

# Thèse de Doctorat

Éloïse VÉQUAUD

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : **Biologie Santé**

Discipline : *Biologie cellulaire et moléculaire*

Spécialité : *Cancérologie*

Unité de recherche : *CRCNA UMR 892 INSERM – 6299 CNRS*

Soutenue le *19 Décembre 2014*

Thèse N° :

## **Etude de la réponse des cellules cancéreuses mammaires au ciblage de la Survivine par ARN interférence et inhibition pharmacologique : Mise en évidence d'une régulation de la recombinaison homologue par la Survivine**

### **JURY**

Rapporteurs : **Brigitte SOLA**, DR CNRS, EA 4652 MILPAT, Caen  
**Pascale BERTRAND**, Chercheur E5 CEA, Unité 967 CEA INSERM, Fontenay aux Rose

Examineurs : **Fabrice FLEURY**, PU 2C, UFIP, CNRS UMR 6286, Nantes  
**Valéria NAIM**, CR INSERM, UMR 8200 IGR, Villejuif

Directeur de Thèse : **Philippe JUIN**, DR INSERM, CRCNA UMR 892 INSERM – 6299 CNRS, Nantes

Co-directeur de Thèse : **Sophie BARILLÉ NION**, CR INSERM, CRCNA UMR 892 INSERM – 6299 CNRS, Nantes

## SOMMAIRE

<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>11</b>
I. Avant-propos .....	12
II. Le cancer du sein .....	14
A. <i>Aspect pathologique du cancer du sein</i> .....	14
1. Epidémiologie .....	14
2. Facteurs de risque .....	16
B. <i>Processus oncogéniques</i> .....	17
C. <i>Classification des cancers du sein</i> .....	21
1. Sous-types histologiques .....	21
2. Classification moléculaire .....	23
3. Le cancer du sein triple négatif .....	25
D. <i>Aspects cliniques des cancers du sein</i> .....	26
1. Eléments diagnostiques .....	26
a) Les stades cliniques du cancer du sein .....	26
b) Les grades anatomopathologiques du cancer du sein .....	27
2. Traitements actuels .....	28
a) La chirurgie .....	29
b) La chimiothérapie .....	29
c) La radiothérapie .....	31
d) Les thérapies ciblées .....	32
III. Voies de réparation des dommages de l'ADN .....	34
A. <i>Dommages à l'ADN et voies de réponse</i> .....	34
B. <i>Voies de réparation des lésions simple-brin de l'ADN</i> .....	36
C. <i>Voies de réparation des cassures double-brin de l'ADN</i> .....	37
1. Les voies NHEJ .....	40
a) NHEJ canonique .....	40
b) NHEJ alternative .....	41
2. La recombinaison homologue .....	42
3. Choix entre NHEJ et RH .....	43
4. Fidélité des voies de réparation et rôle en cancérologie .....	46
IV. La SURVIVINE .....	50
A. <i>Introduction</i> .....	50
1. Structure .....	50

## Sommaire

2. Isoformes .....	51
3. Expression .....	52
4. Interactions protéiques .....	53
<b>B. Régulation de la SURVIVINE .....</b>	<b>53</b>
1. Régulation génique .....	54
2. Régulation épigénétique .....	56
3. Régulation de l'ARNm .....	56
4. Régulation de la protéine SURVIVINE .....	57
<b>C. Fonctions cellulaires .....</b>	<b>58</b>
1. Cycle cellulaire .....	58
a) Le CPC .....	58
b) Rôle dans le point de contrôle mitotique .....	62
2. Survie cellulaire .....	63
<b>D. Rôle en cancérologie .....</b>	<b>66</b>
1. Facteur pronostique .....	67
2. SURVIVINE : une protéine nodale .....	67
3. Ciblage thérapeutique .....	68
a) Inhibiteurs de l'ARNm .....	68
b) Mutants dominants négatifs .....	69
c) Immunothérapie .....	70
d) Le YM155 .....	70
e) Le FL118 .....	71
f) Autres approches .....	71
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>72</b>
I. Lignées cellulaires .....	73
II. Traitements .....	74
III. Extinction et surexpression protéique .....	75
A. ARN interférence .....	75
B. Plasmides .....	76
IV. Immunoblot .....	77
V. Immunocytofluorescence .....	78
VI. Essais comètes .....	79
VII. qPCR .....	80
VIII. Analyse de l'activité de la recombinaison homologue .....	82
IX. Evaluation de la mort cellulaire .....	83
A. Marquage APO2.7-PE .....	83
B. Marquage Annexin V-FITC .....	84
X. Quantification de l'activité des CASPASES .....	84
XI. Analyse du cycle cellulaire .....	85
XII. Analyse de l'activité de promoteur .....	85

XIII. Test de formation de mammosphères .....	86
XIV. Analyse ex vivo .....	86
XV. Analyses statistiques .....	87
<b>RESULTATS .....</b>	<b>88</b>
I. La SURVIVINE, protéine génotectrice .....	89
A. La déplétion en SURVIVINE induit des dommages à l'ADN .....	89
1. La déplétion en SURVIVINE induit des cassures double-brin de l'ADN .....	90
a) La déplétion en SURVIVINE induit une augmentation de la phosphorylation de l'histone H2AX	90
b) La déplétion en SURVIVINE induit des cassures double-brin de l'ADN .....	91
c) Les dommages à l'ADN s'accumulent sous déplétion en SURVIVINE .....	92
2. Les cassures double-brin observées sont spécifiques de la déplétion en SURVIVINE .....	93
a) Différentes séquences de siRNA ciblant la SURVIVINE induisent des dommages à l'ADN .....	93
b) La surexpression ectopique de la SURVIVINE diminue les dommages à l'ADN induits par la	94
déplétion en SURVIVINE endogène .....	94
B. La déplétion en SURVIVINE altère la capacité des cellules à réparer les dommages	
à l'ADN par recombinaison homologue .....	97
1. La déplétion en SURVIVINE diminue la transcription de gènes impliqués dans la recombinaison	
homologue .....	97
2. La déplétion en SURVIVINE diminue l'expression de protéines impliquées dans la RH .....	100
3. Evaluation de l'activité de la RH sous déplétion en SURVIVINE .....	101
4. Corrélation de l'expression génique de BIRC5 avec celle de EME1, EXO1 et BLM dans les tumeurs	
primaires mammaires humaines .....	103
C. Quelles fonctions biologiques de la SURVIVINE peuvent être impliquées dans	
l'accumulation des dommages à l'ADN ? .....	108
1. Implication de la fonction de survie de la SURVIVINE dans l'augmentation des dommages à l'ADN	
108	
a) Etude de l'expression du set de gènes RH sous déplétion en XIAP .....	109
b) Effet de la déplétion en SURVIVINE sur la survenue de mort cellulaire .....	111
c) Effet de la déplétion en SURVIVINE sur l'activité des CASPASES .....	114
d) Contribution de l'activité des CASPASES l'accumulation des dommages à l'ADN .....	115
2. Implication de la fonction de la SURVIVINE sur le cycle dans la variation d'expression du set de	
gènes RH et dans l'accumulation des dommages .....	117
a) Effets de la déplétion en AURORAB ou en CDC20 sur l'expression du set de gènes RH .....	118
b) Effets de la déplétion en AURORAB ou CDC20 sur l'apparition des dommages à l'ADN .....	121
c) Effets sur le cycle cellulaire de la déplétion en SURVIVINE ou en AURORAB .....	122
d) Analyses complémentaires de la perturbation du cycle cellulaire sous déplétion en SURVIVINE,	
en AURORAB ou CDC20 .....	124
e) Survenue des dommages à l'ADN au cours du cycle cellulaire .....	126
f) Expression du set de gènes RH après traitement avec l'AZD1152, inhibiteur pharmacologique de	
l'activité kinase d'AURORAB .....	126
g) Effet de l'AZD1152 sur le cycle cellulaire .....	129

## Sommaire

3. Expression du set de gènes RH sous déplétion en BRCA1 .....	132
<b>D. Conséquences fonctionnelles de la déplétion en SURVIVINE .....</b>	<b>133</b>
1. Etude de la voie p53 .....	133
a) Expression de p53 et de ses cibles transcriptionnelles sous déplétion en SURVIVINE.....	133
b) Expression de p53 et de ses cibles transcriptionnelles sous déplétion en AURORAB .....	136
c) Expression génique des cibles transcriptionnelles de p53 .....	138
d) Effet de l'activité des CASPASES sur l'activation de la voie p53 .....	139
2. Effet de l'Olaparib, inhibiteur de PARP-1 sur les cellules déplétées en SURVIVINE .....	141
<b>II. YM155 : Inhibiteur pharmacologique de la SURVIVINE .....</b>	<b>144</b>
<b>A. YM155 : Inducteur de mort cellulaire .....</b>	<b>145</b>
<b>B. YM155 : inhibiteur de l'expression de protéines .....</b>	<b>146</b>
1. YM155 : inhibiteur de l'expression de la SURVIVINE.....	146
2. YM155 : inhibiteur de l'expression de MCL-1 .....	147
3. Effet de la co-déplétion en MCL-1 et SURVIVINE sur la mort cellulaire .....	147
<b>C. Voies cellulaires impliquées dans la mort induite par le YM155 .....</b>	<b>149</b>
1. La mort cellulaire induite par le YM155 est n'est pas dépendante des CASPASES, ni de la kinase RIP1149	
2. L'autophagie est nécessaire à la mort induite par le YM155 .....	151
3. La voie NF-kB est impliquée dans la mort induite par le YM155 .....	153
<b>D. Modifications des voies de signalisation et mécanismes cellulaires induits par le YM155 .....</b>	<b>158</b>
1. Effet du YM155 sur des acteurs de l'apoptose .....	158
a) Activation de la CASPASE 3 après traitement au YM155 .....	158
b) Clivage de BAX sous traitement YM155 .....	159
2. Le YM155 active le flux autophagique .....	161
<b>E. YM155 : Agent génotoxique .....</b>	<b>165</b>
1. Effet du YM155 sur l'induction des dommages à l'ADN.....	165
2. Le traitement par le YM155 déclenche le recrutement des marqueurs précoces des dommages à l'ADN .....	166
3. Activation de la voie de réponse p53 et modification du cycle cellulaire .....	168
a) Effet du YM155 sur l'expression de p53 et de ses cibles transcriptionnelles .....	168
b) Effet du YM155 et des inhibiteurs de la mort cellulaire sur le cycle cellulaire.....	170
<b>F. Effet de l'extinction du facteur de transcription ILF3 sur la mort et le cycle cellulaire .....</b>	<b>172</b>
1. Effet de la déplétion en ILF3 sur de la mort cellulaire .....	172
2. Effet de la déplétion en ILF3 sur le cycle cellulaire .....	173
<b>G. Le YM155 une molécule à potentiel thérapeutique .....</b>	<b>175</b>
1. Effet du YM155 sur les cellules transformées.....	175
2. Effet du YM155 sur la formation de mammosphères in vitro.....	176
3. Effet du YM155 sur des cellules primaires de cancers du sein .....	177
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>179</b>

*Sommaire*

I. La SURVIVINE : régulation de la recombinaison homologue et génoprotection .....	180
II. Le YM155 : Inducteur de mort cellulaire dépendant de l'autophagie et de la voie NF- kB dans le cancer du sein .....	190
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>200</b>

# **LISTE DES FIGURES**

*Liste des Figures*

Figure 1 : Classification histologique des cancers du sein .....	22
Figure 2 : Classification moléculaire des cancers du sein .....	23
Figure 3 : Les différents types de lésions de l'ADN induits en fonction de différentes causes et les réponses et conséquences cellulaires associées. ....	35
Figure 4 : Voies de réparation des lésions simple-brin de l'ADN et leurs acteurs mis en jeu en fonction des types de lésions à l'ADN. ....	36
Figure 5 : Voies de réponse aux dommages à l'ADN .....	39
Figure 6 : Voie d'action de ligature d'extrémités non homologues canonique (NHEJ canonique : C-NHEJ) .....	41
Figure 7 : Voie d'action de ligature d'extrémités non homologues alternatives .....	42
Figure 8 : Voie d'action de la recombinaison homologues .....	43
Figure 9 : Choix du mécanisme de réparation des cassures double-brin de l'ADN en fonction de la résection des simple-brin d'ADN .....	44
Figure 10 : Choix du mécanisme de réparation des cassures double-brin de l'ADN en fonction du cycle cellulaire .....	45
Figure 11 : Différents types de reconnaissance d'homologie lors du processus de recombinaison homologues .....	48
Figure 12 : Schéma de la structure de la SURVIVINE et des séquences protéiques impliquées dans l'interactions avec ses partenaires protéiques. ....	53
Figure 13 : Les différentes étapes de régulation de la SURVIVINE .....	54
Figure 14 : Schéma du complexe protéique CPC .....	59
Figure 15 : Localisation des protéines du complexe CPC en fonction des phases de la mitoses .....	60
Figure 16 : Fonctions et propriétés de la SURVIVINE au cours du cycle cellulaire .....	61
Figure 17 : Réseau de connexions de la SURVIVINE impliquée dans sa fonction du cycle cellulaire. ....	62
Figure 18 : Régulation du SAC au cours des phases de la mitose .....	63
Figure 19 : Rôles anti-apoptotiques de la SURVIVINE. ....	65
Figure 20 : Réseau de connexions de la SURVIVINE impliquées dans sa fonction de survie cellulaire. ....	66
Figure 21 : Les liens de connexion entre les réseaux du rôle de la SURVIVINE dans la division et la mort cellulaire .....	68
Figure 22 : La déplétion en SURVIVINE induit une augmentation des dommages à l'ADN. ....	91
Figure 23 : La déplétion en SURVIVINE induit des cassures double-brin de l'ADN. ....	92
Figure 24 : Les dommages à l'ADN sous déplétion en SURVIVINE s'accroissent au cours du temps. ....	93
Figure 25 : La déplétion en SURVIVINE par différentes séquences de siRNA induit une augmentation des dommages à l'ADN. ....	94
Figure 26 : Schéma des ARNm de la SURVIVINE endogène et ectopique et du ciblage des séquences de siRNA .....	95
Figure 27 : Les dommages induits par la déplétion en SURVIVINE endogène sont diminués par la surexpression ectopique de cette même protéine. ....	96

Liste des Figures

Figure 28 : La déplétion en SURVIVINE induit une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la RH.....	99
Figure 29 : L'expression du set de gènes RH est diminuée par déplétion en SURVIVINE par deux séquences de siRNA différentes. ....	100
Figure 30 : La déplétion en SURVIVINE diminue l'expression des protéines RAD51 et MUS81 impliquées dans la RH. ....	101
Figure 31 : La déplétion en SURVIVINE diminue l'activité de RH. ....	103
Figure 32 : Courbes de survie Kaplan Meier.....	105
Figure 33 : Corrélations de l'expression de <i>BIRC5</i> avec les expressions des gènes du set RH obtenues à partir des données transcriptomiques de tumeurs primaires mammaires humaines. ....	107
Figure 34 : La déplétion en SURVIVINE diminue l'expression de la protéine XIAP. ....	109
Figure 35 : Expression du set de gènes RH sous déplétion en XIAP.....	110
Figure 36 : La déplétion en XIAP n'induit pas de dommage à l'ADN. ....	111
Figure 37 : La déplétion en SURVIVINE induit une mort cellulaire tardive partiellement dépendante des CASPASES. ....	113
Figure 38 : La déplétion en SURVIVINE induit une activité modérée des CASPASES 3 et 7. ....	115
Figure 39 : Les dommages à l'ADN observés sous déplétion en SURVIVINE ne sont que partiellement dépendant de l'activité CASPASES.....	117
Figure 40 : Expression du set de gènes RH après déplétion en AURORAB ou CDC20.....	120
Figure 41 : La déplétion en AURORAB diminue l'expression de la SURVIVINE contrairement à la déplétion en CDC20 qui l'augmente.....	121
Figure 42 : La déplétion en AURORAB ou CDC20 induit une augmentation des dommages à l'ADN. ....	122
Figure 43 : La déplétion en SURVIVINE ou en AURORAB induit un blocage des cellules en G2/M et une augmentation des cellules polyploïdes.....	123
Figure 44 : Morphologie des cellules après déplétion en SURVIVINE, AURORAB ou CDC20.....	125
Figure 45 : La déplétion en SURVIVINE ou AURORAB diminue l'expression de la CYCLINE B contrairement à la déplétion en CDC20 qui l'augmente. ....	125
Figure 46 : Apparition des dommages à l'ADN en fonction des phases du cycle cellulaire.....	126
Figure 47 : Expression du set de gènes RH après traitement avec l'AZD1152.....	128
Figure 48 : L'AZD1152 induit des dommages à l'ADN et diminue l'expression de la SURVIVINE..	129
Figure 49 : L'inhibiteur d'AURORAB, l'AZD1152 induit un blocage des cellules en G2/M et une augmentation des cellules polyploïdes. ....	131
Figure 50 : Morphologie des cellules après traitement avec l'inhibiteur d'AURORAB, l'AZD1152. .	131
Figure 51 : Expression du set de gènes RH sous déplétion en BRCA1. ....	132
Figure 52 : La déplétion en SURVIVINE induit une activation de la voie p53 en réponse aux dommages de l'ADN.....	135
Figure 53 : L'expression de la protéine p53 augmente sous déplétion en SURVIVINE au cours du temps.....	135
Figure 54 : La déplétion en AURORAB induit une activation de la voie p53 comme la déplétion en SURVIVINE.....	137

*Liste des Figures*

Figure 55 : La déplétion en SURVIVINE ou en AURORAB n'induit pas de modification de la voie p53 dans la lignée MDA-MB-231 p53 mutée. ....	137
Figure 56 : Comparaison de l'expression des gènes régulés par p53 sous déplétion en SURVIVINE, AURORAB, CDC20, XIAP, BRCA1 ou traitement à l'AZD1152.....	139
Figure 57 : L'activation de la voie p53 sous déplétion en SURVIVINE ou en AURORAB n'est pas modifiée sous inhibition de l'activité des CASPASES.....	140
Figure 58 : L'inhibition des CASPASES ne modifie pas l'expression de p53 et p21 dans la lignée MDA-MB-231. ....	141
Figure 59 : L'Olaparib, inhibiteur de PARP-1 induit de la mort sous déplétion en BRCA1 et augmente la mort cellulaire induite par la déplétion en SURVIVINE.....	143
Figure 60 : La molécule YM155 .....	144
Figure 61 : Courbes dose réponse pour le YM155 pour les lignées cellulaires MCF7 et MDA-MB-231. ....	145
Figure 62 : Le YM155 est un inhibiteur de l'expression des protéines SURVIVINE et MCL-1.....	146
Figure 63 : La co-déplétion des protéines SURVIVINE et MCL-1 n'induit pas de mort cellulaire significative.....	148
Figure 64 : La mort cellulaire induite par le YM155 n'est pas bloquée par un inhibiteur de CASPASES, ni par un inhibiteur de la nécroptose, ni par ces deux agents combinés. ....	150
Figure 65 : L'inhibition de l'autophagie bloque la mort cellulaire induite par le YM155.....	152
Figure 66 : L'AS602868 est un inhibiteur de la voie NF-kB.....	154
Figure 67 : L'AS602868, inhibiteur de la voie NF-kB diminue l'expression de la SURVIVINE.....	155
Figure 68 : La voie NF-kB participe et est nécessaire à la mort cellulaire induite par le YM155 dans les lignées MCF7 et MDA-MB-231. ....	156
Figure 69 : La déplétion de la kinase IKK2 diminue la mort induite par le YM155. ....	158
Figure 70 : Le YM155 induit un clivage de la CASPASE 3.....	159
Figure 71 : Le YM55 induit un clivage de la protéine BAX qui est inhibé par la Chloroquine et l'AS2602868 lorsque ceux-ci bloquent la mort cellulaire. ....	161
Figure 72 : Processus cellulaire de l'autophagie et les effets de différents inhibiteurs. ....	162
Figure 73 : Le YM155 augmente le flux autophagique qui est bloqué par la Chloroquine. ....	163
Figure 74 : Image d'immunocytochimie de la protéine LC3.....	164
Figure 75 : La Chloroquine et l'AS602868 augmente l'expression de la protéine p62. ....	165
Figure 76 : Effet des inhibiteurs de l'autophagie et de la voie NF-kB sur les dommages à l'ADN induits par le YM155.....	166
Figure 77 : Le YM155 induit un recrutement en foyer nucléaire de la protéine 53BP1 et une phosphorylation de la protéine CHK2. ....	168
Figure 78 : Le YM155 induit une réponse p53 aux dommages à l'ADN dans les lignées p53 sauvage. ....	170
Figure 79 : Le blocage en phase S des cellules par le traitement YM155 est réversé par les inhibiteurs de l'autophagie ou de la voie NF-kB. ....	171
Figure 80 : L'extinction de l'expression du facteur de transcription ILF3 induit une mort cellulaire très tardivement uniquement dans un des trois lignées cellulaires.....	173
Figure 81 : La déplétion en ILF3 ne modifie pas le cycle cellulaire des lignées. ....	175

*Liste des Figures*

Figure 82 : Le YM155 induit préférentiellement de la mort cellulaire dans les cellules transformées.  
.....176

Figure 83 : Le YM155 diminue la formation de mammosphères in vitro.....177

Figure 84 : Le YM155 induit de la mort cellulaire dans des cellules cancéreuses mammaires primaires.  
.....178

Figure 85 : Schéma récapitulatif des effets de la SURVIVINE. ....189

Figure 86 : Schéma récapitulatif des effets observées du YM155 et des hypothétiques voies de  
régulation .....199

# **LISTE DES ABREVIATIONS**

*Liste des abréviations*

53BP1 : p53 binding protein  
ACTB : Actin  $\beta$   
ADN : Acide désoxyribonucléique  
AIF : Apoptosis inducing factor  
APC/C : Anaphase-promoting complex/cyclosome  
ARN : Acide ribonucléique  
ARNm : ARN messenger  
ATM : Ataxia-telangiectasia mutated  
ATR : Ataxia-telangiectasia and Rad3-related  
B2M : Beta-2-microglobulin  
BAX : Bcl-2-associated X protein  
BBC3 : BCL2 binding component 3  
BCL-2 : B-cell lymphoma 2  
BER : Base excision repair  
BIR : Baculovirus IAP Repeat  
BIRC5 : Baculoviral Inhibitor of apoptosis Repeat-Containing 5  
BLM : Bloom syndrome  
BRCA1 : Breast cancer 1  
BRCA2 : Breast cancer 2  
BUBR1 : Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta  
c-Myc : cellular-Myelocytose  
CARD : Caspase activation and recruitment domains  
CASPASES : CysteinyI-aspartate-cleaving proteases  
CD34 : Cluster of differentiation 34  
CD44 : Cluster of differentiation 44  
CDC20 : Cell Division Cycle 20  
CDE : Cell cycle-dependent element  
CDK : Cyclin dependent kinase  
CDKN1A : Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A  
CHK1/2 : Checkpoint kinase 1/2  
CHR : Cell cycle genes homology region  
cIAP1 : cellular inhibitor of apoptosis protein 1  
cIAP2 : cellular inhibitor of apoptosis protein 2

*Liste des abréviations*

CPC : Chromosomal Passenger Complex  
CRM1 : Chromosomal Maintenance 1  
CRM1 : Chromosome region maintenance 1  
CtIP : CtBP-interacting protein  
DNA-PKcs : DNA-dependent protein kinase catalytic subunit  
DNMT1 : DNA methyltransferase-1  
EGF : Epidermal growth factor  
EME1 : Essential meiotic structure-specific endonuclease 1  
ER : Estrogen receptor  
ERBB2 : V-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2  
ERCC : Excision repair cross-complementation group  
EXO1 : Exonuclease 1  
FGF : Fibroblast growth factor  
FOXO3 : Forkhead box O3  
GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  
GATA-3 : Guanosine- adenosine-thymidine-adenosine binding protein 3  
GFP : Green fluorescence protein  
H2AX : Histone 2 AX  
HDAC : Histone deacetylase  
HDACi : Histone deacetylase inhibitors  
HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor-2  
hFAM : Fat facets in mammals  
HP1 : Heterochromatin protein-1  
HPRT1 : Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1  
HR : Homologous recombination  
HSP90 : Heat shock protein 90  
IAP : Inhibitor-of-Apoptosis Protein  
IGF-1 : Insulin-like growth factor 1  
IGF-2 : Insulin-like growth factor 2  
IKK2 : Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit 2  
ILF3 : Interleukin Enhancer Binding Factor 3  
ILP2 : IAP-like protein-2  
INCENP : Inner centromere protein

*Liste des abréviations*

MAD2 : Mitotic arrest deficient 2  
MAPK : Mitogen-activated protein kinase  
MCC : Mitotique checkpoint complex  
MCL-1 : Myeloid cell leukemia 1  
MDC-1 : Mediator Of DNA Damage Checkpoint Protein 1  
miRNA : micro-RNA  
MKPL-1 : Mitogen-activated *protein* kinase phosphatase-1  
MMR : Mismatch repair  
MRE11 : Meiotic recombination 11  
MRN : MRE11, RAD50, NBS1  
mTOR : mammalian target of rapamycin  
NAHR : Non-allelic homologous recombination  
NAIP : NLR family, apoptosis inhibitory protein  
NBN : Nibrin  
NER : Nucleotide excision repair  
NES : Nuclear export signal  
NF- $\kappa$ B : Nuclear factor-kappa B  
NHEJ : non-homologous end joining: ligature d'extrémités non homologues  
PARP-1 : Poly [ADP-ribose] polymerase 1  
PDGF : Platelet-derived growth factor  
PI3K : Phosphatidylinositol-3-kinases  
PIKKs : PI3K-like kinases  
PKA : Protein kinase A  
PMAIP1 : Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1  
PR : Progesteron receptor  
PUMA : p53 upregulated modulator of apoptosis  
RAS : Rat sarcoma  
RB1 : Retinoblastoma 1  
RECQL4 : RecQ-Like Type 4  
RH : Recombinaison homologue  
RMN : Résonance magnétique nucléaire  
ROS : Reactive oxygen species  
RPA : Replication protein A

*Liste des abréviations*

RPLP0 : Ribosomal protein, large, P0  
SAC : Spindle Assembly Checkpoint  
siRNA : small interfering RNA  
SIRT1 : Sirtuin 1  
SMAC : Second mitochondria-derived activator of caspases  
SP1 : Specificity protein 1  
STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription  
TCF4 : T cell factor-4  
TGF- $\alpha$  : Transforming growth factor alpha  
TGF $\beta$  : Transforming growth factor beta  
TGF $\beta$ RII : Transforming growth factor beta receptor II  
TNM : Tumor, Nodes, Metastasis  
TP53 : Tumor protein  
UDF1 : Ubiquitin fusion degradation protein 1  
VEGF : Vascular endothelial growth factor  
XAF-1 : XIAP-associated factor 1  
XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis protein  
XPG : Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group G  
XRCC : X-Ray Repair Cross-Complementing Protein

# **INTRODUCTION**

## I. Avant-propos

Le gène *BIRC5* (Baculoviral Inhibitor of apoptosis Repeat-Containing 5) et la protéine correspondante SURVIVINE sont surexprimés dans la plupart des cancers. Dans les cancers mammaires, le niveau d'expression de *BIRC5* a une valeur pronostique péjorative utilisée en clinique et est envisagée comme cible thérapeutique en particulier dans le cas des tumeurs de sous-type triple négatif qui en plus d'être associées à un mauvais pronostic ne bénéficient pas encore de thérapies ciblées du fait de leur hétérogénéité oncogénique. La surexpression de la SURVIVINE est également associée chez les patientes à la résistance à la chimio- et/ou radiothérapie. L'objectif de mon travail de thèse était de comprendre comment la SURVIVINE pouvait participer à la résistance à des traitements génotoxiques et d'évaluer l'intérêt thérapeutique de la cibler dans le traitement des cancers du sein.

Nous avons donc étudié les conséquences fonctionnelles du ciblage de la SURVIVINE obtenu par ARN (acide ribonucléique) interférence et par approche pharmacologique dans les cellules tumorales mammaires humaines. Nous avons tout d'abord observé que la déplétion en SURVIVINE induisait de manière spécifique des dommages à l'ADN de type cassures double-brin. Nous avons montré que cette déplétion était associée à une altération fonctionnelle des voies de réparation de l'ADN (acide désoxyribonucléique) par recombinaison homologue (RH) associée à une diminution d'expression de plusieurs acteurs de la RH dont la recombinaison RAD51 et le complexe résolvasse MUS81/EME1. De plus, la méta-analyse de données génomiques de tumeurs mammaires indique la corrélation d'expression d'un cluster de gènes impliqués dans la RH incluant *BIRC5*. Globalement, nos travaux montrent que la SURVIVINE participe au maintien de l'intégrité de l'ADN dans les cellules tumorales mammaires.

Nous nous sommes également intéressés à un inhibiteur pharmacologique de la SURVIVINE, le YM155, identifié suite à un screening construit pour identifier des molécules capables d'inhiber le promoteur du gène codant pour la SURVIVINE chez l'homme, *BIRC5* et actuellement en cours d'essais cliniques en oncologie. Nos résultats montrent que cet agent est capable d'induire la mort dans les cellules tumorales mammaires provenant de patientes atteintes de cancer du sein dans un modèle de culture à court terme d'explants tumoraux, et dans les lignées cellulaires hormono-dépendantes ou triple-négatives, incluant la sous-population cellulaire capable d'auto-renouvellement. Les voies de mort activées par ce

traitement impliquent en particulier les voies d'autophagie et la voie NF- $\kappa$ B (Nuclear factor-kappa B).

La SURVIVINE qui participe à la survie et au déroulement correct du cycle cellulaire et comme nous le montrons à la régulation des voies de réparation des dommages à l'ADN (recombinaison homologue), se positionne à l'intersection de nombreux réseaux moléculaires et voies de signalisation, constituant probablement un avantage de sélection pour les cellules cancéreuses et en contrepartie une cible thérapeutique intéressante en cancérologie. Mes travaux de thèse contribuent à montrer l'implication de la SURVIVINE dans les mécanismes de réparation de l'ADN par recombinaison homologue dans les cellules tumorales mammaires et l'intérêt thérapeutique de la cibler dans les cancers du sein.

## **II. Le cancer du sein**

Le sein est une structure anatomique dont la fonction biologique est la nutrition du nourrisson par production de lait. Il est composée d'une glande mammaire, elle-même constituée de nombreux canaux lactifères, servant à transporter le lait et de lobules ramifiés, regroupés en petites unités : les unités terminales ductulo-lobulaires, dont le rôle est la production de lait pendant les périodes d'allaitement. Ces lobules sécrétoires sont drainés par de plus gros canaux s'abouchant au niveau du mamelon. L'épithélium mammaire, constituant les structures de la glande mammaire, est composé principalement de deux populations cellulaires : les cellules luminales, externes et faisant face à la lumière de l'acinus, qui produisent le lait, et les cellules basales myoépithéliales, internes et responsables de son expulsion. Elles sont entourées par une membrane basale.

Le sein est également constitué de tissu de soutien composé d'un tissu conjonctif dense entourant le système canalaire et d'un tissu graisseux, contenant également des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Les vaisseaux lymphatiques drainent la lymphe au niveau des ganglions situés sous le bras (ganglion axillaires), sous la clavicule et dans le thorax.

### **A. Aspect pathologique du cancer du sein**

#### ***1. Épidémiologie***

Avec 48 763 nouveaux cas estimés en 2012, le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme et représente un peu moins d'un tiers (31,5%) de l'ensemble des nouveaux cas de cancer chez la femme, en France. L'âge moyen du diagnostic était de 63 ans en 2012 en France et dans plus de 8 cas sur 10, il touche des femmes âgées de plus de 50 ans. (INCa 2013)

Le taux d'incidence de cette maladie est de 88 pour 100 000 femmes. Il a augmenté jusqu'en 2010 pour enfin commencer à diminuer pour les données de 2012. Le risque de développer un cancer du sein a fortement augmenté. En effet, près de 9 femmes sur 100 nées

en 1950 risquent de développer un cancer du sein avant l'âge de 75 ans, alors que c'était le cas que pour moins de 6 femmes sur 100 pour celles nées en 1920. Cependant, l'augmentation du risque de développer un cancer en fonction de l'âge tend à s'inverser chez les femmes nées après 1945. Ceci peut être expliqué par une stabilisation des facteurs de risque auxquels sont exposées les plus jeunes générations (parité, âge de la première grossesse, allaitement). Il reste tout de même difficile de quantifier la part due à l'évolution de ces facteurs de risque environnementaux ou comportementaux. (INCa 2013)

Le nombre de décès estimés pour le cancer du sein était de 11 886, avec un taux de mortalité de 15,7 pour 100 000 femmes et un âge moyen du décès de 72 ans en France en 2012. Avec 18,8% de mortalité, tous cancers confondus en 2012, le cancer du sein est donc au premier rang du décès par cancer chez la femme. La mortalité par cancer du sein a baissé entre 2000-2004 et 2005-2009 dans toutes les classes d'âge sauf chez les 20-24 ans mais dans cette tranche d'âge le niveau du taux est très bas. Les baisses les plus importantes ont été observées chez les femmes jeunes et d'âge moyen, des baisses plus modérées ont été observées chez les plus âgées. Le risque de décéder d'un cancer du sein jusqu'à l'âge de 74 ans a diminué pour atteindre 1,82% pour les femmes nées en 1950. La survie nette des patientes diagnostiquées entre 1989 et 2004 est de : 97 % à 1 an; 86 % à 5 ans et de 76 % à 10 ans. Actuellement le taux de survie global, 5 ans après le diagnostic d'un cancer du sein est estimé à environ 89%. (INCa 2013)

Les avancées thérapeutiques des dernières années ont permis d'augmenter la survie. De plus, la prévention par mammographies précoces et systématiques mises en place ces dernières années est responsable à la fois de l'augmentation de la prévalence (détection plus précoce) mais aussi de la survie (prise en charge plus efficace).

Les hommes peuvent également développer un cancer du sein. Cependant, ce type de cancer est extrêmement rare et représente moins d'1% des cas de cancers du sein. Le développement de cancer du sein chez l'homme est fréquemment associé à une origine génétique.

## 2. Facteurs de risque

Le cancer du sein est une maladie multifactorielle, en effet plusieurs facteurs peuvent influencer le risque de son développement. Un certain nombre de facteurs de risque de développement d'un cancer du sein sont connus même si des incertitudes sur l'implication et le poids de plusieurs de ces facteurs persistent.

Une personne qui possède un ou plusieurs facteurs de risque peut ne jamais développer de cancer. Inversement, il est possible qu'une personne n'ayant aucun facteur de risque soit atteinte de ce cancer.

Il existe deux types de facteurs de risque : les facteurs de risque externes, liés à l'environnement et aux modes et conditions de vie et les facteurs de risque internes, constitutifs des individus (âge, sexe, histoire familiale, mutations génétiques, etc.).

Comme déjà abordé précédemment les deux facteurs de risques les plus importants sont le sexe et l'âge de la personne. L'incidence du cancer du sein est 100 fois plus élevée chez les femmes par rapport aux hommes. L'incidence du cancer du sein augmente largement avec l'âge, allant de moins de 10 cas pour 100 000 femmes entre l'âge 20 et 30 ans, à plus de 300 pour 100 000 après 60 ans. (INCa 2013)

Les antécédents personnels de cancer du sein, les antécédents familiaux et les prédispositions génétiques sont les principaux facteurs de risque après l'âge et le sexe.

Les prédispositions génétiques sont responsables de 5 à 10 % des cancers du sein. Environ 10% des femmes atteintes d'un cancer du sein ont souvent au moins un parent atteint d'un cancer du sein et plus de 40% d'entre elles ont un parents atteint d'un cancer de type différent. Les gènes *BRCA1* (Breast cancer 1) et *BRCA2* (Breast cancer 2) ont été associés aux cancers du sein familiaux (ainsi qu'au cancer ovarien) et représentent les deux tiers de ces cas familiaux. Les personnes porteuses d'une mutation de l'un ou l'autre de ces gènes ont un risque d'avoir un cancer du sein de 40 à 85 %. (INCa 2013)

D'autres facteurs de risques ont également été identifiés. Le plus important reste l'exposition aux hormones. Le rôle des oestrogènes et de la progestérone semble très important à la fois pour le développement et la biologie du cancer du sein. D'autres facteurs de risques ont été identifiés. Certains sont plus ou moins spécifiques de ce type de cancer,

comme l'activité physique, la consommation d'alcool ou de tabac ou encore l'obésité. (INCa 2013)

## **B. Processus oncogéniques**

Le processus de cancérisation d'une cellule est du à l'activation d'oncogènes et/ou l'inactivation ou la perte de gènes suppresseurs de tumeurs. Un seul événement n'est pas suffisant pour permettre le développement de cellules cancéreuses mais la somme de plusieurs événements (mutations, activation, inactivation de gènes) est nécessaire. Durant le développement du processus oncogénique, les cellules sont capables d'acquérir de nouvelles capacités biologiques qui sont des caractéristiques spécifiques des cellules cancéreuses leur conférant un avantage sélectif. Ces caractéristiques ont été répertoriées par Hanahan et Weinberg lors d'une première revue en 2000 et puis revue en 2011. Ces caractéristiques des cancers constituent un principe d'organisation de cette maladie complexe. Ils regroupent l'autosuffisance en signaux de prolifération, l'insensibilité au signaux inhibiteurs de la croissance, la résistance à la mort cellulaire (apoptose), la capacité de se répliquer indéfiniment, l'induction de l'angiogenèse et la capacité à développer des métastases. L'inflammation favorisant les tumeurs et l'instabilité génomique sont également des caractéristiques des cancers ainsi que la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire et la capacité d'éviter la destruction par le système immunitaire (Hanahan and Weinberg, 2011). Le microenvironnement de la tumeur a également un rôle important émergent pour les cellules composant de nouveaux domaines d'étude et de stratégies thérapeutiques.

La croissance et le développement normal du sein sont sous la dépendance de nombreuses hormones et facteurs de croissance. Certains de ces composés sont sécrétés par les cellules mammaires elles-mêmes et peuvent agir par voie autocrine. L'oestradiol régule l'expression de plusieurs gènes codant pour des peptides et protéines impliqués dans les mécanismes de contrôle de la croissance cellulaire mammaire. Leur liaison à des récepteurs spécifiques permettent de déclencher les effets de ces facteurs de croissance et hormones. Les récepteurs aux hormones polypeptidiques sont typiquement localisés à la membrane cellulaire, alors que les récepteurs aux hormones stéroïdiennes sont principalement localisés dans le noyau des cellules. Les facteurs de croissance, cytokines et hormones interagissent avec leurs récepteurs spécifiques et déclenchent une cascade de signaux biochimiques

intracellulaires, aboutissant à l'activation ou la répression d'un panel varié de gènes. Plusieurs de ces hormones jouent un rôle dans la croissance et le développement des cellules épithéliales mammaires ainsi que dans la lactation. Du fait que ces hormones et leurs récepteurs régulent le tissu mammaire normal, il n'est pas surprenant que les cellules malignes, issues de ce même tissu mammaire, expriment les récepteurs d'un grand nombre de ces hormones, et conservent une dépendance hormonale. De nombreuses études utilisant des cellules en culture ou du tissu cancéreux mammaire humain, ont montré la présence des récepteurs de la plupart de ces hormones dans les cellules de cancer du sein humain. Des modifications génétiques touchant ces voies de signalisation, pour la plupart acquises, sont liées aux anomalies du développement et à une variété de maladies chroniques, dont le cancer. La cancérisation des cellules mammaires résulte d'une suite d'évènements génétiques incluant la dérégulation de l'expression de facteurs de croissance ou des composants de leur voie de signalisation. (Moore and Nagahara, 2014)

Le rôle biologique des oestrogènes passe par une liaison de haute affinité avec l'ER (Estrogen receptor). Des études suggèrent que les cellules de cancer du sein, sous le contrôle d'oestrogènes, peuvent synthétiser et sécréter leurs propres facteurs de croissance qui pourraient autostimuler les cellules cancéreuses, ou le tissu stromal environnant via des mécanismes autocrines et/ou paracrines. Le tissu stromal peut sécréter de l'IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) et de l'IGF-2 (Insulin-like growth factor 2) qui stimulent les cellules cancéreuses mammaires. Parmi des facteurs de croissance autocrines/paracrines potentiels, se trouvent l'EGF (Epidermal growth factor), le TGF- $\alpha$  (Transforming growth factor alpha), l'IGF-2, le PDGF (Platelet-derived growth factor) et le FGF (Fibroblast growth factor). L'EGF, le TGF- $\alpha$  et l'IGF-2 ont été identifiés dans le sécrétome de cellules de cancer du sein en culture et dans celui de tissus de cancer du sein humain. Ce sont des activateurs de prolifération potentiels pour les cellules épithéliales malignes. Le PDGF et le FGF sont sécrétés par les cellules de cancer du sein et peuvent être responsables de la prolifération du stroma mammaire mésenchymateux. Les cellules épithéliales et/ou stromales au sein de la tumeur sécrètent aussi des protéases, telles que les cathepsines et les métalloprotéases, qui peuvent participer à l'invasion tumorale et au potentiel métastatique. Dans les cellules de cancer du sein positives pour l'ER, l'expression et la sécrétion de certains facteurs de croissance autocrine, tels que le TGF- $\alpha$  et IGF-2, sont stimulés par les oestrogènes, et inhibés par les anti-oestrogènes. Dans les cellules négatives pour l'ER, la sécrétion de ces facteurs n'est pas régulée par les oestrogènes. Les oestrogènes et les anti-oestrogènes stimulent la

synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines, mais aussi l'activité d'enzymes régulatrices. Les oestrogènes régulent donc la progression des cellules au sein du cycle cellulaire et de la mitose. (Huang et al., 2014)

La perturbation des mécanismes de contrôle de croissance au sein d'une cellule aboutit à une prolifération cellulaire anarchique et au développement du cancer. La transformation cellulaire se produit suite à l'activation d'oncogènes et/ ou la perte ou la mutation de gènes suppresseur de tumeur. Les proto-oncogènes, équivalent normaux des oncogènes, fonctionnent comme régulateurs de la croissance dans les cellules normales. Des altérations des proto-oncogènes sont associées à l'initiation et/ou à la maintenance des tumeurs chez l'animal et chez l'Homme. Les produits des oncogènes sont fréquemment des facteurs de croissance ou des récepteurs aux facteurs de croissance. Des oncogènes sont souvent surexprimés dans les tissus cancéreux mammaires, comme *c-Myc* (cellular-Myelocytose) et *Ras* (Rat sarcoma), ou encore les membres de la famille de l'EGFR (Epidermal growth factor receptor) comme HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2). La surexpression et/ou la mutation de récepteurs de facteurs de croissance mène souvent à l'activation constitutive de ces derniers et donc à l'induction de la voie de signalisation sans contrôle. Une signalisation d'activation de croissance peut être continuellement transmis aux cellules, aboutissant à l'activation de multiples voies de transduction et à une croissance cellulaire dérégulée. Des gènes normalement impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, en particulier les CYCLINES D et E, constituent aussi des oncogènes potentiels. La surexpression de ces oncogènes peut contribuer à l'initiation et au maintien du phénotype malin. Une expression altérée de ces gènes peut avoir de nombreux effets sur la croissance et l'homéostasie de l'épithélium mammaire. Des études ont montré que le blocage de ces récepteurs de facteurs de croissance, ou de leur voie associée, peut avoir des implications thérapeutiques. L'EGFR, lorsqu'il est surexprimé, confère un mauvais pronostic au patient. Cependant, l'EGFR ne semble pas être un moteur essentiel du comportement malin dans le cancer du sein. L'expression de ces oncogènes au sein d'échantillons de cancer du sein humain a été montrée comme facteur d'agressivité tumorale, de pronostic, ainsi que de sensibilité à la thérapie. (Shah et al., 2014)

*BCL-2* (B-cell lymphoma 2) est un autre gène fréquemment surexprimé dans le cancer du sein. Sa surexpression est associée à un pronostic peu favorable, à une résistance à l'apoptose, ainsi qu'à une diminution de la réponse à la thérapie par les agents cytotoxiques.

Des molécules relais de la signalisation en aval des récepteurs cellulaires de surface sont souvent activées ou altérées dans les cellules malignes. Ainsi, les voies de la PI3K (Phosphatidylinositol-3-kinases) et des MAPK (Mitogen-activated protein kinase) sont fréquemment activées dans le cancer du sein, et ce même en absence de surexpression de l'EGFR ou d'HER-2. (Nwabo Kamdje et al., 2014)

Les gènes suppresseurs de tumeurs jouent aussi un rôle dans la carcinogénèse du sein. Des altérations de gènes suppresseurs de tumeur bien connus, comme *RBI* (Retinoblastoma 1) ou *TP53* (Tumor protein), ont été identifiées dans les cellules de cancer du sein, aussi bien que dans d'autres tumeurs solides. De plus, plus de 30 % des cancers du sein ont des mutations sur le gène de *TP53* mais cela varie en fonction des sous-type de cancer du sein (Bertheau et al., 2013). Les deux gènes mutés associés aux cancers du sein familiaux, *BRCA1* et *BRCA2*, sont aussi considérés comme des gènes suppresseurs de tumeurs (Larsen et al., 2014). Leur fonction est de contrôler la prolifération cellulaire (*RB1* et *p53*) et/ou la réparation de l'ADN (*p53*, *BRCA1* et *BRCA2*). Les mutations géniques génèrent des protéines mutées et ainsi à une progression dérégulée des cellules au sein du cycle cellulaire. La reconnaissance que l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs est associée au cancer du sein pourrait mener à une détection précoce des familles à haut risque et à de nouvelles stratégies de traitement pour renverser le phénotype malin par introduction de copies normales du gène à l'aide de la thérapie génique. De telles stratégies font l'objet de recherches actives, que ce soit en laboratoire ou au sein d'essais cliniques.

De nouvelles études génétiques ont permis de mettre en évidence des différences des mutations génétiques retrouvées en fonction des différents sous-types moléculaires de cancer du sein qui seront détaillés par la suite. Ces analyses permettent de mieux identifier les voies moléculaires dérégulées dans les différents sous-types du cancer du sein permettant également d'adapter et de personnaliser les stratégies thérapeutiques et d'en développer de nouvelles. (Baird and Caldas, 2013)

## C. Classification des cancers du sein

Les classifications du cancer du sein ont évolué au fur et à mesure de l'avancée des connaissances. Il existe deux types de classification, une reposant sur des données histologiques et une seconde sur des données moléculaires.

### 1. *Sous-types histologiques*

Parmi les cancers du sein, 95 % sont des carcinomes, tumeurs se développant à partir de cellules épithéliales. Ces carcinomes peuvent être de deux types : soit canaux, soit lobulaires, suivant s'ils se développent à partir des canaux lactifères ou des lobules. Les 5 % de cancers du sein restant se développent à partir du tissu entourant la glande. Malgré leur caractère rare, leur nombre de sous-types est relativement élevé (Malhotra et al., 2010). Ces tumeurs rares peuvent être d'origine mésenchymateuse, comme les angiomes qui sont issus des vaisseaux, ou des tumeurs fibroépithéliales, comme les tumeurs phyllodes qui se développent à partir du tissu conjonctif.

Cependant la première distinction histologique de la classification des tumeurs de cancer du sein n'est pas dépendante de leur origine, mais de leur caractère invasif ou infiltrant. Ce critère n'est applicable qu'aux carcinomes. Un carcinome peut être soit *in situ*, lorsque les cellules cancéreuses restent confinées au niveau des canaux ou des lobules du sein, soit infiltrant, si les cellules cancéreuses ont traversé la membrane basale des canaux ou des lobules et ont envahi les tissus avoisinants. Les cellules cancéreuses peuvent alors se propager soit dans les ganglions lymphatiques situés sous l'aisselle, soit par voie veineuse. Ces cancers peuvent donc être à l'origine des métastases.

Les carcinomes mammaires *in situ* sont subdivisés en plusieurs classes : canaux ou lobulaires, selon leur profil de croissance et leurs caractéristiques cytologiques. Les carcinomes *in situ* canaux (ductal) sont considérablement plus fréquents que les lobulaires. Les carcinomes *in situ* canaux sont également subdivisés en comedo, cribiforme, papillaire, micropapillaire et solide. (Figure 1) (Malhotra et al., 2010)

De la même manière, les carcinomes invasifs sont un groupe hétérogène de tumeurs divisées en plusieurs sous-types histologiques. Les sous-types majeurs sont les carcinomes

infiltrants canaux (infiltrating ductal), infiltrants lobulaires, canalo-lobulaires (ductal lobular), mucineux (colloïdes), tubulaires, médullaires et papillaires. Les carcinomes infiltrant canaux sont de loin les plus répandus (70 à 80 % des carcinomes invasifs). (Figure 1) (Malhotra et al., 2010)

Ce schéma de classification fut un outil valable pendant des décennies, mais ne se base que sur des caractéristiques histologiques. Actuellement les classifications utilisant des marqueurs moléculaires se développent de plus en plus.

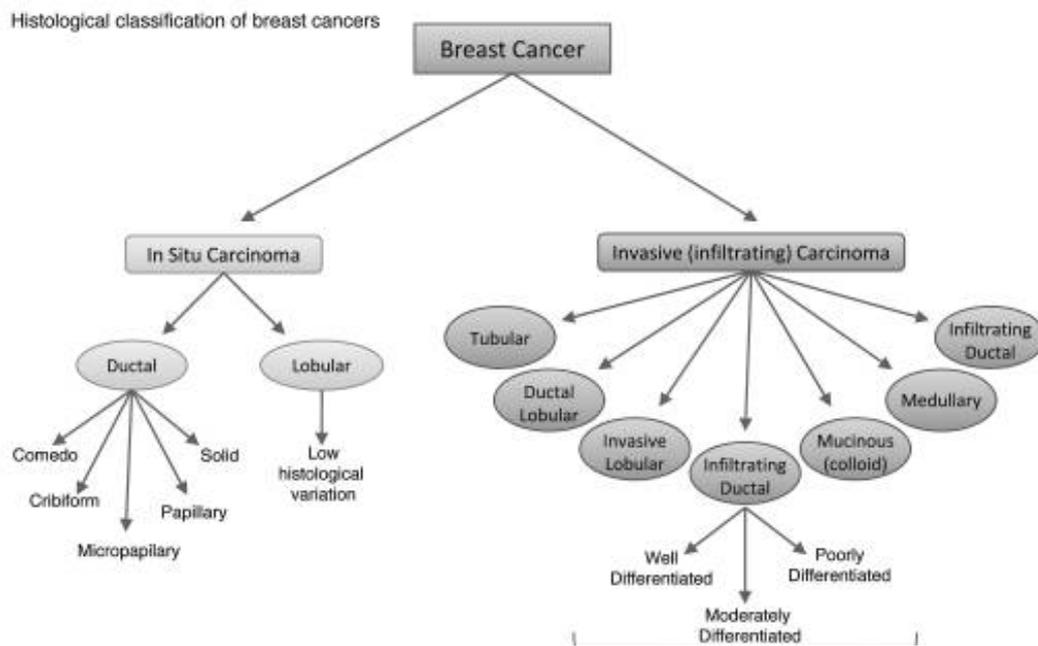


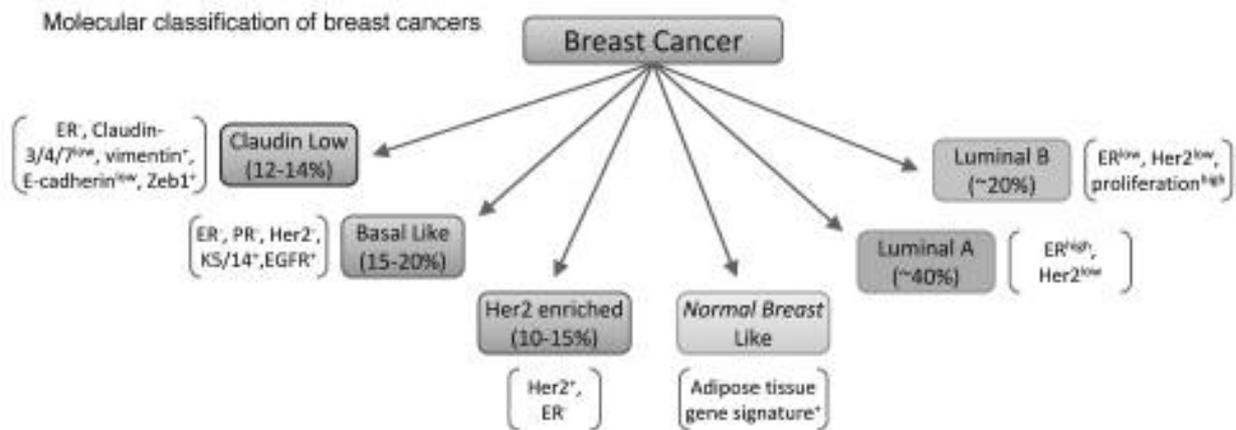
Figure 1 : Classification histologique des cancers du sein

D'après (Malhotra et al., 2010)

## 2. Classification moléculaire

La classification histologique du cancer du sein est utilisée comme valeur diagnostique et pronostique. En revanche l'association avec une classification moléculaire permet la prédiction à la réponse aux thérapies ciblées et oriente les stratégies thérapeutiques. Les analyses géniques et moléculaires permettent l'identification de sous-types moléculaires. Actuellement six sous-types ont été identifiés sur une base moléculaire. Ils sont listés ici avec leur répartition (Figure 2) :

- HER-2<sup>+</sup> (human epidermal growth factor receptor-2) (10-15%)
- Luminal A (environ 40%)
- Luminal B (environ 20%)
- Basal-like (15-20%)
- Claudin-low (12-14%)
- Normal-like



**Figure 2 : Classification moléculaire des cancers du sein**

D'après (Malhotra et al., 2010)

Ces sous-types moléculaires ont été établis sur la base d'analyse d'expression par puce génomique (Sorlie et al., 2003). Ils présentent des différences significatives dans la prédiction de la survie, notamment pour le sous-type basal-like qui est le plus défavorable. Cette classification a permis également de subdiviser les populations ER<sup>+</sup> (Estrogen receptor). En effet les statuts ER, PR (Progesteron receptor) et HER-2 sont utilisés cliniquement dans le cas

des carcinomes canaux infiltrants, mais ces marqueurs ne permettent pas la différenciation en Luminal A et B, deux sous-types ER<sup>+</sup> qui ont des issues cliniques très différentes.

Le sous-type HER-2<sup>+</sup> est le plus simple à définir. Il se caractérise par une expression élevée d'HER-2, généralement due à une amplification de la région chromosomique correspondante. C'est pourquoi ce sous-type de cancer peut aussi surexprimer les gènes de l'unité d'amplification autour d'*ERBB2* (V-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2), gène codant pour HER-2.

Le sous-type Luminal A représente des cancers généralement de grade faible et d'évolution et de pronostic plutôt favorables. Ces cancers expriment les récepteurs hormonaux (ER et PR), ainsi qu'un profil de gènes lié. Ils expriment également les gènes liés à la différenciation luminale, comme le facteur GATA-3 (Guanosine- adenosine-thymidine-adenosine binding protein 3) qui en est le plus caractéristique. Le sous-type luminal B regroupe quant à lui les autres cas de cancers lumineux moins différenciés, plus proliférants et de moins bon pronostic.

Les cancers basaux sont aussi dits triple-négatifs, puisqu'ils n'expriment ni ER, ni PR, ni HER-2 (Carey et al., 2010). Cependant tous les cancers du sein triple-négatifs ne sont pas de type basal. Ces cancers sont de haut grade et de mauvais pronostic. Ils sont très proliférant, expriment des gènes codant pour les régulateurs de cycle cellulaire et présentent fréquemment des mutations de p53. La CADHERINE E et le CD44 (Cluster of differentiation 44) sont également des marqueurs de ces cancers. Une subdivision des cancers basaux a été proposée en basal-like A et B (Neve et al., 2006), reposant sur l'expression du marqueur mésenchymateux, la VIMENTINE, par le sous-type basal B. Cette subdivision rapprocherait le sous-type basal-like B des cancers du sein mésenchymateux et pourrait être surtout un indicateur de la transition épithélio-mésenchymateuse à l'initiation du processus métastatique.

Le sous-type claudin-low est principalement caractérisé par une faible expression des marqueurs de différenciation lumineux et par un enrichissement des marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse (VIMENTINE, ZEB1) et des marqueurs des cellules souches. Son nom vient de la faible expression des CLAUDINES, protéines impliquées dans les jonctions intercellulaires serrées et dont la perte est un marqueur de la transition épithélio-mésenchymateuse.

Cette classification comporte également un sous-type dit « normal » dont les caractéristiques sont mal définies et que nous ne détaillerons pas.

### **3. Le cancer du sein triple négatif**

Le cancer du sein triple-négatif est caractérisé par l'absence, ou la faible, expression des récepteurs hormonaux (ER et PR) et d'HER-2. Cela représente entre 10 et 20 % des cancers du sein (Gluz et al., 2009). Ce sous-type représente un enjeu important dans la recherche sur le cancer du sein, car à ce jour la chimiothérapie (notamment les taxanes) est la seule option thérapeutique. Ces tumeurs sont également associées aux résistances à la chimiothérapie, à un fort risque de rechute et à un mauvais pronostic. Les tumeurs mutées sur les gènes *TP53* ou *BRCA1* se retrouvent fréquemment classées dans ce sous-type.

Le cancer du sein triple-négatif a longtemps été associé au sous-type basal-like car toutes les tumeurs basal-like sont triples-négatives, cependant la réciproque n'est pas vraie (Carey et al., 2010). Les tumeurs triples négatives sont à 90 % des carcinomes canaux infiltrants, avec un haut grade notamment du à leur fort index mitotique (Gluz et al., 2009).

Des analyses de puces génomiques effectuées récemment sur les lignées de cancer du sein triple-négatives ont essayé de caractériser ce sous-types au niveau moléculaire (Prat et al., 2013). Les auteurs de cette étude ont établi une stratification des tumeurs triple-négatives. Le cancer du sein triple-négatif présente donc une composante basal-like majoritaire (70-80%), divisée en claudin-low ou claudin-high. L'autre composante (non-basal-like) (20-30%) peut elle être divisée en Luminale A ou B et enrichi en HER-2. Cette classification illustre la difficulté du traitement de ce type de cancer du sein, difficulté principalement due aux sous-types moléculaires qui le composent, et donc à une impossibilité de prédire l'efficacité du traitement sans examens complémentaires.

## D. Aspects cliniques des cancers du sein

### 1. *Éléments diagnostiques*

#### a) *Les stades cliniques du cancer du sein*

Les examens de diagnostic permettent de déterminer le stade du cancer rendant compte de l'étendu et la progression de la maladie au moment du diagnostic. Trois critères sont pris en compte par les médecins pour déterminer le stade :

- La taille et l'infiltration de la tumeur (carcinome *in situ* ou infiltrant) : ces critères indiquent le degré d'évolution de la maladie.
- L'atteinte ou non des ganglions lymphatiques, le nombre et leur emplacement. Les cellules cancéreuses peuvent traverser la membrane basale et se disséminer dans l'organisme. Les ganglions lymphatiques de l'aisselle sont les premiers à être potentiellement touchés. Un examen clinique par palpation permet de rechercher les ganglions anormaux. Pour déterminer ou confirmer si des ganglions contiennent des cellules cancéreuses, des analyses au microscope sont réalisées après prélèvement. Si des ganglions sont atteints, la maladie a commencé à se disséminer. Le nombre de ganglions envahis et leur emplacement permet de déterminer le degré de propagation du cancer.
- L'existence ou non de métastases. Les cellules cancéreuses peuvent envahir d'autres organes que les ganglions lymphatiques et y développer des métastases. Les organes les plus souvent touchés par ces métastases sont le foie, les os et les poumons.

Ces 3 critères permettent de définir le stade du cancer selon la classification TNM définie par l'Union internationale contre le cancer (UICC) et par l'American Joint Committee on Cancer (AJCC), (7ème édition). TNM signifie en anglais « Tumor, Nodes, Metastasis » soit en français « tumeur, ganglions, métastases ».

L'examen clinique réalisé avant tout traitement permet de définir un stade pré-thérapeutique, appelé classification cTNM (c pour clinique).

Après la chirurgie, l'examen anatomopathologique des tumeurs et l'analyse microscopique des ganglions prélevés permet de définir un stade anatomopathologique, classification pTNM (p pour post-chirurgical).

En fonction des caractéristiques observées lors de cet examen, une annotation par lettre ou par chiffre est donnée pour T, N ou M :

- Tx (la tumeur ne peut pas être évaluée) à T4 pour la taille de la tumeur ;
- Nx (l'envahissement des ganglions ne peut pas être évalué) à N3 pour le degré d'envahissement des ganglions ;
- Mx (renseignements insuffisants pour classer les métastases à distance), M0 et M1 pour la présence ou non de métastase à distance.

Les caractéristiques observées lors de cet examen anatomopathologique peuvent être différentes de celles observées lors de l'examen clinique avant traitement, le stade est alors réévalué après la chirurgie.

Le stade des cancers du sein au moment du diagnostic est exprimé par un chiffre romain allant de 0 à IV. (INCa 2013)

*b) Les grades anatomopathologiques du cancer du sein*

Tous les types de cancers du sein n'ont pas la même agressivité. L'examen anatomopathologique d'un échantillon de la tumeur (après biopsie ou exérèse chirurgicale) permet d'évaluer à la fois le type de tumeur par analyse immunohistochimique (HER2, ER, PR) mais aussi de définir son grade. L'examen microscopique de la tumeur permet d'évaluer trois paramètres morphologiques :

- L'architecture tumorale qui caractérise le niveau de différenciation des cellules. Plus une cellule est différenciée, moins elle est agressive et inversement.
- La forme et la taille du noyau de la cellule qui change lors du processus de cancérisation.
- L'activité mitotique (nombre de cellules en division) qui reflète l'activité proliférative de la tumeur et donc la vitesse de développement.

Une note, de 1 à 3, est attribuée à chaque paramètre.

Critère	Note 1	Note 3
Architecture	La tumeur contient beaucoup de structures bien formées.	La tumeur contient peu ou pas du tout de structures bien formées.
Noyau	Les noyaux de la tumeur sont petits et uniformes.	Les noyaux de la tumeur sont gros et leur taille et leur forme varient.
Activité mitotique	Les cellules de la tumeur se divisent lentement = faible nombre de mitoses.	Les cellules de la tumeur se divisent rapidement = important nombre de mitoses.

(D'après INCa, 2013)

Le grade correspond à la somme des trois notes obtenues par chaque critères. Le grade I est attribué aux tumeurs les moins agressives avec un score compris entre 3 et 5, et le grade III aux tumeurs les plus agressives (score égal à 8 ou 9). Le grade II correspond à un niveau intermédiaire (score égal à 6 ou 7).

## 2. Traitements actuels

Différents types de traitements peuvent être utilisés pour traiter un cancer du sein : la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, la chimiothérapie et les thérapies ciblées. Il est possible parfois qu'un seul type de traitement soit nécessaire. Dans d'autres cas, une association de traitements est nécessaire pour mieux cibler la maladie. On peut ainsi, par exemple, réaliser une chirurgie et compléter ensuite le traitement uniquement par une chimiothérapie, ou uniquement par une radiothérapie. Le traitement complémentaire, traitement adjuvant permet de compléter l'action de la chirurgie et de renforcer son efficacité.

Le choix des traitements dépend des caractéristiques suivantes :

- du type de cancer de l'endroit où il est situé dans le sein,
- de son caractère unifocal (un foyer cancéreux) ou multifocal (plusieurs foyers cancéreux),
- de son stade,
- de son grade,
- du statut des récepteurs hormonaux ou de HER2,
- des éventuelles contre-indications aux traitements,

- de l'état de santé général, de l'âge, des antécédents personnels médicaux et chirurgicaux et des antécédents familiaux de la patiente.

*a) La chirurgie*

La chirurgie est le plus souvent réalisée en premier lieu et peut être suivie d'une chimiothérapie et/ou d'une radiothérapie et/ou d'une hormonothérapie. Elle a pour objectif d'enlever les tissus cancéreux. Elle peut être parfois précédée d'un traitement médical néoadjuvant (chimiothérapie ou hormonothérapie) permettant de réduire la taille de la tumeur afin de faciliter l'intervention chirurgicale.

Deux types d'interventions chirurgicales peuvent être pratiqués :

- Une chirurgie mammaire conservatrice : tumorectomie ou segmentectomie. Elle consiste à retirer la tumeur et une petite quantité des tissus environnant afin de conserver la plus grande partie du sein. Elle est privilégiée aussi souvent que possible et est toujours complétée d'une radiothérapie
- Une chirurgie mammaire non conservatrice, appelée mastectomie. Elle consiste à retirer la totalité du sein y compris l'aréole et le mamelon. Dans ce cas, différentes techniques de reconstruction mammaires sont possibles par la suite.

En cas de tumeur infiltrante et dans certain cas de carcinomes canaux in situ, il est également nécessaire de retirer un ou plusieurs ganglions lymphatiques axillaires, dans le but de déterminer si la tumeur s'étend au-delà du sein et si un traitement complémentaire par chimiothérapie ou hormonothérapie est nécessaire ou si une radiothérapie des ganglions est justifiée. Le curage ganglionnaire permet également de réduire le risque de récurrence.

*b) La chimiothérapie*

Une chimiothérapie n'est pas proposée de façon systématique à toutes les patientes atteintes d'un cancer du sein. Son utilisation dépend du stade du cancer au moment du diagnostic et des facteurs de risque de récurrence. Le cancer du sein est modérément sensible aux agents de chimiothérapie cytotoxiques. Plusieurs catégories d'agents, avec différents mécanismes d'action ont une activité antitumorale chez les patientes atteintes d'un cancer du sein (Nicholson et al., 2014).

Les composés les plus employés et les plus actifs sont :

- les anthracyclines (doxorubicine, épirubicine) : ce sont des composés qui, de par leur structure « plate » (noyaux benzeniques) s'intercalent entre les paires de bases, et perturbent les mécanismes régulant le métabolisme de l'ADN.
- les agents alkylants (cyclophosphamide, sels de platine) : les agents alkylants et les sels de platine sont des composés électrophiles qui forment des liaisons covalentes avec des atomes riches en électrons. Dans les systèmes biologiques ces agents réagissent avec les atomes des protéines et de l'ADN. Les réactions les plus importantes pour la toxicité sont celles avec l'ADN. Elles induisent des liaisons fortes entre les brins, empêchant leur séparation et provoquant des cassures lors de la réplication.
- les antimétabolites (méthotrexate, 5-fluorouracile, capecitabine, gemcitabine) : les antimétabolites (puriques ou pyrimidiques), se substituent aux bases azotés lors de la production d'ADN en phase S, interfèrent avec la division et stoppent la prolifération. Cette caractéristique des antimétabolites les fait rentrer dans la catégorie des composés dits cytostatiques.
- les vinca-alcaloïdes (vinorelbine, vinblastine, vincristine),
- les dérivés de l'épothilone (ixabépilone),
- les taxanes (paclitaxel, docétaxel).

