoteur de DDB2 traité au bisulfite

1.2.1. Amplification de l'insert et purification sur gel

Une séquence de 420 pb du promoteur de DDB2 est amplifiée par PCR à l'aide du couple d'amorces « bisulfiteSeq » (**Tableau 3**). Les réactions de PCR sont réalisées en utilisant le kit de Taq polymérase d'Invitrogen, dans un volume final de 50 μ l contenant : 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, du tampon PCR 1X, 400 nM de chacune des amorces sens et antisens, 200 ng d'ADN converti et 2,5 unité de Taq. L'amplification est réalisée avec un programme PCR « Touch Down » : 94°C pendant 3 min 30 s, 10 cycles d'amplification

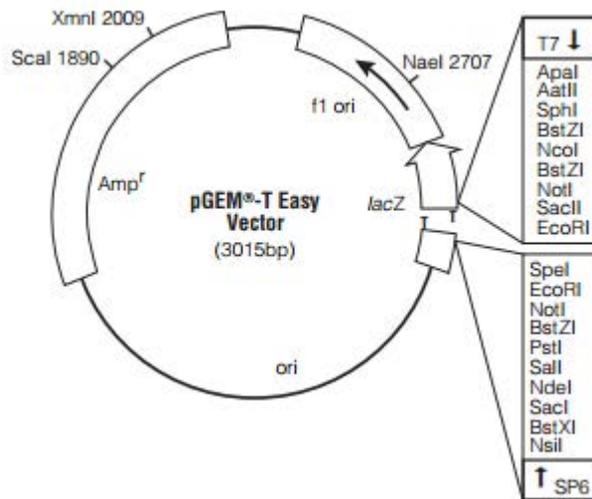


Figure 17 : Représentation schématique du plasmide pGEM®-T (Promega). Le plasmide déjà linéarisé (site EcoRI) porte à ses extrémités 3' une thymine. Une région cible de l'ADN génomique traité au bisulfite est insérée dans ce plasmide, après une réaction d'amplification. L'ajout par la Taq polymérase de deoxyadenosine à l'extrémité 3' sur le fragment amplifié, permet la ligation immédiate de ce dernier avec le vecteur pGEM®-T. D'après Promega, pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual.

chacun réalisé à 94°C pendant 30 s, 62°C (-1°C/cycle) pendant 30 s et 72°C pendant 1 min, puis 30 cycles avec une température d'hybridation fixée à 52°C. Le programme se termine par une élongation finale de 5 min à 72°C.

La totalité du produit de PCR est déposée sur gel d'agarose contenant 500 ng/ml de bromure d'éthidium et la présence d'un amplicon de 420 pb est vérifiée après migration. La bande correspondante est isolée du gel grâce à un scalpel et purifiée en utilisant les colonnes Wizard[®]SV Gel Clean-Up System (Promega). Brièvement, le fragment de gel est dissout et déposé sur colonne. Une première centrifugation permet d'isoler le produit de PCR, lequel est ensuite lavé plusieurs fois avant d'être élué avec 50µl d'eau. Un dosage au NanoDrop permet d'estimer la concentration des échantillons.

1.2.2. Clonage et Transformation bactérienne

L'amplicon est cloné dans le vecteur plasmidique pGEM[®]-T contenant une cassette de résistance à l'ampicilline (Promega, **Figure 17**). L'utilisation de ce vecteur ne nécessite pas de digestion préalable avec des enzymes de restriction. En effet, ce dernier est déjà linéarisé et porte des thymidines aux deux extrémités 3'. Le produit de PCR à insérer à ce vecteur, porte une deoxyadenosine aux extrémités 3', ajoutée au cours de la réaction de polymérisation. Ainsi, vecteur et insert, sont préparés pour la ligation. Le kit pGEM[®]-T Easy vector system (Promega) utilisé pour la ligation, contient l'ensemble des réactifs nécessaires pour cette réaction. La ligation mobilise 50 ng de plasmide et 21 ng d'insert, dans un volume réactionnel de 20 µl contenant un tampon de ligation 1X et 5 unités de T4 DNA ligase. Après 3 heures d'incubation à température ambiante, le produit de ligation est directement utilisé pour les transformations bactériennes.

Pour la réalisation des transformations bactériennes, 10 µl de produit de ligation est ajoutés à 50 µl d'une suspension de bactéries compétentes DH5α (Invitrogen). Après une incubation de 10 min sur glace, le mélange est placé rapidement à 42°C pendant 45 s, puis replacé sur glace pendant 5 min afin de générer un choc thermique. Les bactéries sont ensuite reprises dans 400 µl de milieu LB (Tryptone 10g/l, extraits de levures 5g/l et NaCl 10g/l) contenant 25 mg/l d'ampicilline, puis placées sous agitation à 37°C pendant 1 heure. Les cultures sont étalées sur des boîtes de LB agar (25 mg/l ampicilline) puis laissées sur la nuit à 37°C.

1.2.3. *Extraction plasmidique et séquençage*

Plusieurs colonies sont prélevées et cultivées sur la nuit dans 5 ml de milieu LB avec 25mg/l d'ampicilline, sous agitation, à 37°C. Les cultures bactériennes sont centrifugées et les culots obtenus servent pour une extraction plasmidique à l'aide du kit de miniprep PureYield™ (Promega). Après une lyse des culots, l'extraction se réalise sur colonne et nécessite plusieurs étapes de lavage, puis de précipitation des plasmides à l'isopropanol. Après séchage des colonnes, les plasmides sont élués avec 30 µl d'eau et dosés au NanoDrop. Le séquençage est assuré par la société Beckman Coulter Genomics (Grenoble). Les échantillons envoyés contiennent 20 µl de plasmides à 100 ng/µl et les amorces T7 sens et SP6 anti-sens, qui encadrent l'insert, sont utilisées pour le séquençage. Les séquences obtenues sont analysées avec l'outil bio-informatique du NCBI.

2. Réactions de PCR spécifiques des méthylations (MSP)

Cette technique vise à étudier par PCR, de manière qualitative, l'état de méthylation des cytosines. Elle repose sur l'utilisation de deux paires d'amorces encadrant la même région cible mais employées à amplifier un brin soit non méthylé (amorces U), soit méthylé (M) après conversion au bisulfite de sodium (**Figure 16**). La région ciblée est représentée dans le schéma de la **figure 47** et les couples d'amorces M et U utilisés sont répertoriés dans le **tableau 3**.

Les réactions de PCR MSP ont été réalisées en deux étapes, par deux réactions successives de PCR (PCR nichée). Un premier couple d'amorce sert à amplifier un premier fragment, indépendamment du résultat de conversion par le bisulfite. A l'issue de cette première réaction, 5 µl du produit d'amplification servent à une seconde PCR, cette fois-ci spécifique des méthylations (les amorces M et U sont employées) et permettent d'amplifier une région située à l'intérieur du premier amplicon.

Chaque réaction de PCR se produit dans un volume final de 50 µl contenant 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, du tampon PCR 1X, 400 nM de chacune des amorces sens et antisens, 50 ng d'ADN converti et 2,5 unité de Taq polymérase (Invitrogen). Les programmes d'amplification utilisés sont développés dans le **Tableau 6**.

Etape	PCR nichée 1	PCR nichée 2 MSP
1	94°C / 3 min	94°C / 3 min
2	94°C / 30 s	94°C / 30 s
3	62°C (-1°C/cycle) / 30 s	68°C / 30 s
4	72°C / 1 min 30 s	72°C / 1 min
5	10 répétitions étape 2 à 4	2 répétitions étape 2 à 4
6	40 répétitions étape 2 à 4 avec 52°C étape 3	2 répétitions étape 2 à 4 avec 66°C étape 3
7	72°C / 10 min	35 répétitions étape 2 à 4 avec 65°C étape 3
8		72°C / 10 min

Tableau 6 : programme de réaction d'amplification pour PCR nichées.

3. Immunoprécipitation d'ADN méthylé (MeDIP)

Les différentes étapes expérimentales appliquées pour cette technique sont celles décrites dans le travail de (Mohn et al., 2009). Le principe est d'immunoprécipiter de l'ADN génomique fragmenté par sonication à l'aide d'un anticorps dirigé contre les cytosines méthylées, puis de quantifier parmi les fragments isolés la proportion d'une séquence cible par PCR en temps réel.

3.1. *Extraction de l'ADN génomique et sonication*

Pour chaque essai, 5×10^6 cellules sont resuspendues dans 300 μ l de tampon Tris EDTA (TE, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0) avant d'être lysées par addition de 300 μ l de tampon de lyse (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 4 mM EDTA, 20 mM NaCl et 1% de SDS) contenant 200 μ g de protéinase K (Sigma). Après une incubation à 55°C pendant 5 heures, l'ADN génomique est extrait par un mélange volume/volume de Phénol/Chloroforme (600 μ l/600 μ l) puis précipité avec 1 ml d'éthanol absolu contenant 75 mM d'acétate de sodium. L'ADN précipité est ensuite lavé dans 1 ml d'éthanol 70% puis centrifugé 5 min à 14000 rpm. Les culots d'ADN séchés sont repris dans 150 μ l de TE contenant 20 μ g/ml de RNase A (Sigma) puis placés à 37°C durant 30 min. L'ADN est dosé au Nanodrop et conservé à -80°C.

La sonication de l'ADN génomique permet ensuite de générer des fragments de tailles comprises entre 300 et 1000 pb. Pour ce faire, 20 μ g d'ADN sont dilués dans 300 μ l de TE, puis fragmentés par sonication à raison de 4 pulses de 15 s à 5 watts, chacun interrompu par

une incubation de 10 s sur glace. La fragmentation est ensuite vérifiée en déposant 5 µl d'échantillon sur gel d'agarose contenant 500 ng/ml de bromure d'éthidium.

Une dernière étape permet de purifier l'ADN fragmenté, par une précipitation avec 600 µl d'éthanol absolu contenant 400 mM de NaCl et 8 µg de glycogène (Thermo Scientific). Les échantillons sont centrifugés à 14000g pendant 60 min à 4°C et les culots sont lavés avec 300 µl d'éthanol 70%, puis séchés et repris dans 50 µl de TE. Les concentrations d'ADN sont déterminées au NanoDrop.

3.2. Immunoprécipitation de l'ADN méthylé

Pour l'immunoprécipitation, 4 µg d'ADN sont dilués dans 450 µl de TE avant addition de 51 µl de tampon d'immunoprécipitation (IP) 10X (100 mM de Phosphate de sodium pH 7,0, 1,4 M de NaCl et 0,5% de Triton X-100). A ce mélange, 4 µg d'anticorps monoclonal anti-cytosine méthylée (anti-5mC, Mab-006-100, Diagenode) sont ajoutés, puis incubés durant 4 heures à 4°C sous agitation rotative. Une immunoprécipitation avec des anticorps non spécifiques (IgG contrôles), est également réalisée en parallèle, dans les mêmes conditions. Durant l'incubation, 40 µl/test de billes magnétiques couplées à des immunoglobulines anti-souris (Dynabeads[®] M-280 Sheep anti-Mouse IgG, Invitrogen) sont déposés dans un tube placé contre un aimant. Le surnageant est retiré et remplacé par 40 µl de tampon d'IP 1X (dilué dans du TE). Les billes sont ensuite ajoutées au mélange ADN-Anticorps anti-5mC et incubées 2 heures à 4°C. Les complexes ainsi formés après cette deuxième incubation, sont retenus au fond des tubes à l'aide d'un aimant et lavés 3 fois avec 700 µl de tampon d'IP 1X. Après le dernier lavage, les billes sont reprises dans 250 µl de tampon de digestion (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 0,5% SDS) contenant 70 µg de protéinase K et incubées durant 3 heures à 50°C.

Avant d'analyser les résultats par PCR, les produits d'immunoprécipitation sont purifiés par une extraction au Phénol/Chloroforme (250 µl/250 µl). La précipitation de l'ADN est obtenue en ajoutant aux échantillons 2 volumes d'éthanol absolu contenant 400 mM de NaCl et 8 µg de glycogène. Après lavage à l'éthanol 70% et séchage des culots, l'ADN est resuspendu dans 60 µl de TE et stocké à -20°C.

3.3. *Analyse par PCR quantitative*

Pour les réactions de PCR, 2 µl d'échantillon immunoprécipité sont dilués dans un volume réactionnel de 15 µl contenant, le mix iQTM SYBR[®] Green Supermix 1X (Bio-Rad) et 300 nM d'amorces sens et antisens (**Tableau 3**). Une réaction contenant 20 ng d'ADN génomique non immunoprécipité (input) est également testée. La PCR est réalisée sur le thermocycleur iCycler Opticon2 (Bio-Rad) programmé ainsi : 94°C pendant 3 min 30 s, puis 40 cycles de 94°C - 15 s, 60°C - 20 s et 72°C - 20 s. Une analyse des produits d'amplification par la génération d'une courbe de fusion, permet de vérifier la spécificité des amorces utilisées. Les niveaux d'enrichissement sont exprimés par rapport à ceux mesurés pour les IgG contrôles "Fold Enrichment". La méthode de calcul intègre les valeurs des Ct, pour les immunoprécipitations avec l'IgG et l'anticorps anti-5mC, au sein de la formule $2^{-\Delta\Delta C_t}$. La validité des résultats est renforcée en réalisant en parallèle, des réactions de PCR « contrôles » sur deux régions cibles de l'ADN (Borgel et al., 2012) : la première est une séquence du gène BRDT (Bromodomain testis-Specific, spécifique à la lignée germinale) connue pour être méthylée servant donc de contrôle positif, tandis que l'autre séquence, correspond à une région non méthylée du gène UBE2B (Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2B), servant de témoin négatif à l'expérience. Les séquences des amorces utilisées sont indiquées dans le **tableau 3**.

VI. ANALYSE DE L'INTERACTION ET DE L'ACTIVITE DES PROTEINES NUCLEAIRES SUR L'ADN

1. Analyse par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

1.1. *Extraction et immunoprécipitation de la chromatine*

Pour cette technique le kit commercial ChIP-IT Express (Active Motif) a été utilisé, selon les instructions du fournisseur et dont voici brièvement le déroulement.

La première étape consiste à fixer des cellules à 80% de confluence avec du milieu sans sérum contenant 1% de formaldéhyde. Après 10 minutes de fixation à température ambiante, les cellules sont lavées au D-PBS, puis incubées 5 minutes avec une solution de glycine. Les cellules fixées sont ensuite mises en suspension par grattage dans une solution de D-PBS contenant 500 nM de PMSF et centrifugées à 720 g pendant 10 minutes à 4°C. Le

culot de cellules est resuspendu dans un tampon de lyse, auquel est ajouté 500 nM de PMSF et 0,5% (v/v) d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases. La lyse s'effectue sur glace pendant 30 minutes et se termine par l'homogénéisation des échantillons dans un homogénéisateur de type Dounce (Active Motif). Les noyaux sont finalement récupérés après une centrifugation (2400 g, 10 min, 4°C) et resuspendus dans un tampon de digestion. Cette première étape se termine par la fragmentation, à l'aide d'un mélange enzymatique (200 U/ml) de la chromatine placée à 37°C durant 7 minutes. La digestion est arrêtée par l'ajout d'une solution d'EDTA à 1 mM. Les échantillons sont centrifugés (18000 g, 10 min, 4°C) et la chromatine est récupérée dans le surnageant, puis conservée à -80°C.

Avant l'étape d'immunoprécipitation, 50 µl de chromatine fragmentée sont prélevés pour la digestion à la protéinase K et l'extraction au Phénol/Chloroforme, afin de déterminer les quantités d'ADN pour chaque échantillon, contrôler l'efficacité de la fragmentation sur gel d'agarose et constituer un témoin positif (input) de chromatine non immunoprécipitée. Les inputs sont repris dans 30 µl d'eau et sont dosés au NanoDrop (Thermo Scientific).

La dernière étape d'immunoprécipitation se réalise entre 14 µg de chromatine fragmentée et 2 µg d'anticorps. L'ensemble est mélangé avec 25 µl de billes magnétiques portant la protéine G et un tampon d'immunoprécipitation fournit avec le kit. Les anticorps utilisés sont répertoriés dans le **tableau 4**. Parmi les anticorps, une immunoglobuline G non spécifique est utilisée comme contrôle, afin d'évaluer le bruit de fond après immunoprécipitation, lors de l'analyse des résultats. Après une incubation de 4 heures à 4°C sous agitation rotative, les complexes retenus par les billes magnétiques sont lavés 3 fois à l'aide d'un tampon de lavage, puis reprises dans 100 µl de tampon d'élution.

Une réversion de la fixation réalisée en début d'expérience est obtenue après incubation d'une nuit, de la chromatine immunoprécipitée, à 65°C, dans son tampon d'élution contenant du NaCl. Enfin, la chromatine est digérée avec 1 µg de protéinase K pendant 1 heure à 37°C. L'ADN est purifié par un Phénol(basique)/Chloroforme et précipité à -20°C dans de l'éthanol 70% contenant 80 nM d'acétate de sodium et 1 µg de glycogène durant 2 heures. L'ADN précipité est lavé une fois dans de l'éthanol 70% avant d'être séché et resuspendu dans 30 µl d'eau.

1.2. *Analyse par PCR semi-quantitative*

Les amorces utilisées pour cette partie se trouvent répertoriées dans le **tableau 3**. Les réactions de PCR sont préparées à partir d'un tampon d'amplification et de la polymérase du kit iProof HF DNA Polymérase (Bio-Rad). Une réaction d'amplification, s'effectue dans 10 µl de HF buffer (5X) contenant 300 nM d'amorces sens et anti-sens, 200 µM de dNTP, 100 ng d'ADN non immunoprécipité "input" ou 3 µl d'échantillon immunoprécipité et 1U d'iProof DNA polymérase. Le volume final est ramené à 50 µl est obtenu avec de l'eau. Les conditions paramétrées sur le thermocycleur sont les suivantes : 98°C pendant 30 s, puis la répétition d'une étape, comprenant 10 secondes à 98°C, 20 s à la température d'hybridation des amorces et 20 s d'élongation à 72°C. Le protocole se termine avec une étape d'élongation finale à 72°C pendant 7 minutes.

Les produits d'amplification sont déposés sur gel d'agarose (3%) contenant du bromure d'éthidium à 500 ng/ml. Pour chaque dépôt, 10 µl de produit de PCR sont utilisés et mélangés à 2 µl de bleu de dépôt 2X (Fermentas). Après migration dans un tampon TBE (Tris, Borate, EDTA), les gels sont observés au GelDoc 2000 (Bio-Rad) et l'acquisition des données est réalisée sur le logiciel Quantity One (Bio-Rad).

1.3. *Analyse par PCR quantitative en temps réel*

Les conditions appliquées reprennent globalement le protocole décrit dans le paragraphe II.1.2. Chaque produit d'immunoprécipitation est amplifié à partir de 3 µl d'échantillon. Une gamme standard de chaque type cellulaire est élaborée, à partir des inputs avec 50 ng, 5 ng, 0,5 ng, 0,05 ng et 0,005 ng d'ADN. Les niveaux d'enrichissement pour un anticorps donné sont exprimés par rapport à ceux mesurés pour les IgG contrôles (Fold Enrichment). La méthode de calcul intègre les valeurs des Ct, pour les immunoprécipitations avec l'IgG et l'anticorps d'intérêt, au sein de la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2. **Analyse de l'activité transcriptionnelle des protéines nucléaires**

2.1. *Présentation des plasmides*

Les cellules HEK-293 surexprimant le récepteur nucléaire α ou β aux œstrogènes est obtenu par transfection du plasmide contenant l'ADNc de chacun de ces gènes respectifs. Il

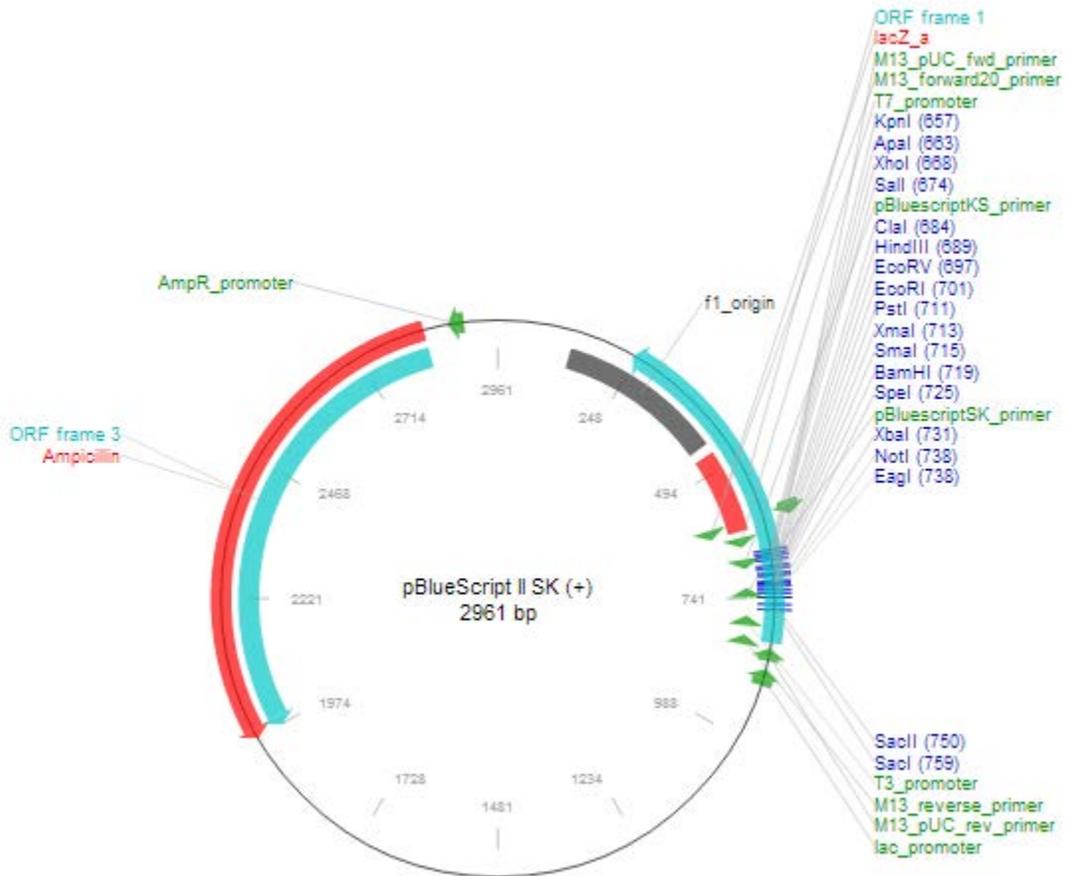


Figure 18 : Représentation schématique du plasmide pBlueScript II SK (+). Le clonage du promoteur du gène Bcl-2 dans ce plasmide est obtenu selon deux constructions différentes : la 1^{ère} intègre la région -3934 à l'ATG et clonée entre les sites BamHI et HindIII, en amont du gène codant la luciférase. Dans une deuxième approche, une région plus restreinte, allant de -1281 à l'ATG est clonée dans ce plasmide, entre les sites EagI et HindIII. D'après Addgene : <https://www.addgene.org/vector-database/1946/> et (Heckman et al., 2000).

est co-transfecté avec un plasmide - intégrant le gène rapporteur luciférase, disponible selon deux constructions différentes :

- Une construction dénommée ERE-Luc, préalablement fourni par le Pr D. Picard (Genève) correspond à la luciférase placée sous le contrôle d'un élément de réponse aux œstrogènes (ERE).
- Une construction dénommée DDB2Promoteur-Luc, dans laquelle on retrouve le gène rapporteur sous le contrôle de la région proximal du promoteur de *ddb2*. Lors d'un travail précédent dans le laboratoire, le promoteur de *ddb2* (735 pb avant l'ATG) a été intégré dans le vecteur plasmidique pGL3 Luciferase Reporter (Promega), entre les sites de restriction KpnI et HindIII.

L'activité transcriptionnelle de la protéine DDB2 sur le promoteur de *bcl-2* a été évaluée en utilisant un plasmide contenant le gène rapporteur de la luciférase, pBluescript II KS(+) (**Figure 18**), placé sous le contrôle du promoteur P1 et P2 de BCL-2 (Addgene 15381) ou de P2 seul (Addgene 15382).

Un plasmide contenant l'ADNc du gène codant la β -galactosidase (pSV40/ β Gal) à et permettant son expression constitutive est utilisé comme contrôle interne des expériences de transfection.

2.2. Transfection transitoire et mesure de l'activité luciférase

2.2.1. Transfections par la méthode Calcium-Phosphate

L'activité transcriptionnelle des récepteurs aux œstrogènes sur le promoteur de DDB2 est étudiée dans les cellules HEK293. Le milieu de culture des cellules est remplacé, 24 heures avant la transfection, par un milieu contenant du sérum traité au charbon actif. De la transfection jusqu'à l'analyse de l'activité luciférase, les cellules sont maintenues dans ce milieu. Une plaque 24 puits estensemencée avec 10^5 cellules/puits. Après 8h les cellules sont transfectées avec les plasmides. Chaque puits reçoit un mélange de 3 plasmides : celui portant une séquence régulatrice en amont du gène de la luciférase (200 ng), un plasmide contenant le gène codant le récepteur aux œstrogènes α ou β (40 ng) et un plasmide contenant le gène de la β -galactosidase (20 ng) sous le contrôle d'un promoteur actif.

Les plasmides sont dilués avec de l'eau dans un volume final de 18 μ l et ajoutés à 6 μ l de solution 1 M de CaCl_2 . Après une incubation de 20 min à température ambiante, le

mélange est ajouté goutte-à-goutte à 24 µl de tampon HBSS (Hepes 50 mM, Na₂HPO₄ 12H₂O 1,5 mM et NaCl 0,14 M). L'intégralité du mélange est versé goutte-à-goutte sur les cultures, lesquelles sont ensuite placées à 37°C sur la nuit. Douze heures après la transfection, le milieu de culture est aspiré et les cellules sont lavées au D-PBS. Chaque puits est ensuite complété avec du milieu de culture traité au charbon actif, additionné ou non de 100 nM d'œstradiol. Après 24 heures à 37°C, le contenu des puits est aspiré et la plaque est placée à -80°C.

Parallèlement, le niveau d'expression des récepteurs aux œstrogènes dans les cellules HEK293 est vérifié après transfection par RT-PCR et western-blot.

2.2.2. Transfection à l'aide d'un agent polycationique

La méthode utilisant le poly-éthylèneimine (Jet-PEI) a été utilisée pour étudier l'activité transcriptionnelle de DDB2 sur le promoteur de *bcl-2*. Les conditions appliquées sont celles déjà décrites dans le paragraphe I.2.2.4.

2.2.3. Mesure de l'activité luciférase et β-galactosidase

Les mesures d'activités luciférase et β-galactosidase sont réalisées en utilisant respectivement les kits Luciférase reporter gene assay high sensitivity (Roche) et β-gal reporter gene assay (Roche). Les cellules sont reprises dans un tampon de lyse fourni avec le kit et incubées 30 min sur glace. Les débris cellulaires sont éliminés après une centrifugation à 14 000 g pendant 5 min et les activités luciférase et β-galactosidase sont mesurées dans le surnageant. La luminescence est mesurée sur plaque 96 puits à l'aide du lecteur de plaque Victor X (PerkinElmer). Pour l'activité luciférase, les mesures démarrent après avoir ajouté à 50 µl de lysat, 100 µl d'une solution contenant de la luciférine. Les 50 µl restant du lysat sont prélevés et ajoutés à 100 µl d'une solution contenant les substrats nécessaires à la réaction catalysée par la β-galactosidase. Après une incubation de 15 min à température ambiante, le mélange réactionnel est complété avec 50 µl d'une solution initiatrice, nécessaire à la mesure immédiate des résultats. Les résultats sont exprimés en activité relative de luciférase, correspondant au rapport des valeurs d'unité relative de lumière (URL) mesurées pour la luciférase sur celles de la β-galactosidase.

VII. ANALYSE DE LA DE MORT CELLULAIRE PAR APOPTOSE

1. Détection de la forme clivée de la protéine PARP par immunoréplique

La détection de la protéine PARP clivée a été effectuée par immunoréplique. Les détails de la technique sont présentés dans la partie matériels et méthodes II.2. Les cellules témoins ou traitées avec les agents anticancéreux sont récupérées et lavées dans du D-PBS, avant d'être resuspendues dans du tampon de lyse. La recherche de la forme clivée de PARP est réalisée à l'aide d'un anticorps spécifique, utilisé à la dilution indiquée dans le **tableau 4**. A l'issue de trois expériences indépendantes, la moyenne de l'intensité du clivage de la protéine PARP est calculée, grâce à la quantification par densitométrie des bandes révélées au ChemiDoc (Bio-Rad). Les valeurs d'intensité de marquage de la tubuline ont servi de références pour normaliser les résultats.

2. Marquage des phosphatidylsérines à l'annexine V

L'exposition de la phosphatidylsérine a été évaluée après marquage des cellules à l'annexine V. Les cellules témoins ou traitées avec les agents anticancéreux sont récupérées et lavées dans du D-PBS, avant d'être resuspendues dans du tampon de liaison (10 mM HEPES pH 7.4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) à 2×10^6 cellules/ml. De cette suspension, 100 μ l (2×10^5 cellules) sont transférées dans des tubes de 5 ml. Les cellules sont alors mises en présence de 5 μ l d'annexine V conjuguée à la Fluorescéine isothiocyanate (BD Pharmingen) pendant 15 min à température ambiante et à l'obscurité. Avant d'analyser au cytomètre en flux, 200 μ l de tampon de liaison sont rajoutés par tube. L'analyse s'effectue sur un cytomètre FACSCalibur (BD) couplé au logiciel CellQuest. La fluorescence est quantifiée sur 10 000 événements comptabilisés par l'appareil, ceci pour chaque mesure.

3. Analyse quantitative de la fragmentation nucléaire

Les cellules tumorales, cultivées sur des lamelles fines de verre sont fixées dans du milieu de culture contenant une solution de paraformaldéhyde (PAF) à 4%, pendant 20 min à température ambiante. Après rinçage avec du D-PBS, les cellules fixées sont incubées pendant 5 min avec du HOECHST 33342 (Molecular Probes) dilué au 10 000ème dans du D-PBS. Le montage est réalisé en plaçant la lamelle sur une lame avec une goutte d'un liquide

de fixation (FluorSave, Calbiochem). Les lames sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence (Nikon) aux objectifs 40 et 100, équipé d'une caméra pour l'acquisition des images. Pour chaque expérience, 100 cellules ont été comptées.

VIII. MESURE DE L'ACTIVITE MITOCHONDRIALE, DU METABOLISME ENERGETIQUE ET DES DERIVES REACTIFS DE L'OXYGENE

1. Mesure de la consommation d'oxygène par polarographie

La consommation d'oxygène est mesurée à l'aide d'un instrument dédié à l'oxygraphie (Hansatech Instruments), équipé d'une électrode de Clark et sous exploitation informatique (Oxygraph Plus Software). L'électrode à oxygène est placée sous une chambre de mesure continuellement maintenue à 37°C.

Les cultures cellulaires, placées en boîtes 150 mm et à 80% de confluence, sont lavées au D-PBS, avant d'être resuspendues dans du milieu RPMI (10% de sérum) à 5×10^6 cellules/ml. Après calibration de l'électrode, les mesures de consommation d'oxygène sont réalisées sur les cellules non perméabilisées. Dans la chambre d'oxygraphie, 1 ml de la suspension cellulaire est déposé pour la mesure. Les cellules sont sous constante agitation grâce à la présence d'un agitateur magnétique. Les valeurs de consommation d'oxygène sont calculées en temps réel par le logiciel Oxygraph Plus et sont exprimées en $\text{nmol O}_2/\text{min}/10^6$ cellules.

Pour étudier l'activité de la chaîne respiratoire, les mesures de consommation d'oxygène « endogène » des cellules, sont réalisées en présence d'inhibiteurs de l'ATP synthase et d'un agent découplant. Après stabilisation des valeurs de consommation d'oxygène endogène, les cellules sont traitées dans la chambre de mesure avec 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'oligomycine (Sigma) et 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'atractyloside (Sigma), afin d'inhiber respectivement l'ATP synthase et l'échangeur ADP/ATP (ANT). Les mesures de consommation d'oxygène sont ensuite complétées par l'effet d'un agent découplant, le CCCP (Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenylhydroxyone, Sigma) ajouté à 500 nM. En dernier lieu, la sensibilité des cellules au KCN est vérifiée en ajoutant à la suspension cellulaire 1 mM de KCN (Sigma). L'efficacité du couplage de la chaîne respiratoire est déterminée en calculant le rapport de la

consommation d'oxygène endogène sur la consommation en présence d'inhibiteurs de l'ATPase.

2. Mesure du métabolisme énergétique

2.1. Dosage de l'ATP

Les mesures d'ATP cellulaire sont obtenues en utilisant un kit de dosage (ENLITEN[®] ATP Assay, Promega), basé sur la détection de bioluminescence (luciférase). Les étapes du protocole sont celles décrites dans la fiche d'instructions du fabricant. Brièvement, des culots de cellules (10^6 cellules) sont lysés dans un tampon de lyse contenant 1% d'acide trichloroacétique. Après lyse des cellules, l'acide trichloroacétique est neutralisé et dilué à 0,1% par addition d'un tampon Tris-acétate 250 mM pH 7,75. Les concentrations en protéines totales sont obtenues par dosage au Bradford. Chacun des échantillons est dilué au $10000^{\text{ème}}$ dont 5 μl est ajouté au mélange réactionnel contenant de la D-Luciférine. La luminescence générée est mesurée au luminomètre PerkinElmer Victor X3. La concentration en ATP, exprimée en nmoles d'ATP/mg de protéines, dans les échantillons, sont déterminée à partir d'une gamme étalon préalablement réalisée.

2.2. Dosage du Lactate

Un kit colorimétrique de dosage du lactate a été utilisé et repose sur le dosage d'un produit de réaction de la lactate déshydrogénase (L-Lactate Assay Kit Colorimetric, Abcam). Les mesures de lactate sont réalisées sur le milieu de culture de cellules ensemencées en plaque 96 puits à 2×10^4 cellules/puits. Après 48 heures de culture, le milieu de chaque puits est récupéré dont l'activité lactate déshydrogénase endogène est éliminée par filtrage sur colonne 10kDa (Vivacon 500, Sartorius).

Les milieux de culture sont dilués au $50^{\text{ème}}$ dans un tampon délivré dans le kit, dans un volume final de 50 μl . L'intégralité de la dilution est ajoutée à 50 μl d'un mélange réactionnel contenant les substrats et enzymes nécessaires à la réaction. La lecture en plaque 96 puits des valeurs d'absorbances (450nm) se réalise après une incubation de 30 min à température ambiante sur le lecteur de plaque VictorX3 (PerkinElmer). Les concentrations en lactate sont déduites d'une gamme étalon de concentrations connues en lactate. Parallèlement, les cellules sont lysées et les protéines extraites sont dosées par la méthode de Bradford. Les

concentrations en protéines totales sont déterminées pour chaque puits. Les résultats sont ainsi exprimés en μ mole de lactate/mg de protéines totales.

3. Mesure des dérivés réactifs de l'oxygène

3.1. *Par microscopie à fluorescence*

Les cellules sont cultivées à 70 % de confluence sur lamelle en verre. Après un lavage au D-PBS, les cellules sont incubées pendant 30 min avec 10 μ M de la sonde CM-H2DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluoresceïn diacetate) (Molecular Probes) à 37°C. Des contrôles négatifs sont réalisés en traitant les cellules 48 heures avant le marquage avec un antioxydant, la N-acétylcystéine (NAC). Après incubation de la sonde, les cellules sont lavées au D-PBS puis fixées au paraformaldéhyde avant d'être visualisées au microscope à fluorescence (Nikon) équipé d'une caméra pour l'acquisition des images.

3.2. *Par cytométrie en flux*

Les cellules sont collectées et lavées dans du D-PBS, avant d'être resuspendues dans un tampon physiologique (10 mM Hepes pH 7.4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) à raison de 2×10^6 cellules/ml. Une fraction de 100 μ l (2×10^5 cellules) de cette suspension est incubée avec 10 μ M de la sonde H2-DCFDA pendant 30 min à 37°C dans le noir. Avant analyse, les cellules sont lavées et resuspendues dans 300 μ l de tampon physiologique. L'analyse de l'intensité de fluorescence s'effectue à l'aide d'un cytomètre FACSCalibur (BD) couplé au logiciel CellQuest sur 10 000 cellules.

IX. ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats présentés correspondent à la moyenne issue d'au moins trois expériences indépendantes. Ils sont exprimés par la moyenne \pm la déviation standard. Pour les courbes de survie, les analyses statistiques sont réalisées en calculant le log-rank test (Mantel-Cox test) entre les courbes CTL vs DDB2 pour une même dose de traitement. Pour le reste, les valeurs de significativité sont calculées en utilisant le test t de student pour deux échantillons indépendants. Les tests statistiques sont effectués sur le logiciel d'analyse des données GraphPad Prism v5. La valeur-p pour chaque test de comparaison est calculée et les résultats sont considérés statistiquement significatifs pour un $p < 0,05$.

RESULTATS

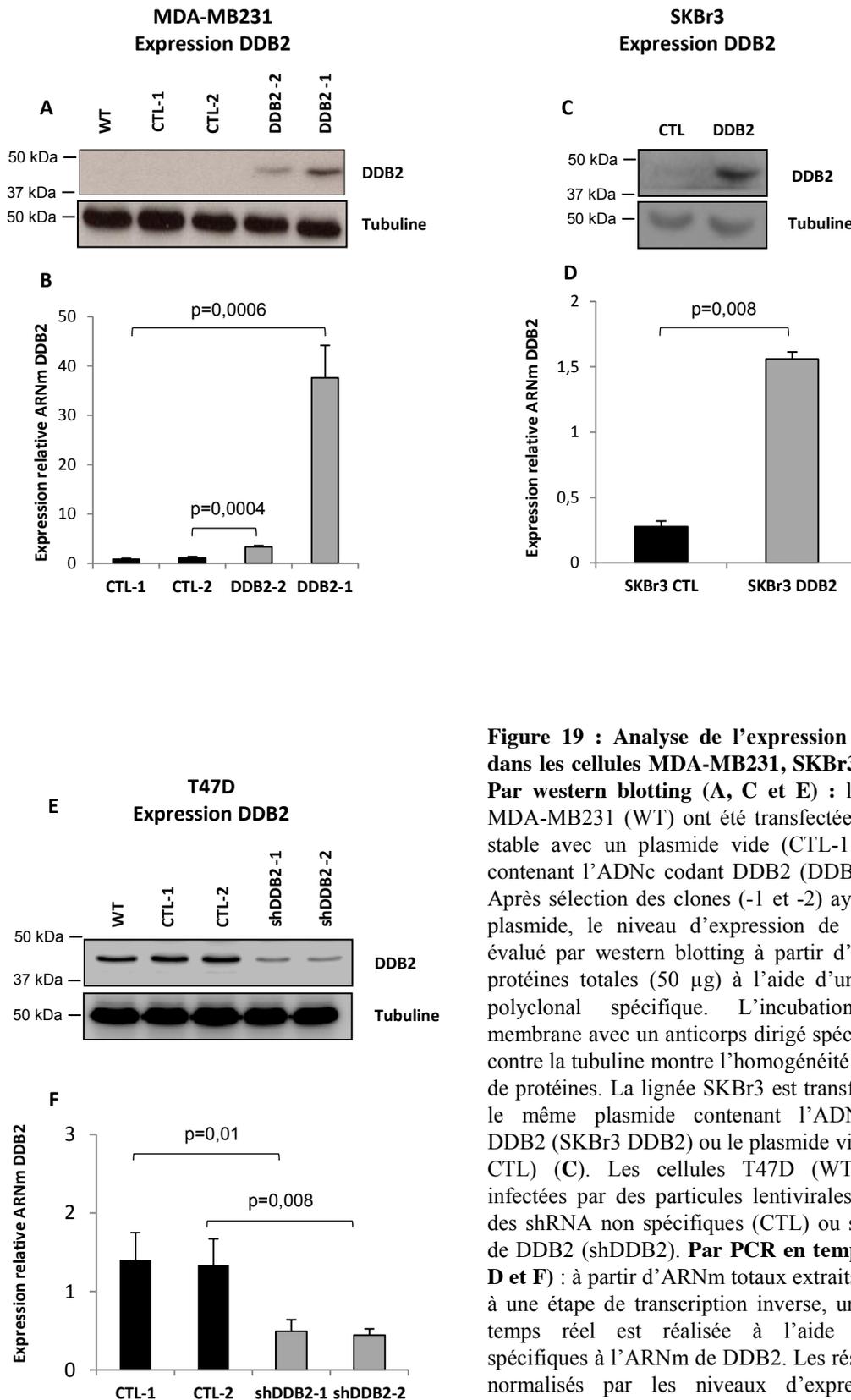


Figure 19 : Analyse de l'expression de DDB2 dans les cellules MDA-MB231, SKBr3 et T47D. Par western blotting (A, C et E) : les cellules MDA-MB231 (WT) ont été transfectées de façon stable avec un plasmide vide (CTL-1 et -2) ou contenant l'ADNc codant DDB2 (DDB2-1 et -2). Après sélection des clones (-1 et -2) ayant reçu le plasmide, le niveau d'expression de DDB2 est évalué par western blotting à partir d'extraits de protéines totales (50 µg) à l'aide d'un anticorps polyclonal spécifique. L'incubation de la membrane avec un anticorps dirigé spécifiquement contre la tubuline montre l'homogénéité des dépôts de protéines. La lignée SKBr3 est transfectée avec le même plasmide contenant l'ADNc codant DDB2 (SKBr3 DDB2) ou le plasmide vide (SKBr3 CTL) (C). Les cellules T47D (WT) ont été infectées par des particules lentivirales contenant des shRNA non spécifiques (CTL) ou spécifiques de DDB2 (shDDB2). **Par PCR en temps réel (B, D et F) :** à partir d'ARNm totaux extraits et soumis à une étape de transcription inverse, une PCR en temps réel est réalisée à l'aide d'amorces spécifiques à l'ARNm de DDB2. Les résultats sont normalisés par les niveaux d'expression des ARNm de UBB et RPLPO et correspondent à la moyenne issue de trois expériences indépendantes ± la déviation standard. Les différences entre les cellules CTL et DDB2/shDDB2 sont significatives pour un $p < 0,05$.

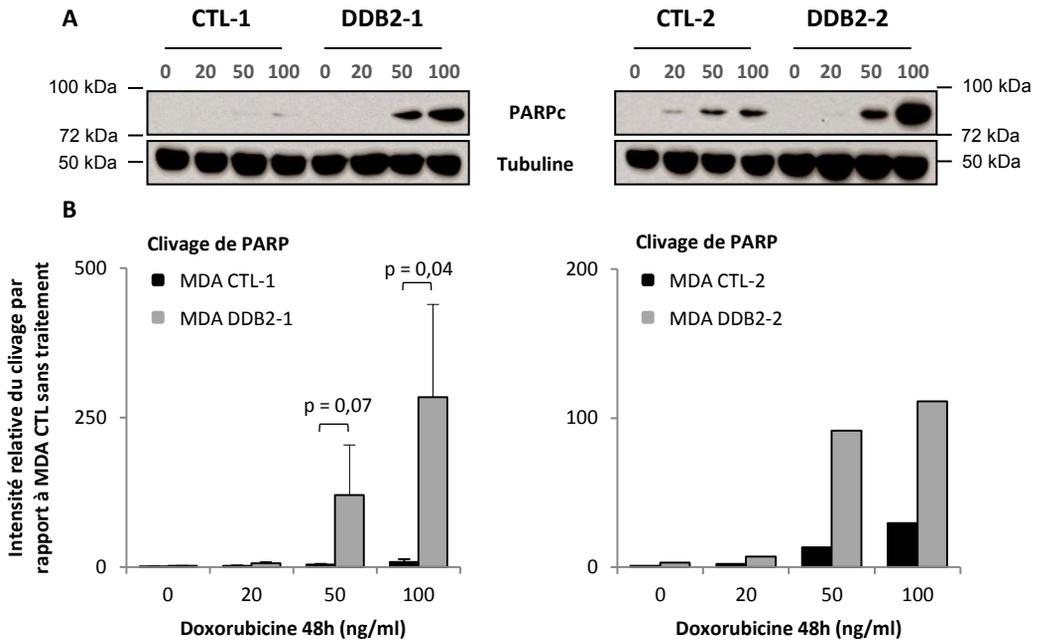
RESULTATS

I. INFLUENCE DE LA PROTEINE DDB2 SUR LA REPOSE DES CELLULES TUMORALES MAMMAIRES AUX AGENTS ANTICANCEREUX

1. Présentation des modèles cellulaires dans lesquels l'expression de DDB2 a été modulée expérimentalement

Afin de montrer l'influence de l'expression de DDB2 sur la réponse des cellules tumorales mammaires aux agents anticancéreux, nous avons travaillé sur deux lignées (MDA-MB-231 et SK-BR-3) exprimant très faiblement DDB2 et une lignée qui la surexprime naturellement (T47D), pour lesquelles cette expression a été modulée expérimentalement. La surexpression a été obtenue après transfection d'un plasmide contenant l'ADNc codant DDB2 et portant un gène de sélection, au cours d'un travail précédent dans le laboratoire (Ennen et al., 2013; Kattan et al., 2008a). Après une sélection en fonction du niveau d'expression de DDB2, deux clones cellulaires sont obtenus et appelés MDA-MB-231 DDB2-1 et DDB2-2. Le clone DDB2-1 est celui qui présente un niveau de transcrits et de protéine DDB2 le plus élevé (**Figure 19A et B**). Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec les cellules dites contrôles, CTL-1 et CTL-2, transfectées avec le plasmide vide et qui, comme les cellules sauvages (WT), ne possèdent pas un niveau d'expression détectable de la protéine DDB2 par western-blot. Nous avons également développé et sélectionné un modèle de cellules SK-BR-3 qui surexprime DDB2 (DDB2 SK-BR-3), comparé aux cellules n'exprimant pas DDB2 et transfectées avec le plasmide vide (SK-BR-3 CTL) (**Figure 19C et D**).

**Doxorubicine – MDA-MB231
(ng/ml) pendant 48h**



**Doxorubicine – MDA-MB231
(heures) à 50 ng/ml**

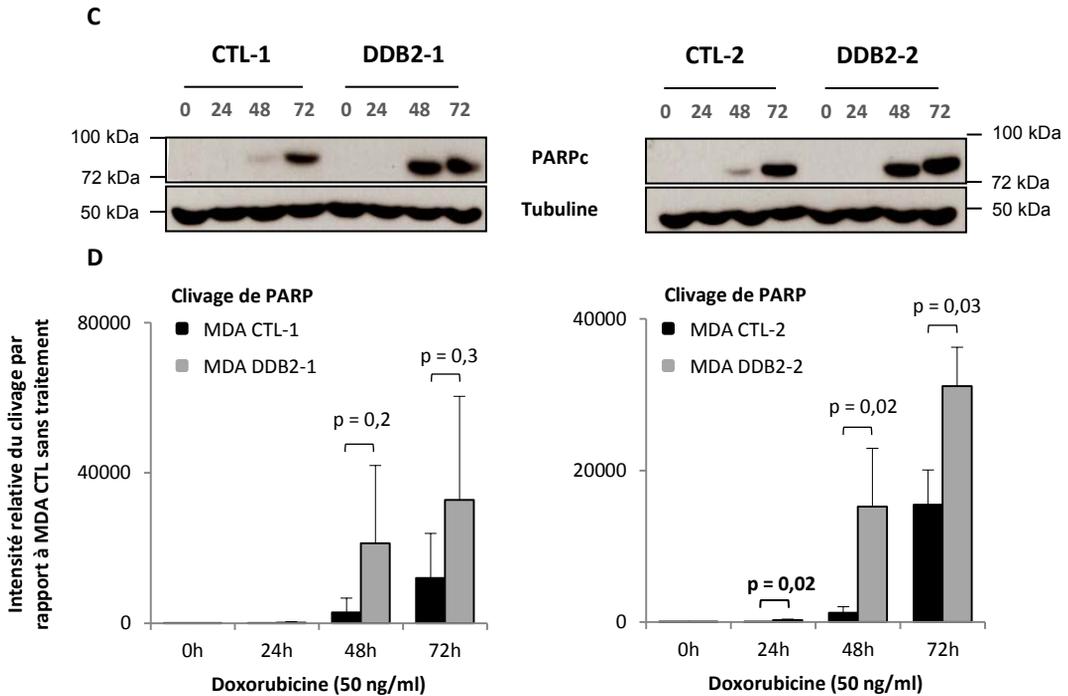


Figure 20 : Analyse par western-blotting du clivage de PARP après traitements à la doxorubicine selon l'expression de DDB2 dans les cellules MDA-MB231. La forme clivée de PARP est détectée par western blotting à l'aide d'un anticorps spécifique dans les extraits de protéines totales (50 µg) provenant de cellules contrôles (CTL-1 et -2) ou surexprimant DDB2 (DDB2-1 et -2) qui ont été traitées avec différentes concentrations de doxorubicine pendant 48 heures (A). La même expérience est réalisée après un traitement à différents temps avec 50 ng/ml de doxorubicine (C). L'incubation de la membrane avec un anticorps dirigé contre la tubuline révèle la quantité de protéines déposées. Les valeurs d'intensité des bandes de la forme clivée de PARP détectées sont réalisées par densitométrie et normalisées par l'intensité des bandes de la tubuline. Les histogrammes **B** et **D** représentent la moyenne de l'intensité de clivage issue de trois expériences indépendantes ± la déviation standard (excepté pour l'analyse CTL-2 vs DDB2-2 en B, qui porte sur la moyenne de deux expériences indépendantes). Les différences entre les cellules CTL et DDB2 sont significatives pour un $p < 0,05$.

A partir des cellules T47D parentales, nous avons inhibé l'expression de DDB2 par la stratégie d'ARN interférence, en utilisant des particules lentivirales contenant des shRNA (small hairpin RNA) dirigés contre l'ARNm correspondant et un gène de sélection à la puromycine. Deux clones, provenant de deux infections lentivirales différentes, ont été isolés et appelés shDDB2-1 et shDDB2-2. Des cellules contrôles (CTL-1 et CTL-2), contenant des shRNA non spécifiques, ont également été sélectionnées, à partir de deux infections différentes. Le niveau d'expression de DDB2 a été analysé par western-blot et RT-qPCR afin d'évaluer l'efficacité de l'ARN interférence dans ces cellules (**Figure 19E et F**). Les cellules T47D shDDB2 ont un taux de transcrits et de protéine DDB2 diminué d'au moins 50% par rapport aux cellules contrôles (CTL). Ces dernières conservent quant à elles, un niveau d'expression de DDB2 proche des cellules sauvages.

2. Effet de la protéine DDB2 sur la sensibilité *in vitro* des cellules tumorales mammaires aux agents anticancéreux

La sensibilité des lignées MDA-MB-231, SK-BR-3 et T47D à la doxorubicine, au 5-Fluorouracile (5-FU) et au paclitaxel, selon l'expression de DDB2, a été étudiée par différentes méthodes permettant d'évaluer l'induction de l'apoptose à différentes étapes, telles que la détection de la forme clivée de la protéine PARP par western-blot, la quantification de la fragmentation nucléaire par microscopie à épifluorescence et le marquage des cellules apoptotiques à l'annexine V.

2.1. Effet sur la sensibilité à la doxorubicine

Dans un premier temps, la sensibilité à la doxorubicine des cellules MDA-MB-231 a été évaluée après une exposition des cellules à plusieurs concentrations différentes (ng/ml) d'agent anticancéreux (20, 50 et 100 ng/ml) pendant 48 heures. La forme clivée de la protéine PARP en deux fragments de 85 kDa et 30 kDa par la caspase-3 activée au cours de l'apoptose, est détectée par Western blot (**Figure 20A**). Les résultats obtenus sur les deux clones CTL et DDB2 indiquent que le clivage de PARP est beaucoup plus important dans les cellules surexprimant DDB2, par rapport aux cellules contrôles après traitement à la doxorubicine, dès 50 ng/ml. Les intensités des bandes marquées sont mesurées par densitométrie et comparées entre les cellules MDA CTL et MDA DDB2 (**Figure 20B**).

Dans un 2^{ème} temps, nous avons évalué la sensibilité des cellules lorsque celles-ci sont exposées à différents temps à la concentration de 50 ng/ml de doxorubicine. (**Figure 20C et D**). Les résultats indiquent que la forme clivée de PARP est détectée plus précocement dès 48h de traitement, dans les cellules MDA-MB-231 surexprimant DDB2 que dans les cellules contrôles.

Ces résultats ont été confirmés par une 2^{ème} méthode, consistant à compter en microscopie à fluorescence après coloration au Hoechst, le nombre de cellules présentant une fragmentation de leur noyau, étape tardive de l'apoptose, après traitement à la doxorubicine. En absence de traitement, la morphologie des noyaux est régulière dans les deux types cellulaires CTL et DDB2 (**Figure 21A**). Seulement 10 à 13% de cellules contrôles et surexprimant DDB2 présentent des noyaux fragmentés, indiquant ainsi le pourcentage d'apoptose spontanée (**Figure 21B**). Après un traitement de 72 heures à 50 ng/ml de doxorubicine, nous observons une différence significative entre les cellules qui surexpriment la protéine DDB2 (DDB2-1) et les cellules contrôles (CTL-1). En effet, l'exposition à la doxorubicine entraîne une fragmentation nucléaire importante dans 33% des cellules DDB2-1, au lieu des 22% dans les cellules CTL-1.

Enfin nos résultats ont été confirmés par une 3^{ème} méthode, qui a consisté à évaluer le nombre de cellules apoptotiques se retrouvant marquées à l'annexine V couplée à un fluorochrome (FITC), par cytométrie en flux, après une exposition à la doxorubicine. Ces expériences ont été réalisées sur les cellules CTL-1 et DDB2-1 exposées à 50 ng/ml de doxorubicine durant 24, 48 et 72 heures, puis marquées à l'Annexine V-FITC. Nos résultats indiquent que les cellules DDB2-1 présentent 22% et 30% de cellules apoptotiques contre 9% et 15% pour les cellules CTL, après respectivement, 24 et 48 heures de traitement avec 50 ng/ml de doxorubicine. Cette différence reste significative après 72h de traitement, avec 37% pour les cellules surexprimant DDB2 contre 22% pour les cellules contrôles (**Figure 22**).

Comme le suggère nos résultats, la protéine DDB2 semble donc augmenter significativement la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 à la doxorubicine, par l'apoptose induite.

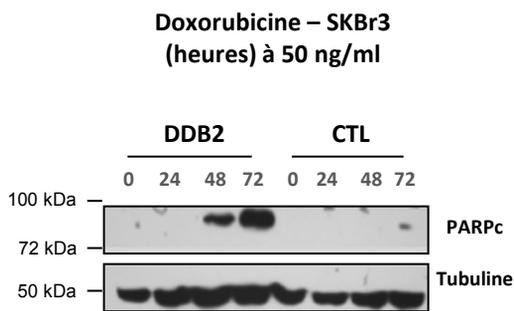


Figure 23 : Influence de la protéine DDB2 sur la sensibilité à la doxorubicine des cellules cancéreuses mammaires SKBr3 par analyse du clivage de PARP. La forme clivée de PARP est détectée par western blotting à l'aide d'un anticorps spécifique dans les extraits de protéines totales (50 µg) provenant des cellules contrôles (CTL) ou surexprimant DDB2 (DDB2) traitées avec 50 ng/ml de doxorubicine à différents temps. La figure est représentative de trois expériences réalisées de façon indépendantes sur 3 extraits protéiques différents.

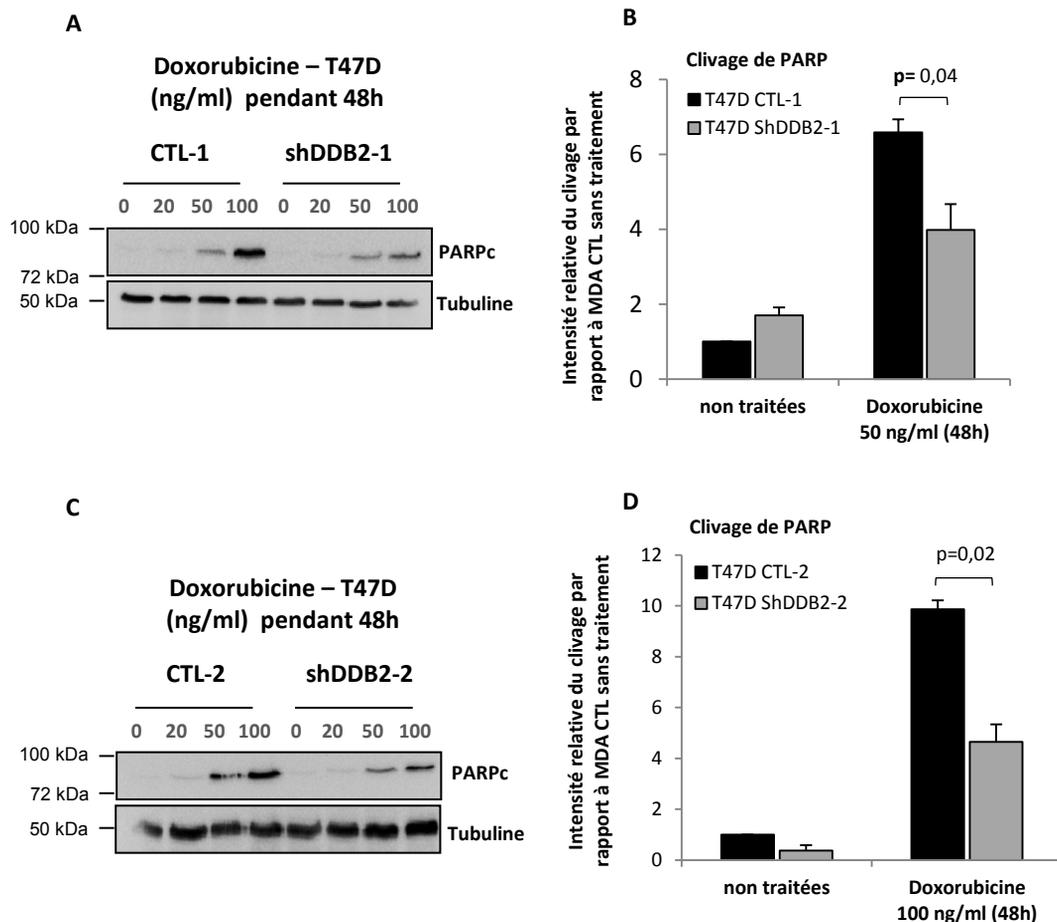


Figure 24 : Influence de la protéine DDB2 sur la sensibilité à la doxorubicine des cellules cancéreuses mammaires T47D par analyse du clivage de PARP. Les cellules T47D contrôles (CTL) ou shDDB2, dont l'expression de DDB2 est inhibée, sont traitées avec différentes doses de doxorubicine. Le clivage de PARP est évalué par western blotting sur des extraits protéiques (50 µg), à l'aide d'un anticorps spécifique (A et C). L'homogénéité des dépôts est contrôlée par immunodétection de la tubuline. Les valeurs d'intensité des bandes de la forme clivée de PARP détectées sont réalisées par densitométrie et normalisées par l'intensité des bandes de la tubuline. Les histogrammes B et D représentent la moyenne de l'intensité de clivage issue de trois expériences indépendantes ± la déviation standard. Les différences entre les cellules CTL et shDDB2 sont significatives pour un $p < 0,05$.

Afin de conforter nos observations, l'influence de DDB2 sur la réponse à la doxorubicine a été également vérifiée sur les cellules SK-BR-3 parentales qui n'expriment pas DDB2, et sur celles qui la surexpriment après transfection stable avec un plasmide contenant l'ADNc qui code la protéine. La **Figure 23** montre que dans les cellules SK-BR-3 surexprimant DDB2 le clivage de PARP est plus soutenu que dans les cellules contrôles CTL après un traitement avec 50 ng/ml de doxorubicine durant 48 et 72 heures.

Inversement, l'inhibition de l'expression constitutive de DDB2 dans les cellules T47D shDDB2-1 et shDDB2-2 entraîne une baisse du clivage de PARP induit après traitement à la doxorubicine par rapport aux cellules contrôles (CTL-1 et CTL-2), comme le montre le Western blot et les quantifications densitométriques correspondantes du clivage de PARP (**Figure 24**).

**5 Fluorouracile – MDA-MB-231
(μM) pendant 72h**

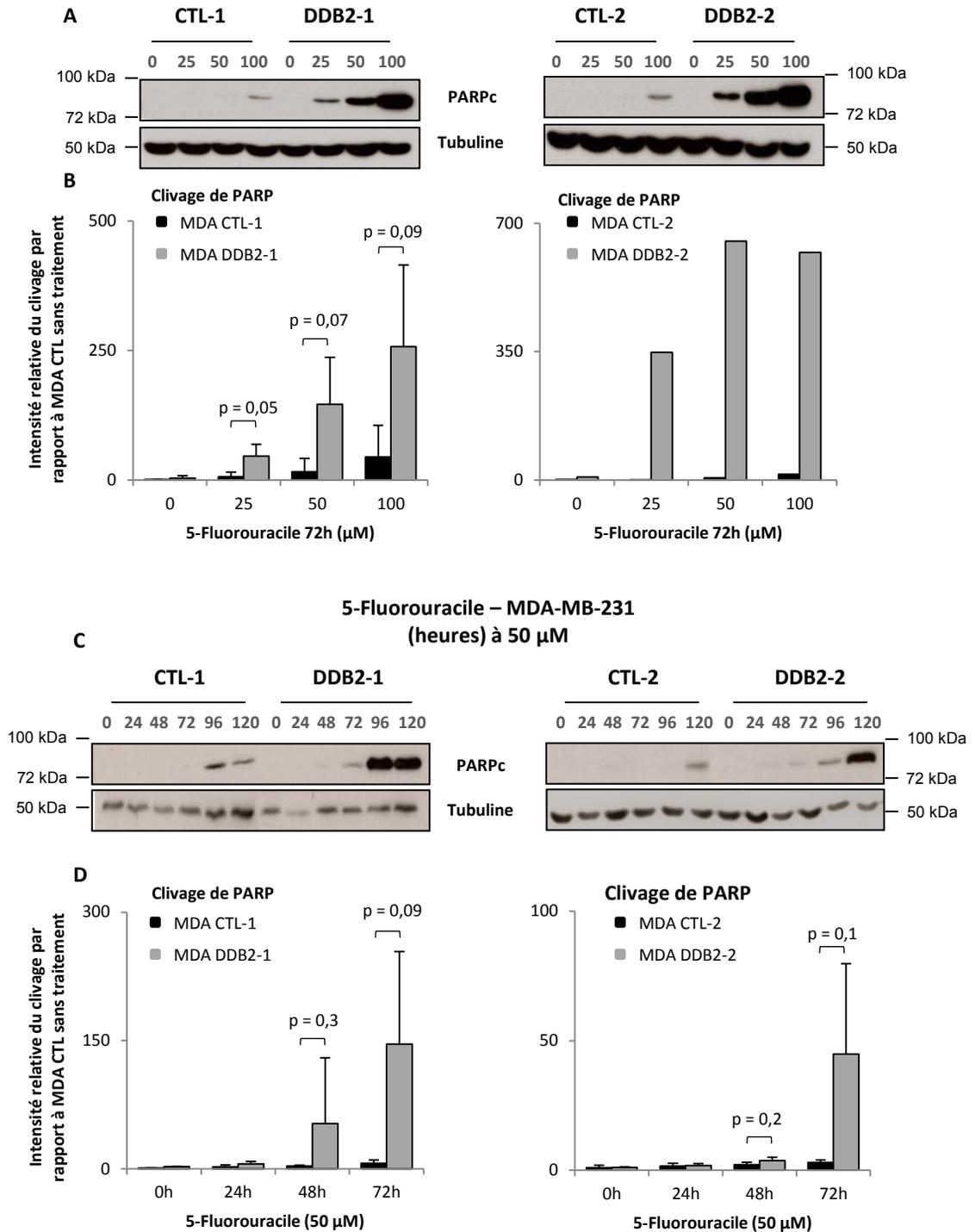


Figure 25 : Analyse par western-blotting du clivage de PARP après traitements au 5-FU selon l'expression de DDB2 dans les cellules MDA-MB231. La forme clivée de PARP est détectée par western blotting à l'aide d'un anticorps spécifique dans les extraits de protéines totales (50 μg) provenant des cellules contrôles (CTL-1 et -2) ou surexprimant DDB2 (DDB2-1 et -2) traitées avec différentes concentrations de 5-FU pendant 72 heures (A). La même expérience est réalisée après un traitement à différents temps avec 50 μM de 5-FU (C). L'incubation de la membrane avec un anticorps dirigé contre la tubuline révèle la quantité de protéines déposées. Les valeurs d'intensité des bandes de la forme clivée de PARP détectées sont réalisées par densitométrie et normalisées par l'intensité des bandes de la tubuline. Les histogrammes B et D représentent la moyenne de l'intensité de clivage issue de trois expériences indépendantes \pm la déviation standard (excepté pour l'analyse CTL-2 vs DDB2-2 en B, qui porte sur la moyenne de deux expériences indépendantes). Les différences entre les cellules CTL et DDB2 sont significatives pour un $p < 0,05$.