Les trois derniers sont des poisons des microtubules qui modifient la dynamique des microtubules et inhibent la division cellulaire.

Le plus souvent les traitements de chimiothérapie combinent plusieurs agents avec des mécanismes d'action différents et des toxicités non-chevauchantes, afin d'augmenter le bénéfice du traitement et de retarder l'émergence de résistance sans effet sur la mortalité ou la qualité de vie. Mais les traitements de chimiothérapie font apparaître plusieurs problèmes à la fois de résistance intrinsèque de la tumeur ou de résistance acquise au cours de traitement par mutation des cellules tumorales ou par sélection d'une sous-population tumorale, leur conférant un avantage sélectif face à ces molécules. Ceci peut également entraîner des risques de récurrence avec métastases et souvent d'agressivité accrue.

De plus de nombreux effets secondaires liés aux traitements de chimiothérapies existent et sont variables selon les molécules, les dosages et les personnes. Ils peuvent

également varier d'une cure de chimiothérapie à l'autre et ne sont pas systématiques. Ils existent deux types d'effets secondaires, les effets secondaires à court terme les plus fréquents (chute de cheveux, nausées et vomissements, fatigue, diarrhée, diminution des cellules sanguines, lésions buccales, engourdissement ou fourmillement des mains et des pieds, douleurs musculaires et articulaires) et les effets secondaires à long terme (troubles du cycle menstruel, troubles cardiaques, fatigue, réactions allergiques). (INCa, 2013)

*c) La radiothérapie*

La radiothérapie utilise des rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses. Les rayonnements ionisants sont précisément ciblés sur la zone à traiter, tout en préservant au mieux les tissus sains et les organes avoisinants. On peut distinguer deux types de radiothérapies :

- La radiothérapie externe : Elle utilise une source externe de rayonnements dirigés vers la zone à traiter et est la plus fréquente pour la radiothérapie des cancers du sein.
- La curiethérapie : Elle utilise une source radioactive placée à l'intérieur du corps, directement au contact de la zone à traiter mais est peu fréquemment utilisée dans le cas du cancer du sein.

Pour un cancer du sein, quatre zones du corps peuvent être traitées par radiothérapie :

- la glande mammaire, après chirurgie conservatrice
- le lit tumoral : la région du sein où se trouvait la tumeur avant l'intervention chirurgicale, donc après chirurgie conservatrice
- la paroi thoracique, après chirurgie non conservatrice
- les ganglions de la chaîne mammaire interne et ceux situés sous la clavicule et ce quel que soit le type de chirurgie

Les indications de la radiothérapie varient en fonction du stade du cancer. La radiothérapie est également utilisée pour traiter des métastases cérébrales ou osseuses. De plus, afin de limiter les effets indésirables et minimiser l'impact de la maladie et des traitements sur la vie des patientes, une nouvelle approche est testée depuis plusieurs années, dans la prise en charge des cancers du sein traités par chirurgie conservatrice. Cette nouvelle approche est la radiothérapie peropératoire qui consiste à délivrer une dose de rayonnements

ionisants pendant l'intervention chirurgicale, sur le lit tumoral. Cette nouvelle technique permet d'éviter 5 à 6 semaines de radiothérapie après la chirurgie et permet également de limiter les effets secondaires car la zone traitée est extrêmement bien ciblée et les tissus sains épargnés. Cette technique est aujourd'hui en phase d'expérimentation. (INCa, 2013)

*d) Les thérapies ciblées*

Ces thérapies ciblées permettent de bloquer spécifiquement des voies oncogéniques ou des mécanismes spécifiques des cellules cancéreuses dont elles sont dépendantes.

Certains sous-types de cancers du sein sont définis comme hormonosensibles, c'est à dire que les hormones féminines, œstrogènes et progestérone, naturellement produites par l'organisme, favorisent et stimulent leur croissance. L'hormonothérapie est un traitement qui consiste donc à empêcher l'action de ces hormones sur les cellules cancéreuses. Ce type de traitement est donc uniquement prescrit aux patientes présentant une forte expression des récepteurs hormonaux ER et/ou PR, et permet de limiter l'utilisation de chimiothérapies. Les bénéfices de l'hormonothérapie dépendent également du stade du cancer.

D'autres molécules de thérapies ciblées existent avec des mécanismes d'action différents. Deux familles de molécules sont fréquemment utilisées dans le cancer du sein :

- La famille des anticorps monoclonaux :
  - Le trastuzumab : connu aussi sous le nom commercial de Herceptin®. Il a été spécialement conçu pour bloquer la protéine HER2 qui est un récepteur qui permet de favoriser la croissance des cellules. Seules les patientes présentant une tumeur de statut HER2+, déterminé par anatomopathologie, se verront administrer ce traitement.
  - Le bévacizumab : commercialisé sous le nom d'Avastin®. Il a été conçu pour inhiber le VEGF (Vascular endothelial growth factor), qui favorise l'angiogenèse en favorisant la croissance et le développement des vaisseaux sanguins. La tumeur ne va donc pas pouvoir développer un nouveau réseau de vaisseaux sanguin et sera privée d'oxygène et de nutriments, ce qui entraîne un ralentissement de la croissance des cellules et l'apparition de nécrose au cœur de la tumeur.

- La famille des inhibiteurs des protéines kinases :
  - Le lapatinib : commercialisé sous le nom de Tyverb®. C'est un inhibiteur de tyrosine-kinase qui est capable de bloquer l'activité kinase de HER2. En bloquant l'activité kinase de ces récepteurs aux facteurs de croissance, il contribue à limiter le développement des cellules cancéreuses. Il est donc utilisé uniquement pour les tumeurs HER2+.
  - L'évérolimus : commercialisé sous le nom d'Afinitor®, c'est un inhibiteur de sérine-thréonine kinase et spécifiquement de la kinase mTOR (mammalian target of rapamycin).

Malheureusement tous les sous-types de cancers du sein ne peuvent bénéficier de thérapies ciblées. C'est le cas pour les tumeurs triple-négatives. L'hétérogénéité de ces tumeurs triple-négatives et la méconnaissance des voies oncogéniques motrices ne permettent pas encore de développer ce type de thérapie.

De nombreuses thérapies ciblées sont en cours de développement et d'évaluation au fur et à mesure de la découverte et de la compréhension des processus oncogéniques et des voies et mécanismes cellulaires dont les cellules cancéreuses sont dépendantes pour leur survie et leur prolifération (inhibiteurs de la voie PI3K/ mTOR , inhibiteurs des kinases mitotiques, inhibiteurs de PARP1....).

### III. Voies de réparation des dommages de l'ADN

#### A. Dommages à l'ADN et voies de réponse

Les dommages à l'ADN surviennent tout au long de la vie d'une cellule. Les causes de ces dommages sont variables et multiples, et peuvent provenir tant de l'extérieur (causes exogènes telles que les radiations ou agents chimiques mutagènes) que de l'intérieur de la cellule (causes endogènes telles que les erreurs lors de la réplication de l'ADN, les métabolites intermédiaires) décrites en Figure 3. Les dommages à l'ADN résultants de ces agressions sont de nature variable (insertions, délétions ou modifications de nucléotides, formations d'adduits, cassures simple- ou double-brin...) et posent un réel problème pour l'intégrité du génome car elles peuvent être la source de modifications des séquences nucléotidiques et par ce biais d'une altération de l'information génétique. Ces modifications génétiques participent au développement de maladies, en particuliers à l'émergence des cancers. Pour pallier ces risques, les cellules humaines ont développé des systèmes efficaces pour prévenir les conséquences de ces lésions à l'ADN. En effet, elles sont équipées de système de détection de dommages à l'ADN et vont activer des voies de réparation. Selon la nature des dommages, certaines voies de réparation seront préférentiellement activées et selon la quantité de ces dommages et la capacité limitée des cellules à les réparer, ces dernières évolueront vers un processus de mort cellulaire si les dommages sont trop importants. Ainsi, un stress génotoxique déclenchera une réponse cellulaire qui se manifestera par l'arrêt du cycle sous l'influence notamment de p53. Celui dernier permettra éventuellement à la réparation de l'ADN de s'effectuer et dans le cas contraire le déclenchement de la mort cellulaire. La protéine p53, suppresseur de tumeur à donc un rôle centrale dans l'avenir de la cellule lésée sur son ADN. La réponse p53 inclut la stabilisation de la protéine par phosphorylation lors d'un stress génotoxique (notamment en Ser15) (Lavin and Gueven, 2006) et une augmentation de son activité transcriptionnelle ciblant en particulier des gènes codant pour des inhibiteurs de CDK tel que *CDKN1A* (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) codant pour p21, impliqués dans les points de contrôle du cycle cellulaire et aussi des gènes codant pour des protéines proapoptotiques telles que BAX (Bcl-2-associated X protein), NOXA ou PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) (Sengupta and Harris, 2005). Au final, la cellule soumise

au stress génotoxique parviendra à réparer son ADN efficacement et survivra sans altération génétique, ou si le dommage est trop intense sera éliminée. Entre ces 2 extrêmes, selon la nature et/ou l'étendue des dommages, la cellule réparera plus ou moins fidèlement son ADN à un niveau compatible avec sa survie, mais dont l'intégrité génétique peut être altérée.

Les cellules cancéreuses sont particulièrement soumises à divers stress dont des stress génotoxiques endogènes ou exogènes (Hanahan and Weinberg, 2011) qui participent à l'instabilité génétique observée dans les cancers. En effet, cette dernière est le moteur des processus oncogéniques car elle favorise la diversité et l'adaptabilité cellulaire, sous-tendant l'émergence et l'évolution d'une tumeur. Elle promeut également la capacité des cellules tumorales à s'adapter aux conditions de stress auxquels elles sont soumises.

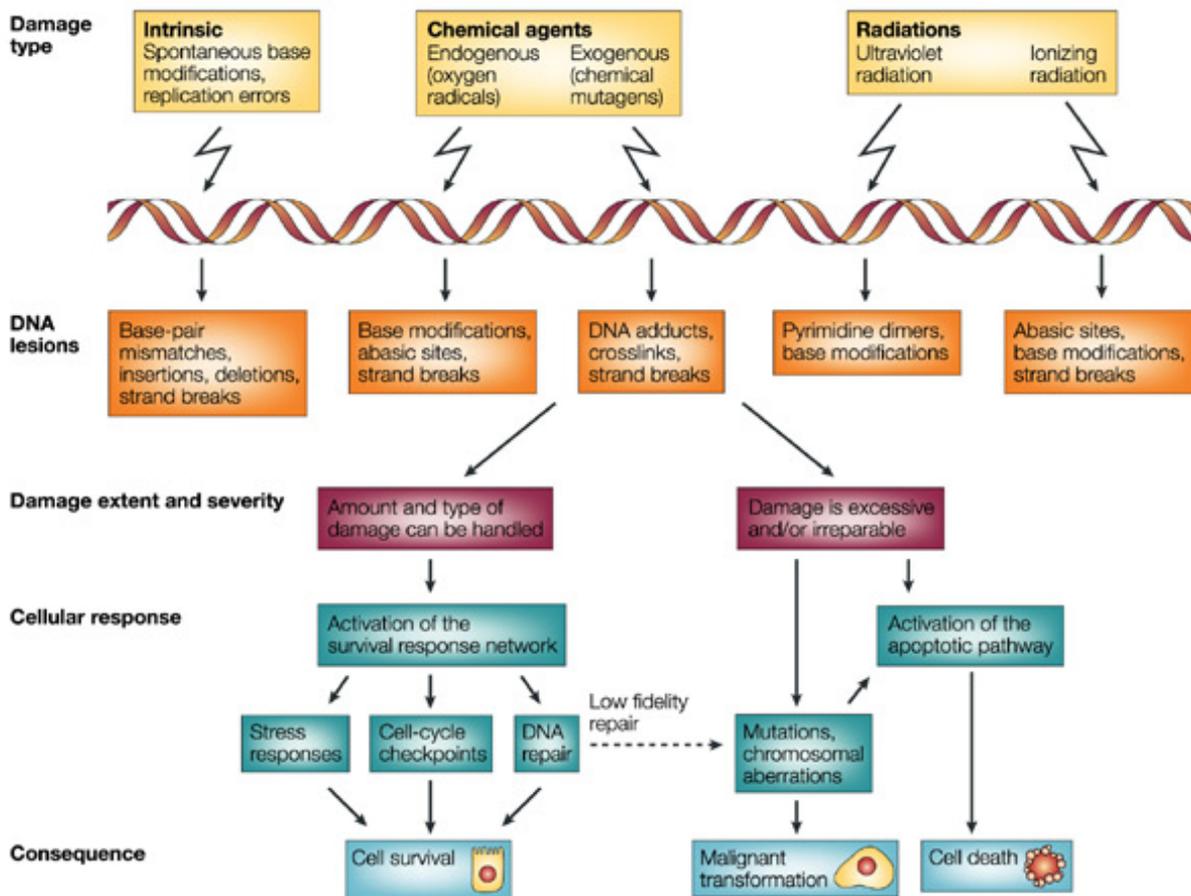


Figure 3 : Les différents types de lésions de l'ADN induits en fonction de différentes causes et les réponses et conséquences cellulaires associées.

D'après (Shiloh, 2003)

Selon le type de lésions, plusieurs voies de réparation de l'ADN peuvent être engagées pour préserver l'intégrité du génome des cellules (Figure 4). Les cassures de l'ADN sont des

lésions particulièrement redoutables pour la cellule. Deux types de cassures peuvent être distinguées: les cassures simple-brin et les cassures double-brin. De manière schématique, les voies BER (Base excision repair), NER (Nucleotide excision repair) et MMR (Mismatch repair) participent à la réparation des cassures simple-brin et les voies de la recombinaison homologue (RH) et NHEJ (non-homologous end joining: ligature d'extrémités non homologues) sont impliquées dans la réparation des cassures double-brin, ces dernières étant les plus délétères pour la cellule. Le choix de la voie de réparation dépend du type de lésions mais aussi de facteurs tels l'état des brins d'ADN et leur processing.

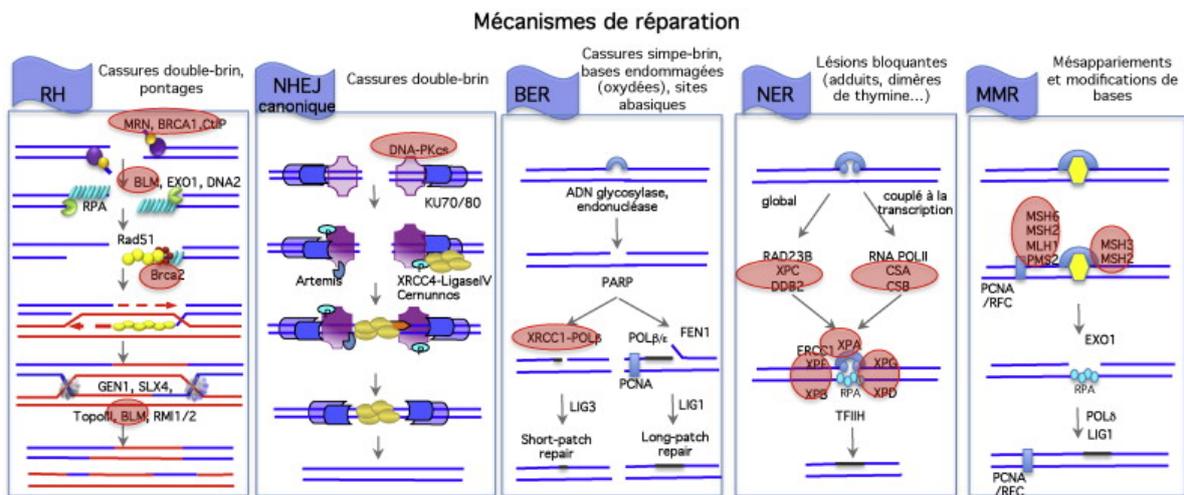


Figure 4 : Voies de réparation des lésions simple-brin de l'ADN et leurs acteurs mis en jeu en fonction des types de lésions à l'ADN.

D'après (Rass et al., 2012)

## B. Voies de réparation des lésions simple-brin de l'ADN

Les lésions qui affectent un seul brin de l'ADN sans modification du squelette de l'hélice d'ADN, comme les cassures simple-brin ou les bases altérées par différentes modifications sont préférentiellement réparées par le mécanisme d'excision de base nommé BER. Le mécanisme de réparation NER, permet d'éliminer par excision de nucléotide, les lésions déformant la structure hélicoïdale de l'ADN, comme les modifications de bases provoquant un encombrement ou des liaisons entre les bases. Ce mécanisme peut intervenir à n'importe quel moment ou bien être couplé à la transcription. Enfin le mécanisme MMR de réparation des mésappariements et de modification de bases a besoin d'un accès à l'ADN et est retrouvé préférentiellement lors de la réplication ou de la transcription. Il est

particulièrement associé à la réplication afin d'en corriger les erreurs. Tous ces mécanismes de réparation de lésions simple-brin de l'ADN impliquent de nombreuses protéines répertoriées dans la Figure 4 (Rass et al., 2012).

### **C. Voies de réparation des cassures double-brin de l'ADN**

Les cassures double-brin sont très toxiques pour la cellule et sont potentiellement la source d'importants réarrangements génomiques. Ces cassures sont nécessaires pour générer de la diversité dans certains processus physiologiques comme le répertoire immunitaire mais sont aussi à l'origine d'une instabilité génétique qui peut conduire à l'émergence de cellules cancéreuses. Le maintien de la stabilité génomique est assuré par un système sophistiqué de réparation des cassures double-brin incluant les 2 grandes voies: la recombinaison homologue (HR : homologous recombinaison) et la voie NHEJ (non-homologous end joining: ligature d'extrémités non homologues) (Figure 4). Le premier débute par la résection d'ADN simple-brin et a besoin de séquences d'ADN homologue présentes lors des phases G2/M du cycle cellulaire lorsque l'ADN a été dupliqué. Le second au contraire ne nécessite ni résection, ni homologie de séquence et pouvant ainsi survenir tout au long du cycle cellulaire.

La réponse aux dommages de l'ADN déclenchée par les cassures double-brin s'appuie tout d'abord sur la modification de la chromatine au niveau de la lésion pour permettre l'accès à l'ADN et le recrutement et l'activation d'une cascade d'acteurs sur le site même de la lésion (Figure 5). Deux complexes moléculaires sont capables de détecter les cassures d'ADN et jouent le rôle de senseurs: le complexe MRN constitué des protéines MRE11, RAD50 et NBS1, qui détecte les cassures double-brin et la protéine RPA (Replication protein A), associée au complexe 9-1-1 (RAD9-RAD1-HUS1), qui détecte les régions exposées des simple-brin d'ADN. Ces senseurs recrutent les kinases apicales de la famille des PI3K-like kinases (PIKKs), Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) et Ataxia-telangiectasia and Rad3-related (ATR), qui après activation par autophosphorylation, vont phosphoryler de nombreux acteurs dont les médiateurs de ces dommages et des kinases effectrices afin de transmettre le signal rapidement. Ces acteurs sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (Figure 5) dont dépendra le destin cellulaire. Cette cascade d'activation aboutissant aux effecteurs, peut conduire à la réparation de l'ADN

suffisante pour la survie ou bien insuffisante entraînant la mort ou la sénescence de la cellule lésée. (Sulli et al., 2012)

Un des acteurs médiateurs de la présence de dommage à l'ADN pouvant être phosphorylé par les kinases apicales (ATM et ATR) est le variant 2 de l'histone H2A (H2AX). La Sérine 139 de la protéine H2AX sera phosphorylée, générant le marqueur de cassures double-brin  $\gamma$ H2AX au niveau de la lésion (Redon et al., 2002). ATM est activé principalement par les cassures double-brin et ATR plutôt par tout stress génotoxique lié à la réplication.  $\gamma$ H2AX recrute MDC1 (Mediator Of DNA Damage Checkpoint Protein 1) qui amplifie la réponse aux dommages en favorisant le recrutement du complexe MRN et l'activation d'ATM (Valdiglesias et al., 2013). Les protéines BRCA1 et 53BP1 (p53 binding protein), considérées également comme médiateurs des dommages à l'ADN, sont également recrutées et phosphorylées sur le site de la lésion. Des modifications post-traductionnelles des histones par ubiquitination se produisent également au niveau de la lésion, par les ubiquitine ligases RNF8 et RNF168 (Panier and Boulton, 2014). Les kinases CHK1 (Checkpoint kinase 1) et CHK2 (Checkpoint kinase 2) peuvent être activés par ATM (ciblant préférentiellement CHK2) et ATR (ciblant préférentiellement CHK1) et diffuser l'impact de la réponse aux dommages au delà de la lésion à l'ADN, en activant notamment p53 et les phosphatases CDC25 impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Maréchal and Zou, 2013). (Figure 5)

Introduction

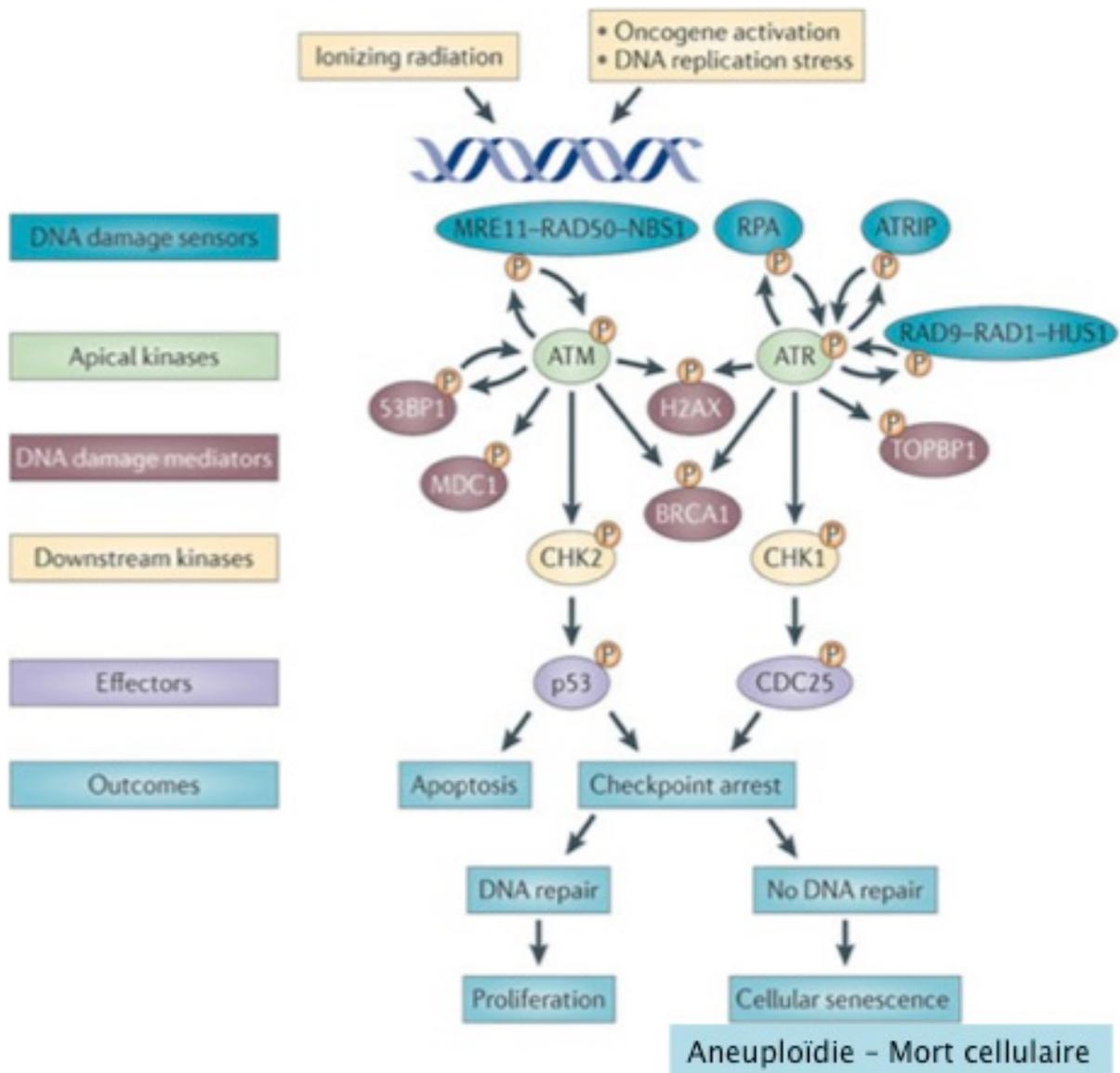


Figure 5 : Voies de réponse aux dommages à l'ADN

D'après (Sulli et al., 2012)

## ***1. Les voies NHEJ***

La voie classique de réparation de l'ADN par NHEJ ne nécessite pas de résection des extrémités d'ADN, ni de séquence homologue comme matrice de réparation, contrairement à la recombinaison homologue (RH). Longtemps, un dogme laissait croire que cette voie était une source de diversité génétique car incapable de reproduire une séquence d'ADN à partir de son brin complémentaire, comme le fait la RH. De plus, une voie NHEJ alternative a été récemment décrite. Comme la voie classique, elle ne nécessite pas de brin homologue pour modèle, en revanche elle nécessite la résection des simple-brin d'ADN comme la RH. Il s'est avéré que cette voie alternative contrairement à la voie canonique était à l'origine de translocation chromosomique et jouait un rôle important dans l'instabilité génétique.

### *a) NHEJ canonique*

Les extrémités double-brin de l'ADN non réséquées (Figure 9) sont reconnues et protégées par le complexe KU80/KU70 qui recrute la DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit). Un certain nombre de facteurs incluant Artemis, préparent les extrémités de l'ADN à la ligation réalisée par la DNA ligase IV assistée des cofacteurs XRCC4 et Cernunnos/XLF (Lieber, 2010) (Figure 6).

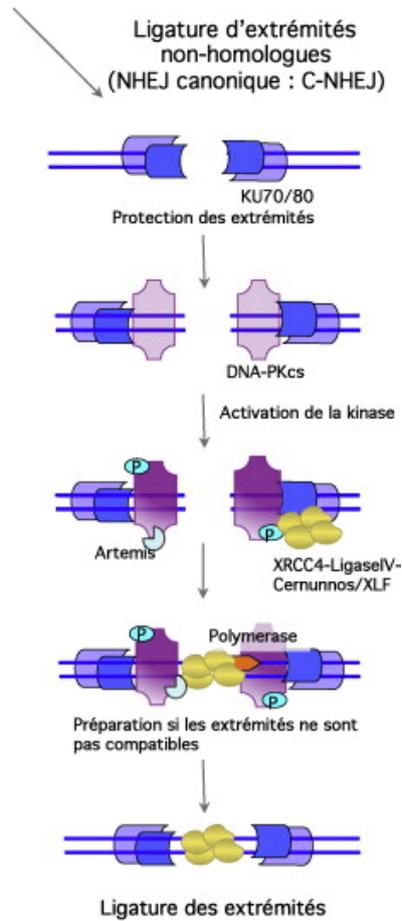


Figure 6 : Voie d'action de ligature d'extrémités non homologue canonique (NHEJ canonique : C-NHEJ)

D'après (Rass et al., 2012)

*b) NHEJ alternative*

Cette voie alternative de NHEJ n'est encore que partiellement comprise. Elle est initiée par la résection d'ADN simple-brin au niveau de la cassure (Figure 9) qui peut être inférieure à 50 paires de base et qui n'est pas protégée par le complexe KU70/80, révélant potentiellement des micro-homologies, parfois éloignées du site de lésion, qui peuvent alors s'hybrider créant des structures intermédiaires remaniées avant ligation. Cette voie n'est pas dépendante de la ligase IV, mais de PARP1 et de la ligase III (Figure 7). De plus, l'activité nucléase de MRE11 favoriserait cette voie. Les micro-homologies ne semblent pas strictement nécessaires pour que la réparation de l'ADN par cette voie se mette en place. De plus les délétions sont fréquentes au niveau des jonctions réparées par cette voie et elle semble à l'origine de nombreuses translocations observées lors des cassures double-brin. (Bétermier et al., 2014)

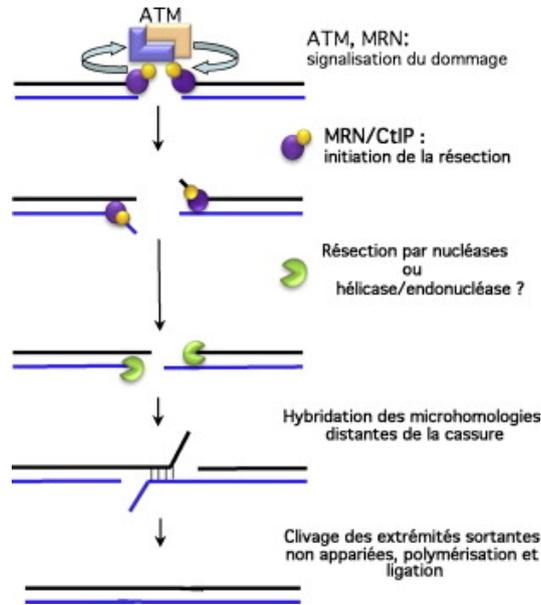


Figure 7 : Voie d'action de ligature d'extrémités non homologue alternatif

D'après (Rass et al., 2012)

## 2. La recombinaison homologue

La voie HR est initiée par la résection des extrémités de l'ADN cassées (Figure 9) par MRE11 (Meiotic recombination 11) et CtIP (CtBP-interacting protein), dont le recrutement est favorisé par BRCA1 (Huertas, 2010). Cette résection génère un brin 3' qui sera recouvert par la protéine RPA. La nucléase Exo1 (Exonuclease 1) participe également à la résection des extrémités cassée. Son recrutement est dépendant de MRE11 et CtIP et ce dernier serait capable d'en contrôler son activité (Eid et al., 2010). Le complexe BRCA2/PALB2 enlève la protéine RPA du simple-brin et permet le recrutement et la nucléation autour du simple-brin d'ADN de la protéine pivot de la RH, RAD51 par interaction directe avec BRCA2 (Buisson et al., 2010). RAD51 promeut l'invasion de l'ADN double-brin homologue et permet un échange de brin, créant ainsi des structures hybrides intermédiaires sur lesquelles la synthèse d'ADN peut se faire. (Figure 8) Des échanges entre brins d'ADN et/ou des structures cruciformes appelées jonctions de Holliday peuvent se produire. La résolution de ces dernières par des complexes moléculaires à activité résolvasse, impliquant BLM et EME1/MU81 par exemple, pourra conduire à des conversions géniques avec ou sans crossing-over.

La recombinaison homologue permet de réparer les cassures double-brin de l'ADN mais est aussi impliquée lors de la réplication lorsque les fourches de réplication rencontre un blocage ou des lésions.

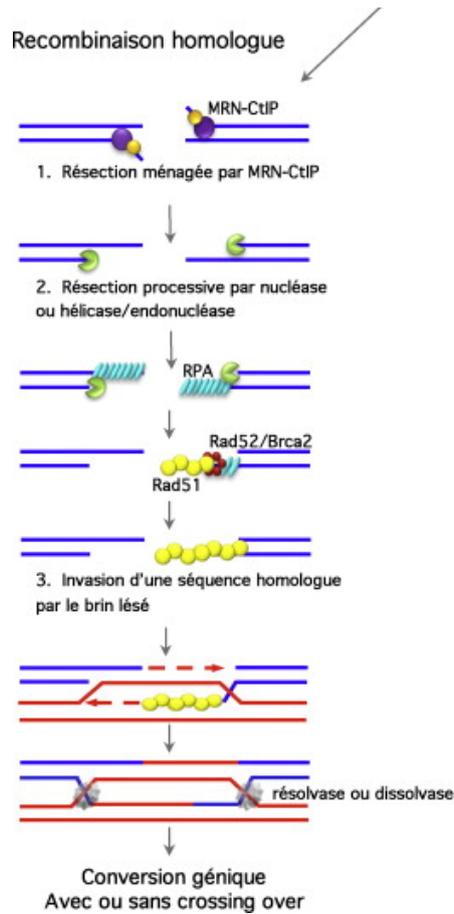
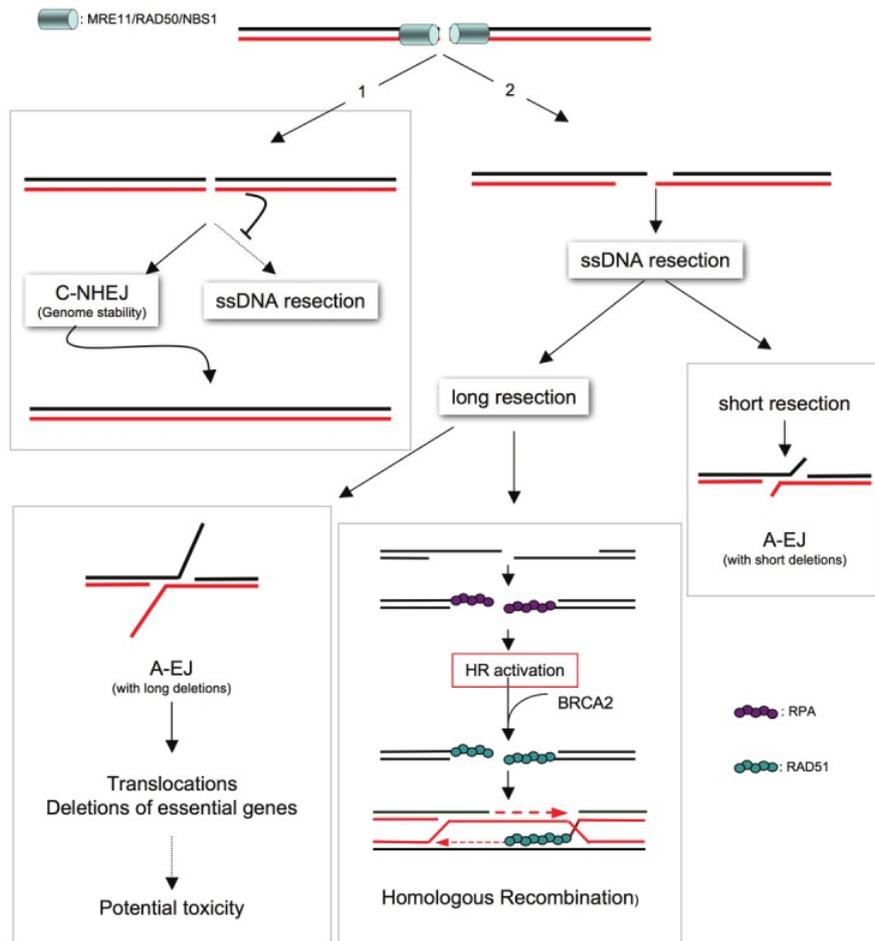


Figure 8 : Voie d'action de la recombinaison homologue

D'après (Rass et al., 2012)

### 3. Choix entre NHEJ et RH

La résection ou non des brins de l'ADN au niveau de la cassure d'ADN est fondamentale dans l'orientation de la voie de réparation qui va s'exécuter (Figure 9). La présence d'un partenaire homologue est également un élément important. Ainsi, la RH peut seulement survenir dans les phases S et G2 du cycle cellulaire lorsque l'ADN a été dupliqué (Figure 10).



**Figure 9 : Choix du mécanisme de réparation des cassures double-brin de l'ADN en fonction de la résection des simple-brin d'ADN**

D'après (Grabarz et al., 2012)

L'étape d'initiation de la résection implique des nucléases et hélicases. EXO1 intervient dans la RH (Bolderson et al., 2010). L'hélicase BLM, mutée dans le syndrome de Bloom prédisposant aux cancers, pourrait également participer au processus de résection (Nimonkar et al., 2008). Il est important que cette étape soit restreinte aux phases S et G2 du cycle cellulaire. CtIP initie une résection ménagée qui sera ensuite amplifiée. Une compétition entre acteurs de la résection se produit au niveau de la cassure: ainsi la fixation du complexe KU aux extrémités de l'ADN pourrait être inhibée au cours de la phase S pendant laquelle la RH doit être favorisée, par des mécanismes encore mal définis. Inversement la DNA-PK inhibe la RH (Allen et al., 2002).

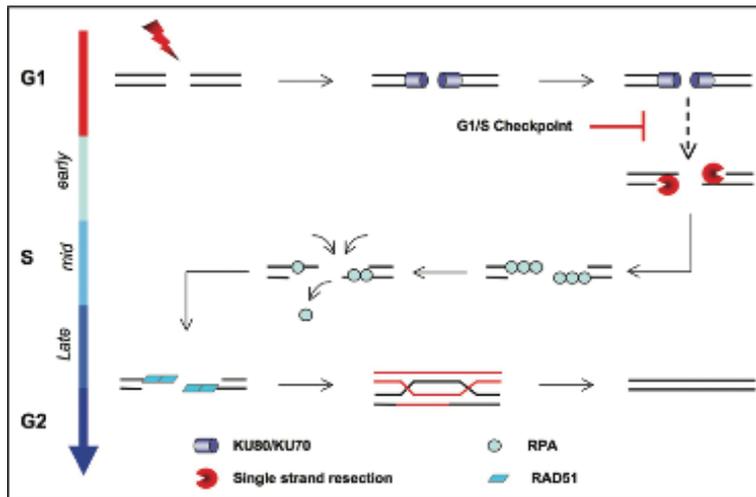


Figure 10 : Choix du mécanisme de réparation des cassures double-brin de l'ADN en fonction du cycle cellulaire

D'après (Delacôte and Lopez, 2008)

De plus la protéine p53 est capable d'inhiber la RH. Lors d'un stress génotoxique cette protéine est activée et va permettre de bloquer les cellules en phase G1, bloquant alors la possibilité d'activation de la RH. De plus p53 est capable de bloquer la RH indépendamment de son rôle transcriptionnel. La protéine p53 peut interagir avec des protéines impliquées dans la RH comme RAD51 et RAD54. (Bertrand et al., 2004)

Le choix entre RH et NHEJ est également associé à une compétition de recrutement entre les protéines 53BP1 et BRCA1 au site de la cassure. Lors de la phase G1, la protéine 53BP1 s'oligomérisse au niveau de la cassures en interagissant avec les modifications d'histones et va alors recruter ses protéines effectrices RIF1 (RAP1-interacting factor 1) et PTIP (PAX transactivation activation domain-interacting protein) au niveau des résidus de 53BP1 phosphorylés par ATM. Le complexe 53BP1-RIF1 lié à la chromatine va empêcher l'association de BRCA1 avec le complexe MRN et CtIP et la résection des brins d'ADN, favorisant alors la voie NHEJ canonique. Lors de l'entrée des cellules en phase S, CtIP est phosphorylé par les CDK, promouvant son interaction avec BRCA1 et empêche ainsi l'association du complexe 53BP1-RIF1 avec l'ADN au site de cassure à travers un mécanisme encore inconnu. La résection des brins d'ADN est activée pouvant alors aboutir à la RH. (Panier and Boulton, 2014)

Le choix de la voie de réparation des cassures double-brin de l'ADN a un très fort impact sur le maintien de la stabilité du génome.

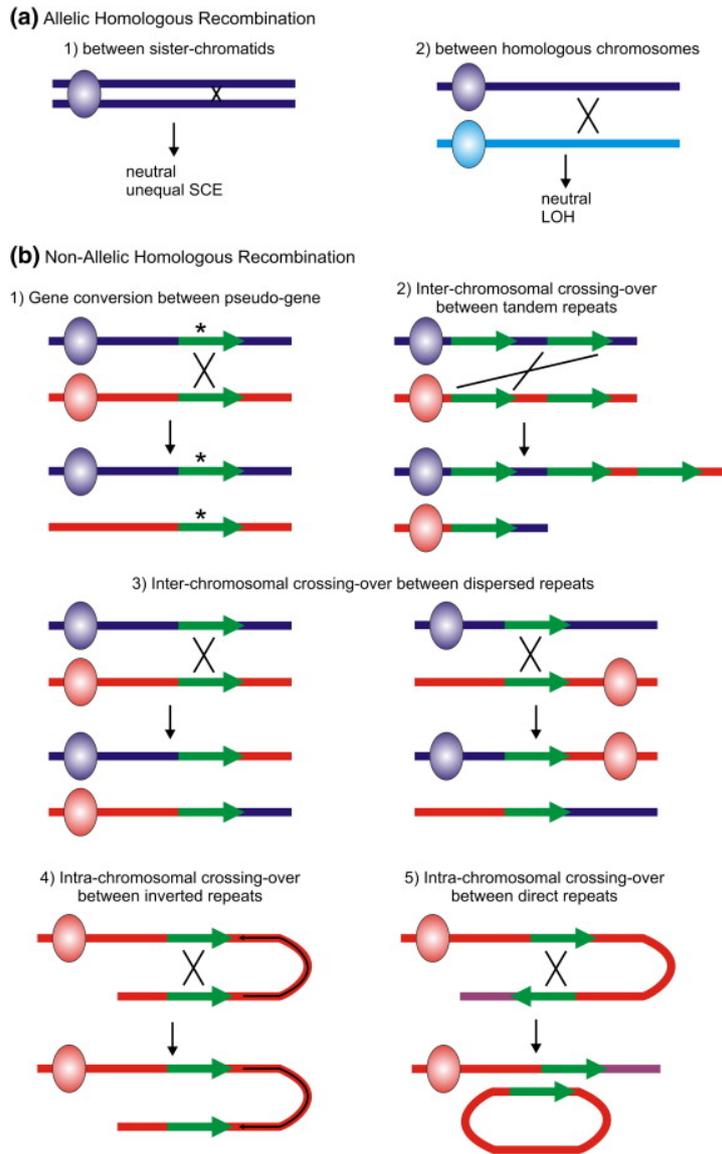
#### 4. *Fidélité des voies de réparation et rôle en cancérologie*

Le maintien, la duplication et la transmission du génome nécessitent la coordination d'un réseau complexe de surveillance et de réparation de l'ADN. Des défauts dans ce réseau entraînent une instabilité génomique et une prédisposition à l'émergence de cancers. La présence de cassures de l'ADN ainsi que l'activation des voies de réponse aux dommages à l'ADN sont détectables au stade précoce de l'oncogenèse. Ces processus sont en particulier liés au stress répliatif endogène, lui-même lié à un blocage des fourches de réplication qui peut être induit par différents processus, comme les espèces oxydantes (ROS : reactive oxygen species) générées par le métabolisme cellulaire. Ce stress répliatif est une source significative d'instabilité génétique dans les stades précoces de l'oncogenèse (Halazonetis et al., 2008). L'implication de la RH au niveau des fourches bloquées au cours de la réplication a été récemment revisitée. La RH permet la stabilisation de ces fourches et leur redémarrage, elle assure également leur progression. La RH a la capacité de reconstruire un réplisome au niveau des fourches inactives, qui peut subir des remaniements conduisant à des erreurs de réplication. Dans ce sens, on peut dire que la RH active pendant la réplication, est non seulement nécessaire à la robustesse de la réplication mais elle contribue également à l'instabilité génomique qui peut survenir au cours de ce processus et ainsi participer à l'émergence de cellules cancéreuses. Ainsi, un défaut de HR peut conduire à la carcinogénèse mais un excès de RH peut s'avérer également délétère. (Carr and Lambert, 2013) Ce dernier cas est illustré par le syndrome de Bloom, associé à une mutation dans le gène *BLM* qui induit une RH augmentée associée à une prédisposition aux cancers chez les patients qui en souffrent (Karow et al., 2000).

L'importance du stress répliatif dans l'instabilité génétique est un domaine de recherche particulièrement intéressant en cancérologie. En effet, celui-ci généré par divers processus, notamment métaboliques, induits par la pression oncogénique, comme la production d'espèces oxydantes ou le manque de nucléotides par consommation excessive, pour la duplication de l'ADN. Ces processus aboutissent à une diminution la mobilité des fourches de réplication et à une augmentation de la fragilité chromosomique en induisant des cassures de l'ADN directement liées à la réplication. Les obstacles à la progression des fourches peuvent conduire à des erreurs de réplication et à des remaniements chromosomiques, en particulier au niveau de sites chromosomiques identifiés comme fragiles (Carr and Lambert, 2013). En effet, à ce stade, des échanges de séquences d'ADN dupliqué

peuvent survenir, ils peuvent être neutres s'ils surviennent entre chromatides soeurs ou bien conduire à des réarrangements illégitimes s'ils surviennent entre des séquences répétées dispersées dans le génome (Figure 11). Ce processus de RH non allélique (NAHR) est maintenant identifié comme une source significative de réarrangements chromosomiques (Liu et al., 2012), comme ceux qui peuvent être observés au cours de processus tel que le phénomène de chromotripsis correspondant à événement cataclysmique induisant une multitude de réarrangements chromosomiques (Crasta et al., 2012). Dans les cellules de mammifères, la protection des fourches de réplication par la RH requiert la participation de BRCA1/2, RAD51 et les protéines de Fanconi (Schlacher et al., 2011, 2012). De plus, le complexe endonucléasique MUS81/EME1 et ERCC1 est nécessaire à la résolution des structures intermédiaires de réplication et à la séparation correcte des chromatides au cours de la mitose (Naim et al., 2013).

A l'opposé un défaut de la RH par le ralentissement de la progression des fourches de réplication qu'il engendre, peut être à l'origine d'un stress réplicatif (Daboussi et al., 2008a). De plus, il entrave la séparation correcte des chromosomes pendant l'anaphase et favorise l'aneuploïdie (Carr and Lambert, 2013). Ainsi, un équilibre entre une RH indispensable pour la transmission d'un génome stable et une RH suffisante pour permettre la progression adaptée de la réplication est nécessaire pour le maintien global de l'intégrité génomique. Un défaut ou un excès de la RH peut participer en revanche à la carcinogénèse par l'instabilité génétique qu'ils vont induire.



**Figure 11 : Différents types de reconnaissance d'homologie lors du processus de recombinaison homologue**  
D'après (Carr and Lambert, 2013)

De nombreux syndromes héréditaires impliquant des acteurs de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN prédisposent à une instabilité génétique et aux cancers (Hoeijmakers, 2009). Onze des douze mutations héréditaires prédisposant au cancer du sein impliquent directement des acteurs de la réponse aux dommages à l'ADN et de leur réparation (Walsh and King, 2007). Ainsi, les gènes les plus fréquemment mutés sont BRCA1 et BRCA2, qui jouent un rôle fondamental dans la RH. Ces observations mettent en lumière l'importance de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN dans l'étiologie du cancer du sein. On peut aussi noter qu'un dysfonctionnement de la voie de signalisation PTEN/AKT1, par mutation de PTEN notamment, survenant dans 40 à 60% des cancers du sein sporadiques peut entraîner une altération de la réponse des cellules aux dommages à l'ADN (Plo et al., 2008).

La RH était initialement identifiée comme un mode de réparation fidèle de l'ADN puisque s'appuyant sur un ADN double-brin homologue. Au contraire la voie NHEJ était considérée comme susceptible d'introduire des erreurs dans la séquence d'ADN par rapport à la séquence d'origine. Il est maintenant établi que la réparation des cassures double-brin de l'ADN par la voie alternative NHEJ peut être la source d'un remaniement profond du génome incluant de multiples translocations chromosomiques (Guirouilh-Barbat et al., 2004; Stephens et al., 2009; Yan et al., 2007). De plus, du fait de la présence de séquences répétées dans le génome, la RH, notamment via la NAHR, peut aussi être à l'origine de remaniements génomiques comme des amplifications, des délétions, des inversions, des translocations ou des conversions géniques et ne garantit donc pas une reproduction fidèle de l'ADN. Aussi ces voies doivent être finement régulées et dans certains cas réprimées pour maintenir un génome stable. Par exemple, la RH est particulièrement requise lors des phases G2/M du cycle cellulaire où la probabilité de trouver une vraie séquence homologue avoisinante est la plus grande, mais elle doit être contenue pour éviter une trop grande instabilité génétique notamment au cours de la réplication.

Les traitements anticancéreux actuellement utilisés, comme l'irradiation ou les agents pharmacologiques génotoxiques, ciblent souvent l'ADN. Cependant des phénomènes de résistance innée ou acquise à ces stratégies thérapeutiques peuvent en limiter leur efficacité. Aussi, il est important de bien comprendre les voies de signalisation déclenchées dans les cellules cancéreuses en réponse aux agents génotoxiques et les voies de réparation recrutées pour identifier de potentielles nouvelles cibles, permettant d'optimiser leur utilisation dans le traitement des cancers.

## IV. La SURVIVINE

### A. Introduction

Le gène de la SURVIVINE, *BIRC5* (Baculoviral Inhibitor of apoptosis Repeat-Containing 5), a été cloné en 1997 par le laboratoire du Pr Altieri. La SURVIVINE a été identifiée tout d'abord pour sa fonction de survie, ce qui lui a valu son nom (Ambrosini et al., 1997). Le gène *BIRC5* se trouve sur le chromosome 17 en position q25 chez l'Homme (Li et al., 1998) et sur le chromosome 11E2 chez la souris (Li and Altieri, 1999a). La SURVIVINE qui fait partie de la famille des IAP (Inhibitor-of-Apoptosis Protein), est impliquée à la fois dans la division cellulaire et dans la survie des cellules

#### 1. Structure

Avec ses 142 acides aminés et ses 16,5 kDa la SURVIVINE est la plus petite protéine de la famille des protéines IAP, comprenant 7 autres membres (XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), cIAP1 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1), cIAP2 (cellular inhibitor of apoptosis protein 2), NAIP (NLR family, apoptosis inhibitory protein), Livin, ILP2 (IAP-like protein-2) et Bruce) (Duffy et al., 2007). Cette famille est définie par la présence d'1 à 3 copie(s) du domaine structural BIR (Baculovirus IAP Repeat). Certaines protéines possèdent également un domaine RING finger, un domaine de recrutement des CASPASES (CARD Caspase activation and recruitment domains), nécessaire à leur fonction d'inhibition de l'apoptose, par interaction physique directe avec certaines CASPASES (cysteiny-l-aspartate-cleaving proteases) (Deveraux and Reed, 1999). La SURVIVINE ne possède qu'un domaine BIR en N-terminal et aucun autre domaine commun aux IAP. En revanche elle possède une extrémité en hélice  $\alpha$  en C-terminal, qui semble avoir un rôle lors de la division cellulaire pour l'interaction avec les microtubules (Yamamoto et al., 2008) et une séquence d'export nucléaire, séquence NES (Nuclear export signal) (Knauer et al., 2007). La SURVIVINE peut former des homodimères via les surfaces hydrophobes de son domaine BIR. La chélation d'un atome de Zn au niveau de son domaine BIR est nécessaire à ses interactions protéiques (Verdecia et al., 2000). La forme monomérique de la SURVIVINE semble exercer

préférentiellement une activité anti-apoptotique, alors que la forme homodimérique assurerait plutôt le bon déroulement de la mitose. La balance entre les deux formes mono et dimériques pourrait expliquer les différences de fonctions (Pavlyukov et al., 2011). (Figure 12 et Figure 13)

## **2. Isoformes**

Le gène BIRC5 est constitué de 4 exons et 3 introns. Il existe plusieurs variants de transcription de la SURVIVINE qui ont été identifiés : SURVIVINE- $\Delta$ Ex3, SURVIVINE-2B, SURVIVINE 3B et SURVIVINE 2a (Figure 13). SURVIVINE-2B contient une insertion de 23 acides aminés provenant d'une insertion d'une partie de l'intron 2, cette séquence contient un site potentiel de N-glycosylation et 2 sites potentiels de N-myristoylation. Le  $\Delta$ Ex-3 résulte de la perte de l'exon 3 engendrant un domaine BIR et C-terminal tronqués. La nouvelle séquence carboxyterminale contient un site de N-myristoylation potentiel et des sites de localisation mitochondriale et nucléaire. Le variant SURVIVINE 3B contient 5 exons, incluant l'exon 3B, privé de 165 bases par rapport à l'exon 3, qui fait apparaître un nouveau codon stop et une protéine tronquée. SURVIVINE 2a, dernier transcrit découvert, contient les exons 1 et 2 et 197 paires de bases de la région 3' de l'intron 2. Ce dernier transcrit a également un nouveau codon stop prédisant une forme tronquée de la protéine (Duffy et al., 2007).

L'expression, les fonctions et les interactions des protéines correspondantes à ces transcrits sont peu connues. L'isoforme  $\Delta$ Ex-3 est décrite pour interagir avec la SURVIVINE au niveau de la mitochondrie. Ce complexe a été associé à l'inhibition de l'apoptose dépendante de la mitochondrie (Caldas et al., 2005a). De plus ce transcrit a été décrit pour favoriser l'angiogenèse in vivo, en facilitant le développement de nouveau micro-vaisseaux à partir de cellules endothéliales vasculaires, alors qu'il ne semble pas participer à la mitose (Caldas et al., 2007; Noton et al., 2006). Les isoformes 2a, 2B et 3B n'interfèrent pas non plus avec la division cellulaire (Lladser et al., 2011). Il a été suggéré que les isoformes 2a et 2B pouvaient former des hétérodimères avec la SURVIVINE et empêcher son activité anti-apoptotique. Mais de récentes données contradictoires suggèrent un possible rôle pro-tumorigénique (Caldas et al., 2005b; Necochea-Campion et al., 2013; Pavlidou et al., 2011). De plus amples investigations seront nécessaires pour mieux comprendre l'expression et les

fonctions de différentes isoformes dans les tissus cancéreux, afin de définir l'intérêt thérapeutique de les cibler. Il a été décrit un intérêt du ciblage de l'isoforme  $\Delta$ Ex-3 dans le cancer du sein (Zheng et al., 2011).

Ces variants de la SURVIVINE sont exprimés à des niveaux très inférieurs à ceux de la SURVIVINE et initialement décrits dans les tissus tumoraux (Ge et al., 2013). Lors de nos travaux nous nous sommes uniquement intéressés à la forme majoritaire de la SURVIVINE.

### **3. Expression**

La SURVIVINE retrouvée très abondamment dans presque toutes les tumeurs humaines est pratiquement indétectable dans la plupart des tissus normaux différenciés (Sah et al., 2006). Dans un contexte physiologique normal, la SURVIVINE est très exprimée durant l'embryogenèse et le développement fœtal. Elle joue probablement un rôle important pour le développement des tissus, l'homéostasie des organes et la différenciation (Adida et al., 1998; Altieri, 2008a). En effet la délétion homozygote du gène de la SURVIVINE chez les embryons de souris engendre des problèmes de mitose et une létalité précoce de ceux-ci (Adida et al., 1998; Uren et al., 2000).

L'expression de la SURVIVINE est aussi retrouvée dans quelques tissus et cellules adultes normaux proliférants : par exemple, dans les cellules épithéliales basales coliques, les thymocytes, les cellules souches CD34+ (Cluster of differentiation 34) et les cellules endothéliales vasculaires (Fukuda and Pelus, 2006). La SURVIVINE peut participer à l'auto renouvellement tissulaire et à une prolifération cellulaire rapide en réponse à un stress dans des tissus normaux. Il a été montré que la SURVIVINE était exprimée dans les cellules ostéoblastiques primaires humaines permettant l'homéostasie et la régénération du tissu osseux (Lechler et al., 2011a). Un autre exemple montre la réexpression de la SURVIVINE dans le cartilage humain en conditions pathologiques d'arthrite indiquant la relation possible entre l'expression du gène de la SURVIVINE et l'inflammation (Lechler et al., 2011b). La SURVIVINE est également impliquée dans les lésions liées au Psoriasis (Dallaglio et al., 2012).

#### 4. Interactions protéiques

La SURVIVINE présente de nombreux sites de liaison avec d'autres protéines partenaires (INCENP (Inner centromere protein), BOREALINE, XIAP, HSP90 (heat shock protein 90), Microtubules) qui ont été identifiées et validées par RMN (Résonance magnétique nucléaire), par cristallographie et mutagenèse directe de site. Les sites d'interaction avec les différentes protéines sont représentés par la Figure 12.

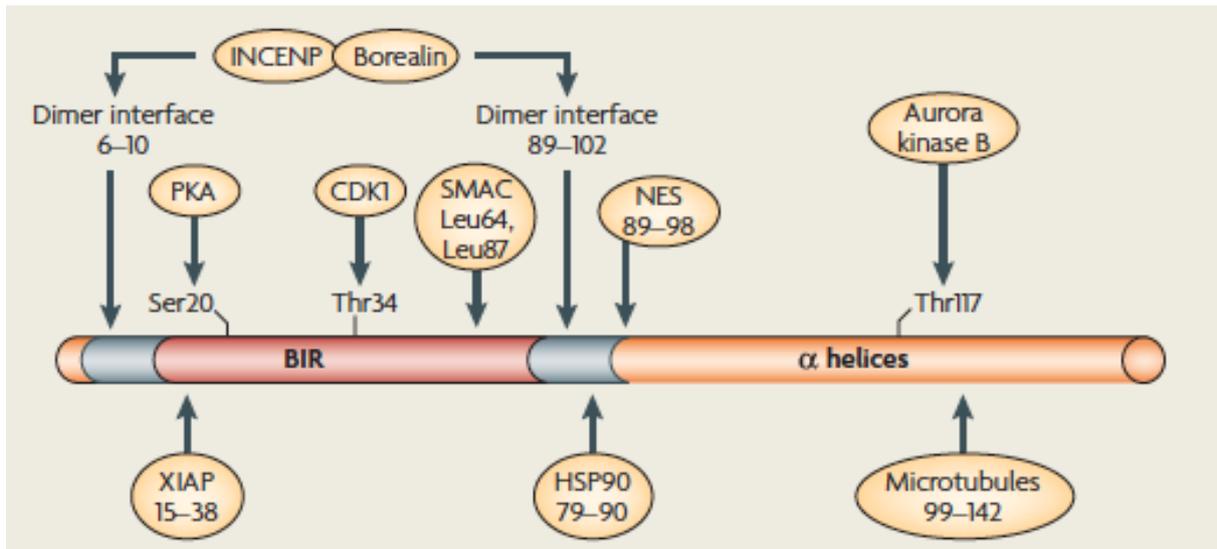


Figure 12 : Schéma de la structure de la SURVIVINE et des séquences protéiques impliquées dans l'interactions avec ses partenaires protéiques.

D'après (Altieri, 2008b)

### B. Régulation de la SURVIVINE

La SURVIVINE peut être régulée à différents niveaux, tant au niveau transcriptionnel, que par des modifications post-traductionnelles qui participent à la stabilité de la protéine.

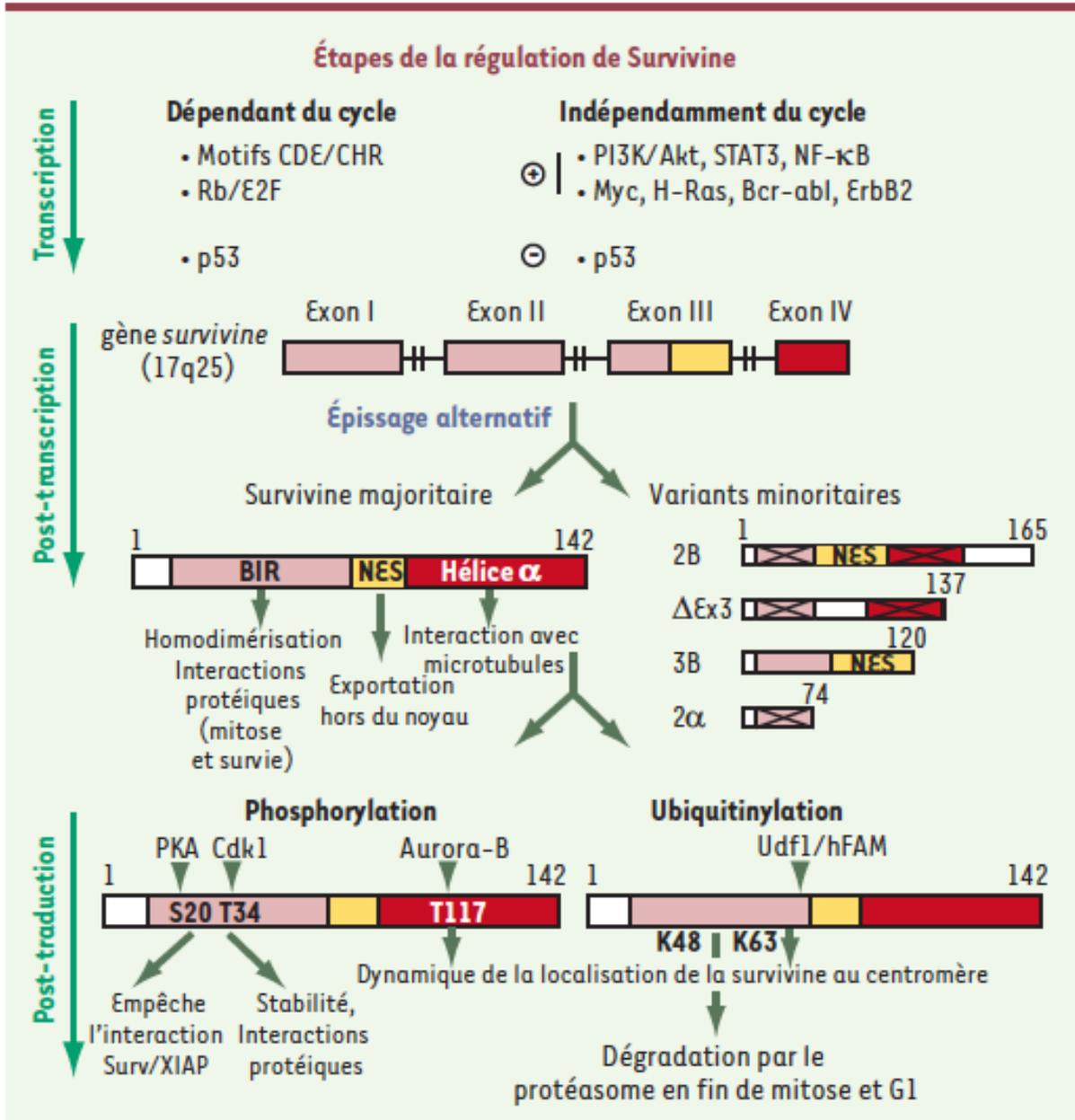


Figure 13 : Les différentes étapes de régulation de la SURVIVINE

D'après (Romagnoli et al., 2008)

### 1. Régulation génique

Le promoteur du gène *BIRC5* n'a pas de TATA ou CCAAT box et SP1 (Specificity protein 1) joue un rôle dans la régulation des gènes ayant perdu ces éléments (Li and Altieri, 1999b). Il existe 2 sites de liaisons pour SP1 dans la région promotrice de *BIRC5* (un premier en position -148 à -153 et un second en position -127 à -140) essentiels pour la régulation de l'activité basale du promoteur, défini dans la lignée HeLa. De plus l'homologue de SP1, SP3

régule le promoteur de *BIRC5* de concert avec SP1 (Xu et al., 2007). Le facteur de transcription humain SP1 est impliqué dans la régulation de l'expression de gènes dans de nombreux processus de développement cellulaire. Il se lie directement à l'ADN au niveau du promoteur et active la transcription du gène. La protéine p53, est un facteur de transcription qui va inhiber l'effet de SP1 au niveau du promoteur de *BIRC5* (Hoffman et al., 2002). En revanche dans un contexte de stress réplicatif, p53 est capable d'activer l'expression de *BIRC5* (Schneider et al., 2010). Ce mécanisme implique le facteur de transcription NF- $\kappa$ B qui dans un contexte cellulaire basal régule positivement l'expression de *BIRC5* (Schneider and Krämer, 2011).

La progression dans le cycle cellulaire modifie l'expression de la SURVIVINE. Les niveaux de SURVIVINE atteignent un pic d'expression en phase de mitose et sont très bas dans les cellules en phase G1 (Li et al., 1998, 1999). Le complexe CDK4 (Cyclin dependent kinase) -CYCLINE-D phosphoryle la protéine RB et engendre l'expression du gène *BIRC5* de manière dépendante de E2F, accélérant ainsi l'entrée dans le cycle cellulaire (Baker and Reddy, 2012).

Le promoteur de la SURVIVINE contient des régions CDE/CHR (cell cycle-dependent element/ cell cycle genes homology region). Ces séquences consensus sont impliquées dans la régulation transcriptionnelle en lien avec le cycle cellulaire. Elles participent donc à la modulation de l'expression de la SURVIVINE au cours du cycle cellulaire. Dans les cellules normales l'expression de la SURVIVINE est indétectable en phase G1, en correspondance avec son rôle majeur dans la division cellulaire. Elle apparaît en phase S et s'accumule en phase G2/M, pour son action sur la régulation de la mitose. Dans les cellules tumorales, l'expression de la SURVIVINE est indépendante du cycle cellulaire, même si des variations au cours du cycle cellulaire sont observées (Xia and Altieri, 2006). Son expression est induite par de nombreuses voies de signalisation (STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription 3), PI3K, NF- $\kappa$ B) ou des oncogènes (MYC, ERBB2) fréquemment dérégulés ou amplifiés dans les cellules cancéreuses, dont le cancer du sein (Romagnoli et al., 2008) (Figure 13).

Le facteur de transcription inductible STAT3 régule positivement l'expression de *BIRC5* (Aggarwal et al., 2009; Guo et al., 2012). La  $\beta$ -CATENINE activée par la voie WNT, et le facteur TCF4 (T cell factor-4), induisent également l'expression de *BIRC5* dans les cellules souches cancéreuses coliques empêchant l'apoptose et des problèmes de mitose

(Clevers and Nusse, 2012; Whitfield, 2009). La voie de signalisation mTOR peut également augmenter la transcription du gène *BIRC5* (Mita et al., 2008). Le facteur de transcription FOXO3 (Forkhead box O3), activé suite à une augmentation du niveau des espèces réactives de l'oxygène intracellulaire, inhibe l'expression de *BIRC5* directement.

## ***2. Régulation épigénétique***

L'expression de gènes requiert des modifications de la chromatine comme l'acétylation de résidus lysine des histones, retrouvées essentiellement dans les régions transcrites (Füllgrabe et al., 2011). Les régulateurs épigénétiques, DNMT1 (DNA methyltransferase-1), l'histone methyltransferase G9a, HP1 (Heterochromatin protein-1) et HDAC1 (Histone deacetylase 1), inhibent l'expression de *BIRC5* via leur régulation par p53 (Estève et al., 2005, 2007; Hervouet et al., 2010; Smallwood et al., 2007). En revanche SIRT1 (Sirtuin 1) exerce son inhibition de l'expression de *BIRC5* indépendamment de p53 (Wang et al., 2008). Il a été montré que l'utilisation de HDACi (Histone deacetylase inhibitors) maintenant l'acétylation des histones et d'autres protéines réduit le niveau de SURVIVINE (Brandl et al., 2012; Knauer et al., 2007; Krämer et al., 2006; Pal-Bhadra et al., 2012). De plus les protéines HDAC et SURVIVINE sont souvent retrouvées surexprimées. Par exemple une corrélation statistiquement significative a été retrouvée entre les niveaux d'ARNm (ARN messenger) de la SURVIVINE et des HDAC1/2/11 dans les carcinomes humains primaires du foie (Lachenmayer et al., 2012).