2.2. *Effet sur la sensibilité au 5-Fluorouracile*

L'influence de DDB2 sur la sensibilité des cellules MDA-MB-231 au 5-Fluorouracile (5-FU) a été étudiée également à l'aide des 3 méthodes permettant d'évaluer l'apoptose induite, comme précédemment. Après une exposition à différentes concentrations de 5-FU (25, 50 ou 100 μ M) pendant 72 heures. Les résultats de détection du clivage de PARP obtenus par western-blot, montrent un gain de clivage dans les cellules surexprimant DDB2 par rapport aux cellules CTL (**figure 25A et B**). Le clivage de PARP est ainsi observé à la fois dès 25 μ M de 5-FU dans toutes les cellules surexprimant DDB2. La forme clivée de PARP est également détectée dès 72 heures de traitement avec 50 μ M dans les cellules MDA DDB2, contrairement aux cellules MDA CTL (**Figure 25C et D**).

Ces résultats sont confirmés par l'étude de la fragmentation nucléaire observée après une exposition à 50 μ M de 5-FU durant 96 heures. Après un traitement au 5-FU, 34% des cellules DDB2-1 présentent une fragmentation de leur noyau, alors qu'elles ne sont que 18% dans les cellules CTL-1 (**Figure 26**). L'analyse par cytométrie en flux des cellules marquées à l'annexine V après traitement au 5-FU, montre des différences significatives entre les cellules DDB2-1 et CTL-1. Dès 48 heures de traitement avec 50 μ M, nous observons 16% de cellules DDB2-1 marquées à l'annexine V contre 7% pour les cellules CTL-1. Cette différence s'accroît à partir de 72 heures pour atteindre 37% de cellules DDB2-1 marquées à l'annexine V après 96 heures de traitement, contre seulement 11 % de cellules CTL-1 (**Figure 27**).

Inversement, l'inhibition de l'expression constitutive de DDB2 rend les cellules T47D shDDB2-1 et shDDB2-2 plus sensibles au 5-FU que les cellules contrôles (CTL-1 et CTL-2), Les cellules ont été traitées durant 72 heures avec 25, 50 et 100 μ M de 5-FU. Pour chacune des doses utilisées, le clivage de PARP est systématiquement plus faible dans les cellules T47D shDDB2 par rapport aux cellules contrôles (**Figure 28**). Une diminution de l'expression de DDB2 dans les cellules T47D s'accompagne donc d'une baisse de la sensibilité de ces cellules au 5-FU.

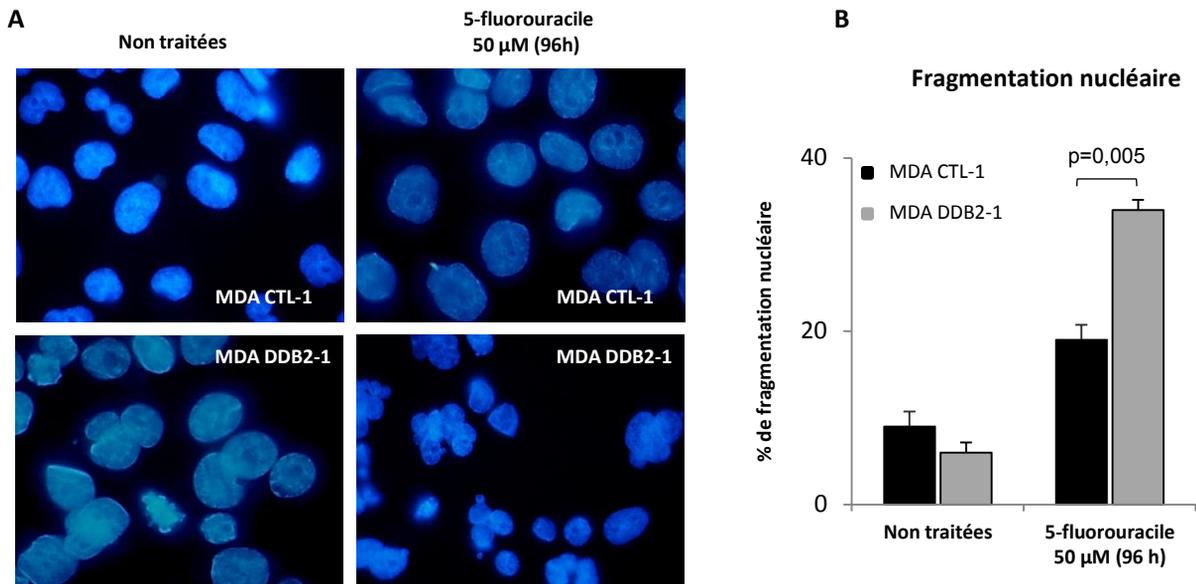


Figure 26 : Analyse de l'apoptose induite par le 5-fluorouracile par évaluation de la fragmentation nucléaire dans les cellules MDA-MB231 surexprimant ou non DDB2. Après un traitement à la doxorubicine (72 heures avec 50 ng/ml), les cellules sont fixées puis leurs noyaux colorés au Hoescht (A). Le pourcentage de noyaux fragmentés, caractéristiques des cellules apoptotiques, est obtenu après comptage de 100 cellules par expérience au microscope à fluorescence (grossissement X400) (B). Les résultats présentés correspondent à la moyenne issue de trois expériences indépendantes \pm la déviation standard. Les différences entre les cellules CTL et DDB2 sont significatives pour un $p < 0,05$.

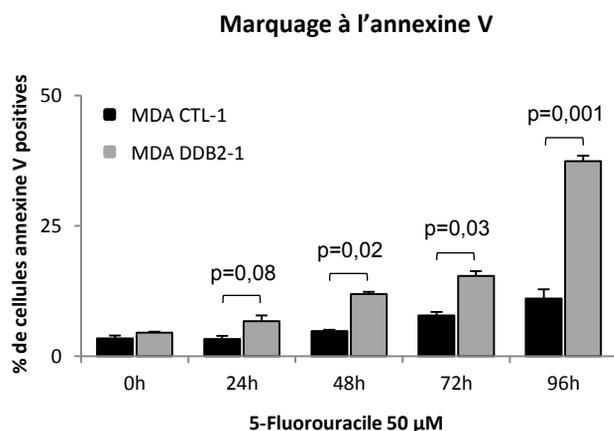


Figure 27 : Analyse de l'apoptose induite par le 5-fluorouracile par marquage à l'annexine V des cellules MDA-MB231 surexprimant ou non DDB2. Les cellules sont traitées avec 50 μ M de 5-fluorouracile. Le pourcentage de cellules apoptotiques, marquées à l'annexine V est obtenu par cytométrie en flux. Les résultats présentés correspondent à la moyenne issue de trois expériences indépendantes \pm la déviation standard. Les différences entre les cellules CTL et DDB2 sont significatives pour un $p < 0,05$.

2.3. *Effet sur la sensibilité au paclitaxel*

Nous avons analysé la conséquence d'une surexpression de DDB2 sur la sensibilité des cellules tumorales mammaires MDA-MB-231 traitées pendant 48 heures à différentes doses de paclitaxel, un autre agent thérapeutique fréquemment utilisé dans le traitement des cancers du sein. Les résultats présentés en **figure 29**, montrent que quelles que soient les doses utilisées ou le temps de traitement, le clivage de la protéine PARP est identique entre les deux types cellulaires.

L'ensemble des résultats obtenus suggèrent fortement que DDB2 augmente la sensibilité à la doxorubicine et au 5-FU, par l'induction de l'apoptose observée, quel que soit les lignées de cellules tumorales mammaires utilisées. Cependant, aucune différence n'est observée quant à la sensibilité des cellules tumorales au paclitaxel selon l'expression de DDB2.

3. **Effet de la protéine DDB2 sur la sensibilité *in vivo* des cellules tumorales mammaires aux agents anticancéreux**

Par une approche *in vivo*, nous avons vérifié l'influence de DDB2 sur la sensibilité de tumeurs xéno greffées chez la souris *nude* à la doxorubicine et au 5-FU. Les tumeurs sont formées après injection sous-cutanée de cellules MDA-MB-231 CTL-1 ou DDB2-1. Les souris xéno greffées ont reçu un traitement à la doxorubicine à raison de 10 et 15 mg/kg (doses finales) durant 2 semaines ou au 5-FU (120 mg/kg ou 240 mg/kg en doses finales), lorsque le volume des tumeurs a atteint 200 à 300mm³. La croissance des tumeurs a été suivie trois fois par semaine afin d'établir une courbe de survie pour chaque souris dès le début du traitement des tumeurs MDA-MB-231 contrôle (CTL) et surexprimant DDB2 (DDB2). Les résultats sont comparés aux courbes de survie obtenues en suivant la croissance des tumeurs portées par le groupe de souris non traitées. Les mesures obtenues sont présentées comme le pourcentage de tumeur ayant un volume inférieur à 5 fois le volume initial en fonction du temps, dès le début des traitements. Ainsi, les résultats montrent que les tumeurs surexprimant DDB2 présentent un retard de croissance plus important que les tumeurs contrôles, quels que soient le traitement et la dose utilisée (**Figures 30 et 31**), venant conforter les résultats obtenus *in vitro* avec ces deux agents anticancéreux.

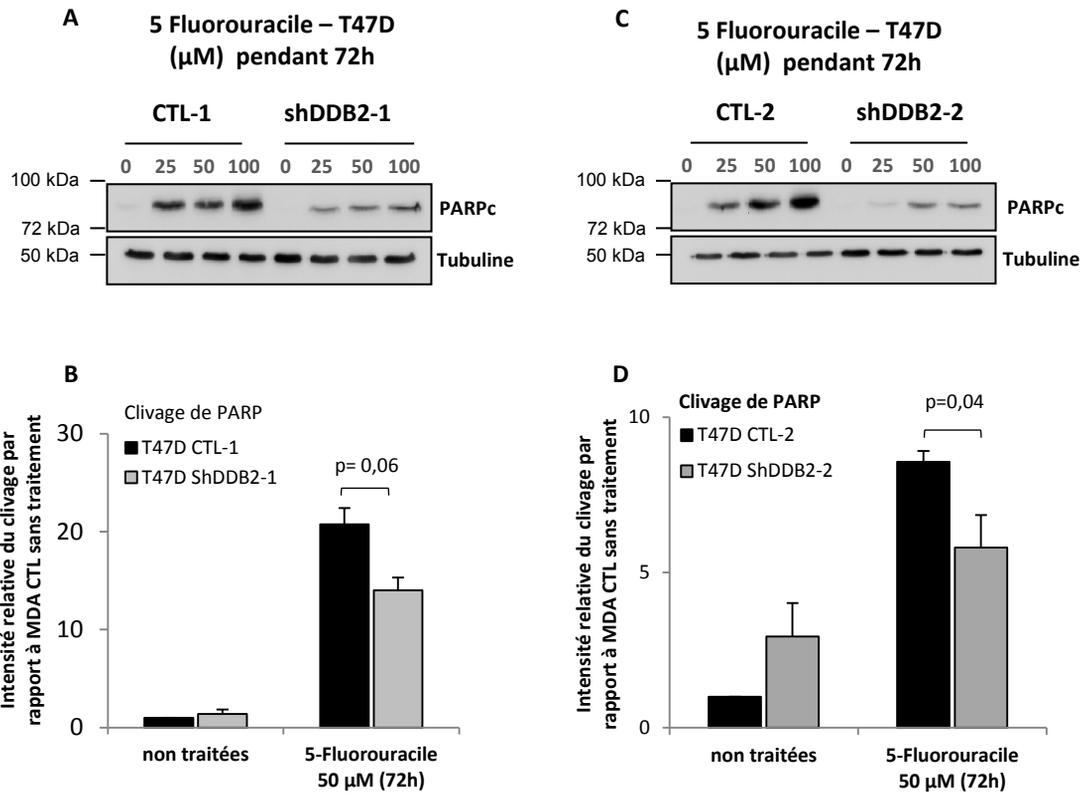


Figure 28 : Influence de la protéine DDB2 sur la sensibilité au 5-fluorouracile des cellules cancéreuses mammaires T47D. Les cellules T47D contrôles (CTL) ou shDDB2, dont l'expression de DDB2 est inhibée, sont traitées avec différentes doses de 5-fluorouracile. Le clivage de PARP est évalué par western blotting sur des extraits protéiques (50 μg), à l'aide d'un anticorps spécifique (A et C). L'homogénéité des dépôts est contrôlée par immunodétection de la tubuline. Les valeurs d'intensité des bandes de la forme clivée de PARP détectées sont réalisées par densitométrie et normalisées par l'intensité des bandes de la tubuline. Les histogrammes B et D représentent la moyenne de l'intensité de clivage issue de trois expériences indépendantes ± la déviation standard. Les différences entre les cellules CTL et shDDB2 sont significatives pour un $p < 0,05$.

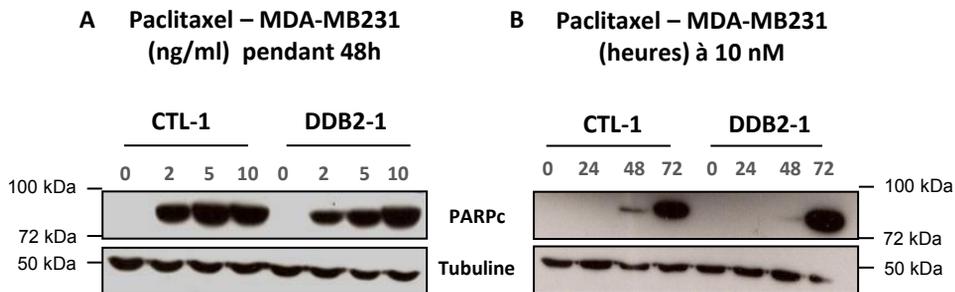


Figure 29 : Analyse par western-blotting du clivage de PARP après traitements au paclitaxel selon l'expression de DDB2 dans les cellules MDA-MB231. La forme clivée de PARP est détectée par western blotting à l'aide d'un anticorps spécifique dans les extraits de protéines totales (50 μg) provenant des cellules contrôles (CTL-1) ou surexprimant DDB2 (DDB2-2) traitées avec différentes concentrations de paclitaxel pendant 48 heures (A). La même expérience est réalisée après un traitement à différents temps avec 10 nM de paclitaxel (B). Les figures sont représentatives de trois expériences réalisées de façon indépendante.

4. Influence de la protéine DDB2 sur le pouvoir apoptogène du TNF α

Les dommages provoqués par la doxorubicine et le 5-FU sur les cellules cancéreuses mammaires sont de natures différentes mais ciblent conjointement l'ADN. Afin de vérifier si l'influence de DDB2 sur la réponse des cellules cancéreuses mammaires aux agents thérapeutiques ne dépend pas de son activité connue dans la réparation de l'ADN, nous avons testé l'effet apoptogène d'une cytokine, le TNF α , connue pour activer spécifiquement la voie extrinsèque de l'apoptose en se fixant sur les récepteurs de mort à la surface des cellules, sans induire de lésions géniques. Les cellules MDA-MB-231 et SK-BR-3 ont été traitées par cet agent avec différentes doses (10 et 25 ng/ml) pendant 12 heures, ou à 10 ng/ml pendant 12, 24, 48 heures. L'effet apoptogène du TNF α a été évalué en détectant le clivage de la protéine PARP par western-blot. Les **figures 32** et **33** montrent que, le clivage de la protéine PARP est nettement plus important dans les cellules cancéreuses mammaires surexprimant DDB2 que dans les cellules contrôles, après traitement avec le TNF α . Ces résultats suggèrent donc que la protéine DDB2, lorsqu'elle est surexprimée, entraîne les cellules MDA-MB-231 et SK-BR-3 vers l'apoptose probablement d'une façon indépendante de son activité dans la réparation de l'ADN.

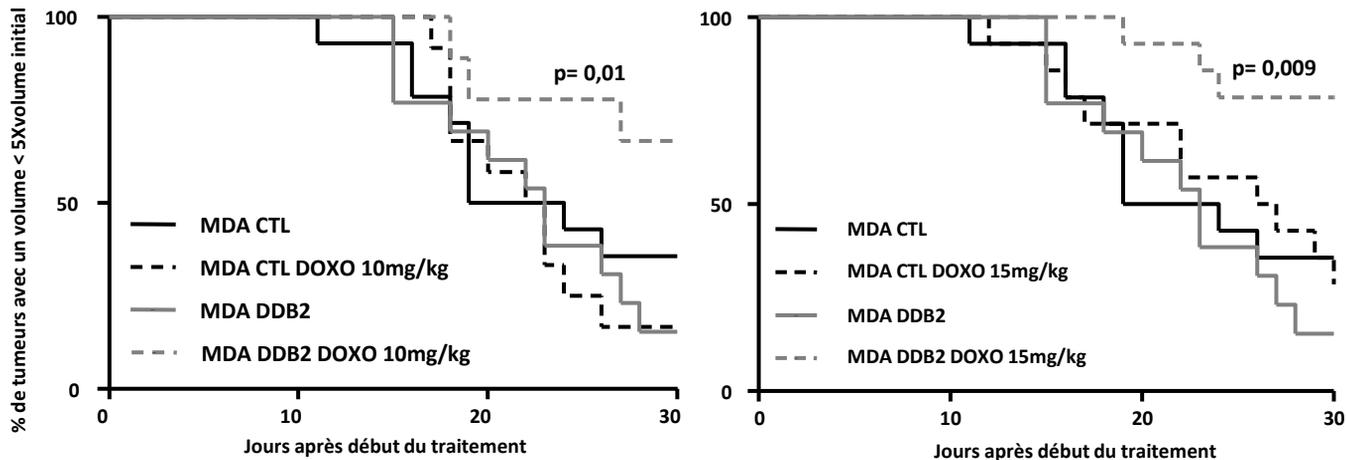


Figure 30 : Courbe de survie ou de Kaplan Meyer réalisées en mesurant le volume des tumeurs après traitement à la Doxorubicine. Des souris *Nude* sont xéno greffées avec des fragments tumoraux MDA-MB-231 surexprimant DDB2 (MDA DDB2) ou non (MDA CTL). Les animaux sont ensuite traités à la doxorubicine (10mg/kg ou 15mg/kg) à raison de 2 injections par semaine (pendant 2 semaines). Au démarrage des traitements, le volume des tumeurs est mesuré périodiquement pendant 30 jours. n= 10 à 15 tumeurs par groupe. Les significativités sont calculées par le test de comparaison des courbes de survies, log-rank (Mantel-Cox) (MDA DDB2 vs MDA DDB2 DOXO).

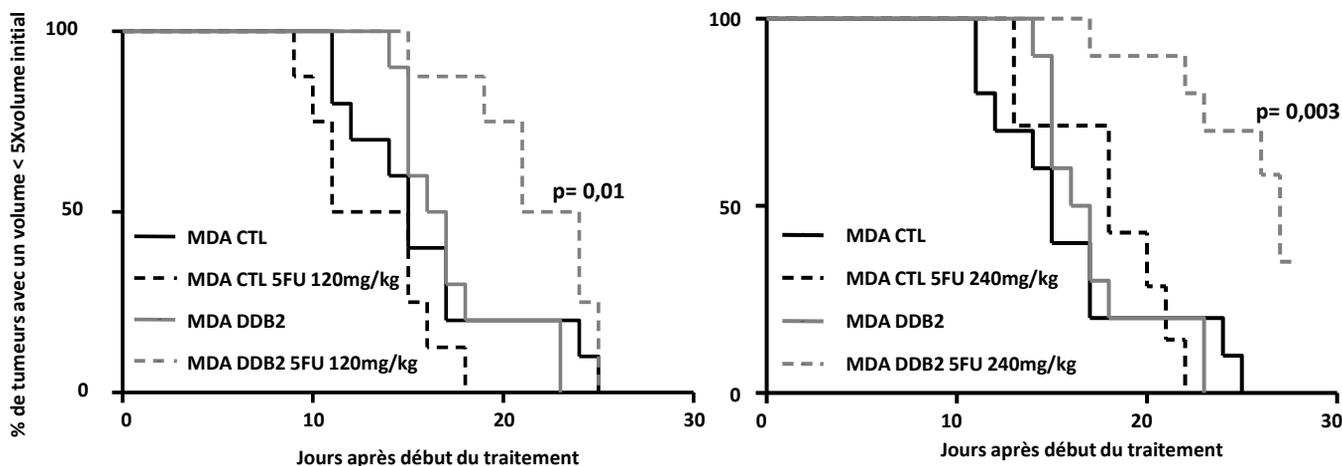


Figure 31 : Courbe de survie ou de Kaplan Meyer réalisées en mesurant le volume des tumeurs après traitement au 5-Fluorouracile. Des souris *Nude* sont xéno greffées avec des extraits tumoraux MDA-MB-231 surexprimant DDB2 (MDA DDB2) ou non (MDA CTL). Les animaux sont ensuite traités au 5-Fluorouracile (120mg/kg ou 240mg/kg) à raison de 2 injections par semaine (pendant 2 semaines). Au démarrage des traitements le volume des tumeurs est mesuré périodiquement pendant 30 jours. n= 8 à 10 tumeurs par groupe. Les significativités sont calculées par le test de comparaison des courbes de survies, log-rank (Mantel-Cox) (MDA DDB2 vs MDA DDB2 5FU).

5. Conclusion

Nos travaux ont permis de mettre en évidence que la protéine DDB2 lorsqu'elle est surexprimée dans les cellules cancéreuses mammaires permet d'augmenter l'apoptose induite par la doxorubicine et le 5-FU. De manière cohérente, dans des cellules cancéreuses mammaires qui expriment naturellement DDB2, une diminution de l'expression de cette protéine, s'accompagne d'une baisse de la sensibilité des cellules aux agents anticancéreux. Cette sensibilité accrue est observée dans trois lignées cancéreuses mammaires différentes *in vitro* et a été confirmée également *in vivo*. Par ailleurs, cette sensibilité accrue des cellules surexprimant DDB2 à rentrer en apoptose est également observée au cours d'un traitement au TNF α . L'effet chimiosensibilisant de cette protéine ne semble toutefois pas s'étendre au paclitaxel, dans nos conditions expérimentales.

TNF α – MDA-MB231

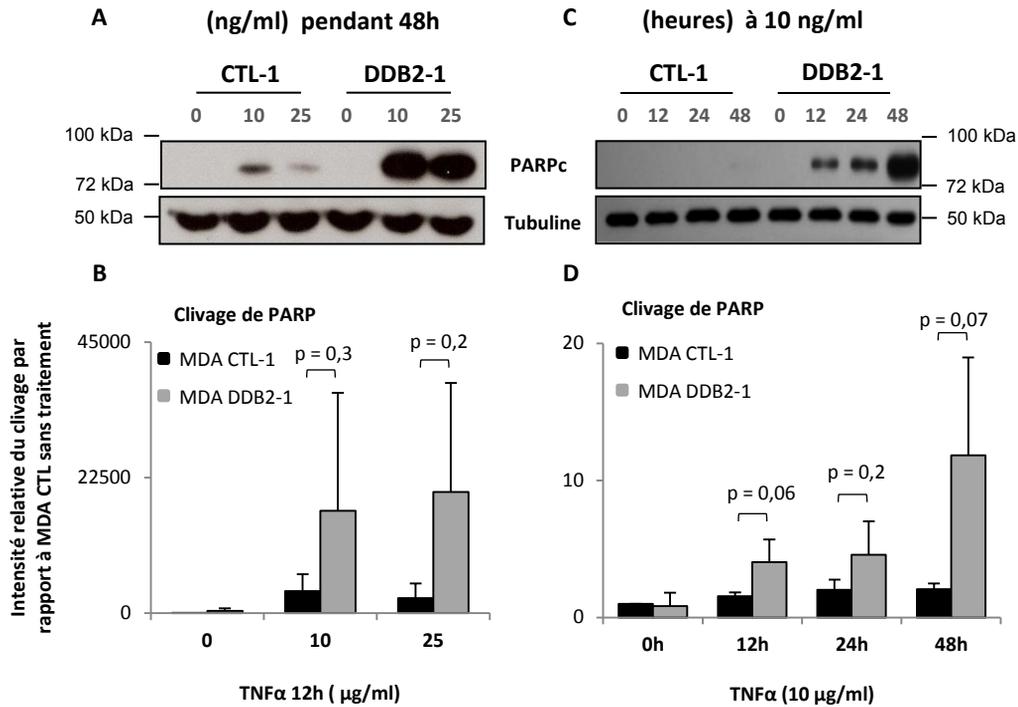


Figure 32 : Analyse par western-blotting du clivage de PARP après traitements au TNF α selon l'expression de DDB2 dans les cellules MDA-MB231. La forme clivée de PARP est détectée par western blotting à l'aide d'un anticorps spécifique dans les extraits de protéines totales (50 μ g) provenant des cellules contrôles (CTL-1) ou surexprimant DDB2 (DDB2-1) traitées avec différentes concentrations de TNF α pendant 12 heures (A). La même expérience est réalisée après un traitement à différents temps avec 10 ng/ml de TNF α (C). L'incubation de la membrane avec un anticorps dirigé contre la tubuline révèle la quantité de protéines déposées. Les mesures de l'intensité de la bande correspondante à la forme clivée de PARP sont réalisées par densitométrie et représentées comme la moyenne issue de trois expériences indépendantes \pm la déviation standard (B et D). Les différences entre les cellules CTL et DDB2 sont significatives pour un $p < 0,05$.

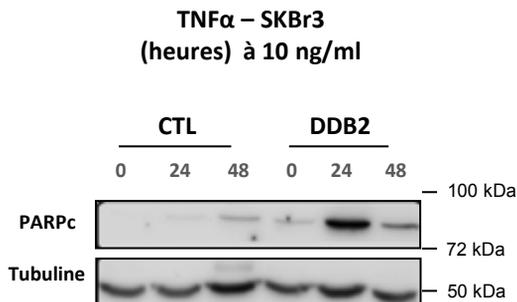


Figure 33 : Analyse par western-blotting du clivage de PARP après traitements au TNF α , selon l'expression de DDB2 dans les cellules SKBr3. La forme clivée de PARP est détectée par western blotting à l'aide d'un anticorps spécifique dans les extraits de protéines totales (50 μ g) provenant des cellules contrôles (CTL) ou surexprimant DDB2 (DDB2) traitées avec 10 ng/ml de TNF α à différents temps. La figure est représentative de trois expériences réalisées de façon indépendante.

II. IDENTIFICATION DES MECANISMES ASSOCIES A L'ACTION CHIMIOSENSIBILISANTE DE DDB2

1. Influence de DDB2 sur l'activité mitochondriale

En dehors des gènes cibles de DDB2 déjà caractérisés (SODMn, IκBα) dans le laboratoire, les résultats d'une analyse transcriptomique antérieure à ces travaux, a également révélé un certain nombre de gènes cibles potentiels codant des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale, et des gènes impliqués dans la régulation du métabolisme cellulaire. Les mitochondries possèdent un rôle déterminant dans le processus apoptotique et dans la production de DRO. Aussi, les résultats préliminaires d'analyse transcriptomique suggèrent que DDB2 pourrait jouer un rôle dans le contrôle de l'apoptose en influençant l'activité mitochondriale. Nous nous sommes alors intéressés à l'influence de la surexpression de DDB2 sur l'activité respiratoire et métabolique des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et T47D.

1.1. *Effet sur la consommation d'oxygène par la chaîne respiratoire*

La mesure de la consommation d'oxygène permet d'avoir une indication sur l'activité de la chaîne respiratoire. Elle est réalisée dans les clones MDA-MB-231 surexprimant DDB2 (DDB2-1 et -2), ainsi que dans les clones contrôles (CTL-1 et -2), par polarographie. Nos résultats montrent une augmentation significative de la consommation d'oxygène endogène (c'est-à-dire sans apport de substrats exogènes) dans les cellules MDA DDB2 par rapport aux cellules témoins CTL (**Figure 34A**). En effet, la consommation d'oxygène des cellules DDB2-1 s'élève à $2,4 \pm 0,1$ nmolesO₂/min/million de cellules, tandis que celle des cellules CTL-1 avoisine les $1,8 \pm 0,1$ nmolesO₂/min/million de cellules

L'influence de DDB2 sur la consommation d'oxygène a également été étudiée dans les cellules cancéreuses mammaires T47D. Les résultats obtenus et représentés dans la **figure 34C**, montrent que dans les cellules T47D, le niveau de consommation d'oxygène endogène semble indépendant de l'expression de DDB2. La consommation moyenne en oxygène pour les cellules contrôles et shDDB2 se situe autour de 4 nmolesO₂/min/million de cellules.

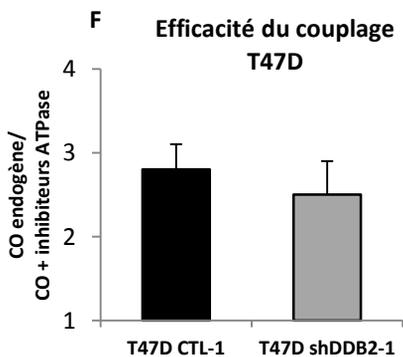
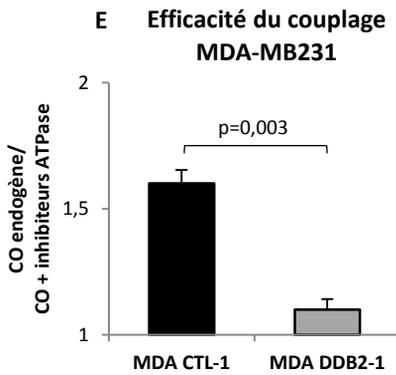
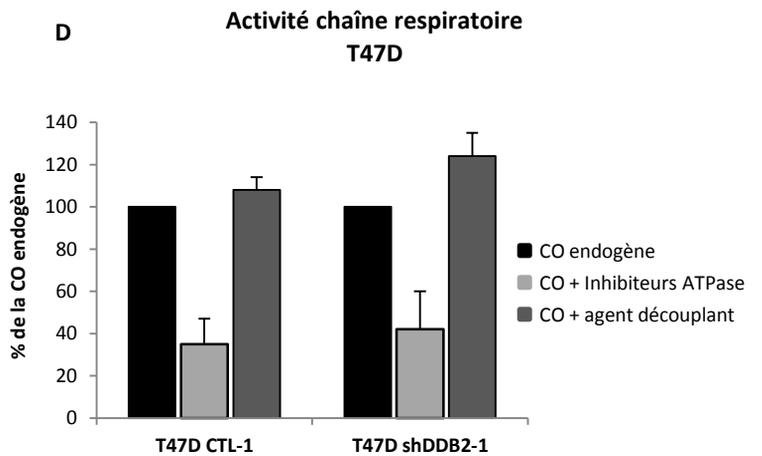
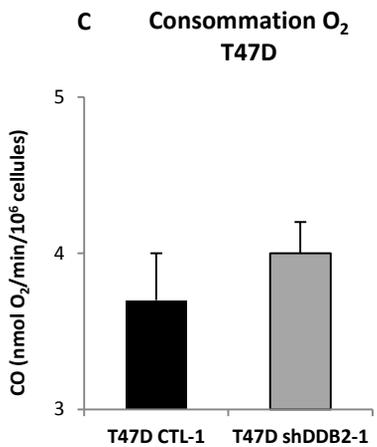
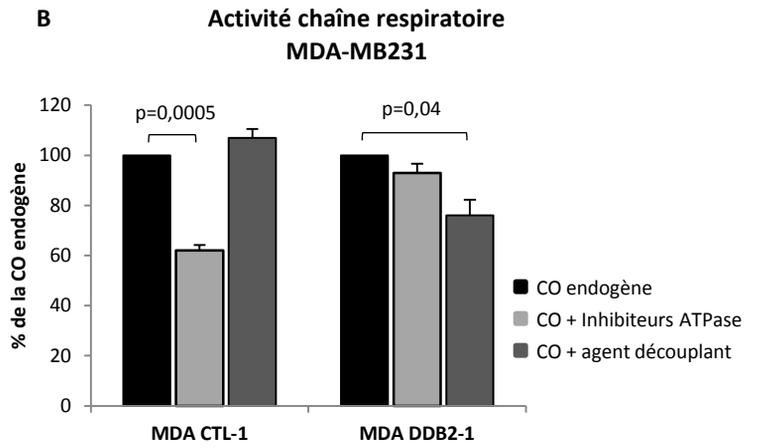
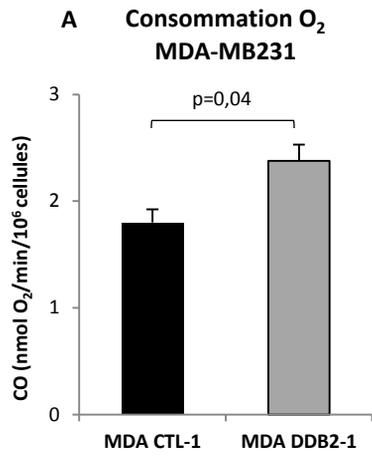


Figure 34 : Influence de la protéine DDB2 sur la consommation d'oxygène et l'efficacité de couplage de la chaîne respiratoire des cellules cancéreuses mammaires. Dans la chambre d'oxygraphie, les cellules MDA-MB231 (CTL-1 ou DDB2-1) ou T47D (CTL-1 ou shDDB2-1) sont à 10⁷ cellules/ml. Les résultats montrent, la moyenne des consommations d'oxygène (CO) endogène, exprimée en nmoles d'O₂/min/million de cellules (**A et C**). La moyenne des consommations d'oxygène endogène exprimée en pourcentage, après l'ajout d'inhibiteurs de l'ATPase (Oligomycine 10µg/ml + Atractyloside 10 µg/ml) et d'un agent découplant (CCCP 500nM), est comparée à la consommation d'O₂ endogène fixée à 100% (**B et D**). Le rapport de la consommation d'oxygène endogène des cellules sur la consommation en présence d'inhibiteurs de l'ATPase est calculé pour donner l'efficacité de couplage de la chaîne respiratoire (**E et F**). Les résultats présentés pour les clones CTL-1 et DDB2-1 correspondent à la moyenne ± la déviation standard issue de quatre expériences indépendantes. Les différences entre les cellules CTL et DDB2 sont significatives pour un p<0,05.

Ainsi, dans les cellules MDA-MB-231, la surexpression de la protéine DDB2 s'accompagne d'une augmentation de la consommation d'oxygène endogène de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cependant, dans les cellules T47D, la protéine DDB2 ne semble pas moduler le niveau de consommation en oxygène.

1.2. Effet sur l'efficacité du couplage de la chaîne respiratoire

Pour étudier l'efficacité du couplage entre l'activité de la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP, des traitements avec des inhibiteurs de l'ATP synthase et de l'ANT (Adenosine Nucleotide Translocase), tels que l'oligomycine et l'atractyloside, sont réalisés. Selon un mode opératoire décrit dans la section MATERIELS ET METHODES, la consommation d'oxygène endogène est suivie au cours d'un traitement à 10 µg/ml d'oligomycine et 10 µg/ml d'atractyloside. L'ajout des inhibiteurs d'ATP synthase diminue sensiblement la respiration cellulaire dans les cellules témoins CTL-1 (-40% de consommation d'oxygène comparée à la consommation endogène). Pour les cellules surexprimant DDB2 (DDB2-1), aucune différence significative n'est observée entre la consommation endogène d'oxygène et celle mesurée après l'ajout des inhibiteurs (**Figure 34B**).

L'inhibition de l'ATP synthase provoque, dans des mitochondries ayant une activité normale, une accumulation de protons dans l'espace intermembranaire, car ces derniers ne sont plus utilisés lors de la synthèse d'ATP. Cette accumulation a donc pour conséquence une réduction de la consommation d'oxygène par la chaîne respiratoire. Dans notre cas, les cellules surexprimant DDB2 (DDB2-1) ne répondent pas aux inhibiteurs de l'ATP synthase, indiquant un dysfonctionnement de cette enzyme. Ce dysfonctionnement peut être mis en évidence par le rapport entre la respiration endogène des cellules et la respiration en présence des inhibiteurs de l'ATP synthase. Plus ce rapport est important, plus la chaîne respiratoire est couplée à la synthèse d'ATP. La **figure 34E**, démontre bien un découplage significatif des mitochondries des cellules surexprimant DDB2 par rapport aux cellules témoins CTL-1.

Ainsi les cellules MDA-MB-231 présentent une diminution de l'efficacité de la chaîne respiratoire mitochondriale, lorsqu'elles expriment DDB2.

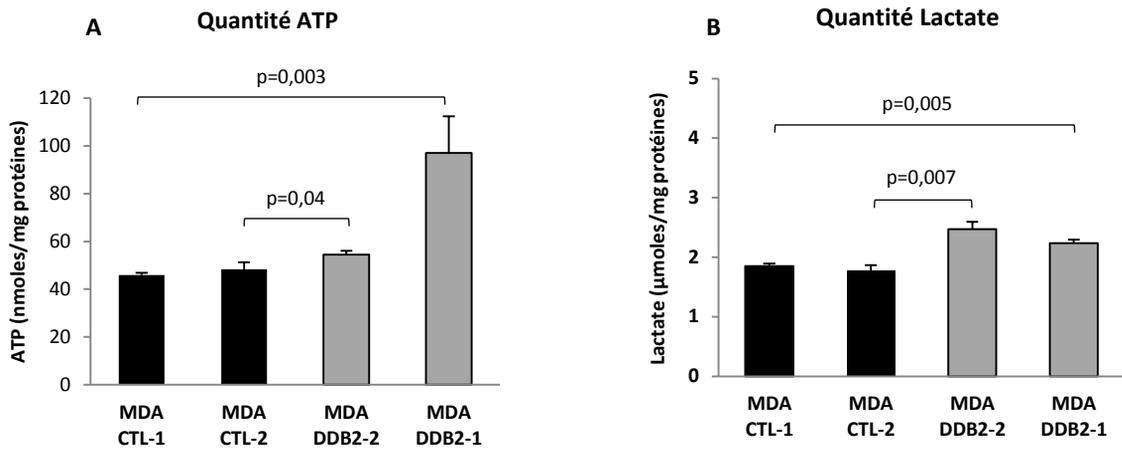


Figure 35 : Mesure des quantités d'ATP et de Lactate selon l'expression de DDB2. Les mesures d'ATP (A) et de Lactate (B) sont exprimées par mg de protéines totales et correspondent à la moyenne \pm la déviation standard de cinq expériences indépendantes. Les différences entre les cellules CTL et DDB2 sont significatives pour un $p < 0,05$.

A la suite des mesures de respiration en présence d'oligomycine et d'atractyloside, nous avons étudié l'effet d'un agent découplant (CCCP). Ce dernier provoque une dissipation du gradient de protons et entraîne une activation maximale de la chaîne respiratoire, qui tente ainsi d'expulser un maximum de proton afin de rétablir ce gradient. Les deux types cellulaires étudiés répondent de manière opposée à cet agent. En effet, le CCCP rétablit une consommation d'oxygène proche, voire légèrement supérieure à la consommation d'oxygène endogène observée avant l'ajout de l'oligomycine dans les cellules contrôles (CTL-1), alors qu'il n'accélère pas du tout la consommation d'oxygène dans les cellules DDB2 (DDB2-1) (**Figure 34B**). Ainsi, les cellules DDB2 auraient une consommation d'oxygène maximale et découplée de la synthèse d'ATP, caractéristiques d'une fuite importante et passive de protons.

L'ensemble de ces résultats ont ensuite été vérifiés sur la lignée T47D (**Figure 34D et F**). Dans ces cellules, la vitesse de consommation d'oxygène de la chaîne respiratoire mitochondriale, en présence d'oligomycine et d'atractyloside, est similaire entre les cellules contrôles et les cellules shDDB2. Entre les cellules CTL et shDDB2, l'efficacité du couplage de la chaîne respiratoire mitochondriale semble identique. En réponse au CCCP, les cellules T47D adaptent leur consommation en oxygène indépendamment du niveau d'expression de la protéine DDB2. Nos résultats montrent que, dans la lignée T47D, la protéine DDB2 n'influence pas l'activité respiratoire mitochondriale contrairement à ce qui a été montré dans les cellules MDA-MB-231.

1.3. Effet sur l'activité métabolique

Sur la base des dysfonctionnements de l'activité de la chaîne respiratoire mis en évidence dans les cellules MDA-MB-231 surexprimant DDB2, nous avons tenté de vérifier si le statut métabolique des cellules était également perturbé. Une analyse de la quantité d'ATP intracellulaire a été réalisée dans les cellules MDA contrôles (CTL-1 et CTL-2) et les cellules MDA surexprimant DDB2 (DDB2-2 et DDB2-1). Le résultat de ce dosage montre que la quantité d'ATP intracellulaire dans les deux clones MDA surexprimant DDB2 est supérieure à celle mesurée dans les cellules contrôles (CTL-1 et CTL-2) (**Figure 35A**). Précédemment, nous avons mis en évidence dans les cellules DDB2 un découplage de la consommation d'oxygène et de la synthèse d'ATP. Malgré une baisse de l'efficacité des phosphorylations oxydatives dans ces cellules, nous venons de démontrer qu'elles contiennent d'avantage d'ATP que les cellules témoins. Afin de compléter cette étude et tenter d'identifier les possibles mécanismes à l'origine de l'excédent d'ATP dans les cellules DDB2, nous avons

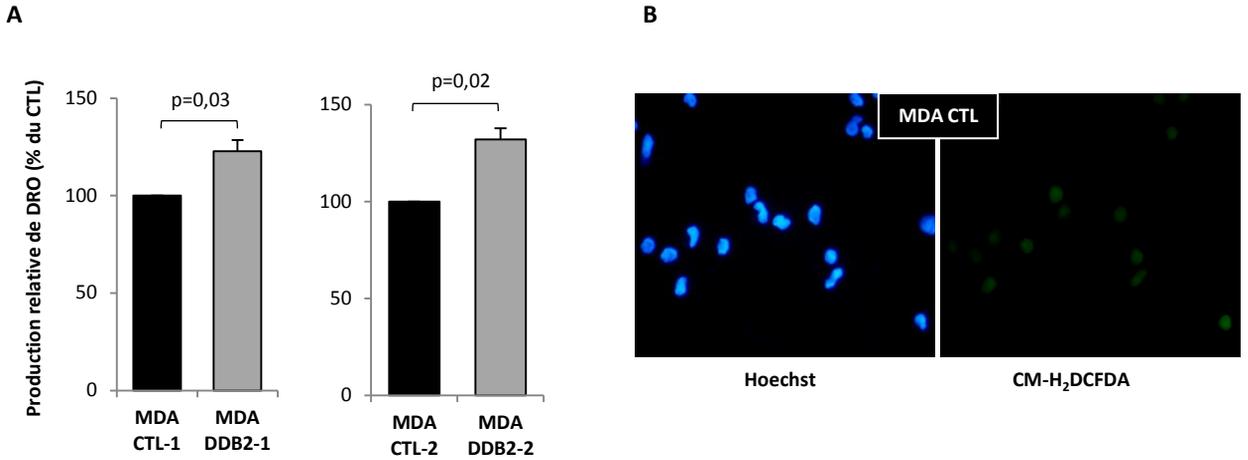


Figure 36 : Influence de la protéine DDB2 sur la production de dérivés réactifs de l’oxygène.

Le niveau de DRO dans les cellules MDA-MB-231 contrôles (CTL) et dans les cellules MDA-MB-231 surexprimant DDB2 (DDB2) est obtenue par cytométrie en flux après incorporation de la sonde fluorescente CM-H₂DCFDA (A). Les suspensions cellulaires sont incubées pendant 30 min avec 10 μM de sonde. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± la déviation standard issue de trois expériences indépendantes. Les différences entre les cellules CTL et DDB2 sont significatives pour un p<0,05.

L’intensité de fluorescence de la sonde CM-H₂DCFDA est évaluée par microscopie à fluorescence (B). Les cellules sont traitées avec 10 μM de sonde pendant 30min. La spécificité de la fluorescence vis-à-vis des DRO est vérifiée par un traitement au préalable des cellules MDA DDB2 pendant 48 heures avec la N-acétyl cystéine (NAC). Après fixation, les cultures sont observées au microscope à fluorescence, au grossissement X400.

évalué le statut glycolytique par un dosage de lactate extracellulaire. Une élévation du niveau de lactate produit par les cellules représente un élément informatif d'une augmentation de la glycolyse cytoplasmique, indépendante de l'activité mitochondriale. Dans les cellules MDA-MB-231, la surexpression de DDB2 augmente la production de lactate de 20% à 39% par rapport au niveau de production des cellules contrôles (**Figure 35B**). Cette observation indique qu'il existe dans les cellules MDA DDB2, un métabolisme glycolytique plus élevé que dans les cellules témoins.

Ainsi, la protéine DDB2 semble provoquer des dysfonctionnements de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale associés à une altération du métabolisme énergétique des cellules MDA-MB-231.

1.4. Influence de DDB2 sur le niveau de production de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO)

Les mitochondries constituent la principale source de DRO. Un dysfonctionnement dans l'activité de ces organites accentue la production de ces DRO. Réciproquement, un excès de DRO au sein des mitochondries peut conduire à des dysfonctionnements de l'activité de l'organite, et notamment des altérations des membranes mitochondriales et donc à une fuite de protons (Handy and Loscalzo, 2012). Un excès de DRO peut également s'expliquer par une perturbation de l'activité des enzymes de détoxification permettant de maintenir des niveaux normaux de DRO. Dans nos modèles de cellules cancéreuses mammaires, un excès de DRO pourrait être causé par une diminution de l'expression d'une enzyme antioxydante, la SODMn, dont le gène est régulé négativement par DDB2 (Minig et al., 2009) et qui est strictement localisée dans la matrice mitochondriale. Ainsi, sur la base des effets de DDB2 sur l'activité mitochondriale et de son rôle sur la régulation de l'expression de la SODMn, nous avons évalué en conséquence le niveau de production de DRO dans les cellules MDA-MB-231 surexprimant ou non DDB2. Pour mesurer le niveau de production de DRO nous avons utilisé la sonde CM-H2DCFDA, qui lorsqu'elle est oxydée, émet une fluorescence verte détectable dans les cellules à la fois par cytométrie en flux et par microscopie à fluorescence.

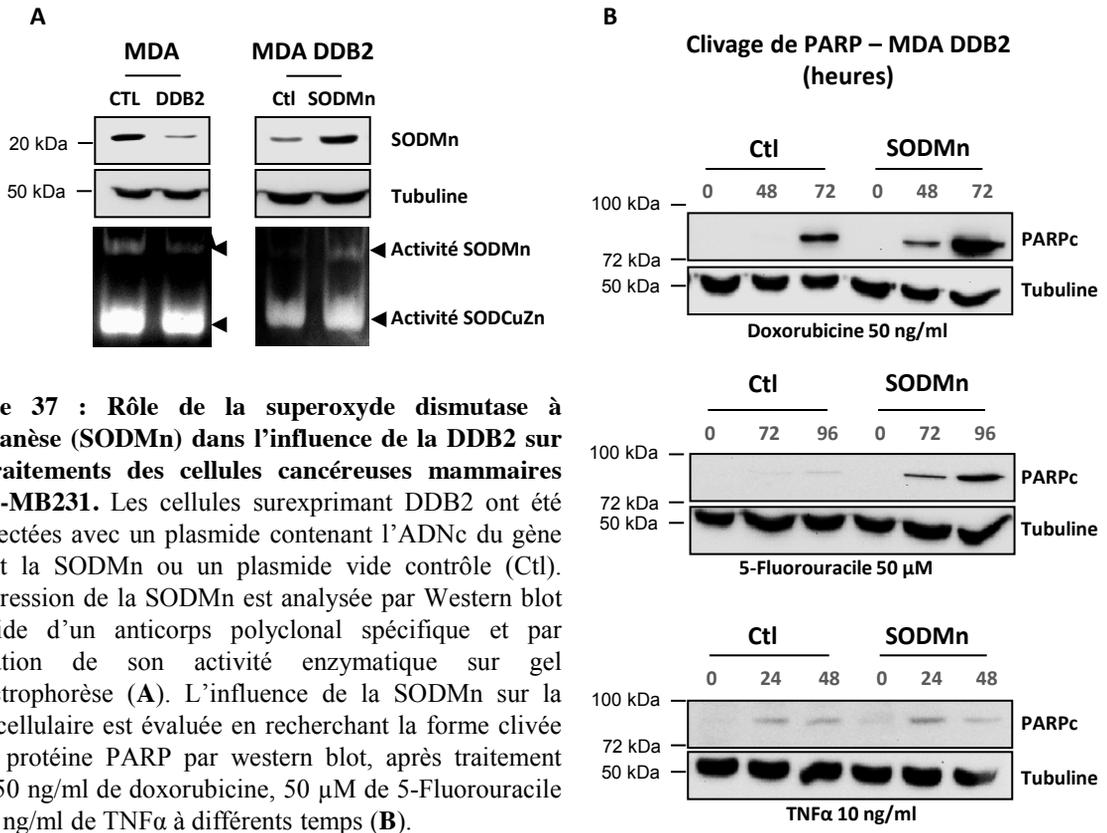


Figure 37 : Rôle de la superoxyde dismutase à manganèse (SODMn) dans l'influence de la DDB2 sur les traitements des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB231. Les cellules surexprimant DDB2 ont été transfectées avec un plasmide contenant l'ADNc du gène codant la SODMn ou un plasmide vide contrôle (Ctl). L'expression de la SODMn est analysée par Western blot à l'aide d'un anticorps polyclonal spécifique et par révélation de son activité enzymatique sur gel d'électrophorèse (A). L'influence de la SODMn sur la mort cellulaire est évaluée en recherchant la forme clivée de la protéine PARP par western blot, après traitement avec 50 ng/ml de doxorubicine, 50 µM de 5-Fluorouracile ou 10 ng/ml de TNFα à différents temps (B).

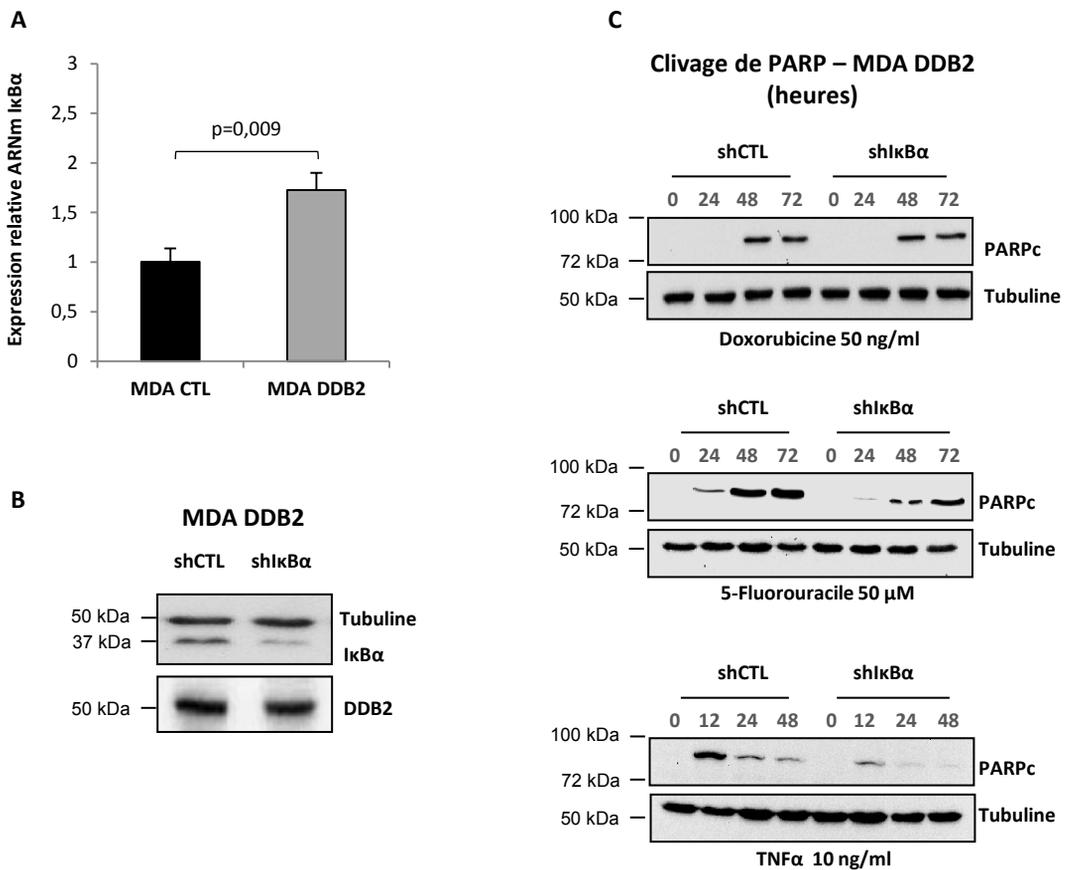
L'analyse par cytométrie en flux révèle une production de DRO augmentée significativement de 20 ± 6 % dans les cellules DDB2-1 par rapport aux cellules contrôles, CTL-1. Cette augmentation est de 30 ± 8 % dans les cellules DDB2-2 comparativement aux cellules contrôles CTL-2 (**Figure 36A**).

Ces résultats sont confirmés lorsque les cellules ayant incorporé la sonde CM-H2DCFDA sont observées au microscope à fluorescence. La **figure 36B**, montre bien une différence importante de l'intensité de fluorescence correspondante à la sonde CM-H2DCFDA oxydée en présence des DRO dans les cellules surexprimant DDB2 (DDB2-1), comparativement aux cellules contrôles CTL-1. Afin de vérifier que l'intensité de fluorescence élevée, observée dans les cellules DDB2-1 est due à un niveau de production plus élevée de DRO, nous avons exposé ces cellules à une molécule antioxydante, la N-Acétylcystéine (NAC) durant 48 heures avant de réaliser l'expérience. En conséquence, l'intensité de fluorescence observée est considérablement diminuée, suite au traitement avec la NAC (**Figure 36B**), démontrant ainsi la spécificité de la sonde utilisée.

L'ensemble de ces résultats indiquent que les cellules MDA-MB-231, lorsqu'elles surexpriment DDB2, ont un niveau de production de DRO plus élevé que les cellules contrôles.

2. Implication de la régulation transcriptionnelle du gène de la SODMn par DDB2

L'expression de la SODMn est contrôlée en partie par DDB2 dans les cellules tumorales mammaires (Minig et al., 2009). Il n'est pas exclu que cette enzyme, en régulant le niveau de DRO intracellulaire, soit impliquée dans la sensibilité des cellules tumorales aux agents anticancéreux. Cette hypothèse est testée en transfectant les cellules MDA-MB-231 surexprimant DDB2 (MDA DDB2-1) avec un plasmide contenant l'ADNc codant la SODMn. La **figure 37A** confirme bien qu'une surexpression de la protéine DDB2 dans les cellules MDA-MB-231 entraîne une diminution de l'expression et de l'activité de la SODMn. Cet effet répresseur est annulé en surexprimant stablement dans les cellules MDA-DDB2, le gène de la SODMn (MDA-DDB2 SODMn, **Figure 37A**). Les résultats obtenus sur les cellules MDA-DDB2 surexprimant la SODMn, ont été comparés à ceux provenant des cellules MDA-DDB2 dites contrôles (MDA-DDB2 Ctl) ayant reçu un plasmide vide.



Après avoir rétabli l'expression de la SODMn dans les cellules MDA-MB-231 surexprimant DDB2, les conséquences sur la sensibilité à la doxorubicine, au 5-FU et au TNF α ont été évaluées par détection du clivage de PARP par western-blot. La **figure 37B**, révèle que, le clivage de PARP est plus important et observé plus tôt dans les cellules MDA-DDB2 surexprimant la SODMn que dans les cellules MDA-DDB2 Ctl en présence de doxorubicine (50 ng/ml) ou de 5-FU (50 μ M). Aucune différence n'est observée lors d'un traitement avec le TNF α , selon le niveau d'expression de la SODMn. Ces résultats indiquent que l'effet chimiosensibilisant de DDB2 est plutôt augmenté qu'inhibé sur les cellules MDA-MB-231 exposées à la doxorubicine ou au 5-FU, lorsque l'expression de la SODMn est restaurée.

3. Implication de la régulation transcriptionnelle du gène I κ B α par DDB2

Lors d'un travail précédent dans le laboratoire, la protéine DDB2 a été décrite comme étant impliquée dans les capacités invasives des cellules tumorales mammaires en activant l'expression du gène codant I κ B α (Ennen et al., 2013). En effet, la protéine se fixe sur une séquence située dans la région proximale du promoteur du gène I κ B α et entraîne une activation de son expression. En augmentant l'expression de ce gène, comme le montre la **figure 38A**, DDB2 contribue ainsi à réduire l'activité du facteur de transcription NF- κ B, connu pour son rôle dans la réponse aux agents thérapeutiques (Ennen et al., 2013; Li and Sethi, 2010). Afin de vérifier une possible implication de la protéine I κ B α dans l'effet chimiosensibilisant de DDB2 dans les cellules tumorales mammaires, nous avons introduit stablement, dans les cellules MDA-MB-231 surexprimant DDB2, un plasmide contenant un shRNA ciblant l'ARNm d'I κ B α . L'efficacité de l'ARN interférence dans ces cellules a été évaluée par western-blot en comparant le niveau d'expression de la protéine I κ B α avec des cellules MDA-DDB2 infectées à l'aide de particules lentivirales contenant un plasmide shRNA contrôle, non spécifique. Entre ces deux types cellulaires, la surexpression de DDB2 reste inchangée, tandis que l'expression de la protéine I κ B α est diminuée d'au moins de moitié dans les cellules MDA-DDB2 shI κ B α par rapport aux cellules MDA-DDB2 shCTL (**Figure 38B**).

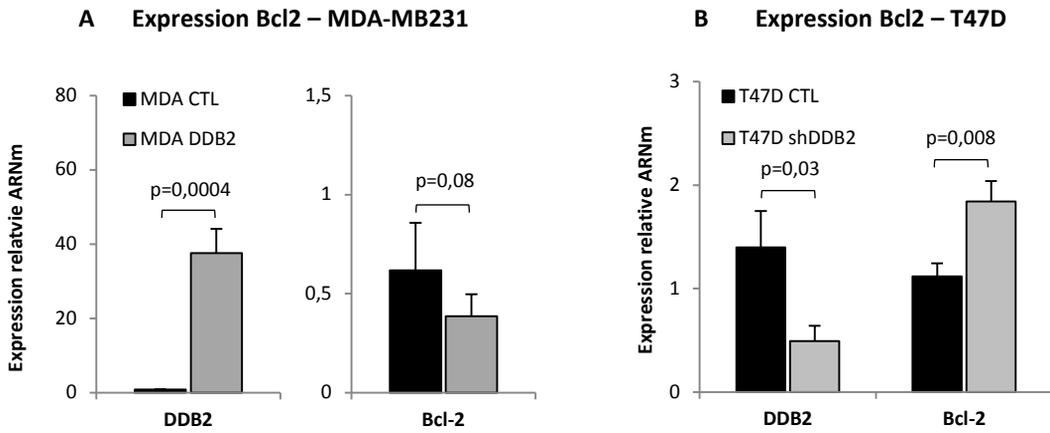


Figure 39 : Influence de la protéine DDB2 sur l'expression basale de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans les cellules cancéreuses mammaires. A partir d'ARNm totaux extraits des cellules MDA-MB231 (CTL et DDB2, **A**) ou T47D (CTL ou shDDB2, **B**), puis soumis à une étape de transcription inverse, une PCR en temps réel est réalisée à l'aide d'amorces spécifiques à l'ARNm de DDB2 et Bcl-2. Les résultats sont normalisés par les niveaux d'expression des ARNm de UBB et RPLPO et correspondent à la moyenne \pm la déviation standard issue de trois expériences indépendantes. Les différences entre les cellules CTL vs DDB2 ou CTL vs shDDB2 sont significatives pour un $p < 0,05$.

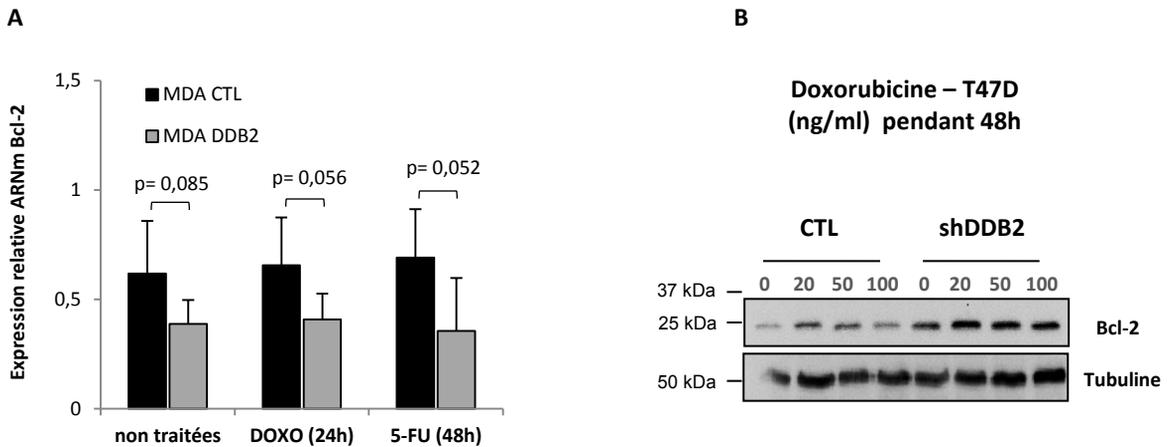
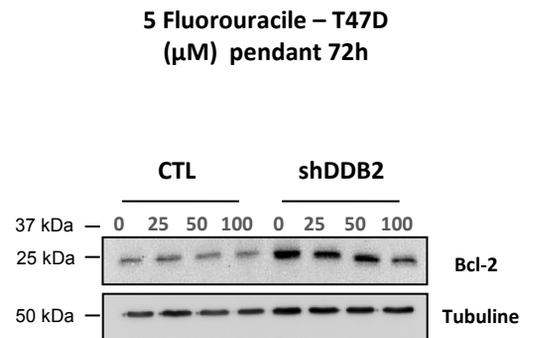


Figure 40 : Influence de la protéine DDB2 sur l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans les cellules cancéreuses mammaires traitées aux agents anticancéreux. Les cellules MDA-MB-231 contrôles (CTL) ou surexprimant DDB2 (DDB2) sont traitées avec la doxorubicine (50 ng/ml pendant 48h) ou au 5-Fluorouracile (50 μ M pendant 72h) et l'expression de Bcl-2 est évaluée par RT-qPCR sur des extraits d'ARN totaux (**A**). Les résultats sont normalisés par les niveaux d'expression des ARNm de UBB et RPLPO et correspondent à la moyenne \pm la déviation standard issue de trois expériences indépendantes. Les différences entre les cellules CTL et DDB2 sont significatives pour un $p < 0,05$. Les cellules T47D contrôles (CTL-2) ou shDDB2-2 sont traitées avec la doxorubicine (20, 50 ou 100 ng/ml pendant 48h) ou avec le 5-Fluorouracile (25, 50 ou 100 μ M pendant 72h) et l'expression de Bcl-2 est évaluée par western-blotting réalisé sur des extraits protéiques (50 μ g) (**B**). L'homogénéité des dépôts est contrôlée par immunodétection de la tubuline. p indique les valeurs de significativité calculées, pour CTL vs DDB2.