## ***3. Régulation de l'ARNm***

La protéine p53 est capable d'affecter l'épissage alternatif après transcription du gène *BIRC5* dans le cancer du sein et probablement dans d'autres types de cancer (Végran et al., 2007, 2011).

Les miRNA (micro-RNA), comme miRNA-16, miRNA-34 et miRNA-218 souvent retrouvés diminués dans les cancers peuvent contrôler les niveaux d'ARNm et réguler négativement l'ARNm de la SURVIVINE (Groner and Weiss, 2014a).

#### **4. Régulation de la protéine SURVIVINE**

La localisation et les modifications post-transcriptionnelles de la SURVIVINE peuvent déterminer ses fonctions. Il a été décrit 3 sites de phosphorylation pour cette protéine (Figure 13). La SURVIVINE peut être phosphorylée sur la thréonine 34 par CDK1-CYCLIN-B1 ce qui va alors promouvoir la progression en mitose. Cette phosphorylation augmente la stabilité de la protéine et les interactions protéiques (O'Connor et al., 2000) et atténue la prolifération favorisant la survie cellulaire (Barrett et al., 2009). La sérine 20 est phosphorylée par la protéine PKA (Protein kinase A), empêchant son interaction avec XIAP. La thréonine 117 phosphorylée par la kinase AURORAB est impliquée dans la localisation de la SURVIVINE au centromère (Delacour-Larose et al., 2007) (Figure 13 et Figure 15).

La SURVIVINE peut également être acétylée sur la lysine 129 (Riolo et al., 2012), régulant sa localisation cellulaire (Wang et al., 2010).

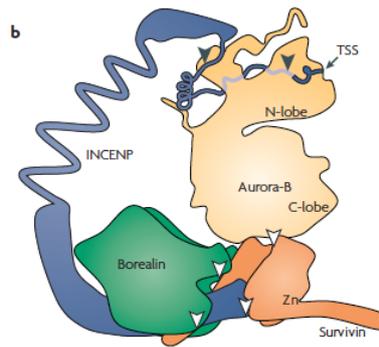
La SURVIVINE est une protéine dont le temps de demi-vie est court, évalué à 30 minutes (Zhao et al., 2000). Sa dégradation, par le protéasome est régulée par des processus d'ubiquitination. Les modifications post-transcriptionnelles des résidus lysine peuvent augmenter cette dégradation par le protéasome. En effet l'interaction de chaînes de d'ubiquitine avec la lysine 48 va permettre sa dégradation par le protéasome en fin de mitose (Zhao et al., 2000). Ce processus est inhibé par son interaction avec la protéine chaperonne HSP90 (Fortugno et al., 2003) Ces mécanismes sont impliqués dans les cellules cancéreuses pour maintenir une surexpression de la SURVIVINE. La lysine 63 peut également être liée à une chaîne d'ubiquitine par le complexe UDF1/hFAM (Ubiquitin fusion degradation protein 1/Fat facets in mammals) , intervenant dans sa localisation au centromère (Vong et al., 2005) (Figure 16).

## **C. Fonctions cellulaires**

### *1. Cycle cellulaire*

#### *a) Le CPC*

La SURVIVINE est définie comme un important régulateur de la mitose. En effet elle fait partie du complexe CPC (Chromosomal Passenger Complex), avec les protéines INCENP et Boréaline, régulant le 4<sup>ème</sup> partenaire la kinase mitotique AURORAB (Figure 14). Ce complexe CPC est localisé en prophase au niveau des chromosomes puis au niveau des centromères en métaphase. En anaphase il est localisé au niveau des cortex et fuseaux équatoriaux puis au niveau du pont intercellulaire en télophase. Il est responsable du bon déroulement de mitose. Ce complexe régule à la fois la structure du fuseau mitotique, la ségrégation correcte des chromatides sœurs et le déroulement de la cytokinèse. Le CPC est capable de contrôler la tension de l'attachement des chromosomes au fuseau mitotique lors de l'assemblage de ce dernier en métaphase. La SURVIVINE est elle plus particulièrement impliquée dans la localisation du CPC tant dans les cellules normales que tumorales. Sa phosphorylation par AURORAB sur la thréonine 117 et la liaison de chaîne d'ubiquitine sur la lysine 63 vont permettre la dynamique de sa localisation au centromère. De plus ces modifications post-transcriptionnelles seraient impliquées dans la dissociation de la SURVIVINE des centromères (Vong et al., 2005). INCENP et BOREALINE interviennent aussi dans la localisation du CPC (Jeyaprakash et al., 2007).



**Figure 14 : Schéma du complexe protéique CPC**

D'après (Ruchaud et al., 2007)

La formation du fuseau mitotique et les interactions microtubules/kinétochores, permettant l'attachement des chromatides sœurs au fuseau mitotique sont très contrôlées (Kotwaliwale and Biggins, 2006). Lorsque la tension du fuseau est suffisante et égale pour chaque chromatide sœur, contrôlée également par le CPC, la séparation de celles-ci peut s'opérer et la cellule peut progresser en métaphase puis anaphase (Figure 15 et Figure 16). L'activité kinase d'AURORAB est indispensable pour la dépolymérisation des microtubules lorsque les 2 chromatides sœurs sont attachées au même pôle du fuseau, empêchant une ségrégation inégale du matériel génétique. La SURVIVINE quand à elle assurerait la connexion entre les microtubules et les centromères (Lampson et al., 2004). Il a été également démontré qu'une fraction libre de la SURVIVINE, non liée au CPC pouvait se localiser et interagir directement sur les microtubules et participer à la formation du fuseau mitotique (Rosa et al., 2006).

La SURVIVINE participe également à l'activation du point de contrôle mitotique en maintenant la protéine BUBR1 (Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta) sur les kinétochores (Lens and Medema, 2003; Lens et al., 2003)

En fin de mitose un réseau d'acto-myosine circulaire se met en place et constitue une structure cytosquelettique appelée anneau contractile. Cet anneau va délimiter la zone de clivage entre les deux cellules filles. Pendant la télophase, le CPC et la SURVIVINE, phosphorylée sur la thréonine 117 sont concentrés en périphérie de l'anneau de clivage (Wheatley et al., 2007). Dans cette région, la SURVIVINE est co-localisée avec la protéine MKPL-1 (mitogen-activated protein kinase phosphatase-1), moteur moléculaire microtubulaire composant la matrice cytosquelettique de l'anneau de clivage et substrat de la kinase AURORAB (Thomas and Kaplan, 2007). La localisation de MKPL-1 et l'abscission en

fin de cytokinèse semblent régulées par la forme phosphorylée de la SURVIVINE (Chantalat et al., 2000; Thomas and Kaplan, 2007).

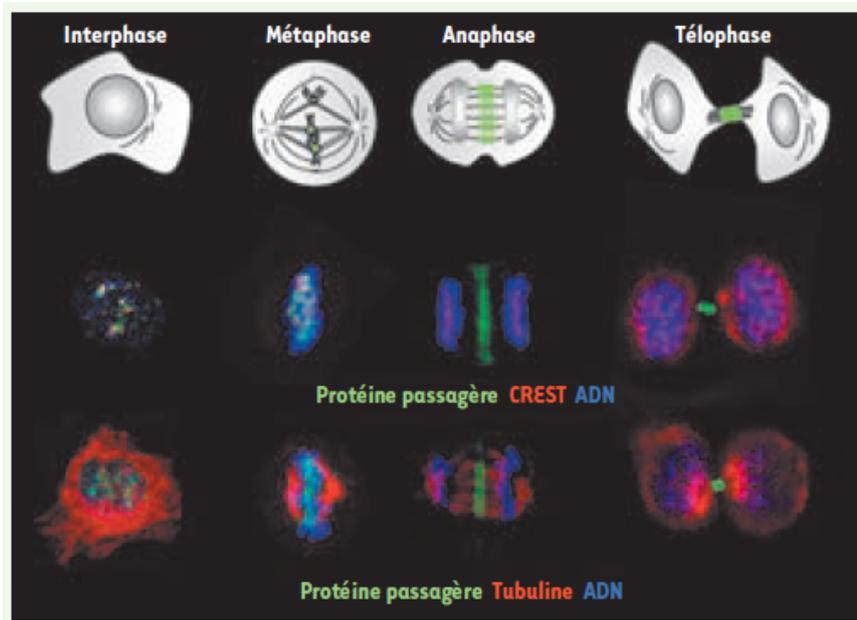


Figure 15 : Localisation des protéines du complexe CPC en fonction des phases de la mitose

D'après (Delacour-Larose et al., 2008)

Les fonctions de la SURVIVINE au cours de la mitose sont nombreuses et son action est interconnectée à celles des autres membres du CPC et plus particulièrement dépendante de l'activité kinase d'AURORAB. Des données de cristallographie suggèrent que la SURVIVINE n'interagit pas directement avec AURORAB. Ces données ont également montré que la SURVIVINE interagirait avec les parties amino-terminales de INCENP et BOREALINE par sa longue hélice  $\alpha$ , créant alors un cœur de 3 hélices  $\alpha$  (Jeyaprakash et al., 2007). Cette configuration du CPC ne permet pas d'expliquer la mobilité de la SURVIVINE. Cependant il est probable qu'il existe plusieurs configurations de ce complexe.

La SURVIVINE intervient également dans la transition G1/S. Elle est nécessaire à l'entrée dans le cycle de cellules murines normales et de progéniteurs hématopoïétiques (Fukuda et al., 2004). De plus elle serait capable de forcer la transition G1/S dans les cellules tumorales en absence de signaux de croissance par le déplacement des inhibiteurs des complexes CYCLINE-CDK (Suzuki et al., 2000).

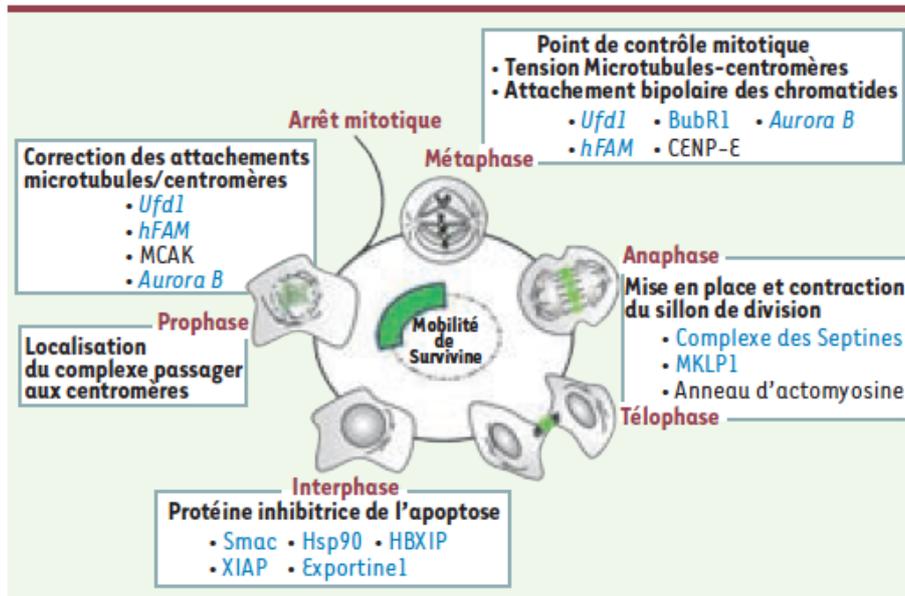
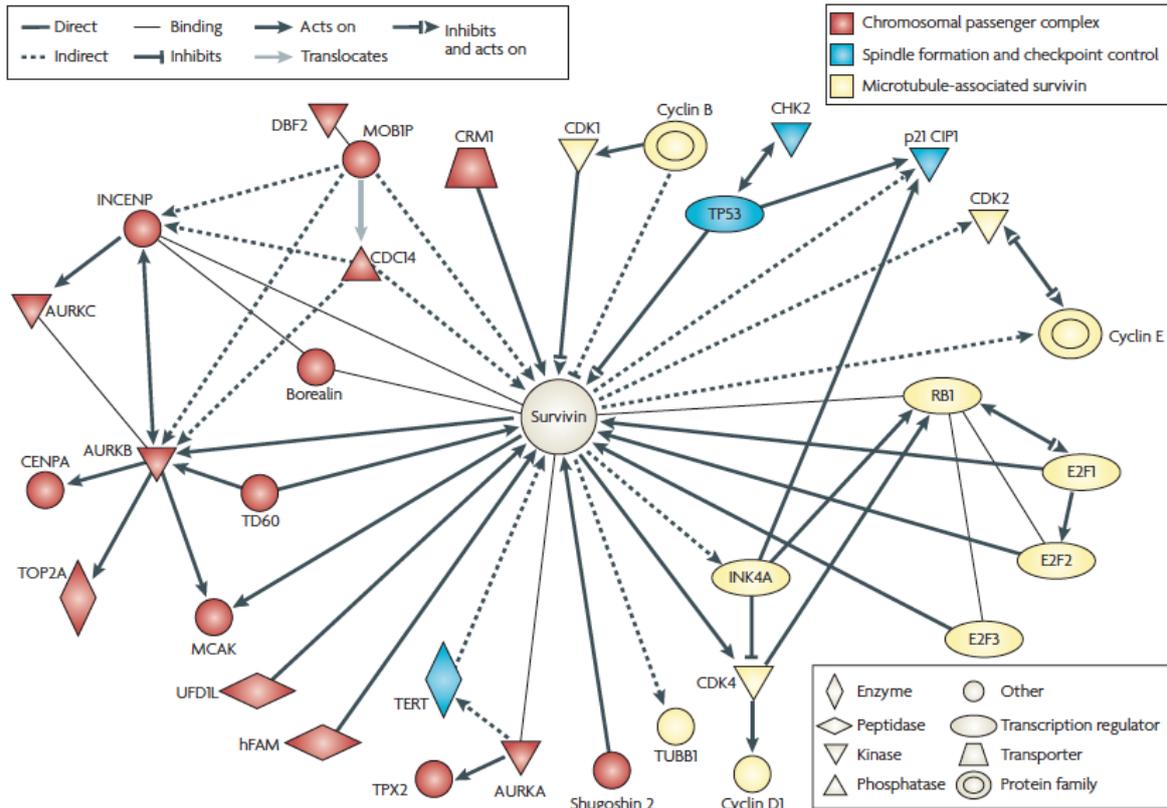


Figure 16 : Fonctions et propriétés de la SURVIVINE au cours du cycle cellulaire

D'après (Delacour-Larose et al., 2008). Schéma rappelant la localisation cellulaire de la SURVIVINE (en vert). Les fonctions du CPC sont récapitulées pour chaque étape. Les protéines indiquées en bleu sont liées directement à la SURVIVINE ou à sa fonction et les enzymes en italiques sont celles qui modifient la SURVIVINE.

Le travail de synthèse de méta-analyse de l'interactome de la SURVIVINE réalisé par le professeur D. Altieri, a permis de définir le SURVIVINE comme une protéine « nodale » (Altieri, 2008b) (Figure 17).

L'analyse de la panoplie d'interactions qui caractérisent le rôle de la SURVIVINE dans la division cellulaire montre une complexité et une diversité du réseau d'interaction de la SURVIVINE. Un premier réseau de connexion comprend les acteurs du CPC et les régulateurs. Le deuxième réseau de connexions regroupe des protéines impliquées dans la formation du fuseau mitotique et dans les points de contrôle régulant ce dernier (SAC : Spindle Assembly Checkpoint). Enfin le troisième réseau de connexions correspond à l'interaction de la SURVIVINE avec les microtubules et sa régulation.



**Figure 17 : Réseau de connexions de la SURVIVINE impliquée dans sa fonction du cycle cellulaire.**

D'après (Altieri, 2008b). Ce réseau de connexions a été obtenu à l'aide d'Ingenuity Pathway Analysis et compile les interactions validées dans de multiples organismes vivants.

*b) Rôle dans le point de contrôle mitotique*

Le point de contrôle mitotique permet la ségrégation correcte des chromosomes lors de la mitose. Le complexe protéique qui constitue le point de contrôle du fuseau mitotique est appelé SAC (Spindle Assembly Checkpoint).

Le SAC régule la protéine CDC20 (Cell Division Cycle 20), co-facteur d'APC/C (Anaphase-promoting complex/cyclosome), une ubiquitine ligase. Le SAC empêche CDC20 d'activer APC/C et inhibe donc l'ubiquitination et dégradation par le protéasome de la SECURINE et de la CYCLINE B. La SECURINE est l'inhibiteur de la protéase SEPARASE, qui permet le clivage des complexes de COHESINE reliant les deux chromatiques sœurs. Le SAC permet de réprimer l'activité de CDC20 et de prolonger la prométaphase permettant la bonne configuration des chromosomes au niveau de la plaque métaphasique. L'inhibition de CDC20 est médiée par le complexe MCC (Mitotique checkpoint complex) (MAD2 (Mitotic arrest deficien 2), BUBR1, BUB3). Ce complexe peut se lier à APC/C inhibant son activité

d'ubiquitine ligase. Pendant la prométaphase CDC20 et le SAC sont concentrés sur les kinétochores. La localisation des protéines du SAC est dynamique et assure la formation du complexe MCC. Chaque kinétochore qui n'est pas correctement attaché au fuseau mitotique génère un signal permettant de bloquer l'activation d'APC/C–CDC20, par liaison de la protéine MAD2 sur ce complexe, ou par séquestration de CDC20. (Jia et al., 2013) De plus, la tension exercée par les deux chromatides sœurs et l'orientation de cette tension sont vérifiées et permettent d'inactiver le SAC si elles sont correctes. (Figure 18) Cette tension et cet attachement sont surveillés par le CPC et plus particulièrement par AURORAB et INCENP. Enfin le CPC peut augmenter l'activation du SAC et la maintenir actif. (Carmena et al., 2012a)

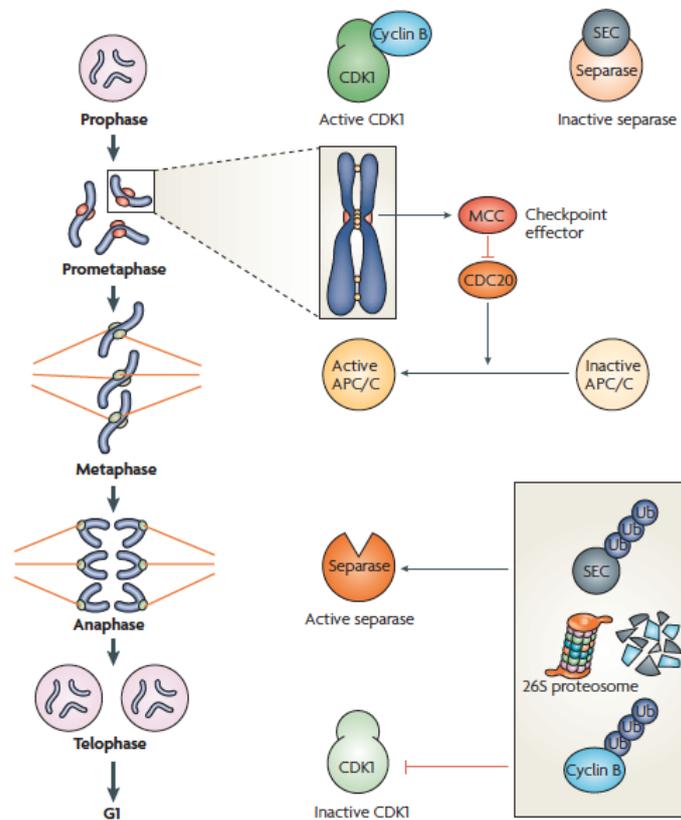


Figure 18 : Régulation du SAC au cours des phases de la mitose  
D'après (Musacchio and Salmon, 2007)

## 2. Survie cellulaire

La fonction de survie de la SURVIVINE a été amplement démontrée tant dans les cellules cancéreuses que dans les cellules normales, et tant in vitro que in vivo avec des

modèles animaux. Cette fonction est indispensable pendant la mitose mais aussi au cours de l'interphase, plus particulièrement dans les cellules cancéreuses. Bien que la SURVIVINE présente un domaine structural BIR, elle n'est pas capable de se lier avec les CASPASES et d'inhiber leur fonction, comme peuvent le faire les autres membres de la famille des IAP, essentiellement XIAP. En revanche son domaine BIR lui permet d'interagir avec de nombreux partenaires impliqués dans le contrôle de l'apoptose. En effet la SURVIVINE peut favoriser l'activité anti-apoptotique de XIAP à la fois en protégeant sa dégradation par le protéasome (Dohi et al., 2004a) mais aussi en neutralisant la protéine SMAC (Second mitochondria-derived activator of caspases), inhibiteur de XIAP libéré de la mitochondrie lors de l'apoptose (Song et al., 2003). Cependant la protéine XAF-1 (XIAP-associated factor 1), autre inhibiteur de XIAP peut bloquer l'activité anti-apoptotique du complexe SURVIVINE/XIAP en entraînant la dégradation de la SURVIVINE (Arora et al., 2007). De plus la SURVIVINE serait capable d'inhiber la libération du facteur pro-apoptotique AIF (Apoptosis inducing factor) de la mitochondrie (Liu et al., 2004) (Figure 16 et Figure 19).

La localisation subcellulaire de la SURVIVINE est étroitement liée à sa fonction et la conditionne. Il a été montré que la SURVIVINE pouvait être exportée hors du noyau, à l'aide du transporteur CRM1 (chromosome region maintenance 1 )/EXPORTINE1, indispensable à son activité anti-apoptotique lors de l'interphase (Colnaghi et al., 2006). Dans les lignées tumorales il a été identifié qu'une fraction de la SURVIVINE était située dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie (Dohi et al., 2004b). Malgré l'absence de séquence d'import mitochondrial dans la structure de la SURVIVINE, son interaction avec HSP90 permettrait son entrée dans la mitochondrie (Fortugno et al., 2003). Elle séquestrerait alors SMAC empêchant sa libération lors de l'apoptose (Ceballos-Cancino et al., 2007) (Figure 16 et Figure 19). Lors de l'apoptose la fraction mitochondriale de la SURVIVINE pourrait être relarguée dans le cytoplasme et ainsi stabiliser XIAP. De plus lors de son passage dans la mitochondrie, la SURVIVINE est déphosphorylée sur la sérine 20, modification indispensable à son interaction avec XIAP (Dohi et al., 2007). Cette fraction mitochondriale, libérée lors d'un stress cellulaire serait capable de limiter l'amplification du processus apoptotique et confèrerait donc un avantage aux cellules tumorales.

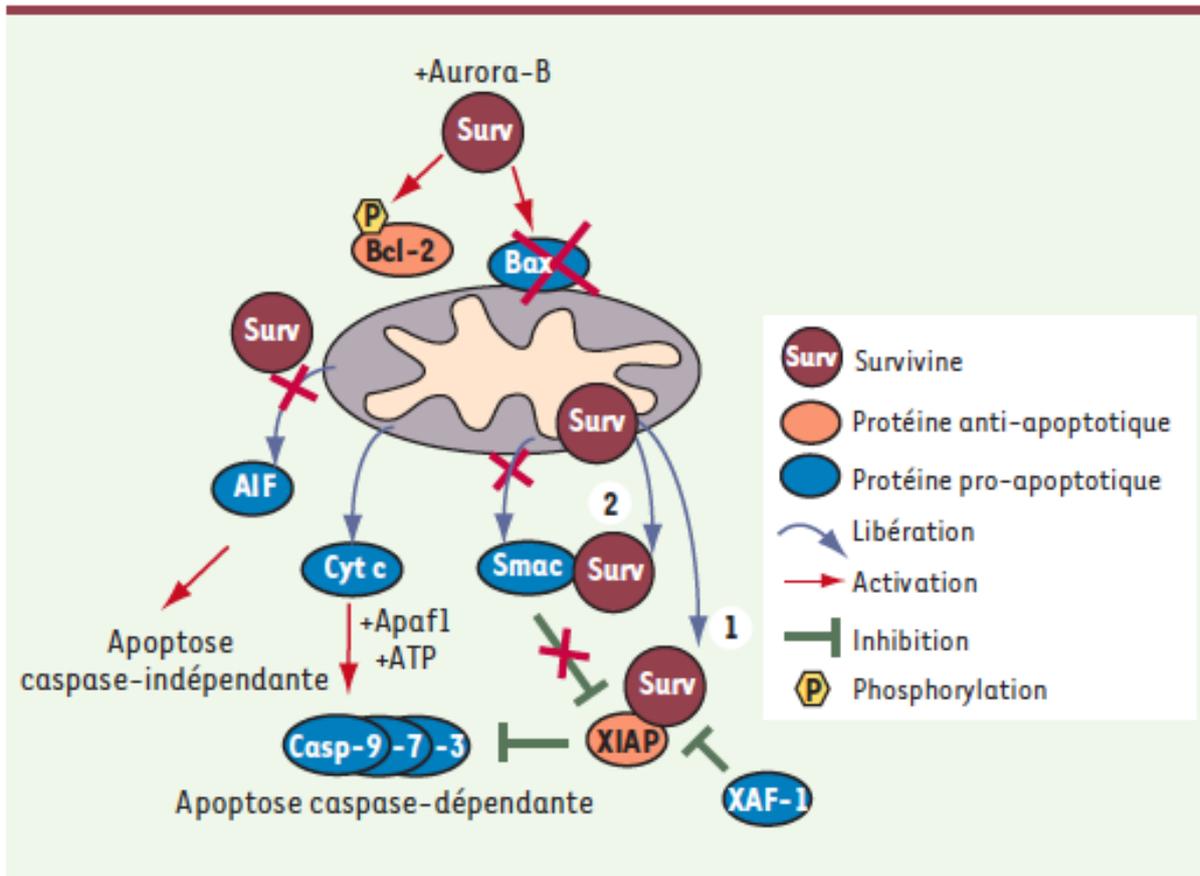


Figure 19 : Rôles anti-apoptotiques de la SURVIVINE.

D'après (Romagnoli et al., 2008)

La SURVIVINE pourrait alors assurer un lien entre prolifération et survie au cours du cycle. Dans les cellules cancéreuses, la surexpression de la SURVIVINE peut avoir une action à la fois dans le déroulement correct de la mitose, moment où la cellule cancéreuse est fragilisée par son instabilité génétique. La phosphorylation sur la thréonine 34 en phase G2 par le complexe CYCLINE-B1/CDK1 favorise les interactions protéiques et la séquestration d'acteurs majeurs de l'apoptose. La CASPASE 3 et p21 sont séquestrées au niveau des centrosomes (Li et al., 1999) et la CASPASE 9 au niveau des microtubules. Il existe donc une balance des signaux anti- et pro-apoptotique lors de la mitose. De plus le complexe SURVIVINE/AURORAB permet la régulation des protéines de la famille BCL-2 pendant la mitose. Ce complexe peut phosphoryler la protéine anti-apoptotique BCL-2 et inactiver la protéine pro-apoptotique BAX, permettant alors le maintien de l'intégrité de la mitochondrie nécessaire à la survie des cellules (Vogel et al., 2007) (Figure 19). La kinase CHK2 qui est activée en réponse aux dommages à l'ADN afin de bloquer le cycle et de permettre la réparation de l'ADN, serait également impliquée dans la libération de la fraction mitochondriale de la SURVIVINE permettant le blocage de l'apoptose (Ghosh et al., 2006).

La fonction de la SURVIVINE sur la survie cellulaire lors de la mitose semble très importante pour les cellules cancéreuses dont la prolifération est soutenue (Blanchard et al., 2003).

Le rôle de la SURVIVINE dans l'inhibition de l'apoptose présente un degré de complexité similaire au rôle de régulateur du cycle cellulaire. De multiples voies qui régulent l'expression de gènes, les interactions protéines-protéines et les fonctions mitochondriales sont interconnectées. Un premier réseau d'interaction correspond à un accroissement du seuil de survie cellulaire. Le deuxième réseau de connexion regroupe des partenaires permettant la coopération intermoléculaire. Le troisième réseau identifié correspond à la régulation de la dynamique mitochondriale (Altieri, 2008b) (Figure 20).

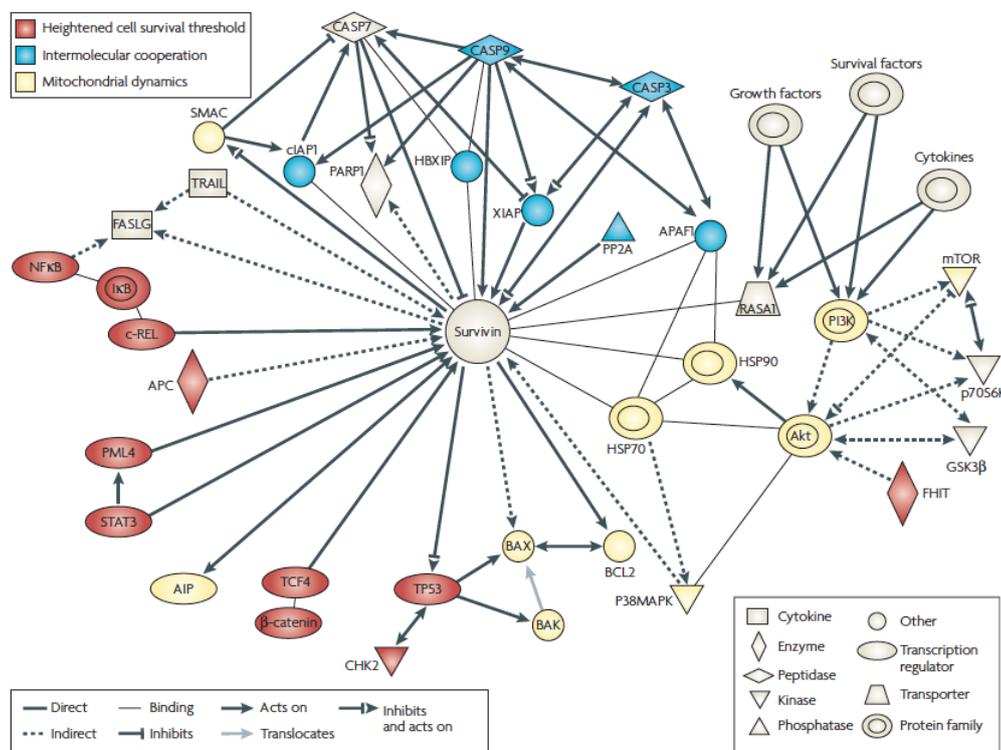


Figure 20 : Réseau de connexions de la SURVIVINE impliquées dans sa fonction de survie cellulaire.

D'après (Altieri, 2008b). Ce réseau de connexions a été obtenu à l'aide d'Ingenuity Pathway Analysis et compile les interactions validées dans de multiples organismes vivants.

## D. Rôle en cancérologie

La SURVIVINE a été identifiée comme le quatrième gène le plus exprimé dans de nombreux cancers (Velculescu et al., 1999). De plus comme nous l'avons vu précédemment ses fonctions confèrent aux cellules tumorales de nombreux avantages sélectifs.

### **1. Facteur pronostique**

Plusieurs modèles animaux transgéniques montrent l'importance de la SURVIVINE dans la prédisposition au développement de cancers et donc son rôle dans l'oncogénèse (Thomas et al., 2007). La surexpression de la SURVIVINE dans les tumeurs humaines a été amplement étudiée et démontre une corrélation avec la progression tumorale et un mauvais pronostic. De plus, sa localisation subcellulaire aurait un impact sur le pronostic et jouerait un rôle dans la progression tumorale et la résistance aux traitements (Fukuda and Pelus, 2006).

Des études *in vitro*, réalisées dans des lignées cellulaires résistantes aux radio- ou chimio-résistantes ont montré que la SURVIVINE y était très fortement exprimée. En clinique humaine la résistance au taxol pour les carcinomes ovariens ou au Cisplatine dans les cancers de l'estomac et de la vessie est corrélée à une expression élevée de la SURVIVINE. Dans les cancers du sein et de la prostate elle est associée à la résistance aux traitements hormonaux. De plus, des traitements anti-cancéreux, comme le Cisplatine induisent l'expression de la SURVIVINE. Elle aurait donc un rôle dans la résistance *de novo* et acquise aux traitements. C'est pourquoi elle est étudiée comme marqueur prédictif de l'efficacité des thérapies anti-tumorales (Pennati et al., 2007).

En plus d'être un marqueur pronostique, la SURVIVINE a été identifiée en clinique comme biomarqueur urinaire dans le cancer de la vessie (Kenney et al., 2007) et indicateur de rechute dans le cancer du sein (Yie et al., 2006).

### **2. SURVIVINE : une protéine nodale**

Les fonctions de la SURVIVINE sont interconnectées avec les mécanismes du contrôle de la division cellulaire, de la fidélité du génome, de l'assemblage du fuseau mitotique, du réseau du trafic cellulaire, de la régulation des points de contrôle et de l'apoptose. La SURVIVINE est donc au cœur de la connexion de multiples voies indépendantes régulant l'homéostasie cellulaire, ce qui en fait donc une protéine nodale très importante pour la cellule cancéreuse (Altieri, 2008b) (Figure 21). En effet ces nombreux réseaux impliquant la SURVIVINE semblent conférer aux cellules cancéreuses une importante adaptation, des capacités prolifératives accrues et une résistance à la mort cellulaire. De plus les fonctions nodales de la SURVIVINE peuvent constituer une faiblesse

importante pour les cellules tumorales. En effet la SURVIVINE, comme protéine nodale, est impliquée dans des réseaux de mécanismes cellulaires différents et non redondants, importants pour la cellule tumorale et difficilement contournables. Le ciblage de la SURVIVINE est alors d'autant plus intéressant puisqu'il ne repose pas seulement sur l'inhibition d'une seule protéine mais sur l'inhibition de plusieurs voies et mécanismes cellulaires primordiaux pour les cellules cancéreuses (Altieri, 2008b) (Figure 21).

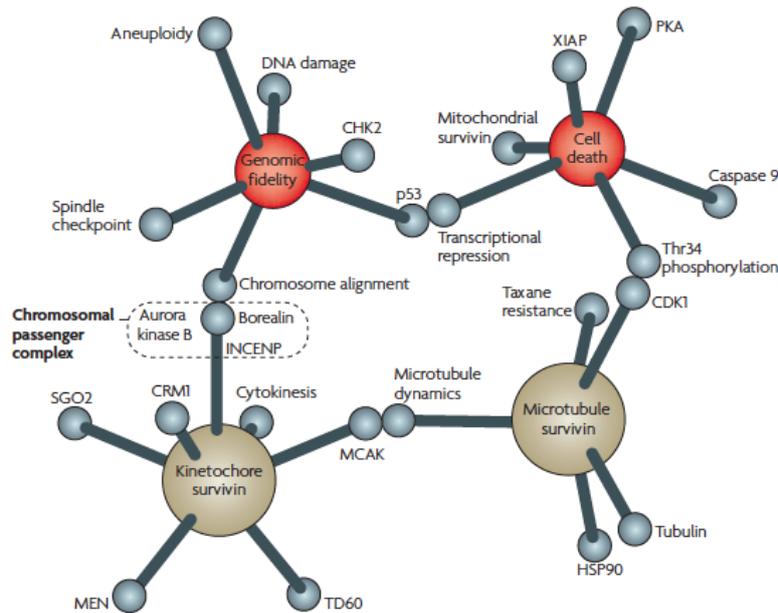


Figure 21 : Les liens de connexion entre les réseaux du rôle de la SURVIVINE dans la division et la mort cellulaire

D'après (Altieri, 2008b)

### 3. Ciblage thérapeutique

De part ses fonctions de régulateur de la division et de survie cellulaire, et au vu de sa surexpression et de ses rôles dans le cellules cancéreuses, la SURVIVINE a été envisagée comme cible thérapeutique anticancéreuse (Altieri, 2003). De nombreuses stratégies ont donc été élaborées pour inhiber la SURVIVINE.

#### a) Inhibiteurs de l'ARNm

Une des approches pour diminuer l'expression de la SURVIVINE, est l'utilisation d'un oligonucléotide anti-sens de l'ARNm de la SURVIVINE, le LY2181308. Cet agent a montré un arrêt du cycle cellulaire, l'induction de la mort et l'inhibition de la croissance

tumorale sur des modèles *in vitro* de cellules tumorales et *in vivo* chez la souris. Des études cliniques de phase I utilisant cette molécule ont été réalisées et donnaient des résultats encourageants, sans effets secondaires notables (Carrasco et al., 2011; Church and Talbot, 2012; Talbot et al., 2010). En revanche des essais cliniques de phase II en agent simple ou en combinaison avec des agents de chimiothérapie conventionnelle n'ont montré aucun effet anti-tumoral, et une toxicité hématologique (Wiechno et al., 2014)

Un second oligonucléotide anti-sens, le SPC3042 présente une plus grande stabilité et une inhibition plus importante que les premières générations d'anti-sens. Des études *in vitro* ont également montré que l'utilisation du SPC3042 induisait un arrêt du cycle cellulaire, une induction de la mort et une diminution de l'expression de BCL-2 et de la SURVIVINE (Church and Talbot, 2012) dans un modèle de cancer de la prostate. Dans ce même modèle il a été montré que cet anti-sens augmentait significativement la réponse au paclitaxel *in vitro* et en xénogreffe (Hansen et al., 2008).

L'utilisation *in vitro* de siRNA et de ribozymes comme antagonistes de la SURVIVINE a montré une diminution de l'expression de la SURVIVINE et l'induction d'apoptose essentiellement en combinaison avec une chimiothérapie. Cependant l'activité anti-tumorale des ces agents est limitée à cause de leur dégradation *in vivo* (Ryan et al., 2009a; Trabulo et al., 2011).

#### *b) Mutants dominants négatifs*

Une autre approche du ciblage de la SURVIVINE implique l'utilisation des mutants dominants négatifs. Le mutant dominant négatif T34A, dont la thréonine 34 a été remplacée par une alanine, et non phosphorylable par le complexe CDK1/CYCLINE-B1, est capable d'augmenter à la fois l'apoptose dépendante et indépendante des CASPASES, de supprimer l'angiogenèse et d'inhiber les métastases, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* dans un modèle de xénogreffe chez la souris avec une toxicité tolérable (Aspe and Wall, 2010).

Le mutant dominant négatif C84A, déstructurant le domaine BIR, a montré dans un modèle murin de xénogreffe de cancer gastrique la capacité d'induire de l'apoptose et d'inhiber la croissance tumorale (Weng et al., 2013).

c) *Immunothérapie*

Puisque la SURVIVINE est abondamment exprimée dans les cellules tumorales et pratiquement indétectable dans les cellules normales, elle est considérée comme un antigène tumoral qui pourrait générer des peptides immunogènes et agir comme un nouvel épitope activant une réponse immunitaire (Bernatchez et al., 2011). L'immunogénicité de la SURVIVINE a été confirmée in vivo et ex vivo chez l'homme. En effet des anticorps anti-SURVIVINE et des lymphocytes T cytotoxiques ont été détectés chez des patients atteints de cancer (Jha et al., 2012).

L'utilisation de peptides SURVIVINE ou de cellules dendritiques activées par la SURVIVINE, comme immunothérapie anticancéreuse est entrée en essais cliniques de phase I/II. Ces études ont révélé que la vaccination contre la SURVIVINE peut activer les lymphocytes T CD8+ en réponse à un antigène spécifique. Cependant peu de patients ont développé une réponse immunologique optimale permettant une réponse clinique (Altieri; Bernatchez et al., 2011).

d) *Le YM155*

Le YM155 est une petite molécule qui inhibe l'expression du gène *BIRC5*. Son effet inhibiteur de la SURVIVINE a été largement étudié in vitro et en essai clinique depuis plusieurs années. Le YM155 est capable de se lier à la région promotrice riche en site de liaison SP1 (Ryan et al., 2009b). Des études sur un large panel de lignées cancéreuses tumorales ont montré que le YM155 avait de nombreuses propriétés anti-cancéreuses. De plus, l'utilisation du YM155 dans des modèles de xénogreffes de cancers humains a également montré ces effets antitumoraux, sans effet secondaire notable (Nakahara et al., 2011).

Nous nous sommes intéressés à cette molécule, seul inhibiteur chimique disponible, lors de mes travaux de thèse. Pour dépléter les cellules en SURVIVINE nous avons utilisé une approche par ARN interférent mais nous voulions également utiliser une approche chimique, qui peut être utilisée en thérapie. Nous voulions comparer les effets et mieux déterminer les conséquences d'un traitement avec cette molécule YM155 qui est arrivée rapidement en essais cliniques avec peu de caractérisation de son mode d'action in vitro.

*e) Le FL118*

Le FL118 est une petite molécule identifiée récemment à l'aide d'un criblage à haut débit de l'inhibition de l'expression de *BIRC5*, comme le YM155 (Ling et al., 2012). Cette molécule a montré une activité antitumorale dans de nombreuses lignées cellulaires de cancer. Cette molécule a une structure similaire à l'irinotecan (inhibiteur de la topoisomérase 1), mais n'exerce pas son effet antitumoral par inhibition de la topoisomérase 1. L'utilisation in vivo du FL118 dans des modèles de xénogreffes de tumeurs humaines montrent des effets anticancéreux supérieurs à ceux de chimiothérapies conventionnelles (Ling et al., 2012).

*f) Autres approches*

La petite molécule Shepherdine est un inhibiteur de la formation du complexe SURVIVINE/HSP90 en empêchant leur liaison. Des données in vitro de l'utilisation de cette molécule semblent encourageantes (Groner and Weiss, 2014b). En revanche aucun essai clinique n'est en cours.

Une autre stratégie thérapeutique est l'administration d'inhibiteur de HDAC, le Belinostat. Son administration provoque la diminution de l'expression de la SURVIVINE et induit la mort des cellules cancéreuses par modification épigénétique, permettant la réexpression du TGF $\beta$ RII (Transforming growth factor beta receptor II). Par ce biais la cascade TGF $\beta$  (Transforming growth factor beta) est réactivée et induit la dégradation de la SURVIVINE par le protéasome et la répression transcriptionnelle de *BIRC5* (Chowdhury et al., 2011).

Enfin l'interconnexion de nombreux réseaux avec la SURVIVINE et sa place comme protéine nodale, reliée à de nombreuses voies importantes pour le développement de cancers, présentent de nouvelles approches thérapeutiques intéressantes (Groner and Weiss, 2014b).

## **MATERIEL ET METHODES**

## I. Lignées cellulaires

Nous avons travaillé sur trois lignées cellulaires humaines cancéreuses mammaires.

Les lignées cellulaires Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 sont toutes trois issues d'adénocarcinome mammaire humain et établies à partir d'effusions pleurales métastatiques.

Les Cal51 provenant de DMSZ (Braunshweig, Germany) présentent un caryotype normal et une absence de mutation sur le gène *TP53*. Les MDA-MB-231 provenant de l'ATCC (Manassas, Virginia, USA) sont aneuploïdes et mutées sur le gène *TP53*. Cette mutation R280K affecte le domaine de liaison à l'ADN de la protéine p53. Ces deux lignées n'expriment pas de récepteurs hormonaux (ER et PR) et ne présentent pas d'amplification d'expression de l'oncogène HER2. Elles sont donc de sous-type triple négatif.

Ces deux lignées cellulaires adhérentes sont cultivées en monocouche dans un milieu DMEM (Gibco) supplémenté avec 5% de SVF (PAA), 100 unités/mL de Glutamine (Invitrogen) et de 100 unités/mL de pénicilline et de streptomycine (Invitrogen).

La lignée MCF7, provenant de l'ATCC (Manassas, Virginia, USA), exprime le récepteur aux œstrogènes ( $ER\alpha$ ), représentative d'un sous-type hormono-dépendant (ER+) et a un statut p53 sauvage. Cette lignée cellulaire adhérente est cultivée en monocouche dans un milieu RPMI-1640 (Gibco) supplémenté avec 5% de SVF (PAA), de 100 unités/mL de Glutamine (Invitrogen), et de 100 unités/mL d'un mélange de pénicilline et de streptomycine (Invitrogen).

La lignée RG37, utilisée pour l'analyse de l'activité de la recombinaison homologue, a été fournie par le Dr Bernard Lopez (IGR, Paris, France). Cette lignée est issue de fibroblastes humains immortalisés par le SV40. Les conditions de culture sont les mêmes que pour la lignée Cal51.

La lignée ER-Src MCF10A a été fournie par le Dr Kevin Struhl (Harvard Medical School, Boston, USA). Cette lignée cellulaire provient de la lignée MCF10A, lignée cellulaire épithéliale non tumorigène dérivant de la glande mammaire, qui a été modifiée génétiquement, afin d'intégrer le gène codant pour l'oncogène v-Src sous le contrôle d'un promoteur contenant des domaines de liaison au récepteur aux œstrogènes. L'exposition de

cette lignée cellulaire à  $1\mu\text{M}$  de 4OH-TAM (Sigma-Aldrich) induit une rapide transformation de ces cellules. Cette lignée cellulaire est cultivée dans du milieu DMEM-F12 supplémenté de  $2\mu\text{g/mL}$  de BPE (extrait pituitaire bovin),  $500\text{ ng/mL}$  d'hydrocortisone,  $20\mu\text{g/mL}$  de hEGF,  $10\mu\text{g/mL}$  d'insuline,  $100\text{ ng/mL}$  de toxine cholérique, 5% de sérum de cheval, 1% d'HEPES et de  $100\text{ unités/mL}$  d'un mélange de pénicilline et de streptomycine.

Toutes les lignées cellulaires sont incubées à  $37^\circ\text{C}$ , dans une atmosphère humide et à 5% de  $\text{CO}_2$ , et leur repiquage se fait à l'aide de la trypsine.

## **II. Traitements**

Les traitements sont réalisés par ajout des drogues directement dans le milieu de culture complet.

Le YM155 (Selleck Chemicals), inhibiteur pharmacologique de la SURVIVINE, est utilisé à des concentrations et temps variables indiqués pour chaque figure.

Le Cisplatine (Sigma), l'Etoposide (Sigma), le Paclitaxel (Sigma) et la Staurosporine (Sigma) sont utilisés comme génotoxique ou comme inducteur de mort cellulaire à des doses indiquées en fonction des lignées cellulaires, pendant 48 heures (précisé si temps différents).

L'exposition des cellules au rayonnement  $\gamma$  est réalisée avec le générateur de rayons X, Faxitron. Les cellules sont analysées 30 minutes après une irradiation de 2 Gy.

Les inhibiteurs pan-CASPASES, le Q-VD-OPh (R&D System) utilisé à  $10\mu\text{M}$  et le Z-VAD-fmk (Promega) utilisé à  $20\mu\text{M}$ , sont ajoutés dans le milieu de culture comme prétraitement, deux heures avant les autres traitements.

La Nécrostatine-1, inhibiteur de la kinase RIP1 provenant de Selleck Chemicals, est utilisé à  $30\mu\text{M}$  et est ajoutée au milieu de culture avec ou sans le Q-VD-OPh, 2 heures avant le traitement YM155.

L'inhibiteur de l'activité kinase d'AURORAB, l'AZD1152 (Bio Vision) est utilisé pendant 48 heures à  $0,2\mu\text{M}$ .

L'Olaparib, inhibiteur pharmacologique de PARP-1, provenant de chez Euromedex, est mis en présence des cellules pendant 6 jours aux concentrations indiquées.

Les inhibiteurs de l'autophagie, la Chloroquine (Chloro), la 3-Méthyladénine (3-MA) et la Bafilomycine (Bafilo) proviennent de chez Sigma Aldrich et sont ajoutés au milieu de culture 2 heures avant le traitement YM155 ou autre traitement.

Le BAY11-7082 provient de chez Selleck Chemicals et l'AS602868 nous a été fourni par Merck-Serono International SA. Ces deux inhibiteurs de la voie NF- $\kappa$ B sont ajoutés au milieu de culture 2 heures avant l'ajout d'autres traitements.

Le TNF $\alpha$  provenant de chez R&D systems, est mis en contact des lignées cellulaires pendant 48 heures.

### **III. Extinction et surexpression protéique**

#### **A. ARN interférence**

L'extinction des protéines d'intérêt, est effectuée par transfection de siRNA (small interfering RNA) selon le protocole suivant. Vingt-quatre heures après la mise en culture des cellules ou après un temps indiqué de traitement, un mélange de milieu Opti-MEM (Gibco) et de Lipofectamine RNAiMax est ajouté au mélange contenant le milieu Opti-MEM et 40 nM de siRNA. Après une incubation de 10 minutes le mélange est déposé sur dans le milieu complet. Six heures après transfection le milieu est remplacé par du milieu complet frais. Le temps d'extinction des protéines par siRNA est généralement optimal à 48 heures. Le temps d'extinction peut varier en fonction des besoins des expériences et sont alors indiqués. En parallèle du siRNA complémentaire de l'ARNm codant pour la protéine ciblée, les cellules sont transfectées avec un siRNA contrôle (ON-TARGETplus Non-targeting Pool D-001810, Thermo Fisher), ne ciblant aucune séquence d'ARNm humaine.

siRNA	Référence	Fournisseur
SURVIVINE (si S1)	CUSTOM SIRNA 5'GGACCACCGCAUCUCUACA3'	Ambion
SURVIVINE (si S2)	SIL. SEL. VALIDATED SIRNA <i>BIRC5</i> ID S1459	Life Technologies
SURVIVINE (si S 5'UTR 1)		Sigma-Aldrich
SURVIVINE (si S 5'UTR 2)		Sigma-Aldrich
XIAP	AM51334 ID121291	Ambion
AURORAB	SMARTpool: ON-TARGETplus L-003326	Thermo Fisher
CDC20	4392420	Life Technologies
BRCA1	SMARTpool: ON-TARGETplus L-003461	Thermo Fisher
PARP-1	SMARTpool: ON-TARGETplus L-006656	Thermo Fisher
IKK2	ON-TARGETplus Human Smart pool L-003503-00-0005	Thermo Fisher
MCL-1	120644	Ambion
ILF3	SMARTpool: ON-TARGETplus L-012442	Thermo Fisher

Tableau 1 : Liste des siRNA utilisés

## B. Plasmides

La transfection des plasmides est réalisée à l'aide de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) selon un protocole optimisé pour chaque lignée cellulaire. Pour une plaque 24 puits, un mélange de 50 $\mu$ L de milieu Opti-MEM et de 0,8 $\mu$ g d'ADN plasmidique est mélangé avec un second mélange contenant 50 $\mu$ L de milieu Opti-MEM et une quantité variable selon les lignées de Lipofectamine 2000 (ex : Cal51 : 0,8 $\mu$ L). Après 20 minutes d'incubation ce mélange est déposé sur les cellules en culture. Le milieu de transfection est remplacé 4 heures après par du milieu complet frais. Ces cellules peuvent ensuite subir des traitements ou transfection de siRNA sur 48 h, selon les expériences.

Les plasmides utilisés sont :

- pG-AcGFP-53BP1c codant pour la protéine 53BP1-GFP (Green fluorescence protein) obtenu par le Dr Thomas Von Zglinicki (New Castle University, UK)
- pcDNA 3 vide (pContrôle) (Invitrogen)

- pcDNA 3 SURVIVINE (pSURVIVINE) fourni par le Pr Dario Altieri (The Wistar Institute, Philadelphia, USA)

## **IV. Immunoblot**

Le milieu de culture et les cellules sont récupérés et centrifugés 5 minutes à 300g. Le culot cellulaire est resuspendu dans du tampon de lyse (SDS 1%, EDTA 10mM, Tris HCl pH 8,1 50mM, d'inhibiteurs de protéases (Roche), Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM, NaF 50nM) puis soniqué par période de 15 minutes à l'aide d'un sonicateur Bioruptor (Diagenode) jusqu'à l'obtention d'un lysat homogène et fluide. Un dosage protéique est réalisé pour chaque échantillon à partir d'une gamme étalon effectué avec le kit BC Assay (Interchim). La réaction colorimétrique s'effectue après incubation 10 minutes à 37°C puis la DO est lue à 570 nm à l'aide d'un spectromètre. La même quantité de protéines solubles totales (entre 40 et 70µg) pour tous les échantillons est additionnée de tampon de charge 4X (Tris HCL pH 6,8 125mM, Glycérol 10%, SDS 4%, Bleu de Bromophénol et de β-Mercaptoéthanol 5%) et dénaturés 5 minutes à 95°C. Les protéines sont ensuite déposées et séparées par SDS-PAGE dans un gel d'électrophorèse 15%, 12,5 % ou 10% de SDS polyacrylamide (0,375M Tris pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS, TEMED) (SDS-PAGE), puis transférées sur une membrane PVDF (Immobilon Transfer Membranes, Millipore) grâce à un électro-transfert en phase liquide. Les sites aspécifiques de la membrane sont bloqués avec 2% de WBR (Western Blocking Reagent, Roche) dans du TBS, 1 heure sous agitation à température ambiante puis l'anticorps primaire dilué dans du TBS-Tween 0,1%-WBR 2% est incubé sur la nuit à 4°C. Après lavages dans du TBS-Tween 0,1%, l'anticorps secondaire couplé à la HRP dilué dans du TBS-Tween 0,1%-WBR 2% est incubé 1 heure à température ambiante. Après lavages dans du TBS-Tween 0,1%, l'expression des protéines est détectée à l'aide du kit Clarity Western ECL Substrate (BioRad). La révélation se fait à l'aide de l'appareil ChemiDoc MP System (BioRad) et du logiciel informatique ImagLab (BioRad).

Les résultats présentés sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes.

Anticorps	Origine	Poids moléculaire (kDa)	Référence	Fournisseur
ACTINE	Souris monoclonal	42	MAB1501	Millipore
BAX	Lapin polyclonal	21; 18	A3533	Dako
CASPASE 3	Souris monoclonal	31; 22-17; 12-10	sc-7272	Santa cruz
CHK1-Ser317	Lapin polyclonal	58	#2344	Cell signaling
CHK2-Thr68	Lapin polyclonal	62	#2661	Cell signaling
CYCLINE B-1	Souris monoclonal	60	sc-245	Santa cruz
EME1	Souris polyclonal	65	ab88878	Abcam
HSP90	Souris monoclonal	90	610418	BD Biosciences
IKK2	Lapin monoclonal	87	#8943	Cell signaling
LC3	Lapin polyclonal	17; 14	#4108	Cell signaling
MCL-1	Lapin monoclonal	37	ab31948	Santa cruz
MUS81	Souris monoclonal	61	ab14387	Abcam
NOXA	Souris monoclonal	15	ALX-804-408	Enzo Life Science
p21	Lapin monoclonal	21	#2947	Cell signaling
p53	Souris monoclonal	53	554294	BD Biosciences
p53-Ser15	Lapin polyclonal	53	#9284	Cell signaling
PUMA	Lapin monoclonal	23	12450S	Cell signaling
RAD51	Souris monoclonal	37	GTX70230	Genetex
SURVIVINE	Lapin polyclonal	17	AF886	R&D systems
TUBULINE $\beta$	Souris monoclonal	50	T0198	Sigma
XIAP	Souris monoclonal	55	610717	BD Biosciences
$\gamma$ -H2AX (Ser139)	Souris monoclonal	15	#05-636	Millipore

Tableau 2 : Liste des anticorps primaires utilisés

## V. Immunocytofluorescence

Trente mille cellules sont mises en culture sur des lamelles stériles préalablement incubées 15 minutes à 37°C avec de la Poly-L-Lysine (Sigma) pour une meilleure adhérence des cellules. Après différentes conditions, les cellules sont lavées au PBS puis fixées avec une solution de PBS-PAF 1%, 30 minutes à température ambiante. Après lavage en PBS, les cellules sont perméabilisées par une solution de PBS-Triton X100 0,5%, 1 heure à température ambiante. Les cellules sont lavées en PBS-Tween-20 0,1% (Sigma) et les sites non spécifiques sont saturés grâce à une incubation de 30 minutes à 37°C avec une solution

de PBS-BSA 5%. A la suite d'un lavage en PBS, les cellules sont incubées avec une solution de PBS-BSA 1% contenant 0,4 $\mu$ g d'anticorps de souris anti- $\gamma$ -H2AX (Millipore) ou d'anticorps de souris anti-CASPASE 3 active (BD Biosciences, 559565) ou d'anticorps anti-LC3 I et II (Cell signaling), pendant 1h30, à 37°C. Les lavages en PBS-Tween 0,1% sont suivis d'une incubation avec 1 $\mu$ g d'anticorps secondaire de chèvre anti-souris Alexa Fluor 568 ou anti-souris Alexa Fluor 488 ou anti-lapin Alexa Fluor 488 (Invitrogen) pendant 1 h, à 37°C et à l'obscurité. Enfin après lavages en PBS-Tween 0,1%, les lamelles sont montées sur lame de microscope avec un réactif de conservation ProLong Gold antifade contenant du DAPI (Invitrogen) permettant ainsi la visualisation du noyau.

Les lamelles sont analysées à l'aide d'un microscope à fluorescence relié à une caméra AxioCam MRm Zeiss. L'acquisition des images se fait avec l'objectif X20 ou en mosaïque 4X4, en fonction des marquages ou des conditions, à l'aide du logiciel AxioVision (Zeiss). Pour le marquage  $\gamma$ -H2AX, les mosaïques sont ensuite analysées grâce à une macro réalisée avec le logiciel MétaMorph (Universal Imaging). Les données brutes obtenues sous tableau Excel (Microsoft) représentent pour chaque noyau analysé le pourcentage de son aire marquée par la fluorescence rouge correspondant au marquage  $\gamma$ -H2AX. Pour l'analyse de la localisation cellulaire de la protéine 53BP1-GFP, le nombre de cellules présentant un marquage GFP diffus en foci est compté.

## VI. Essais comètes

Le test des comètes appelé aussi *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) est une technique d'électrophorèse sur microgel d'agarose qui permet de mesurer les cassures induites par différentes conditions.  $5 \times 10^4$  cellules sont insérées dans un gel d'agarose (Low melting agarose LMA) à 40°C. 50 $\mu$ L sont immédiatement prélevés et insérés entre deux lames (CometSlide, Trevigen). Les lames sont placées à 4°C à l'obscurité pendant 30 minutes avant d'être immergées dans une solution de lyse 30 minutes à 4°C, permettant de lyser la membrane des cellules et de libérer les noyaux. Cette solution de lyse à pH neutre contient 2,5M de NaCl, 100mM d'EDTA, 10mM de TRIS et 1% de N-lauryl sarcosin. Les lames sont immergées dans une solution d'électrophorèse préparée extemporanément 20 minutes à température ambiante à l'obscurité. Puis l'électrophorèse se fait sur glace à un voltage constant de 21 V et 300 mA pendant 30 minutes. Le tampon d'électrophorèse contient 300mM de

NaOH et 1mM d'EDTA. Après l'électrophorèse, les lames sont rincées à l'eau plusieurs fois et immergées dans une solution d'éthanol 70% pendant 5 minutes. Après séchage des lames à l'air libre, 100 $\mu$ L de la solution de SYBR green I, diluée au 1/10 000 sont ajoutés. Les lames sont observées à l'aide du microscope à fluorescence DMI 6000B fluorescence Leica couplé à une caméra (CoolSNAP HQ2) (Sutter Instrument Compagny). Les images sont acquises en mosaïque d'image de 12x12 à l'objectif x10 à l'aide du logiciel MetaMorph. Puis les images sont analysées avec le logiciel Comet Assay IV (Perceptive instruments). Les résultats sont exprimés en Tail Moment (unité arbitraire), pour chaque cellule analysée et reflètent l'intensité du dommage à l'ADN. Ces tests ont été réalisés au laboratoire par Grégoire Desplanques.

## **VII. qPCR**

Après 48 heures de déplétion par siRNA ou de traitement, les cellules sont décollées par la trypsine (5 minutes à 37°C) puis lavées en PBS et centrifugées 5 minutes à 300g. Les ARN totaux sont extraits avec le kit NucleoSpin RNA (Macherey Nagel). La rétrotranscription (RT) est réalisée à l'aide du kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher). Pour chaque échantillon, 500ng d'ARN totaux sont ajoutés à la première solution du kit, contenant la transcriptase inverse et un inhibiteur de RNases et la seconde contenant les dNTP, des amorces hexamériques aléatoires (random hexamer primers) et des oligo(dT)<sub>18</sub>. De l'eau RNase-free est ajoutée pour obtenir un volume final de 20  $\mu$ L. Les échantillons sont ensuite incubés dans le thermocycleur (My Cycler Thermal Cycler, BioRad). Le programme utilisé comprend 10 minutes à 25°C pour l'hybridation des oligo(dT)<sub>18</sub> et des amorces hexamériques aléatoires, puis 15 minutes à 50°C permettant l'élongation et enfin 5 minutes à 85°C afin de dénaturer la transcriptase inverse. Un témoin négatif de RT ne contenant pas d'ARN est réalisé. Les ADNc obtenus sont conservés à -20°C.

La qPCR est réalisée avec le kit Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) ROX solution provided (Thermo Fisher) et l'appareil Stratagene MX3005P (Agilent Technologies). Le volume réactionnel final est de 10 $\mu$ L et contient 4  $\mu$ L d'ADNc préalablement dilués au 1/25, 1  $\mu$ L d'une solution contenant les amorces sens et anti sens à une concentration de 1,5  $\mu$ M et 5  $\mu$ L du mélange de qPCR du kit. Le mélange du kit contient la hot start taq polymerase, du MgCl<sub>2</sub>, des dNTP, du ROX (10nM) et du SYBR green. Le programme utilisé

comprend une première étape de dénaturation de 15 minutes à 95°C permettant l'activation de la polymérase également, puis une répétition de 40 cycles d'amplification (dénaturation : 10 secondes 95°C, hybridation et élongation : 30 secondes 60°C) avec lecture de la fluorescence du SYBR green à la fin de chaque cycle. Le programme se termine par une courbe de fusion. L'analyse des résultats se fait avec le logiciel Mx Pro. La quantification relative de l'expression génique est réalisée à partir des CT (cycle seuil) obtenus après analyse du logiciel Mx Pro. Nous avons normalisé l'expression des différents gènes à l'aide de l'expression de 3 gènes de ménage endogènes. Ces 3 gènes ont été déterminés pour chaque lignée cellulaire à l'aide d'un programme Excel comme ceux dont l'expression était la moins modifiée dans nos conditions parmi 6 gènes testés. Les quantités normalisées pour chaque condition ainsi obtenues sont rapportées à celles obtenues dans la condition contrôle (siRNA Contrôle ou Cellules non traitées). Nous obtenons des ratios de quantités normalisées dont les moyennes sont utilisées dans nos résultats afin de voir les modifications d'expression pour chaque gène et pour chaque condition. Les moyennes de ratios sont représentées soit en histogramme avec l'écart type, soit en Heat Map. Cette dernière représentation permet de mieux visualiser les différences d'expression et facilite la comparaison entre conditions. Le dégradé de couleur va du vert si l'expression est diminuée, au rouge si l'expression est augmentée. Le coefficient de variation (Cv) représente la variation entre manipulations (n=3) et est représenté par ce signe \*; \*\*\* si  $Cv < 0,25$ , \*\* si  $Cv < 0,35$ , \* si  $Cv < 0,5$  et la case est blanche si  $Cv > 0,5$ .

Gènes	Amorces sens 5'-3'	Amorces anti-sens 5'-3'
<i>GAPDH</i>	CAAAGGGTCATCATCTCTGC	AGTTGTCATGGATGACCTTGG
<i>ACTB</i>	AGAAAATCTGGCACCACACC	CAGAGGCGTACAGGGATAGC
<i>HPRT1</i>	ATGCTGAGGATTTGGAAAGG	GATGTAATCCAGCAGGTCAGC
<i>RPLP0</i>	AACCCAGCTCTGGAGAAACT	CCCCTGGAGATTTTAGTGGT
<i>B2M</i>	CGTGGCCTTAGCTGTGC	AATGTCGGATGGATGAAACC
<i>BAX</i>	GCAACTTCAACTGGGGCCGGG	GATCCAGCCCAACAGCCGCTC
<i>BBC3</i>	GGAACAGTGGGCCCCGGGAGA	GTGCCGCTGCTGCTCCTCTT
<i>BIRC5</i>	TGCGCTTTCCTTCTGTCAAGAAGC	CGGCGCACTTCTCCGCAGT
<i>BLM</i>	TAAGCAGCGATGTGATTTGC	TCTTCTGGAGAAGGTGGAACA
<i>BRCA1</i>	CTCAAGGAACCAGGGATGAA	GCTGTAATGAGCTGGCATGA
<i>BRCA2</i>	TGGTGGGCTCTCCTGATGCC	TACCAGCGAGCAGGCCGAGT
<i>CDKN1A</i>	CAGCATGACAGATTTCTACCAC	GAGACTAAGGCAGAAGATGTAGAG
<i>EME1</i>	ACAAGCAAGGCAGAAGGAAA	CATGGTCTGCAGTGCTCCTA
<i>ERCC1</i>	GTGCGCAATGTGCCCTGGGA	CTGCAGCCGCCCATGGATGT
<i>ERCC2</i>	GTGCCCATACTTCCTTGCTC	GAGTCGATGCAGACGTTGTC
<i>ERCC4</i>	GAGTAGGCCTGGGAAACCTC	TCCGAGTGTGAGTGGAAACA
<i>EXO1</i>	TCACACATGCCATGGCCCACA	GGCCAACTGCGCATCAGCTT
<i>GEN1</i>	TCTCGGTATGGGTCTTCTGG	ACATGACCACCAGCATTGAG
<i>MUS81</i>	AGAGAACAGTCCAGCCCCGCA	TCGGGCTCCTGAGTGCCGAG
<i>NBN</i>	TTGGTTGCATGCTCTTCTTG	GGCTGCTTCTTGGACTCAAC
<i>PMAP11</i>	CTCTGTAGCTGAGTGGGCG	CGGAAGTTCAGTTTGTCTCCA
<i>RAD50</i>	CGTACCCAAATGGAGATGCT	GCAAGTCTGTCCCTGGTCTG
<i>RAD51</i>	TGGCCACAACCCATTTACCGG	GCGCATAGGCAACAGCCTCCA
<i>RECQL4</i>	TTACTGCAACCGGCGCGAGG	GAAGGCTCGCTGTACCCGCC
<i>SLX4</i>	CATCGGCACATGATGATAGC	CCATCTTCACAGCACACTGC
<i>XPG</i>	ATCGCCATGGGAACTCAATA	AAGGCAGTTTTGATGGCTTG
<i>XRCC3</i>	CAGCAGAAGGAGCGGTTC	CGTCTTCCGTGCAGATGTAG
<i>XRCC4</i>	TGGTCATTCAGCATGGACTGGGACA	TCAGCTGGTCCTGCTCCTGACA

Tableau 3 : Liste des amorces designées avec l'outil Primer designing tool du NCBI.