Dans ces cellules cancéreuses mammaires surexprimant DDB2, les conséquences d'une diminution de l'expression d'I κ B α sur la chimiosensibilité ont été testées en évaluant par western-blot, le clivage de la protéine PARP. Le niveau de sensibilité des cellules MDA-DDB2 shCTL et shI κ B α à l'apoptose induite par la doxorubicine, le 5-FU et le TNF α est représenté sur la **figure 38C**. Un traitement à la doxorubicine de 50 ng/ml, pendant 24, 48 et 72 heures provoque un clivage de la protéine PARP identique entre les cellules shCTL et shI κ B α . Cependant, un traitement avec 50 μ M de 5-FU pendant 24, 48 et 72 heures, entraîne une diminution du clivage de PARP dans les cellules shI κ B α , comparativement aux cellules shCTL. La même observation est faite avec un traitement au TNF α à 10 ng/ml pendant 12, 24 et 48 heures. Ces résultats suggèrent ainsi que le gain de clivage de PARP que confère la protéine DDB2 dans les cellules cancéreuses mammaires traitées au 5-FU et au TNF α dépend en partie de son implication dans la régulation positive du gène I κ B α .

4. Mise en évidence d'une relation entre la protéine DDB2 et le facteur anti-apoptotique Bcl-2

4.1. *Influence de DDB2 sur l'expression de Bcl-2 dans les cellules cancéreuses mammaires*

Certains travaux évoquent une corrélation négative entre l'expression de DDB2 et de Bcl-2 dans les cellules cancéreuses ovariennes (Barakat et al., 2009). Dans ces cellules, une diminution de l'expression du gène anti-apoptotique est observée après surexpression de la protéine DDB2. Cette corrélation n'a jamais été étudiée dans les cellules cancéreuses mammaires et pourrait potentiellement expliquer le rôle de DDB2 sur l'entrée en apoptose chimio-induite. Aussi, nous avons évalué dans les cellules MDA-MB-231 et T47D, le niveau de corrélation entre l'expression de DDB2 et de Bcl-2 par RT-qPCR. Dans les cellules MDA-MB-231 qui surexpriment DDB2, le niveau d'expression de Bcl-2 est plus bas que dans les cellules contrôles (CTL) (**Figure 39A**). Cette corrélation négative est également observée dans les cellules T47D, où une diminution de l'expression de DDB2 dans les cellules shDDB2 entraîne une augmentation de l'expression de Bcl-2 (**Figure 39B**).

Par la suite, nous avons démontré que cette corrélation négative entre le niveau de DDB2 et celui de Bcl2 est maintenue dans les cellules cancéreuses mammaires traitées à la doxorubicine et au 5-FU (**Figure 40**). Dans les deux lignées, non traitées et traitées, l'expression de Bcl-2 est systématiquement plus faible dans les cellules exprimant DDB2.

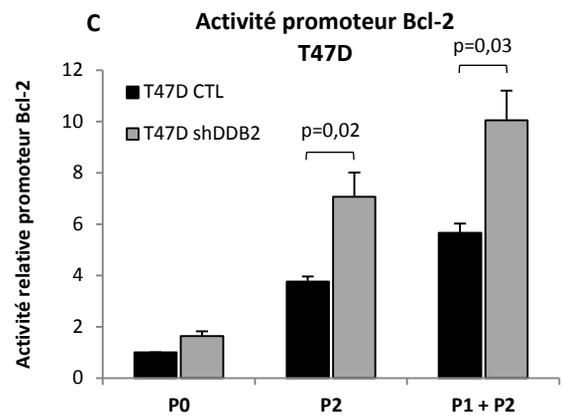
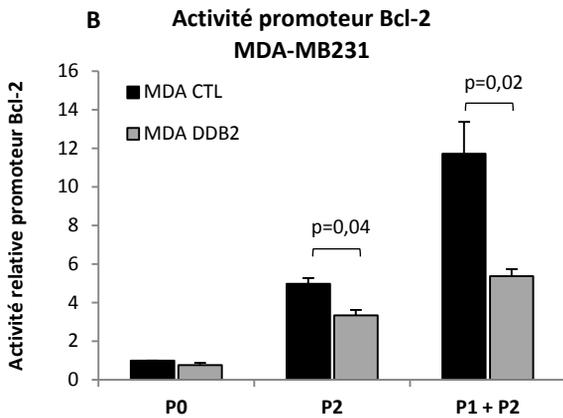
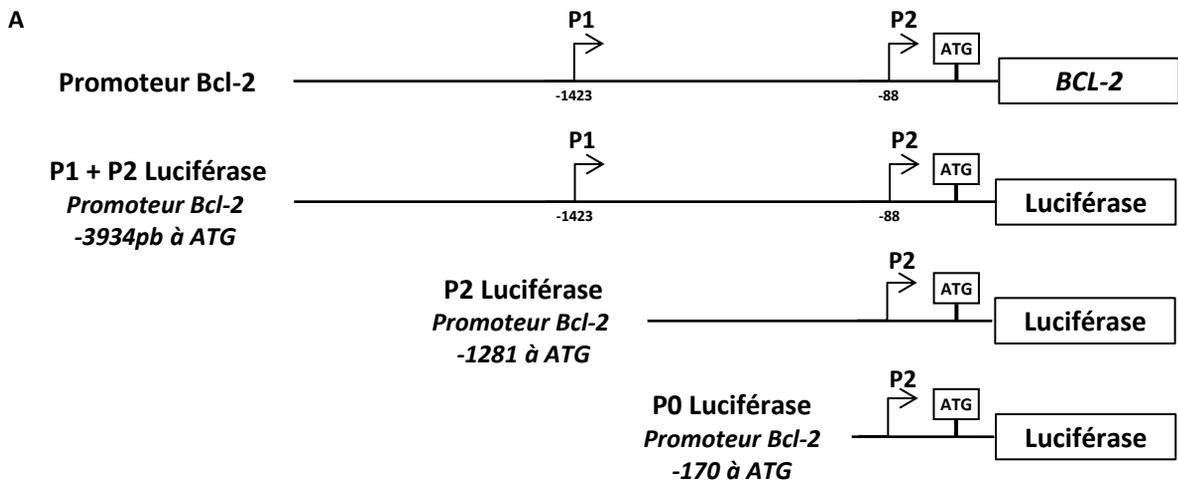


Figure 41 : Influence de DDB2 sur l'activité du promoteur du gène *bcl-2* dans les cellules cancéreuses mammaires. Une représentation schématique de la région promotrice du gène *bcl-2* révèle la présence de 2 promoteurs (P1 et P2) (A). L'analyse fonctionnelle du promoteur du gène *bcl-2* est réalisée en mesurant l'expression du gène rapporteur de type luciférase, sous contrôle des différentes régions régulatrices représentées sur la figure au sein d'une construction plasmidique. Chacune de ces constructions a été utilisée en même temps qu'un plasmide de normalisation des résultats codant la β -galactosidase, pour transfecter transitoirement les cellules. Les activités luciférase et β -galactosidase sont mesurées, après transfection sur les cellules MDA-MB231 (B) surexprimant ou non DDB2 (clones MDA CTL-1 et MDA DDB2-2) et les cellules T47D (C) dont l'expression de DDB2 est inhibée (shDDB2-2) ou non (CTL-2). L'activité relative de la luciférase est déterminée comme la moyenne \pm la déviation standard de 3 expériences indépendantes des rapports de l'activité luciférase sur celle de la β -galactosidase. Les différences entre les cellules CTL vs DDB2 et CTL vs shDDB2 sont significatives pour un $p < 0,05$.

4.2. *Influence de DDB2 sur l'activité du promoteur du gène bcl-2*

Connaissant le rôle de DDB2 sur la transcription de gènes et prenant en compte les résultats présentés précédemment, nous avons testé l'hypothèse d'une influence de DDB2 sur l'activité du promoteur de *bcl-2* dans les cellules cancéreuses mammaires. La région promotrice de ce gène anti-apoptotique est composée de deux promoteurs différents, P1 et P2, avec un site d'initiation de la transcription propre à chacun. Trois constructions plasmidiques contenant soit les deux promoteurs (P1 + P2), soit P2, soit P0 (limité à 170 paires de bases avant l'ATG) de *bcl-2*, placés en amont du gène rapporteur correspondant à la luciférase ont été utilisées lors d'expériences de transfections transitoires afin de mesurer leur activité dans les cellules (**Figure 41A**). Les résultats montrent, qu'indépendamment du niveau d'expression de DDB2 (CTL et DDB2), l'activité luciférase, sous contrôle de P2 et P1+P2 est significativement augmentée dans les cellules MDA-MB-231 par rapport aux cellules ayant reçu la construction P0, respectivement de 4,5 et 12 fois (**Figure 41B**). L'activité des promoteurs P2 et P1+P2, comparativement à P0 est confirmée dans les cellules T47D (**Figure 41 C**). Aussi, dans les cellules MDA-MB-231 et T47D, la transcription du gène *bcl-2* semble dépendre de l'activité du promoteur P1 et P2. Néanmoins, une surexpression de la protéine DDB2 entraîne une diminution de $50 \pm 5 \%$ de l'activité du promoteur P1+P2 dans les cellules MDA DDB2 par rapport aux cellules CTL. Cette diminution atteint les $34 \pm 6 \%$ pour l'activité du promoteur P2. Inversement, l'inhibition de l'expression constitutive de DDB2 dans les cellules T47D par ARN interférence (shDDB2), s'accompagne d'une augmentation de 80% de l'activité luciférase sous contrôle des régions P1+P2 et P2 du promoteur de *bcl-2*, par rapport aux cellules T47D contrôles (shCTL). Ces résultats suggèrent donc que DDB2 a une influence négative sur l'activité du promoteur du gène codant Bcl-2 au niveau du promoteur P1+P2, en relation avec la présence d'un site de fixation de la protéine sur P1, identifié récemment par Zhao et al. (2014). Cependant, il n'est pas exclu qu'il existe un autre site de fixation de DDB2, situé sur le promoteur P2. Nous avons montré que l'activité de ce dernier est également sous l'influence négative de DDB2.

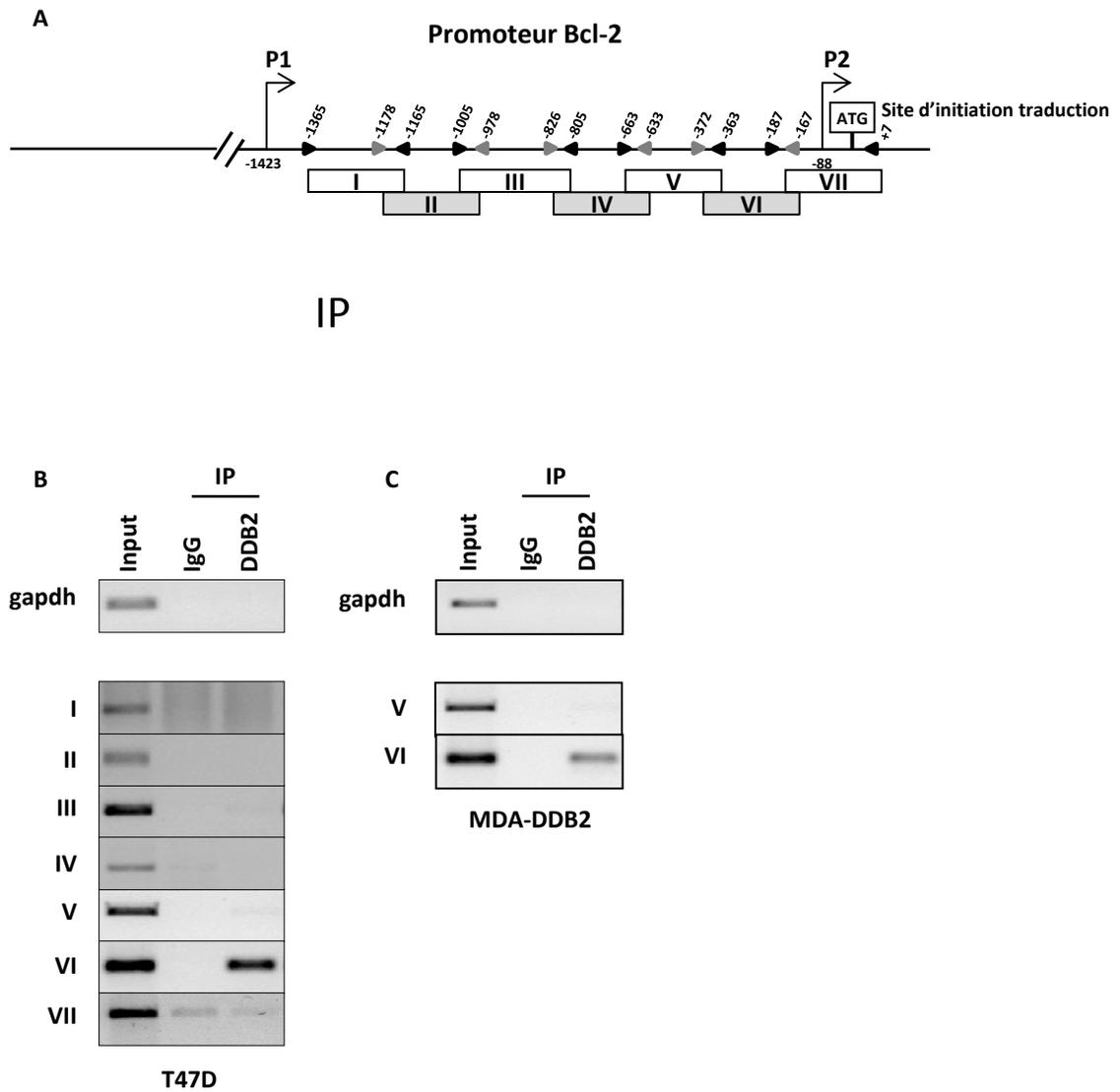


Figure 42 : Analyse des interactions de la protéine DDB2 sur le promoteur du gène *bcl-2* par immunoprécipitation de chromatine. Une représentation schématique de la région promotrice du gène *bcl-2* révèle la présence de plusieurs promoteurs (P1 et P2) (A). Un site d'interaction de DDB2 est recherché dans le promoteur P2, à l'aide de plusieurs couples d'amorces, représentés par des flèches horizontales (noirs et grises) et couvrant des régions d'environ 200 pb (rectangles de I à VII). Cette recherche d'interaction est menée par immunoprécipitation de chromatine sur les cellules T47D parentales qui surexpriment naturellement la DDB2 (B) et les MDA-MB231-DDB2 (C). La chromatine immunoprécipitée (IP), à l'aide des anticorps anti-DDB2 ou IgG contrôle est amplifiée par PCR en utilisant les couples d'amorces présentés en A. En parallèle, la PCR est réalisée avec un couple d'amorces spécifiques d'une séquence du gène de la *gapdh*, comme contrôle négatif. L'efficacité des réactions d'amplifications, pour chaque couple d'amorce, est testée sur des extraits de chromatine non immunoprécipités (input) comme contrôle positif.

4.3. *Interactions de la protéine DDB2 sur le promoteur du gène bcl-2*

D'après les résultats précédents, nous avons donc recherché une interaction entre DDB2 et une séquence du promoteur P2 par immunoprécipitation de chromatine (ChIP). La chromatine de la lignée T47D sauvage a été immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps anti-DDB2 ou d'un anticorps non spécifique servant de témoin négatif (IgG). L'ADN génomique issu de la chromatine immunoprécipitée a été utilisé comme matrice pour une réaction d'amplification par PCR, testant sept couples d'amorces qui définissent 7 régions (I à VII) et qui couvrent l'intégralité du promoteur P2 (**Figure 42A**). Nos résultats indiquent, que seule la région VI du promoteur P2 est immunoprécipitée par l'anticorps anti-DDB2 (**Figure 42B**). La protéine DDB2 semble donc interagir avec une séquence localisée entre -372 et -167 avant l'ATG.

Cette interaction de la protéine DDB2 sur la région VI du promoteur P2 a également été observée sur de la chromatine provenant des cellules MDA-MB-231 surexprimant DDB2 (DDB2) (**Figure 42C**).

4.4. *Influence de DDB2 sur la désacétylation des histones H3 dans le promoteur du gène bcl-2*

Afin de comprendre comment la protéine DDB2 entraîne une diminution de la transcription du gène *bcl-2*, nous avons testé l'hypothèse que son interaction est associée à des modifications épigénétiques des histones au niveau du promoteur P2 pour affecter localement la structure de la chromatine et par conséquent l'activité transcriptionnelle du gène. Nous avons ainsi tenté d'établir une corrélation entre le niveau d'expression de DDB2 et le niveau d'histones H3 acétylés dans la région VI du promoteur P2 du gène codant Bcl-2. Le niveau d'acétylation a été quantifié par immunoprécipitation de la chromatine avec les anticorps anti-lysine 9 et 14 acétylées de l'histone H3 (H3K9/14ac) et anti-lysine 27 acétylée de l'histone H3 (H3K27ac). Les immunoprécipitations ont été réalisées sur de la chromatine provenant des cellules MDA-MB-231 surexprimant ou non DDB2 (CTL et DDB2) mais aussi provenant des cellules T47D contrôles (CTL) ou inhibées pour l'expression de DDB2 (shDDB2).

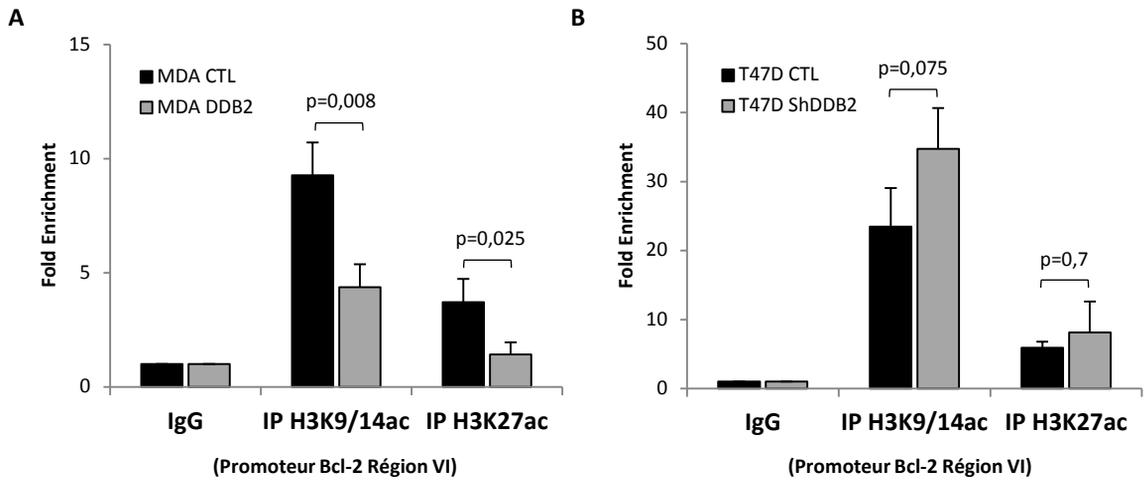


Figure 43 : Evaluation des degrés d'acétylation des histones H3 dans la région du promoteur P2 du gène *bcl-2*, contenant le site de fixation de DDB2. Les cellules MDA-MB231 (CTL vs DDB2, **A**) et T47D (CTL vs shDDB2, **B**) ont été utilisées afin de comparer les niveaux d'acétylation H3K9, 14ac et H3K27ac dans la région VI du promoteur du gène *bcl-2*. Pour chaque type cellulaire, des expériences de ChIP sont réalisées à l'aide d'anticorps spécifiques des formes acétylées de l'histone H3. Les niveaux d'enrichissement de la chromatine immunoprécipitée au niveau de la région VI du promoteur du gène *bcl-2* sont quantifiés par PCR en temps réel. Les résultats correspondent à la moyenne \pm la déviation standard issue de trois expériences indépendantes. Les différences entre les cellules CTL vs DDB2 et CTL vs shDDB2 sont significatives pour un $p < 0,05$.

Dans les cellules MDA-MB-231, la surexpression de la protéine DDB2 s'accompagne d'une diminution significative des formes H3K9/14 et H3K27 acétylés dans la chromatine, au niveau de la région VI du promoteur P2 du gène *bcl-2* (**Figure 43A**). Inversement, l'inhibition de l'expression de la protéine DDB2 dans les cellules T47D provoque quant à elle, un enrichissement de la chromatine en H3K9/14ac dans la région VI (**Figure 43B**). La proportion de H3K27ac dans cette région de la chromatine ne semble pas être modifiée entre les cellules T47D CTL et shDDB2.

5. Conclusion

Dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231, nous avons montré que la surexpression de la protéine DDB2 provoque un dysfonctionnement de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, associés à une augmentation de la glycolyse et de la production de radicaux libres. Toutefois, ce dysfonctionnement n'étant pas observé dans d'autres lignées de cellules cancéreuses mammaires, ne semble donc pas être le principal mécanisme expliquant l'effet chimiosensibilisant de DDB2. Cet effet dépend en partie de l'implication de cette protéine dans la régulation de l'expression du gène $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, mais pas de la SODMn. De même, l'identification du gène codant le facteur anti-apoptotique Bcl2, comme cible régulée négativement par DDB2 est prometteuse pour rendre compte de l'effet chimiosensibilisant de notre protéine d'intérêt.

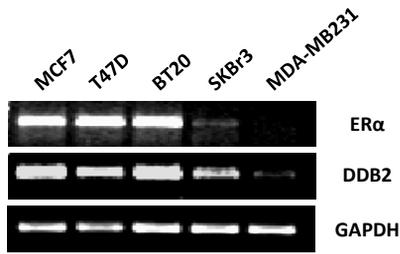
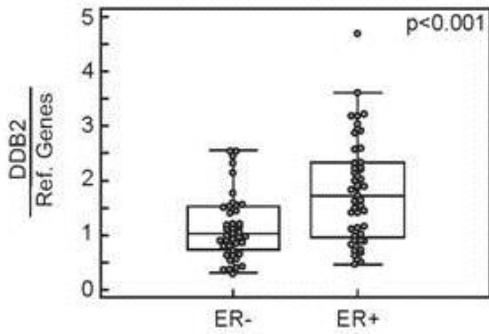
A**B**

Figure 44 : Expression de la DDB2 et du récepteur aux œstrogènes dans différentes lignées cancéreuses et dans des tumeurs mammaires.

Les profils d'expression de plusieurs lignées cancéreuses mammaires pour les gènes ERα et DDB2 sont obtenus par RT-PCR (A). Les ARN totaux extraits à partir de 92 tumeurs mammaires issues de patientes sont analysés par RT-PCR en temps réel (B). Les niveaux d'expression de DDB2 sont normalisés par l'expression des contrôles internes UBB et RPLPO, puis sont comparés entre les 43 tumeurs ER négative et les 49 ER positive. La différence entre les deux groupes de tumeurs est statistiquement évaluée par le test ANOVA one-way et parewisé et est significative pour un $p < 0,05$.

III. REGULATION DE L'EXPRESSION DE DDB2 DANS LES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES

1. Profils d'expression du gène *ddb2* dans les cancers du sein

Faible et inductible dans les cellules normales, l'expression constitutive de DDB2 est parfois élevée dans les cellules cancéreuses mammaires (Kattan et al., 2008a). Les travaux menés par le laboratoire visant à caractériser le rôle de DDB2 dans le cancer du sein ont permis d'établir le profil d'expression de ce gène dans plusieurs lignées cancéreuses et tumeurs mammaires. L'expression du gène *ddb2* dans les lignées cancéreuses mammaires est hétérogène et corrélée avec le récepteur aux œstrogènes ER α (**Figure 44A**). En effet, sur cinq lignées testées, trois expriment fortement *ddb2* (MCF7, T47D et BT20) et sont ER α positives. Les deux autres lignées (MDA-MB-231 et SK-BR-3) n'expriment pas ou peu DDB2 et sont ER α négatives. Le degré de corrélation entre l'expression du récepteur aux œstrogènes et DDB2 a été évaluée dans une étude rétrospective sur 92 échantillons de tumeurs prélevés chez des patientes. Les résultats de cette étude, obtenues en collaboration avec l'équipe du professeur Joseph Abecassis (EA3430, Centre régional de lutte contre le cancer Paul Strauss de Strasbourg) confirment l'existence d'une corrélation entre l'expression de la protéine DDB2 et ER α (**Figure 44B**). L'expression de DDB2 est augmentée significativement dans les tumeurs ER positives comparativement aux tumeurs n'exprimant pas le récepteur.

2. Influence des récepteurs aux œstrogènes sur l'activité du promoteur du gène *ddb2*

Sur la base d'une expression corrélée entre ER α et DDB2, nous avons émis l'hypothèse qu'ER α pouvait être un régulateur transcriptionnel de DDB2 dans les cellules cancéreuses mammaires ER positives. Une recherche bio-informatique a été menée sur la région proximale du promoteur du gène *ddb2* afin de localiser un élément de réponse aux œstrogènes ERE (Estrogen Responsive Element) potentiel. La séquence consensus d'un ERE est 5'-AGGTCAnnnTGACCT-3' (n pour un nucléotide quelconque). L'analyse bio-informatique a permis d'identifier une séquence similaire à l'ERE, composée par l'enchaînement 5'-AGGTCAnnnTGACC-3', en position -316 paires de bases avant l'ATG dans le promoteur du gène *ddb2*. Nous avons ainsi testé l'activité de la région promotrice de 735 paires de bases du gène *ddb2*, contenant la séquence « ERE-like », placée dans un vecteur plasmidique en amont du gène codant la luciférase. La transfection transitoire de ce vecteur,

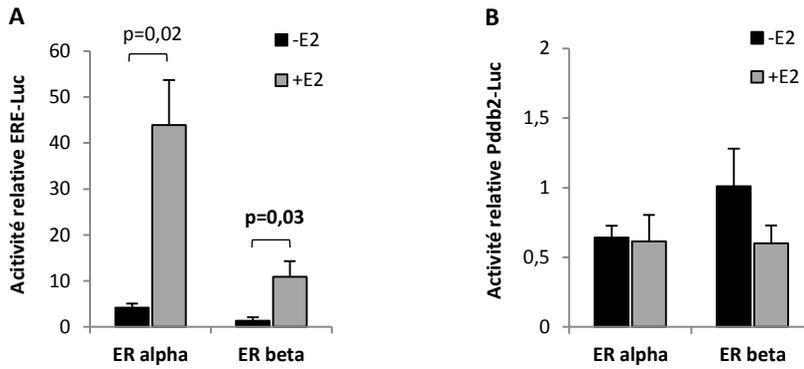


Figure 45 : Activité transcriptionnelle des récepteurs aux œstrogènes sur le promoteur du gène *ddb2*. Des cellules HEK sont transfectées avec un plasmide contenant le gène du récepteur aux œstrogènes alpha ou beta. L'activité transcriptionnelle d'ERalpha et ERbeta est évaluée à l'aide d'un gène rapporteur luciférase, placé sous le contrôle d'un élément de réponse aux récepteurs aux œstrogènes ERE (A) ou en aval du promoteur du gène DDB2 (B). L'activité luciférase est mesurée en absence ou en présence d'oestradiol. Les résultats sont exprimés en activité relative de luciférase, qui correspond à la moyenne \pm la déviation standard de trois expériences indépendantes, des rapports de l'activité luciférase sur celle de la β -galactosidase. Les différences sont significatives pour un $p < 0,05$.

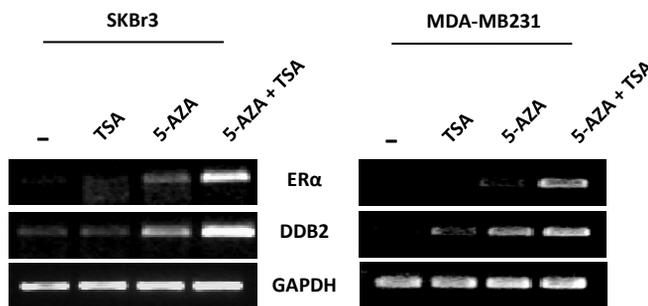


Figure 46 : Influence d'un agent déméthylant et d'un inhibiteur d'HDAC sur la transcription du gène ER α et *ddb2* dans les cellules cancéreuses mammaires ER négatives. Dans les cellules cancéreuses mammaires SKBr3 et MDA-MB231 n'exprimant pas naturellement DDB2, l'effet de traitements à la Trichostatine A (TSA à 100 ng/ml pendant 24h) et/ou à la 5-azacytidine (5 μ M pendant 72h) est évalué sur la réexpression de ER α et DDB2 par RT-PCR. L'expression du gène de la GAPDH est ubiquitaire et sert de contrôle interne à l'expérience.

conjointement avec un plasmide portant l'ADNc du gène ER α ou ER β est réalisée sur des cellules HEK (Human Embryonic Kidney), en présence ou non d'œstrogène (\pm E2). Le plasmide contenant le gène codant la β -galactosidase est également utilisé pour normaliser les valeurs d'activité luciférase. Dans les cellules HEK, les récepteurs ER α et β activés en présence d'E2 sont capables d'augmenter la transcription du gène rapporteur de la luciférase lorsque ce dernier est sous contrôle d'un ERE consensus (**Figure 45A**). Toutefois, la transcription de la luciférase, dont le gène est mis sous contrôle du promoteur du gène *ddb2*, n'est pas modifiée significativement par l'activation de ER α/β dans les cellules, suggérant que ces récepteurs nucléaires n'interviennent probablement pas dans la régulation de ce gène malgré la présence d'un élément « ERE-like » (**Figure 45B**).

3. Régulation épigénétique de l'expression du gène *ddb2*

3.1. *Effet des inhibiteurs de méthylation de l'ADN et des histones désacétylases sur l'expression du gène ddb2*

La corrélation d'expression entre le gène *ddb2* et ESR1 (ER α) dans les cellules cancéreuses mammaires, nous a également amené à envisager l'implication de mécanismes épigénétiques responsables de l'absence d'expression du gène codant DDB2. Ces mécanismes pourraient être similaires à ceux observés pour le gène codant ER α dans les cellules ER négatives, telles que les MDA-MB-231 et les SK-BR-3. Comme pour ER α , le gène *ddb2* est réexprimé au niveau transcriptionnel dans les cellules ER négatives SK-BR-3 et MDA-MB-231 traitées avec 5 μ M de 5-azacytidine (5-AZA inhibiteur de méthylation de l'ADN) durant 72 heures ou avec 100 ng/ml de trichostatine A (TSA, inhibiteur de HDAC) pendant 24 h, ou les deux substances combinées (**Figure 46**). Ces résultats suggèrent l'existence de mécanismes épigénétiques responsables de la répression du gène *ddb2* dans les cellules tumorales mammaires métastatiques et ER négatives.

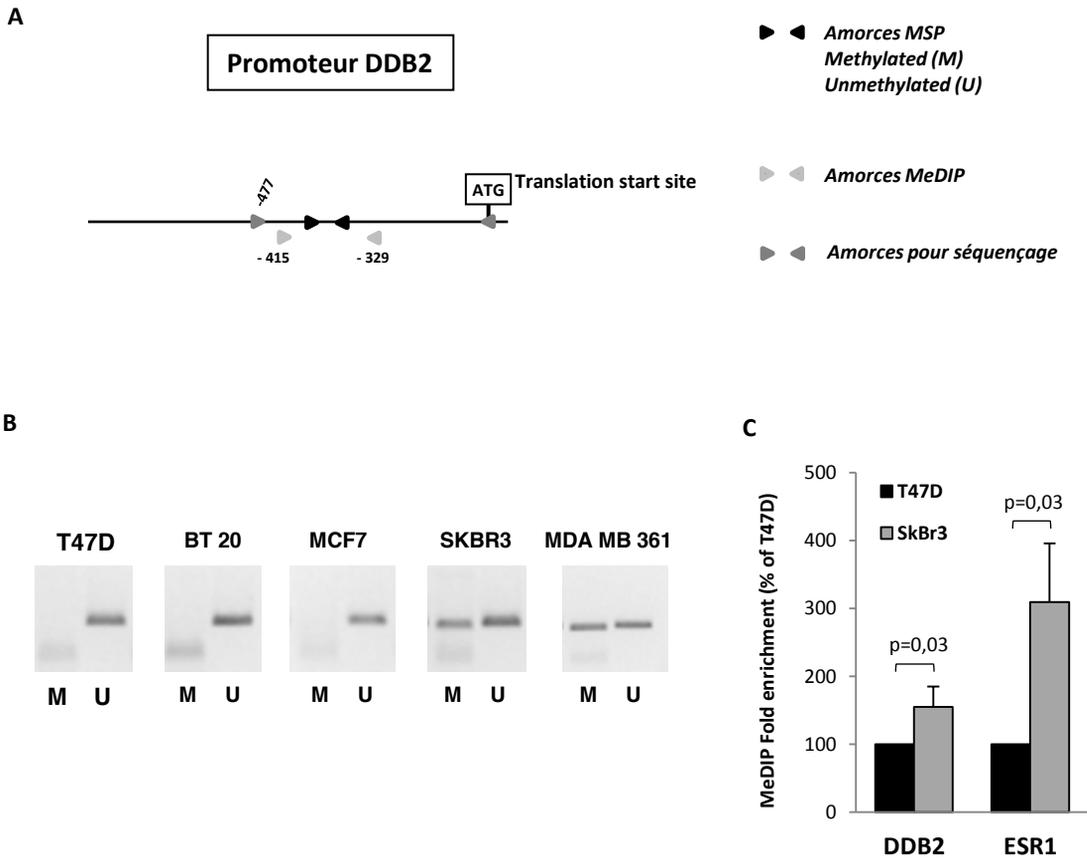


Figure 47 : Recherche de méthylation sur le promoteur du gène *ddb2*. Dans les cellules cancéreuses mammaires, les méthylation de l'ADN sont recherchées au niveau du promoteur proximal de DDB2 par MSP après traitements au bisulfite (**B**) ou par MeDIP (**C**). La localisation de la région de l'ADN étudiée est illustrée sur le schéma **A**. Après traitement au bisulfite, l'ADN génomique est amplifié par PCR à l'aide des couples d'amorces pour MSP (Methylation Specific PCR) (**B**). Une séquence de 170 pb contenant des sites CpG, pourra être amplifiée par le couple d'amorces M, si ces derniers sont méthylés. Le couple d'amorces U permet l'amplification de cette même région dans un contexte de CpG non méthylés. (**C**). Des extraits d'ADN génomique des cellules T47D et SKBr3 sont immunoprécipités à l'aide d'un anticorps dirigé contre les cytosines méthylées (MeDIP). Un couple d'amorces pour MeDIP, encadrant la région d'intérêt du promoteur de DDB2 est utilisé afin de déterminer le niveau d'enrichissement après IP par PCR quantitative. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'enrichissement par rapport à la lignée T47D et correspondent à la moyenne \pm la déviation standard de trois expériences indépendantes. Le niveau d'enrichissement pour une séquence non méthylée du gène UBE2B a été utilisé pour normaliser les résultats. Parallèlement, une analyse par MeDIP est menée sur le promoteur du gène ERalpha (ESR1) sur les mêmes extraits d'ADN génomique. Les différences entre les cellules T47D et SKBr3 sont significatives pour un $p < 0,05$.

3.2. Recherche des méthylations au sein du promoteur du gène *ddb2*

Des méthylations de l'ADN ont été recherchées dans la région du promoteur de *ddb2* par une 1^{ère} approche, la technique MSP (PCR spécifiques des méthylations) dans les cellules cancéreuses mammaires, en testant les couples d'amorces des travaux de Lodygin et al. (2005) (**Figure 47A**). Après traitement au bisulfite, l'ADN des différentes lignées cancéreuses mammaires est soumis à une réaction d'amplification MSP. Nos résultats montrent que le couple d'amorces spécifique à l'ADN non méthylé (U) permet d'amplifier un fragment dans les lignées cancéreuses mammaires exprimant DDB2 (T47D, BT20 et MCF7) (**Figure 47B**). Aucune amplification n'est observable dans ces cellules, lorsque l'on utilise le couple d'amorces spécifique à l'ADN méthylé (M). Inversement, le couple d'amorce M permet l'amplification d'un fragment dans les lignées cancéreuses mammaires n'exprimant pas ou peu le gène *ddb2* (MDA-MB361 et SK-BR-3), suggérant ainsi la présence de cytosines méthylées dans cette région du promoteur du gène *ddb2*.

Dans le but de confirmer ces résultats, les méthylations du promoteur de *ddb2* ont été recherchées par une seconde approche, qui consiste à immunoprécipiter l'ADN méthylé (MeDIP) dans deux lignées cancéreuses mammaires exprimant différemment DDB2 (T47D et SK-BR-3). L'ADN immunoprécipité, à l'aide d'un anticorps anti-cytosine méthylée, est purifié puis analysé par PCR en temps réel. Nous avons testé deux couples d'amorces différents, le premier permet l'amplification d'une région localisée dans le promoteur du gène ESR1 codant le récepteur ER α , le second la région potentiellement méthylée du promoteur du gène codant *ddb2*. Nous avons mis en évidence, comme attendu, un enrichissement en ADN méthylé significativement plus important dans la lignée SK-BR-3 ER négative par rapport à la lignée T47D ER positive, dans la région promotrice du gène ESR1 (**Figure 47C**). Concernant la région promotrice du gène *ddb2*, l'immunoprécipitation d'ADN méthylé semble plus importante dans les cellules SK-BR-3 par rapport aux cellules T47D. Nous confirmons donc que dans les cellules cancéreuses mammaires, une faible expression du gène codant DDB2 est corrélée à une augmentation de la méthylation du promoteur de ce gène.

Dans le promoteur du gène codant DDB2, la région étudiée par MSP et MeDIP se situe entre -415 et -330 paires de bases avant l'ATG. Nous avons complété ces résultats en étudiant une région plus large contenant 470 paires de bases en amont de l'ATG (**Figure 47A**). Sur ce fragment d'ADN, les cytosines méthylées ont pu être identifiées par la technique de « séquençage au bisulfite » (cf paragraphe Matériels et Méthodes V.1.). Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe « Régulation épigénétique de l'identité cellulaire » du docteur Michaël WEBER (UMR7242 Inserm Université de Strasbourg). Les profils de méthylation des cytosines du promoteur de DDB2 ont été décryptés dans plusieurs lignées cancéreuses mammaires. La région du promoteur de DDB2 traitée au bisulfite est alors amplifiée par une réaction de PCR pour être finalement clonée puis séquencée. Le séquençage permet de faire l'inventaire des cytosines converties ou non après traitement au bisulfite et établir ainsi le profil de méthylation du promoteur du gène *ddb2* dans les cellules cancéreuses mammaires. Cependant, les résultats montrent que les profils de méthylation obtenus par cette méthode sont similaires entre toutes les lignées cancéreuses mammaires exprimant ou non DDB2, et semblent contredire ceux obtenus avec les méthodes MSP et MeDIP

4. Conclusion

Même si une corrélation positive entre l'expression de DDB2 et d'ER α est observée dans plusieurs lignées cancéreuses mammaires et dans des échantillons tumoraux provenant de patientes, nos résultats montrent que le récepteur hormonal n'est pas impliqué dans la régulation du gène codant notre protéine d'intérêt. Malgré la restauration de l'expression de DDB2 dans les cellules tumorales mammaires métastatiques, traitées avec un inhibiteur des ADN méthyltransférases, nous n'avons pas mis en évidence des méthylations suffisamment significatives au niveau du promoteur du gène *ddb2* entre toutes les lignées cellulaires exprimant ou non la protéine. Néanmoins, ces résultats nous conduisent à suggérer l'existence d'un mécanisme épigénétique dépendant de méthylations de l'ADN dans les cellules tumorales mammaires métastatiques, au niveau du gène d'un facteur de transcription restant à identifier et régulant l'expression du gène *ddb2*.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

I. LA PROTEINE DDB2 MODULE LA SENSIBILITE DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES AUX AGENTS ANTICANCEREUX

Parallèlement à son rôle dans la réparation, la protéine DDB2 est impliquée dans les processus qui contrôlent la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses mammaires. Son rôle semble dépendre en partie de son influence sur l'expression de ses gènes cibles, en particulier, celui codant la superoxyde dismutase à manganèse (SODMn) ou le facteur inhibiteur de NF- κ B, I κ B α . Un tel rôle fait que la protéine DDB2 peut influencer potentiellement les voies de signalisation contrôlées par ces gènes cibles, telles que celles activant la prolifération, la migration ou la survie cellulaire. Sur ce dernier point, il n'existe dans la littérature, aucune donnée impliquant DDB2 dans la survie et la réponse aux agents anticancéreux des cellules tumorales mammaires. Par ailleurs, la mise en évidence de l'influence de DDB2 sur la régulation de l'expression du gène codant I κ B α (Ennen et al., 2013), a été initiée par des expériences de puce à ADN réalisées à partir de cellules tumorales mammaires exprimant ou non DDB2, et ce afin de mettre en évidence l'ensemble des gènes cibles potentiels de cette dernière. Ces expériences ont montré qu'environ 600 gènes étaient modulés en fonction du niveau d'expression de DDB2. La classification de ces gènes a permis de les regrouper dans différentes catégories en fonction de leur rôle connu dans les processus tels que la prolifération, la migration, le métabolisme et l'apoptose. Ainsi, les gènes impliqués dans la régulation du métabolisme cellulaire et l'apoptose ont particulièrement retenu notre attention.

Par conséquent, le premier objectif de ce travail était de préciser les effets de la protéine DDB2 sur la chimiosensibilité des cellules tumorales mammaires. Nos travaux ont permis de mettre en évidence *in vitro*, que la protéine DDB2 dans les lignées cancéreuses MDA-MB-231, SK-BR-3 et T47D permet d'accroître la sensibilité de ces cellules à la doxorubicine et au 5-fluorouracile. Cette sensibilité accrue se manifeste par une induction précoce et élevée de l'apoptose. D'autre part, l'influence chimiosensibilisante de DDB2 sur les cellules tumorales mammaires a été confirmée *in vivo*. L'ensemble de ces résultats sont en accord avec des travaux démontrant que l'expression de la protéine DDB2 dans les cellules

cancéreuses de l’ovaire est corrélée avec la sensibilité au cisplatine *in vitro* (Barakat et al., 2009; Zhao et al., 2014). De même, dans le cancer du sein, certains travaux suggèrent de manière indirecte l’existence d’un lien possible entre la chimiosensibilité et l’expression de DDB2. Ces travaux montrent une plus forte sensibilité des lignées MCF7 et T47D à la doxorubicine et au 5-FU par rapport à la lignée MDA-MB-231 (Gariboldi et al., 2007; Li et al., 2013; Wong et al., 2011), dans lesquelles l’expression de DDB2 diffèrent très significativement. Les lignées MCF-7 et T47D expriment fortement DDB2, comparativement à la lignée MDA-MB-231 qui l’exprime peu ou pas (Kattan et al., 2008a).

Toutefois, notre travail est le premier à avoir démontré les conséquences d’une modulation de l’expression de DDB2, à la fois *in vitro* et *in vivo* sur la réponse des cellules tumorales mammaires aux traitements anticancéreux. Les données caractérisant le rôle chimiosensibilisant de DDB2 n’avaient alors été obtenues que lors d’un traitement avec le cisplatine, un agent ciblant l’ADN. Nos données permettent donc d’appliquer ce nouveau rôle de DDB2 après un traitement avec deux autres classes d’agents de chimiothérapie, une anthracycline (doxorubicine) ciblant directement l’ADN et un antimétabolite (5-FU), ciblant indirectement l’ADN.

Nous avons également étudié l’influence de DDB2 sur la réponse des cellules tumorales mammaires au paclitaxel, un agent anticancéreux couramment utilisé dans le traitement des cancers du sein métastatiques, qui bloque la prolifération cellulaire en altérant la dépolymérisation et la réorganisation des microtubules. Cependant, nos résultats ne montrent pas de sensibilité plus importante selon que l’expression de DDB2 est modulée. L’effet chimiosensibilisant de cette protéine ne semble donc pas s’étendre au paclitaxel, dans nos conditions expérimentales. Dans ce sens, dans une étude de Eschenbrenner et al., la sensibilité au paclitaxel a été évaluée dans différentes lignées cancéreuses mammaires, et semble ne pas pouvoir être corrélée au statut DDB2 de ces cellules (Eschenbrenner et al., 2011). Cependant, la sensibilité des cellules MDA-MB-231 parentales (n’exprimant pas DDB2) au paclitaxel est relativement élevée aux doses utilisées et avoisinant l’IC50 (Nakayama et al., 2009). De plus, le mode d’action de cet agent anticancéreux est différent de la doxorubicine et du 5-FU, qui eux ciblent essentiellement l’ADN.

D'autres travaux ont également montré l'effet chimiosensibilisant de la protéine DDB2 pour des agents ciblant l'ADN (Barakat et al., 2009; Stoyanova et al., 2009; Zhao et al., 2014). Aussi, pour vérifier si cet effet de DDB2 dans les cellules cancéreuses mammaires est dépendant du ciblage de l'ADN, nous avons testé l'effet apoptogène du TNF α sur les cellules MDA-MB-231 et SK-BR-3 surexprimant ou non la protéine. Cette cytokine pro-inflammatoire induit l'apoptose de nombreuses cellules par un mécanisme qui dépend de son action sur la voie apoptotique dépendante des récepteurs à domaine de mort, sans provoquer de dommages au niveau de l'ADN (Horssen et al., 2006; Rath and Aggarwal, 1999). Les résultats obtenus montrent qu'une surexpression de la protéine DDB2 dans ces deux lignées cancéreuses mammaires provoque un accroissement de la sensibilité au TNF α . Cette nouvelle donnée constitue ainsi un argument expérimental en faveur d'un rôle sensibilisant de la protéine DDB2 aux traitements anticancéreux d'une manière indépendante des dommages de l'ADN qu'ils peuvent induire. Cette conclusion est confortée par les travaux de Barakat et al. (2009), montrant l'influence de DDB2 sur la sensibilité au cisplatine des cellules cancéreuses ovariennes. Dans ce travail, les auteurs montrent que DDB2 sensibilise ces cellules cancéreuses au cisplatine, d'une manière indépendante des dommages qu'induit cet agent anticancéreux sur l'ADN et du système de réparation NER induit.

Dans notre travail, nous n'avons jamais exclu l'implication possible de p53, dont dépend le système GGR pour contrôler l'entrée des cellules en apoptose lorsque des dommages de l'ADN sont induits (Adimoolam and Ford, 2003; Itoh et al., 2003). De plus, p53 est connue pour réguler positivement l'expression de DDB2 en reconnaissant un site de fixation dans la région promotrice de son gène (Tan and Chu, 2002). Cependant, une modification de l'expression de DDB2 dans nos modèles d'études MDA-MB-231 et T47D, dans lesquels le gène codant p53 est muté (Hui et al., 2006; Lim et al., 2009) est suffisante pour moduler l'apoptose induite par des agents anticancéreux, suggérant une sensibilité indépendante du système GGR. Au contraire le système de réparation GGR impliquant DDB2 peut d'avantage conduire à une résistance aux lésions induites sur l'ADN et à l'apoptose. En effet, il a été montré que l'induction de l'expression par p53 sauvage de certaines protéines du système NER dont DDB2, dans des cellules malignes de mélanome et gastrique, provoque un mécanisme de résistance acquise aux traitements endommageant l'ADN (agents alkylants, dont le cisplatine, et dérivés de chloroethylnitrosourée) (Barckhausen et al., 2014; Hirakawa et al., 2013).

II. RELATION ENTRE L'ACTIVITE MITOCHONDRIALE ET DDB2 DANS LA CHIMIOSENSIBILITE DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES

Après avoir écarté l'implication d'un mécanisme associé à la réparation de l'ADN, nous nous sommes intéressés à l'influence que la protéine DDB2 exerce sur l'expression de gènes cibles, que le laboratoire a été le 1^{er} à identifier et caractériser (Ennen et al., 2013; Minig et al., 2009). Sur la base d'une analyse transcriptomique, montrant une diminution de l'expression de gènes codant de nombreuses sous-unités de la chaîne respiratoire dans les cellules MDA-MB-231 surexprimant DDB2, nous avons émis l'hypothèse de dysfonctionnements de l'activité mitochondriale. Ces dernières sont connues pour jouer un rôle clé dans les processus apoptotiques.

Dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231, hormono-indépendante et triple négative, nous avons montré qu'une surexpression de la protéine DDB2 provoque un dysfonctionnement de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les cellules MDA-MB-231 surexprimant DDB2 semblent avoir une consommation d'oxygène découplée de la synthèse d'ATP, phénomène qui est associé à une inefficacité des oxydations phosphorylantes. Ce type de dysfonctionnement peut être dû à une fuite passive de protons qui ainsi ne peuvent plus être utilisés pour la synthèse d'ATP. De plus, ces dysfonctionnements de l'activité mitochondriale selon l'expression de DDB2 sont associés à une augmentation de la voie glycolytique et à l'augmentation de la production de radicaux libres. Toutefois, le rôle joué par DDB2 dans l'activité mitochondriale n'a pas été confirmé dans une autre lignée cancéreuse mammaire, la lignée hormono-dépendante T47D. Dans ces cellules, une inhibition de l'expression de la protéine n'entraîne aucune modification de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale par rapport aux cellules contrôles. L'absence d'effet de la protéine dans cette lignée nous amène à penser que les dysfonctionnements mitochondriaux ne représenteraient pas un mécanisme déterminant dans le rôle chimiosensibilisant de DDB2. Il est probable que la protéine DDB2 affecte le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale d'une manière dépendante du type cellulaire et de leur statut métabolique respectif. En effet les cellules cancéreuses présentent de nombreuses modifications métaboliques et mutations dans l'ADN mitochondrial, ainsi qu'une production anormalement importante de dérivés réactifs de l'oxygène, qui sont associés à leur agressivité et leur pouvoir métastatique (Kroemer, 2006). C'est pourquoi, de nombreuses cellules tumorales présentent des défauts de la respiration et un métabolisme

glycolytique anormalement élevé, qui leur permettent d'assurer une production d'ATP suffisante (Warburg, 1956). Une importante hétérogénéité du fonctionnement mitochondrial peut alors être observée entre les différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires. Les cellules cancéreuses mammaires triple négatives « basal-like », comme les cellules MDA-MB-231, se distinguent par exemple des autres types de cellules cancéreuses du sein en affichant souvent une activité glycolytique élevée (Kim et al., 2013). Le fait de surexprimer DDB2 dans ces cellules, dont les dysfonctionnements mitochondriaux sont déjà présents, ne change probablement rien. Dans l'avenir, il sera quand même important de conclure si ces effets sont liés au statut triple négatives « basal-like » des cellules tumorales mammaires, en confirmant ces résultats sur une autre lignée dans laquelle DDB2 sera surexprimée. Il serait intéressant de savoir si les dysfonctionnements mitochondriaux sont associés à une diminution importante de l'expression de DDB2 dans ces cellules tumorales mammaires métastatiques.

III. ROLE DE DDB2 DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE GENES CIBLES : CONSEQUENCES SUR LA CHIMIOSENSIBILITE DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES

1. Le cas de la SODMn

Nous nous sommes intéressés à la SODMn car le laboratoire a montré récemment que la protéine DDB2 active les capacités prolifératives des cellules cancéreuses mammaires non métastatiques, en maintenant une expression faible de la superoxyde dismutase à manganèse, (Kattan et al., 2008b; Minig et al., 2009). Il est connu que des agents anticancéreux tels que la doxorubicine et le 5-FU sont très efficaces sur des cellules tumorales ayant un taux élevé de prolifération. De plus, en maintenant une expression faible de la superoxyde dismutase à manganèse, il a été montré qu'il en résultait une accumulation dans les cellules de l'anion superoxyde, substrat de l'enzyme antioxydante qui active les voies de signalisation, en particulier celle dépendante de Ras/Raf/MAPK et du facteur transcriptionnel AP-1 (Reuter et al., 2010). Par ailleurs, ce DRO est susceptible d'oxyder irréversiblement un lipide localisé dans la membrane interne mitochondriale, la cardiolipine, qui est impliquée dans la rétention du cytochrome c dans l'espace intermembranaire (Petrosillo et al., 2003). L'oxydation de la cardiolipine peut donc entraîner une libération du cytochrome c dans l'espace

intermembranaire, qui est relargué ensuite dans le cytosol au moment de la perméabilisation de la membrane externe de l'organite lors de l'apoptose.

Comme, nous avons observé une hausse du niveau de DRO spécifiquement dans les cellules surexprimant DDB2, nous avons émis l'hypothèse que cette augmentation pourrait être en partie responsable de l'augmentation de la sensibilité des cellules surexprimant DDB2 à la doxorubicine et au 5-FU. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons surexprimé la SODMn dans des cellules exprimant DDB2 dans lesquelles elle est inhibée par cette dernière. En rétablissant l'expression de la SODMn dans les cellules MDA-MB-231 surexprimant DDB2, la sensibilité à la doxorubicine, au 5-FU, ainsi qu'au TNF α est augmentée par rapport aux cellules surexprimant seulement DDB2. Ces résultats indiquent donc que la chimiosensibilité induite par DDB2 n'est pas due à la répression transcriptionnelle de la SODMn. Il était particulièrement intéressant de tester cette hypothèse car la SODMn a encore à l'heure actuelle un rôle ambigu dans la tumorigenèse. En effet, si certains travaux ont démontré que sa surexpression s'accompagnait d'une résistance aux thérapies (Kumar et al., 2014; Suresh et al., 2003) d'autres travaux, au contraire lui ont attribuée un rôle suppresseur de tumeur (Duan et al., 2003; Oberley, 2005).

Ce résultat obtenu, à l'inverse de l'hypothèse initialement formulée, peut s'expliquer par une surexpression trop importante de la SODMn, supérieure à celle naturellement observée dans les cellules MDA-MB-231 sauvages. Cette surexpression peut créer un déséquilibre important dans la production de DRO, en particulier vers l'accumulation de peroxyde d'hydrogène, dont les enzymes chargées de leur élimination sont peu exprimées dans cette lignée (Kattan et al., 2008b). Enfin, il est possible que la surproduction de peroxyde d'hydrogène, provenant d'une surexpression trop élevée de la SODMn et responsable d'une mort cellulaire trop importante en présence des agents anticancéreux, soit liée à l'influence négative que peut exercer DDB2 sur l'expression du gène codant la catalase, une des enzymes éliminant ce DRO (Roy et al., 2010). Nous n'avons pas vérifié cette éventualité dans les cellules MDA-MB-231 surexprimant DDB2, dont le gène n'est déjà pas exprimé fortement dans les cellules sauvages.

Dans nos conditions expérimentales, même si le rôle de la SODMn dans la croissance et la réponse aux traitements des cellules tumorales mammaires reste controversé, les résultats obtenus nous permettent d'écarter une possible implication de cette enzyme dans l'effet chimiosensibilisant de la protéine DDB2 dans les cellules tumorales mammaires.

2. Le cas d'I κ B α

Récemment, le laboratoire a montré l'importance de DDB2 dans les capacités migratrices et invasives des cellules cancéreuses mammaires, en augmentant l'expression d'I κ B α , avec pour conséquence une diminution de l'activité constitutive de NF- κ B (Ennen et al., 2013). Ce facteur de transcription est décrit également pour diminuer la réponse des cellules tumorales aux agents anticancéreux, en régulant l'expression de nombreux gènes codant des protéines anti-apoptotiques, telles que des membres de la famille Bcl-2 (Bcl-xl, A1/Bfl-1) et de la famille des IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins) (Baldwin, 2001). Plusieurs travaux montrent que la voie NF- κ B contribue également au développement d'une chimiorésistance dans les cellules cancéreuses mammaires (Li and Sethi, 2010). Par exemple, les cellules MCF7, qui expriment naturellement DDB2 et ont une activité constitutive de NF- κ B très faible, deviennent résistantes au 5-FU, lorsqu'elles sont transfectées avec les sous-unités p50 et p65 de ce facteur de transcription (Wang et al., 2004). De même, une autre étude montre que les cellules MDA-MB-231, lorsqu'elles sont traitées avec des inhibiteurs de NF- κ B, deviennent significativement plus sensibles au 5-FU (Upadhyay et al., 2006). Comme pour le 5-FU, de nombreux travaux prouvent que le pouvoir apoptogène du TNF α est également sous contrôle du facteur de transcription NF- κ B dans plusieurs types de cellules cancéreuses (Bhat-Nakshatri et al., 2002; Shinoura et al., 2000; Xiao et al., 2003). Par rapport à la littérature, nos travaux ont montré qu'en diminuant l'expression d'I κ B α , l'effet sensibilisant d'une surexpression de DDB2 sur les cellules MDA-MB-231 est annulé pour un traitement avec le 5-FU ou le TNF α .

Cependant, cette diminution d'expression d'I κ B α n'affecte pas la chimiosensibilité induite par DDB2 dans les cellules MDA-MB-231 traitées avec la doxorubicine. Ceci suggère que l'inhibition de l'activité de NF- κ B dans les cellules cancéreuses mammaires surexprimant DDB2 n'est pas impliquée dans l'effet sensibilisant à la doxorubicine. Ces résultats peuvent être surprenants, à la vue des études démontrant l'influence de la voie NF- κ B sur la réponse des cellules tumorales mammaires à la doxorubicine. L'inhibition de ce facteur de transcription entraîne une augmentation de la sensibilité à la doxorubicine des cellules MDA-MB-231, qui présentent une forte activité constitutive de NF- κ B (Ciucci et al., 2006; Tapia et al., 2007). Contrairement au 5-FU et au TNF α , la doxorubicine exerce son activité anticancéreuse par différents mécanismes (intercalent de l'ADN, inhibiteur de topoisomérase, production de DRO) multipliant ainsi les types de dommages et les voies à l'origine de

l'entrée en apoptose. Nous pouvons imaginer qu'une de ces voies d'entrée en apoptose, en réponse à la doxorubicine, puisse être activée par la protéine DDB2 d'une manière indépendante de NF- κ B.

A l'issue de ce travail, le contrôle de l'activation de la voie NF- κ B représente potentiellement un mécanisme par lequel DDB2 module la chimiosensibilité des cellules cancéreuses mammaires envers certains agents anticancéreux.

3. Le cas de Bcl-2

Durant notre travail, nous nous sommes intéressés à Bcl-2 sur la base d'une observation majeure faite par Barakat et al. (2009), qui ont été les premiers à montrer que l'augmentation de la chimiosensibilité des cellules cancéreuses ovariennes surexprimant DDB2 est associée à une baisse de l'expression du facteur anti-apoptotique *in vitro* (Barakat et al., 2009). Ces résultats ont d'ailleurs été confirmés au cours de notre travail sur des prélèvements de tumeurs ovariennes provenant de 13 patientes (Zhao et al., 2014). Néanmoins, ces travaux ne se sont pas intéressés aux mécanismes moléculaires à l'origine de la régulation de l'expression de Bcl-2, et ont juste supposé que DDB2 pourrait être à l'origine de cette régulation. De même, dans nos travaux nous avons montré que l'expression de Bcl-2 est inversement corrélée à celle du gène *ddb2* dans les cellules tumorales mammaires. Cette expression reste faible lorsque les cellules cancéreuses mammaires exprimant DDB2 sont traitées avec des agents anticancéreux.

Dans le but d'établir un lien entre ces deux protéines dans les cellules cancéreuses mammaires, nous avons tenté de vérifier si DDB2 pouvait exercer un rôle sur la régulation de l'expression de Bcl-2, sans exclure une éventuelle implication de NF- κ B. En effet, ce dernier est également capable de reconnaître une séquence dans le promoteur du gène *bcl-2* et d'activer son expression dans les cellules cancéreuses mammaires (Viatour et al., 2003). De plus, l'importance de cette voie NF- κ B/Bcl-2 sur le contrôle de la chimiosensibilité des tumeurs mammaires a été évaluée dans une étude rétrospective intégrant 82 échantillons de tumeurs (Buchholz et al., 2005). Les résultats de cette étude établissent une corrélation positive entre la localisation nucléaire de NF- κ B (indice d'activation) et l'expression de Bcl-2 dans les tumeurs mammaires. Enfin dans ces tumeurs, l'activation de la voie NF- κ B/Bcl-2 est associée à une faible réponse à la doxorubicine.

Néanmoins, au cours de ce travail de thèse, il a été démontré très récemment que DDB2 interagit avec une séquence de fixation sur le promoteur P1 du gène *bcl-2* après un traitement au cisplatine des cellules d'adénocarcinome ovarien (Zhao et al., 2014). Sur la base de ce travail, nous avons également tenté de confirmer cette interaction de DDB2 avec le gène *bcl-2* dans nos modèles de cellules tumorales mammaires. Notre étude par gène rapporteur a confirmé qu'il existait dans les lignées cancéreuses mammaires une influence de la protéine DDB2 sur l'activité du promoteur du gène *bcl-2*. Plus précisément, nous avons établi que l'activité du promoteur P2 du gène codant Bcl-2 était réduite sous l'influence de la protéine DDB2, cette dernière étant capable d'interagir avec une région de l'ADN située du côté 3' de ce promoteur. Il reste à montrer l'importance de ce nouveau site de fixation de DDB2 sur le promoteur P2, comparativement à celui identifié et caractérisé sur P1 par Zhao et al. (2014), dont nous avons d'ailleurs confirmé l'existence dans les cellules tumorales mammaires. Contrairement à nos résultats, ces auteurs ont montré que la protéine DDB2 agit négativement sur l'activité du promoteur P1 du gène codant Bcl-2 et ne possède pas d'effet sur l'activité de P2. La séquence de fixation de DDB2 est par ailleurs très proche de celle que le laboratoire a identifié dans la région promotrice du gène codant la SODMn (Minig et al., 2009). Une analyse bioinformatique n'a cependant pas révélé une séquence similaire dans le promoteur P2. D'autres expériences seront nécessaires afin de déterminer précisément la nature de ce site de fixation au niveau du promoteur P2.

Le mécanisme par lequel DDB2 réprime l'expression du gène *bcl-2* n'est pas connu. En dehors des 7 domaines WD40 et du domaine hélice-boucle-hélice composant la structure de DDB2, la protéine ne contient pas réellement de domaine permettant d'expliquer son influence sur l'expression de ses gènes cibles. Cependant, un des mécanismes suggéré par ce travail et d'autres encore est que DDB2 influencerait la transcription des gènes en agissant sur le remodelage de la chromatine, comme ce qui a été récemment démontré pour la réparation de nucléotides lésés (Luijsterburg et al., 2012). Ce remodelage de la chromatine dépend de modifications post-traductionnelles des histones. En effet, nous avons montré que l'interaction de DDB2 sur le promoteur P2 est associée localement à une diminution des acétylations des histones H3 de la chromatine. En accord avec ce résultat, le laboratoire avait auparavant montré que la fixation de DDB2 sur le promoteur du gène codant la SODMn s'accompagne d'une diminution des acétylations des histones et d'une diminution de l'expression transcriptionnelle du gène (Minig et al., 2009). Plus récemment, Roy et al. (2013), ont également montré que la fixation de DDB2 sur le promoteur des gènes codant le

VEGF et Zeb1 était associée à une baisse locale de l'acétylation des histones et à une diminution de l'expression de ces gènes. Il est proposé que la répression qu'exerce DDB2 sur l'expression du gène *bcl-2* pourrait dépendre de la désacétylation des histones. La nouvelle conformation des histones désacétylés favorise leur assemblage et leur interaction avec l'ADN, conduisant ainsi à une compaction plus importante de la chromatine qui est moins accessible pour la machinerie transcriptionnelle (Koch et al., 2007). Le travail récent de Zhao et al. (2014) a par ailleurs montré que DDB2 favorisait le recrutement d'histones désacétylases (HDAC) sur le promoteur P1 du gène codant Bcl-2. Roy et al. (2010 ; 2013) ont également montré que DDB2 favorise le recrutement de l'histone méthyl transférase Su39 pour diminuer l'expression du gène codant la catalase. Cependant, nous n'avons pas vérifié le niveau de méthylation des histones au niveau du promoteur P2 du gène *bcl-2*, ni le recrutement d'HDAC, ce qui devra être réalisé prochainement.

Nous avons donc montré que DDB2 diminue l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 dans les cellules tumorales mammaires. Néanmoins pour finaliser notre étude l'implication de cette régulation dans la sensibilisation des cellules cancéreuses mammaires aux agents anticancéreux devra être établie. Dans la littérature, plusieurs études *in vitro* établissent un lien entre le niveau d'expression de Bcl-2 et la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires aux traitements. L'augmentation de l'expression de Bcl-2 dans les cellules cancéreuses hormono-dépendantes MCF-7 entraîne une chimiorésistance à la doxorubicine (Davis et al., 2003). Inversement, l'inhibition de l'expression de Bcl-2 rend plus sensible les cellules MDA-MB-231 à la doxorubicine (Emi et al., 2005).