## VIII. Analyse de l'activité de la recombinaison homologue

Pour l'analyse fonctionnelle de l'activité de la recombinaison homologue (RH), nous avons utilisé la lignée RG37, qui a été fournie par le Dr Bernard Lopez (IGR, Paris, France) (Laulier et al., 2011). Cette lignée contient dans son génome une seule copie du plasmide pDR-GFP (développé par le Dr. M. Jasin). Ce plasmide contient deux cassettes inactives répétées en tandem, codant pour la GFP. Une de ces cassettes contient un unique site de clivage pour la nucléase I-SceI, qui n'est pas exprimée par les cellules humaines. L'expression plasmidique transitoire de I-SceI entraîne une cassure double-brin au niveau de son site de

coupure dans l'insert, qui si elle est réparée par RH entraîne l'expression de la GFP (Pierce et al., 1999). Les cellules recombinées deviennent fluorescentes et sont détectées par cytométrie en flux. L'acquisition sur  $2 \times 10^4$  cellules par cytométrie en flux est réalisée à l'aide d'un FACSCalibur (Becton Dickinson) avec un laser argon 488nm. L'analyse des résultats est réalisée sur le logiciel CellQuest Pro.

Les cellules sont dans un premier temps transfectées avec le plasmide codant pour l'enzyme I-SceI, avec le réactif jetPEI, puis 24 heures après avec des siRNA (comme précédemment décrit). Les cellules sont récupérées 48 heures après transfection des siRNA et fixées avec une solution de PFA 1% avant d'être analysées en cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules GFP positives détecté reflète la capacité des cellules à réaliser de la RH.

## **IX. Evaluation de la mort cellulaire**

### **A. Marquage APO2.7-PE**

L'anticorps 2.7A6A3, couplé à la phycoérythrine (IOTest, Beckman Coulter), reconnaît l'antigène APO2.7, qui est une protéine exprimée à la surface de la membrane mitochondriale après modification de l'intégrité de la membrane externe de la mitochondrie. Le marquage est réalisé sans perméabilisation membranaire et permet donc de détecter une mort cellulaire tardive lorsque la membrane cellulaire est altérée. La protéine APO2.7 a été identifiée comme un marqueur sensible de la mort cellulaire mais non spécifique de l'apoptose, elle est détectée dans des cellules lymphocytaires après des traitements avec des toxines altérant la membrane mitochondriale (Büssing et al., 1999). Cependant un autre article a démontré que la détection de cette protéine était dépendante des CASPASES dans la lignée cellulaire Jurkat et ce indépendamment de la perturbation de l'intégrité de la mitochondrie (Nagahara et al., 2007).

Les cellules et leur milieu de culture sont récupérés. Le culot cellulaire est lavé puis incubé dans du PBS contenant  $2 \mu\text{L}$  d'anticorps 2.7A6A3 (condition pour  $10^5$  cellules), 15 minutes, à température ambiante et à l'obscurité. Les cellules sont ensuite fixées avec du PBS-

PFA 1%. L'acquisition sur  $10^4$  cellules par cytométrie en flux est réalisée à l'aide d'un FACSCalibur (Becton Dickinson) avec un laser argon 488nm. Un des intérêts de ce test est la possibilité de différer l'analyse contrairement au suivant.

## **B. Marquage Annexin V-FITC**

L'Annexin V est une protéine qui reconnaît avec une très grande affinité la phosphatidylsérine, phospholipide qui est normalement localisé sur la face interne de la membrane plasmique cellulaire mais qui se retrouve sur la surface externe de la membrane plasmique lors du déclenchement de la mort cellulaire apoptotique. L'externalisation de la phosphatidylsérine n'était pas observée que dans un contexte d'apoptose mais aussi lors de phase très précoce de nécrose dans la lignée JB6 CASPASE 8 déficientes (Krysko et al., 2004). Ce marquage peut être couplé avec un marquage IP (Iodure de propidium). La détection de cellules positives pour l'Annexin V et négatives pour l'IP (Annexin V (+) IP (-)) permet de mettre en évidence une mort cellulaire apoptotique précoce sans perméabilisation des membranes. La détection des cellules Annexin V (+) IP (+) permet de détecter une mort cellulaire plus tardive.

Les cellules et leur milieu de culture sont récupérés. Le culot cellulaire est lavé avec du PBS froid puis incubé dans 100 $\mu$ L de Buffer 1X (préparé à partir du Buffer 20X du kit) contenant 1 $\mu$ L d'Annexin V-FITC (kit Miltenyi Biotec) (condition pour  $10^5$  cellules), 15 minutes, sur glace et à l'obscurité. Les cellules sont ensuite reprises dans le Buffer 1X. L'acquisition immédiate sur  $10^5$  cellules et l'analyse des données sont réalisées comme décrit précédemment. Le spectre d'émission de fluorescence de la fluorescéine est compris entre 517 et 527nm.

## **X. Quantification de l'activité des CASPASES**

Nous avons utilisé le kit Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) pour évaluer l'activité des CASPASES. Nous avonsensemencé  $8 \times 10^3$  cellules en plaque 96 puits blanches et réalisé des extinction de protéines de 48 heures par siRNA. Puis nous avons ajouté directement dans les puits le même volume de mélange du kit contenant le tampon de lyse, la luciférase UltraGlo

Recombinant Luciférase et le substrat de la luciférase contenant une séquence DEVD qui pourra être utilisé par la luciférase une fois le clivage par les CASPASES réalisé. Après agitation de 10 minutes et incubation à l'obscurité et à température ambiante de 20 minutes, la lecture de la luminescence produite par la luciférase si la séquence DEVD de son substrat est clivée par les CASPASES est mesurée avec le Mithras LP 940. Les normalisations sont faites comme indiquées par le fournisseur.

## **XI. Analyse du cycle cellulaire**

Le cycle cellulaire est étudié à l'aide d'un marquage par l'iodure de propidium (IP). L'iodure de propidium est un agent intercalant des acides nucléiques et une molécule fluorescente. Après récupération, les cellules sont lavées avec du PBS. Le culot cellulaire est repris dans du PBS-SVF 50%, puis perméabilisé et fixé dans de l'éthanol 70% pendant une nuit à 4°C. Pour un marquage IP seul, les cellules sont lavées, reprises dans du PBS et incubées 15 minutes avec 2µg d'IP à température ambiante (condition pour 3x10<sup>5</sup> cellules). Pour un marquage IP-γ-H2AX, les cellules sont lavées en PBS et perméabilisées 15 minutes sur glace dans du PBS-saponine 0,1%. Puis les cellules sont lavées deux fois dans du PBS et incubées dans 200µL de PBS-SVF 2% contenant 0,4µg d'anticorps γ-H2AX-FITC (condition pour 3x10<sup>5</sup> cellules) sous agitation, à 4°C et à l'abri de la lumière. Enfin les cellules sont lavées et reprises en PBS et incubées 15 minutes avec l'iodure de propidium (2µg) (Invitrogen) à température ambiante. L'acquisition sur 2x10<sup>4</sup> cellules et l'analyse des données sont réalisées comme décrit précédemment. Le spectre d'émission de fluorescence de la fluorescéine est compris entre 517 et 527nm, et celui de l'IP est très large et s'étend de 560 à 680nm.

## **XII. Analyse de l'activité de promoteur**

La lignée MCF7 a été transfectée (comme précédemment décrit) avec un plasmide codant pour la luciférase sous promoteur régulé par le facteur de transcription NF-κB (Panomics, eBioSciences). Puis après prétraitement avec l'AS602868, les cellules sont exposées 48 heures au TNFα. L'activité de l'enzyme luciférase est mesurée à l'aide du kit

Dual-Luciférase Reporter assay system (Promega) conformément aux instructions du fournisseur. Les résultats sont représentés en unité arbitraire.

### **XIII. Test de formation de mammosphères**

Pour ce test, nous avons utilisé la lignée cellulaire MCF7. Les cellules sont mises en culture dans un milieu de culture DMEM-F12 (Sigma) optimisé pour la croissance de cellules épithéliales mammaires dépourvu de sérum et supplémenté de B27 (Gibco) et de MEGM singlequots (Lonza). Les cellules sont mises en culture à faible densité cellulaire dans des plaques de culture à très faible adhérence (Corning) comme précédemment décrit (Campone et al., 2011). Après 7 jours de culture en présence de 50nM de YM155 ou non, les mammosphères de taille supérieur à 50  $\mu\text{m}$  sont comptées. Les résultats sont exprimés en nombre de mammosphères formées dans chaque condition.

### **XIV. Analyse ex vivo**

Les échantillons de tumeurs mammaires humaines sont obtenus de l'Institut de Cancérologie de l'Ouest - René Gauducheau (ICO) (Nantes), après exérèse chirurgicale de carcinomes mammaires chez des patientes n'ayant pas subi de chimiothérapie. Un consentement informé est toujours obtenu des patientes par l'équipe médicale permettant l'utilisation des pièces chirurgicales à visée de recherche et des données clinico-pathologiques. Le comité d'éthique local a donné son accord pour les protocoles utilisés dans le cadre de ce travail.

Les tumeurs sont découpées en fines tranches de 250  $\mu\text{m}$  à l'aide d'un vibratome (Microme) et incubées 48 heures avec 50nM de YM155 ou non, dans un milieu de culture optimisé. Les tranches sont ensuite fixées dans un tampon contenant 10% de formol. Les tranches sont incluses par la suite en paraffine et des sections de 3 $\mu\text{m}$  sont réalisées pour l'étude histologique après coloration HES (Hematoxylin-Eosine-Safran) et étude immunohistochimique, utilisant un anticorps anti-CASPASE 3 active, marqueur de mort cellulaire (Séveno et al., 2012). L'altération morphologique des cellules est évaluée grâce à la coloration HES. Un score est donné en fonction de l'altération cellulaire allant de 0 si il n'y a

pas d'altération à 3 si l'altération cellulaire est très importante. Le pourcentage de cellules CASPASE 3 active positive est également évalué sur 200 cellules cancéreuses comptées. L'expression du récepteur aux œstrogènes a été définie en parallèle, dans un but de diagnostic.

## **XV. Analyses statistiques**

Les expériences ont été réalisées 3 fois indépendamment (sauf si mentionné différemment). Les moyennes des 3 expériences sont représentées avec la SEM comme facteur de variation.

Les analyses statistiques réalisées sont à chaque fois des tests t de Student avec le logiciel Prism. Correspondance des probabilités : \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

# **RESULTATS**

## I. La SURVIVINE, protéine génoprotectrice

La SURVIVINE est une protéine qui est retrouvée surexprimée dans la plupart des cancers dont les cancers mammaires. En clinique la forte expression de la SURVIVINE est associée à des tumeurs agressives et de mauvais pronostic. Sa surexpression est également associée à la résistance à de nombreux traitements de chimio et radiothérapie. Nous voulions comprendre comment la SURVIVINE pouvait participer à la résistance à des traitements génotoxiques et définir quel rôle elle pouvait jouer dans la protection des dommages à l'ADN dans les cellules cancéreuses.

Les travaux de cette thèse ont été réalisés avec les lignées cellulaires Cal51, MDA-MB-231 et MCF7, toutes trois issues d'adénocarcinome mammaire humain et établies à partir d'effusions pleurales métastatiques. Les Cal51 présentent un caryotype normal et une absence de mutation sur le gène *TP53*. Les MDA-MB-231 sont aneuploïdes et mutées sur le gène *TP53*. Cette mutation R280K affecte le domaine de liaison à l'ADN de la protéine p53. Ces deux lignées n'expriment pas de récepteurs hormonaux (ER et PR) et ne présentent pas d'amplification d'expression de l'oncogène Her2. Elles sont donc de sous-type triple négatif. La lignée MCF7 exprime le récepteur aux œstrogènes (ER $\alpha$ ), représentative d'un sous-type hormono-dépendant (ER+) et ne présente pas de mutation sur le gène *TP53*.

### A. La déplétion en SURVIVINE induit des dommages à l'ADN

Dans cette hypothèse du rôle génoprotecteur de la surexpression de la SURVIVINE, nous avons analysé l'effet la déplétion en SURVIVINE, par ARN interférence, sur l'apparition des dommages à l'ADN.

**1. La déplétion en SURVIVINE induit des cassures double-brin de l'ADN.**

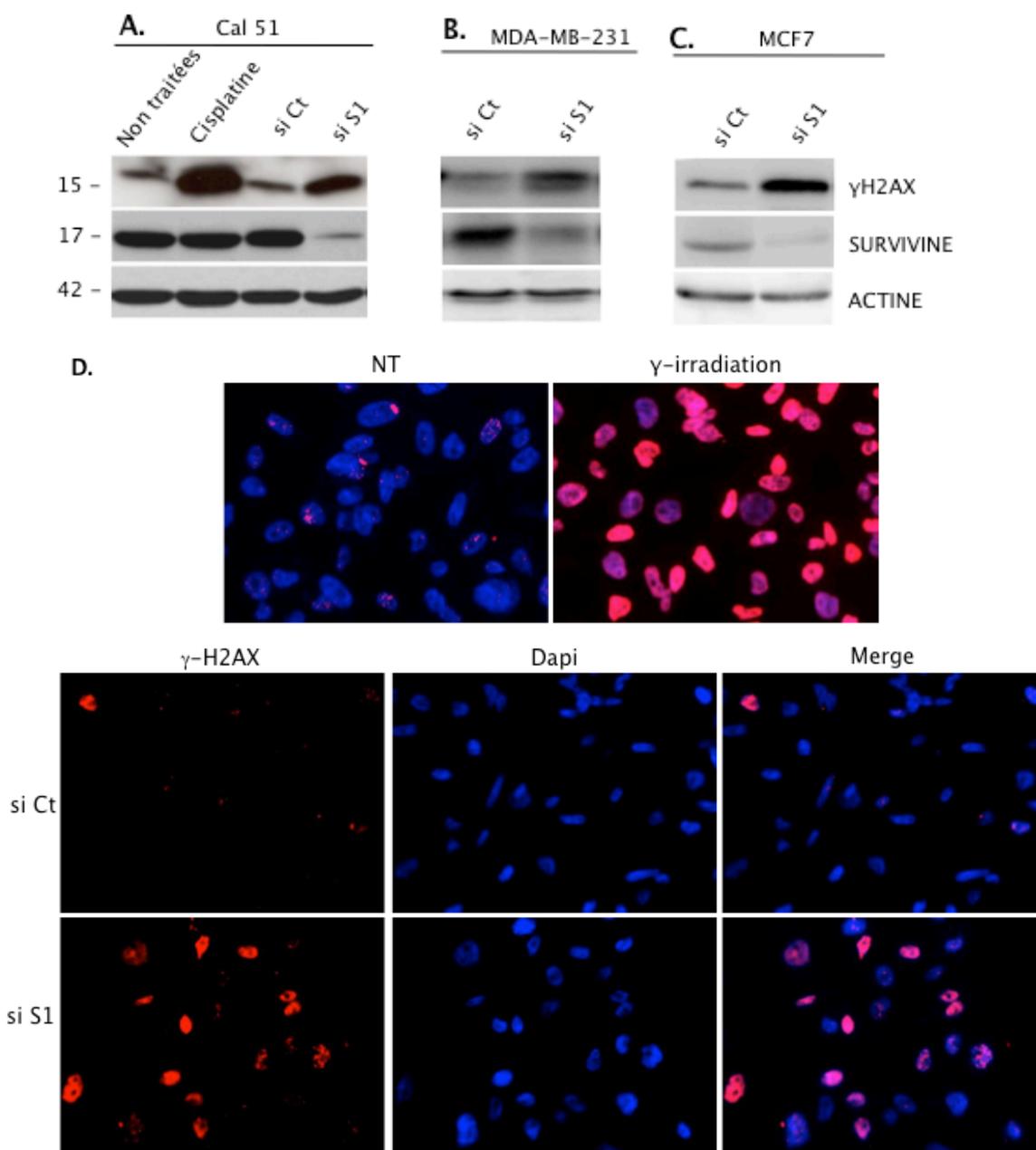
*a) La déplétion en SURVIVINE induit une augmentation de la phosphorylation de l'histone H2AX*

Nous avons détecté à la fois en immunoblot et immunocytochimie la phosphorylation sur la Sérine 139, modification précoce et rapide, du variant H2AX de l'histone H2A ( $\gamma$ -H2AX), en réponse aux cassures double-brin de l'ADN (Redon et al., 2002) (Figure 22).

La déplétion efficace en SURVIVINE s'accompagne d'une augmentation de  $\gamma$ -H2AX en immunoblot dans trois lignées cellulaires cancéreuses mammaires, Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 par rapport au siRNA Contrôle (si Ct) (Figure 22 et Figure 30 A, B et C respectivement). Un traitement génotoxique, le Cisplatine, est utilisé comme contrôle positif (Figure 22 A). Nous observons également un niveau basal de  $\gamma$ -H2AX, qui peut être dû à la survenue de dommages à l'ADN au cours de la prolifération cellulaire.

En immunocytochimie, nous avons mis en évidence une augmentation du marquage nucléaire de  $\gamma$ -H2AX sous déplétion en SURVIVINE, comme montré dans la lignée Cal51 (Figure 22 D). L'irradiation  $\gamma$  nous a servi de contrôle positif de génotoxicité (Figure 22 D). De plus nous avons mis en évidence à plus fort grossissement un marquage  $\gamma$ -H2AX en foci nucléaires, spécifiques de cassures double-brin de l'ADN. Cet immunomarquage est actuellement le plus utilisé pour la détection des cassures de l'ADN double-brin et reconnu pour son excellente sensibilité (Sedelnikova et al., 2002).

Ces résultats montrent que la déplétion en SURVIVINE induit une augmentation des dommages à l'ADN dans les trois lignées cancéreuses mammaires étudiées qui sont a priori des cassures double-brin de l'ADN.



**Figure 22 : La déplétion en SURVIVINE induit une augmentation des dommages à l'ADN.**

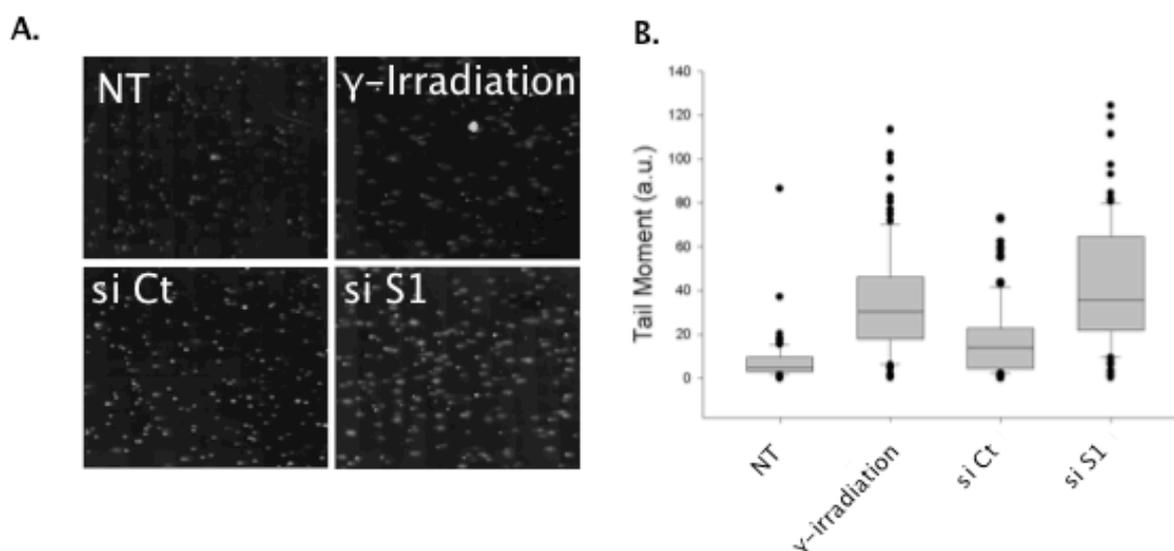
A, B et C Les lysats totaux des lignées cellulaires Cal51 (A), MDA-MB-231 (B) et MCF7 (C) 48 heures après transfection des siRNA ciblant la SURVIVINE. (A, B et C) et à 48 heures de traitement Cisplatine ( $6,66\mu\text{M}$ ), utilisé comme contrôle positif (A) sont analysés en immunoblot afin de déterminer l'expression de la SURVIVINE et de  $\gamma$ -H2AX. D et E Des immunomarquages  $\gamma$ -H2AX ont été réalisés sur la lignée Cal51 48 heures après transfection de siRNA ciblant la SURVIVINE ou bien après 48 heures d'irradiation  $\gamma$  (2 Gy). Le noyau a été marqué en DAPI. (n=3)

*b) La déplétion en SURVIVINE induit des cassures double-brin de l'ADN*

Un essai comète a été réalisé (Single Cell Electrophoresis Assay) en conditions neutre ou alcaline (Figure 23) dans la lignée MDA-MB-231, afin de confirmer les cassures double-

brin de l'ADN. L'irradiation de la lignée cellulaire a été choisi comme contrôle positif. La Figure 23 A représente les gels d'électrophorèse des essais comètes sur lesquels nous pouvons voir l'apparition d'images de comètes quand la SURVIVINE est déplétée, dont nous avons mesuré la longueur des queues, correspondant aux brins d'ADN cassés. La quantification des comètes et de leur taille, représentée par le Tail Moment, a été réalisée à l'aide du logiciel Comet Assay IV. Ce critère représentatif de l'intensité du dommage à l'ADN nous a permis de confirmer l'augmentation des dommages à l'ADN double-brin dans la condition de déplétion en SURVIVINE, comme nous l'observons après rayonnement  $\gamma$  (Figure 23 B).

Les mêmes résultats ont été obtenus en conditions neutres ou alcalines, nous permettant alors de confirmer que la déplétion en SURVIVINE induit des cassures double-brin de l'ADN.



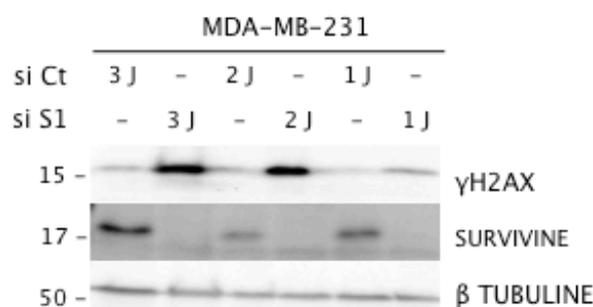
**Figure 23 : La déplétion en SURVIVINE induit des cassures double-brin de l'ADN.**

A Nous avons réalisé des essais comètes sur la lignée MDA-MB-231 48 heures après transfection de siRNA ciblant la SURVIVINE ou 48 heures d'irradiation  $\gamma$  (2 Gy) en condition non alcaline. B La quantification de l'intensité du dommage à l'ADN est représenté par le Tail Moment, mesuré automatiquement par le logiciel Comet Assay IV, pour chaque cellule dans les gels d'électrophorèse. (n=2, 10<sup>4</sup> cellules analysées par expériences)

*c) Les dommages à l'ADN s'accroissent sous déplétion en SURVIVINE*

Nous avons voulu voir l'évolution du niveau de dommage à l'ADN au cours du temps après transfection de siRNA ciblant la SURVIVINE. Nous avons déplété la lignée MDA-MB-231 en SURVIVINE de 1 à 3 jours et analysé l'évolution du marquage  $\gamma$ -H2AX (Figure 24). Nous observons dès 24 heures après transfection de siRNA une légère augmentation de  $\gamma$ -

H2Ax qui s'accumule après 2 et 3 jours. La déplétion en SURVIVINE par siRNA est très efficace dès 24 heures après transfection et est maintenue 3 jours, après transfection de siRNA.



**Figure 24 : Les dommages à l'ADN sous déplétion en SURVIVINE s'accumulent au cours du temps.**

La lignée MDA-MB-231 a été déplétée en SURVIVINE (si S1) de 1 à 3 jours par ARN interférence. Les lysats cellulaires totaux ont été analysés en immunoblot afin d'observer  $\gamma$ -H2AX et la SURVIVINE. (n=2)

## ***2. Les cassures double-brin observées sont spécifiques de la déplétion en SURVIVINE***

Nous avons voulu vérifier la spécificité de la déplétion de la SURVIVINE sur l'induction des dommages à l'ADN.

### *a) Différentes séquences de siRNA ciblant la SURVIVINE induisent des dommages à l'ADN*

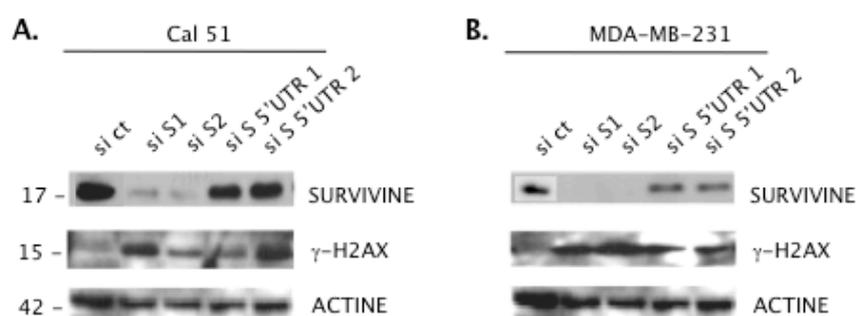
Nous avons utilisé différentes séquences de siRNA ciblant l'ARNm de la SURVIVINE. Deux séquences complémentaires de la partie codante de l'ARNm (si SURVIVINE 1 et 2) et deux séquences ciblant la partie 5'UTR de l'ARNm de la SURVIVINE (si S 5'UTR 1 et 2) ont été utilisées (Figure 26). Ces deux dernières (si S 5'UTR 1 et 2) ont été choisies pour l'expérience de complémentation par surexpression de la SURVIVINE exogène à l'aide d'un plasmide.

Ces différentes séquences diminuent l'expression de la SURVIVINE par immunoblot (Figure 25). Les séquences ciblant la partie codante de l'ARNm diminuent très efficacement l'expression de la SURVIVINE dans les lignées Cal51 et MDA-MB-231 (Figure 25 A et B respectivement). En revanche les séquences complémentaires de la partie 5'UTR de l'ARNm

diminuent moins efficacement l'expression de la protéine notamment dans la lignée Cal51 (Figure 25 A).

Nous avons évalué l'induction de dommages à l'ADN sous déplétion en SURVIVINE par ces différentes séquences en immunoblot à l'aide du marqueur  $\gamma$ -H2AX. Toutes les séquences utilisées ciblant l'ARNm de la SURVIVINE induisent une augmentation de  $\gamma$ -H2AX (Figure 25). L'augmentation de  $\gamma$ -H2AX est toujours détectable sous déplétion en SURVIVINE. Cependant l'apparition des dommages de l'ADN n'est pas proportionnelle au niveau d'extinction de la SURVIVINE. Par exemple, la séquence si S2 induit une plus faible induction de  $\gamma$ -H2AX dans la lignée Cal51 en comparaison à la séquence si S 5'UTR 2 mais diminue plus efficacement l'expression de la SURVIVINE (Figure 25 A).

Les différentes séquences de siRNA ciblant la SURVIVINE, et capables de diminuer l'expression de la protéine, induisent toutes une augmentation des dommages de l'ADN.



**Figure 25 : La déplétion en SURVIVINE par différentes séquences de siRNA induit une augmentation des dommages à l'ADN.**

A et B Les lignées Cal51 (A) et MDA-MB-231 (B) ont été transfectées avec différentes séquences d'ARN interférents ciblant la partie codante de l'ARNm de la SURVIVINE (si S1 et si S2) ou ciblant la partie 5'UTR (si S 5'UTR 1 et 2). 48 heures après transfection des séquences siRNA ciblant la SURVIVINE, les lysats cellulaires totaux ont été analysés par immunoblot afin de voir les variations de phosphorylation de  $\gamma$ H2AX et de la SURVIVINE. (n=3)

*b) La surexpression ectopique de la SURVIVINE diminue les dommages à l'ADN induits par la déplétion en SURVIVINE endogène*

Enfin pour confirmer l'effet de la déplétion en SURVIVINE sur l'apparition des dommages à l'ADN, nous avons réalisé une expérience de restauration d'expression de la SURVIVINE. Nous avons pour cela surexprimé une SURVIVINE ectopique par transfection transitoire du plasmide pCDNA3 SURVIVINE (pSURVIVINE) (Figure 27 C), puis nous avons déplété la SURVIVINE endogène en utilisant les séquences de siRNA ciblant la partie

5'UTR de l'ARNm qui est absente de l'ARNm de la SURVIVINE ectopique codée par le plasmide pSURVIVINE (Figure 26).



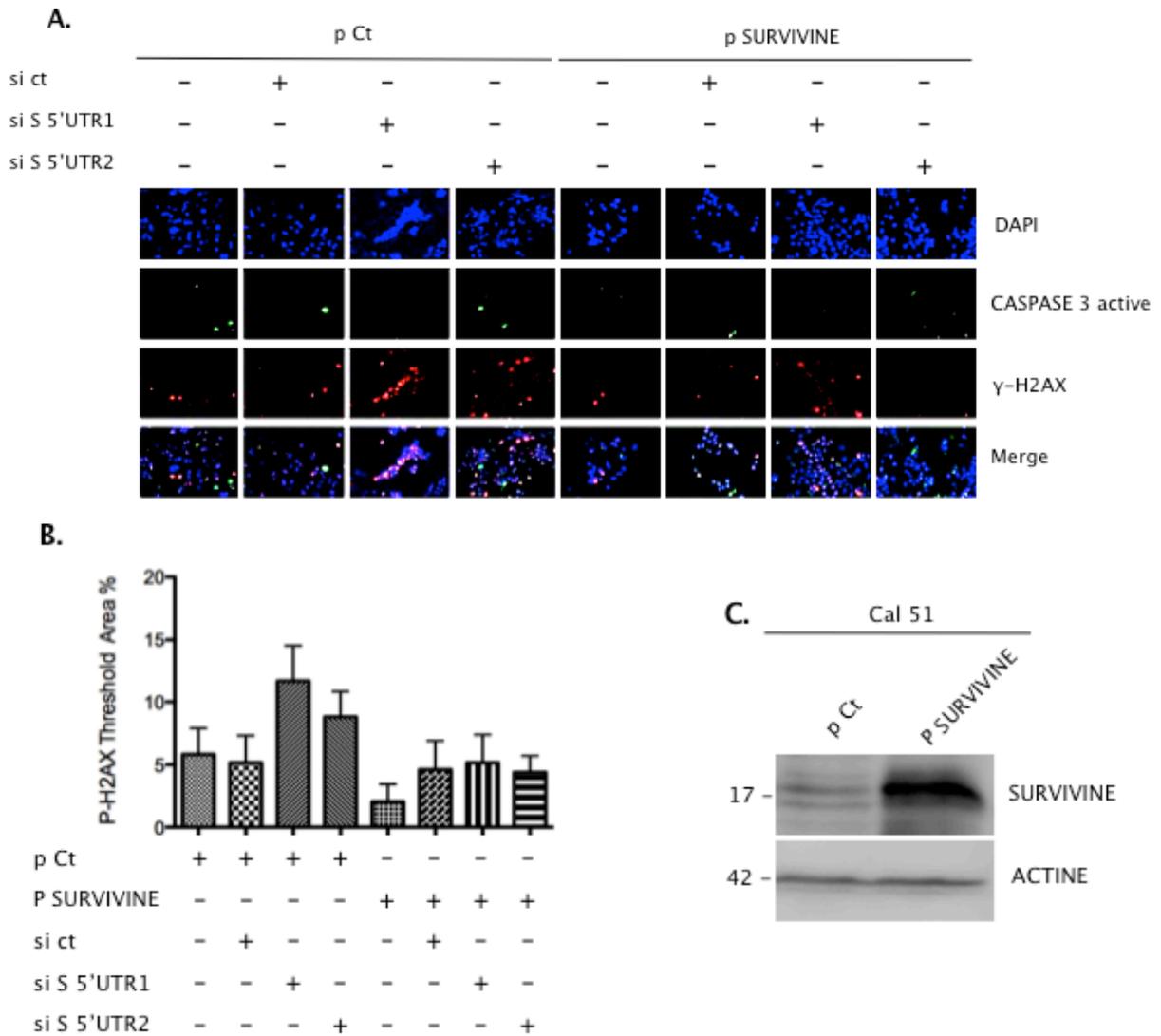
Figure 26 : Schéma des ARNm de la SURVIVINE endogène et ectopique et du ciblage des séquences de siRNA

Après les transfections des plasmides pContrôle et pSURVIVINE et des siRNA (Ct et S 5'UTR 1 ou 2) dans la lignée Cal51, nous avons réalisé des marquages d'immunocytochimie de  $\gamma$ -H2AX pour évaluer les dommages à l'ADN dans les différentes conditions (Figure 27 A). Après observation au microscope à fluorescence, les images obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel Métamorphe. L'analyse permet de déterminer le pourcentage de l'aire du noyau, marqué en DAPI, présentant un marquage  $\gamma$ -H2AX. Ce pourcentage nucléaire de marquage  $\gamma$ -H2AX, représenté par l'histogramme en Figure 27 B a été réalisé pour chaque condition à partir des images d'immunocytochimie (Figure 27 A).

La déplétion en SURVIVINE endogène par transfection des siRNA S 5'UTR 1 et 2 augmente le pourcentage du marquage  $\gamma$ -H2AX de l'aire nucléaire. Lorsque l'on surexprime la SURVIVINE ectopique par transfection plasmidique transitoire tout en ayant l'extinction de la SURVIVINE endogène, nous observons une diminution du pourcentage de ce marquage  $\gamma$ -H2AX nucléaire (Figure 27 B).

Au cours de cette expérience nous avons également mis en évidence une très faible activation de la CASPASE 3.

L'augmentation des dommages à l'ADN sous déplétion en SURVIVINE n'est donc pas liée à un effet hors cible de l'ARN interférent. Elle est alors spécifique de la déplétion en SURVIVINE.



**Figure 27 : Les dommages induits par la déplétion en SURVIVINE endogène sont diminués par la surexpression ectopique de cette même protéine.**

A La lignée Cal51 a été transfectée avec un plasmide contrôle (pCt) ou un plasmide codant pour la SURVIVINE (pSURVIVINE) dont nous avons vérifié la surexpression en immunoblot (C) après 48 heures. Puis les cellules ont été transfectées 24 heures plus tard avec des ARN interférents ciblant la partie 5'UTR de l'ARN messenger de la SURVIVINE endogène. 48 heures après transfection des siRNA ciblant la SURVIVINE, les cellules sont fixées. Des immunomarquages de  $\gamma$ -H2AX et de la CASPASE 3 active ont été réalisés. Le noyau est marqué au DAPI. L'analyse des images d'immunocytochimie réalisées (A) permet de déterminer le pourcentage de l'aire du noyau présentant un marquage  $\gamma$ -H2AX (P-H2AX Threshold Area %) représenté en histogramme pour chaque condition (B). (n=2)

## **B. La déplétion en SURVIVINE altère la capacité des cellules à réparer les dommages à l'ADN par recombinaison homologue**

Mes travaux de thèse ont consisté par la suite à déterminer les causes de l'accumulation des dommages à l'ADN survenant après déplétion en SURVIVINE.

Les cellules cancéreuses prolifèrent rapidement, créant des dommages à l'ADN endogènes qui, lorsque les voies de réparation sont actives, sont réparés limitant ainsi leur accumulation. En revanche si une des voies de réparation est perturbée, une accumulation des dommages à l'ADN apparaît. Des connexions entre les acteurs de la réparation de l'ADN et la SURVIVINE ont déjà été décrites. Il a été montré que BRCA1 régule négativement l'expression de la SURVIVINE dans les lignées cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MCF7, l'associant à une sensibilité au Paclitaxel (Promkan et al., 2009, 2011). Nous retrouvons aussi cette régulation dans un modèle murin de lignée cellulaire et de tumorigenèse mammaire *in vivo*, via l'augmentation de l'expression de SIRT1 par BRCA1 entraînant des modifications épigénétiques diminuant l'expression de la SURVIVINE (Wang et al., 2008). De plus il a aussi été montré une accumulation nucléaire de la SURVIVINE après irradiation et une colocalisation et une interaction avec des acteurs de la réparation, les protéines Ku70, MDC1,  $\gamma$ -H2AX et DNA-PK, dans un modèle de cancer colorectal et de gliome (Capalbo et al., 2010; Reichert et al., 2011; Wall et al., 2010). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'influence de la déplétion en SURVIVINE sur les voies de réparation des dommages de l'ADN.

### ***1. La déplétion en SURVIVINE diminue la transcription de gènes impliqués dans la recombinaison homologue***

Afin de comprendre si la déplétion en SURVIVINE pouvait perturber les voies de réparation de dommages à l'ADN, nous avons réalisé l'analyse de l'expression d'un panel de gènes impliqués dans différentes voies de réparation, lors de la déplétion en SURVIVINE, par qPCR.

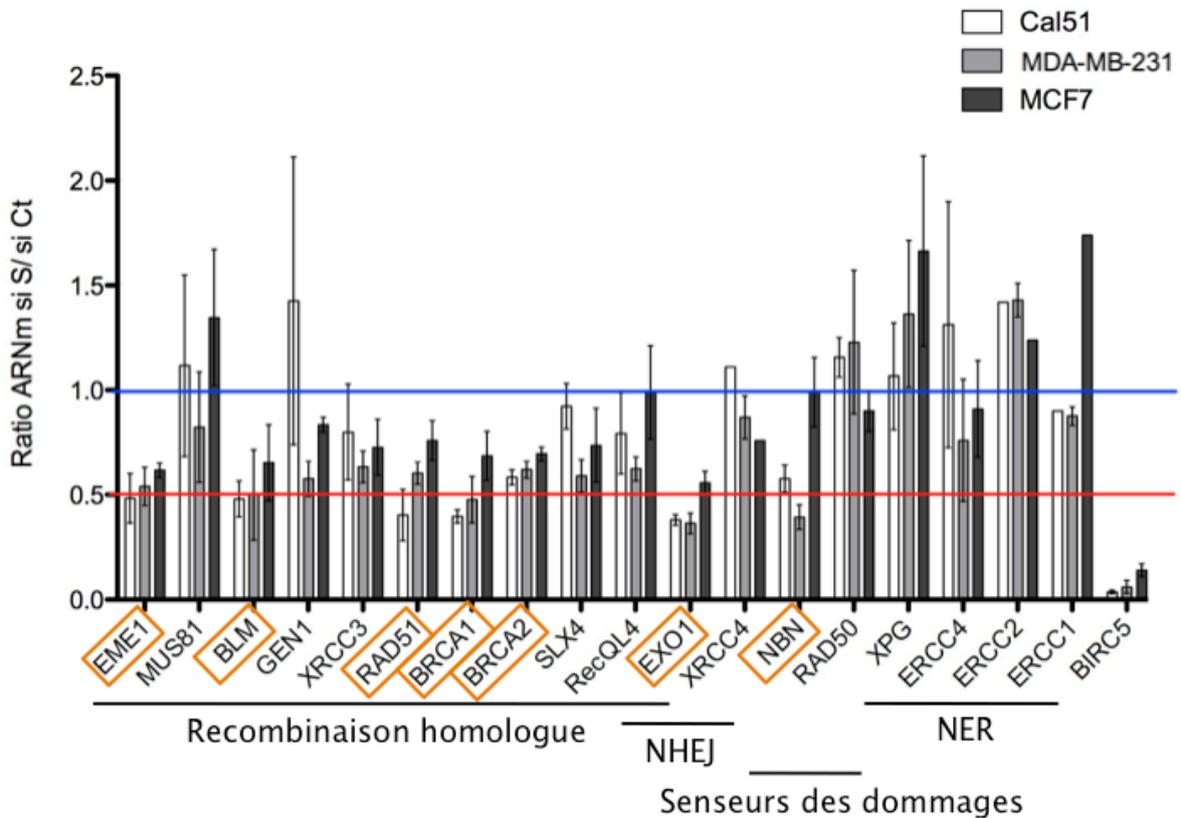
Les résultats de qPCR exprimés en ratio des quantités normalisées par rapport aux gènes de ménage (Cf. Matériel et méthodes) obtenues sous déplétion en SURVIVINE par

rapport à celles obtenues dans la condition siRNA contrôle (si Ct) dans la Figure 28, nous permettent de visualiser la variation de l'expression des 18 gènes étudiés. De plus nous observons que l'expression de l'ARNm de la SURVIVINE est très diminuée.

De ces résultats nous avons retenu 7 gènes dont l'expression était diminuée sous déplétion en SURVIVINE dans au moins deux lignées cellulaires parmi les trois étudiées (ceux encadrés en orange dans la Figure 28. Parmi ces gènes, 6 sont impliqués dans la recombinaison homologue (RH). Cet ensemble de gène sera par la suite nommé set de gènes RH.

Le 7<sup>ème</sup> gène, *NBN*, dont l'expression est diminuée suite à la déplétion en SURVIVINE fait partie du complexe MRN, senseur du dommage à l'ADN (Williams et al., 2010). De plus, nous n'avons pas observé de variation significative des autres gènes étudiés, indiquant qu'il n'y a pas de diminution globale de l'activité transcriptionnelle.

La déplétion en SURVIVINE s'accompagne d'une diminution de l'expression de 6 gènes impliqués dans la recombinaison homologue (set de gènes RH).



**Figure 28 : La déplétion en SURVIVINE induit une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la RH.**

Les lignées Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 sont analysées après 48 heures de transfection avec les siRNA Ct ou S1. Après rétrotranscription des ARNm isolés, les ADNc obtenus sont analysés en qPCR ciblant les gènes indiqués. L'histogramme présente la moyenne des ratios des quantités normalisées obtenues sous déplétion en SURVIVINE par rapport aux quantités normalisées obtenue après transfection du siRNA Ct pour chaque gène. (n=3)

Nous avons confirmé que la déplétion en SURVIVINE par une autre séquence de siRNA a le même effet sur la diminution de l'expression du set de gènes RH. Les moyennes de ratios des quantités relatives normalisées obtenues dans la lignée MCF7 sous déplétion en SURVIVINE avec les deux séquences de siRNA (si S1 et 2) par rapport à celles obtenues dans la condition siRNA contrôle sont représentées en Figure 29. Nous avons représenté les résultats en Heat Map afin de faciliter les comparaisons de ratio d'expression génique entre les différentes conditions. Le dégradé de couleurs, plus visuel, nous permet de voir que la deuxième séquence de siRNA (si S2) est encore plus efficace pour diminuer l'expression du set de gènes RH ciblés par la première séquence (Figure 29).

## Résultats

MCF7	EME1	EXO1	BLM	BRCA1	BRCA2	RAD51	MUS81	BIRC5
si S1	0,55 ***	0,56 ***	0,49 *	0,55 **	0,55 **	0,55 ***	0,95 ***	0,12 **
si S2	0,25 ***	0,33 **	0,59	0,54 *	0,57 ***	0,36 ***	1,33	0,04 *

**Figure 29 : L'expression du set de gènes RH est diminuée par déplétion en SURVIVINE par deux séquences de siRNA différentes.**

La lignée MCF7 est déplétée 48 heures en SURVIVINE par ARN interférence avec deux séquences différentes. Après rétrotranscription des ARN messagers, les ADNc obtenus sont analysés en qPCR ciblant les gènes indiqués. Le tableau présente la moyenne des ratios des quantités normalisées obtenues sous déplétion en SURVIVINE avec la séquence S1 ou S2 par rapport aux quantités normalisées obtenues après transfection du siRNA Ct pour chaque gène. Un dégradé de couleur permet de mettre en évidence les diminutions (vert) ou augmentations (rouge) de l'expression des gènes. Le coefficient de variation (Cv) des moyennes des ratios est indiqué par les \*; \*\*\* si  $Cv < 0,25$ , \*\* si  $Cv < 0,35$ , \* si  $Cv < 0,5$  et la case est blanche si  $Cv > 0,5$ . (n=3)

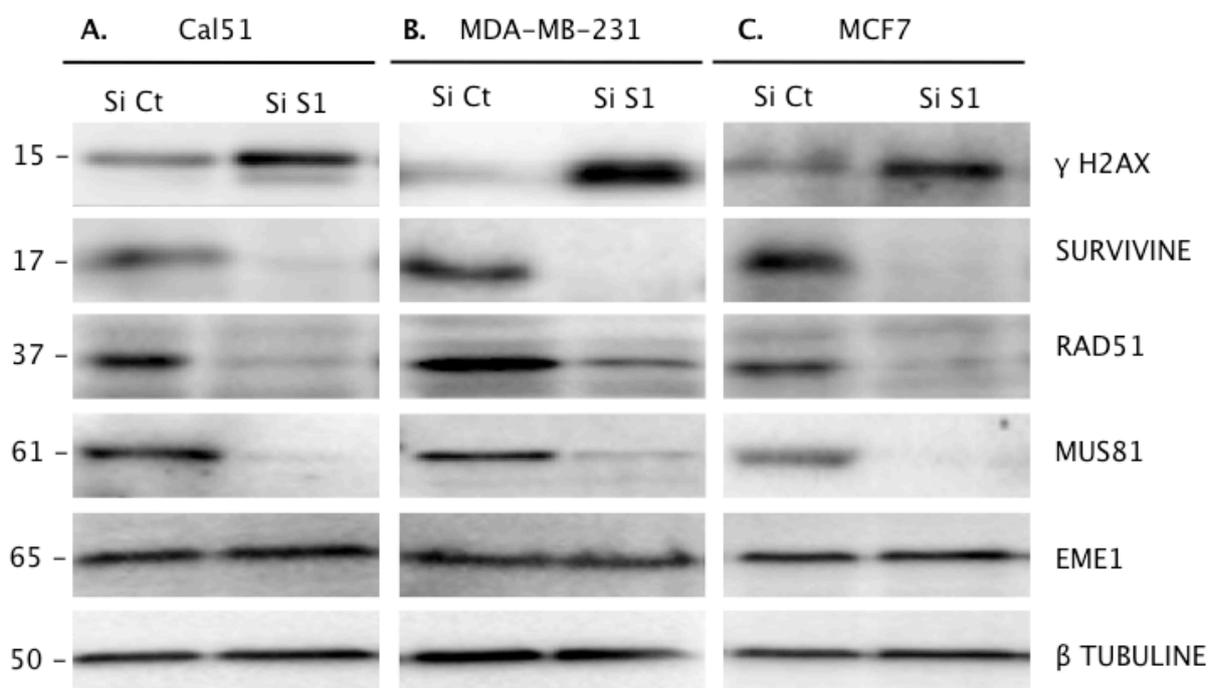
### ***2. La déplétion en SURVIVINE diminue l'expression de protéines impliquées dans la RH***

Nous avons alors analysé l'expression protéique des cibles identifiées par qPCR. Nous avons porté notre intérêt sur l'expression de RAD51 et EME1, dont l'expression génique est fortement diminuée lorsque la SURVIVINE est déplétée. Nous avons également étudié l'expression de MUS81, puisque cette protéine forme un complexe avec EME1, même si l'expression de son gène est stable sous déplétion en SURVIVINE.

Les immunoblots réalisés sur les trois lignées révèlent que la déplétion en SURVIVINE entraîne une diminution de la protéine RAD51, corrélée à la diminution de son ARNm (Figure 30). Nous n'observons pas de modification de l'expression de la protéine EME1, bien que son expression génique soit diminuée de moitié sous déplétion en SURVIVINE. En revanche, sous déplétion en SURVIVINE nous observons une très forte diminution de l'expression de la protéine MUS81, bien que son expression génique ne soit pas modifiée.

La déplétion en SURVIVINE diminue l'expression de protéines impliquées dans la voie de réparation par RH. Les expressions protéique et génique sont corrélées pour RAD51, mais pas pour le complexe EME1-MUS81. Ce complexe est une endonucléase qui a une activité de résolvasse des structures intermédiaires de réplication. Bien que son ARNm soit diminué, la protéine EME1 est toujours exprimée, ce qui pourrait s'expliquer par une stabilité

particulièrement importante de la protéine. En revanche pour MUS81, son ARNm n'est pas modifié, mais la diminution de l'expression de la protéine correspondante laisse à penser que des mécanismes de dégradation peuvent être en jeu et particulièrement actifs quand les cellules sont déplétées en SURVIVINE.



**Figure 30 : La déplétion en SURVIVINE diminue l'expression des protéines RAD51 et MUS81 impliquées dans la RH.** A, B et C Les lignées Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 sont transfectées avec des ARN interférant contrôle (si Ct) ou ciblant l'ARNm de la SURVIVINE (si S1). Après 48 heures d'extinction, les lysats protéiques totaux sont analysés en immunoblot permettant de voir les modifications d'expression des protéines SURVIVINE, RAD51, MUS81, EME1 et la modification de phosphorylation de H2AX sur le Sérine 139. (n=3)

### 3. Evaluation de l'activité de la RH sous déplétion en SURVIVINE

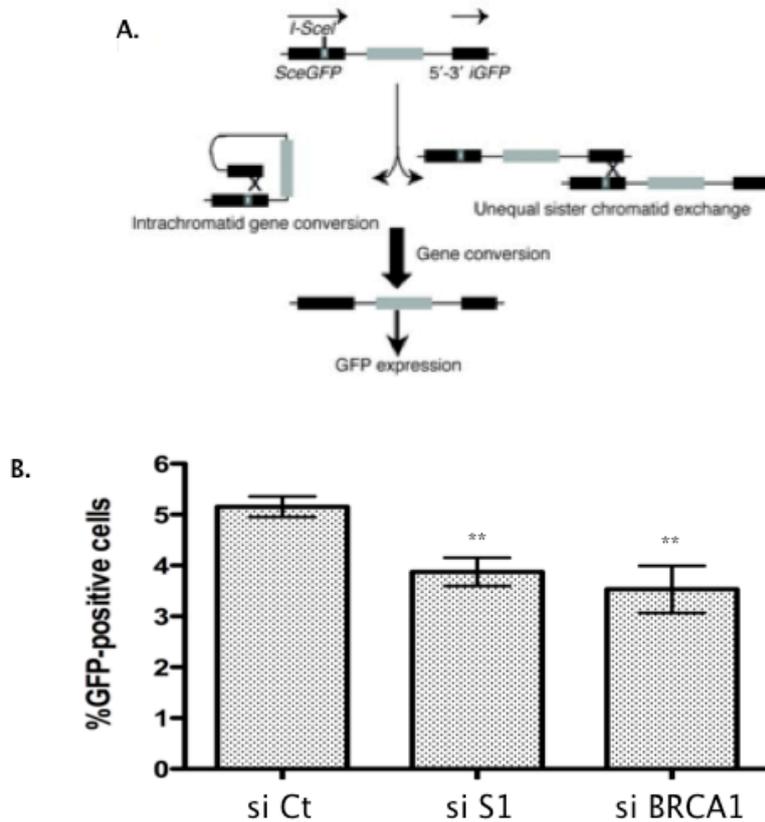
Au vu des précédents résultats, nous voulions analyser si la déplétion en SURVIVINE affectait la RH. Nous avons alors utilisé un test fonctionnel évaluant la capacité de la cellule à réparer par RH les cassures double-brin induites.

Nous avons utilisé la lignée cellulaire RG37 (fournie par B. Lopez IGR, Paris) (Laulier et al., 2011) (Dumay et al., 2006) modifiée génétiquement par l'insertion stable dans le génome d'une seule copie d'une construction permettant l'évaluation de la RH (Figure 31 A). Cette cassette génique possède un seul site de coupure de la nucléase, I-SceI, non présente chez les mammifères. L'enzyme I-SceI est exprimée par transfection plasmidique transitoire.

Après coupure par l'enzyme ce système peut par RH soit par un événement intra-chromatidien soit à l'aide de la chromatide sœur permettre de restaurer une séquence génétique complète, codante pour la GFP. La fluorescence de la GFP, détectée par cytométrie en flux indique une efficacité de la RH.

La déplétion en BRCA1 par siRNA dans la lignée RG37 est utilisée comme contrôle positif. En effet, la diminution de l'activité de la RH est observée (Figure 31 B). La déplétion en SURVIVINE par siRNA dans la lignée RG37 entraîne une diminution significative du pourcentage des cellules exprimant la GFP (Figure 31 B). La diminution du pourcentage de cellules exprimant la GFP est semblable sous déplétion en BRCA1 et de SURVIVINE.

La déplétion en SURVIVINE diminue la capacité des cellules à faire de la RH et ceci de manière aussi efficace que la déplétion en BRCA1, protéine actrice de cette voie de réparation.



**Figure 31 : La déplétion en SURVIVINE diminue l'activité de RH.**

A (d'après (Laulier et al., 2011)) Principe du système génique permettant d'évaluer l'activité de la RH. La lignée RG37 a été modifiée génétiquement afin d'insérer stablement dans son génome le système d'évaluation de la RH (A). Afin d'évaluer l'activité de la RH, les cellules sont transfectées avec un plasmide codant pour l'enzyme de restriction I-SceI dont le site de coupure se trouve uniquement dans l'insert SceGFP. Après coupure, si la RH est fonctionnelle, la GFP est exprimée et détectée par cytométrie en flux. B La lignée RG37 a été transfectée avec le plasmide codant pour I-SceI puis déplétée en SURVIVINE par ARN interférence (siSurv). Puis nous avons déterminé, par cytométrie en flux le pourcentage de cellules exprimant la GFP (% GFP-positive cells). La déplétion en BRCA1 (siBRCA1) nous a servi de contrôle positif. (n=6)

#### ***4. Corrélation de l'expression génique de BIRC5 avec celle de EME1, EXO1 et BLM dans les tumeurs primaires mammaires humaines***

L'utilisation de l'outil Breast Cancer Gene-Expression Miner v3.0 ([http://bcgenex.centregauducheau.fr/BC-GEM/GEM\\_Accueil.php?js=1](http://bcgenex.centregauducheau.fr/BC-GEM/GEM_Accueil.php?js=1)), regroupant des données transcriptomiques publiques de tumeurs primaires mammaires humaines, nous a permis d'étudier les valeurs pronostique du set de gènes RH et d'éventuelles corrélations avec *BIRC5*, gène codant pour la SURVIVINE.

La méta-analyse de des données transcriptomiques de 2413 patientes, utilisant la méthode Cox univariée, a permis de mettre en évidence, que l'expression de *BIRC5* est lié à

un mauvais pronostic avec une forte significativité (Figure 32). Les résultats sont représentés par la courbe Kaplan-Meier, et indiquent que les patientes présentant une forte expression de *BIRC5* ont un plus grand risque de rechute avec métastases que lorsque l'expression de *BIRC5* est plus faible. De manière intéressante nous observons également que les fortes expressions des gènes *RAD51*, *EME1*, *EXO1*, *BLM* et *BRCA1* sont liées à un mauvais pronostic et un risque plus important de rechute avec métastases. En revanche, l'expression de *MUS81* n'a pas de valeur pronostique, celle de *BRCA2* non plus (Figure 32).

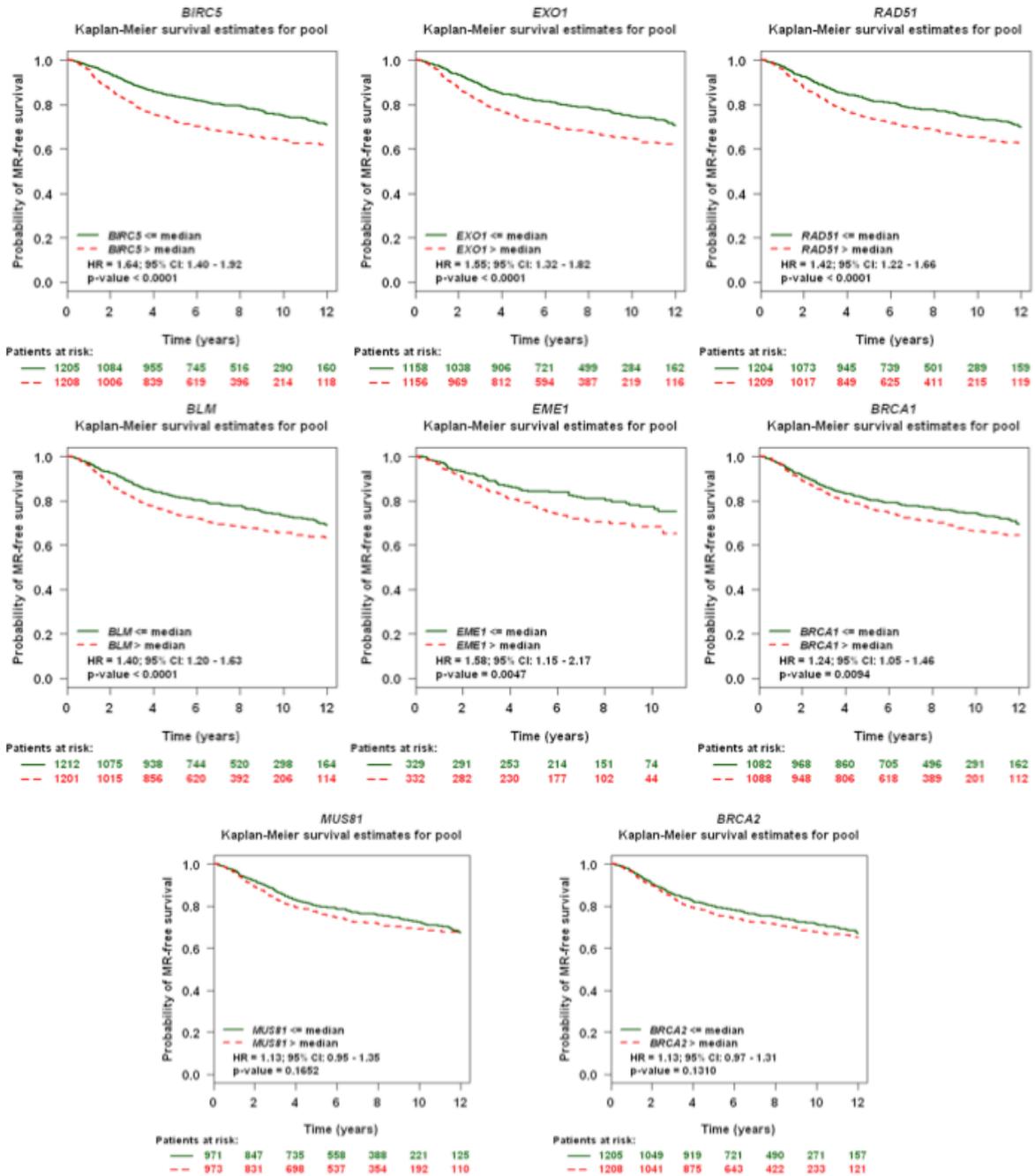


Figure 32 : Courbes de survie Kaplan Meier.

Pour chaque gènes du set RH, nous avons réalisé des méta-analyses des données transcriptomiques de tumeurs mammaires primaires à l'aide de l'outil d'analyse Breast Cancer Gene-Expression Miner v3.0 (Jezequel P. ICO, Nantes). Les courbes de survie Kaplan Meier obtenues représentent la probabilité de survie sans rechute métastatique en fonction du niveau d'expression des différents gènes et au cours du temps.

A partir des données transcriptomiques issues de toutes les patientes confondues, nous retrouvons une corrélation positive de *BIRC5*, gène codant pour la SURVIVINE avec les gènes *EME1*, *EXO1* et *BLM* (Figure 33). Ceci concorde avec les résultats obtenus dans les lignées cellulaires sous déplétion en SURVIVINE.

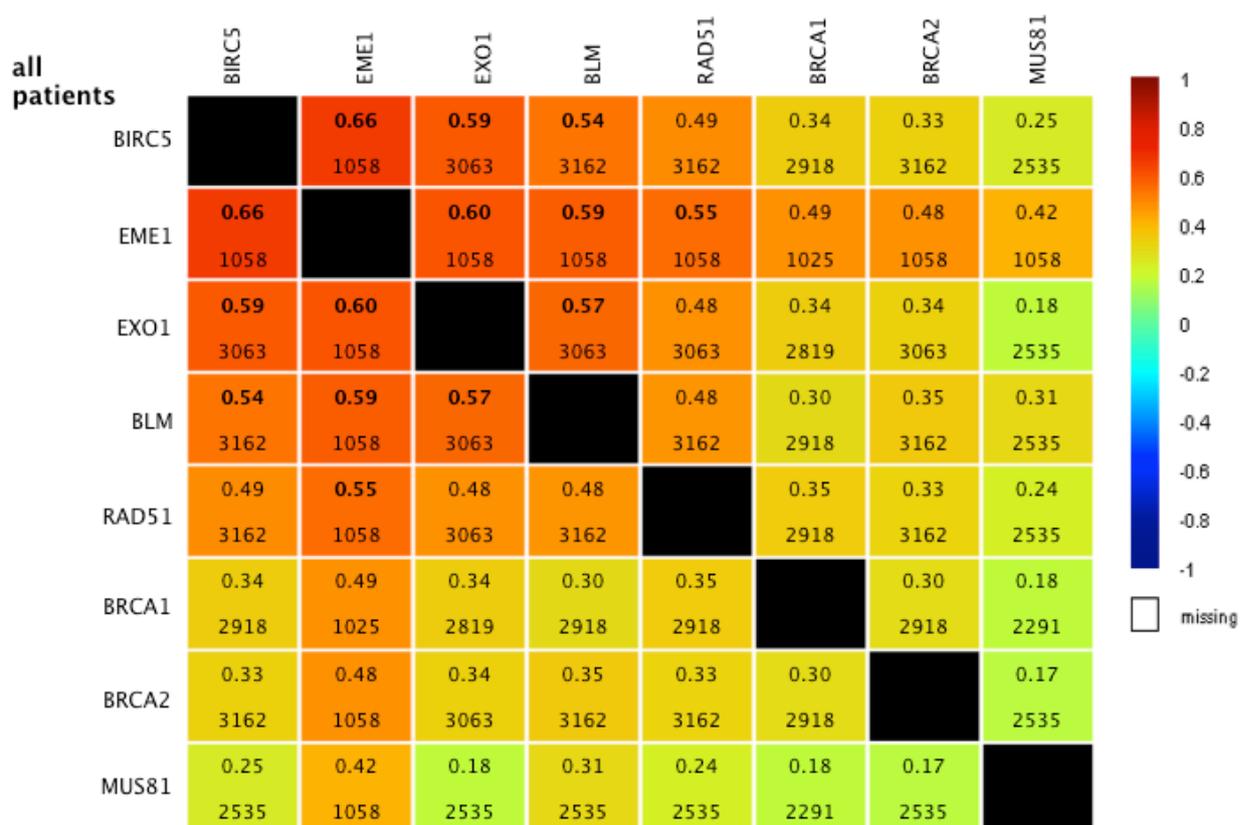
La corrélation positive de *BIRC5* avec *RAD51* est juste en dessous du seuil de significativité, placé à 0,5. Nous ne retrouvons pas de corrélation positive significative de *BIRC5* avec *BRCA1* et *BRCA2* (Figure 33).

Les gènes *BIRC5* et *MUS81* ne présentent aucune corrélation d'expression génique (Figure 33). Ceci est en accord avec nos données de qPCR obtenues dans les lignées cellulaires.

Nous observons en revanche une corrélation positive de *EME1* avec les gènes *EXO1*, *BLM* et *RAD51*. La corrélation positive de *EME1* avec *BRCA1* et *BRCA2* est proche de 0,5 (Figure 33). De plus, les expressions de *EME1* et de *MUS81* ne sont pas corrélées (Figure 33).

Ces données transcriptomiques sont en accord avec les données obtenues dans les lignées cellulaires. L'expression de *BIRC5* est associée et corrélée positivement à l'expression d'un cluster de gènes impliqués dans la RH dans les tumeurs primaires mammaires.

## Résultats



**Figure 33 : Corrélations de l'expression de *BIRC5* avec les expressions des gènes du set RH obtenues à partir des données transcriptomiques de tumeurs primaires mammaires humaines.**

Les données de corrélation géniques ont été obtenues à partir de l'outil d'analyse de données transcriptomiques de tumeurs mammaires primaires Breast Cancer Gene-Expression Miner v3.0 (Jezequel P. ICO, Nantes). Les corrélations obtenues sont issues des données transcriptomiques des tumeurs de toutes les patientes. Une échelle de couleur permet de visualiser les corrélations positives (Rouge) et négatives (Bleu). Pour chaque case, le premier chiffre correspond au coefficient de corrélation ( $r$ ) et le second au nombre de tumeurs analysées. Le seuil de significativité est fixé à  $r \geq 0,5$ . ( $p < 0,0001$ )

## **C. Quelles fonctions biologiques de la SURVIVINE peuvent être impliquées dans l'accumulation des dommages à l'ADN ?**

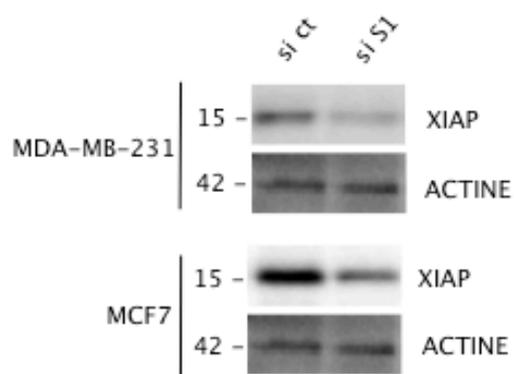
La SURVIVINE a à la fois une fonction dans la survie cellulaire et dans le cycle cellulaire. Nous voulions savoir si nous pouvions rattacher l'accumulation des dommages à l'ADN à l'une de ces fonctions biologiques exercées par la SURVIVINE

### ***1. Implication de la fonction de survie de la SURVIVINE dans l'augmentation des dommages à l'ADN***

Les protéines de la familles de IAP participent à la survie cellulaire soit par inhibition directe des CASPASES comme la protéine XIAP (sauf la SURVIVINE) (Dohi et al., 2004a) ou par inhibition de la nécroptose, indépendamment des CASPASES. La fonction de survie de la SURVIVINE est liée à la protéine XIAP. En effet son interaction avec la SURVIVINE permet sa stabilisation, en empêchant son ubiquitination et donc sa dégradation. XIAP peut alors inhiber directement l'activité des CASPASES 3 et 9.

Nous observons dans les lignées cellulaires MDA-MB-231 et MCF7 une diminution de la protéine XIAP par immunoblot sous déplétion en SURVIVINE (Figure 34). La déplétion en SURVIVINE ne diminue pas l'expression génique de XIAP (Figure 35). Cela confirme que la diminution protéique de XIAP obtenue sous déplétion en SURVIVINE est due à une stabilisation par interaction protéique. De plus des données du laboratoire ont montré que ces deux protéines pouvaient être co-immunoprécipitées.

## Résultats



**Figure 34 : La déplétion en SURVIVINE diminue l'expression de la protéine XIAP.**

Les lignées MDA-MB-231 et MCF7 ont été déplétées en SURVIVINE par ARN interférence. Après 48 heures de déplétion, les lysats protéiques totaux sont analysés par immunoblot afin de voir les modifications d'expression de la protéine XIAP. (n=3)

### a) Etude de l'expression du set de gènes RH sous déplétion en XIAP

Nous avons comparé l'effet de l'extinction de XIAP par rapport à celle de la SURVIVINE sur l'expression du set de gènes RH.