IV. REGULATION DE L'EXPRESSION DE DDB2 DANS LES CANCERS DU SEIN

Devant l'importance de DDB2 dans la tumorigenèse mammaire et les résultats de ce travail montrant son rôle positif dans la réponse aux agents anticancéreux, nous avons tenté de connaître la raison de son expression très faible dans les cellules tumorales métastatiques. Nous nous sommes basés sur l'existence d'une corrélation positive entre l'expression des gènes codants DDB2 et ER α . Les données obtenues sur plusieurs lignées cancéreuses mammaires viennent confirmer les travaux déjà obtenus précédemment dans le laboratoire (Kattan et al., 2008a). De plus, nos résultats ont été confortés par une étude rétrospective portant sur 92 échantillons de tumeurs mammaires et révélant un niveau de corrélation significatif entre l'expression de ces deux gènes. De plus, ces données sont en accord avec

une étude, dans laquelle, les profils d'expression des tumeurs mammaires ER⁺ et ER⁻ provenant de 59 patientes taiwanaises ont été comparés par microarray. Les auteurs de cette étude ont identifiés 65 gènes exprimés différemment selon le statut ER des tumeurs. Parmi ces gènes, celui codant DDB2 est significativement plus exprimé dans les tumeurs ER⁺ même si cette étude n'a pas été confirmée pour des prélèvements de tumeurs provenant de patientes européennes (Chen et al., 2008).

Cependant, nous n'avons pas observé une régulation directe du gène *ddb2* par le récepteur aux œstrogènes. Mais il n'est pas exclu qu'un rôle indirect de ER, restant à identifier, influence l'expression du gène codant DDB2, car une étude a montré que le traitement de cellules MCF7 avec du tamoxifène (antagoniste ER) modifiait l'expression de plusieurs gènes, dont celui codant DDB2 (Gadal et al., 2005). Les auteurs observent, qu'en réduisant l'effet de ER dans ces cellules cancéreuses mammaires en présence du tamoxifène, l'expression de DDB2 diminue.

Toujours sur la base d'une corrélation entre l'expression de DDB2 et d'ER α , nous avons émis l'hypothèse de l'intervention de mécanismes épigénétiques impliqués dans la régulation du gène *ddb2*. Les méthylation de l'ADN constituent un mécanisme efficace, responsable de l'absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes dans les cellules tumorales mammaires ER⁻ (Ferguson et al., 1995; Giacinti et al., 2006). De plus, une équipe a révélé la présence de méthylation dans la région promotrice de douze gènes, dont celui codant DDB2, dans les tumeurs provenant d'adénocarcinome de prostate et comparées au tissu sain. Il est montré que le promoteur du gène codant DDB2 est hyperméthylé dans 86 % (34/41) des prélèvements de tumeurs de la prostate (Lodygin et al., 2005). Cependant, une étude récente et similaire a été entreprise dans des tumeurs d'adénocarcinome ovarien, dans laquelle, les auteurs concluent que la méthylation de l'ADN ne semble pas constituer un mécanisme déterminant dans la régulation de l'expression de DDB2 dans les cancers ovariens (Han et al., 2014). Dans le cadre de notre travail, la restauration de l'expression de DDB2 dans les lignées ER⁻ traitées avec un inhibiteur de méthylation de l'ADN tel que la 5-AZA, puis les résultats obtenus avec la méthode de MeDIP, laissaient à penser la présence de méthylation sur le promoteur du gène. Ce dernier présente effectivement dans certaines régions des îlots CpG pouvant être la cible d'ADN méthyltransférases (région -470 pb au site ATG). Néanmoins, même si les réactions d'amplification par MSP de l'ADN traité au bisulfite suggéraient également la présence de cytosines méthylées dans une région du promoteur du gène *ddb2*, aucune méthylation significative du nucléotide n'a été révélée par la

technique de « séquençage au bisulfite » de cette région. Il a déjà été décrit que les traitements aux bisulfite peuvent potentiellement endommager l'ADN et n'avoir qu'une efficacité partielle de conversion, pouvant expliquer la présence de faux positifs révélés par les réactions d'amplification par MSP (Ehrich et al., 2007). La divergence des résultats obtenus selon les méthodes utilisées nous a donc conduits à en conclure que l'absence d'expression du gène *ddb2* dans les cellules tumorales mammaires ER- et métastatiques n'est pas dépendante de méthylations suffisantes dans sa région promotrice. Cependant, ces résultats suggèrent que les mécanismes épigénétiques dépendants de méthylations sont impliqués dans l'absence d'expression de DDB2 dans ces cellules tumorales d'une manière indirecte, en étant responsables de l'absence d'expression de certains facteurs de transcription restant à identifier et qui seraient indispensables pour l'expression du gène codant DDB2.

CONCLUSION

&

PERSPECTIVES

Cellule cancéreuse
mammaire DDB2+ et ER+

Cellule cancéreuse
mammaire DDB2- et ER-

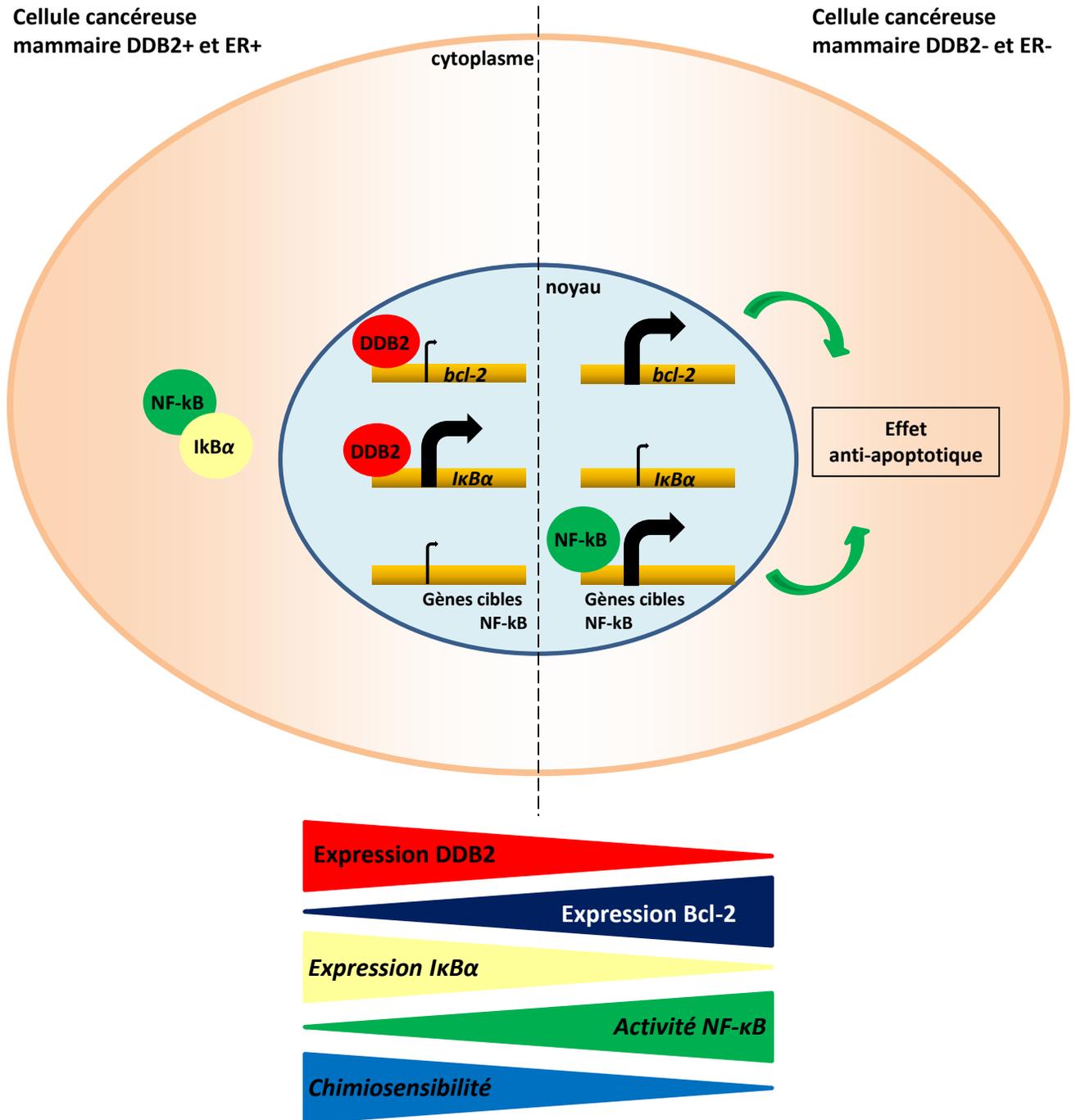


Figure 48 : Modèle proposé du rôle de DDB2 dans la réponse des cellules tumorales mammaires aux traitements anticancéreux. Les cellules cancéreuses mammaires qui expriment fortement la protéine DDB2, sont plus sensibles à la doxorubicine et au 5-FU que les cellules ne l'exprimant pas. L'effet chimiosensibilisant de DDB2 dépendrait de son influence sur l'expression des gènes codant IκBα et le facteur anti-apoptotique Bcl-2. DDB2 maintient un niveau faible d'expression du gène Bcl-2, en se fixant sur la région promotrice de son gène et en modulant les modifications post-traductionnelles de l'histone H3. Dans un même temps, DDB2 maintient un niveau élevé d'IκBα qui empêche alors l'activation de NF-κB. Le rôle anti-apoptotique connu de ce dernier, en régulant l'expression de nombreux gènes cibles, peut expliquer en partie comment DDB2 contrôle la réponse des cellules cancéreuses mammaires aux traitements anticancéreux.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

En 2007, une commission de 420 experts internationaux, impliqués dans la lutte contre le cancer du sein, a désigné la recherche de marqueurs prédictifs de réponse aux traitements, comme une des priorités de recherche (Dowsett et al., 2007). Dans ce sens, l'ensemble de nos résultats ont permis de montrer que la protéine DDB2 entraîne une modulation de la réponse des cellules tumorales mammaires à des agents anticancéreux *in vitro* et *in vivo*, selon un mécanisme proposé en **figure 48**. En accord avec nos résultats, une étude *in vitro*, a corrélée l'expression du gène *ddb2* avec la sensibilité de 39 lignées cancéreuses à 20 agents de chimiothérapies (Dan et al., 2002). Nos travaux s'ajoutent à ceux déjà réalisés au sein du laboratoire qui ont conduit récemment à identifier DDB2 comme une protéine participant activement aux capacités prolifératives et invasives des cellules tumorales mammaires, en régulant l'expression de gènes cibles (Ennen et al., 2013; Kattan et al., 2008a). L'ensemble de ces données a permis de révéler l'intérêt clinique de DDB2, comme un nouveau marqueur pronostic de progression métastatique des tumeurs mammaires. L'apport du présent travail contribue à démontrer que la protéine DDB2 présente un autre intérêt clinique, en tant que marqueur prédictif de la réponse aux thérapies couramment utilisées dans le traitement des cancers du sein. Cependant, il sera nécessaire de préciser, voire d'approfondir certaines données issues du présent travail, à la fois sur le plan fondamental et clinique.

En premier lieu, il s'agira de montrer que l'activité chimiosensibilisante de DDB2 observée *in vivo*, au cours de traitements de souris portant des tumeurs xénogreffées, s'accompagne d'une induction de l'apoptose intra-tumorale, comme le suggère les résultats *in vitro*. Une recherche de marqueurs d'activation de la voie apoptotique pourra être menée dans ce sens, sur des extraits des tumeurs xénogreffées qui ont été soumises aux traitements.

Notre travail a permis d'identifier une région du promoteur P2 du gène *bcl2* sur laquelle DDB2 se fixe. Néanmoins, il sera intéressant de préciser la séquence de fixation de DDB2 sur P2 et de la comparer à celle identifiée pour le gène de la SODMn. Dans ce sens, des approches par gel retard et par mutagenèse dirigée seront prochainement envisagées. D'autres part, dans le but de mieux comprendre comment DDB2 intervient négativement sur l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-2, il conviendra de rechercher la présence d'histones acétyltransférases (HDAC) et/ou d'histones méthyltransférases (HMT), comme il a

déjà été montré par d'autres équipes (Roy et al., 2010, 2013; Zhao et al., 2014), ou encore d'autres protéines restant à identifier. Par ailleurs, il sera nécessaire également de prouver que l'influence de DDB2 sur la réponse aux agents anticancéreux dépend de son action négative sur l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-2. Dans ce sens, une étude est actuellement menée dans le laboratoire, qui consiste à restaurer l'expression du facteur anti-apoptotique dans les cellules cancéreuses mammaires surexprimant DDB2 et d'évaluer les conséquences sur la réponse aux agents anticancéreux.

En plus de son rôle dans la régulation de l'expression du gène anti-apoptotique Bcl-2, il n'est pas exclu que la protéine DDB2 puisse influencer la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires aux traitements anticancéreux par un ou plusieurs autre(s) mécanisme(s). Dans le but de préciser l'action de cette protéine au cours de la réponse aux traitements nous envisageons d'analyser son influence sur l'activation de multiples voies de signalisation intracellulaire contrôlant la prolifération et la mort cellulaire (voie PI3K, ERK, etc). Dans ce sens l'utilisation d'un système automatisé, tel que la plateforme BioPlex (BIO-RAD) permettant l'analyse quantitative et simultanée de plusieurs voies de signalisation est en cours sur des échantillons de cellules cancéreuses mammaires préalablement traitées par chimiothérapie et dont l'expression de DDB2 a été modulée. Parallèlement, toujours dans le but de comprendre l'influence de DDB2 sur la chimiosensibilité, nous émettons l'hypothèse que le rôle de cette protéine sur la régulation de l'expression, directe ou indirecte de gènes cibles représente un mécanisme déterminant. Aussi, d'autres gènes cibles encore non identifiés peuvent potentiellement être impliqués dans les effets de DDB2 au cours de la réponse des cellules tumorales mammaires aux agents thérapeutiques. La recherche de ces gènes cibles représente alors une perspective intéressante et pourrait être menée par exemple à l'aide d'une plateforme de séquençage à haut débit de séquences d'ADN cibles ayant fixé DDB2 au cours d'une réaction d'immunoprécipitation de chromatine (ChIPSeq) provenant de cellules cancéreuses traitées ou non par chimiothérapie. A partir de ces séquences une liste de gènes correspondants sera établie et nous permettra de sélectionner des gènes dont les protéines correspondantes sont impliquées dans le processus de mort cellulaire. Au-delà même du processus de mort cellulaire, nous pouvons supposer que cette expérience pourra également permettre de compléter la compréhension des mécanismes par lesquels DDB2 contrôle les processus de prolifération, d'invasion et de migration des cellules cancéreuses mammaires mais également dans ses effets sur le métabolisme.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Afin de mesurer la dimension clinique de DDB2 en tant que marqueur prédictif de réponse aux thérapies, il sera intéressant d'élargir l'étude de l'influence de DDB2 sur la réponse des cellules tumorales mammaires à d'autres classes d'agent anticancéreux, en particulier ceux utilisés en thérapie ciblée, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Les anti-HER2 sont par exemple couramment utilisés dans le traitement des cancers du sein (HER+), et leur efficacité antitumorale pourrait être évaluée selon le niveau d'expression de DDB2. De plus, il conviendra d'analyser le niveau d'expression de DDB2 et de ses gènes cibles dans des échantillons de tumeurs mammaires provenant de patientes, dans le cadre d'une étude clinique rétrospective et prospective. Les résultats pourront être corrélés avec la réponse des patientes aux traitements qu'elles auront reçus.

Le rôle de DDB2 dans la tumorigenèse mammaire et la réponse des cellules aux agents anticancéreux dépend de son niveau d'expression. Il apparaît donc nécessaire de comprendre les mécanismes de régulation de l'expression de son gène dans les tumeurs mammaires, afin de renforcer l'intérêt clinique de la protéine. La recherche des mécanismes moléculaires responsables de la régulation de l'expression de son gène dans les cellules tumorales mammaires devra être poursuivie. Une des voies ouvertes durant le présent travail est l'implication de mécanismes épigénétiques, responsables de l'absence d'expression de DDB2 dans les cellules tumorales mammaires métastatiques, et répondant faiblement aux agents anticancéreux. Ces mécanismes seraient responsables de l'absence d'expression de certains facteurs de transcription restant à identifier dans ces cellules tumorales, et qui seraient indispensables pour l'expression du gène codant DDB2.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

En conclusion, ce présent travail a démontré que DDB2, par son expression, rend les cellules tumorales mammaires plus sensibles à certains agents anticancéreux utilisés en chimiothérapie conventionnelle. Ces résultats, même si ils nécessitent d'être complétés, permettent de révéler l'intérêt clinique de cette protéine, en tant que facteur prédictif de réponse aux traitements anticancéreux, et d'apporter à terme aux cliniciens une aide à la décision thérapeutique selon son niveau d'expression. L'identification du ou des mécanismes de régulation de son gène représente une perspective originale et pertinente, qui laisse entrevoir la possibilité de développer des molécules à visée thérapeutique capable d'induire son expression. Si les mécanismes épigénétiques jouent un rôle central dans l'absence d'expression de *ddb2*, le développement de molécules ciblant ces mécanismes et capables d'induire la réexpression de la protéine pour agir en synergie avec les traitements actuels, présente donc un intérêt clinique majeur et constitue une stratégie thérapeutique intéressante. Cette dernière pourrait à terme, permettre d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patientes atteintes d'un cancer du sein.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A, B

Adimoolam, S., and Ford, J.M. (2003). p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* 2, 947–954.

Albain, K.S., Barlow, W.E., Shak, S., Hortobagyi, G.N., Livingston, R.B., Yeh, I.-T., Ravdin, P., Bugarini, R., Baehner, F.L., Davidson, N.E., et al. (2010). Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol.* 11, 55–65.

Anderson, E. (2002). The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res.* 4, 197–201.

Ando, T., Ishiguro, H., Kuwabara, Y., Kimura, M., Mitsui, A., Sugito, N., Mori, R., Ogawa, R., Katada, T., and Fujii, Y. (2008). Relationship between expression of 5-fluorouracil metabolic enzymes and 5-fluorouracil sensitivity in esophageal carcinoma cell lines. *Dis. Esophagus* 21, 15–20.

Ayers, M., Symmans, W.F., Stec, J., Damokosh, A.I., Clark, E., Hess, K., Lecoche, M., Metivier, J., Booser, D., Ibrahim, N., et al. (2004). Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 22, 2284–2293.

Baldwin, A.S. (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. *Journal of Clinical Investigation* 107, 241–246.

Banerjee, A. (2002). Increased levels of tyrosinated α -, β III-, and β IV-tubulin isotypes in paclitaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293, 598–601.

Barakat, B.M., Wang, Q.E., Han, C., Milum, K., Yin, D.T., Zhao, Q., Wani, G., Arafa, E.S., El-Mahdy, M.A., and Wani, A.A. (2009). Overexpression of DDB2 enhances the sensitivity of human ovarian cancer cells to cisplatin by augmenting cellular apoptosis. *Int J Cancer.*

Barckhausen, C., Roos, W.P., Naumann, S.C., and Kaina, B. (2014). Malignant melanoma cells acquire resistance to DNA interstrand cross-linking chemotherapeutics by p53-triggered upregulation of DDB2/XPC-mediated DNA repair. *Oncogene* 33, 1964–1974.

Bardou, V.-J., Arpino, G., Elledge, R.M., Osborne, C.K., and Clark, G.M. (2003). Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J. Clin. Oncol.* 21, 1973–1979.

Bartoszek, A. (2002). Metabolic activation of adriamycin by NADPH-cytochrome P450 reductase; overview of its biological and biochemical effects. *Acta Biochim. Pol.* 49, 323–331.

Benhar, M., Engelberg, D., and Levitzki, A. (2002). ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO Rep* 3, 420–425.

Bhat-Nakshatri, P., Sweeney, C.J., and Nakshatri, H. (2002). Identification of signal transduction pathways involved in constitutive NF-kappaB activation in breast cancer cells. *Oncogene* 21, 2066–2078.

Bonnefoi, H., and Cremoux, P. de (2008). Nouveaux facteurs prédictifs de chimiosensibilité dans le cancer du sein. *Bulletin Du Cancer* 95, 943–950.

Borgel, J., Guibert, S., and Weber, M. (2012). Methylated DNA Immunoprecipitation (MeDIP) from Low Amounts of Cells. In *Genomic Imprinting*, N. Engel, ed. (Humana Press), pp. 149–158.

Brown, J.M., and Attardi, L.D. (2005). The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* 5, 231–237.

Buchholz, T.A., Garg, A.K., Chakravarti, N., Aggarwal, B.B., Esteva, F.J., Kuerer, H.M., Singletary, S.E., Hortobagyi, G.N., Pusztai, L., Cristofanilli, M., et al. (2005). The Nuclear Transcription Factor κ B/bcl-2 Pathway Correlates with Pathologic Complete Response to Doxorubicin-Based Neoadjuvant Chemotherapy in Human Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 11, 8398–8402.

Buyse, M., Loi, S., van't Veer, L., Viale, G., Delorenzi, M., Glas, A.M., d'Assignies, M.S., Bergh, J., Lidereau, R., Ellis, P., et al. (2006). Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 1183–1192.

Buzdar, A.U., and Hortobagyi, G. (1998). Update on endocrine therapy for breast cancer. *Clin Cancer Res* 4, 527–534.

C, D

Cai, Q., Fu, L., Wang, Z., Gan, N., Dai, X., and Wang, Y. (2014). α -N-Methylation of Damaged DNA-Binding Protein 2 (DDB2) and Its Function in Nucleotide Excision Repair. *J. Biol. Chem.*

Candé, C., Cecconi, F., Dessen, P., and Kroemer, G. (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci* 115, 4727–4734.

Carey LA, Perou CM, Livasy CA, and et al (2006). RAce, breast cancer subtypes, and survival in the carolina breast cancer study. *JAMA* 295, 2492–2502.

- Chen, H.-W., Huang, H.-C., Lin, Y.-S., Chang, K.-J., Kuo, W.-H., Hwa, H.-L., Hsieh, F.-J., and Juan, H.-F. (2008). Comparison and Identification of Estrogen-Receptor Related Gene Expression Profiles in Breast Cancer of Different Ethnic Origins. *Breast Cancer (Auckl) 1*, 35–49.
- Christmann, M., and Kaina, B. (2013). Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. *Nucl. Acids Res.*
- Ciucci, A., Gianferretti, P., Piva, R., Guyot, T., Snape, T.J., Roberts, S.M., and Santoro, M.G. (2006). Induction of apoptosis in estrogen receptor-negative breast cancer cells by natural and synthetic cyclopentenones: role of the I κ B kinase/nuclear factor- κ B pathway. *Mol. Pharmacol. 70*, 1812–1821.
- Colavitti, R., and Finkel, T. (2005). Reactive oxygen species as mediators of cellular senescence. *IUBMB Life 57*, 277–281.
- De Cremoux, P. (2010). Marqueurs pronostiques et prédictifs de réponse aux traitements des cancers du sein. *Bulletin Du Cancer 97*, 1297–1304.
- Cutts, S.M., Nudelman, A., Rephaeli, A., and Phillips, D.R. (2005). The Power and Potential of Doxorubicin-DNA Adducts. *IUBMB Life 57*, 73–81.
- Dan, S., Tsunoda, T., Kitahara, O., Yanagawa, R., Zembutsu, H., Katagiri, T., Yamazaki, K., Nakamura, Y., and Yamori, T. (2002). An Integrated Database of Chemosensitivity to 55 Anticancer Drugs and Gene Expression Profiles of 39 Human Cancer Cell Lines. *Cancer Res 62*, 1139–1147.
- Datta, A., Bagchi, S., Nag, A., P. Shiyonov, Adami, G.R., Yoon, T., and Raychaudhuri, P. (2001). The p48 subunit of the damaged-DNA binding protein DDB associates with the CBP/p300 family of histone acetyltransferase. *Mutat Res 486*, 89–97.
- Daubisse-Marliac, L., Delafosse, P., Boitard, J.B., Poncet, F., Grosclaude, P., and Colonna, M. (2011). Breast cancer incidence and time trend in France from 1990 to 2007: a population-based study from two French cancer registries. *Ann. Oncol. 22*, 329–334.
- Davis, J.M., Navolanic, P.M., Weinstein-Oppenheimer, C.R., Steelman, L.S., Hu, W., Konopleva, M., Blagosklonny, M.V., and McCubrey, J.A. (2003). Raf-1 and Bcl-2 induce distinct and common pathways that contribute to breast cancer drug resistance. *Clin. Cancer Res. 9*, 1161–1170.
- Dechant, M.J., Fellenberg, J., Scheuerpflug, C.G., Ewerbeck, V., and Debatin, K.-M. (2004). Mutation analysis of the apoptotic “death-receptors” and the adaptors TRADD and FADD/MORT-1 in osteosarcoma tumor samples and osteosarcoma cell lines. *Int. J. Cancer 109*, 661–667.
- Dhar, S.K., and St. Clair, D.K. (2012). Manganese superoxide dismutase regulation and cancer. *Free Radical Biology and Medicine 52*, 2209–2222.
- Dj, P., T, M., S, J., R, S., and H, A. (2001). Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. *Cell Growth Differ 12*, 129–135.

Dowsett, M., Goldhirsch, A., Hayes, D.F., Senn, H.-J., Wood, W., and Viale, G. (2007). International Web-based consultation on priorities for translational breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 9, R81.

Duan, H., Zhang, H.J., Yang, J.-Q., Oberley, L.W., Futscher, B.W., and Domann, F.E. (2003). MnSOD up-regulates maspin tumor suppressor gene expression in human breast and prostate cancer cells. *Antioxid. Redox Signal.* 5, 677–688.

Duffy, M.J. (2005). Predictive Markers in Breast and Other Cancers: A Review. *Clinical Chemistry* 51, 494–503.

E, F

Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 383–424.

Ehrich, M., Zoll, S., Sur, S., and van den Boom, D. (2007). A new method for accurate assessment of DNA quality after bisulfite treatment. *Nucleic Acids Res* 35, e29.

Emi, M., Kim, R., Tanabe, K., Uchida, Y., and Toge, T. (2005). Targeted therapy against Bcl-2-related proteins in breast cancer cells. *Breast Cancer Research* 7, R940.

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- κ B and breast tumor invasion. *Cancer Res.*

Eschenbrenner, J., Winsel, S., Hammer, S., Sommer, A., Mittelstaedt, K., Drosch, M., Klar, U., Sachse, C., Hannus, M., Seidel, M., et al. (2011). Evaluation of activity and combination strategies with the microtubule-targeting drug sagopilone in breast cancer cell lines. *Front. Oncol.* 1, 44.

Estaquier, J., Vallette, F., Vayssiere, J.-L., and Mignotte, B. (2012). The Mitochondrial Pathways of Apoptosis. In *Advances in Mitochondrial Medicine*, R. Scatena, P. Bottoni, and B. Giardina, eds. (Springer Netherlands), pp. 157–183.

Fantozzi, A., Gruber, D.C., Pisarsky, L., Heck, C., Kunita, A., Yilmaz, M., Meyer-Schaller, N., Cornille, K., Hopfer, U., Bentires-Alj, M., et al. (2014). VEGF-Mediated Angiogenesis Links EMT-Induced Cancer Stemness to Tumor Initiation. *Cancer Res.* 74, 1566–1575.

Ferguson, A.T., Lapidus, R.G., Baylin, S.B., and Davidson, N.E. (1995). Demethylation of the Estrogen Receptor Gene in Estrogen Receptor-negative Breast Cancer Cells Can Reactivate Estrogen Receptor Gene Expression. *Cancer Res* 55, 2279–2283.

Fischer, U., Jänicke, R.U., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 10, 76–100.

Fulda, S. (2009). Tumor resistance to apoptosis. *Int. J. Cancer* 124, 511–515.

Fulda, S., and Debatin, K.-M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25, 4798–4811.

G, H

Gadal, F., Starzec, A., Bozic, C., Pillot-Brochet, C., Malinge, S., Ozanne, V., Vicenzi, J., Buffat, L., Perret, G., Iris, F., et al. (2005). Integrative analysis of gene expression patterns predicts specific modulations of defined cell functions by estrogen and tamoxifen in MCF7 breast cancer cells. *J. Mol. Endocrinol.* *34*, 61–75.

Galluzzi, L., Aaronson, S.A., Abrams, J., Alnemri, E.S., Andrews, D.W., Baehrecke, E.H., Bazan, N.G., Blagosklonny, M.V., Blomgren, K., Borner, C., et al. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.* *16*, 1093–1107.

Gariboldi, M.B., Ravizza, R., Molteni, R., Osella, D., Gabano, E., and Monti, E. (2007). Inhibition of Stat3 increases doxorubicin sensitivity in a human metastatic breast cancer cell line. *Cancer Lett* *258*, 181–188.

Gewirtz, D. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology* *57*, 727–741.

Gewirtz, D.A. (2014). The Four Faces of Autophagy: Implications for Cancer Therapy. *Cancer Res.*

Ghavami, S., Hashemi, M., Ande, S.R., Yeganeh, B., Xiao, W., Eshraghi, M., Bus, C.J., Kadkhoda, K., Wiechec, E., Halayko, A.J., et al. (2009). Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet* *46*, 497–510.

Giacinti, L., Claudio, P.P., Lopez, M., and Giordano, A. (2006). Epigenetic Information and Estrogen Receptor Alpha Expression in Breast Cancer. *The Oncologist* *11*, 1–8.

Gouazé, V., Mirault, M.-E., Carpentier, S., Salvayre, R., Levade, T., and Andrieu-Abadie, N. (2001). Glutathione Peroxidase-1 Overexpression Prevents Ceramide Production and Partially Inhibits Apoptosis in Doxorubicin-Treated Human Breast Carcinoma Cells. *Mol Pharmacol* *60*, 488–496.

Gouazé, V., Liu, Y.-Y., Prickett, C.S., Yu, J.Y., Giuliano, A.E., and Cabot, M.C. (2005). Glucosylceramide Synthase Blockade Down-Regulates P-Glycoprotein and Resensitizes Multidrug-Resistant Breast Cancer Cells to Anticancer Drugs. *Cancer Res* *65*, 3861–3867.

Han, C., Zhao, R., Liu, X., Srivastava, A., Gong, L., Mao, H., Qu, M., Zhao, W., Yu, J., and Wang, Q.-E. (2014). DDB2 Suppresses Tumorigenicity by Limiting the Cancer Stem Cell Population in Ovarian Cancer. *Mol Cancer Res* molcanres.0638.2013.

Handy, D.E., and Loscalzo, J. (2012). Redox Regulation of Mitochondrial Function. *Antioxid Redox Signal* *16*, 1323–1367.

Hayes, S., Shiyonov, 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.

Hirakawa, M., Sato, Y., Ohnuma, H., Takayama, T., Sagawa, T., Nobuoka, T., Harada, K., Miyamoto, H., Sato, Y., Takahashi, Y., et al. (2013). A phase II study of neoadjuvant combination chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and S-1 for locally advanced resectable gastric cancer: nucleotide excision repair (NER) as potential chemoresistance marker. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *71*, 789–797.

Horsssen, R. van, Hagen, T.L.M. ten, and Eggermont, A.M.M. (2006). TNF- α in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility. *The Oncologist* *11*, 397–408.

Hortobagyi, G.N. (1998). Treatment of Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* *339*, 974–984.

Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., and Swanson, P.E. (2009). Cell Death in Disease: Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts. *N Engl J Med* *361*, 1570–1583.

Hu, Z., Fan, C., Oh, D.S., Marron, J.S., He, X., Qaqish, B.F., Livasy, C., Carey, L.A., Reynolds, E., Dressler, L., et al. (2006). The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* *7*, 96.

Hui, L., Zheng, Y., Yan, Y., Bargonetti, J., and Foster, D.A. (2006). Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D. *Oncogene* *25*, 7305–7310.

I, J

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.