Nous avons pour chaque lignée cellulaire, comparé les ratios des quantités normalisées de chaque gène par rapport au siRNA contrôle, sous déplétion en SURVIVINE et sous déplétion en XIAP.

Le siRNA XIAP diminue efficacement l'ARNm de *XIAP* dans les trois lignées cellulaires et n'affecte pas l'expression de *BIRC5* (Figure 35).

La représentation des moyennes des ratios en Figure 35 pour les trois lignées cellulaires, permet de visualiser que la déplétion en XIAP ne modifie pas l'expression du set de gènes RH.

Nous pouvons donc conclure que la fonction de survie de la SURVIVINE via XIAP n'est pas responsable de la modification de l'expression du set de gènes RH affectée par la déplétion en SURVIVINE.

**A.**

**Cal51**

	EME1	EXO1	BLM	BRCA1	BRCA2	RAD51	MUS81	BIRC5	XIAP
si S1	0,40 ***	0,37 ***	0,54 **	0,41 ***	0,56 ***	0,45 ***	1,30 *	0,04 *	2,41 *
si XIAP	0,96 **	1,10 **	0,64	0,88 *	1,11 **	1,27 **	1,20 ***	0,94 ***	0,03 ***

**B.**

**MDA-MB-231**

	EME1	EXO1	BLM	BRCA1	BRCA2	RAD51	MUS81	BIRC5	XIAP
si S1	0,39 ***	0,37 **	0,39 *	0,40 ***	0,41 **	0,54 ***	0,79 ***	0,05	0,84 **
si XIAP	1,12 ***	0,95 ***	1,19	0,69	0,91 ***	1,09 ***	0,93 **	1,27 ***	0,03

**C.**

**MCF7**

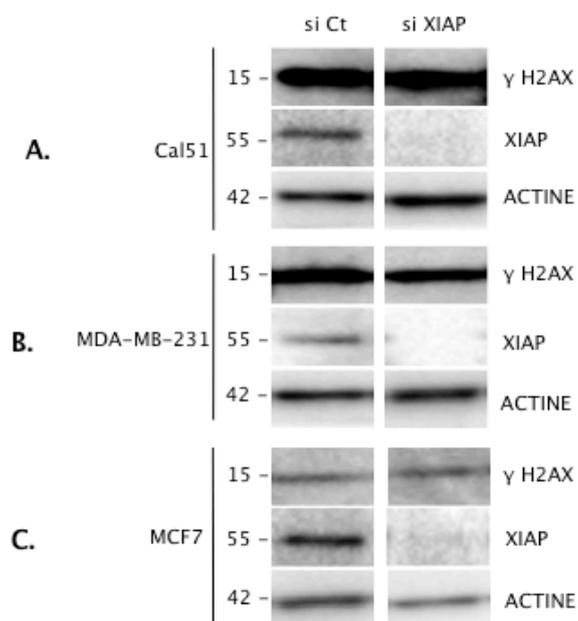
	EME1	EXO1	BLM	BRCA1	BRCA2	RAD51	MUS81	BIRC5	XIAP
si S1	0,55 ***	0,56 ***	0,49 *	0,55 **	0,55 ***	0,55 ***	0,95 ***	0,12 **	1,39 *
si XIAP	1,21 ***	1,18 ***	1,17	0,99	1,24 ***	1,28 ***	0,88 ***	1,13 ***	0,09 *

**Figure 35 : Expression du set de gènes RH sous déplétion en XIAP.**

A, B et C Les lignées Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 sont récupérées après 48 heures de transfection avec les siRNA ciblant la SURVIVINE ou XIAP. Après rétrotranscription des ARN messagers, les ADNc obtenus sont analysés en qPCR ciblant les gènes indiqués. Le tableau présente la moyenne des ratios des quantités normalisées obtenues sous déplétion en SURVIVINE ou de XIAP par rapport aux quantités normalisées obtenues après transfection du siRNA Ct pour chaque gène. Un dégradé de couleur permet de mettre en évidence les diminutions (vert) ou augmentations (rouge) de l'expression des gènes. Le coefficient de variation (Cv) des moyennes des ratios est indiqué par les \*; \*\*\* si Cv<0,25, \*\* si Cv<0,35, \* si Cv<0,5 et la case est blanche si Cv> 0,5. (n=3)

Nous avons évalué la modification de phosphorylation de  $\gamma$ -H2AX sous déplétion en XIAP. L'immunoblot (Figure 36) ne montre pas d'augmentation de  $\gamma$ -H2AX sous déplétion en XIAP. La déplétion en XIAP n'augmente pas les dommages à l'ADN endogènes.

L'accumulation des dommages à l'ADN induits par la déplétion en SURVIVINE est indépendante de sa fonction de survie via la stabilisation de XIAP.



**Figure 36 : La déplétion en XIAP n'induit pas de dommage à l'ADN.**

A, B et C Les lignées cellulaires Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 ont été transfectées avec un siRNA ciblant l'ARNm de XIAP. Après 48 heures de déplétion en XIAP, les lysats cellulaires totaux ont été analysés par immunoblot afin de comparer la phosphorylation de  $\gamma$ -H2AX et l'expression de XIAP. (n=3)

*b) Effet de la déplétion en SURVIVINE sur la survenue de mort cellulaire*

La mort cellulaire des lignées est analysée à l'aide du marquage Annexin V-IP, après 2 à 7 jours de transfection de siRNA ciblant la SURVIVINE.

Les cellules analysées après 2 à 4 jours de transfection ne subissent qu'une transfection de siRNA. Les cellules analysées après 5 à 7 jours subissent 2 transfactions pour maintenir l'extinction de la protéine. Les cellules sont transfectées à J0 puis à J3 et récupérées de J5 à J7.

A 2 jours après transfection de siRNA S1, temps auquel  $\gamma$ -H2AX est évalué, nous n'observons pas d'augmentation du pourcentage des cellules apoptotiques par rapport au siRNA Ct sauf dans la lignée Cal51 (Figure 37).

Dans la lignée MDA-MB-231, nous n'observons pas d'augmentation de mort cellulaire sous déplétion en SURVIVINE entre 2 à 5 jours après transfection. Il faut attendre 6 jours après la première transfection de siRNA pour avoir une très légère augmentation du pourcentage de cellules apoptotiques comparé aux cellules contrôles (Figure 37 C et D). En revanche, après 7 jours de déplétion en SURVIVINE, une crise apoptotique dépendante des

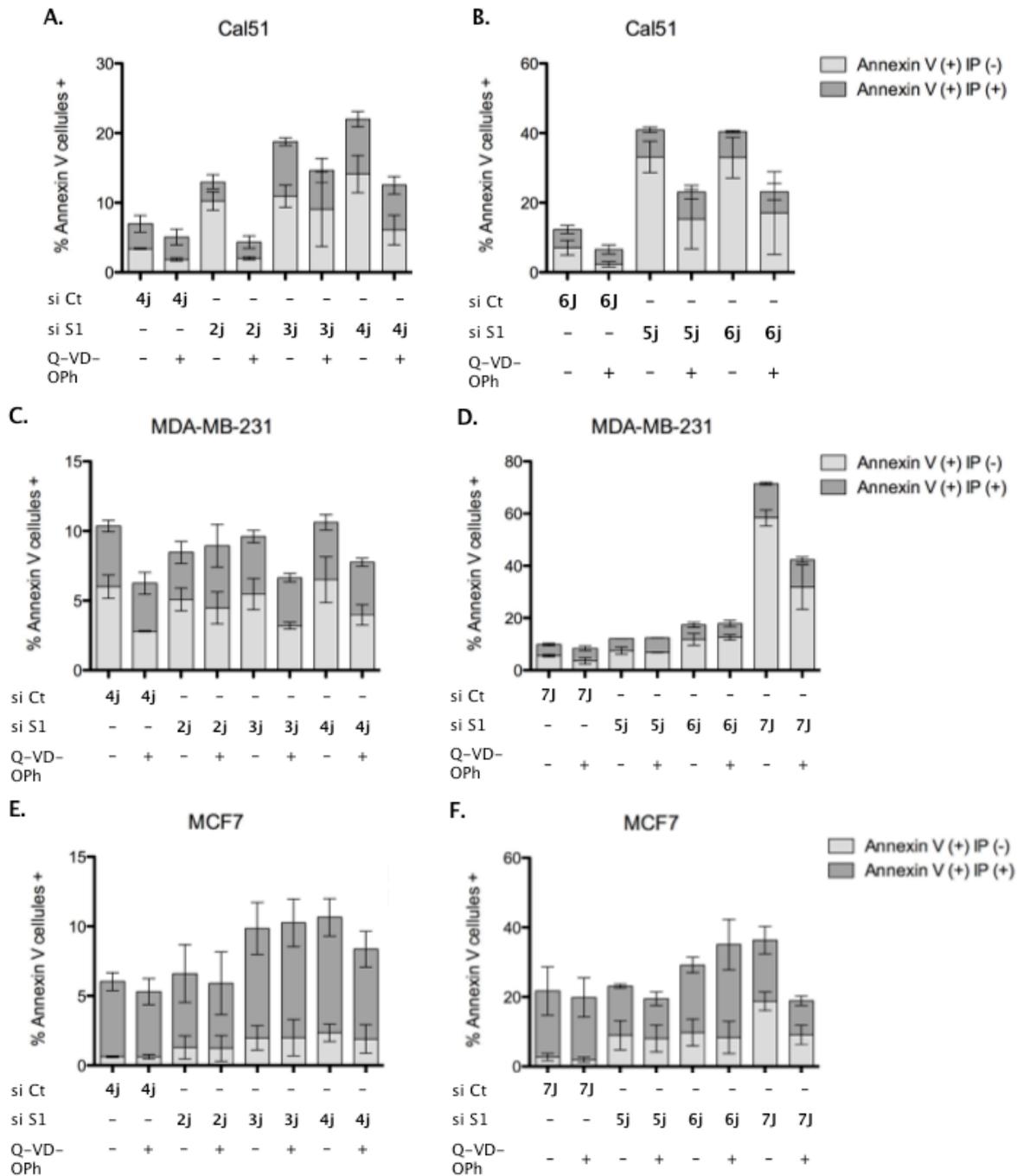
CASPASES apparait. En effet, le pourcentage de cellules apoptotiques augmente à plus de 70% et est diminué à 40% par l'utilisation du Q-VD-OPh (Figure 37 D). La mort cellulaire est aussi partiellement dépendante des CASPASES.

Dans la lignée MCF7, nous observons un pourcentage de cellules Annexin V-IP positives qui devient significatif dans les conditions prolongées d'extinction. Ce pourcentage varie très peu entre la condition contrôle et les conditions de déplétion en SURVIVINE, essentiellement dans les conditions prolongées d'extinction (Figure 37 E et F). Ceci est dû aux conditions de culture prolongées. Si nous comparons les pourcentages de cellules Annexin V positives, IP négatives, nous observons une augmentation très modérée de ce pourcentage après 2 à 4 jours de transfection. Ce pourcentage atteint 10% après 5 jours transfection et se maintient à 6 jours. Après 7 jours de déplétion, le pourcentage de cellules apoptotiques arrive à 18% environ et est diminué de moitié par le Q-VD-OPh (Figure 37 F). La mort cellulaire déclenchée par la déplétion en SURVIVINE est faible et partiellement dépendante des CASPASES lorsqu'elle est plus importante à 7 jours.

Dans la lignée Cal51, cette mort déclenchée est inhibée par un inhibiteur de l'activité des CASPASES, le Q-VD-OPh (Figure 37 A). Dans cette lignée, le pourcentage de cellules apoptotiques s'accumule progressivement au cours du temps de déplétion. Le pourcentage de cellules apoptotiques d'environ 20% à 4 jours augmente à 40% à 5 - 6 jours après transfection (Figure 37 A et B). La mort cellulaire observée est partiellement dépendante des CASPASES puisqu'elle est diminuée de moitié par le Q-VD-OPh de 4 à 6 jours après transfection (Figure 37 A et B).

La déplétion en SURVIVINE déclenche une crise apoptotique tardive après une extinction de 6 à 7 jours. Les lignées cellulaires sont plus ou moins sensibles à la déplétion en SURVIVINE. La lignée Cal51 est la plus sensible. La lignée MDA-MB-231 requiert une extinction prolongée pour voir apparaître une augmentation de l'apoptose. Quant à la lignée MCF7, même si la déplétion de 7 jours de la SURVIVINE induit de l'apoptose celle-ci reste dans des proportions très faibles en comparaison aux autres lignées. Cette lignée est déficiente pour la CASPASE 3, ce qui peut expliquer sa plus grande résistance.

L'apoptose tardive déclenchée par la déplétion en SURVIVINE est partiellement dépendante de l'activité des CASPASES.



**Figure 37 : La déplétion en SURVIVINE induit une mort cellulaire tardive partiellement dépendante des CASPASES.**

A, B et C Les lignées Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 ont été transfectées par siRNA ciblant la SURVIVINE. Pour les conditions d'extinction de 2 à 4 jours, les lignées cellulaires sont transfectées à J0 et récupérées de J2 à J4. En revanche, pour les conditions d'extinction de 7 à 5 jours deux transfections sont réalisées afin de maintenir une extinction correcte de la SURVIVINE. Les cellules sont transfectées à J0 une première fois puis à J3 et récupérées de J5 à J7. Les cellules sont aussi traitées avec un inhibiteur pan-CASPASES, le Q-VD-Oph (10 $\mu$ M), une seule fois pour les conditions de 2 à 4 jours, le jour de la transfection. Pour les conditions de 5 à 7 jours, nous réalisons deux fois le traitement avec le Q-VD-Oph, les mêmes jours que les transfections. Les cellules sont ensuite marquées avec l'Annexin V et l'IP. La lecture de la fluorescence de ces deux marqueurs par cytométrie en flux permet de déterminer le pourcentage de cellules mortes. (n=3)

c) *Effet de la déplétion en SURVIVINE sur l'activité des CASPASES*

Nous avons déterminé l'activité des CASPASES qui peut être associée à la déplétion en SURVIVINE.

Nous avons analysé l'activation des CASPASES 3 et 7 à l'aide du kit Caspase-Glo 3/7 Assay après 2 jours de transfections de siRNA. Les résultats représentent les ratios d'activité des CASPASES après traitement ou transfection de siRNA S1 par rapport à leur activité dans la condition contrôle, non traitée ou siRNA Ct.

La Staurosporine est un alcaloïde dérivé de *Streptomyces sp.* Cette molécule est un inhibiteur de nombreuses kinases (PKC, PKA, ...) via son interaction avec les sites de liaison à l'ATP. La Staurosporine est un inducteur de l'apoptose via l'activation des CASPASES, principalement la CASPASE 3. Nous l'avons donc utilisée comme contrôle positif d'induction d'activité des CASPASES. Dans la lignée Cal51, la staurosporine augmente d'environ 8 fois l'activité des CASPASES 3 et 7 (Figure 38 A).

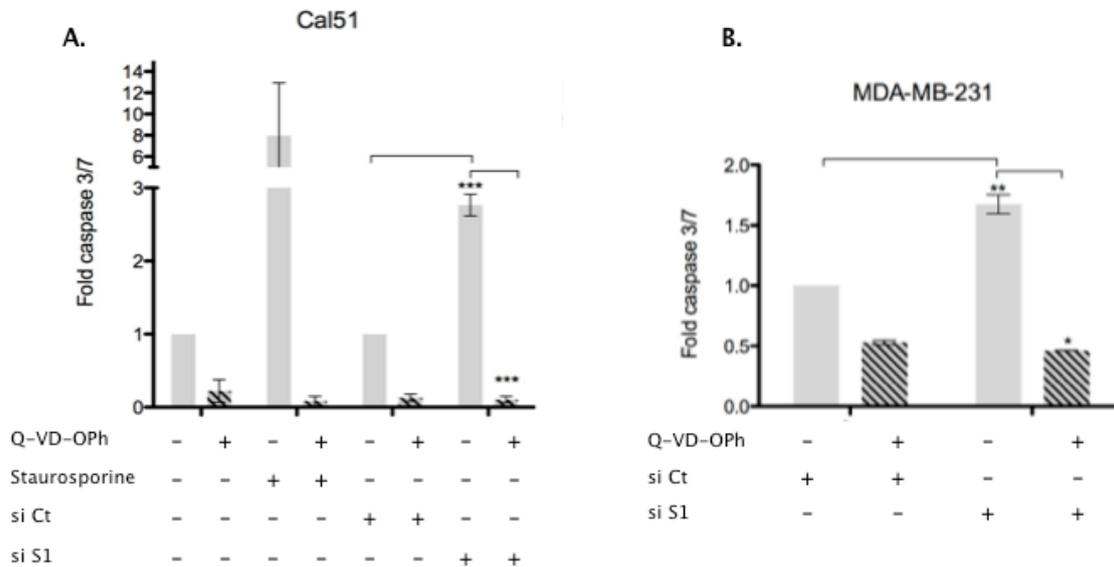
La déplétion en SURVIVINE augmente aussi cette activité mais seulement d'un facteur 3 dans la lignée Cal51 et d'un facteur 1,5 dans la lignée MDA-MB-231 (Figure 38 A et B respectivement). L'inhibiteur pan-CASPASES, le Q-VD-OPh diminue efficacement l'activité des CASPASES sous déplétion en SURVIVINE ou après traitement Staurosporine. Nous remarquons que les CASPASES ont une activité basale qui peut être diminuée dans les conditions contrôles par le Q-VD-OPh (Figure 38).

La lignée Cal51 est la plus sensible à la mort cellulaire partiellement dépendante des CASPASES induite par la déplétion en SURVIVINE et c'est la lignée qui fait apparaître la plus forte activité CASPASE 3 et 7.

Dans la lignée MDA-MB-231, l'activité CASPASE détectée après 2 jours de transfection de siRNA S1 est sub létale, puisque nous n'observons pas de mort cellulaire dans cette lignée après une courte période de déplétion.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activité CASPASES dans la lignée MCF7 avec ce kit, même après traitement Staurosporine. Cette lignée est déficiente en CASPASE 3, mais nous ne détectons pas d'activité de la CASPASE 7.

La déplétion en SURVIVINE de 2 jours induit une activation modérée et sublétales dans la lignée MDA-MB-231 des CASPASES 3 et 7 qui est inhibée par le Q-VD-OPh.



**Figure 38 : La déplétion en SURVIVINE induit une activité modérée des CASPASES 3 et 7.**

A et B Les lignées Cal51 et MDA-MB-231 ont été déplétées en SURVIVINE par transfection de siRNA, puis traitées avec un inhibiteur pan-CASPASES, le Q-VD-OPh (10µM). A La lignée Cal51 a été prétraitée avec le Q-VD-OPh (10µM) puis traitée avec un activateur des CASPASES, la Staurosporine (1µg/mL). Après 48 heures de transfections ou de traitement, l'activité des CASPASES 3 et 7 a été évaluée à l'aide du kit Caspase-Glo 3/7 Assay par lecture de la luminescence émise lors de la dégradation du substrat par les CASPASES actives. Les histogrammes représentent les ratios de luminescence émise (Fold CASPASE 3/7) dans les différentes conditions par rapport à la condition contrôle. (n=3)

*d) Contribution de l'activité des CASPASES l'accumulation des dommages à l'ADN*

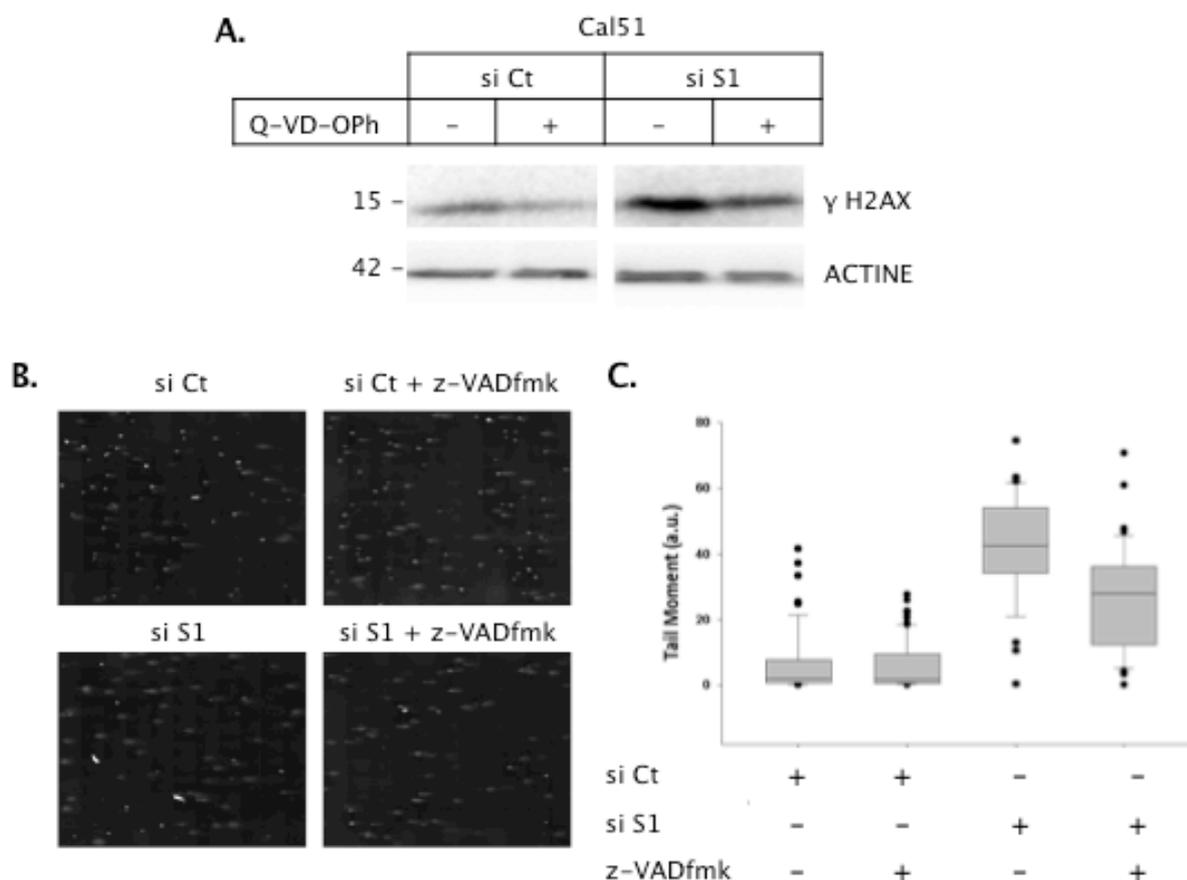
L'activation des CASPASES est une des causes possibles de l'augmentation des dommages à l'ADN. En effet les CASPASES peuvent dégrader, par leur activité de protéase, iCAD, protéine inhibitrice de la CAD. Ainsi libérée, cette DNase peut fragmenter l'ADN. La déplétion en SURVIVINE induit une augmentation de l'activité des CASPASES et une induction de l'apoptose dans la lignée Cal51, pour laquelle nous avons évalué si les CASPASES pouvaient être impliquées dans l'accumulation des dommages à l'ADN.

Nous avons évalué γ-H2AX par immunoblot dans la lignée Cal51 après déplétion en SURVIVINE et traitement avec un inhibiteur pan-CASPASES, le Q-VD-OPh (Figure 39 A). Après transfection avec le siRNA Contrôle (si Ct) et un traitement avec le Q-VD-OPh, le niveau de γ-H2AX est légèrement diminué. Ceci peut correspondre au faible pourcentage de

cellules mortes en culture. La déplétion en SURVIVINE fait apparaître un fort niveau de phosphorylation de H2AX. Celui-ci est légèrement diminué après traitement au Q-VD-Oph. Mais le niveau de  $\gamma$ -H2AX obtenu sous déplétion en SURVIVINE et inhibition de CASPASES reste supérieur au niveau basal après transfection du siRNA contrôle.

La lignée MDA-MB-231 présentant également une activation des CASPASES en déplétion en SURVIVINE, cependant sublétales, nous avons réalisé des essais comètes en présence ou non d'un inhibiteur pan-CASPASES, le z-VADfmk. Les images d'électrophorèse des essais comètes (Figure 39 B) sont quantifiées à l'aide du logiciel Comet Assay IV pour déterminer le paramètre Tail Moment de chaque noyau représenté en Figure 39 C, afin d'évaluer les cassures double-brin. La déplétion en SURVIVINE augmente les dommages à l'ADN. Le z-VADfmk diminue légèrement la taille des comètes (Tail Moment), mais en restant toujours supérieur au niveau basal.

La faible activation des CASPASES apparaissant sous déplétion en SURVIVINE n'est que partiellement responsable de l'accumulation des dommages à l'ADN. Les CASPASES ne jouent qu'un rôle mineur dans l'accumulation des dommages à l'ADN.



**Figure 39 : Les dommages à l'ADN observés sous déplétion en SURVIVINE ne sont que partiellement dépendant de l'activité CASPASES.**

A et B La lignée MDA-MB-231 a été transfectée par siRNA contrôle (si Ct) ou siRNA SURVIVINE (si SURVIVINE) et traitées par un inhibiteurs pan-CASPASES, le z-VADfmk (20 $\mu$ M). Des essais comètes ont été réalisés après 48 heures de déplétion et de traitement, en condition non alcaline. B La quantification du niveau de dommage à l'ADN est représenté par le Tail Moment après analyse des gels d'électrophorèse. C La lignée Cal51 a été déplétée en SURVIVINE pendant 48 heures par ARN interférence et traitée avec du Q-VD-OPh (10 $\mu$ M). Les lysats protéiques totaux ont été analysés en immunoblot afin d'observer les modifications de phosphorylation de H2AX sur le Sérine 139. (A : n=2, B n=2, 10<sup>4</sup> cellules analysées par expériences)

## 2. Implication de la fonction de la SURVIVINE sur le cycle dans la variation d'expression du set de gènes RH et dans l'accumulation des dommages

La SURVIVINE a un rôle très important dans la régulation du cycle cellulaire. Elle fait partie d'un complexe protéique, le CPC dont fait également partie la kinase AURORAB. Ce complexe CPC permet lors de la mitose, une ségrégation correcte des chromatides sœurs et régule également la cytokinèse, en contrôlant les points de contrôle de l'abscission (Carmena et al., 2012b).

Le CPC et plus particulièrement AURORAB régule la ségrégation correcte des chromatides en contrôlant le bon attachement des microtubules sur les kinétochores grâce à sa fonction de senseur de la tension sur les deux chromatides. Si ces conditions sont incorrectes, le CPC, via AURORAB va amplifier l'activation du point de contrôle mitotique le SAC, empêchant la poursuite de la mitose (Terada, 2001). Le SAC régule l'activation de l'ubiquitine ligase APC/C séquestrant son co-activateur, CDC20. Une fois le SAC inactif, CDC20 est libéré et peut par interaction avec APC/C l'activer, lui permettant d'ubiquitiner tout d'abord la Sécurine, qui par dégradation va libérer la Séparase. Cette dernière va dégrader la Cohésine qui retient les deux chromatides sœurs attachées et permettre leur ségrégation. L'APC/C activé par CDC20 permet aussi l'ubiquitination de la CYCLINE B entraînant sa dégradation qui permet la sortie de la mitose par diminution de l'activité de CDK1, dont elle est le co-activateur (Musacchio and Salmon, 2007) (Figure 18).

*a) Effets de la déplétion en AURORAB ou en CDC20 sur l'expression du set de gènes RH*

Afin de savoir si la perturbation du cycle cellulaire pouvait être la cause de la modification de l'expression du set de gènes RH retrouvée sous déplétion en SURVIVINE nous avons comparé les résultats de qPCR pour le set de gènes RH retenus, obtenus sous déplétion en SURVIVINE à ceux obtenus sous déplétion en AURORAB ou CDC20.

La protéine AURORAB fait partie du CPC, et la protéine CDC20 est nécessaire à la levée du point de contrôle mitotique, le SAC.

Les moyennes des ratios des quantités normalisées de chaque gène obtenues sous déplétion en SURVIVINE, en AURORAB ou en CDC20, par rapport au siRNA contrôle sont représentées en Figure 40.

Les données de qPCR sous déplétion en SURVIVINE illustrées ici ne sont pas issues de la même expérience celles de la Figure 28. Nous avons réalisé en tout 6 fois cette expérience nous donnant toujours les mêmes résultats de modification génique.

Nous confirmons l'efficacité du siRNA ciblant CDC20 par diminution de l'expression de son ARNm dans les 3 lignées cellulaires. La déplétion en CDC20 diminue l'expression de peu de gènes du set RH. La déplétion en CDC20 n'engendre pas les mêmes variations

d'expression du set de gènes RH que la déplétion en SURVIVINE dans les lignées Cal51 et MDA-MB-231 (Figure 40 A et B respectivement). Nous observons tout de même une diminution de l'expression du gène BRCA1 dans les lignées Cal51 et MCF7 (Figure 40 A et C). Nous observons également la diminution de l'expression du gène *EXO1* dans la lignée MDA-MB-231 et de *BLM* dans la lignée MCF7. De plus la déplétion en CDC20 entraîne un blocage en mitose, phase pendant laquelle la transcription est très réduite, qui peut expliquer les diminutions d'ARNm observées. La déplétion en CDC20 augmente faiblement l'ARNm de la SURVIVINE (*BIRC5*) mais nous observons une augmentation de l'expression protéique (Figure 41). Sous déplétion en CDC20 et arrêt en mitose, la protéine SURVIVINE est stabilisée.

Nous confirmons l'efficacité du siRNA ciblant AURORAB par diminution de l'expression de son ARNm dans les 3 lignées cellulaires. La déplétion en AURORAB affecte l'expression des gènes *BRCA1* et *RAD51* comme la déplétion en SURVIVINE dans la lignée Cal51 (Figure 40 A). Dans la lignée MDA-MB-231, les gènes *BLM* et *BRCA2* sont affectés dans la même mesure sous déplétion en AURORAB et de la SURVIVINE. L'expression du gène *EXO1* est plus diminuée sous déplétion en AURORAB (Figure 40 B). Enfin dans la lignée MCF7, seule l'expression du gène *BLM* est diminuée sous déplétion en AURORAB (Figure 40 C). Mais la déplétion en AURORAB diminue également l'expression génique (Figure 40) et protéique (Figure 41) de la SURVIVINE, même si cette diminution est légèrement moins marquée que sous ARN interférence ciblant la SURVIVINE. La déplétion en AURORAB altère l'expression de 3 à 4 gènes régulés par la SURVIVINE dans les lignées Cal51 et MDA-MB-231 et d'un seul dans la lignée MCF7 (Figure 40).

La déplétion en AURORAB mime partiellement l'effet la déplétion en SURVIVINE sur l'expression du set de gènes RH. Cependant nous ne pouvons pas conclure si ces effets observés sont vraiment spécifiques de la déplétion en AURORAB puisque celle-ci diminue également l'expression de la SURVIVINE.

**A.**

**Cal51**

	EME1	EXO1	BLM	BRCA1	BRCA2	RAD51	MUS81	BIRC5	CDC20	AURKB
si S1	0,40 ***	0,37 ***	0,54 **	0,41 ***	0,56 ***	0,45 ***	1,30 *	0,04 *	0,43 ***	0,53 ***
si Aurora B	0,61 **	0,65 ***	0,82 **	0,42 **	0,65 ***	0,47 **	1,55 ***	0,57 *	0,70 ***	0,21 ***
si CDC20	0,74 *	0,61 ***	0,82	0,41 **	0,78 ***	1,10 ***	1,18 **	1,44 ***	0,09 **	1,01 *

**B.**

**MDA-MB-231**

	EME1	EXO1	BLM	BRCA1	BRCA2	RAD51	MUS81	BIRC5	CDC20	AURKB
si S1	0,39 ***	0,37 **	0,39 *	0,40 ***	0,41 **	0,54 ***	0,79 ***	0,05	0,60 **	0,38 *
si Aurora B	0,70 ***	0,29 ***	0,49 *	0,82 ***	0,42 ***	0,73 ***	0,66 ***	0,66	0,44 ***	0,10 **
si CDC20	1,51 ***	0,41 **	0,56 ***	0,84 **	0,81 ***	0,94 ***	0,99 ***	1,94 *	0,09 *	1,29 *

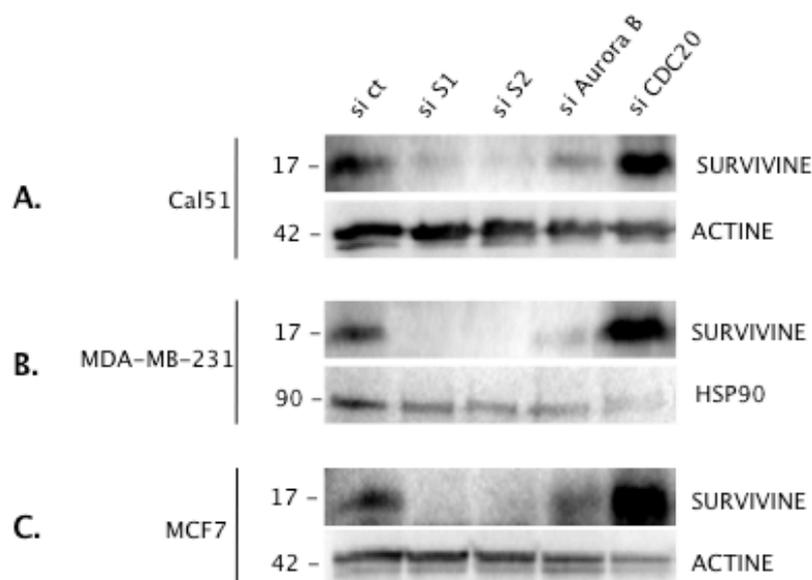
**C.**

**MCF7**

	EME1	EXO1	BLM	BRCA1	BRCA2	RAD51	MUS81	BIRC5	CDC20	AURKB
si S1	0,55 ***	0,56 ***	0,49 *	0,55 **	0,55 **	0,55 ***	0,95 ***	0,12 **	0,50 **	0,37 ***
si Aurora B	0,70 ***	0,76 ***	0,53 **	0,85 ***	1,21 ***	0,68 ***	1,11 ***	0,51 **	0,78 *	0,18 ***
si CDC20	1,15 ***	0,66 ***	0,45 ***	0,49 ***	0,65 ***	0,89 ***	1,14 ***	1,23 ***	0,19 **	0,77 **

**Figure 40 : Expression du set de gènes RH après déplétion en AURORAB ou CDC20.**

A, B et C Les lignées Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 sont récupérées après 48 heures de transfection avec les siRNA ciblant la SURVIVINE, AURORAB ou CDC20. Après rétrotranscription des ARN messagers, les ADNc obtenus sont analysés en qPCR ciblant les gènes indiqués. Le tableau présente la moyenne des ratios des quantités normalisées obtenues sous déplétion en SURVIVINE, en AURORAB ou en CDC20 par rapport aux quantités normalisées obtenues après transfection du siRNA Ct pour chaque gène. Un dégradé de couleur permet de mettre en évidence les diminutions (vert) ou augmentations (rouge) de l'expression des gènes. Le coefficient de variation (Cv) des moyennes des ratios est indiqué par les \*; \*\*\* si  $Cv < 0,25$ , \*\* si  $Cv < 0,35$ , \* si  $Cv < 0,5$  et la case est blanche si  $Cv > 0,5$ . (n=3)



**Figure 41 : La déplétion en AURORAB diminue l'expression de la SURVIVINE contrairement à la déplétion en CDC20 qui l'augmente.**

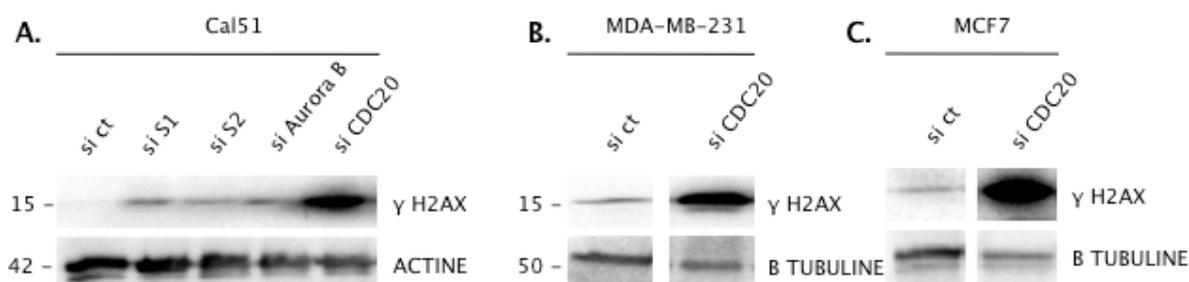
A, B et C Les lignée Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 sont déplétées pendant 48 heures en SURVIVINE, AURORAB ou CDC20, par siRNA. Les lysats cellulaires totaux sont analysés en immunoblot afin d'observer les modifications d'expression de la SURVIVINE. (n=3)

*b) Effets de la déplétion en AURORAB ou CDC20 sur l'apparition des dommages à l'ADN*

Nous avons évalué les niveaux de dommages à l'ADN sous déplétion en CDC20. La déplétion en CDC20 induit un blocage mitotique en prométaphase des cellules. En effet le SAC reste actif empêchant la progression de la mitose. De plus morphologiquement les cellules deviennent non adhérentes et rondes (Figure 44). La déplétion en CDC20 augmente fortement l'expression de  $\gamma$ -H2AX dans les trois lignées cellulaires (Figure 42). Nous pouvons conclure que le stress mitotique déclenché par le blocage de la mitose induit des dommages à l'ADN.

L'immunoblot réalisé après déplétion en AURORAB sur la lignée Cal51 présente une augmentation de  $\gamma$ -H2AX comme la déplétion en SURVIVINE (si S1 et 2) (Figure 42 A). Cet effet est faible et n'a été observé qu'une seule fois. De plus des données préliminaires en essai comètes réalisées sur la lignée MDA-MB-231, montrait aussi cette augmentation de cassures double-brin de l'ADN après 48 heures de transfection de siRNA ciblant AURORAB. Il semble donc que la déplétion en AURORAB est aussi génotoxique pour la cellule. On ne peut

cependant pas dire si cet effet est direct ou passe par la diminution de l'expression de la SURVIVINE.



**Figure 42 : La déplétion en AURORAB ou CDC20 induit une augmentation des dommages à l'ADN.**

A La lignée Cal51 est déplétée en SURVIVINE (si S1 et si S2) ou en AURORAB (si AURORAB) ou en CDC20 (si CDC20) pendant 48 heures. B et C Les lignées MDA-MB-231 et MCF7 sont déplétées en CDC20 (si CDC20) pendant 48 heures. A, B et C Les lysats cellulaires totaux sont analysés en immunoblot afin d'observer les modifications de phosphorylation de  $\gamma$ -H2AX. (si CDC20 n=3; si AURORAB n=1)

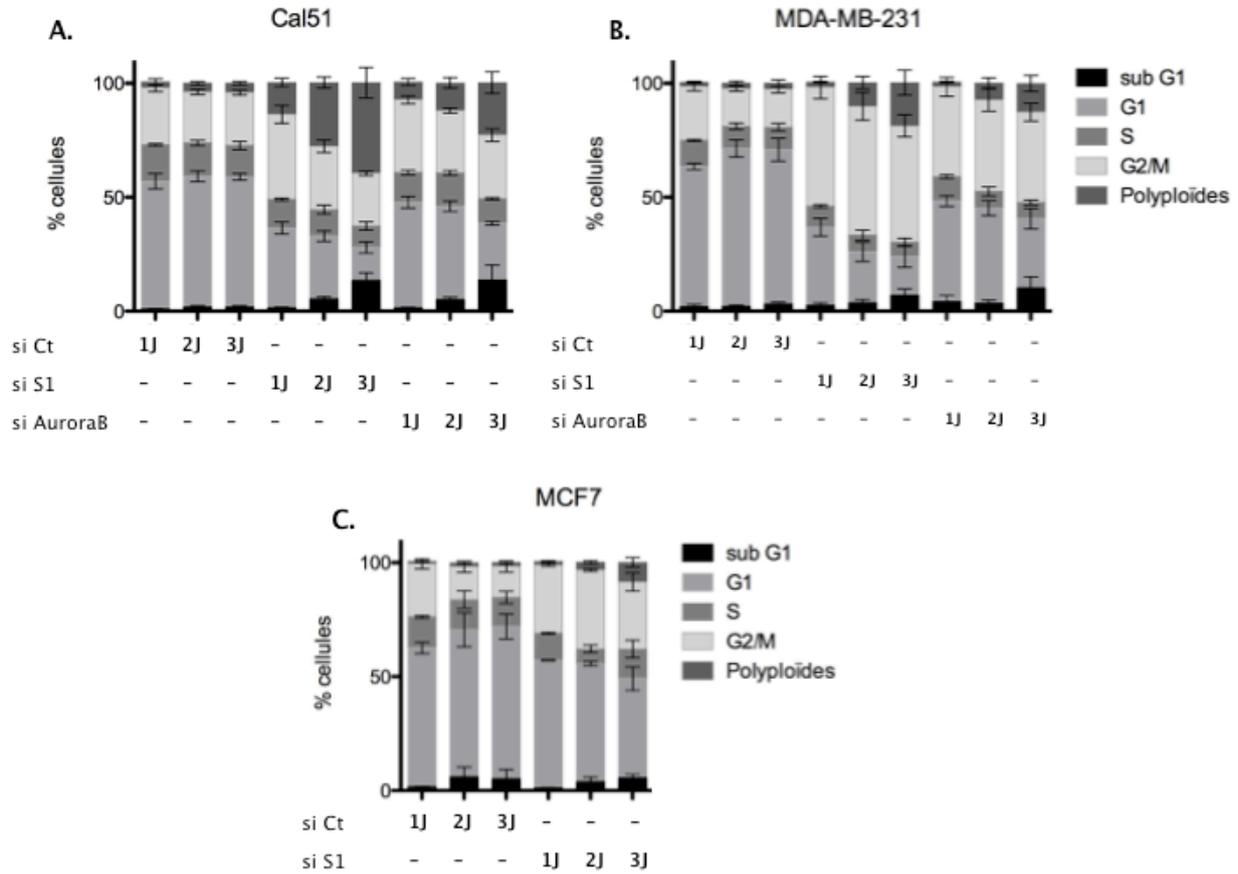
### c) Effets sur le cycle cellulaire de la déplétion en SURVIVINE ou en AURORAB

Nous avons étudié l'effet de la déplétion en SURVIVINE ou en AURORAB sur le cycle cellulaire.

La déplétion en SURVIVINE induit un blocage des cellules en G2/M (Figure 43) et une apparition de cellules polyploïdes. Selon les lignées cellulaires, le pourcentage de cellules tétraploïdes et polyploïdes varie et apparaît plus ou moins précocement. En effet dans la lignée Cal51, les cellules polyploïdes apparaissent très précocement et s'accumulent au cours du temps de déplétion de manière plus intense que dans les deux autres lignées. Dans la lignée MDA-MB-231, la proportion de cellules tétraploïdes et polyploïdes est plus importante que dans la lignée MCF7. L'apparition de cellules sub-G1 dans la lignée Cal51 concorde avec l'apparition de l'apoptose. L'effet de la déplétion en SURVIVINE sur le cycle cellulaire est plus important sur la lignée Cal51, puis sur la lignée MDA-MB-231 et moins sur la lignée MCF7. Il se peut que l'activation de la voie p53 et des points de contrôle de la tétraploïdie et polyploïdie soit plus ou moins efficace selon le fond génétique des lignées cellulaires. Cette différence de sensibilité est aussi retrouvée dans l'induction de mort cellulaire.

Bien que les effets de la déplétion en AURORAB soient semblables à ceux observés sous déplétion en SURVIVINE, nous pouvons remarquer qu'ils sont quand même moins

importants. En effet nous observons que l'augmentation du pourcentage de cellules tétraploïdes et polyploïdes est moins importante sous déplétion en AURORAB que sous déplétion en SURVIVINE. L'efficacité de l'extinction de la protéine AURORAB est peut être moins bonne et demanderait à être étudiée.



**Figure 43 : La déplétion en SURVIVINE ou en AURORAB induit un blocage des cellules en G2/M et une augmentation des cellules polyploïdes.**

A, B et C Les lignées Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 sont déplétées en SURVIVINE ou AURORAB par ARN interférence de 1 à 3 jours. L'ADN des cellules après fixation et perméabilisation est marqué au Iodure de propidium, agent intercalant. La fluorescence du Iodure de propidium une fois intercalé dans l'ADN est détectée par Cytométrie en flux. Les histogrammes représentent le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire. (n=3)

*d) Analyses complémentaires de la perturbation du cycle cellulaire sous déplétion en SURVIVINE, en AURORAB ou CDC20*

Sous déplétion en CDC20, la morphologie des cellules est radicalement différente de celle observées sous déplétion en SURVIVINE ou en AURORAB. En effet les cellules deviennent rondes et non adhérentes (Figure 44). De plus nous observons une accumulation de la CYCLINE B, comme attendu lors d'un blocage du cycle cellulaire en prométaphase de mitose.

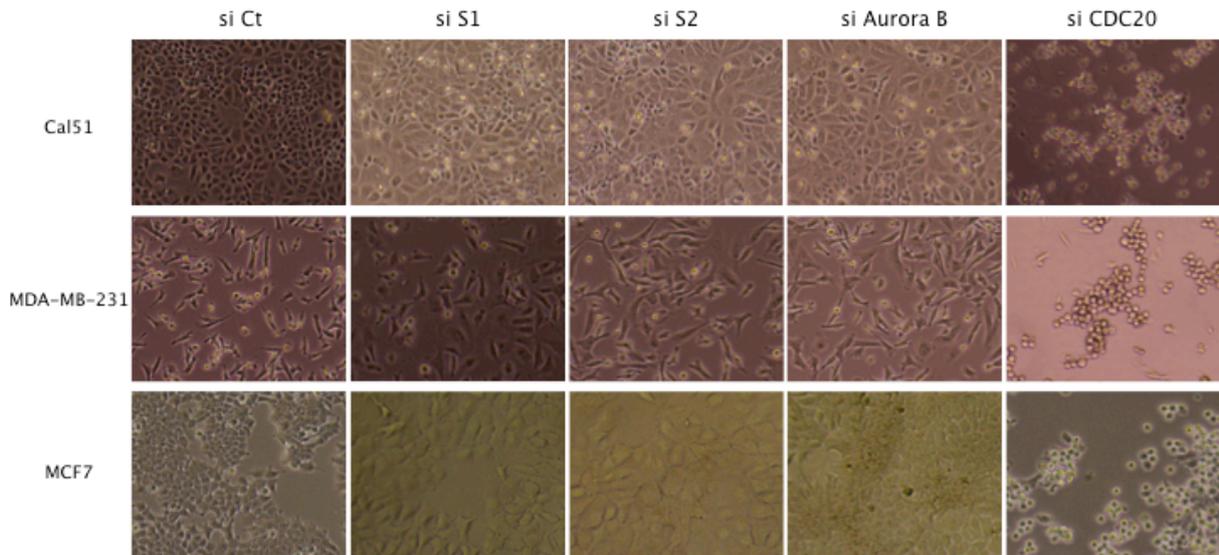
L'observation microscopique de la morphologie des cellules après 2 jours de transfection de siRNA ciblant la SURVIVINE (deux séquences différentes siS1 et S2) ou AURORAB, montre à la fois une augmentation de la taille des cellules et une diminution de la densité cellulaire (Figure 44).

Nous avons évalué par immunoblot l'expression de la CYCLINE B, co-activateur de CDK1, qui est modulée au cours du cycle cellulaire et plus particulièrement au cours de la mitose. Son expression est observée pendant la mitose. Sa dégradation permet la sortie de la mitose par diminution de l'activité de CDK1. La déplétion en SURVIVINE ou en AURORAB induit une diminution de la CYCLINE B. Dans la condition siRNA Ct, quelques cellules en mitose expliquent une expression basale de CYCLINE B (Figure 45). La diminution de la CYCLINE B après déplétion en SURVIVINE ou en AURORAB nous indique que les cellules ne sont pas bloquées en mitose mais ont poursuivi leur cycle cellulaire sans division cellulaire.

Les données de cycle cellulaire, l'observation morphologique et la modification d'expression de la CYCLINE B sont en accord avec le fait que les déplétions en SURVIVINE ou en AURORAB induisent une augmentation du nombre des cellule G2/M après blocage de la cytokinèse, dont elles régulent normalement la réalisation. Ceci expliquerait l'apparition des cellules tétraploïdes et polyploïdes après possible re-réplication, plus ou moins aisément selon les lignées cellulaires, probablement en fonction des points de contrôle de la tétraploïdie plus ou moins permissifs.

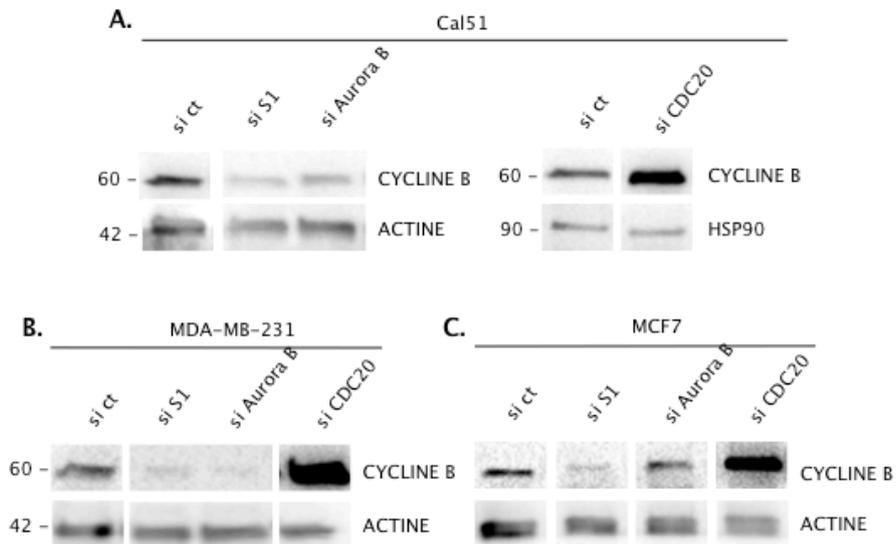
La déplétion en CDC20 bloque les cellules en prométaphase.

Résultats



**Figure 44 : Morphologie des cellules après déplétion en SURVIVINE, AURORAB ou CDC20.**

Après 48 heures de transfection des siRNA ciblant l'ARNm de la SURVIVINE (si S1 et si S2) ou d'AURORAB (si AURORAB) ou CDC20 (si CDC20), les lignées cellulaires Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 sont observées au microscope à l'objectif x20.



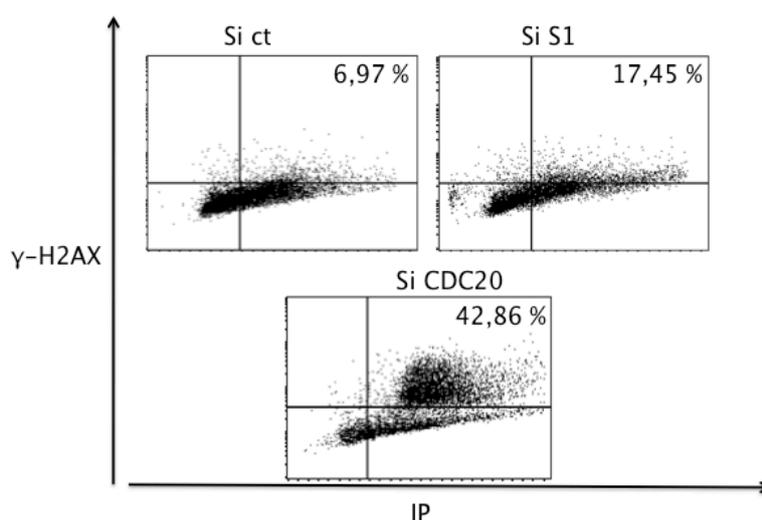
**Figure 45 : La déplétion en SURVIVINE ou AURORAB diminue l'expression de la CYCLINE B contrairement à la déplétion en CDC20 qui l'augmente.**

A, B et C Les lignée Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 sont déplétées pendant 48 heures en SURVIVINE, AURORAB ou CDC20, par ARN interférence. Les lysats cellulaires totaux sont analysés en immunoblot afin d'observer les modifications d'expression de la CYCLINE B. (n=3)

e) *Survenue des dommages à l'ADN au cours du cycle cellulaire*

Nous voulions évaluer à quel stade du cycle cellulaire survenait les dommages à l'ADN sous déplétion en SURVIVINE. Pour cela nous avons utilisé une approche par cytométrie de flux pour analyser le double marquage  $\gamma$ H2AX et ADN après ARN interférence.

La déplétion en CDC20 induit une forte augmentation du marquage  $\gamma$ -H2AX uniquement dans les cellules en phase G2/M (4n) (Figure 46). Sous déplétion en SURVIVINE nous observons une augmentation du marquage  $\gamma$ -H2AX dans les cellules polyploïdes mais de manière moins marquée que lors d'un stress mitotique, induit par la déplétion en CDC20. Nous avons déjà mis en évidence par immunoblot que la déplétion en CDC20 induit une plus forte augmentation de  $\gamma$ -H2AX que la déplétion en SURVIVINE (Figure 42).



**Figure 46 : Apparition des dommages à l'ADN en fonction des phases du cycle cellulaire.**

La lignée Cal51 a été déplétée en SURVIVINE ou CDC20 par siRNA 48 heures. Les cellules après fixation et perméabilisation sont marquées avec un anticorps reconnaissant  $\gamma$ -H2AX et avec du Iodure de Propidium (IP) pour déterminer les phases du cycle cellulaire. La fluorescence de ces deux marquages est analysée en cytométrie en flux. Les graphiques obtenus représentent l'intensité de fluorescence de l'IP, donnant le contenu en ADN, en abscisse en fonction de l'intensité de fluorescence du marquage  $\gamma$ -H2AX en ordonnée. (n=3)

f) *Expression du set de gènes RH après traitement avec l'AZD1152, inhibiteur pharmacologique de l'activité kinase d'AURORAB*

L'AZD1152, inhibiteur pharmacologique de l'activité kinase d'AURORAB, a été développé dans un but thérapeutique. La déplétion en AURORAB diminuant l'expression de

la SURVIVINE, nous avons utilisé un inhibiteur chimique de l'activité kinase d'AURORAB. Nous partions de l'hypothèse que l'inhibition de l'activité kinase d'AURORAB pouvait mimer les modifications du cycle cellulaire retrouvées sous déplétion en SURVIVINE ou AURORAB, sans diminuer l'expression de la SURVIVINE. Nous l'avons utilisé pour évaluer son éventuelle capacité à modifier l'expression du panel de gènes impliqués dans la RH, régulés par la SURVIVINE. Nous voulions ainsi répondre à l'hypothèse de l'implication de la fonction de la régulation du cycle cellulaire de la SURVIVINE sur la modification de l'expression du set de gènes RH.

Le traitement AZD1152, de 48 heures, diminue l'expression du set de gènes RH dans la lignée MCF7 (Figure 47 C) et de manière plus importante que la déplétion en SURVIVINE par siRNA. Mais l'AZD1152 diminue aussi l'expression du gène *BIRC5* (Figure 47 C) et de l'expression protéique de la SURVIVINE (Figure 48 A). De plus le traitement AZD1152 augmente légèrement l'expression de  $\gamma$ -H2AX en immunoblot (Figure 48 A).

Dans la lignée Cal51, le traitement AZD1152 diminue l'expression de 3 gènes, EXO1, BLM et BRCA1 (Figure 47 A). La diminution de l'expression du gène *BIRC5* codant pour la SURVIVINE est moins importante que pour la lignée MCF7 et la diminution protéique est assez faible également (Figure 48 B). L'AZD1152 ne modifie pas l'expression de  $\gamma$ -H2AX (données non montrées).

Quant à la lignée MDA-MB-231, l'AZD1152 ne modifie pas l'expression du set de gènes RH ni de *BIRC5* (Figure 47 B).

L'inhibiteur chimique d'AURORAB, l'AZD1152 induit des modifications d'expression génique variables en fonction du fond cellulaire. Le traitement AZD1152 mime l'effet de la déplétion en SURVIVINE sur l'expression du set de gènes RH dans la lignée MCF7 et de manière concordante à la diminution de l'expression de l'ARNm de la SURVIVINE. Dans la lignée Cal51 et MDA-MB-231 nous ne retrouvons pas sous traitement avec l'AZD1152, les effets de la déplétion en SURVIVINE sur la variation de l'expression du set de gènes RH. En revanche, nous remarquons que l'effet de l'AZD1152 sur la modification d'expression du set de gènes RH corrèle avec son impact sur les niveaux d'ARNm de la SURVIVINE.

**A.**

**Cal51**

	EME1	EXO1	BLM	BRCA1	BRCA2	RAD51	MUS81	BIRC5	AURKB
si S1	0,40 ***	0,37 ***	0,54 **	0,41 ***	0,56 ***	0,45 ***	1,30 *	0,04 *	0,53 ***
AZD1152	0,94	0,51 **	0,50 ***	0,45 ***	0,68 ***	0,58	1,83 ***	0,60 ***	0,60 *

**B.**

**MDA-MB-231**

	EME1	EXO1	BLM	BRCA1	BRCA2	RAD51	MUS81	BIRC5	AURKB
si S1	0,39 ***	0,37 **	0,39 *	0,40 ***	0,41 **	0,54 ***	0,79 ***	0,05	0,38 *
AZD1152	1,14 *	0,78 ***	0,70 **	0,91 ***	0,84 ***	0,98 ***	1,09 **	1,03 **	0,97 **

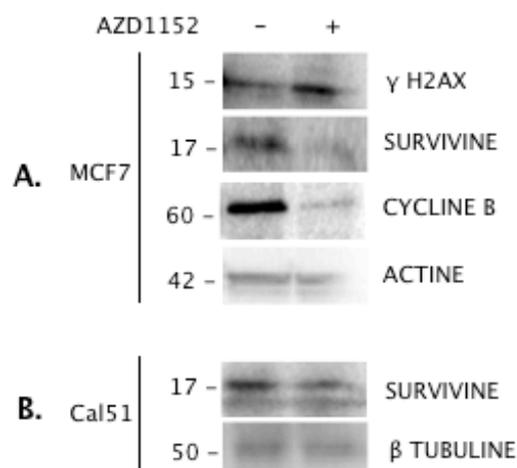
**C.**

**MCF7**

	EME1	EXO1	BLM	BRCA1	BRCA2	RAD51	MUS81	BIRC5	AURKB
si S1	0,55 ***	0,56 ***	0,49 *	0,55 **	0,55 **	0,55 ***	0,95 ***	0,12 **	0,37 ***
AZD1152	0,14 *	0,18 ***	0,15 ***	0,14 ***	0,22 ***	0,20 ***	1,02	0,26	0,14

**Figure 47 : Expression du set de gènes RH après traitement avec l'AZD1152.**

A, B et C Les lignées Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 sont récupérées après 48 heures de traitement avec l'AZD1152 (0,2  $\mu$ M). Après rétrotranscription des ARN messagers, les ADNc obtenus sont analysés en qPCR ciblant les gènes indiqués. Le tableau présente la moyenne des ratios des quantités normalisées obtenues sous déplétion en SURVIVINE par rapport aux quantités normalisées obtenues après transfection du siRNA Ct et la moyenne des ratios des quantités normalisées obtenues après traitement AZD1152 par rapport aux quantités normalisées obtenues en condition non traitée, pour chaque gène. Un dégradé de couleur permet de mettre en évidence les diminutions (vert) ou augmentations (rouge) de l'expression des gènes. Le coefficient de variation (Cv) des moyennes des ratios est indiqué par les \*, \*\*\* si  $Cv < 0,25$ , \*\* si  $Cv < 0,35$ , \* si  $Cv < 0,5$  et la case est blanche si  $Cv > 0,5$ . (n=3)



**Figure 48 : L'AZD1152 induit des dommages à l'ADN et diminue l'expression de la SURVIVINE.**

A et B Les lignées MCF7 et MDA-MB-231 sont traitées pendant 48 heures avec l'AZD1152 (0,2  $\mu$ M). Les lysats cellulaires totaux sont analysés en immunoblot afin d'observer la modification de la phosphorylation de H2AX et de l'expression de la SURVIVINE et de la CYCLINE B (n=2)

#### g) Effet de l'AZD1152 sur le cycle cellulaire

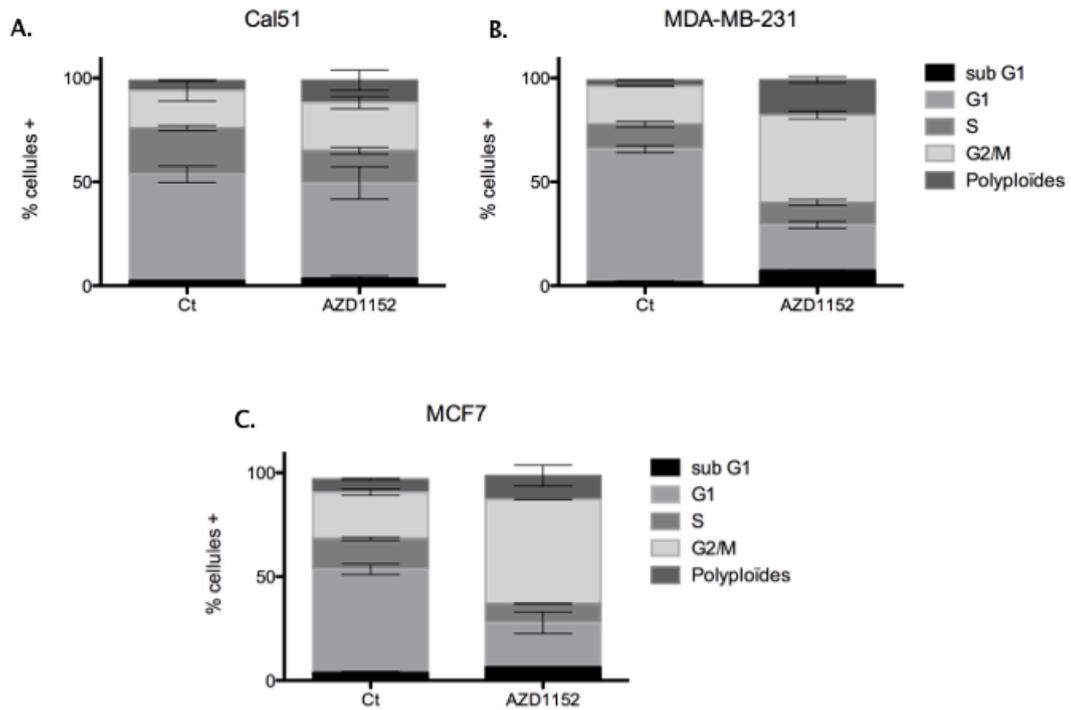
Nous avons en parallèle, étudié l'effet de l'AZD1152 sur le cycle cellulaire après 2 jours de traitement.

Dans la lignée Cal51, l'AZD1152 induit une légère augmentation du pourcentage de cellules en G2/M et de la proportion de cellules polyploïdes (Figure 49 A). Dans les lignées MDA-MB-231 et MCF7, nous voyons apparaître une plus forte augmentation du pourcentage de population cellulaire tétraploïde (Figure 49 B et C). Quant aux cellules polyploïdes la proportion est plus importante dans la lignée MDA-MB-231 et équivalente dans les lignées MCF7 et Cal51 (Figure 49).

Dans la lignée MDA-MB-231, l'effet de l'AZD1152 sur le cycle cellulaire est très comparable à celui observé sous déplétion en AURORAB. L'effet de l'AZD1152 sur le cycle cellulaire dans la lignée Cal51 reste plus faible que la déplétion en AURORAB.

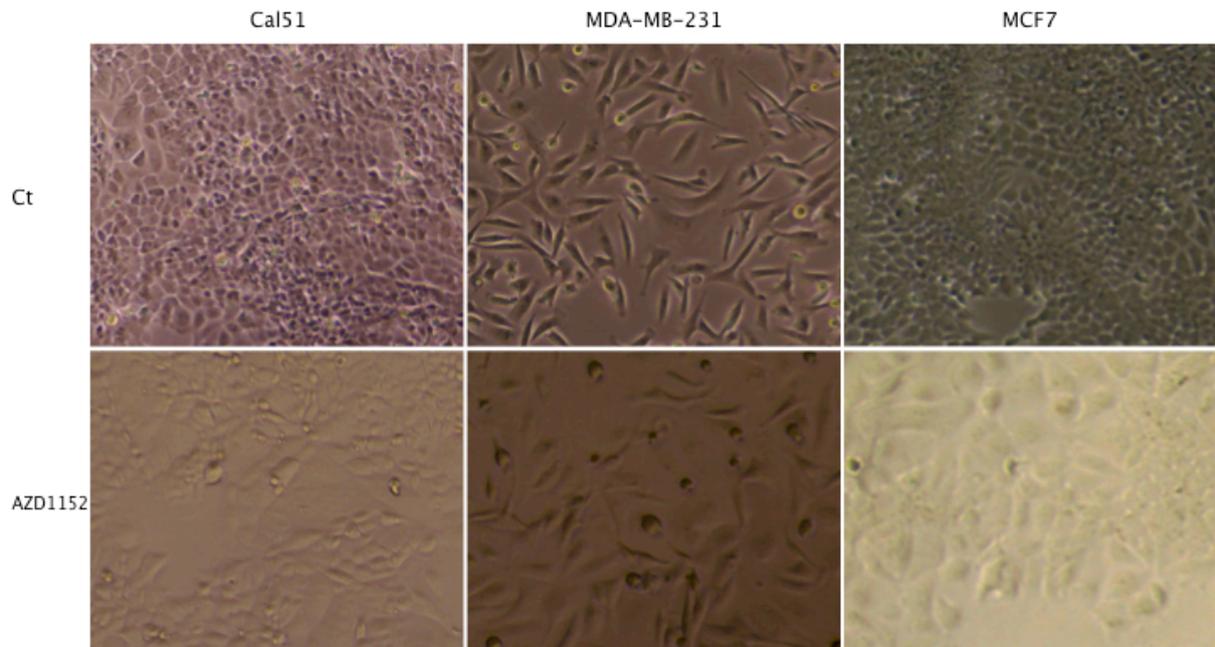
De plus morphologiquement nous voyons également apparaître une plus faible densité cellulaire et des cellules dont la taille est augmentée, essentiellement dans les lignées MDA-MB-231 et MCF7. Il semble y avoir plus d'hétérogénéité de réponse cellulaire dans la lignée Cal51 (Figure 50).

Au final l'effet du traitement AZD1152 sur le cycle cellulaire est assez proche de ce qu'on observe sous la déplétion en SURVIVINE et en AURORAB. Il induit probablement un défaut de cytokinèse et donc une augmentation des cellules polyploïdes. La sensibilité est également variable en fonction des lignées mais est différente de celle observée après déplétion par siRNA. De plus l'AZD1152 diminue l'expression de la SURVIVINE et a un effet sur l'expression du set de gène HR proportionnel à la diminution de l'expression de *BIRC5*. Ces résultats démontrent que la régulation du set de gène HR n'est pas dépendante de la fonction CPC de la SURVIVINE.



**Figure 49 : L'inhibiteur d'AURORAB, l'AZD1152 induit un blocage des cellules en G2/M et une augmentation des cellules polyplodes.**

A, B et C Les lignées Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 sont traitées pendant 48 heures avec l'AZD1152 (0,2  $\mu$ M), l'inhibiteur de l'activité de la protéine AURORAB. Les cellules après fixation et perméabilisation sont marquées avec de l'Iodure de propidium puis l'analyse de sa fluorescence par cytométrie en flux permet de déterminer le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire représenté par les histogrammes. (n=2)



**Figure 50 : Morphologie des cellules après traitement avec l'inhibiteur d'AURORAB, l'AZD1152.**

Après 48 heures de traitement avec l'AZD1152 (0,2  $\mu$ M) les lignées cellulaires Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 sont observées au microscope, objectif x20.

### 3. Expression du set de gènes RH sous déplétion en BRCA1

Nous avons voulu étudier si la déplétion de BRCA1, dont l'expression est diminuée sous déplétion en SURVIVINE, pouvait perturber l'expression des autres gènes impliqués dans les voies de réparation.

Nous n'observons pas de modification de l'expression du set de gènes RH sous déplétion en BRCA1 par siRNA (Figure 51).

L'effet de la déplétion en SURVIVINE sur la diminution de l'expression du set de gènes RH est indépendant de la diminution de l'expression de BRCA1.

**A.**

<b>Cal51</b>	EME1	EXO1	BLM	BRCA1	BRCA2	RAD51	MUS81	BIRC5
si S1	0,40 ***	0,37 ***	0,54 **	0,41 ***	0,56 ***	0,45 ***	1,30 *	0,04 *
si BRCA1	1,12 **	1,07 ***	2,34	0,27 ***	1,19 **	1,14 ***	1,09 *	1,24 ***

**B.**

<b>MDA-MB-231</b>	EME1	EXO1	BLM	BRCA1	BRCA2	RAD51	MUS81	BIRC5
si S1	0,39 ***	0,37 **	0,39 *	0,40 ***	0,41 **	0,54 ***	0,79 ***	0,05
si BRCA1	1,43	0,77 ***	0,73 *	0,26	0,79 ***	0,71 **	0,86 **	0,84 ***

**C.**

<b>MCF7</b>	EME1	EXO1	BLM	BRCA1	BRCA2	RAD51	MUS81	BIRC5
si S1	0,55 ***	0,56 ***	0,49 *	0,55 **	0,55 **	0,55 ***	0,95 ***	0,12 **
si BRCA1	0,80 **	0,88 ***	0,81 **	0,23	1,22 ***	0,81 **	1,57	0,81 ***

**Figure 51 : Expression du set de gènes RH sous déplétion en BRCA1.**

A, B et C Les lignées Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 sont récupérées après 48 heures de transfection avec les siRNA ciblant la SURVIVINE ou BRCA1. Après rétrotranscription des ARN messagers, les ADNc obtenus sont analysés en qPCR ciblant les gènes indiqués. Le tableau présente la moyenne des ratios des quantités normalisées obtenues sous déplétion en SURVIVINE ou en BRCA1 par rapport aux quantités normalisées obtenues après transfection du siRNA Ct pour chaque gène. Un dégradé de couleur permet de mettre en évidence les diminutions (vert) ou augmentations (rouge) de l'expression des gènes. Le coefficient de variation (Cv) des moyennes des ratios est indiqué par les \*, \*\*\* si  $Cv < 0,25$ , \*\* si  $Cv < 0,35$ , \* si  $Cv < 0,5$  et la case est blanche si  $Cv > 0,5$ . (n=3)

En résumé, la déplétion en SURVIVINE diminue l'expression de 6 gènes impliqués dans la RH, des protéines RAD51 et MUS81 et associée à l'apparition de dommages à l'ADN, à l'induction de peu de mort cellulaire et à un défaut de cytokinèse. Les effets de modification d'expression du set de gènes RH ne sont pas reproduits par la déplétion en XIAP, ou en CDC20, ou en AURORAB ou par inhibition d'AURORAB. C'est donc une autre fonction de la SURVIVINE que nous avons mis en évidence comme régulateur de transcription génique.

## D. Conséquences fonctionnelles de la déplétion en SURVIVINE

### 1. Etude de la voie p53

#### a) Expression de p53 et de ses cibles transcriptionnelles sous déplétion en SURVIVINE

La déplétion en SURVIVINE induisant des dommages à l'ADN nous avons étudié si la réponse p53 pouvait être activée en réponse aux dommages dans les lignées possédant un gène *TP53* non muté (Cal51 et MCF7).

Nous avons analysé l'expression de p53 et de sa forme phosphorylée sur la Sérine 15 par immunoblot ainsi que l'expression de certaines de ses cibles transcriptionnelles telles que PUMA, NOXA, BAX et p21.

La déplétion en SURVIVINE induit la phosphorylation de p53 sur la Sérine 15 et l'augmentation de son expression également, dans les lignées Cal51 (Figure 52, Figure 53 A, Figure 54 A et Figure 57 A) et MCF7 (Figure 52, Figure 53 B, Figure 54 B et Figure 57 B). Suite aux dommages à l'ADN double-brin, la kinase ATM est activée et peut entraîner la phosphorylation de p53 sur la Sérine 15 (Xu, 2003).

De plus l'expression de p53 qui apparaît dès le premier jour après déplétion en SURVIVINE, s'accumule au cours du temps dans les deux lignées p53 sauvage (Figure 53). Dans la lignée Cal51 nous remarquons une augmentation de la phosphorylation de la Sérine

15 de la protéine p53 entre le premier et le deuxième jour de déplétion en SURVIVINE pour ne plus augmenter au troisième jour (Figure 53 A).

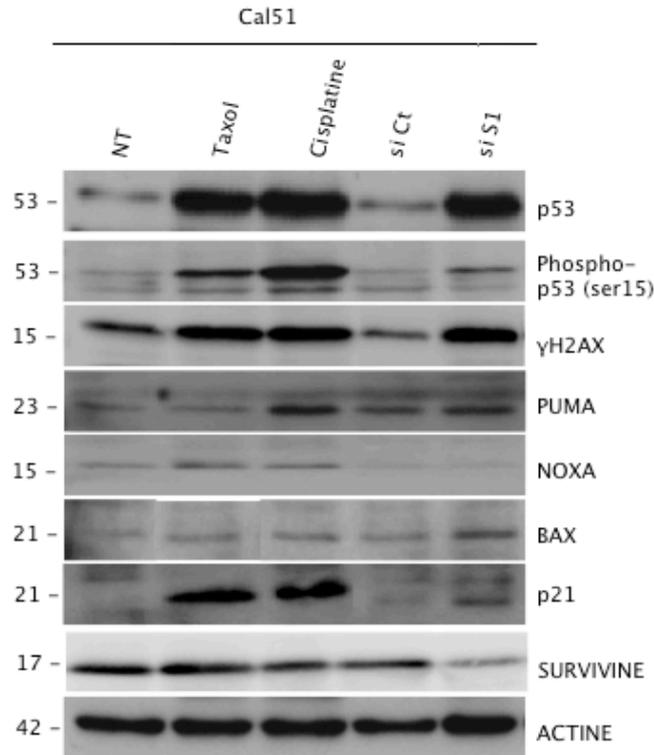
L'expression et la phosphorylation de p53 arrivent très précocement après la déplétion en SURVIVINE et la protéine p53 s'accumule par la suite.

L'expression protéique de certaines cibles transcriptionnelles de p53 est aussi augmentée sous déplétion en SURVIVINE, telles que PUMA, BAX et p21 (Figure 52, Figure 54 et Figure 57 A) dans les deux lignées Cal51 et MCF7.

Dans la lignée MDA-MB-231, p53 mutée en R280K affectant son domaine de liaison à l'ADN, nous n'observons pas de modification de l'expression des protéines p53 et p21, comme attendu (Figure 54).

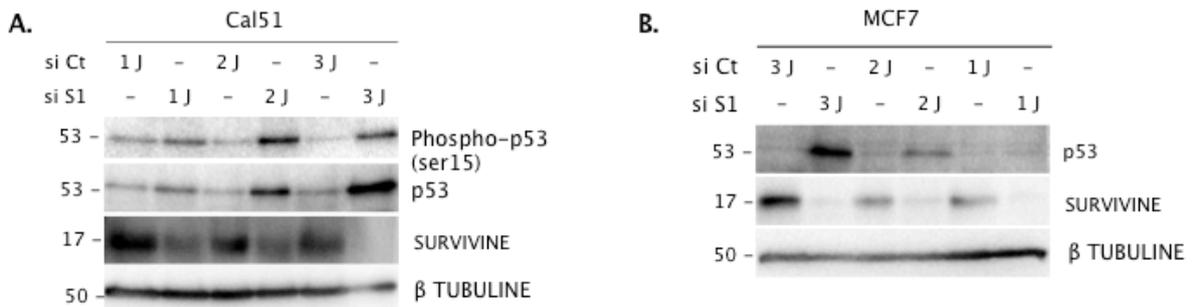
Cette réponse cellulaire est retrouvée avec l'utilisation de la seconde séquence de siRNA (si S2) (Figure 55 et Figure 56)

La déplétion en SURVIVINE active la réponse p53 dans les cellules présentant des gènes *TP53* non mutés comme peut le faire un stress génotoxique, le Cisplatine ou un stress mitotique, le Taxol (Figure 52).



**Figure 52 : La déplétion en SURVIVINE induit une activation de la voie p53 en réponse aux dommages de l'ADN.**

La lignée Cal51 a été déplétée en SURVIVINE par ARN interférence pendant 48 heures. La lignée a également été traitée 48 heures avec le Cisplatine (6,66µM) comme contrôle positif de génotoxicité et avec le Taxol (700 nM). Les lysats cellulaires totaux analysés par immunoblot permettent d'observer les différences de phosphorylation de H2AX et de p53 sur la Sérine 15, et les différences d'expression des cibles transcriptionnelles de p53, PUMA, NOXA, BAX, p21. (n=3)



**Figure 53 : L'expression de la protéine p53 augmente sous déplétion en SURVIVINE au cours du temps.**

A et B Les lignées Cal51 et MCF7 ont été déplétées en SURVIVINE (si S1) de 1 à 3 jours par ARN interférence. Les lysats cellulaires totaux ont été analysés en immunoblot afin d'observer les modifications de phosphorylation de p53 sur la Sérine 15 et de son expression. (n=3)

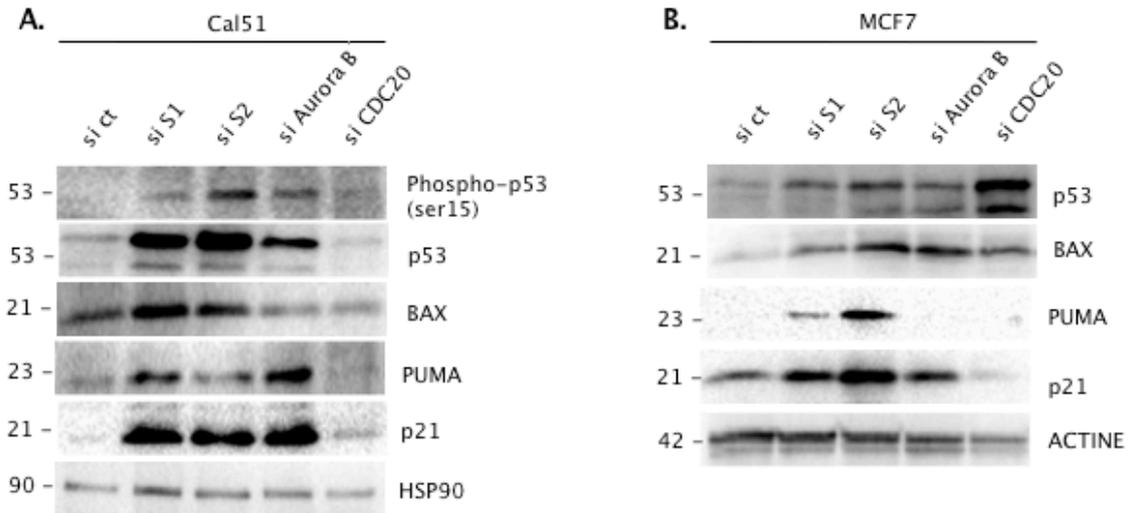
*b) Expression de p53 et de ses cibles transcriptionnelles sous déplétion en AURORAB*

Nous observons une augmentation de la phosphorylation de p53 sur la Sérine 15 sous déplétion en AURORAB, dans la lignée Cal51 (Figure 54 A). L'augmentation de l'expression de p53 et de ces cibles transcriptionnelles, BAX, PUMA et p21 est aussi observée sous déplétion en AURORAB et de SURVIVINE dans les lignées Cal51 et MCF7 (Figure 54 A et B et Figure 57).

La déplétion en CDC20 n'induit pas la même réponse. Nous n'observons pas d'augmentation de PUMA et de p21 (Figure 54), ce qui est en accord avec un blocage des cellules en mitose, phase pendant laquelle la transcription est quasiment inexistante, mais la traduction Cap dépendante possible.

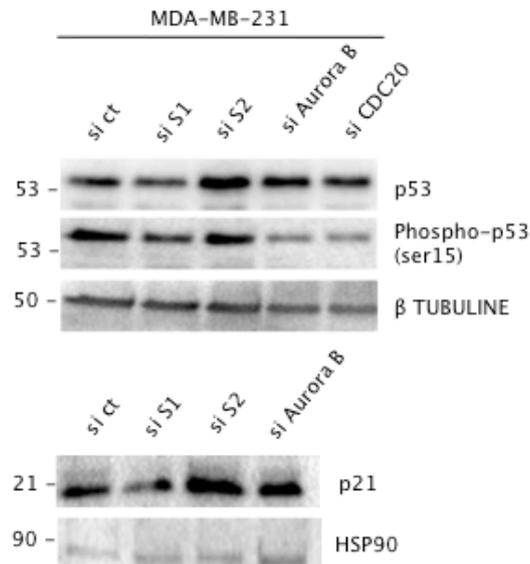
La déplétion en AURORAB ou CDC20 dans la lignée MDA-MB-231 ne modifie pas non plus l'expression et la phosphorylation de p53, ni l'expression de p21.

Seule la déplétion en AURORAB dans un contexte p53 sauvage mime l'activation de la voie p53 observée sous déplétion en SURVIVINE.



**Figure 54 : La déplétion en AURORAB induit une activation de la voie p53 comme la déplétion en SURVIVINE.**

A et B Les lignées Cal51 et MCF7 sont déplétées en SURVIVINE (si S1 et S2), en AURORAB (si AURORAB) ou en CDC20 (si CDC20) pendant 48 heures par ARN interférence. Les lysats cellulaires totaux sont analysés en immunoblot permettant de visualiser les différences de phosphorylation de p53 sur la Sérine 15, et d'expression des protéines p53, BAX, PUMA et p21. (n=3)



**Figure 55 : La déplétion en SURVIVINE ou en AURORAB n'induit pas de modification de la voie p53 dans la lignée MDA-MB-231 p53 mutée.**

La lignée MDA-MB-231 est déplétée en SURVIVINE (si S1 et si S2) ou en AURORAB (si AURORAB) ou en CDC20 (si CDC20) pendant 48 heures par ARN interférence. Les lysats cellulaires totaux sont analysés en immunoblot permettant de visualiser les différences de phosphorylation de p53 sur la Sérine 15, et d'expression des protéines p53 et p21. (n=3)

*c) Expression génique des cibles transcriptionnelles de p53*

Nous avons évalué l'expression des gènes cibles de p53 par qPCR sous déplétion des différentes protéines dont nous avons observé l'effet sur l'expression des gènes régulés par la SURVIVINE.

Nous observons une augmentation de l'expression des gènes *BAX*, *BBC3* codant pour la protéine PUMA et *CDKN1A* codant pour p21, sous déplétion en SURVIVINE (si S1 et S2), sous déplétion en AURORAB et après traitement avec l'AZD1152 dans les lignées Cal51 et MCF7 (Figure 56 A et B). La déplétion des autres protéines (CDC20, XIAP et BRCA1) ne modifie pas l'expression de ces gènes.

Nous n'observons pas non plus de modification de ces gènes dans la lignée MDA-MB-231, comme attendu.

L'augmentation de l'expression des protéines cibles de p53 passe bien par une augmentation de l'expression génique dans les lignées p53 sauvage et sous déplétion en SURVIVINE ou en AURORAB. La réponse p53 est enclenchée dans ces deux cas-ci.

A. Cal51					B. MCF7				
	BAX	BBC3	PMAP11	CDKN1A		BAX	BBC3	PMAP11	CDKN1A
si S1	2,43 ***	5,44 **	1,49 **	5,04 ***	si S	1,63 ***	2,27	0,64 **	2,92
si S2	2,45 ***	3,18 ***	1,77 **	2,72 ***	si S2	2,32 ***	2,72	2,07 *	5,94
si Aurora B	2,20 ***	4,63 ***	1,75 ***	3,76 ***	si Aurora B	1,71 ***	4,58 ***	1,80 **	4,04
si CDC20	1,32 **	1,76	1,57 *	3,50	si CDC20	1,35 ***	1,37	0,88 **	1,82 *
si XIAP	0,92 *	1,15 **	1,10 ***	0,88 *	si XIAP	1,04 ***	1,46 ***	1,45 ***	0,66 ***
si BRCA1	1,32 ***	1,56 ***	0,75 *	1,09 *	si BRCA1	1,07 ***	2,05 **	1,01 ***	1,26 *
AZD1152	3,25 **	4,48 ***	2,26 *	19,90 *	AZD1152	5,08 ***	3,71	0,99	14,43

Figure 56 : Comparaison de l'expression des gènes régulés par p53 sous déplétion en SURVIVINE, AURORAB, CDC20, XIAP, BRCA1 ou traitement à l'AZD1152.

A, B et C Les lignées Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 sont récupérées après 48 heures de transfection avec les différents siRNA. Après rétrotranscription des ARN messagers, les ADNc obtenus sont analysés en qPCR ciblant les gènes indiqués. Le tableau présente la moyenne des ratios des quantités normalisées obtenues après déplétion par siRNA des différentes cibles par rapport aux quantités normalisées obtenues après transfection du siRNA Ct pour chaque gène et la moyenne des ratios des quantités normalisées obtenues après traitement AZD1152 par rapport aux quantités normalisées obtenues en condition non traitée. Un dégradé de couleur permet de mettre en évidence les diminutions (vert) ou augmentations (rouge) de l'expression des gènes. Le coefficient de variation des moyennes des ratio est indiqué par les \*; \*\*\*<0,25, \*\* <0,35, \* <0,5 et la case est blanche si > 0,5. (n=3)

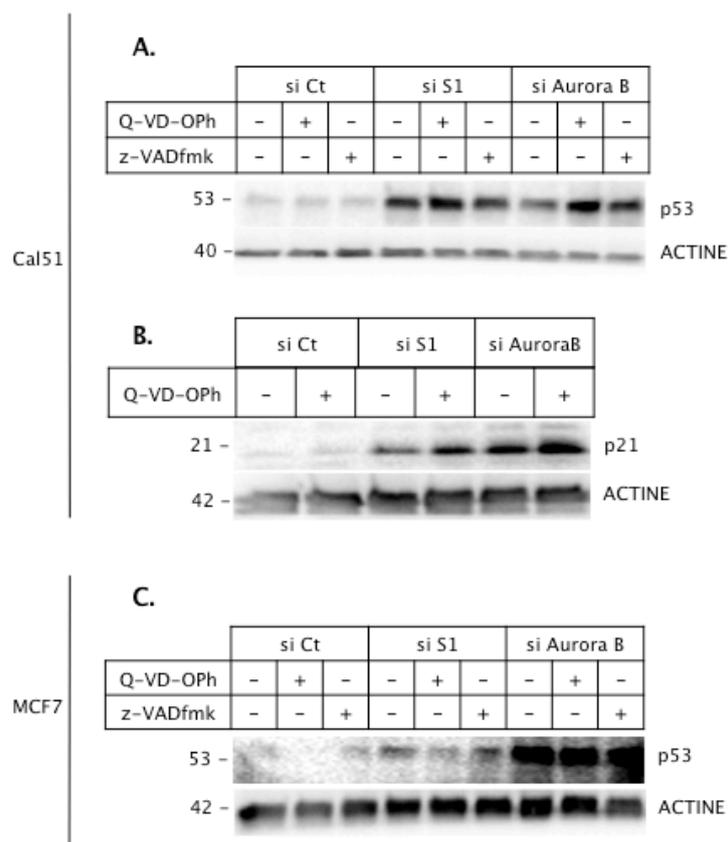
d) Effet de l'activité des CASPASES sur l'activation de la voie p53

La déplétion en SURVIVINE induisant une activité des CASPASES, nous avons évalué l'implication de celle-ci dans l'activation de la réponse p53. En effet l'activité CASPASE peut participer ou amplifier l'activation de la voie p53.

Nous avons analysé par immunoblot si des inhibiteurs pan-CASPASES, le Q-VD-Oph ou le z-VADfmk pouvaient moduler l'expression de p53 ou de p21 cible transcriptionnelle de p53.

Dans la lignée Cal51 et MCF7 nous n'observons pas de modification de l'expression de p53 sous déplétion en SURVIVINE ou AURORAB après inhibition de l'activité CASPASE (Figure 57 A et C). L'expression de p21, induite sous déplétion en SURVIVINE ou en AURORAB n'est pas affectée non plus par le traitement au Q-VD-Oph dans la lignée Cal51 (Figure 57 B).

L'activité CASPASE ne participe pas et ne module pas l'activation de la voie p53 induite sous déplétion en SURVIVINE ou en AURORAB dans les lignées p53 sauvages.



**Figure 57 : L'activation de la voie p53 sous déplétion en SURVIVINE ou en AURORAB n'est pas modifiée sous inhibition de l'activité des CASPASES.**

A, B et C Les lignées Cal51 et MCF7 sont déplétées en SURVIVINE (si S1) ou en AURORAB (si AURORAB) ou en CDC20 (si CDC20) par ARN interférence. Puis les cellules sont traitées avec des inhibiteurs pan-CASPASES, le Q-VD-OPh (10 $\mu$ M) ou le z-VADfmk (20 $\mu$ M). Après 48 heures de déplétion et de traitement, les lysats cellulaires totaux sont analysés en immunoblot permettant de visualiser les différences de d'expression des protéines p53 et p21. (n=3)

Nous avons aussi étudié l'expression de p53 et de p21 dans la lignée MDA-MB-231, p53 mutée, où nous avons observé une activation modérée des CASPASES sous déplétion en SURVIVINE. Nous n'observons pas de modification de ces deux protéines sous inhibiteur de CASPASES (Figure 58).



**Figure 58 : L'inhibition des CASPASES ne modifie pas l'expression de p53 et p21 dans la lignée MDA-MB-231.**

A et B La lignée MDA-MB-231 est déplétée en SURVIVINE (si S1) ou en AURORAB (si AURORAB) ou en CDC20 (si CDC20) par ARN interférence. Puis les cellules sont traitées avec des inhibiteurs pan-CASPASES, le Q-VD-OPh (10 $\mu$ M) ou le z-VADfmk (20 $\mu$ M). Après 48 heures de déplétion et de traitement, les lysats cellulaires totaux sont analysés en immunoblot permettant de visualiser les différences d'expression des protéines p53, p21 et CASPASE 3. (n=3)

## ***2. Effet de l'Olaparib, inhibiteur de PARP-1 sur les cellules déplétées en SURVIVINE***

L'inhibition de l'activité enzymatique de PARP-1 (Poly [ADP-ribose] polymérase 1) dans un contexte BRCAness (gènes *BRCA1/2* mutés ou délétés) induit une accumulation de dommages à l'ADN simple-brin qui sont convertis en cassures double-brin et ne peuvent plus être réparés par RH. Les niveaux de dommages à l'ADN s'accumulent au delà d'un seuil tolérable pour la cellule et induisent alors la mort cellulaire. Ce concept de létalité synthétique a permis d'élaborer de nouvelles thérapies ciblées. La perte de fonction ou d'expression de protéines impliquées dans la réparation des cassures de l'ADN double-brin combinée à l'inhibition de PARP-1 peut déclencher la létalité synthétique (Dedes et al., 2011). La déplétion en SURVIVINE induisant une diminution de l'expression du gène *BRCA1*, et régulant négativement la RH, nous voulions analyser si la combinaison de la déplétion en SURVIVINE et de l'inhibition de PARP-1 pouvait avoir cet effet de létalité synthétique.

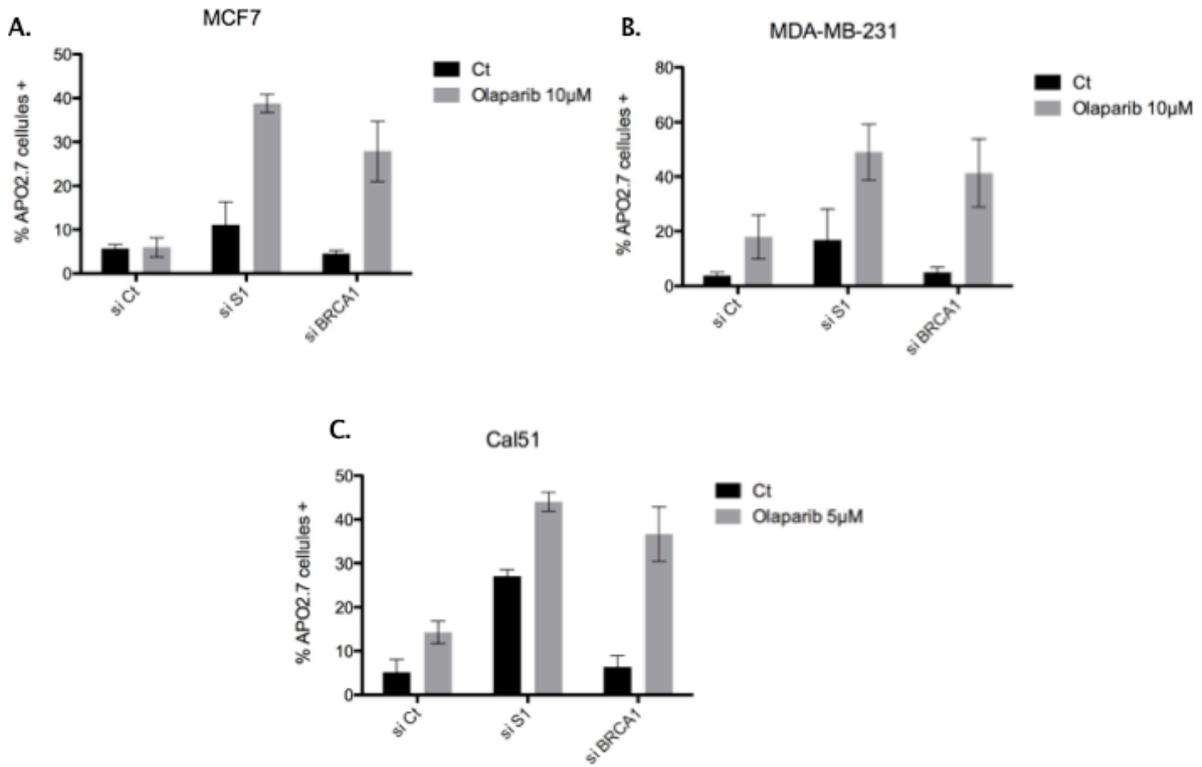
Nous avons utilisé l'Olaparib, inhibiteur pharmacologique de l'activité de PARP-1. Pour observer un effet de cet inhibiteur en agent simple, un traitement de 6 jours est nécessaire. Nous avons évalué la toxicité en agent simple de l'Olaparib sur les lignées cellulaires et adapté la concentration utilisée par la suite. Nous traitons à J0 les cellules avec des doses d'Olaparib peu toxiques en agent simple sur 6 jours. Les MDA-MB-231 et les

MCF7 sont traitées avec une dose d'Olaparib de 10 $\mu$ M et la lignée Cal51 avec 5 $\mu$ M. Puis nous transfectons, à J2, les cellules avec des siRNA ciblant la SURVIVINE ou BRCA1, utilisé comme contrôle positif. Nous observons la mort cellulaire induite à J6, soit 6 jours après traitement et 4 jours après transfection, à l'aide de l'immunomarquage APO2.7.

La déplétion en BRCA1 seule n'induit pas de mort cellulaire, mais associée au traitement à l'Olaparib, nous atteignons entre 30 et 40 % de mort dans les trois lignées cellulaires étudiées (Figure 59).

La déplétion en SURVIVINE induit plus de mort cellulaire, entre 10 et 20 % selon la lignée cellulaire (Figure 59). Mais associée au traitement avec l'Olaparib, nous voyons augmenter la mort cellulaire entre 35 et 50%. La différence d'induction de mort cellulaire entre la déplétion seule et l'association avec l'Olaparib est très marquée dans la lignée MCF7 (Figure 59 A), un peu moins dans la lignée MDA-MB-231 (Figure 59 B) et encore moins dans la lignée Cal51 où la déplétion en SURVIVINE seule induit déjà plus de mort cellulaire (Figure 59 C).

L'inhibition de l'activité de PARP-1 par l'Olaparib amplifie la mort cellulaire induite par la déplétion en SURVIVINE comme dans un contexte BRCAness. La déplétion en SURVIVINE mime donc un contexte BRCAness.



**Figure 59 : L'Olaparib, inhibiteur de PARP-1 induit de la mort sous déplétion en BRCA1 et augmente la mort cellulaire induite par la déplétion en SURVIVINE.**

A B et C Les lignées MCF7, MDA-MB-231 et Cal51 sont traitées avec l'Olaparib (A et B 10 $\mu$ M, C 5  $\mu$ M) pendant 6 jours. Les transfections des ARN interférents sont réalisées 2 jours après, la déplétion des protéines est donc de 4 jours. Pour analyser la mort cellulaire, les cellules sont marquées avec l'anticorps APO2.7 puis analysées en Cytométrie en flux. (n=2)

## II. YM155 : Inhibiteur pharmacologique de la SURVIVINE

En parallèle de mon travail sur les effets de la déplétion en SURVIVINE dans un modèle de cancer mammaire, j'ai également évalué les effets du seul inhibiteur pharmacologique de l'expression de la SURVIVINE disponible, le YM155.

Le YM155 (Sepantronium Bromide) (Figure 60) a été décrit comme inhibiteur pharmacologique de l'expression de la SURVIVINE. La molécule a été découverte par le laboratoire de la compagnie pharmaceutique Astellas Pharma, suite à un screening. Les auteurs ont utilisé un système de gène reporteur constitué du gène codant pour la Luciférase sous contrôle du promoteur du gène *BIRC5*. Ce screening a été réalisé dans la lignée cellulaire HeLa qui a été transfectée stablement avec cette construction. La molécule YM155 permettait de diminuer l'expression de la Luciférase et donc l'activité du promoteur de *BIRC5* avec une IC50 de 0,54nM. Ils ont également montré que l'ARNm de la SURVIVINE et l'expression de la protéine diminuaient suite au traitement avec le YM155 dans des lignées cellulaires du cancer de la prostate (Nakahara et al., 2007).

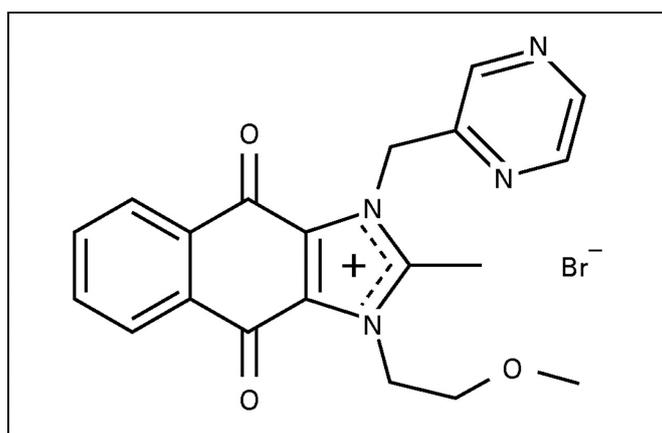


Figure 60 : La molécule YM155

Au vu des résultats obtenus sous déplétion en SURVIVINE par ARN interférence nous voulions analyser si le YM155 reproduisait les mêmes effets sur les lignées de cancer mammaire. Puis nous voulions évaluer l'effet antitumoral de cet inhibiteur et les voies de mort impliquées, afin de mieux définir les modes d'action du YM155 et optimiser son utilisation en clinique.

## A. YM155 : Inducteur de mort cellulaire

Les premiers articles de la littérature référençaient le YM155 comme une molécule très efficace pour induire la mort dans des lignées cancéreuses de la prostate, du poumon et de glioblastome (Tang et al., 2011; Wang et al., 2011) à des doses de l'ordre de 1 à 100 nM, qui diminuent également l'expression de la SURVIVINE. Nous avons vérifié cet effet sur des lignées cellulaires du cancer du sein. Des essais de doses réponses ont été réalisées après 48 heures de traitement de YM155 (Figure 61). Les doses de YM155 engendrant 50% de cellules mortes ont ainsi été déterminées et sont de 70nM pour la lignée Cal51, 50nM pour les MDA-MB-231 et 40nM pour les MCF7. Ces doses déterminées pour chaque lignée sont utilisées au cours de ce travail. Nous avons également pu observer qu'un temps de traitement de 24 heures n'est pas suffisant pour induire de la mort cellulaire dans ces lignées (données non montrées).

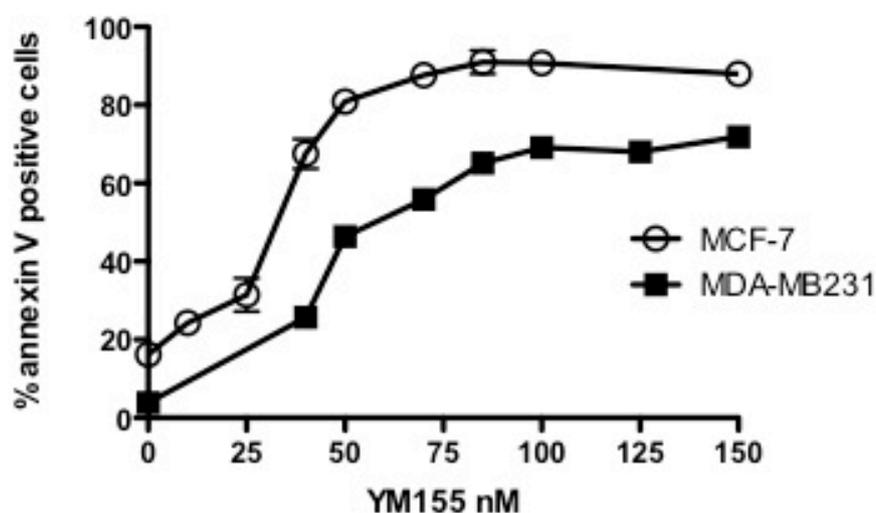


Figure 61 : Courbes dose réponse pour le YM155 pour les lignées cellulaires MCF7 et MDA-MB-231.

Les lignées cellulaires sont traitées 48 heures avec des doses croissantes de YM155. La lecture du marquage Annexin V en cytométrie en flux permet d'évaluer la mort cellulaire induite (% annexin V positive cells). (n=3)

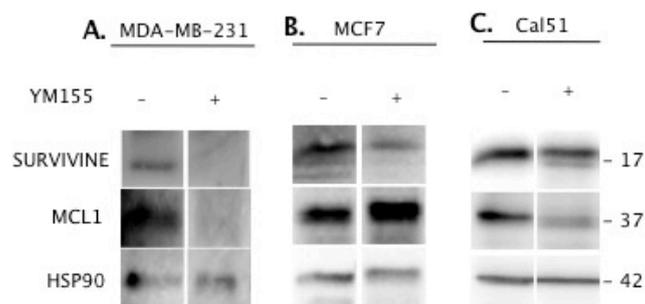
## B. YM155 : inhibiteur de l'expression de protéines

Nous avons voulu vérifier que le YM155 diminuait l'expression de la SURVIVINE, comme indiqué dans la littérature dans d'autres modèles tumoraux, dans les lignées cellulaires du cancer du sein.

### 1. YM155 : inhibiteur de l'expression de la SURVIVINE

Nous avons évalué l'expression de la SURVIVINE par immunoblot comme le montre la Figure 62 dans trois lignées du cancer du sein, Cal51, MDA-MB-231 et MCF7. Nous avons tout d'abord traité les cellules avec les doses déterminées précédemment.

Le YM155 diminue l'expression de la SURVIVINE dans la lignée MDA-MB-231 après 48 heures de traitement (Figure 62 A). Pour la lignée MCF7 le traitement YM155 diminue également l'expression de la SURVIVINE (Figure 62 B) cependant moins efficacement que dans la lignée MDA-MB-231. Le traitement YM155 dans la lignée Cal51 diminue très peu l'expression de la SURVIVINE avec une dose utilisée bien supérieure (Figure 62 C).



**Figure 62 : Le YM155 est un inhibiteur de l'expression des protéines SURVIVINE et MCL-1.**

A, B et C : Les lignées du cancer du sein, Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 ont été traitées avec différentes doses de YM155 pendant 48 heures (A, B et C). Les extraits protéiques totaux issus ont été analysés afin de déterminer l'expression de la SURVIVINE et de MCL-1. (n=3)

## **2. YM155 : inhibiteur de l'expression de MCL-1**

Un article a mis en évidence l'inhibition de l'expression protéique de MCL-1 (Myeloid cell leukemia 1) par le YM155 (Tang et al., 2011), c'est pourquoi nous avons également évalué l'expression de MCL-1 dans les lignées cellulaires. Le YM155 est efficace pour diminuer l'expression de MCL-1 dans les lignées MDA-MB-231 et Cal51 (Figure 62 A et C respectivement). En revanche nous ne voyons pas de diminution de MCL-1 dans la lignée MCF7 (Figure 62 B).

Le YM155 est plus ou moins efficace, à des doses induisant 50% de mort cellulaire, pour réduire l'expression de ces deux protéines et ce différemment en fonction des lignées cellulaires. Nous n'avons pas vu de modification de l'expression des protéines Bcl-2 et Bcl-xL, comme déjà observé dans le premier article décrivant le YM155 (Nakahara et al., 2007).

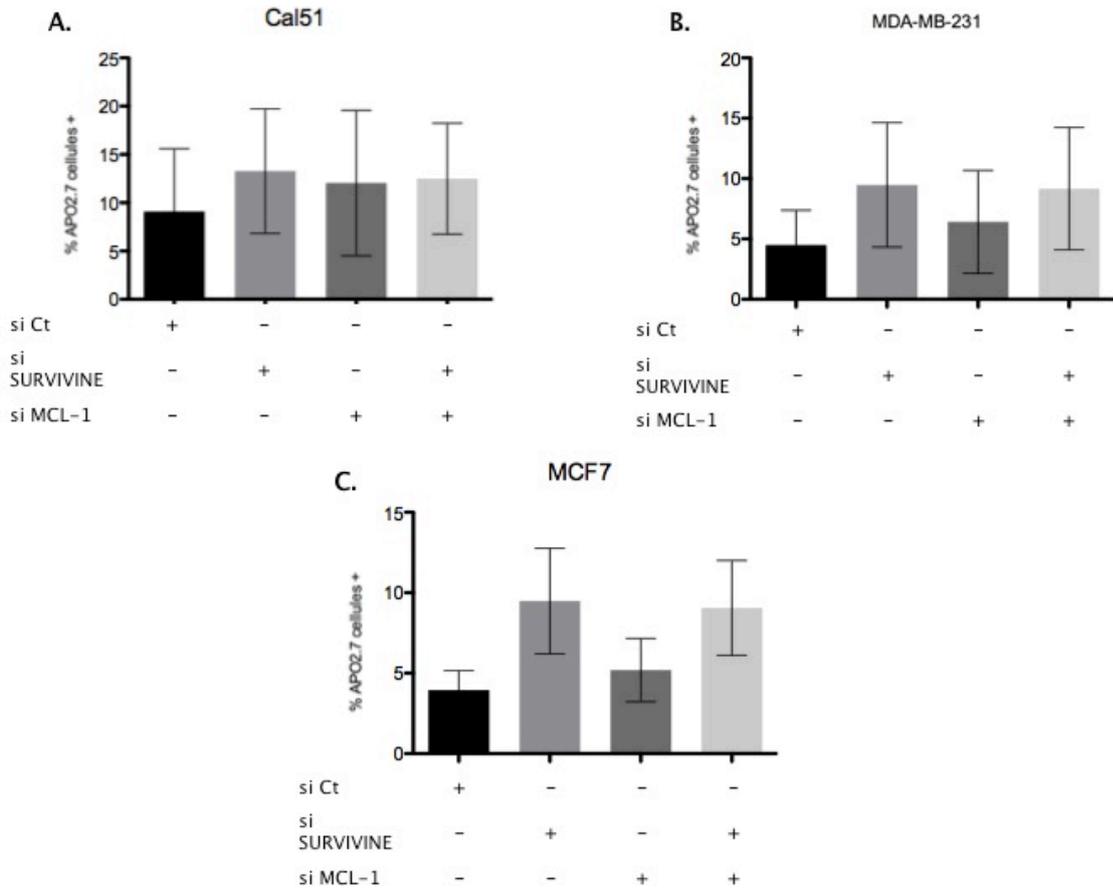
## **3. Effet de la co-déplétion en MCL-1 et SURVIVINE sur la mort cellulaire**

Le traitement YM155 diminuant l'expression de la SURVIVINE et de MCL-1, initialement décrit dans la littérature et également observé dans notre modèle plus ou moins efficacement selon les lignées (Figure 62), nous avons voulu étudier si la simple ou co-déplétion en SURVIVINE et/ou en MCL-1 pouvait mimer la mort cellulaire déclenchée par le YM155.

Nous avons vérifié que les déplétions par ARN interférents étaient efficaces en évaluant l'expression de la SURVIVINE et MCL-1 par immunoblot dans les différentes lignées.

La déplétion seule, de la SURVIVINE ou de MCL-1 dans les lignées cellulaires n'induit que peu de mort cellulaire non significatif (Figure 63 A, B et C). Il en est de même pour la co-déplétion en SURVIVINE et MCL-1. La déplétion de ces deux protéines n'est donc pas suffisante pour reproduire les effets du YM155 sur l'induction de la mort cellulaire.

La mort cellulaire induite par le YM155 n'est pas fonction de la déplétion de la SURVIVINE et de MCL-1.



**Figure 63 : La co-déplétion des protéines SURVIVINE et MCL-1 n'induit pas de mort cellulaire significative.**

A, C et D Les lignées Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 sont transfectées avec différents ARN interférents. Les déplétions simples avec les ARN interférents contrôle (Ct), SURVIVINE et MCL-1 sont de 48 heures avant l'analyse de la mort cellulaire par lecture du marquage APO2.7 en cytométrie en flux. La co-déplétion en SURVIVINE et MCL-1 par ARN interférence est réalisée avec une première transfection de l'ARN interférent ciblant l'ARNm codant pour la SURVIVINE puis une seconde transfection 8 heures plus tard avec l'ARN interférent ciblant l'ARNm codant pour MCL-1. B L'extinction des protéines par ARN interférence a été vérifiée par immunoblot ici dans la lignée Cal51. (n=3)

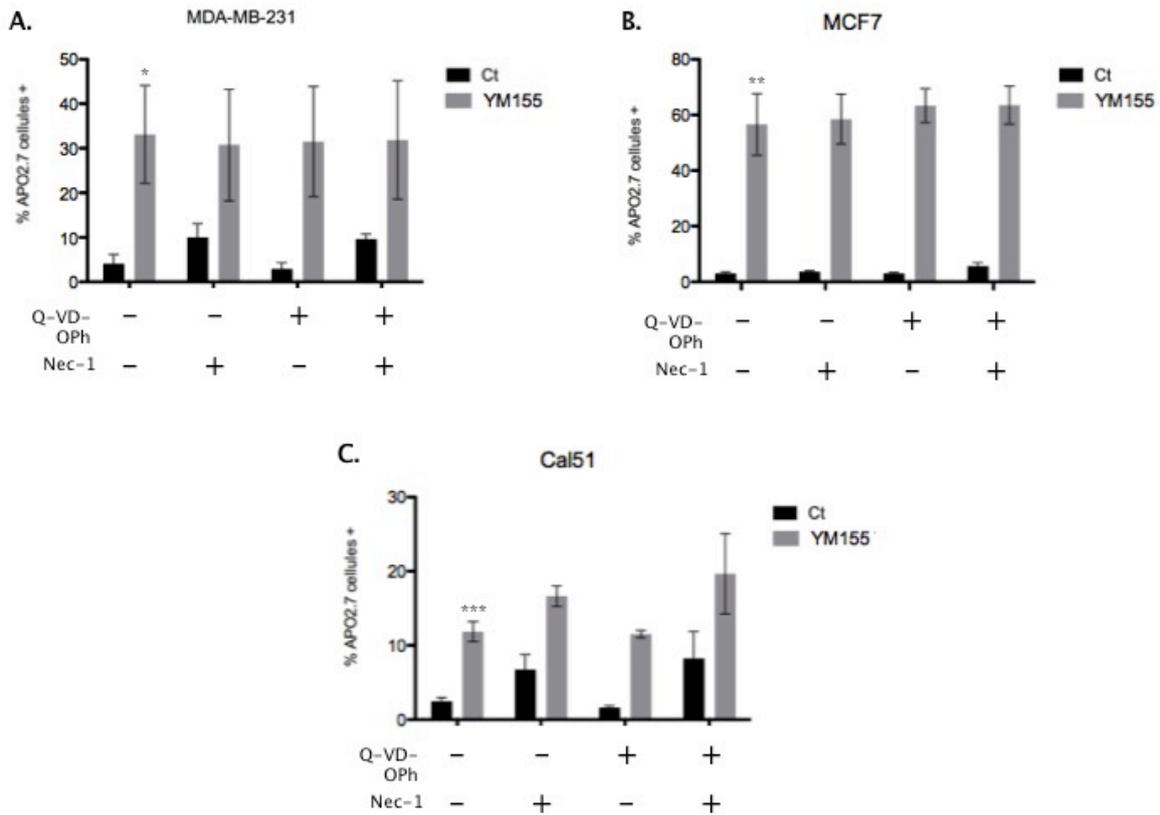
## C. Voies cellulaires impliquées dans la mort induite par le YM155

Malgré l'absence de données en faveur d'une mort dépendante de la SURVIVINE ou de MCL-1 après traitement avec le YM155, mais au vu de l'efficacité de cette molécule, nous nous sommes interrogés sur les voies de mort cellulaire déclenchées par le YM155, afin de mieux comprendre ses mécanismes cytotoxiques.

### *1. La mort cellulaire induite par le YM155 est n'est pas dépendante des CASPASES, ni de la kinase RIP1*

Nous avons voulu analyser si la mort cellulaire déclenchée par le YM155 était de l'apoptose classique induisant une activation des CASPASES, en utilisant des inhibiteurs pan-CASPASES, le Q-VD-OPh et le z-VADfmk.

Nous avons prétraité les lignées cellulaires avec le Q-VD-OPh (10 $\mu$ M), dont nous avons vérifié l'efficacité à inhiber l'apoptose induite par la Staurosporine. Puis nous avons traité les lignées pendant 48 heures avec le YM155 en présence de l'inhibiteur. Nous avons évalué la mort cellulaire à l'aide du marquage APO2.7 en cytométrie en flux (Cf Matériel et Méthodes). Ce marquage reconnaît un épitope mitochondrial, qui est détecté en cas de déclenchement de mort cellulaire mais non spécifique de l'apoptose et de l'activation des CASPASES selon les modèles cellulaires décrits. L'inhibition de l'activité des CASPASES n'affecte pas significativement la mort induite par le YM155 comme nous le montre la Figure 64. Le YM155 n'induit donc pas une mort cellulaire reposant uniquement sur l'activation des CASPASES.



**Figure 64 : La mort cellulaire induite par le YM155 n'est pas bloquée par un inhibiteur de CASPASES, ni par un inhibiteur de la nécroptose, ni par ces deux agents combinés.**

A, B et C Un prétraitement de 2 heures est réalisé avec un inhibiteur pan-CASPASES, le Q-VD-OPh (10µM) et/ou un inhibiteur de la kinase RIP1, la Nécrostatine-1 (30µM). Après 48 heures de traitement avec le YM155, l'évaluation de la mort cellulaire dans les trois lignées est réalisée par la lecture du marquage APO2.7 par cytométrie en flux. (n=3)

Nous avons alors voulu analyser si la mort cellulaire induite par le YM155 pouvait être de la nécroptose, mort cellulaire dépendante des kinases RIP (Linkermann and Green, 2014). Pour répondre à cette hypothèse, nous avons utilisé la Nécrostatine-1, un inhibiteur de la kinase RIP1 qui est impliqué dans le processus de nécroptose. Un prétraitement à la Nécrostatine-1, ne modifie pas l'induction de mort cellulaire des lignées induit par le traitement YM155 (Figure 64). La nécroptose est une mort cellulaire qui a été décrite pour la première fois dans la lignée cellulaire murine L929. Elle a été caractérisée par son induction par le TNFα lorsque les CASPASES sont inhibées (Vercaemmen et al., 1998). C'est pourquoi nous avons prétraité les lignées cellulaires avec le Q-VD-OPh et la Nécrostatine-1. Suite aux 48 heures de traitement avec le YM155, aucune modification de la mort cellulaire n'est observée (Figure 64). Le YM155 n'est pas une molécule induisant de la nécroptose.

La mort induite par le YM155 n'est ni une apoptose classique dépendante des CASPASES ni de la nécroptose.

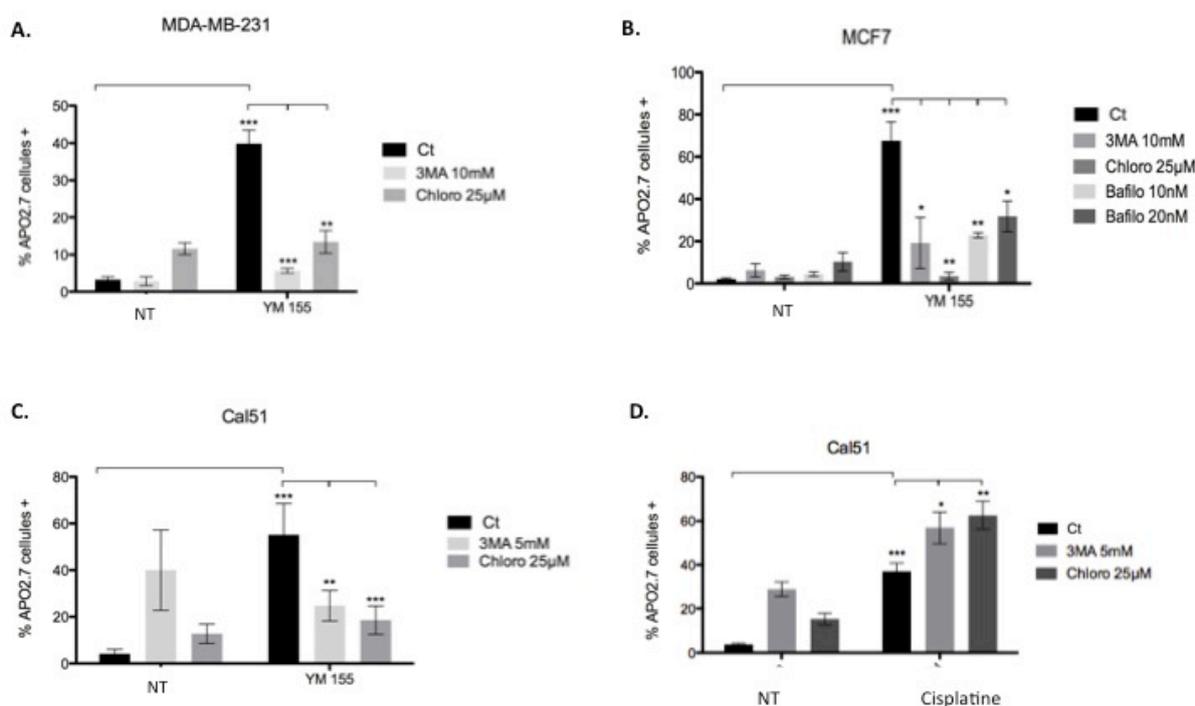
## **2. *L'autophagie est nécessaire à la mort induite par le YM155***

Dans un modèle de cancer de la prostate il a été mis en évidence que la mort induite par le YM155 est dépendante de l'autophagie (Wang et al., 2011).

Nous avons voulu étudier si dans le modèle de cancer du sein que le YM155 induisait également une mort dépendante de l'autophagie. Aussi nous avons utilisé trois inhibiteurs de l'autophagie (Figure 72). La 3MA (3-méthyladénine) inhibe la voie autophagique très en amont, elle empêche la formation des autophagosomes. La Chloroquine est un inhibiteur qui agit en aval de la voie et qui empêche la fusion des autophagosomes et les lysosomes et donc la dégradation des éléments contenus dans les autophagosomes. Cette molécule a un tropisme particulier pour les lysosomes et s'accumule dans ceux-ci, empêchant leur acidification, l'activation des enzymes lysosomales et donc le processus de dégradation. La Bafilomycine a un mode d'action semblable à la Chloroquine. En effet il empêche l'acidification des lysosomes mais en inhibant les ATPases membranaires.

Après une incubation de deux heures avec ces différents inhibiteurs, les lignées cellulaires sont traitées avec le YM155 pendant 48 heures. Puis nous avons évalué la mort cellulaire en cytométrie en flux, à l'aide de l'immunomarquage APO2.7. La 3MA (3-méthyladénine) est utilisée à différentes concentrations en fonction de la toxicité en agent simple qu'elle peut induire sur les lignées. La lignée Cal51 est très sensible à la 3MA ce qui peut indiquer une dépendance à l'autophagie de la lignée pour sa survie (Figure 65 C). Nous pouvons remarquer que sur la Figure 65 le prétraitement avec la 3MA diminue efficacement et de manière significative la mort induite dans les 3 lignées cellulaires. L'effet est le même avec la Chloroquine (Chloro) (Figure 65). La Bafilomycine (Bafilo), permet aussi de réduire la mort cellulaire induite par le YM155 dans la lignée MCF7 (Figure 65 C). Cette molécule en agent simple est très toxique même à de très faibles concentrations dans les deux autres lignées. Nous avons donc utilisé cet inhibiteur uniquement sur la lignée MCF7 qui montre une plus grande résistante.

L'inhibition de l'autophagie par différents inhibiteurs qui agissent sur des points différents de cette voie bloque la mort cellulaire qu'induit le YM155 dans les trois lignées du cancer du sein. Le processus de mort cellulaire déclenché par le YM155 est donc dépendant de la voie autophagique également dans les cellules tumorales mammaires.



**Figure 65 : L'inhibition de l'autophagie bloque la mort cellulaire induite par le YM155.**

A, B et C Un prétraitement de 2 heures avec les inhibiteurs chimiques indiqués a été réalisé sur les lignées cellulaires avant le traitement de 48 heures au YM155. La 3MA (3-méthyladénine) est utilisé à 5 ou 10mM, la Chloroquine (Chloro) à 25µM et la Bafilomycine (Bafilo) à 10 et 20nM. D La lignée Cal51 a tout d'abord subi un prétraitement de 2 heures avec les inhibiteurs de l'autophagie la 3MA (3-méthyladénine) à 5mM, ou la Chloroquine (Chloro) à 25µM, puis un traitement de 48 heures avec le Cisplatine à 6,66µM Le pourcentage de cellules positives pour le marquage APO2.7 déterminé par cytométrie en flux est représentatif de l'induction de mort cellulaire. (n=3)

Nous avons évalué l'implication de l'autophagie dans la réponse au traitement de chimiothérapie conventionnelle dans les lignées cellulaires. Pour ce faire nous avons pré-traité la lignée Cal51 avec les différents inhibiteurs de l'autophagie (3-MA et Chloroquine) puis nous avons incubé les cellules 48 heures avec le Cisplatine.

Le Cisplatine, agent de chimiothérapie conventionnelle, de la famille des platines, se lie aux bases puriques de l'ADN (adénine et guanine) créant des distorsions de l'ADN et empêchant la transcription, la réplication et la division cellulaire, aboutissant à la formation de dommages à l'ADN.

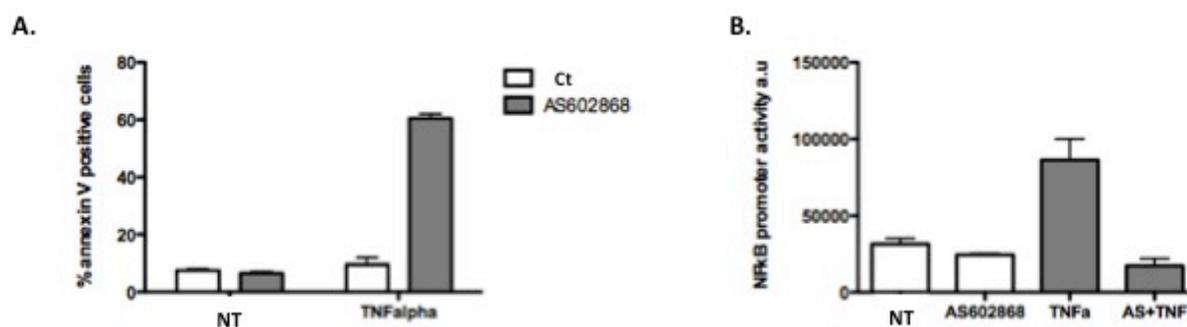
Nous avons observé une sensibilisation de la lignée Cal51 au Cisplatine lorsque l'autophagie est inhibée (Figure 65 D). Ceci est en accord avec l'utilisation en clinique de l'inhibition de l'autophagie pour potentialiser l'effet toxique des chimiothérapies (Sui et al., 2013). Dans ce contexte l'autophagie est donc une voie de survie cellulaire, comme décrit dans la plupart des cas.

### **3. La voie NF-kB est impliquée dans la mort induite par le YM155**

Nous avons évalué le rôle de la voie NF-kB canonique dans le processus de mort déclenchée par le YM155 car elle est connectée à l'autophagie (Xiao, 2007), elle est très souvent activée par les chimiothérapies et elle participe également à la régulation de la SURVIVINE dans un modèle de cancer du sein (Papanikolaou et al., 2011) mais aussi dans d'autres modèles comme les lymphomes (Tracey et al., 2005).

Nous avons combiné le traitement YM155 avec un inhibiteur de la voie NF-kB l'AS602868 (AS), ciblant la kinase IKK2 (Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit 2) (Frelin et al., 2003). Cette molécule inhibe directement l'activité de la kinase IKK2 qui ne peut plus phosphoryler la protéine I $\kappa$ B $\alpha$ , empêchant alors sa dégradation par le protéasome. I $\kappa$ B $\alpha$  reste donc lié à RelA qui ne peut se relocaliser au noyau et jouer son rôle de facteur de transcription. Cette molécule a été utilisée en essais cliniques chez des patients atteints d'hémopathie, mais arrêtés pour cause de toxicité. L'AS602868, dont la cible principale est IKK2, avec une IC<sub>50</sub> de 20nM, inhibe aussi la kinase FLT3, avec une IC<sub>50</sub> de 678nM, qui est aussi capable d'activer la voie NF-kB (Griessinger et al., 2007) et inhibe également JNK2 à une IC<sub>50</sub> de 600nM (Frelin et al., 2003).

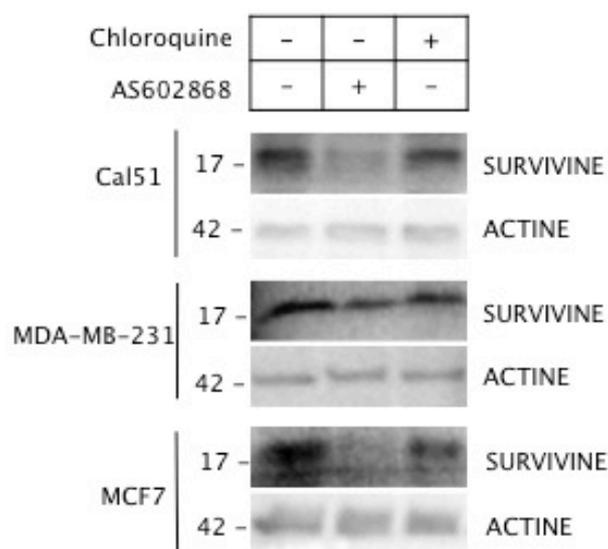
Nous avons vérifié la capacité de l'AS à inhiber la voie NF-kB. Pour ce faire nous avons utilisé du TNF $\alpha$ , connu pour activer la voie de mort cellulaire via les récepteurs au TNF et l'activation de la CASPASE 8 mais aussi pour activer la voie NF-KB, voie de survie qui va alors contrecarrer la voie de mort activée en parallèle. Le traitement avec l'AS602868, bloquant la voie NF-kB et donc la voie de survie cellulaire devrait favoriser la voie de mort cellulaire. En effet, l'AS602868 induit une augmentation de la mort cellulaire en co-traitement avec le TNF $\alpha$  (Figure 66 A). De plus, nous avons vérifié que l'activation de la voie NF-kB et de son activité transcriptionnelle après traitement TNF $\alpha$  était diminuée par l'AS602868 (Figure 66 B).



**Figure 66 : L'AS602868 est un inhibiteur de la voie NF-kB.**

A La lignée MDA-MB-231 a été prétraitée 3 heures avec l'AS602868 ( $10\mu\text{M}$ ) puis exposée pendant 48 heures au TNF $\alpha$  (50ng/mL). Le marquage Annexin V analysé en cytométrie en flux permet d'évaluer la mort cellulaire induite (% annexin V positive cells). B La lignée MCF7 a été transfectée avec un plasmide codant pour la luciférase sous contrôle d'un promoteur pouvant être régulé par la voie NF-kB. Les cellules ont été prétraitées 3 heures avec l'AS602868 ( $10\mu\text{M}$ ) puis exposées pendant 48 heures au TNF $\alpha$  (50ng/mL). L'activité de la luciférase est ensuite mesurée, reflétant l'activité du promoteur (NFkB promoteur activity a.u.). (n=3)

Nous avons vérifié l'effet de l'inhibiteur AS602868 sur l'expression de la SURVIVINE. La Figure 67 permet de mettre en évidence l'inhibition de l'expression de la SURVIVINE après 48 heures de traitement avec l'inhibiteur AS602868, contrairement à l'inhibiteur de l'autophagie, la Chloroquine qui n'a pas d'effet. L'effet de l'AS602868 est très prononcé dans les lignées Cal51 et MCF7. Dans la lignée MDA-MB-231, l'AS602868 ne fait apparaître qu'une très faible diminution de l'expression de la SURVIVINE. Le blocage de la voie NF-kB diminue l'expression de la SURVIVINE. Cette voie régule l'expression de la SURVIVINE dans au moins deux des lignées cellulaires utilisées.



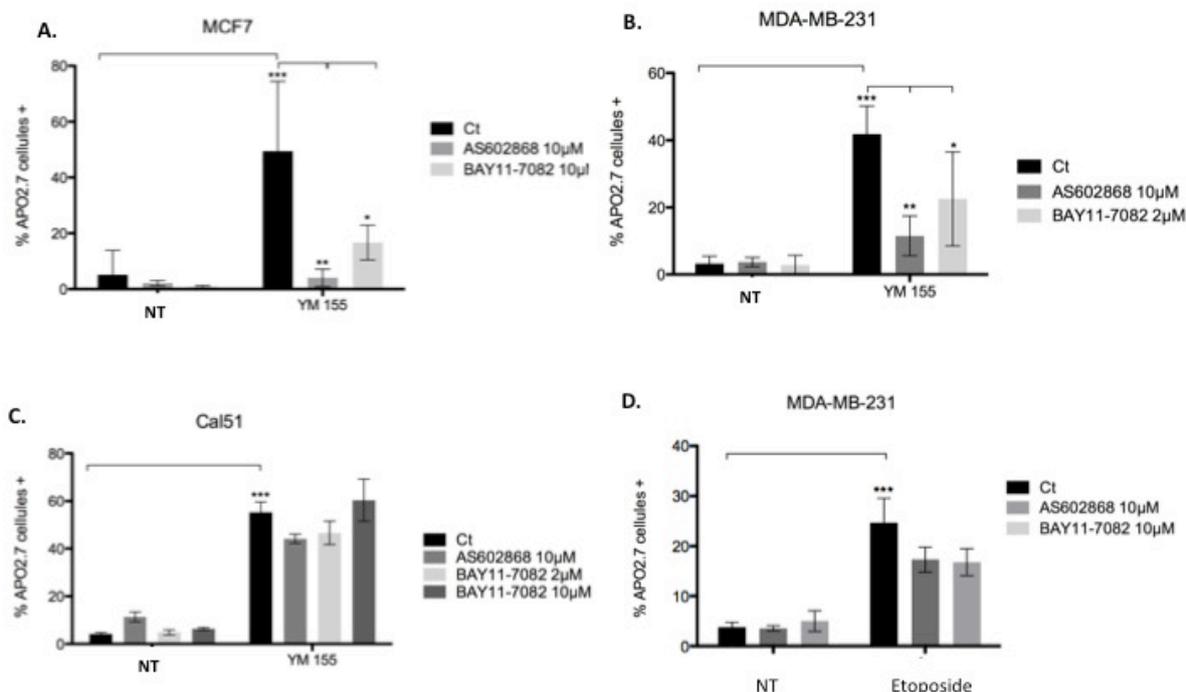
**Figure 67 : L'AS602868, inhibiteur de la voie NF-kB diminue l'expression de la SURVIVINE.**

Après 48 heures de traitement avec l'inhibiteur de la voie NF-kB, l'AS602868, utilisé à  $10\mu\text{M}$  ou avec l'inhibiteur de l'autophagie, la Chloroquine, utilisé à  $25\mu\text{M}$ , les lysats protéiques totaux provenant des trois lignées cellulaires sont analysés afin d'observer les variations d'expression de la SURVIVINE. (n=3)

Nous nous sommes intéressés à l'effet d'un co-traitement YM155 et AS602868 sur la mort cellulaire dans les lignées du cancer du sein. Pour ce faire, après un prétraitement avec l'inhibiteur de la voie NF-kB, l'AS602868, et 48 heures avec le YM155 les cellules marquées avec l'anticorps APO2.7 sont analysées en cytométrie en flux pour évaluer la mort cellulaire. L'AS602868 à  $10\mu\text{M}$ , en agent simple n'induit pas de mort cellulaire des trois lignées cellulaires (Figure 68 A, B et C). De manière inattendue, le prétraitement avec l'AS602868, protège très efficacement les cellules de la mort cellulaire induite par le YM155 seul. Nous observons cet effet dans les lignées cellulaires MCF7 (Figure 68 B) et MDA-MB-231 (Figure 68 A). En revanche cette protection est faible et statistiquement non significative dans la lignée Cal51 (Figure 68 C).