Ishikawa, M., Miyauchi, T., and Kashiwagi, Y. (2008). Clinical implications of thymidylate synthetase, dihydropyrimidine dehydrogenase and orotate phosphoribosyl transferase activity levels in colorectal carcinoma following radical resection and administration of adjuvant 5-FU chemotherapy. *BMC Cancer* *8*, 188.

Itoh, T., Nichols, A., and Linn, S. (2001). Abnormal regulation of DDB2 gene expression in xeroderma pigmentosum group E strains. *Oncogene* *20*, 7041–7050.

Itoh, T., O'Shea, C., and Linn, S. (2003). Impaired Regulation of Tumor Suppressor p53 Caused by Mutations in the Xeroderma Pigmentosum DDB2 Gene: Mutual Regulatory Interactions between p48DDB2 and p53. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 7540–7553.

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.

Järvinen, T.A.H., Tanner, M., Rantanen, V., Bärlund, M., Borg, Å., Grénman, S., and Isola, J. (2000). Amplification and Deletion of Topoisomerase II α Associate with ErbB-2 Amplification and Affect Sensitivity to Topoisomerase II Inhibitor Doxorubicin in Breast Cancer. *The American Journal of Pathology* *156*, 839–847.

Jassem, J., Pieńkowski, T., Płuzañska, A., Jelic, S., Gorbunova, V., Mrcic-Krmpotic, Z., Berzins, J., Nagykalnai, T., Wigler, N., Renard, J., et al. (2001). Doxorubicin and Paclitaxel Versus Fluorouracil, Doxorubicin, and Cyclophosphamide as First-Line Therapy for Women With Metastatic Breast Cancer: Final Results of a Randomized Phase III Multicenter Trial. *JCO* *19*, 1707–1715.

Jennifer S Carew, S.T.N. (2007). Modulating autophagy for therapeutic benefit. *Autophagy* *3*, 464–467.

K, L

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

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

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

Kaufmann, S.H., and Earnshaw, W.C. (2000). Induction of Apoptosis by Cancer Chemotherapy. *Experimental Cell Research* *256*, 42–49.

Kim, M.-J., Kim, D.-H., Jung, W.-H., and Koo, J.-S. (2013). Expression of metabolism-related proteins in triple-negative breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol* *7*, 301–312.

Kinnula, V.L., and Crapo, J.D. (2004). Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radical Biology and Medicine* *36*, 718–744.

Knoop, A.S., Knudsen, H., Balslev, E., Rasmussen, B.B., Overgaard, J., Nielsen, K.V., Schonau, A., Gunnarsdóttir, K., Olsen, K.E., Mouridsen, H., et al. (2005). retrospective analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J. Clin. Oncol.* *23*, 7483–7490.

Koch, C.M., Andrews, R.M., Flicek, P., Dillon, S.C., Karaoz, U., Clelland, G.K., Wilcox, S., Beare, D.M., Fowler, J.C., Couttet, P., et al. (2007). The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines. *Genome Res* *17*, 691–707.

Kroemer, G. (2006). Mitochondria in cancer. *Oncogene* *25*, 4630–4632.

Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiological Reviews* *87*, 99–163.

- Kumar, A.P., Loo, S.Y., Shin, S.W., Tan, T.Z., Eng, C.B., Singh, R., Putti, T.C., Ong, C.W., Salto-Tellez, M., Goh, B.C., et al. (2014). Manganese superoxide dismutase is a promising target for enhancing chemosensitivity of Basal-like breast carcinoma. *Antioxid. Redox Signal.* *20*, 2326–2346.
- Kuznetsov, A.V., Margreiter, R., Amberger, A., Saks, V., and Grimm, M. (2011). Changes in mitochondrial redox state, membrane potential and calcium precede mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1813*, 1144–1152.
- Lacroix, M., Toillon, R.-A., and Leclercq, G. (2006). p53 and breast cancer, an update. *Endocr Relat Cancer* *13*, 293–325.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
- Lee, H.C., and Wei, Y.H. (2009). Mitochondrial DNA instability and metabolic shift in human cancers. *Int J Mol Sci* *10*, 674–701.
- Lehmann, A.R., McGibbon, D., and Stefanini, M. (2011). Xeroderma pigmentosum. *Orphanet J Rare Dis* *6*, 70.
- LeRoith, D., and Roberts Jr, C.T. (2003). The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Letters* *195*, 127–137.
- Li, F., and Sethi, G. (2010). Targeting transcription factor NF- κ B to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* *1805*, 167–180.
- Li, X., Kong, X., Kong, X., Wang, Y., Yan, S., and Yang, Q. (2013). 53BP1 Sensitizes Breast Cancer Cells to 5-Fluorouracil. *PLoS ONE* *8*, e74928.
- Lim, L.Y., Vidnovic, N., Ellisen, L.W., and Leong, C.-O. (2009). Mutant p53 mediates survival of breast cancer cells. *Br J Cancer* *101*, 1606–1612.
- Liu, J., Lin, M., Zhang, C., Wang, D., Feng, Z., and Hu, W. (2012). TAp63 γ enhances nucleotide excision repair through transcriptional regulation of DNA repair genes. *DNA Repair* *11*, 167–176.
- Lodygin, D., Epanchintsev, A., Menssen, A., Diebold, J., and Hermeking, H. (2005). Functional Epigenomics Identifies Genes Frequently Silenced in Prostate Cancer. *Cancer Res* *65*, 4218–4227.
- Van Loo, G., Schotte, P., van Gorp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K., Rodriguez, I., Ruiz-Carrillo, A., Vandekerckhove, J., Declercq, W., et al. (2001). Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ.* *8*, 1136–1142.
- Löwe, J., Li, H., Downing, K.H., and Nogales, E. (2001). Refined structure of $\alpha\beta$ -tubulin at 3.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* *313*, 1045–1057.

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

Lyu, Y.L., Kerrigan, J.E., Lin, C.-P., Azarova, A.M., Tsai, Y.-C., Ban, Y., and Liu, L.F. (2007). Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Res.* 67, 8839–8846.

M, N

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.

McPherson, K., Steel, C.M., and Dixon, J.M. (2000). Breast cancer--epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 321, 624–628.

Mechetner, E., Kyshtoobayeva, A., Zonis, S., Kim, H., Stroup, R., Garcia, R., Parker, R.J., and Fruehauf, J.P. (1998). Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin. *Clin. Cancer Res.* 4, 389–398.

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. *Nucl. Acids Res.* 41, 5692–5703.

Mestre-Escorihuela, C., Rubio-Moscardo, F., Richter, J.A., Siebert, R., Climent, J., Fresquet, V., Beltran, E., Agirre, X., Marugan, I., Marín, M., et al. (2007). Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood* 109, 271–280.

Mickaël Michaud, I.M. (2011). Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science (New York, N.Y.)* 334, 1573–1577.

Minig, V., Kattan, Z., van Beeumen, J., Brunner, E., and Becuwe, P. (2009). Identification of DDB2 protein as a transcriptional regulator of constitutive SOD2 gene expression in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 284, 14165–14176.

Mohn, F., Weber, M., Schübeler, D., and Roloff, T.-C. (2009). Methylated DNA Immunoprecipitation (MeDIP). In *DNA Methylation*, J. Tost, ed. (Humana Press), pp. 55–64.

Molnar-Stanciu, D., Guimas, V., Bensalem, A., and Thiery-Vuillemin, A. (2012). Thérapie ciblée et cancer du sein : état de l'art. *Pathologie Biologie* 60, 254–263.

Moscow, J.A., Townsend, A.J., and Cowan, K.H. (1989). Elevation of pi class glutathione S-transferase activity in human breast cancer cells by transfection of the GST pi gene and its effect on sensitivity to toxins. *Mol. Pharmacol.* 36, 22–28.

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.

Nakayama, S., Torikoshi, Y., Takahashi, T., Yoshida, T., Sudo, T., Matsushima, T., Kawasaki, Y., Katayama, A., Gohda, K., Hortobagyi, G.N., et al. (2009). Prediction of paclitaxel sensitivity by CDK1 and CDK2 activity in human breast cancer cells. *Breast Cancer Research* 11, R12.

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.

Notte, A., Leclere, L., and Michiels, C. (2011). Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer. *Biochemical Pharmacology* 82, 427–434.

O, P

Oberley, L.W. (2005). Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed. Pharmacother.* 59, 143–148.

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

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

Orr, G.A., Verdier-Pinard, P., McDaid, H., and Horwitz, S.B. (2003). Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 22, 7280–7295.

Osborne, C.K., and Schiff, R. (2011). MECHANISMS OF ENDOCRINE RESISTANCE IN BREAST CANCER. *Annu Rev Med* 62, 233–247.

Otrin, V.R., McLenigan, M., Takao, M., Levine, A.S., and Protic, M. (1997). Translocation of a UV-damaged DNA binding protein into a tight association with chromatin after treatment of mammalian cells with UV light. *J Cell Sci* 110 (Pt 10), 1159–1168.

Ozkan, C., Gumuskaya, B., Yaman, S., Aksoy, S., Guler, G., and Altundag, K. (2012). ERCC1 expression in triple negative breast cancer. *J BUON* 17, 271–276.

Ozoren, N., and El-Deiry, W.S. (2002). Defining Characteristics of Types I and II Apoptotic Cells in Response to TRAIL. *Neoplasia* 4, 551–557.

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.

Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., and Paradies, G. (2003). Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *FASEB J* 17, 2202–2208.

Petruseva, I.O., Evdokimov, A.N., and Lavrik, O.I. (2014). Molecular Mechanism of Global Genome Nucleotide Excision Repair. *Acta Naturae* 6, 23–34.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.

Phillips, G.D.L., Li, G., Dugger, D.L., Crocker, L.M., Parsons, K.L., Mai, E., Blättler, W.A., Lambert, J.M., Chari, R.V.J., Lutz, R.J., et al. (2008). Targeting HER2-Positive Breast Cancer with Trastuzumab-DM1, an Antibody–Cytotoxic Drug Conjugate. *Cancer Res* 68, 9280–9290.

Platet, N., Cathiard, A.M., Gleizes, M., and Garcia, M. (2004). Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 51, 55–67.

Pleasance, E.D., Cheetham, R.K., Stephens, P.J., McBride, D.J., Humphray, S.J., Greenman, C.D., Varela, I., Lin, M.-L., Ordóñez, G.R., Bignell, G.R., et al. (2010a). A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* 463, 191–196.

Pleasance, E.D., Stephens, P.J., O’Meara, S., McBride, D.J., Meynert, A., Jones, D., Lin, M.-L., Beare, D., Lau, K.W., Greenman, C., et al. (2010b). A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure. *Nature* 463, 184–190.

Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X., and Perou, C.M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research* 12, R68.

Pritchard, K.I., Messersmith, H., Elavathil, L., Trudeau, M., O’Malley, F., and Dhesy-Thind, B. (2008). HER-2 and Topoisomerase II As Predictors of Response to Chemotherapy. *JCO* 26, 736–744.

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.

R, S

Radisky, E.S., and Radisky, D.C. (2010). Matrix Metalloproteinase-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15, 201–212.

Rapic-Otrin, V., Navazza, V., Nardo, T., Botta, E., McLenigan, M., Bisi, D.C., Levine, A.S., and Stefanini, M. (2003). True XP group E patients have a defective UV-damaged DNA binding protein complex and mutations in DDB2 which reveal the functional domains of its p48 product. *Hum Mol Genet* 12, 1507–1522.

Rath, P.C., and Aggarwal, B.B. (1999). TNF-Induced Signaling in Apoptosis. *J Clin Immunol* 19, 350–364.

- Reardon, J.T., and Sancar, A. (2003). Recognition and repair of the cyclobutane thymine dimer, a major cause of skin cancers, by the human excision nuclease. *Genes Dev* *17*, 2539–2551.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., and Aggarwal, B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med* *49*, 1603–1616.
- Riggins, R.B., Bouton, A.H., Liu, M.C., and Clarke, R. (2005). Antiestrogens, aromatase inhibitors, and apoptosis in breast cancer. *Vitam. Horm.* *71*, 201–237.
- Robu, M., Shah, R.G., Petitclerc, N., Brind'Amour, J., Kandan-Kulangara, F., and Shah, G.M. (2013). Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the removal of UV-induced DNA lesions by nucleotide excision repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 1658–1663.
- 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.
- Rutgers, E., Piccart-Gebhart, M.J., Bogaerts, J., Delalogue, S., Veer, L.V. 't, Rubio, I.T., Viale, G., Thompson, A.M., Passalacqua, R., Nitz, U., et al. (2011). The EORTC 10041/BIG 03-04 MINDACT trial is feasible: results of the pilot phase. *Eur. J. Cancer* *47*, 2742–2749.
- Sánchez-Tilló, E., Lázaro, A., Torrent, R., Cuatrecasas, M., Vaquero, E.C., Castells, A., Engel, P., and Postigo, A. (2010). ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. *Oncogene* *29*, 3490–3500.
- Scaltriti, M., Rojo, F., Ocaña, A., Anido, J., Guzman, M., Cortes, J., Cosimo, S.D., Matias-Guiu, X., Cajal, S.R. y, Arribas, J., et al. (2007). Expression of p95HER2, a Truncated Form of the HER2 Receptor, and Response to Anti-HER2 Therapies in Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* *99*, 628–638.
- Scrima, A., Konícková, R., Czyzewski, B.K., Kawasaki, Y., Jeffrey, P.D., Groisman, R., Nakatani, Y., Iwai, S., Pavletich, N.P., and Thomä, N.H. (2008). Structural basis of UV DNA-damage recognition by the DDB1-DDB2 complex. *Cell* *135*, 1213–1223.
- Seitz, S., Wassmuth, P., Fischer, J., Nothnagel, A., Jandrig, B., Schlag, P.M., and Scherneck, S. (2002). Mutation analysis and mRNA expression of trail-receptors in human breast cancer. *Int. J. Cancer* *102*, 117–128.
- Shinoura, N., Yamamoto, N., Yoshida, Y., Fujita, T., Saito, N., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. (2000). Adenovirus-mediated gene transduction of IkappaB or IkappaB plus Bax gene drastically enhances tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis in human gliomas. *Jpn. J. Cancer Res.* *91*, 41–51.

Singh, A., and Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29, 4741–4751.

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.

Stanculescu, A., Bembinster, L.A., Borgen, K., Bergamaschi, A., Wiley, E., and Frasor, J. (2010). Estrogen promotes breast cancer cell survival in an inhibitor of apoptosis (IAP)-dependent manner. *Horm Cancer* 1, 127–135.

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

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.

Sugioka, K., Nakano, M., Totsune-Nakano, H., Minakami, H., Tero-Kubota, S., and Ikegami, Y. (1988). Mechanism of O₂- generation in reduction and oxidation cycle of ubiquinones in a model of mitochondrial electron transport systems. *Biochim Biophys Acta* 936, 377–385.

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

Suresh, A., Guedez, L., Moreb, J., and Zucali, J. (2003). Overexpression of manganese superoxide dismutase promotes survival in cell lines after doxorubicin treatment. *British Journal of Haematology* 120, 457–463.

T, U

Tagawa, H., Karnan, S., Suzuki, R., Matsuo, K., Zhang, X., Ota, A., Morishima, Y., Nakamura, S., and Seto, M. (2005). Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene* 24, 1348–1358.

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.

Tamatani, T. (2012). Antitumor efficacy of sequential treatment with docetaxel and 5-fluorouracil against human oral cancer cells. *International Journal of Oncology*.

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 (Amst)* 1, 601–616.

Tapia, M.A., González-Navarrete, I., Dalmases, A., Bosch, M., Rodríguez-Fanjul, V., Rolfe, M., Ross, J.S., Mezquita, J., Mezquita, C., Bachs, O., et al. (2007). Inhibition of the Canonical IKK/NF- κ B Pathway Sensitizes Human Cancer Cells to Doxorubicin. *Cell Cycle* 6, 2284–2292.

Trachootham, D., Alexandre, J., and Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 8, 579–591.

Tsuge, M., Masuda, Y., Kaneoka, H., Kidani, S., Miyake, K., and Iijima, S. (2013). SUMOylation of damaged DNA-binding protein DDB2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.

Upadhyay, A.K., Singh, S., Chhipa, R.R., Vijayakumar, M.V., Ajay, A.K., and Bhat, M.K. (2006). Methyl- β -cyclodextrin enhances the susceptibility of human breast cancer cells to carboplatin and 5-fluorouracil: Involvement of Akt, NF- κ B and Bcl-2. *Toxicology and Applied Pharmacology* 216, 177–185.

V, W, X, Y, Z

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.

Viatour, P., Bentires-Alj, M., Chariot, A., Derogowski, V., de Leval, L., Merville, M.-P., and Bours, V. (2003). NF- κ B2/p100 induces Bcl-2 expression. *Leukemia* 17, 1349–1356.

Wakasugi, M., Shimizu, M., Morioka, H., Linn, S., Nikaido, O., and Matsunaga, T. (2001). Damaged DNA-binding protein DDB stimulates the excision of cyclobutane pyrimidine dimers in vitro in concert with XPA and replication protein A. *J. Biol. Chem.* 276, 15434–15440.

Wang, H., Zhai, L., Xu, J., Joo, H.Y., Jackson, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Xiong, Y., and Zhang, Y. (2006). Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol Cell* 22, 383–394.

Wang, H.-L., Bai, H., Li, Y., Sun, J., and Wang, X.-Q. (2007). Rationales for expression and altered expression of apoptotic protease activating factor-1 gene in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 13, 5060–5064.

Wang, W., Cassidy, J., O'Brien, V., Ryan, K.M., and Collie-Duguid, E. (2004). Mechanistic and Predictive Profiling of 5-Fluorouracil Resistance in Human Cancer Cells. *Cancer Res* 64, 8167–8176.

Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Ying, X., and Zhou, B.P. (2013). The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets* 13, 963–972.

Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309–314.

Wei, Y., Fan, T., and Yu, M. (2008). Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 40, 278–288.

- Weigelt, B., Horlings, H.M., Kreike, B., Hayes, M.M., Hauptmann, M., Wessels, L.F.A., de Jong, D., Van de Vijver, M.J., Van't Veer, L.J., and Peterse, J.L. (2008). Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J. Pathol.* *216*, 141–150.
- Wildiers, H., Forceville, K., Paridaens, R., and Joensuu, H. (2010). Taxanes and anthracyclines in early breast cancer: which first? *The Lancet Oncology* *11*, 219–220.
- Wong, S.W., Tiong, K.H., Kong, W.Y., Yue, Y.C., Chua, C.H., Lim, J.Y., Lee, C.Y., Quah, S.I., Fow, C., Chung, C., et al. (2011). Rapamycin synergizes cisplatin sensitivity in basal-like breast cancer cells through up-regulation of p73. *Breast Cancer Res Treat* *128*, 301–313.
- Xiao, C.W., Yan, X., Li, Y., Reddy, S.A.G., and Tsang, B.K. (2003). Resistance of human ovarian cancer cells to tumor necrosis factor alpha is a consequence of nuclear factor kappaB-mediated induction of Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme-like inhibitory protein. *Endocrinology* *144*, 623–630.
- Yoon, T., Chakraborty, A., Franks, R., Valli, T., Kiyokawa, H., and Raychaudhuri, P. (2005). Tumor-prone phenotype of the DDB2-deficient mice. *Oncogene* *24*, 469–478.
- 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.* *12*, 370–380.
- Zubair, A., and Frieri, M. (2013). Role of Nuclear Factor- κ B in Breast and Colorectal Cancer. *Curr Allergy Asthma Rep* *13*, 44–49.

ANNEXE I : CURRICULUM VITEA

Rémi KLOTZ

Doctorant – Biologie & Santé

PARCOURS UNIVERSITAIRE

- **2010-2014** : Doctorant en Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Lorraine, France. Travaux dirigés par le Prof. Philippe Bécuwe et le Dr. Stéphanie Grandemange.
- **2008-2010** : Master en Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Lorraine, France.
- **2005-2008** : Licence en Sciences du Vivant et de la Santé, Université de Lorraine, France.

EXPERIENCE EN RECHERCHE

- **2010-2014** : Université de Lorraine – CNRS, UMR7039 CRAN, doctorant.
Titre du projet : Rôle de la protéine DDB2 dans la réponse des cellules tumorales mammaires aux agents thérapeutiques.
Direction scientifique : Prof. Philippe Bécuwe et Dr. Stéphanie Grandemange
- **2010** : Université de Lorraine – CNRS, UMR7039 CRAN, Master 2nd année.
Titre du projet : Influence de la protéine DDB2 sur la réponse des cellules tumorales mammaires aux agents anticancéreux.
Direction scientifique : Prof. Philippe Bécuwe et Dr. Stéphanie Grandemange
- **2009** : Université de Lorraine – Laboratoire SiGReTO EA4421, Master 1^{ère} année.
Titre du projet : Expression et importance de la sémaphorine 6B, un nouveau gène cible des PPAR dans les gliomes humains.
Direction scientifique : Dr. Lionel Domenjoud

COMMUNICATIONS

Publications :

Becuwe, B., Ennen, M., **Klotz, R.**, Barbieux, B., and Grandemange, S. (2014). Manganese superoxide dismutase in breast cancer: from molecular mechanisms of gene regulation to biological and clinical significance. *Free Radical Biology & Medicine*. (Accepted)

Brie, D*., **Klotz, R***., Miron, S., Moussaoui, S., Mustin, C., Bécuwe, P., and Grandemange, S. (2014). Joint analysis of flow cytometry data and fluorescence spectra as a non-negative array factorization problem. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* *137*, 21–32.

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-kB and breast tumor invasion. *Cancer Res* 15;73(16):5040-52

Klotz, R., Barbieux, C., Besancenot, V., Brunner, E., Pinel, S., Bécuwe, P., Grandemange, S. DDB2 enhances the sensitivity of human breast cancer to chemotherapy by regulating its target genes expression. *Écriture en cours*

Klotz, R., Besancenot, V., Brunner, E., Bécuwe, P., Grandemange, S. DDB2: a new regulator of metabolism in breast cancer cells. *Écriture en cours*

*Equal contribution

Communication Orale :

Klotz R., Besancenot V., Brunner E., Bécuwe P. and Grandemange S. La protéine DDB2: un nouveau régulateur de la chimiosensibilité dans les cancers du sein. **Journée Recherche « Cancérologie en Lorraine »** Institut de Cancérologie de Lorraine. 26 Septembre 2014.

Posters :

Klotz R., Besancenot V., Brunner E., Bécuwe P. and Grandemange S. DDB2 a new regulator of mitochondrial metabolism and sensitivity to cell death in human breast tumor cells. **ONCOTRANS Congress** 27-28 June 2013, Reims

Klotz R., Besancenot V., Brunner E., Bécuwe P., Grandemange S., 2012. DDB2: a new regulator of metabolism and cell death in human breast cancer cells. **CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium**. San Antonio (US-TX) 04-08 December 2012. Poster selected and abstract published in *Cancer Research* P6-01-04, 15 Dec. 2012; (72) 24 supplement 3: 487

Klotz R., Ennen M., Besancenot V., Brunner E., Touche N., Domenjoud L., Bécuwe P. and Grandemange S. DDB2 a new regulator of metabolism and cell death in human breast tumor cells. **Journée Biomédicale** 2 March 2012, Nancy

Klotz R., Besancenot V., Brunner E., Bécuwe P. and Grandemange S. DDB2 a new regulator of mitochondrial metabolism and sensitivity to cell death in human breast tumor cells. **ONCOTRANS Congress** 8-9 September 2011, Nancy

ANNEXE II : RESUMES DES PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Article 1.

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

Becuwe, B., Ennen, M., **Klotz, R.**, Barbieux, B., and Grandemange, S. (2014). *Free Radical Biology & Medicine*. (Accepted)

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 (O₂⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂). 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.

Article 2.

Joint analysis of flow cytometry data and fluorescence spectra as a non-negative array factorization problem.

Brie, D*, **Klotz, R***, Miron, S., Moussaoui, S., Mustin, C., Bécuwe, P., and Grandemange, S. (2014). *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 137, 21–32.

The paper presents a novel approach to the processing of flow cytometry data sequences. It consists in decomposing a sequence of multidimensional probability density functions by using the multilinear block tensor decomposition approach [1,2]. Also a formal link between flow cytometry data and fluorescence spectra is provided allowing the joint processing of both data. To illustrate the effectiveness of the approach, a study of the T47D cell line mitochondrial membrane potential as a function of the CCCP decoupling agent concentration is performed. The main advantages of the method are: (i) the flow cytometry data compensation is no longer necessary, and (ii) the cell sorting capacity of the method is significantly improved as compared to classical clustering methods. As a byproduct, it was

possible to observe directly on the result of the processing, the dependence of the cell mitochondrial membrane potential with respect to the cell cycle phase. The proposed method is quite general provided that it is possible to design an experiment allowing the observation of the response of cell populations to an environmental/chemical/biological parameter.

Article 3.

DDB2: a novel regulator of NF- κ B 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., Domenjoud L, Abecassis J, Plénat F, Grandemange S, Becuwe P (2013). *Cancer Res* 15;73(16):5040-52

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- κ B and the expression of its target matrix metalloprotease 9 (MMP9). Mechanistic investigations indicated that DDB2 decreased NF- κ B activity by upregulating expression of I κ B α by binding the proximal promoter of this gene. This effect was causally linked to invasive capacity. Indeed, knockdown of DDB2-induced I κ B α gene expression restored NF- κ B 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.

* These authors contributed equally to this work

RESUME

Dans les cancers du sein, la progression tumorale suite à l'échappement aux thérapies reste une préoccupation permanente en cancérologie clinique. Ceci réside dans le manque de marqueurs biologiques prédictifs suffisamment fiables et la connaissance des mécanismes moléculaires responsables. Le laboratoire a récemment identifié la protéine Damaged-DNA-Binding 2 (DDB2), connue à l'origine pour son rôle dans la réparation de l'ADN endommagé par les rayonnements UV, comme une protéine impliquée dans la tumorigenèse mammaire. En effet, nous avons montré son rôle dans la croissance et la progression des tumeurs mammaires via la régulation transcriptionnelle de gènes cibles, comme celui codant IkappaBalpha (IkB α), l'inhibiteur cytoplasmique du facteur de transcription NF- κ B. A la suite de ces travaux, nous avons voulu déterminer le rôle de DDB2 et de ses gènes cibles dans la réponse des cellules tumorales mammaires aux agents anticancéreux. Ainsi, nous avons montré que la surexpression de DDB2 augmente la sensibilité des cellules tumorales MDA-MB231 et SKBr3 traitées à la doxorubicine et au 5-fluorouracile (5-FU), à la fois *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de xénogreffes chez la souris *nude*. Inversement, l'inhibition de l'expression de DDB2 dans les cellules T47D qui l'expriment naturellement s'accompagne d'une baisse de la sensibilité à ces agents anticancéreux. De la même manière, nous avons également observé que la surexpression de DDB2 entraîne une plus grande sensibilité des cellules tumorales mammaires à une cytokine pro-apoptotique, le TNF α .

Afin de comprendre comment DDB2 exerce cette activité chimiosensibilisante, nous avons recherché le ou les mécanisme(s) moléculaire(s) impliqué(s) dans ces processus. Sur la base de résultats d'analyses transcriptomiques ayant montré une expression variable de nombreux gènes codant des protéines impliquées dans la régulation du métabolisme cellulaire en fonction du niveau d'expression de DDB2, nous avons étudié le métabolisme de ces cellules. Un dysfonctionnement de l'activité mitochondriale associé à une augmentation de la glycolyse et de la production de dérivés réactifs de l'oxygène a bien été observé mais uniquement dans un seul de nos modèles cellulaires surexprimant DDB2. Ces résultats suggèrent donc que la sensibilité aux agents anticancéreux ne dépend pas du statut métabolique des cellules exprimant DDB2. De part le rôle de DDB2 dans la régulation du facteur de transcription NF- κ B, connu pour son rôle dans la réponse aux agents anticancéreux, nous avons vérifié si son inhibition en présence de DDB2 pourrait être à l'origine de la sensibilité des cellules aux thérapies. Nos résultats montrent que la sensibilité des cellules au 5-FU mais pas à la doxorubicine, lorsque DDB2 est surexprimée, dépend en partie du contrôle négatif qu'exerce cette dernière sur l'activité de NF- κ B, en régulant positivement l'expression d'IkB α . Enfin, la recherche d'autres gènes cibles de DDB2, impliqués dans l'apoptose, nous a conduits à celui codant le facteur anti-apoptotique Bcl-2. Nous avons montré que DDB2 agit négativement sur l'expression de Bcl-2 dans les cellules tumorales mammaires, en interagissant avec une région de l'ADN localisée dans le promoteur P2 du gène correspondant. Cette action négative de DDB2 sur l'expression de Bcl-2 est associée à une diminution des acétylations des histones H3. De part, son rôle anti-apoptotique, la régulation de son expression pourrait bien être à l'origine de la sensibilité aux agents anticancéreux induite par DDB2.

L'ensemble de ces résultats met donc en évidence l'intérêt clinique de DDB2 comme marqueur prédictif intéressant de la réponse aux agents anticancéreux, et devrait contribuer dans l'avenir à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'échappement des cellules tumorales aux thérapies.

Mots clés : Damaged-DNA-Binding 2 (DDB2) ; cancer du sein ; agents anticancéreux ; Bcl-2 ; NF- κ B.

ABSTRACT

In breast cancers, tumor progression that arises after treatment failure is a major concern in clinical oncology. Researches in this field have been focusing on the understanding of molecular processes that are involved in cancer therapy resistance. Indeed, a better comprehension of these phenomenon can lead to the discovery of new reliable predictive markers that would allow to adapt patient treatment. In this line, the laboratory has recently identified the Damaged-DNA Binding 2 protein (DDB2), a protein involved in DNA repair, as an important actor in breast tumorigenesis. Our laboratory has shown that DDB2 is involved in breast tumor growth and progression through the transcriptional regulation of target genes (*eg* IkB α , NF- κ B, SODMn). Thus, the first aim of this work was to study the role of DDB2 and its target genes in the response of breast cancer cells to anticancer drugs. We showed that DDB2 overexpressed in breast cancer cell lines, such as MDA-MB231 and SKBr3, increased the cells sensitivity to apoptosis induced by doxorubicin and 5-Fluorouracil (5-FU), both *in vitro* and *in vivo* in a mouse xenograft model. Conversely, the inhibition of DDB2 expression in T47D cells, which express endogenously this protein, decreased cell sensitivity to anticancer agents. Finally, we observed that DDB2-overexpression enhanced the sensitivity of breast cancer cells to the pro-apoptotic cytokines TNF α . All these results led us to study, in a second part, the molecular mechanisms by which DDB2 impacts cell chemosensitivity.

Thus, based on a transcriptomic analysis showing that the expression level of DDB2 impacts different genes coding for factors involved in the regulation of cell metabolism, we analyzed cell metabolism. We first studied mitochondria activity to determine if its impairment could be responsible for the cell chemosensitivity induced by DDB2. Interestingly, our results demonstrated, only in MDA-MB231, an alteration of mitochondria activity correlated with an increase of glycolysis as well as reactive oxygen species production. These results suggest that breast cancer cell chemosensitivity didn't depend on the metabolic status of DDB2 expressing cells. Since NF- κ B is known to modify anticancer agent response and DDB2 is involved in NF- κ B regulation, we hypothesized that NF- κ B inhibition in the presence of DDB2 could be responsible for the observed chemosensitivity. Indeed our results showed that cell sensitivity induced by DDB2 expression to 5-FU but not doxorubicin depended on its ability to repress NF- κ B activity via the regulation of IkB α expression. At last, the search of potential DDB2 target genes implicated in apoptosis has led us to identify the anti-apoptotic factor Bcl-2. We showed the ability of DDB2 to downregulate Bcl-2 expression in breast cancer cells via its interaction with DNA region located in P2 promoter of the corresponding gene. This downregulation is correlated with a decrease of histone H3 acetylation levels. These results suggest that Bcl-2 downregulation by DDB2 could be a major event that explains the enhanced sensitivity of cancer cells to therapeutic agents.

Altogether, these data highlight the clinical interest of DDB2, as a predictive marker of the response to anticancer agents. A better understanding of its mode of action will contribute to improve therapeutic treatments and avoid their failure in resistant patients.

Keywords: Damaged-DNA-Binding 2 (DDB2) ; breast cancer ; anticancer agents ; Bcl-2 ; NF- κ B.