Nous avons également utilisé le BAY 11-7085 (BAY), un autre inhibiteur chimique de la voie NF-kB. Cet inhibiteur inhibe l'activation de la voie NF-kB en bloquant la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$ . Nous avons utilisé cet inhibiteur à des concentrations de  $2\mu\text{M}$  et  $10\mu\text{M}$  sur les lignées MDA-MB-231 et MCF7 respectivement n'induisant pas de mort cellulaire en agent simple. Ces deux doses ont aussi été utilisées sur la lignée Cal51. Le BAY 11-7085 diminue la mort cellulaire induite par le YM155 dans la lignée MCF7 et MDA-MB-231 (Figure 68 A et B respectivement). L'effet du BAY 11-7085 reste en revanche moins important que celui de l'AS602868. Quant à la lignée Cal51, cet inhibiteur ne modifie pas la

mort cellulaire induite par le YM155 (Figure 68 C) comme nous l'avons déjà vu avec l'AS602868.



**Figure 68 : La voie NF-kB participe et est nécessaire à la mort cellulaire induite par le YM155 dans les lignées MCF7 et MDA-MB-231.**

A, B et C Les lignées cellulaires sont prétraitées pendant 2 heures avec un inhibiteur chimique de la voie NF-kB, puis après 48 heures de traitement avec le YM155. Les inhibiteurs de la voie NF-kB utilisés sont le BAY 11-7085 à 2 et 10µM et l'AS602868 à 10µM. D La lignée MDA-MB-231 après avoir été prétraitée pendant 2 heures avec des inhibiteurs de la voie NF-kB, l'AS602868 (AS) à 10µM ou le BAY 11-7085 (BAY) à 10µM, est incubée pendant 48 heures avec l'Etoposide à 100µM. La lecture du marquage APO2.7 en cytométrie en flux permet d'évaluer la mort cellulaire. (n=3)

Nous voulions également évaluer l'implication de la voie NF-kB dans la réponse au traitement de chimiothérapie conventionnelle. Nous avons donc étudié l'effet de l'inhibition de la voie NF-kB, sur la mort induite par l'Etoposide dans la lignée MDA-MB-231.

L'Etoposide, un inhibiteur de la Topoisomérase II. Cette enzyme permet d'éliminer les supertours de l'ADN produits lors de la réplication et ainsi empêcher la survenue de cassures de l'ADN. L'Etoposide, en bloquant cette enzyme, augmente tous les supertours de l'ADN et donc les cassures qui en résultent.

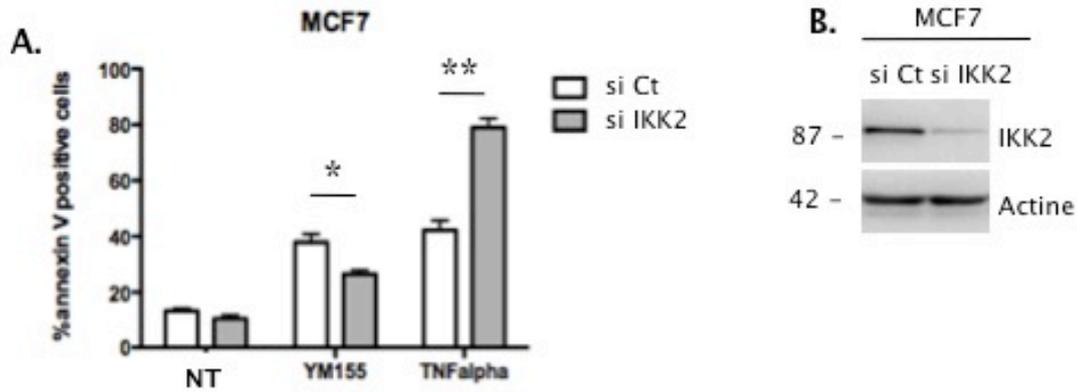
Les inhibiteurs de la voie NF-kB, utilisés en co-traitement dans la lignée MDA-MB-231 avec l'Etoposide tendent à diminuer la mort cellulaire induite par l'Etoposide seul (Figure 68 D). Il en est de même sur la mort induite par le YM155 mais avec une efficacité bien plus

prononcée. La voie NF- $\kappa$ B n'est pas impliquée dans la survie cellulaire dans ce contexte, comme souvent d'écrit, mais semble participer un peu à la mort cellulaire induite par l'Etoposide.

Pour conforter l'implication de la voie NF- $\kappa$ B dans la mort cellulaire induite par le YM155, nous avons utilisé une approche par ARN interférence ciblant IKK2. Dans la lignée MCF7, 48 heures après transfection de siRNA ciblant IKK2 les cellules sont traitées 48 heures avec le YM155. La mort cellulaire est évaluée par lecture en cytométrie en flux du marquage Annexin V. Nous avons également vérifié l'efficacité de l'extinction de IKK2 par immunoblot (Figure 69 B). La déplétion de la protéine IKK2 diminue la mort cellulaire induite par le YM155 dans la lignée MCF7. La diminution de la mort cellulaire est moins drastique qu'avec l'utilisation de l'AS602868 mais est tout de même visible et significative (Figure 69 A).

Afin d'avoir un contrôle positif de l'efficacité de l'extinction d'IKK2 sur la voie NF- $\kappa$ B, nous avons traité la lignée MCF7 avec du TNF $\alpha$ . L'extinction de IKK2 augmente la mort cellulaire sous traitement TNF $\alpha$  (Figure 69 A) comme peut le faire l'AS602868.

Le blocage de la voie NF- $\kappa$ B canonique inhibe la mort cellulaire induite par le YM155. L'induction de la mort cellulaire par le YM155 nécessite la voie NF- $\kappa$ B et plus particulièrement l'activité de la kinase IKK2.



**Figure 69 : La déplétion de la kinase IKK2 diminue la mort induite par le YM155.**

A Après 48 heures d'extinction de la protéine IKK2 par ARN interférence, la lignée MCF7 est traitée 48 heures avec le YM155 ou du TNF $\alpha$  (50ng/mL). La mort cellulaire est déterminée par la lecture en cytométrie en flux du marquage Annexin V (% annexin V positive cells). B La vérification de l'extinction de la protéine IKK2 est vérifiée par immunoblot. (n=3)

## D. Modifications des voies de signalisation et mécanismes cellulaires induits par le YM155

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de cette molécule nous avons étudié les effets du YM155 sur les voies de signalisation cellulaire liées à la mort et au cycle cellulaire et nous avons également évalué les effets des inhibiteurs de la mort cellulaire induite, sur ces voies, dans la lignée MCF7, où ils sont le plus efficaces.

### 1. Effet du YM155 sur des acteurs de l'apoptose

Malgré la persistance de la mort cellulaire induite par le YM155 après blocage de l'activité des CASPASES, nous nous sommes intéressés à l'action de cette molécule sur les protéines impliquées dans l'apoptose.

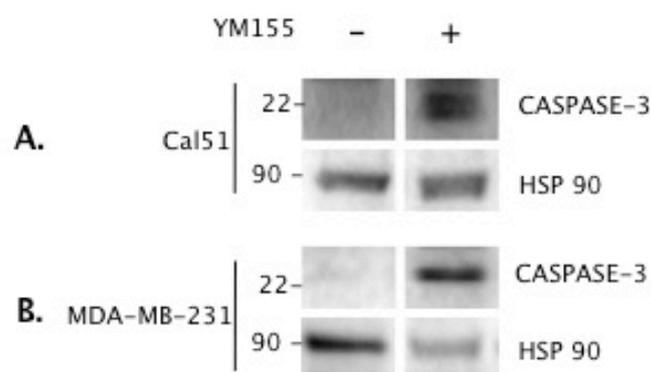
#### a) Activation de la CASPASE 3 après traitement au YM155

Dans un premier temps nous avons voulu étudier l'effet du YM155 sur l'activation des CASPASES, en analysant leur clivage. Même si ce processus intervient essentiellement dans

l'apoptose, les CASPASES peuvent aussi intervenir dans d'autres processus. L'activation des CASPASES peut aussi être sublétales et enclencher diverses voies de signalisation.

Nous nous sommes donc intéressés au clivage de la CASPASE 3 qui est souvent utilisé comme marqueur d'événement de mort cellulaire. Nous avons analysé l'apparition du clivage de la CASPASE 3 par immunoblot dans les lignées Cal51 et MDA-MB-231 (Figure 70). Nous ne pouvions le faire dans la lignée MCF7 puisque celle-ci est déficiente pour la CASPASE 3. Le traitement YM155 de 48 heures fait apparaître une forme clivée intermédiaire de 22 kDa de la CASPASE 3 dans les deux lignées cellulaires. Ce clivage est inhibé par les inhibiteurs pan-CASPASES (données non montrées) et donc non nécessaire à la mort cellulaire induite (Figure 64), confortant l'argument que la mort cellulaire observée sous YM155 est indépendante des CASPASES.

Le clivage et l'activation de la CASPASE 3 induit par le YM155 n'est pas nécessaire à la mort cellulaire (Figure 64), mais pourrait participer à une boucle d'amplification et à des cascades de protéases. Nous pouvons donc utiliser la CASPASE 3 active comme marqueur d'induction de mort cellulaire induite par le YM155.



**Figure 70 : Le YM155 induit un clivage de la CASPASE 3.**

A et B Les lignées cellulaires Cal51 et MDA-MB-231 ont été traitées 48 heures avec le YM155 à A. 80nM ou B. 30nM, puis nous avons analysé le clivage de la CASPASE 3 sur les lysats protéiques totaux. (n=2)

### b) Clivage de BAX sous traitement YM155

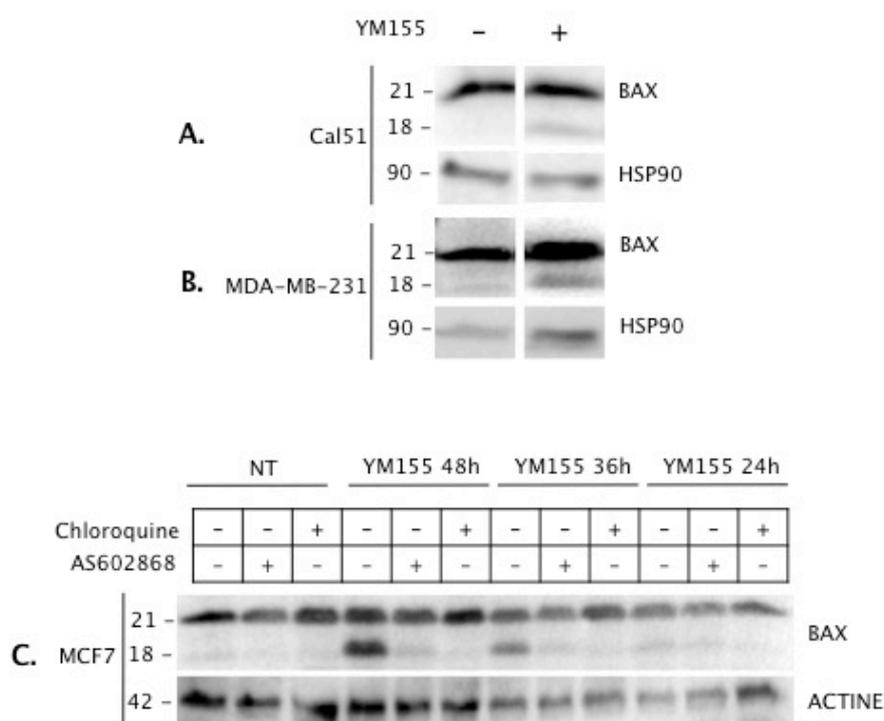
Parmi les nombreuses protéines de la famille Bcl-2 dont nous avons étudié l'expression sous traitement YM155, la protéine BAX a particulièrement retenu notre attention.

En effet, nous avons vu apparaître après traitement YM155, la forme clivée de BAX de 18kDa. Ce clivage apparaît dans toutes les lignées étudiées (Figure 71). Ce clivage n'apparaît qu'après plus de 24 heures de traitement. En effet dans les lignées Cal51 nous n'observons pas ce clivage à 24 heures après traitement avec le YM155 (Figure 71 A). Il en est de même dans la lignée MCF7 où le clivage apparaît dans la condition traitée 36 heures et non celle traitée 24 heures (Figure 71 C). Le clivage de BAX apparaît également tardivement comme la mort cellulaire déclenchée par le YM155.

Nous avons également voulu déterminer l'effet des inhibiteurs chimiques qui bloquent la mort induite par le YM155, sur le clivage de BAX. L'AS602868 et la Chloroquine, qui inhibent la mort induite par le YM155 bloquent le clivage de BAX dans la lignée MCF7 (Figure 71 C). Ce clivage de BAX est également maintenu avec l'utilisation des inhibiteurs de CASPASES, le Q-VD-OPh et le z-VADfmk, qui n'ont également aucun effet sur la mort cellulaire que déclenche le YM155 (données non montrées). Ce clivage est donc indépendant de l'activité CASPASES.

Dans la lignée MCF7, le clivage de BAX concorde avec l'apparition de la mort cellulaire. Les inhibiteurs de l'autophagie et de la voie NF-kB préviennent le clivage de BAX lorsqu'ils protègent de la mort cellulaire induite par le YM155.

Nous nous interrogeons donc sur le fait que BAX et son clivage puissent être un marqueur de mort cellulaire ou s'ils sont plutôt un marqueur de l'activité des calpaïnes, connues pour cliver BAX, plutôt qu'acteurs de la mort cellulaire.



**Figure 71 : Le YM55 induit un clivage de la protéine BAX qui est inhibé par la Chloroquine et l'AS2602868 lorsque ceux-ci bloquent la mort cellulaire.**

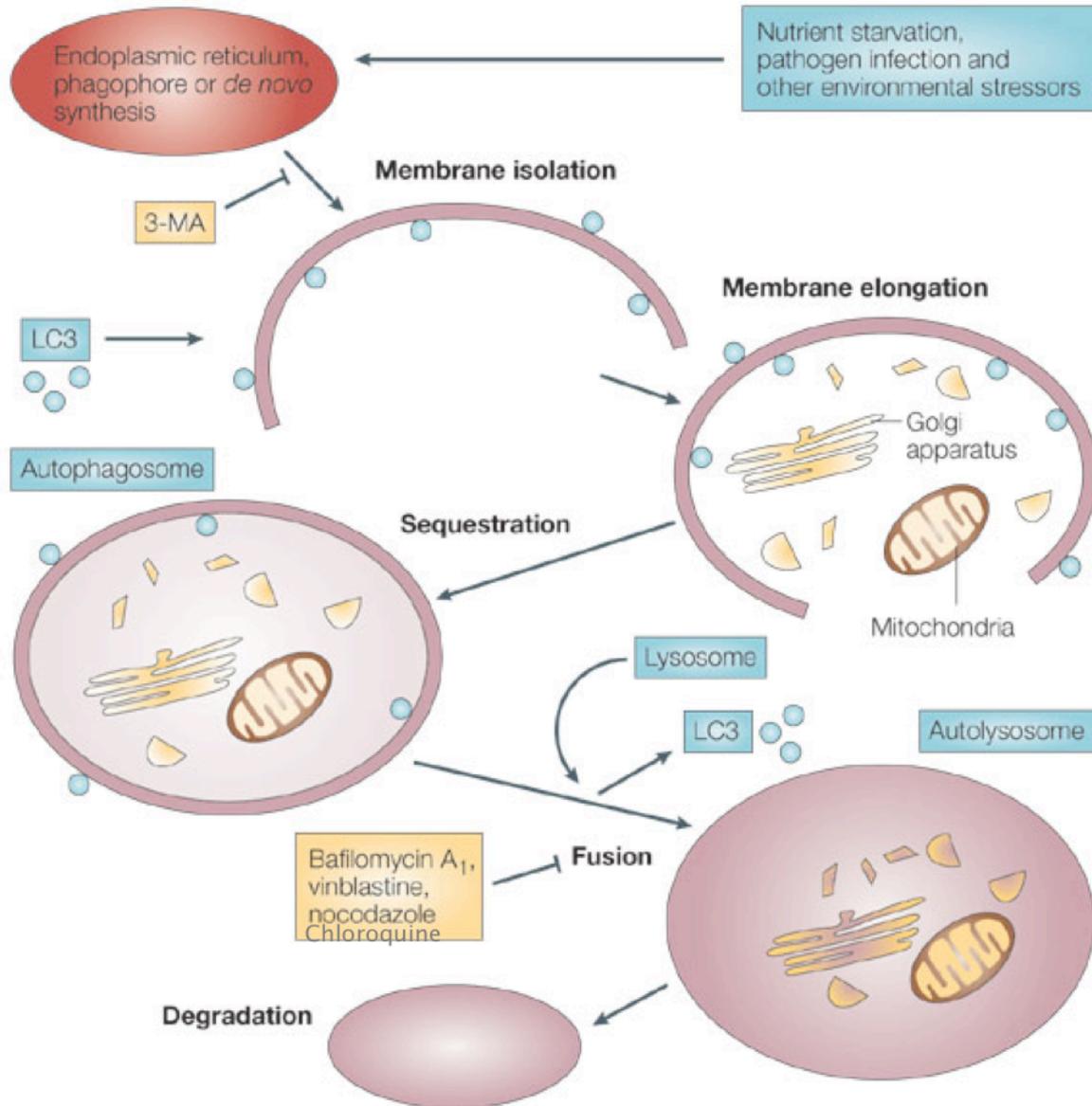
A et B Les lignées cellulaires Cal51 et MDA-MB-231 ont été traitées 48 heures avec le YM155 à A. 80nM, B. 30nM C La lignée MCF7 a été prétraitée 2 heures avec l'inhibiteur de l'autophagie, la Chloroquine à 25 $\mu$ M ou avec l'inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B, l'AS602868 à 10 $\mu$ M puis traitée 24, 36 ou 48 heures avec de YM155 à 50nM. Les lysats cellulaires sont analysés par immunoblot afin de visualiser les modifications d'expression de BAX et l'apparition de la forme clivée. (n=3)

## 2. Le YM155 active le flux autophagique

Nous avons observé que la mort cellulaire induite par le YM155 était inhibée lorsque l'on bloquait le flux autophagique par la Chloroquine, comme déjà décrit dans la littérature (Wang et al., 2011). Nous avons donc analysé l'effet du YM155 sur le flux autophagique dans les lignées du cancer du sein.

Nous avons utilisé un marqueur de l'autophagie la protéine LC3 afin de répondre à cette question. Cette protéine a deux formes, une première forme de 18kDa, LC3-I, et une forme secondaire de 14kDa, LC3-II, qui va être clivée puis subir une lipodation, permettant son insertion dans les membranes des autophagosomes et leur formation. Cette seconde forme se trouve insérée dans les membranes des autophagosomes contrairement à la première forme

(Figure 72). Pour comprendre les variations du flux autophagiques, l'expression des deux formes est à prendre en compte (Mizushima and Yoshimori, 2007).



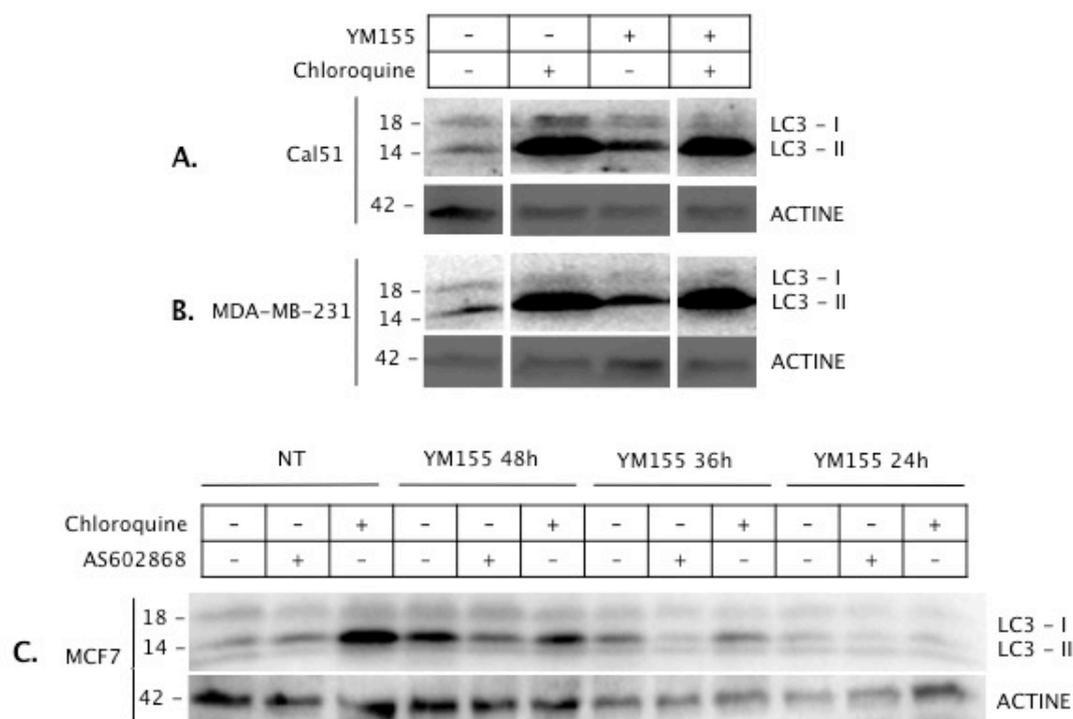
**Figure 72 : Processus cellulaire de l'autophagie et les effets de différents inhibiteurs.**

D'après (Kondo et al., 2005)

Le traitement YM155 fait apparaître une accumulation de la forme secondaire, LC3-II, dans les trois lignées cellulaires par rapport au cellules non traitées (Figure 73). Cette accumulation apparaît à partir de 36 heures dans la lignée MCF7 (Figure 73 C). L'augmentation du flux autophagique est détectable après 36 heures de traitement et la mort

cellulaire à 48 heures de traitement YM155. L'accumulation de la forme secondaire sous traitement Chloroquine indique bien que le flux autophagique est existant à la fois dans les cellules à l'état basal mais aussi sous traitement YM155 (Figure 73).

Dans la lignée MCF7, l'AS602868 semble diminuer l'accumulation de LC3-II obtenue sous YM155 (Figure 73 C). La voie NF-kB pourrait donc moduler l'autophagie dans cette lignée.

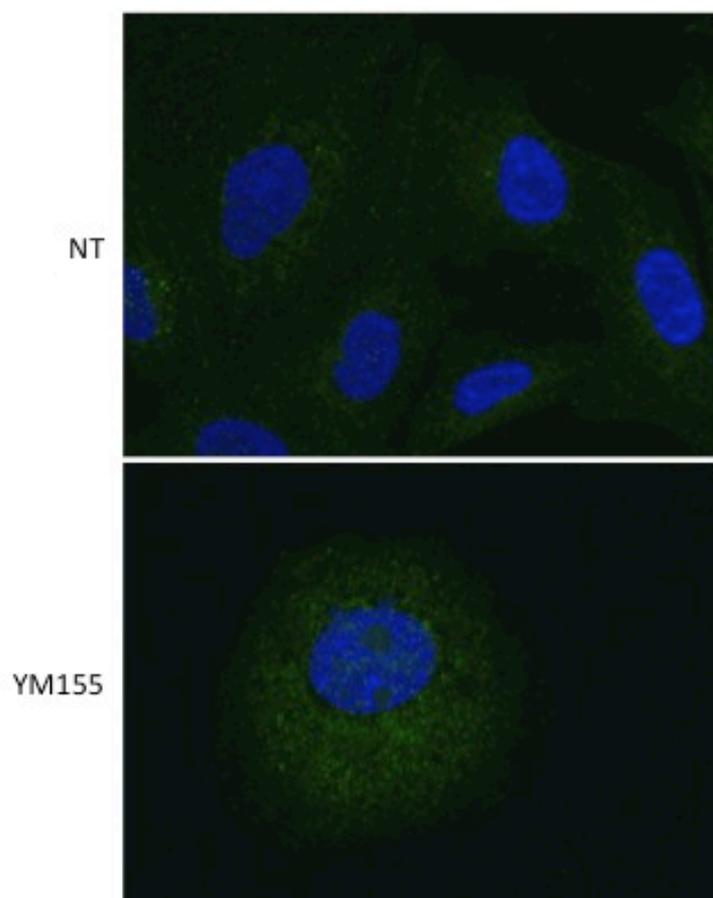


**Figure 73 : Le YM155 augmente le flux autophagique qui est bloqué par la Chloroquine.**

A et B Les lignées Cal51, MDA-MB-231 sont traitées 48 heures avec le YM155 à A. 80nM et B. 30nM. C La lignée MCF7 prétraitée 2 heures avec un inhibiteur de l'autophagie, la Chloroquine à 25µM, ou un inhibiteur de la voie NF-kB, l'AS602868 à 10µM, a été traitée ensuite 24, 36 ou 48 heures avec 50nM de YM155. L'analyse par immunoblot des lysats cellulaires totaux nous ont permis de voir les modifications d'expression des deux formes de la protéine LC3 (LC3 – I et LC3 – II) marqueurs de la modification du flux autophagique. (n=3)

Nous avons analysé par immunocytochimie l'expression et la localisation cellulaire de la protéine LC3 (forme I et II), sous traitement YM155 (Figure 74). Les images d'immunocytochimie montrent une augmentation cytoplasmique du marquage de la protéine LC3 après 48 heures de traitement avec le YM155 dans la lignée Cal51. Le marquage est également plus punctiforme que dans la condition non traitée (NT).

Le YM155 augmente le flux autophagique, en effet la protéine LC3 présente un marquage plus important et punctiforme pour la formation d'autophagosomes.



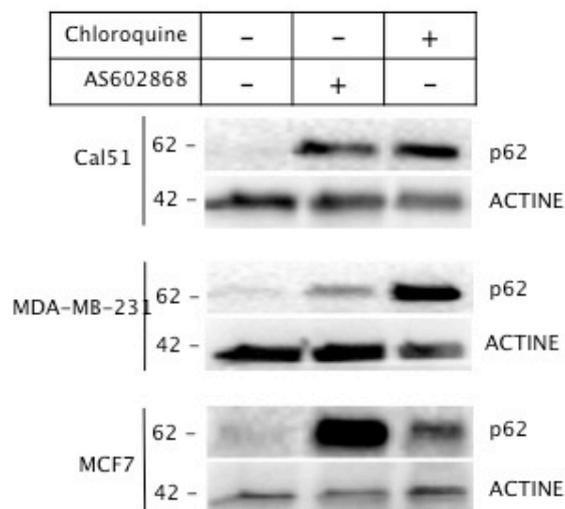
**Figure 74 : Image d'immunocytochimie de la protéine LC3.**

La lignée Cal51 a été traitée ou non 48 heures avec du YM155. Après fixation, immunomarquage de LC3 et marquage nucléaire en DAPI les cellules sont observées au microscope à fluorescence objectif X40.

Les inhibiteurs des voies de l'autophagie et de NF- $\kappa$ B bloquant tous deux, la mort induite par le YM155 dans deux lignées sur trois étudiées, nous voulions étudier si ces deux voies étaient connectées et si l'une pouvait influencer l'autre. Nous avons commencé à évaluer l'expression de p62. Cette protéine se lie aux protéines ubiquitinées à dégrader par autophagie et par liaison à LC3. p62 s'accumule lorsque l'autophagie est déficiente (Klionsky et al., 2012). De plus il a été démontré que p62 a un rôle activateur de la voie NF- $\kappa$ B, (Moscat and Diaz-Meco, 2009).

Nous observons une augmentation de l'expression de p62 après traitement Chloroquine, inhibiteur de l'autophagie, comme nous nous y attendions. Nous observons aussi cette accumulation de p62 sous traitement AS602868. L'augmentation de l'expression de p62 est plus importante que sous traitement Chloroquine dans la lignée MCF7, équivalente dans la lignée Cal51 et bien plus faible dans la lignée MDA-MB-231 (Figure 75).

L'AS602868 semble avoir un très léger effet le flux autophagique. La voie NF-kB pourrait donc avoir une action sur l'autophagie. Mais des analyses complémentaires seront à réaliser.



**Figure 75 : La Chloroquine et l'AS602868 augmente l'expression de la protéine p62.**

Après 48 heures de traitement avec la Chloroquine ou l'AS602868, les lysats protéiques des trois lignées cellulaires, Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 ont été analysés en immunoblot pour observer l'expression de la protéine p62.

## E. YM155 : Agent génotoxique

La déplétion en SURVIVINE par ARN interférence déclenche des dommages à l'ADN et nous avons très tôt fait l'hypothèse que le YM155, décrit comme suppresseur de la SURVIVINE pouvait également induire des dommages à l'ADN.

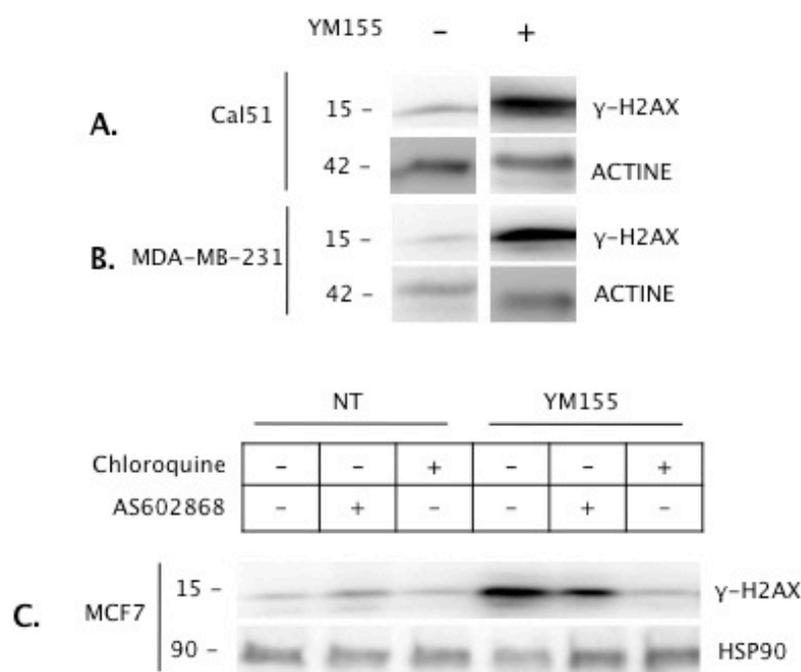
### 1. Effet du YM155 sur l'induction des dommages à l'ADN

Nous avons évalué tout d'abord les variations de phosphorylation de l'histone H2AX sur la Sérine 139 ( $\gamma$ -H2AX) par immunoblot.

Après 48 heures de traitements avec le YM155, nous avons observé une augmentation de  $\gamma$ -H2AX dans les trois lignées utilisées (Figure 76). Ces résultats sont en accord avec une publication de 2012 montrant la génotoxicité du YM155 (Glaros et al., 2012).

Nous avons également voulu évaluer l'effet des inhibiteurs de l'autophagie et de la voie NF-kB, capables de protéger la mort induite par le YM155, sur l'apparition de ces dommages à l'ADN. Dans la lignée MCF7 nous avons observé une diminution de  $\gamma$ -H2AX avec l'inhibiteur de l'autophagie, la Chloroquine (Figure 76 A et C). De plus, l'AS602868, inhibiteur de la voie NF-kB semble diminuer très légèrement le niveau de  $\gamma$ -H2AX dans la lignée MCF7 (Figure 76 C).

L'autophagie pourrait jouer un rôle sur l'induction des dommages à l'ADN par le YM155, comme la voie NF-kB cependant dans une moindre mesure.



**Figure 76 : Effet des inhibiteurs de l'autophagie et de la voie NF-kB sur les dommages à l'ADN induits par le YM155.** A et B Les lysats protéiques totaux obtenus après 48 heures de traitement YM155 ou C après prétraitement de 2 heures avec les inhibiteurs et 48 heures de traitement YM155 sont analysés afin de observer les variations de phosphorylation de l'histone H2AX, marqueur des dommages à l'ADN. (n=3)

## 2. Le traitement par le YM155 déclenche le recrutement des marqueurs précoces des dommages à l'ADN

Le marqueur  $\gamma$ -H2AX est lui-même un marqueur précoce de la signalisation des dommages à l'ADN que l'on voit apparaître après plus de 24 heures de traitement avec le YM155. La survenue des dommages à l'ADN est donc assez tardive après le traitement au YM155.

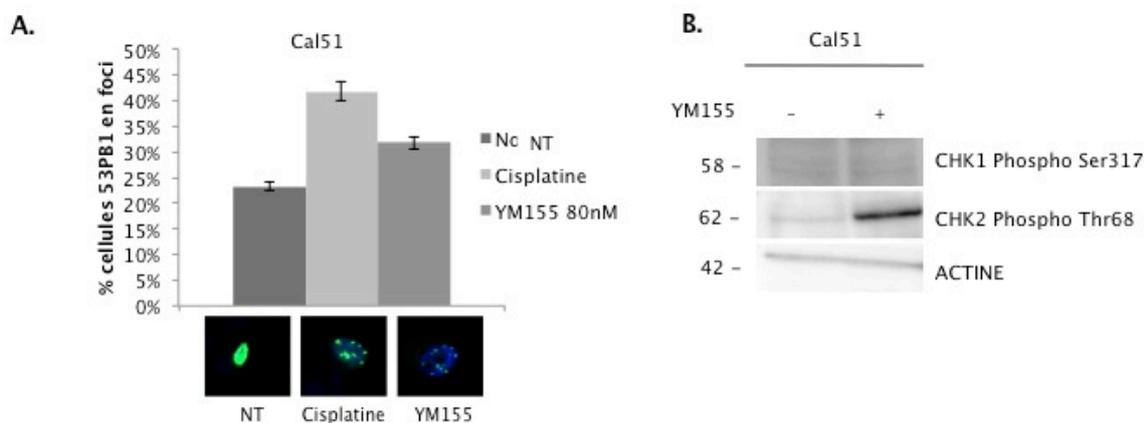
Nous nous sommes également intéressés à la protéine 53BP1. En effet cette protéine est aussi recrutée en foyers nucléaires, précocement sur les cassures double-brin de l'ADN afin de signaler les cassures et permet le recrutement d'autres protéines assurant ainsi la cascade de signalisation et la réparation. La protéine 53BP1 est recrutée suite aux dommages à l'ADN après activation d'ATM et phosphorylation de H2AX (Anderson et al., 2001). Elle permet l'amplification de la voie de signalisation ATM (Zgheib et al., 2005), le recrutement des acteurs précoces des voies de réparation, préférentiellement de la voie NHEJ (Daley and Sung, 2014).

Nous avons utilisé un plasmide codant pour la protéine recombinante 53BP1 fusionnée à la GFP, en transfection transitoire. Puis nous avons observé le marquage nucléaire de 53BP1 grâce à la fluorescence de la GFP, par microscopie à fluorescence. Le marquage nucléaire peut être diffus ou en foci, indiquant alors la présence de dommages à l'ADN et l'activation de recrutement des protéines de réparation. Nous avons déterminé le pourcentage de cellules ayant un marquage nucléaire ponctué en foci après 48 heures de traitement avec un génotoxique, le Cisplatine servant de contrôle, ou bien avec le YM155, dans la lignée Cal51 (Figure 77 A).

Les cellules non traitées présentent une population avec un marquage 53BP1-GFP en foci de 20%. Ceci correspond probablement à une activité basale de signalisation des dommages à l'ADN qui interviennent au cours des divisions des lignées cancéreuses ou éventuellement causé par le stress de la transfection du plasmide. Sous traitement Cisplatine, le pourcentage de cellules avec un marquage en foci est doublé. Enfin sous traitement YM155, les cellules avec un marquage 53BP1-GFP en foci représentent un peu plus de 30% (Figure 77 A). L'augmentation de cette population cellulaire montre l'effet génotoxique du traitement YM155.

Nous avons également évalué les modifications par phosphorylation de CHK1 et CHK2, deux protéines participant aux voies d'activation précoces de la signalisation et de réparation de l'ADN. Les phosphorylations de CHK1 sur la Sérine 317 et de CHK2 sur le Thréonine 68 sont dues aux kinases ATR et ATM respectivement en réponse à l'apparition de dommage à l'ADN afin d'activer les voies de signalisation permettant d'enclencher les voies de réparation (Smith et al., 2010). Un traitement de 48 heures dans la lignée Cal51 permet d'induire la phosphorylation de CHK2 sur la Thréonine 68 mais pas de CHK1 (Figure 77 B).

Cela suggère que le traitement YM155 active préférentiellement la kinase ATM en réponse aux dommages double-brin de l'ADN dans cette lignée cellulaire.



**Figure 77 : Le YM155 induit un recrutement en foyer nucléaire de la protéine 53BP1 et une phosphorylation de la protéine CHK2.**

A La lignée Cal51 a été transfectée avec le plasmide codant pour la protéine 53BP1-GFP. 24 heures après, les cellules sont traitées avec le Cisplatine ( $6,66\mu\text{M}$ ) ou le YM155 (80nM) pendant 48 heures. Les cellules sont ensuite fixées en PFA 1% et les noyaux marqués avec du DAPI. La visualisation de la fluorescence de la GFP se fait en microscopie à fluorescence. Le graphique représente le pourcentage de cellules transfectées avec le plasmide 53BP1-GFP présentant un marquage en foci comme le montre les images de microscopie à fluorescence. B Les lysats cellulaires totaux obtenus après 48 heures de traitement avec le YM155 sur la lignée Cal51, sont analysés en immunoblot afin de voir les modifications de phosphorylation des protéines CHK1 sur la Sérine 317 et CHK2 sur le Thréonine 68. (n=3)

### 3. Activation de la voie de réponse p53 et modification du cycle cellulaire

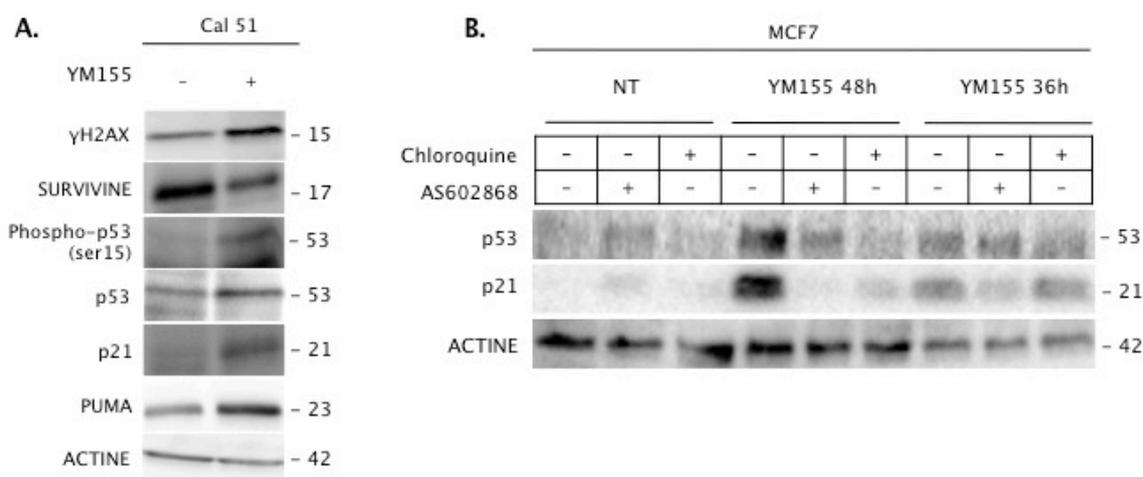
Nous avons mis en évidence un effet génotoxique du YM155 et la phosphorylation de la protéine CHK2. Nous avons ensuite analysé la voie de réponse p53. En effet cette voie de signalisation fait partie des voies activées par la voie ATM/CHK2 afin de conduire soit à l'arrêt du cycle pour que les voies de réparation puissent se mettre en place ou à la mort cellulaire selon l'augmentation des différentes cibles transcriptionnelles de p53.

#### a) Effet du YM155 sur l'expression de p53 et de ses cibles transcriptionnelles

Nous avons observé par immunoblot les modifications de l'expression de p53 et de sa forme phosphorylée sur la Sérine 15, ainsi que plusieurs de ses cibles transcriptionnelles dans les deux lignées cellulaires dont le gène *TP53* est non mutée, Cal51 et MCF7 (Figure 78). Le

YM155 induit bien une augmentation de l'expression de la protéine p53 dans ces deux lignées après 48 heures de traitement (Figure 78). Nous avons également observé l'augmentation de protéines, cibles transcriptionnelles de p53. Le YM155, dans la lignée Cal51 fait apparaître une augmentation de la protéine pro-apoptotique PUMA, mais aussi d'une protéine régulatrice du cycle cellulaire, p21 (Figure 78 A).

Dans la lignée MCF7 nous avons observé une augmentation croissante au cours des temps de traitement YM155 de la protéine p21 (Figure 78 B). De plus, les inhibiteurs de l'induction de mort déclenchée par le YM155, montre qu'ils sont aussi capables de bloquer la réponse p53. En effet un prétraitement avec la Chloroquine ou l'AS602868, diminue à la fois l'accumulation de la protéine p53 mais également et de manière logique l'expression de p21 (Figure 78 B). Les voies autophagique et NF-kB semblent jouer un rôle sur l'activation de cette voie de réponse aux dommages à l'ADN. L'inhibition de l'une ou l'autre de ces voies peut être reliée à la diminution d'apparition des dommages à l'ADN surtout dans le cas de l'inhibition de l'autophagie.



**Figure 78 : Le YM155 induit une réponse p53 aux dommages à l'ADN dans les lignées p53 sauvage.**

A Après 48 heures de traitement YM155 dans le lignées Cal51, les lysats cellulaires totaux sont analysés par immunoblot afin de voir les modification d'expression de p53 et de sa forme phosphorylée sur la Sérine 15, mais aussi de ses cibles transcriptionnelles p21 et PUMA. L'expression de SURVIVINE et la phosphorylation de H2AX sont aussi détectées. B Les lysats de la lignée MCF7, après un prétraitement de 2 heures avec un inhibiteur de l'autophagie, la Chloroquine à 25µM ou de la voie NF-kB, l'AS602868 à 10µM, et un traitement de 24, 36 ou 48 heures au YM155 à 50nM, sont analysés en immunoblot afin d'observer les modifications d'expression de p53 et de sa cible transcriptionnelle p21. (n=3)

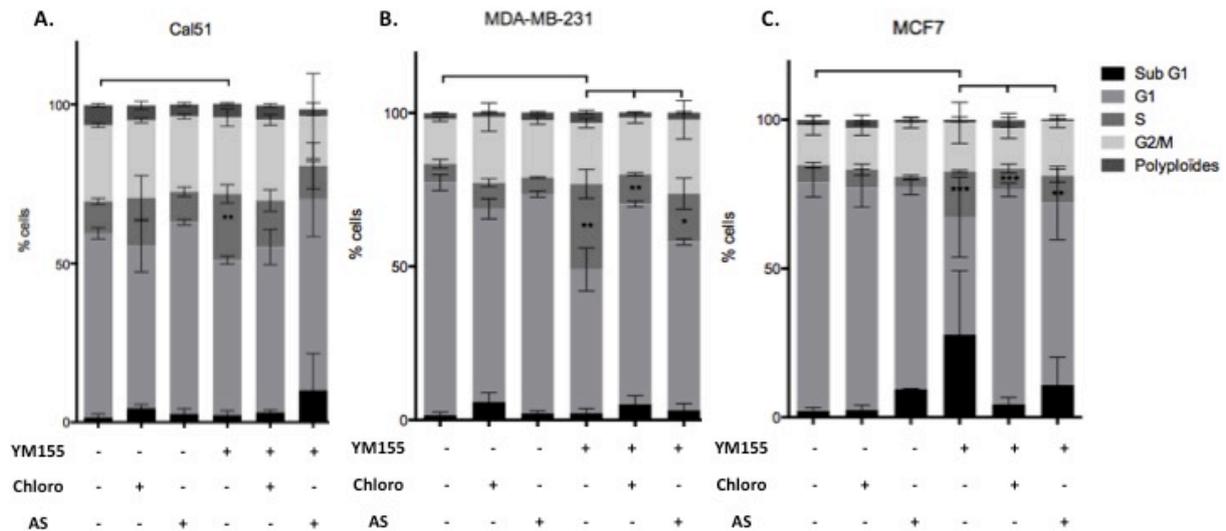
*b) Effet du YM155 et des inhibiteurs de la mort cellulaire sur le cycle cellulaire*

L'une des issues de l'activation de la réponse p53 aux dommages à l'ADN est l'arrêt du cycle cellulaire par augmentation de la protéine p21, que l'on observe sous traitement YM155. Au vue du rôle très important de la SURVIVINE dans le cycle cellulaire et de l'effet de sa déplétion, nous nous sommes intéressés à l'effet du traitement YM155 sur le cycle cellulaire.

L'analyse par cytométrie en flux de la fluorescence d'un intercalant de l'ADN l'iode de propidium, nous permet d'obtenir le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire en fonction du contenu en ADN détecté. Après un traitement de 48 heures par le YM155, nous avons observé une augmentation significative du pourcentage des cellules se trouvant en phase S du cycle cellulaire et ceci dans les trois lignées cellulaires (Figure 79). Nous avons testé l'effet des deux inhibiteurs sur le cycle cellulaire en combinaison ou non avec le YM155. Ces molécules seules ne modifient pas le cycle, en revanche dans les lignées MDA-MB-231 et MCF7, elle font diminuer le pourcentage de cellules en phase S obtenu sous traitement YM155, en retrouvant des pourcentages semblables aux cellules non traitées

(Figure 79 B et C). Cet effet se retrouve plus légèrement dans la lignée Cal51 mais n'est pas statistiquement significatif (Figure 79 A).

Le traitement YM155 induit un blocage en phase S du cycle cellulaire, laissant l'hypothèse d'une induction de stress répliquatif envisageable. De plus les inhibiteurs corrigent les anomalies du cycle cellulaire induites par le YM155.



**Figure 79 : Le blocage en phase S des cellules par le traitement YM155 est réversé par les inhibiteurs de l'autophagie ou de la voie NF-kB.**

A, B et C Les lignées cellulaires Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 sont traitées pendant 48 heures avec le YM155 à A. 80nM, B. 30nM C. 50nM après un prétraitement de 2 heures avec un inhibiteur de l'autophagie, la Chloroquine (Chloro) à 25µM ou de la voie NF-kB, l'AS602868 (AS) à 10µM. Après une fixation à l'éthanol, les cellules sont marquées avec de l'iodure de propidium, dont la fluorescence est proportionnelle au contenu en ADN des cellules. L'analyse en cytométrie en flux de cette fluorescence permet de déterminer le pourcentage de cellules (% cells) dans chaque phase du cycle cellulaire représenté par les histogrammes. (n=3)

En conclusion, les voies NF-kB et autophagique sont associées à la mort cellulaire induite par le YM155 mais aussi à l'accumulation des dommages à l'ADN, à l'activation de la voie p53 et à la régulation du cycle cellulaire.

## **F. Effet de l'extinction du facteur de transcription ILF3 sur la mort et le cycle cellulaire**

Le YM155 diminuant l'expression de deux protéines de demi-vie courte (SURVIVINE et MCL-1), cela nous laissait à penser que le YM155 pouvait diminuer l'activité transcriptionnelle de manière plus globale. De plus, un article a démontré que le YM155 ciblait directement le facteur de transcription ILF3 (Interleukin Enhancer Binding Factor 3). Les auteurs ont montré que le YM155 se fixe sur la protéine NF110, une isoforme de ILF3 et empêche son activité transcriptionnelle. Le YM155 empêche alors l'augmentation de l'activité du promoteur de la SURVIVINE observée sous surexpression de ILF3 (Nakamura et al., 2012). Nous avons voulu analyser si dans les lignées cancéreuses étudiées, la déplétion de ce facteur par ARN interférence pouvait mimer les effets du YM155 sur la mort et le cycle cellulaire.

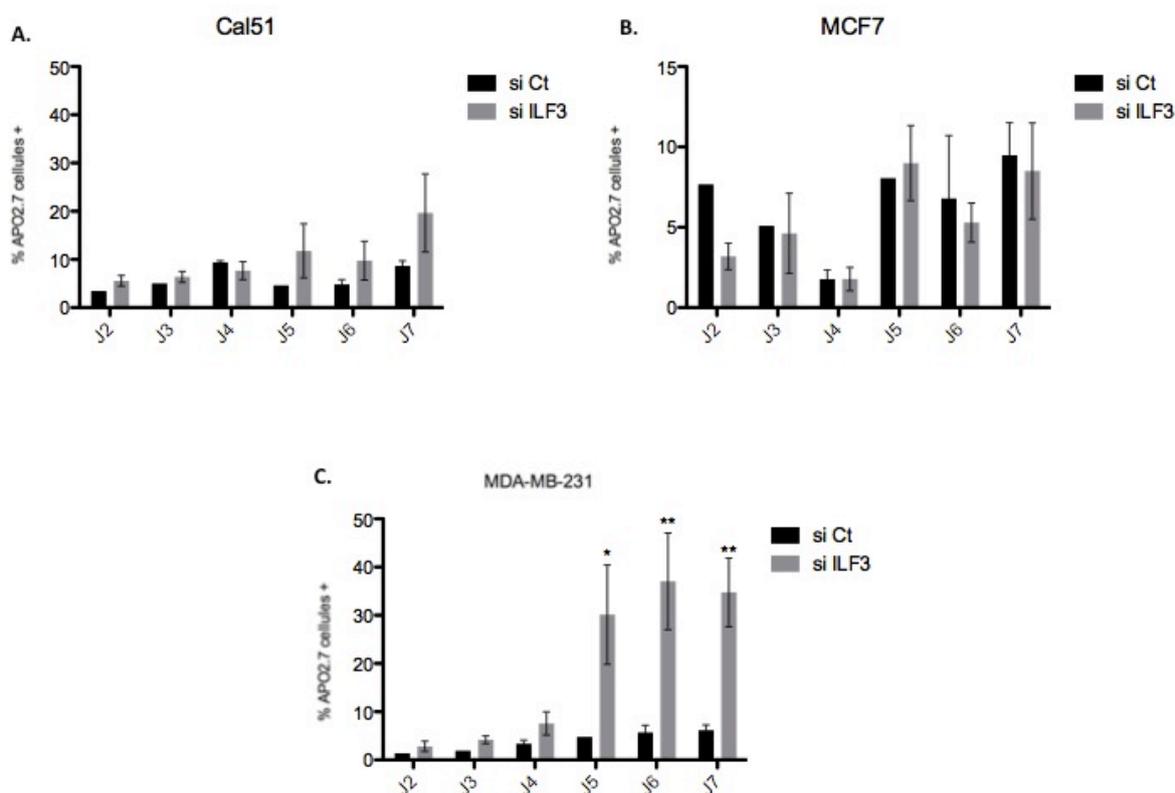
### ***1. Effet de la déplétion en ILF3 sur de la mort cellulaire***

Nous avons étudié l'effet de la déplétion par siRNA ciblant ILF3 sur la mort cellulaire. L'efficacité du siRNA a été évalué par qPCR. Nous n'avons pas observé de mort cellulaire de 2 à 4 jours après transfection des siRNA. Aucune des lignées n'est affectée par la déplétion à court terme de ILF3 (Figure 80).

Nous avons donc essayé de prolonger l'extinction de ILF3 Nous avons analysé a mort cellulaire cette fois-ci, après 5 à 7 jours de transfection. Pour maintenir une extinction correcte de la protéine une première transfection est réalisée à J0 puis une seconde 3 jours après. Aucun effet n'est obtenu sur la lignée MCF7 (Figure 73 B). Cette longue déplétion augmente très légèrement la mort cellulaire dans la lignée Cal51 à 5 jours et un peu plus à 7 jours mais ceci de manière non significative (Figure 73 A). Enfin dans la lignée MDA-MB-231, l'augmentation de la mort cellulaire est visible dès 5 jours après transfection des siRNA ILF3 et se maintient sans augmentation à 6 et 7 jours (Figure 73 C).

L'extinction de ILF3 n'induit que très partiellement et après une déplétion prolongée, la mort cellulaire et ceci uniquement dans la lignée MDA-MB-231. La cible initiale du

YM155 ne semble pas être ILF3 dans nos lignées cellulaires. Nous n'avons donc pas trouvé intéressant de poursuivre l'étude des effets de la déplétion en ILF3



**Figure 80 : L'extinction de l'expression du facteur de transcription ILF3 induit une mort cellulaire très tardivement uniquement dans un des trois lignées cellulaires.**

A, B et C Les lignées cellulaires Cal51, MCF7 et MDA-MB-231 sont déplétées en ILF3 par ARN interférence sur des temps courts de 2 à 4 jours (J2, J3 et J4) ne nécessitant qu'une seule transfection, ou sur des temps plus longs de 5 à 7 jours (J5, J6 et J7), nécessitant donc deux transfactions. Un ARN interférent contrôle (si Ct) est également transfecté en parallèle dans les mêmes conditions que l'ARN interférent ciblant ILF3 (si ILF3). Après déplétion, les cellules marquées avec l'APO2.7 sont analysées en cytométrie en flux. (n=3)

## 2. Effet de la déplétion en ILF3 sur le cycle cellulaire

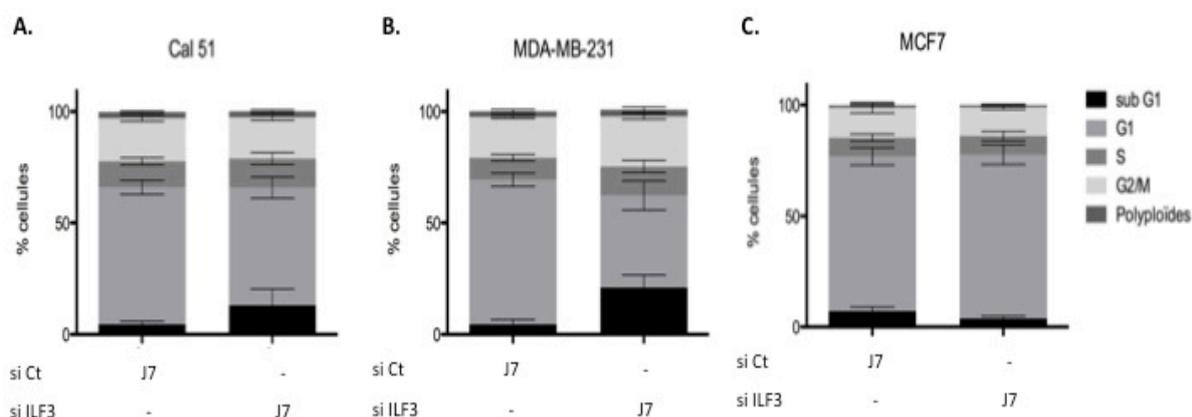
Malgré les résultats négatifs de la déplétion en ILF3 sur l'induction de la mort cellulaire, nous avons voulu analyser si la déplétion en ILF3 pouvait modifier le cycle cellulaire, et s'il pouvait comme le YM155 bloquer les cellules en phase S du cycle cellulaire.

Nous avons donc choisi d'analyser le cycle cellulaire dans les lignées cellulaires après une déplétion prolongée de 6 et 7 jours. C'est dans ces conditions que nous avons observé la mort cellulaire dans les MDA-MB-231 et que nous commençons à voir une diminution de la

prolifération dans toutes les lignées. Les cellules déplétées en ILF3 sont donc marquées à l'iodure de propidium puis analysées en cytométrie en flux. La déplétion en ILF3 ne modifie pas la répartition des cellules dans les phases S, G2/M du cycle cellulaire et ne fait pas apparaître plus de cellules polyploïdes (Figure 80) dans toutes les lignées cellulaires étudiées. Dans la lignée MCF7 le pourcentage de la fraction SubG1 et des cellules en phase G1 ne change pas non plus (Figure 80 C). Dans cette lignée, aucune modification du cycle n'apparaît. Dans les lignées Cal51 et MDA-MB-231 nous avons observé une diminution des cellules en phase G1 en faveur d'une augmentation de la fraction Sub-G1 qui correspond aux cellules mortes et qui est en accord avec nos précédents résultats de mort cellulaire obtenus (Figure 80 A et B).

L'observation des cellules au microscope montrait une diminution de la densité cellulaire faisant penser à une diminution de la prolifération des cellules dans les trois lignées cellulaires après 6 à 7 jours de déplétion du facteur de transcription ILF3. Ce qui serait en accord avec une publication décrivant que la déplétion en ILF3 entraînait un ralentissement de la croissance cellulaire en perturbant la synthèse de l'ADN (Guan et al., 2008). De plus peu de cellules mortes comme sous traitement YM155 apparaissaient même dans la lignée MDA-MB-231.

La déplétion à long terme en ILF3 ne bloque pas les cellules en phase S comme le YM155 et ne modifie pas le cycle cellulaire, ne fait apparaître qu'une augmentation du pourcentage des cellules en sub-G1 dans les lignées où apparaît de la mort cellulaire. La déplétion en ILF3 ne mime donc pas les effets du YM155 dans les lignées cellulaires du cancer du sein.



**Figure 81 : La déplétion en ILF3 ne modifie pas le cycle cellulaire des lignées.**

A, B et C Les lignées cellulaires Cal51, MDA-MB-231 et MCF7 sont déplétées de la protéine ILF3 par transfection à deux reprises à 3 jours d'intervalle d'ARN interférence (si ILF3) sur 6 et 7 jours (6j et 7j). Les cellules ensuite fixées à l'éthanol sont marquées avec de l'iodure de propidium dont la fluorescence est analysée en cytométrie en flux, nous permettant de déterminer le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire représenté ici en histogramme. (n=3)

## G. Le YM155 une molécule à potentiel thérapeutique

Le YM155 est en cours d'évaluation clinique. Nous voulions compléter l'argumentaire de l'intérêt thérapeutique de l'utilisation du YM155, dans notre modèle de cancer du sein, en étudiant son effet sur des cellules non tumorigéniques, le ciblage préférentiel des cellules transformées et des cellules initiatrices de cancer et enfin l'efficacité de la molécule sur des tumeurs mammaires ex vivo.

### 1. Effet du YM155 sur les cellules transformées

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé une lignée de cellules mammaires non transformées, la lignée MCF10A génétiquement modifiée pour exprimer l'oncogène Src de manière inductible par l'ajout de Tamoxifène (TAM) qui conduit à une rapide transformation des cellules. Des doses réponses ont été réalisées avec ce modèle cellulaire en présence ou non de Tamoxifène, après 48 heures de traitement YM155, afin de déterminer des IC50 (Figure 82).

La dose nécessaire de YM155 pour induire 50% de mort cellulaire dans la lignée ER-MCF10A-Src en l'absence de TAM (n'exprimant pas Src) est de l'ordre de 200nM (Figure 82)

A). Ceci est bien supérieur aux doses induisant 50% de mort cellulaire dans les lignées cellulaires utilisées précédemment qui étaient comprises entre 30 et 70nM. De plus l'ajout de Tamoxifène, induisant l'expression de l'oncogène Src, diminue l'IC50 de moitié, 100nM, bien plus proche que celles des lignées cancéreuses (Figure 82 B). Le YM155 semble donc cibler préférentiellement les cellules transformées.

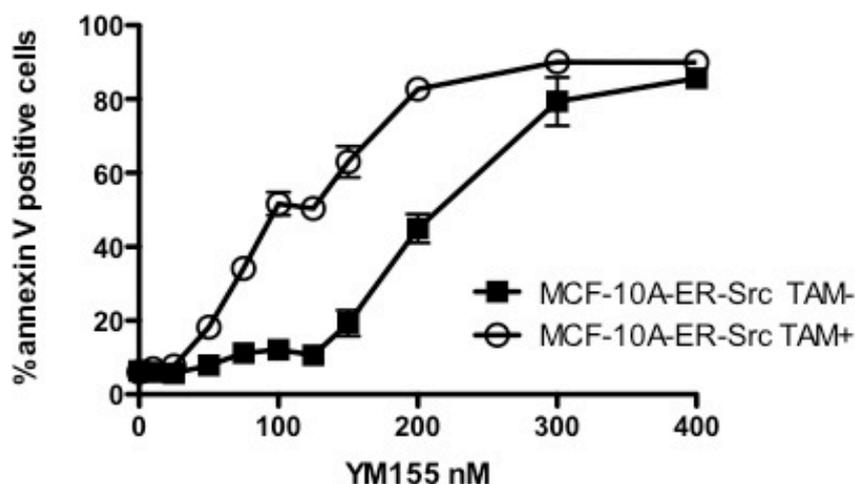


Figure 82 : Le YM155 induit préférentiellement de la mort cellulaire dans les cellules transformées.

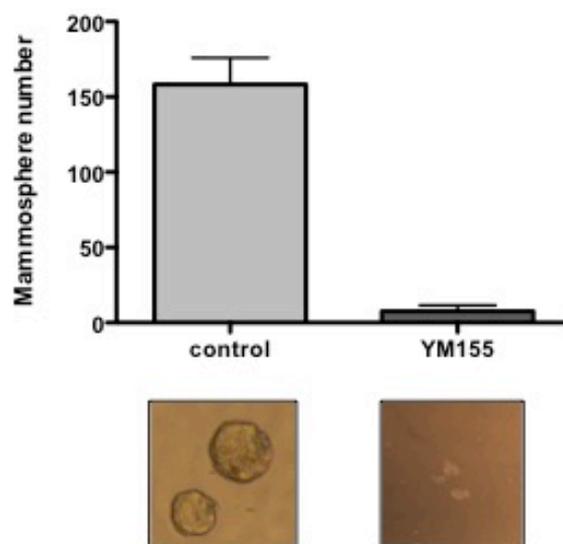
A et B La lignée cellulaire mammaire non transformée ER-MCF10A-Src inductible pour l'oncogène Src par l'ajout de Tamoxifène (TAM) induisant une transformation rapide des cellules, est utilisée pour construire des courbes doses réponses au YM155 après 48 heures de traitement. La mort cellulaire est détectée par lecture du marquage Annexin V en cytométrie en flux (Annexin V + cells). Les IC50 sont ensuite déterminées à l'aide du logiciel Prism. (n=3)

## 2. Effet du YM155 sur la formation de mammosphères *in vitro*

Nous ensuite testé l'effet du YM155 sur une population cellulaire capable de former des mammosphères *in vitro* correspondant à un phénotype de cellules souches capables d'auto renouvellement et d'initier de tumeurs *in vivo*. Ces cellules pourraient être responsables des récurrences tumorales chez les patients et présentent un problème majeur dans le traitement des cancers.

Nous avons utilisé la lignée MCF7 qui forme des sphères clonales *in vitro* (Cf. Matériel et méthodes). Nous observons une diminution presque complète de la formation des sphères après traitement avec 40nM de YM155 par rapport aux cellules contrôle (Figure 83).

Le YM155 a une action inhibitrice sur l'auto renouvellement des cellules et est donc capable de cibler cette population cellulaire potentiellement dangereuse chez les patients.



**Figure 83 : Le YM155 diminue la formation de mammosphères in vitro.**

La lignée MCF7, formant des mammosphère in vitro est traitée ou non avec 40nM de YM155. Les mammosphères ont été observées et comptées au microscope et représentées en histogramme (Mammosphere number). (n=3)

### 3. Effet du YM155 sur des cellules primaires de cancers du sein

Au laboratoire, un modèle de culture *ex vivo* de tranches de tumeurs primaires mammaires a été développé afin d'évaluer la réponse apoptotique à des agents thérapeutiques (Séveno et al., 2012). L'intérêt de ce modèle est l'évaluation de la réponse des cellules cancéreuses primaires en présence de leur micro-environnement tumoral, dont l'intégrité tridimensionnelle est maintenue.

Dans le cadre d'un protocole de recherche clinique avec l'ICO (Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint Herblain), la classification histologique des tumeurs a été déterminée après évaluation des marquages des récepteurs aux œstrogènes ou à la progestérone et de Her2, en immunocytochimie, dans une démarche de diagnostic.

Après exérèse chirurgicale, un fragment tumoral parvient à notre laboratoire. Cette partie de la tumeur est découpée en tranche et mise en culture *ex vivo*. Sa réponse à différents traitements est évaluée à l'aide de la coloration HES, déterminant l'altération des cellules, et l'apoptose est déterminée avec l'immunomarquage de la CASPASE 3 active (Figure 84 A).

Nous avons traité 17 tumeurs primaires mammaires avec du YM155 à 50nM. Puis l'analyse immunohistochimique (Figure 84 A) nous a permis de déterminer le pourcentage de



## **DISCUSSION**

## **I. La SURVIVINE : régulation de la recombinaison homologue et génoprotection**

Nos résultats ont permis de déterminer que la déplétion en SURVIVINE induit des dommages à l'ADN et un défaut de réparation de ces dommages par altération de la RH. La SURVIVINE est donc une protéine nécessaire au maintien de l'intégrité génomique dans les cellules cancéreuses mammaires.

Nous avons mis en évidence que la déplétion en SURVIVINE induit une augmentation des dommages à l'ADN double-brin dans les trois lignées cancéreuses mammaires étudiées. Nous avons également confirmé que cette accumulation de cassures double-brin était retrouvée après l'utilisation de 4 séquence de siRNA ciblant la SURVIVINE et n'était pas liée à un effet hors cible de l'ARN interférent, en effet la surexpression ectopique de la SURVIVINE protège des dommages à l'ADN induit par la déplétion de la SURVIVINE endogène.

Nous nous sommes intéressés ensuite à comprendre les causes de l'accumulation de ces dommages à l'ADN. En effet la surexpression de la SURVIVINE étant associée à la chimio et radio résistance (Yamamoto et al., 2008), nous voulions comprendre comment la SURVIVINE pouvait jouer son rôle de génoprotecteur. De plus il a été montré que les voies de réponses et de réparation des dommages à l'ADN régule l'expression de la SURVIVINE. En effet BRCA1 peut réguler négativement l'expression de la SURVIVINE par modifications épigénétiques via l'augmentation de l'expression de SIRT1 (Promkan et al., 2011; Wang et al., 2008). Nous avons alors mis en évidence que la déplétion en SURVIVINE diminue un set de 7 gènes dans au moins deux des trois lignées. Parmi ces gènes 6 sont impliqués dans la RH (*BRCA1/2, EME1, EXO1, BLM, RAD51*).

Nous avons montré que la diminution de l'expression génique de RAD51 s'accompagne de la diminution de l'expression de la protéine. La protéine RAD51, acteur clé de la RH, est une recombinaise qui se lie à l'ADN simple-brin à l'aide de BRCA2, permettant la formation d'un nucléofilament pour la protection du brin d'ADN, la création d'une structure boucle D et l'association avec le brin homologue pour le déroulement de la réparation par RH (Sung et al., 2003).

Nous avons également observé la diminution de l'expression de la protéine MUS81, sans que son expression génique soit modifiée sous déplétion en SURVIVINE. La protéine MUS81 est la sous unité catalytique du complexe endonucléasique et peut s'associer aux sous unités régulatrices EME1 et EME2. Le complexe EME1-MUS81 a une fonction de résolvasse qui est indispensable à la résolution des fourches de réplication bloquées et des jonctions de Holliday et au déroulement de la RH (Dehé et al., 2013; Sarbajna et al., 2014; Wyatt et al., 2013). Le complexe MUS81-EME2 agit uniquement en phase S pour promouvoir le redémarrage des fourches de réplication, alors que le complexe MUS81-EME1 agirait en phase G2/M pour résoudre les structures intermédiaires de l'ADN après réplication (Pepe and West, 2014). De plus, la régulation d'expression de MUS81 que nous avons observée sous déplétion en SURVIVINE est particulièrement intéressante car elle met en évidence le contrôle post-transcriptionnel de l'expression de MUS81, qui n'a pas, à notre connaissance, été décrit dans la littérature, sauf dans un papier de virologie, qui indiquait une possible ubiquitination de la protéine dans un contexte infectieux avec le virus HIV (Berger et al., 2014) Nous voudrions étudier si cette protéine interagit avec la SURVIVINE permettant alors sa stabilisation comme le fait la SURVIVINE avec XIAP. Nous voulons également évaluer si l'inhibition des voies de dégradation des protéines (protéasome/autophagie) permettent de stabiliser l'expression de MUS81.

De plus nous n'avons pas observé de diminution de la protéine EME1, bien que la déplétion en SURVIVINE entraîne la diminution de l'expression de son ARNm. L'étude de la stabilité de la protéine EME1 et de son ARNm, sous déplétion en SURVIVINE, pourrait permettre d'apporter une explication à cette observation. Nous pourrions vérifier l'expression protéique de EME1 à des temps d'extinction en SURVIVINE plus longs pour voir si la diminution de l'expression génique se reflète sur l'expression protéique. MUS81 ayant deux cofacteurs, nous pourrions étudier également l'expression protéique et génique de EME2.

Enfin nous voudrions étudier s'il existe une colocalisation nucléaire des protéines MUS81, EME1 avec la SURVIVINE ainsi qu'avec  $\gamma$ -H2AX, comme cela a déjà été montré après irradiation pour ce dernier partenaire. En effet, la SURVIVINE avait déjà été décrite pour sa relocalisation nucléaire suite à un stress génotoxique radio-induit et sa colocalisation avec des protéines impliquées dans la signalisation des dommages (MDC1,  $\gamma$ -H2AX, 53BP1) et la voie NHEJ de réparation des dommages à l'ADN (Ku70 et DNA-PK) (Capalbo et al., 2010; Reichert et al., 2011; Wall et al., 2010). Ces données sont observées dans un contexte

de stress génotoxique différent de la génotoxicité induite par la déplétion en SURVIVINE dans notre modèle. Nos données n'excluent pas un rôle de la SURVIVINE sur la voie NHEJ et soulignent qu'elle influe la RH.

La méta-analyse des données transcriptomiques d'environ 3000 tumeurs primaires mammaires humaines mises à disposition sur Breast Cancer Gene-Expression Miner v3.0 a mis en évidence que l'expression des gènes *BIRC5* mais également *BRCA1*, *EME1*, *EXO1*, *BLM* et *RAD51*, pris individuellement était associée à un pronostic péjoratif. De manière intéressante, la méta-analyse de ces mêmes données est en accord avec les données obtenues en qPCR dans les lignées cellulaires. En effet nous observons une forte corrélation positive d'expression de *BIRC5* avec *EME1*, *EXO1* et *BLM* lors de l'analyse des données de toutes les patientes. Ces données transcriptomiques montrent également une forte corrélation positive d'expression de *EME1*, *EXO1* et *BLM* entre eux.

Nous avons également mis en évidence, à l'aide d'un système de conversion génique régulée par la RH, que la déplétion en SURVIVINE diminue fonctionnellement l'activité de la RH de manière aussi efficace que la déplétion en *BRCA1*, acteur majeur de cette voie de réparation. Les défauts de réparation des dommages à l'ADN favorisant l'instabilité génétique sont propices au développement tumoral et favorables à l'augmentation de l'agressivité tumorale, car sources de diversité génétique et d'évolution. De plus les cellules peuvent supporter les dommages à l'ADN jusqu'à un certain seuil au delà duquel les voies de signalisation de mort cellulaire sont enclenchées. Les cellules cancéreuses présentent des points de contrôle du cycle cellulaire moins stringents et donc une perte de contrôle du cycle cellulaire, entraînant une prolifération anarchique et des erreurs de réplication, responsables d'une instabilité génique importante. La surexpression de la SURVIVINE dans les cellules cancéreuses peut participer à maintenir la RH, permettant alors la protection de l'intégrité du génome et le maintien des dommages à l'ADN en deçà d'un seuil délétère pour la cellule. Nos données suggèrent que la SURVIVINE pourrait favoriser la RH et ainsi participer à la progression tumorale en plus de son rôle canonique à la fois dans la régulation du cycle cellulaire via le CPC et de survie cellulaire via XIAP. Ce rôle peut expliquer également la résistance aux chimio et radiothérapie des tumeurs surexprimant la SURVIVINE. En effet les thérapies génotoxiques ont pour principe d'induire de nombreux dommages à l'ADN, dépassant la capacité de réparation des cellules et le seuil tolérable, induisant alors la mort cellulaire. Mais nombreuses sont les résistances des tumeurs à ces traitements génotoxiques.

La régulation positive de la RH par la SURVIVINE peut expliquer l'association de la résistance aux génotoxiques et sa surexpression. Nos données ainsi que celles de la littérature, citées précédemment, suggèrent un rôle très important de la SURVIVINE sur la régulation de la réparation des dommages à l'ADN. En effet la localisation nucléaire de la SURVIVINE après dommages à l'ADN radio induits et sa colocalisation avec des senseurs des dommages à l'ADN ainsi que la régulation de l'activité de la DNA-PK (Capalbo et al., 2010; Reichert et al., 2011; Wall et al., 2010), permettant la réparation des dommages à l'ADN. Ces données confortent l'importance du rôle de la SURVIVINE comme génoprotecteur des dommages à l'ADN soit endogènes par régulation de la RH soit induits par régulation de la voie NHEJ.

Parmi les gènes dont l'expression est réduite suite à la déplétion en SURVIVINE, *EXO1*, *BLM* et le complexe *EME1/MUS81* sont impliqués au cours de la réplication, après et pendant la phase G2/M dans la résolution des fourches de réplication bloquées et des structures intermédiaires de l'ADN. Nous pouvons donc faire l'hypothèse que la déplétion en SURVIVINE pourrait, de manière indirecte, engendrer un stress post-réplicatif, en empêchant la résolution des intermédiaires de réplication. Les fourches de réplication alors bloquées et non résolues par les nucléases et par RH peuvent être responsables de l'accumulation de dommages à l'ADN. Bien que le rôle de la SURVIVINE au cours du cycle cellulaire soit essentiellement décrit lors de la phase de mitose comme composant du complexe CPC, elle peut aussi réguler l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire en promouvant la phase S (Fukuda et al., 2002, 2004; 2000). De plus, des données préliminaires, dans la lignée Cal51, montrent une altération de l'incorporation de BrdU après déplétion en SURVIVINE, indiquant une possible perturbation du déroulement de la phase S et donc une régulation de cette phase par la SURVIVINE dans les cellules cancéreuses comme déjà suggéré (Suzuki et al., 2000). Cela a également été observé dans des progéniteurs hématopoïétiques (Fukuda et al., 2004). L'évaluation de la vitesse d'élongation des fourches de réplication à l'aide des techniques de mesure d'élongation de fibres d'ADN comme décrit (Anglana et al., 2003; Michalet et al., 1997), nous permettait de connaître l'implication de la SURVIVINE sur la synthèse de l'ADN lors de la réplication. De plus il a été montré qu'un défaut de la RH pouvait réduire la vitesse de progression des fourches de réplifications dans des lignées cellulaires de hamsters (Daboussi et al., 2008b), nous confortant dans l'idée de déterminer l'effet de la déplétion en SURVIVINE sur la synthèse d'ADN.

Il a été décrit qu'il existait des connexions et des régulations entre la réplication et la ségrégation des chromosomes au niveau desquelles la RH joue un rôle majeur, permettant de réduire l'instabilité génétique. Un défaut de la RH engendre une diminution de la vitesse des fourches de réplication ne permettant pas une réplication complète de l'ADN. Ceci va enclencher un défaut de ségrégation des chromatides dont la réplication n'est pas achevée et aboutir à une prolongation de la métaphase, à la formation de ponts de chromatine et à la formation de cellules aneuploïdes (Wilhelm et al., 2014). L'équipe de F. Rosselli (Naim et al., 2013) a également démontré que les complexes endonucléasiques MUS81-EME1 et XPF-ERCC1 permettaient la séparation correcte des chromatides sœurs en éliminant, pendant la mitose, toutes les structures intermédiaires de réplication au niveau des sites fragiles de l'ADN. Ce système permet d'empêcher la création de ponts d'ADN en anaphase et l'apparition de dommages à l'ADN et d'aneuploïdie dans les cellules filles (Sarbjana et al., 2014). Il est donc très probable que la déplétion en SURVIVINE diminuant l'expression de MUS81 et l'activité de la RH, perturbe ces processus de résolution d'intermédiaires de réplication, pouvant expliquer l'augmentation des dommages à l'ADN observés.

Nous avons également observé que la déplétion en SURVIVINE induit une augmentation des cellules en G2/M et de cellules polyploïdes, indépendamment du statut p53 des lignées. L'augmentation du pourcentage de cellules tétraploïdes et polyploïdes varie selon les lignées et apparaît plus ou moins précocement. L'augmentation du pourcentage de cellules tétraploïdes et polyploïdes, l'observation morphologique montrant une augmentation du volume cellulaire et la diminution d'expression de la CYCLINE B suggèrent que la déplétion en SURVIVINE induit un blocage de la cytokinèse. Nous pouvons nous demander si la non résolution des fourches de réplication bloquées et des structures intermédiaires de réplication ne peuvent pas en plus perturber la ségrégation des chromosomes, avoir un effet négatif sur le bon déroulement de la cytokinèse.

La SURVIVINE a un rôle très important dans la régulation du cycle cellulaire. En effet elle fait partie du complexe protéique, le CPC, qui permet la ségrégation correcte des chromatides sœurs durant la mitose et le déroulement de la cytokinèse (Carmena et al., 2012b; Lens et al., 2006). Sa surexpression dans les cancers est sans doute également liée à son rôle sur le cycle cellulaire, en favorisant la prolifération intense des cellules tumorales. La perturbation du cycle cellulaire pouvant perturber la transcription des gènes, nous voulions étudier si les modifications de l'expression du set de gènes RH pouvaient s'expliquer par une

modification du cycle cellulaire. Nous voulions également essayer d'identifier si une phase du cycle cellulaire était critique pour l'apparition des dommages à l'ADN. Pour ce faire nous avons comparé les effets de la déplétion en SURVIVINE à ceux obtenus sous déplétion en AURORAB ou en CDC20, deux acteurs importants au cours du déroulement du cycle cellulaire.

Nous observons après déplétion en CDC20 par siRNA, une accumulation de la protéine CYCLINE B et une augmentation du pourcentage de cellules en phase G2/M positive pour le marquage MPM2, confirmant que la déplétion de CDC20 induit un blocage mitotique en prométaphase (Bah et al., 2014). En revanche nous voyons apparaître une importante accumulation de dommages à l'ADN dans les cellules en phase G2/M. Nous observons également une augmentation de l'expression de p53 mais pas de ses cibles transcriptionnelles. Ce qui peut s'expliquer par un arrêt de la transcription en mitose. La déplétion en CDC20 ne présente pas de modification d'expression du set de gènes RH semblable à celle observée sous déplétion en SURVIVINE, indiquant une stabilité de ces ARNm même sous blocage mitotique. L'induction d'un blocage mitotique par déplétion en CDC20 est très génotoxique mais ne semble pas être liée à l'altération de la RH. Ces résultats indiquent que la déplétion en SURVIVINE n'induit pas d'arrêt du cycle en prométaphase et nous a permis d'exclure la prolongation de la phase de mitose comme facteur responsable de la diminution de l'expression du set de gènes régulés par la SURVIVINE.

Nous avons également analysé l'effet du ciblage d'un autre membre du CPC, AURORAB, par siRNA et par inhibition chimique de son activité kinase. Les effets sur le cycle cellulaire de la déplétion en AURORAB par siRNA et de l'inhibition de son activité kinase par traitement avec l'AZD1152 sont semblables à ceux observés sous déplétion en SURVIVINE. La déplétion d'AURORAB induit également une augmentation des dommages à l'ADN et une activation de la réponse p53 comme observée sous déplétion en SURVIVINE. En revanche, la déplétion en AURORAB mime partiellement l'effet la déplétion en SURVIVINE sur l'expression du set de gènes RH étudiés. Cependant l'extinction d'AURORAB induisant la diminution de l'expression de la SURVIVINE, nous ne pouvons pas déterminer si la diminution de l'expression du set de gènes RH est réellement due à la modification du cycle cellulaire ou tout simplement proportionnelle à la diminution de l'expression de la SURVIVINE. Nous avons remarqué que l'effet de l'AZD1152 sur la modification d'expression du set de gènes RH corrèle avec son impact sur les niveaux

d'ARNm de la SURVIVINE. Ces résultats semblent suggérer que le rôle de la SURVIVINE sur le cycle cellulaire n'est pas responsable de l'altération de l'expression génique des acteurs de la RH. En revanche, afin de mieux déterminer l'effet sur le cycle cellulaire de la déplétion en SURVIVINE, de la vidéomicroscopie est envisagée. L'utilisation de lentivecteur codant pour des shRNA ciblant la SURVIVINE inductibles ou non et d'autres codant pour l'histone H2B couplée à la protéine fluorescente RFP permettra d'étudier l'effet sur le déroulement de la mitose et s'il y a modification du temps passé dans cette phase. Nous pourrions aussi voir l'effet sur la ségrégation du matériel génétique et analyser si la présence de matériel génétique au niveau de l'anneau de cytokinèse, pourrait expliquer le défaut de cytokinèse. Et si tel est le cas, l'étude des points de contrôle de l'abscission et l'implication de la SURVIVINE serait intéressante à mener.

Nous voulions également déterminer si le rôle de survie de la SURVIVINE pouvait moduler la régulation de la RH. La déplétion en XIAP, inhibiteur direct des CASPASES, dont la SURVIVINE stabilise l'expression ne mime pas les résultats de qPCR obtenus sous déplétion en SURVIVINE. La fonction de survie de la SURVIVINE via XIAP n'est donc pas responsable de la modification de l'expression du set de gènes RH. De plus, l'accumulation des dommages à l'ADN n'est pas reproduite par la déplétion en XIAP. Nous avons aussi évalué l'effet de la déplétion en SURVIVINE sur la mort cellulaire. L'intensité et la cinétique d'apparition de cellules apoptotiques sous déplétion en SURVIVINE varient selon la lignée cellulaire étudiée et indépendamment du statut p53. La déplétion en SURVIVINE induit donc une mort cellulaire tardive et partiellement dépendante de l'activité des CASPASES. Les dommages à l'ADN précédant cette crise apoptotique, la fonction de survie de la SURVIVINE n'est pas impliquée dans la génotoxicité observée lors de sa déplétion. De plus, nos données ont montré que la faible activation des CASPASES apparaissant sous déplétion en SURVIVINE ne rend pas compte de l'accumulation des dommages à l'ADN et que ce processus est mineur dans notre modèle. De plus, nous avons montré que la régulation de la RH par déplétion en SURVIVINE n'était pas modifiée lorsque les CASPASES étaient inhibées (données non montrées).

L'effet de la déplétion en SURVIVINE sur la diminution de l'expression du set de gènes HR n'est pas reproduit par la déplétion en BRCA1. De plus la déplétion de BRCA1 ne modifie pas l'expression génique de la SURVIVINE dans les lignées cellulaires utilisées contrairement à ce qui a précédemment été décrit (Promkan et al., 2009, 2011).

Nous faisons donc l'hypothèse que la SURVIVINE est impliquée dans la régulation de la transcription de ce set de gènes RH, indépendamment de ses rôles dans la survie cellulaire et sur le cycle cellulaire. La protéine bir-1, homologue de la SURVIVINE chez *C. elegans* a été décrite pour sa capacité à réguler la transcription de gènes impliqués dans le développement (Kostrouchova et al., 2003). La SURVIVINE a également été décrite dans un modèle de cancer du colon et de leucémie pour favoriser la phosphorylation de SP1 et de c-Myc, engendrant une augmentation de la liaison à l'ADN de ces facteurs de transcription et induisant l'activation de promoteurs de gènes codant pour FASL et hTERT (Asanuma et al., 2004; Endoh et al., 2005). Dans un modèle de cellules souches hématopoïétiques, il a été montré que la SURVIVINE pouvait diminuer l'expression d'un facteur de transcription Evi-1 perturbant ainsi la prolifération cellulaire (Fukuda et al., 2014). Un autre article suggérait que la SURVIVINE pouvait même agir comme facteur de transcription ou co-activateur de la transcription permettant d'activer la transcription du gène codant pour p21 (Tang et al., 2012). De plus la SURVIVINE a aussi été décrite dans la lignée MCF7 pour la diminution de l'expression de p53 et ainsi augmenter l'expression de NF-kB (p50) permettant alors une augmentation de son rôle de facteur de transcription (Wang et al., 2013). Enfin l'interaction de la SURVIVINE avec les formes phosphorylées des histones, H3 (Jeyaprakash et al., 2011; Kelly et al., 2010; Niedzialkowska et al., 2012) et H2AX (Capalbo et al., 2010; Reichert et al., 2011) permettant une localisation particulière de la SURVIVINE pourrait réguler la transcription comme co-facteur ou en régulant l'accès à la chromatine. Mais des investigations plus importantes seront nécessaires pour comprendre comment la SURVIVINE régule ce set de gènes RH. Nous pouvons aussi supposer que la SURVIVINE régule un facteur de transcription commun à ses gènes, comme nous l'avons envisagé pour le YM155 avec ILF3.

Nous avons également mis en évidence l'activation de la voie p53 dans les deux lignées cellulaires présentant un gène *TP53* non muté. L'expression de p53 et sa phosphorylation sur la Sérine 15 arrivent très précocement après la déplétion en SURVIVINE et l'expression de p53 s'accumule après prolongation de l'extinction de la SURVIVINE. La SURVIVINE régule négativement l'expression de p53. Elle a été décrite pour inhiber la dégradation de MDM2 par les CASPASES et permettre son action de dégradation de p53 (Wang et al., 2004). Ce rôle pourrait également rendre compte de l'accumulation de p53. L'expression protéique liée à l'augmentation de l'expression génique de certaines cibles transcriptionnelles de p53 est aussi augmentée sous déplétion en SURVIVINE, telles que

PUMA, BAX et p21. La déplétion en SURVIVINE active la réponse p53 dans les cellules p53 sauvage comme peut le faire un stress génotoxique, le Cisplatine. Nous observons également une accumulation des dommages à l'ADN au cours de la déplétion en SURVIVINE. L'observation en cinétique de l'accumulation des dommages à l'ADN ainsi que de l'activation d'ATM et de la voie d'activation de p53 (phosphorylation p53-ser15 et cibles transcriptionnelles) est envisagée afin de comprendre si les niveaux de dommages à l'ADN sont proportionnels à l'activation des voies de détection et de réponse. Enfin nous pourrions observer si les voies restent actives, s'amplifient ou diminuent.

Nous voudrions également connaître l'implication de l'activation de la voie p53 sur la mort et le cycle cellulaire même si celle-ci n'y est pas nécessaire. Nous voudrions comprendre par déplétion de p53, de BAX ou PUMA, l'implication de ces protéines sur la mort cellulaire induite. De plus l'activation de p53 augmente l'expression de p21, protéine inhibitrice de la progression du cycle cellulaire, par inhibition de l'activité des complexes CYCLINE/CDK. Pourtant nous observons une augmentation des cellules polyploïdes après endoréplication. Cela suggère que p21 est insuffisante pour réguler le cycle cellulaire et que les points de contrôle pourraient être déficients. Nous pourrions déterminer l'effet de la déplétion en p21 sur le déroulement du cycle cellulaire. Enfin p21 peut favoriser la sénescence des cellules que nous voudrions aussi évaluer.

Enfin l'induction de mort cellulaire tardive, l'apparition de cellules polyploïdes et la génotoxicité augmentant l'instabilité génétique, observées sous déplétion en SURVIVINE n'en font à priori pas une cible thérapeutique unique idéale. Cependant la déplétion en SURVIVINE fait apparaître une altération de la RH et donc un contexte BRCAness. Il a été montré que l'inhibition de l'activité enzymatique de PARP-1, protéine impliquée dans la réparation des cassures simple-brin de l'ADN, engendrait une augmentation des dommages à l'ADN double-brin par conversion des cassures simples ne pouvant être réparées. De plus l'inhibition de PARP-1 dans un contexte BRACness, BRCA1 et/ou BRCA2 muté ou délété, engendre une augmentation des dommages à l'ADN double-brin non réparés par RH, au delà du seuil tolérable par la cellule déclenchant alors l'arrêt du cycle et la mort cellulaire (Farmer et al., 2005). Ce principe de létalité synthétique est actuellement utilisé en clinique dans les cancers génotypés BRCA mutés (Dedes et al., 2011). C'est pourquoi nous avons voulu analyser si la déplétion de la SURVIVINE combinée à l'inhibition de l'activité de PARP-1 par l'Olaparib pouvait engendrer une létalité synthétique. En effet le traitement avec l'Olaparib

amplifie la mort cellulaire induite par la déplétion en SURVIVINE comme dans un contexte BRCAness, sous déplétion de BRCA1 par siRNA. Le ciblage de la déplétion en SURVIVINE et donc la régulation négative de RH combinée à l'inhibition de PARP-1 donc avoir un intérêt thérapeutique.

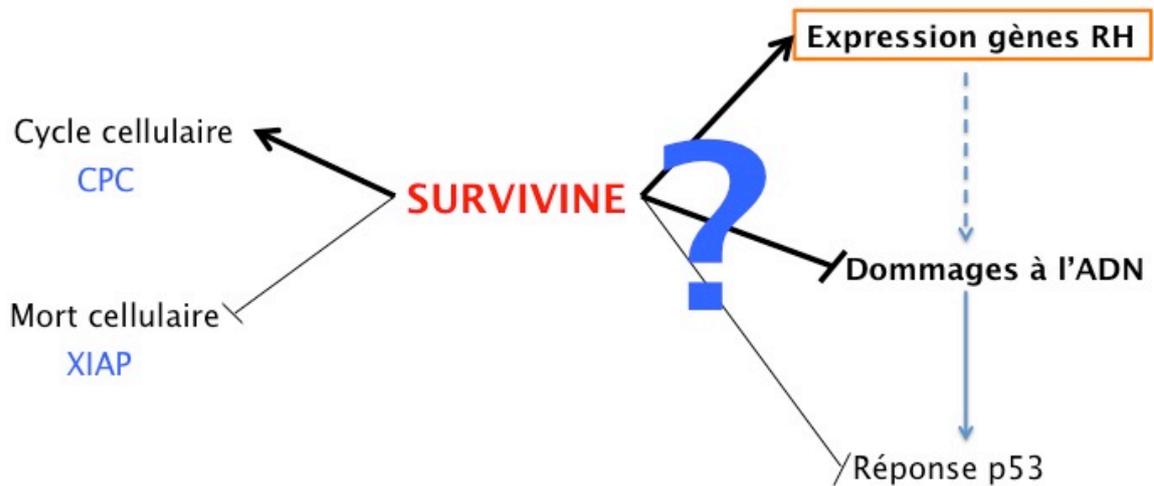


Figure 85 : Schéma récapitulatif des effets de la SURVIVINE.

En conclusion de cette partie de notre travail, nous avons montré que la SURVIVINE promeut la RH, et donc la réparation des dommages à l'ADN endogènes ou induits afin de contrôler l'intégrité du génome, en plus de favoriser la prolifération et la survie cellulaire.

## **II. Le YM155 : Inducteur de mort cellulaire dépendant de l'autophagie et de la voie NF- $\kappa$ B dans le cancer du sein**

Suite à l'identification de l'expression aberrante de la SURVIVINE dans la majorité des cancers, développer un inhibiteur de la SURVIVINE s'est avéré une opportunité pour certains laboratoires pharmaceutiques. Cependant, la SURVIVINE est une petite protéine, organisée en un seul domaine BIR et sans activité enzymatique, à priori peu propice à l'identification d'inhibiteurs pharmacologiques classiques. Le laboratoire Astellas a alors pris l'option de rechercher des inhibiteurs, non de la protéine mais de l'expression de son gène *BIRC5*. Ainsi YM155 est issu d'un screening construit pour identifier des molécules capables d'inhiber le promoteur du gène codant pour la SURVIVINE chez l'homme, *BIRC5* (Nakahara et al., 2007). Cette première publication datant de 2007 montrait que cette molécule était capable de diminuer l'ARNm de la SURVIVINE et l'expression de la protéine. Les premiers essais in vitro indiquaient que le YM155 avait une importante activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses à de faibles concentrations (10 à 100 nM). De plus, des essais cliniques de phase I ont montré que l'administration de cet inhibiteur à des patients atteints de cancers (tumeurs solides et lymphomes) de stade avancé, souvent métastatiques et résistants à la chimiothérapie conventionnelle, était bien tolérée aux doses utilisées et une réponse antitumorale partielle à cette molécule utilisée en agent simple a parfois été observée (Kelly et al., 2013; Satoh et al., 2009; Tolcher et al., 2008). En revanche des essais cliniques de phase II, utilisant le YM155 en agent simple, ont montré une efficacité antitumorale variable en fonction de l'origine de la tumeur et de son stade. C'est pourquoi des essais cliniques de phase II et III sont actuellement en cours pour évaluer plus précisément son intérêt thérapeutique en oncologie, le plus souvent associé à une chimiothérapie conventionnelle et semblent encourageants. Aucun essai clinique de phase II n'a été publié sur le cancer du sein (Rauch et al., 2014). Parallèlement, des études réalisées in vitro sur des lignées cellulaires ont montré dans différents modèles de cancer que le YM155 induisait, comme attendu, la diminution des expressions géniques et protéiques de la SURVIVINE mais aussi celles de MCL-1 (Tang et al., 2011). De plus il a été montré que le YM155 induisait un arrêt de la prolifération et une mort cellulaire plus ou moins importante de lignées cellulaires selon les modèles de cancers. Le modèle du cancer du sein, dont 9 lignées cellulaires tous sous-types confondus ont été

testées en inhibition de croissance, a été classé parmi les modèles de cancers sensibles au YM155 (Nakahara et al., 2011; Rauch et al., 2014). Le YM155 est capable d'induire l'activation des CASPASES et une mort cellulaire qui serait dépendante de l'autophagie (Cheng et al., 2014; Feng et al., 2013; Rauch et al., 2014; Wang et al., 2011, 2014). De plus des études *in vivo* réalisées chez la souris ont montré l'efficacité du YM155 sur des xénogreffes de lignées cellulaires provenant de différents modèles de cancer. Parmi ces études, deux ont été réalisées sur le modèle du cancer du sein et ont montré que le YM155 induisait une diminution de la tumeur et des métastases (Pennati et al., 2014; Rauch et al., 2014; Yamanaka, 2011).

Parallèlement à ces travaux, nous avons commencé une étude de cet inhibiteur dans le cancer du sein, en souhaitant initialement l'utiliser comme outil pharmacologique ciblant la SURVIVINE et ensuite comme puissant agent inducteur de mort cellulaire, dont nous avons essayé de décrypter les mécanismes d'action. Nous avons commencé par déterminer, dans les lignées cellulaires du cancer du sein étudiées, les doses de YM155 faisant apparaître 50% de cellules mortes. Les doses déterminées comprises entre 40 et 70nM montrent l'efficacité de cette molécule à induire de la mort cellulaire dans les cellules mammaires cancéreuses. Cette mort peu marquée après 24 heures de traitement, survient principalement entre 36 et 48H. De plus, elle est observable dans toutes les lignées testées quel que soit leur statut p53, comme cela avait déjà été montré dans d'autres modèles de cancers (Nakahara et al., 2011).

Nous avons d'abord évalué la capacité du YM155 à diminuer l'expression de la SURVIVINE dans les lignées cellulaires étudiées. Nous avons observé que le YM155 réduit l'expression de cette protéine et de MCL-1 plus ou moins efficacement selon nos lignées cellulaires. En revanche, nous n'avons pas vu de modification de l'expression des protéines Bcl-2 et Bcl-xL. Nous remarquons tout de même que le YM155 diminue au moins l'expression de deux protéines impliquées dans la survie cellulaire, qui ont la particularité d'avoir des demi-vies de courte durée. Nous avons alors évalué si la déplétion simultanée de ces deux protéines reproduisait la mort induite par YM155. La co-déplétion de la SURVIVINE et de MCL-1 n'est pas suffisante pour reproduire les effets du YM155 sur l'induction de la mort cellulaire. Ces résultats indiquent que la SURVIVINE et MCL-1 ne sont probablement pas les seules cibles du YM155 dans les cellules cancéreuses. Suite à la découverte de la déplétion de MCL-1 par le YM155, celui-ci a été combiné aux BH3 mimétiques, l'ABT-263 et l'ABT-737, dont les effets apoptotiques sont limités par MCL-1

(Konopleva et al., 2006; Yecies et al., 2010). Ces combinaisons de traitement montraient des effets antitumoraux synergiques dans des lignées cancéreuses prostatiques et de gliomes (Jane et al., 2013; Tang et al., 2011).

Nous avons voulu mieux définir le type de mort cellulaire que le YM155 était capable de déclencher dans des cellules tumorales humaines. Nous avons mis en évidence qu'un inhibiteur des CASPASES ne permettait pas de contrecarrer la mort induite par le YM155. Cette molécule n'induit donc pas une mort cellulaire reposant uniquement sur l'activation des CASPASES. L'inhibition de la kinase RIP1, impliquée dans la nécroptose, seule ou associée à l'inhibition des CASPASES, n'altère pas non plus la mort cellulaire induite par le YM155, excluant cette voie comme initiatrice de la mort. En revanche, le blocage de l'autophagie par la Chloroquine est très efficace pour bloquer la mort déclenchée par le YM155. Ces résultats confirment ceux précédemment décrits dans un modèle de cancer de la prostate et d'adénocarcinome de glandes salivaires (Wang et al., 2011, 2014). L'inhibition de l'autophagie par différents inhibiteurs chimiques (Chloroquine, 3-MA, Bafilomycine) agissant sur des étapes différentes de cette voie, bloquent efficacement la mort cellulaire induite le YM155. Le YM155 induit l'activation du flux autophagique qui est nécessaire à la mort cellulaire déclenchée. Dans ce contexte l'autophagie est une voie de mort. Cette voie est pourtant plus souvent décrite comme voie de survie et activée sous traitement de chimiothérapie, contribuant alors à la résistance au traitement (Sui et al., 2013). C'est la raison pour laquelle l'autophagie est ciblée en combinaison avec les traitements anticancéreux classiques (Amaravadi et al., 2011). Cependant la voie de l'autophagie est également associée à la mort cellulaire dans les cancers (Wu et al., 2012).

De plus, nous avons évalué l'implication de la voie NF- $\kappa$ B, qui comme l'autophagie est une voie qui régule l'homéostasie cellulaire et qui peut réguler cette dernière (Trocoli and Djavaheri-Mergny, 2011). En utilisant l'AS602868, inhibiteur de l'activité kinase de la protéine IKK2, nous avons observé une inhibition très importante de la mort cellulaire induite par le YM155 dans les lignées MCF7 et MDA-MB-231 et une tendance à une diminution dans la lignée Cal51. L'utilisation du BAY 11-7085, autre inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B, diminue aussi significativement la mort cellulaire induite par le YM155 dans la lignée MCF7, cependant moins efficacement que l'AS602868. De manière importante, nous avons pu confirmer dans la lignée MCF7 que l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B par déplétion de la protéine IKK2 par ARN interférence, diminue également la mort induite par le YM155. Ces données

indiquent clairement que la voie NF-kB régule la mort cellulaire induite par le YM155. La voie NF-kB peut être à la fois une voie de survie, souvent en réponse à un stress mais elle est aussi impliquée dans les voies de mort cellulaire par la régulation de l'expression de protéines pro et anti-apoptotiques (Kucharczak et al., 2003). De plus il a été montré dans un modèle de tumeur de Wilms que le YM155 régulait positivement l'expression des gènes impliqués dans la signalisation du TNF $\alpha$ , dont le TNF $\alpha$  lui-même ainsi que NFKB1 (protéine p105/p50) (Tao et al., 2012). Le rôle de la voie NF-kB dans la mort cellulaire déclenchée par le YM155, pourrait passer ou être amplifiée par une induction du TNF $\alpha$ . Il est envisagé d'analyser l'expression du TNF $\alpha$  sous traitement YM155 puis d'évaluer sa contribution à la mort cellulaire. De plus le complexe IKK phosphoryle d'autres cibles dont nous ne devons pas exclure un possible rôle dans l'induction de la mort par le YM155 (Chariot, 2009). D'autres expériences seront à mener pour éclaircir ces voies de signalisation.

L'inhibition de l'autophagie empêchant la mort cellulaire par le YM155, nous avons évalué l'impact du YM155 sur le flux autophagique. Nous avons observé les modifications d'expression des deux formes de la protéine LC3 (LC3-I et LC3-II), qui s'insère dans les autophagosomes. Sa forme secondaire (LC3-II), qui est clivée puis modifiée par lipidation pour l'insertion dans les phagosomes et leur formation, et qui s'accumule sous traitement Chloroquine indique qu'il existe un flux autophagique endogène actif. Nous voyons également apparaître cette accumulation de la forme LC3-II sous traitement YM155 et en co-traitement avec la Chloroquine qui permet de confirmer l'augmentation de ce flux à partir de 36 heures de traitement YM155. Comme l'inhibition de la voie NF-kB protège les cellules de la mort induite par le YM155, nous avons voulu connaître son action sur la voie autophagique. Dans la lignée MCF7, nous avons observé que l'AS602868 semble diminuer l'accumulation de LC3-II obtenue sous YM155. Cette observation peut être interprétée soit comme une inhibition du flux soit comme une augmentation encore plus importante du flux autophagique. Ceci n'est pas observé dans les lignées Cal51 et MDA-MB-231. Pour clarifier ce point, nous avons étudié l'expression de p62, protéine cargo impliquée dans l'autophagie, qui permet d'amener les protéines à dégrader par autophagie au niveau des autophagosomes naissants (Lippai et al., 2014). Nous observons une augmentation de l'expression de p62 après traitement Chloroquine, comme nous nous y attendions. En effet la protéine cargo p62 est moins dégradée lorsque l'autophagie est bloquée par la Chloroquine (Lippai et al., 2014). Nous avons aussi observé que l'AS602868 induisait une accumulation de cette protéine. Ces résultats suggèrent que la voie NF-kB régulerait l'autophagie. Pour décrypter les interactions

qui existent entre ces deux voies et leurs régulations par le YM155, il serait nécessaire d'étudier des modifications d'expression et de modifications post-transcriptionnelles des acteurs de ces deux voies sous traitement YM155 en présence ou non des inhibiteurs, Chloroquine et/ou AS602868. Une analyse en cinétique sur 48 heures, comme nous l'avons initiée, serait également importante à poursuivre sur les différents marqueurs qui varient et sur les acteurs de ces deux voies. De plus l'utilisation de siRNA ciblant des acteurs de ces deux voies pourrait nous permettre de mieux comprendre les contrôles et les connexions entre ces deux voies importantes.

Nous nous interrogeons également sur l'action du YM155 sur les lysosomes indispensables à l'autophagie. En effet la mort lysosomale engendrée par la perméabilisation des membranes des lysosomes cause le déversement dans le cytoplasme des hydrolases contenues dans les lysosomes. Peut s'en suivre alors la dégradation de protéines et l'activation de protéases dont les CASPASES, qui peuvent entraîner la mort cellulaire (Boya and Kroemer, 2008). La Chloroquine ayant un tropisme particulier pour les lysosome et neutralisant l'activité des hydrolases acides lysosomales en empêchant l'acidification des lysosomes, cette molécule pourrait alors bloquer la cascade protéolytique engendrée par le YM155 et ainsi protéger les cellules de la mort. Nous essayons de comprendre si le YM155 pourrait avoir une action directe sur les lysosomes et déclencher une mort cellulaire par perméabilisation des membranes lysosomales comme événement initial. Il est possible que l'autophagie et/ou la voie NF-kB régule la stabilité des lysosomes qui peut être reliée à la mort cellulaire observée.

Malgré l'induction d'une mort non protégée par un inhibiteur des CASPASES, nous avons observé un clivage de la CASPASE 3 qui correspond à l'activation de cette dernière par protéolyse. La CASPASE 3 est donc clivée dans des conditions de mort cellulaires. Celui-ci est bloqué par les inhibiteurs pan-CASPASES dans toutes les lignées, donc l'activation de la CASPASE 3 n'est pas indispensable à la mort cellulaire induite par le YM155. Ces résultats confortent l'utilisation en ex vivo de la CASPASE 3 active comme marqueur de mort cellulaire induite par le YM155. Nous avons également mis en évidence l'apparition d'un clivage tardif de BAX après 36 à 48 heures de traitement YM155, non protégé par un inhibiteur pan-CASPASES. La Chloroquine et l'AS602868 préviennent le clivage de BAX dans la lignée MCF7. Le clivage de BAX a été principalement décrit comme étant réalisé par des calpaïnes (1998). Les calpaïnes sont des protéases à cystéine, dont l'activité est régulée

par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  (Melloni and Pontremoli, 1989). Il serait intéressant de analyser si BAX est indispensable à la mort induite par le YM155 ou si son clivage n'est qu'une conséquence de l'activation de protéases. Pour conclure, le traitement par YM155 semble déclencher une cascade de protéases incluant des CASPASES, ces dernières n'étant pas nécessaire à la mort cellulaire déclenchée. Cependant les CASPASES pourraient jouer un rôle dans l'amplification de la mort cellulaire mais n'en sont pas l'évènement initial. L'implication d'autres protéases comme les calpaïnes mériterait d'être évaluée dans ce modèle.

Comme nous l'avons observé pour la déplétion en SURVIVINE, le YM155 a également un effet génotoxique détecté par une augmentation de  $\gamma$ -H2AX dans les trois lignées utilisées. Cet effet génotoxique est visible mais faible dès 24 heures après traitement YM155 puis s'accumule à 36 et 48 heures après traitement. De plus, nous avons pu mettre en évidence la phosphorylation de CHK2 sur la Thréonine 68 dans la lignée Cal51, au contraire CHK1 n'est pas phosphorylé. Cela suggère donc que le traitement YM155 active préférentiellement la kinase ATM en réponse aux dommages double-brin de l'ADN (Lavin and Kozlov, 2007). Nous avons également observé un recrutement en foci nucléaires de la protéine 53BP1, marqueur précoce de la détection des dommages à l'ADN. En plus de l'activation des voies de détection des dommages à l'ADN, nous avons observé, dans les lignées présentant un gène *TP53* non muté, une activation de la réponse p53. En effet nous voyons apparaître la phosphorylation sur la Sérine 15 de p53, qui est en accord avec l'activation de la voie ATM (Lee and Paull, 2007). Nous avons également observé une accumulation de p53 et l'augmentation de ces cibles transcriptionnelles, PUMA, protéine pro-apoptotique et p21, protéine inhibitrice du cycle cellulaire. L'évaluation de l'implication de l'autophagie et de la voie NF- $\kappa$ B sur l'activation de la réponse p53 a permis de montrer dans la lignée MCF7, une diminution à la fois de l'accumulation de la protéine p53 et celle de p21. L'effet génotoxique du YM155 est diminué lors de l'inhibition de l'autophagie dans les deux lignées *TP53* non muté. L'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B semble diminuer l'effet génotoxique du YM155 plus faiblement dans la lignée MCF7. Les voies de l'autophagie et de NF- $\kappa$ B jouent également un rôle sur l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN. Même si la mort induite par le YM155 est indépendante du statut p53 des lignées cellulaires, nous pourrions définir la part d'implication de la voie p53 dans la mort induite par le YM155. De plus nous voudrions analyser si les voies de réponse aux dommages à l'ADN, la voie p53 mais aussi la mort cellulaire contribuent à l'apparition et à l'accumulation des cassures de l'ADN.

Nous avons étudié l'effet du YM155 sur le cycle cellulaire et nous avons observé une augmentation du pourcentage des cellules en phase S. Les inhibiteurs de l'autophagie et de la voie NF- $\kappa$ B corrigent ces anomalies observées indépendamment du statut p53 et de l'augmentation de l'expression de p21. En revanche, la réponse p53 étant régulée par les inhibiteurs de la mort induite par YM155 et levant le blocage de la phase S, nous pourrions étudier si l'activation de la voie p53 et la protéine p21 y contribuent. Ce blocage en phase S arrive également tardivement, après 36 à 48 heures de traitement YM155. Cette molécule a été décrite comme perturbant la synthèse de l'ADN (Arora et al., 2012; Glaros et al., 2012). De plus des travaux récents ont démontré, à l'aide d'un test acellulaire in vitro, que le YM155 était une molécule capable de s'insérer dans l'ADN (Winter et al., 2014). Ces données suggèrent que le YM155 pourrait être un inhibiteur de la transcription génique dont l'effet à 48 heures serait particulièrement important pour les protéines à courte demi vie comme la SURVIVINE et MCL-1. Nous pouvons faire l'hypothèse que la capacité du YM155 à s'insérer dans l'ADN et à en perturber la synthèse est une des causes de l'arrêt du cycle cellulaire. Est ce une accumulation progressive de la molécule YM155 dans l'ADN au cours du premier cycle cellulaire qui par la suite pourrait perturber la synthèse de l'ADN et engendrer un blocage en phase S et potentiellement participer à l'effet génotoxique ? Et comment les voies de l'autophagie et de NF- $\kappa$ B peuvent réguler cet arrêt en phase S ?

Au cours de notre travail, une publication a identifié le facteur ILF3 comme cible de YM155 (Nakamura et al., 2012). En effet l'isoforme NF110 du facteur et co-activateur de la transcription ILF3 a été découvert comme cible principale du YM155 par interaction directe, par une approche de spectrométrie de masse, et inhibition de sa fonction. Nous avons voulu analyser si l'extinction de ILF3 mimait les effets du traitement YM155, dans les lignées cellulaires du cancer du sein. En ciblant toutes les isoformes du facteur de transcription ILF3 par ARN interférence, nous avons observé que seule la déplétion prolongée d'ILF3 était capable d'entraîner la mort cellulaire et seulement dans la lignée MDA-MB-231. L'observation des cellules au microscope montrait une diminution de la densité cellulaire faisant penser à une diminution de la prolifération des cellules dans les trois lignées cellulaires après 6 à 7 jours de déplétion en ILF3. Cependant nous n'avons pas détecté d'arrêt du cycle cellulaire. Ces résultats ne vont pas dans le sens d'une implication d'ILF3, dans la mort induite par le traitement YM155, dans les lignées cellulaires étudiées. Cette protéine ILF3 s'associe avec ILF2, facteur et co-activateur de transcription qui pourrait hypothétiquement pallier la déplétion de ILF3. ILF3 et ILF2 ont été décrits par la suite comme protéine pouvant

se lier à l'ARN et en réguler l'épissage, la stabilité et même le transport (Castella et al., 2014; Rigo et al., 2012), suggérant alors la possible déstabilisation d'ARNm après ciblage par le YM155. De plus une étude *in vivo* de xénogreffe a montré que ILF3 était important pour le développement tumoral dans un modèle de cancer du sein (Hu et al., 2013).

Nous avons identifié l'autophagie et la voie NF- $\kappa$ B agissant en amont de la voie de mort cellulaire suite au traitement YM155. Ces deux voies ont été décrites comme voies homéostatiques dans un contexte de cellules normales. Elles peuvent être activées en réponses à différents stress et dans un contexte oncogénique. Dans les cellules cancéreuses, ces voies sont responsables de résistances aux traitements de par leur implication dans les voies de survie cellulaire. Cependant elles peuvent dans certains contextes être impliquées dans les voies de mort cellulaire (Baud and Karin, 2009; Kucharczak et al., 2003; Li and Sethi, 2010; Sui et al., 2013; Wu et al., 2012). En effet l'autophagie a été décrite pour être impliquée dans un mécanisme de mort cellulaire précédant une mort apoptotique (González-Polo et al., 2005). La voie NF- $\kappa$ B a également été décrite pour induire une voie pro-apoptotique suite à l'activation d'ATM en réponse à des dommages doubles-brin de l'ADN (Wu and Miyamoto, 2008).

A partir de nos résultats, nous avons essayé de comprendre la séquence d'évènements survenant lors d'un traitement par YM155. Tous les effets observés (mort, flux autophagique, clivage de BAX, dommages à l'ADN) suite au traitement YM155 surviennent vers 36 à 48 heures après le traitement. Les dommages à l'ADN sont en aval de l'autophagie, mais leur survenue ne semble pas aussi dépendante de la voie NF- $\kappa$ B. En revanche la réponse p53 est dépendante de ces deux voies. La voie de l'autophagie est activée par le YM155, mais qu'en est-il de la voie NF- $\kappa$ B ? Quelle est la part de la voie de réponse aux dommages à l'ADN et de la voie d'activation de p53 sur l'arrêt du cycle cellulaire, l'activation de ces deux voies et la survenue des dommages à l'ADN ? Et inversement ces deux voies ont elles une action sur les voies de réponses aux dommages à l'ADN et comment peuvent elles l'exercer ? De plus la voie NF- $\kappa$ B est visiblement nécessaire dans deux des trois lignées étudiées. Nous pourrions comparer ces différentes lignées afin de mieux cerner les mécanismes d'action du YM155. Enfin nous voudrions étudier si l'une de ses deux voies régule l'autre. Les résultats obtenus dans la lignée MCF7 indiquent que la voie NF- $\kappa$ B régule l'autophagie. La lignée Cal51 est la plus résistante à la mort cellulaire induite par le YM155 mais n'a pas besoin de la voie NF- $\kappa$ B pour exécuter la mort cellulaire. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que la voie NF- $\kappa$ B

amplifie l'activation de la voie de l'autophagie. De plus l'évaluation de l'extinction de cible de ces voies sur les différents effets du YM155 pourra également nous permettre de comprendre la séquence des événements. Toutes ces questions seront intéressantes à résoudre afin de mieux comprendre les mécanismes d'action du YM155 et de proposer des synergies pertinentes avec d'autres molécules et/ou d'anticiper des résistances potentielles.

D'un point de vue thérapeutique, nous avons également mis en évidence que le YM155 ciblait préférentiellement les cellules cancéreuses par rapport à des cellules mammaires non transformées. De plus cette molécule a aussi une action sur la capacité des cellules à former des sphères *in vitro*, test qui permet d'évaluer leur capacité d'autorenouvellement, suggérant également le ciblage par le YM155 des cellules souches initiatrices de tumeurs. Ces cellules sont probablement intéressantes à cibler par les traitements anticancéreux car leur présence est souvent péjorative. Enfin les données de mort cellulaire obtenues sur le modèle *ex vivo* d'explant de tumeurs primaires mammaires que notre équipe a développé (Séveno et al., 2012) montrent que le YM155 augmente significativement la mort cellulaire dans ces cellules cancéreuses mammaires primaires en présence de leur environnement dans une majorité des cas. Sur une série de 17 tumeurs mammaires provenant de patientes traitées pour un cancer du sein à l'ICO, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Centre de lutte contre le Cancer René Gauducheau, le traitement YM155 induit une réponse apoptotique dans 59% des cas. Ces données obtenues sur des échantillons de tumeurs primaires indiquent que le YM155 est donc une molécule d'intérêt thérapeutique dans le cancer du sein. De plus nous pourrions comparer les cohortes de tumeurs sensibles aux tumeurs résistantes afin de mieux cibler les possibles mécanismes de résistance et de comprendre l'activité du YM155 et son ciblage. En effet nous avons accès aux données transcriptomiques, reflet de l'expression génique, de la tumeur, grâce à la collaboration avec P. Jezequel (UMGC, CHU Nantes, ICO). Nous pourrions également analyser le sécrétome de la tumeur avec ou sans traitement YM155, grâce à la plateforme de protéomique de l'ICO. De manière intéressante, un récent article a montré que le YM155 a besoin du transporteur SLC35F2 pour avoir son action génotoxique. L'expression et la fonctionnalité de ce transporteur pourraient être un premier marqueur pour cibler la réponse à la molécule. Enfin l'inclusion d'un plus grand nombre de tumeurs pourra aussi nous permettre de mettre en évidence des corrélations de sensibilité ou résistance avec les sous-types de cancer du sein ou bien avec d'autres marqueurs.

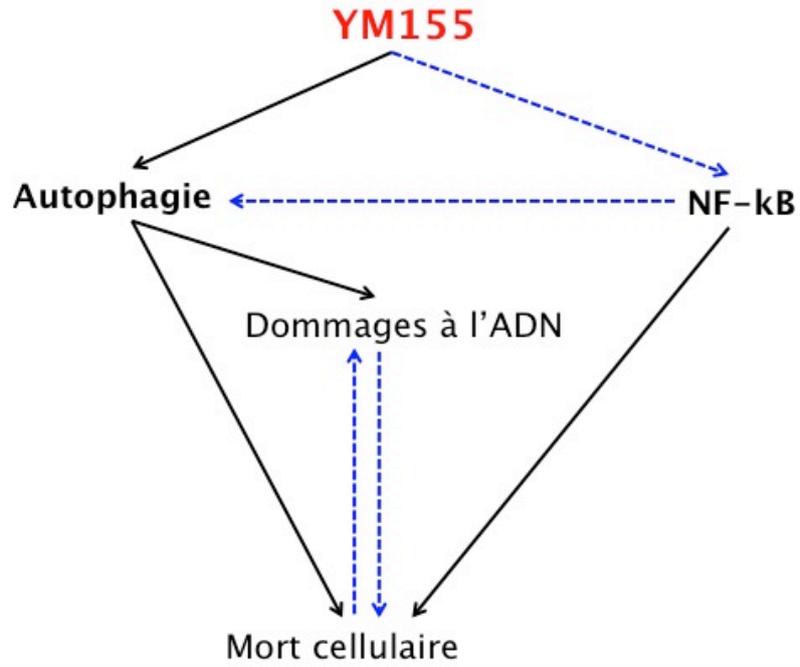


Figure 86 : Schéma récapitulatif des effets observés du YM155 et des hypothétiques voies de régulation

En conclusion, malgré un effet supresseur de la SURVIVINE avéré, le YM155 présente une activité cytotoxique majeure, probablement indépendante du niveau de SURVIVINE et intéressante dans le traitement du cancer du sein.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Adida, C., Crotty, P.L., McGrath, J., Berrebi, D., Diebold, J., and Altieri, D.C. (1998). Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am. J. Pathol.* *152*, 43.
- Aggarwal, B.B., Kunnumakkara, A.B., Harikumar, K.B., Gupta, S.R., Tharakan, S.T., Koca, C., Dey, S., and Sung, B. (2009). Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1171*, 59–76.
- Allen, C., Kurimasa, A., Brenneman, M.A., Chen, D.J., and Nickoloff, J.A. (2002). DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 3758–3763.
- Altieri, D.C. (2003). Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 46–54.
- Altieri, D.C. (2008a). New wirings in the survivin networks. *Oncogene* *27*, 6276–6284.
- Altieri, D.C. (2008b). Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 61–70.
- Altieri, D.C. Targeting survivin in cancer. *Cancer Lett.*
- Amaravadi, R.K., Lippincott-Schwartz, J., Yin, X.-M., Weiss, W.A., Takebe, N., Timmer, W., DiPaola, R.S., Lotze, M.T., and White, E. (2011). Principles and Current Strategies for Targeting Autophagy for Cancer Treatment. *Clin. Cancer Res.* *17*, 654–666.
- Ambrosini, G., Adida, C., and Altieri, D.C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* *3*, 917–921.
- Anderson, L., Henderson, C., and Adachi, Y. (2001). Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 1719–1729.
- Anglana, M., Apiou, F., Bensimon, A., and Debatisse, M. (2003). Dynamics of DNA Replication in Mammalian Somatic Cells: Nucleotide Pool Modulates Origin Choice and Interorigin Spacing. *Cell* *114*, 385–394.
- Arora, R., Shuda, M., Guastafierro, A., Feng, H., Toptan, T., Tolstov, Y., Normolle, D., Vollmer, L.L., Vogt, A., Dömling, A., et al. (2012). Survivin is a therapeutic target in Merkel cell carcinoma. *Sci. Transl. Med.* *4*, 133ra56.
- Arora, V., Cheung, H.H., Plenchette, S., Micali, O.C., Liston, P., and Korneluk, R.G. (2007). Degradation of survivin by the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-XAF1 complex. *J. Biol. Chem.* *282*, 26202–26209.
- Asanuma, K., Tsuji, N., Endoh, T., Yagihashi, A., and Watanabe, N. (2004). Survivin enhances Fas ligand expression via up-regulation of specificity protein 1-mediated gene transcription in colon cancer cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 3922–3929.
- Aspe, J.R., and Wall, N.R. (2010). Survivin-T34A: molecular mechanism and therapeutic potential. *OncoTargets Ther.* *3*, 247–254.
- Bah, N., Maillet, L., Ryan, J., Dubreil, S., Gautier, F., Letai, A., Juin, P., and Barillé-Nion, S. (2014). Bcl-xL controls a switch between cell death modes during mitotic arrest. *Cell Death Dis.* *5*, e1291.
- Baird, R.D., and Caldas, C. (2013). Genetic heterogeneity in breast cancer: the road to personalized medicine? *BMC Med.* *11*, 151.
- Baker, S.J., and Reddy, E.P. (2012). CDK4: A Key Player in the Cell Cycle, Development, and Cancer. *Genes Cancer* *3*, 658–669.
- Barrett, R.M.A., Osborne, T.P., and Wheatley, S.P. (2009). Phosphorylation of survivin at threonine 34 inhibits its mitotic function and enhances its cytoprotective activity. *Cell Cycle* *8*, 278–283.

- Baud, V., and Karin, M. (2009). Is NF- $\kappa$ B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 33–40.
- Berger, G., Lawrence, M., Hue, S., and Neil, S.J.D. (2014). G2/M cell cycle arrest correlates with primate lentiviral Vpr interaction with the SLX4 complex. *J. Virol.*
- Bernatchez, C., Zhu, K., Li, Y., Andersson, H., Ionnides, C., Fernandez-Vina, M., Cano, P., Cooper, L., Abbruzzese, J., Hwu, P., et al. (2011). Altered decamer and nonamer from an HLA-A0201-restricted epitope of Survivin differentially stimulate T-cell responses in different individuals. *Vaccine* 29, 3021–3030.
- Bertheau, P., Lehmann-Che, J., Varna, M., Dumay, A., Poirot, B., Porcher, R., Turpin, E., Plassa, L.-F., de Roquancourt, A., Boursstyn, E., et al. (2013). p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *The Breast* 22, *Supplement 2*, S27–S29.
- Bertrand, P., Saintigny, Y., and Lopez, B.S. (2004). p53's double life: transactivation-independent repression of homologous recombination. *Trends Genet. TIG* 20, 235–243.
- Bétermier, M., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2014). Is Non-Homologous End-Joining Really an Inherently Error-Prone Process? *PLoS Genet* 10, e1004086.
- Blanchard, J.-M. (2003). [Oncogenes and mitotic regulators: a change in perspective of our view of neoplastic processes]. *Médecine Sci. MS* 19, 187–199.
- Bolderson, E., Tomimatsu, N., Richard, D.J., Boucher, D., Kumar, R., Pandita, T.K., Burma, S., and Khanna, K.K. (2010). Phosphorylation of Exo1 modulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 38, 1821–1831.
- Boya, P., and Kroemer, G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 27, 6434–6451.
- Brandl, A., Wagner, T., Uhlig, K.M., Knauer, S.K., Stauber, R.H., Melchior, F., Schneider, G., Heinzl, T., and Krämer, O.H. (2012). Dynamically regulated sumoylation of HDAC2 controls p53 deacetylation and restricts apoptosis following genotoxic stress. *J. Mol. Cell Biol.* 4, 284–293.
- Buisson, R., Dion-Côté, A.-M., Coulombe, Y., Launay, H., Cai, H., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Xia, B., and Masson, J.-Y. (2010). Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1247–1254.
- Büssing, A., Vervecken, W., Wagner, M., Wagner, B., Pfüller, U., and Schietzel, M. (1999). Expression of mitochondrial Apo2.7 molecules and caspase-3 activation in human lymphocytes treated with the ribosome-inhibiting mistletoe lectins and the cell membrane permeabilizing viscotoxins. *Cytometry* 37, 133–139.
- Caldas, H., Jiang, Y., Holloway, M.P., Fangusaro, J., Mahotka, C., Conway, E.M., and Altura, R.A. (2005a). Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. *Oncogene* 24, 1994–2007.
- Caldas, H., Honsey, L.E., and Altura, R.A. (2005b). Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Mol. Cancer* 4, 11.
- Caldas, H., Fangusaro, J.R., Boué, D.R., Holloway, M.P., and Altura, R.A. (2007). Dissecting the role of endothelial SURVIVIN DeltaEx3 in angiogenesis. *Blood* 109, 1479–1489.
- Campane, M., Noël, B., Couriaud, C., Grau, M., Guillemin, Y., Gautier, F., Gouraud, W., Charbonnel, C., Champion, L., Jézéquel, P., et al. (2011). c-Myc dependent expression of pro-apoptotic Bim renders HER2-overexpressing breast cancer cells dependent on anti-apoptotic Mcl-1. *Mol. Cancer* 10, 110.
- Capalbo, G., Dittmann, K., Weiss, C., Reichert, S., Hausmann, E., Rödel, C., and Rödel, F. (2010). Radiation-Induced Survivin Nuclear Accumulation is Linked to DNA Damage Repair. *Int. J. Radiat. Oncol.* 77, 226–234.

- Carey, L., Winer, E., Viale, G., Cameron, D., and Gianni, L. (2010). Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *7*, 683–692.
- Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., and Earnshaw, W.C. (2012a). The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 789–803.
- Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., and Earnshaw, W.C. (2012b). The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 789–803.
- Carr, A.M., and Lambert, S. (2013). Replication stress-induced genome instability: the dark side of replication maintenance by homologous recombination. *J. Mol. Biol.* *425*, 4733–4744.
- Carrasco, R.A., Stamm, N.B., Marcusson, E., Sandusky, G., Iversen, P., and Patel, B.K.R. (2011). Antisense inhibition of survivin expression as a cancer therapeutic. *Mol. Cancer Ther.* *10*, 221–232.
- Castella, S., Bernard, R., Corno, M., Fradin, A., and Larcher, J.-C. (2014). Iif3 and NF90 functions in RNA biology. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*.
- Ceballos-Cancino, G., Espinosa, M., Maldonado, V., and Melendez-Zajgla, J. (2007). Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin. *Oncogene* *26*, 7569–7575.
- Chantalat, L., Skoufias, D.A., Kleman, J.P., Jung, B., Dideberg, O., and Margolis, R.L. (2000). Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions. *Mol. Cell* *6*, 183–189.
- Chariot, A. (2009). The NF- $\kappa$ B-independent functions of IKK subunits in immunity and cancer. *Trends Cell Biol.* *19*, 404–413.
- Cheng, S., Chang, Y., Liu, C., Lee, J., Chan, H., Kuo, C., Lin, K., Tsai, S., Chen, S., Li, C., et al. (2014). YM155 down-regulates survivin and XIAP, modulates autophagy, and induces autophagy-dependent DNA damage in breast cancer cells. *Br. J. Pharmacol.*
- Chowdhury, S., Howell, G.M., Teggart, C.A., Chowdhury, A., Person, J.J., Bowers, D.M., and Brattain, M.G. (2011). Histone deacetylase inhibitor belinostat represses survivin expression through reactivation of transforming growth factor beta (TGFbeta) receptor II leading to cancer cell death. *J. Biol. Chem.* *286*, 30937–30948.
- Church, D.N., and Talbot, D.C. (2012). Survivin in solid tumors: rationale for development of inhibitors. *Curr. Oncol. Rep.* *14*, 120–128.
- Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell* *149*, 1192–1205.
- Colnaghi, R., Connell, C.M., Barrett, R.M.A., and Wheatley, S.P. (2006). Separating the anti-apoptotic and mitotic roles of survivin. *J. Biol. Chem.* *281*, 33450–33456.
- Crasta, K., Ganem, N.J., Dagher, R., Lantermann, A.B., Ivanova, E.V., Pan, Y., Nezi, L., Protopopov, A., Chowdhury, D., and Pellman, D. (2012). DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature* *482*, 53–58.
- Daboussi, F., Courbet, S., Benhamou, S., Kannouche, P., Zdzienicka, M.Z., Debatisse, M., and Lopez, B.S. (2008a). A homologous recombination defect affects replication-fork progression in mammalian cells. *J. Cell Sci.* *121*, 162–166.
- Daboussi, F., Courbet, S., Benhamou, S., Kannouche, P., Zdzienicka, M.Z., Debatisse, M., and Lopez, B.S. (2008b). A homologous recombination defect affects replication-fork progression in mammalian cells. *J. Cell Sci.* *121*, 162–166.
- Daley, J.M., and Sung, P. (2014). 53BP1, BRCA1, and the Choice between Recombination and End Joining at DNA Double-Strand Breaks. *Mol. Cell Biol.* *34*, 1380–1388.
- Dallaglio, K., Marconi, A., and Pincelli, C. (2012). Survivin: a dual player in healthy and

diseased skin. *J. Invest. Dermatol.* *132*, 18–27.

Dedes, K.J., Wilkerson, P.M., Wetterskog, D., Weigelt, B., Ashworth, A., and Reis-Filho, J.S. (2011). Synthetic lethality of PARP inhibition in cancers lacking BRCA1 and BRCA2 mutations. *Cell Cycle* *10*, 1192–1199.

Dehé, P.-M., Coulon, S., Scaglione, S., Shanahan, P., Takedachi, A., Wohlschlegel, J.A., Yates, J.R., Llorente, B., Russell, P., and Gaillard, P.-H.L. (2013). Regulation of Mus81–Eme1 Holliday junction resolvase in response to DNA damage. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 598–603.

Delacour-Larose, M., Thi, M.-N.H., Dimitrov, S., and Molla, A. (2007). Role of survivin phosphorylation by aurora B in mitosis. *Cell Cycle Georget. Tex* *6*, 1878–1885.

Delacour-Larose, M., My Nhung Hoang, T., and Molla, A. (2008). Survivine, la petite reine du complexe passager: *Chek-up* pour son dixième anniversaire. *Médecine/sciences* *24*, 828–832.

Deveraux, Q.L., and Reed, J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* *13*, 239–252.

Dohi, T., Okada, K., Xia, F., Wilford, C.E., Samuel, T., Welsh, K., Marusawa, H., Zou, H., Armstrong, R., Matsuzawa, S., et al. (2004a). An IAP-IAP Complex Inhibits Apoptosis. *J. Biol. Chem.* *279*, 34087–34090.

Dohi, T., Beltrami, E., Wall, N.R., Plescia, J., and Altieri, D.C. (2004b). Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* *114*, 1117–1127.

Dohi, T., Xia, F., and Altieri, D.C. (2007). Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection. *Mol. Cell* *27*, 17–28.

Duffy, M.J., O'Donovan, N., Brennan, D.J., Gallagher, W.M., and Ryan, B.M. (2007). Survivin: A promising tumor biomarker. *Cancer Lett.* *249*, 49–60.

Dumay, A., Laulier, C., Bertrand, P., Saintigny, Y., Lebrun, F., Vayssière, J.-L., and Lopez, B.S. (2006). Bax and Bid, two proapoptotic Bcl-2 family members, inhibit homologous recombination, independently of apoptosis regulation. *Oncogene* *25*, 3196–3205.

Eid, W., Steger, M., El-Shemerly, M., Ferretti, L.P., Peña-Diaz, J., König, C., Valtorta, E., Sartori, A.A., and Ferrari, S. (2010). DNA end resection by CtIP and exonuclease 1 prevents genomic instability. *EMBO Rep.* *11*, 962–968.

Endoh, T., Tsuji, N., Asanuma, K., Yagihashi, A., and Watanabe, N. (2005). Survivin enhances telomerase activity via up-regulation of specificity protein 1- and c-Myc-mediated human telomerase reverse transcriptase gene transcription. *Exp. Cell Res.* *305*, 300–311.

Estève, P.-O., Chin, H.G., and Pradhan, S. (2005). Human maintenance DNA (cytosine-5)-methyltransferase and p53 modulate expression of p53-repressed promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 1000–1005.

Estève, P.-O., Chin, H.G., and Pradhan, S. (2007). Molecular mechanisms of transactivation and doxorubicin-mediated repression of survivin gene in cancer cells. *J. Biol. Chem.* *282*, 2615–2625.

Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N.J., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C., et al. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* *434*, 917–921.

Feng, W., Yoshida, A., and Ueda, T. (2013). YM155 induces caspase-8 dependent apoptosis through downregulation of survivin and Mcl-1 in human leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *435*, 52–57.

Fortugno, P., Beltrami, E., Plescia, J., Fontana, J., Pradhan, D., Marchisio, P.C., Sessa, W.C., and Altieri, D.C. (2003). Regulation of survivin function by Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 13791–13796.

Frelin, C., Imbert, V., Griessinger, E., Loubat, A., Dreano, M., and Peyron, J.-F. (2003).

AS602868, a pharmacological inhibitor of IKK2, reveals the apoptotic potential of TNF- $\alpha$  in Jurkat leukemic cells. *Oncogene* 22, 8187–8194.

Fukuda, S., and Pelus, L.M. (2006). Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol. Cancer Ther.* 5, 1087–1098.

Fukuda, S., Foster, R.G., Porter, S.B., and Pelus, L.M. (2002). The antiapoptosis protein survivin is associated with cell cycle entry of normal cord blood CD34+ cells and modulates cell cycle and proliferation of mouse hematopoietic progenitor cells. *Blood* 100, 2463–2471.

Fukuda, S., Mantel, C.R., and Pelus, L.M. (2004). Survivin regulates hematopoietic progenitor cell proliferation through p21WAF1/Cip1-dependent and -independent pathways. *Blood* 103, 120–127.

Fukuda, S., Hoggatt, J., Singh, P., Abe, M., Speth, J.M., Hu, P., Conway, E.M., Nucifora, G., Yamaguchi, S., and Pelus, L.M. (2014). Survivin modulates genes with divergent molecular functions and regulates proliferation of hematopoietic stem cells through Evi-1. *Leukemia*.

Füllgrabe, J., Kavanagh, E., and Joseph, B. (2011). Histone onco-modifications. *Oncogene* 30, 3391–3403.

Ge, Q.-X., Li, Y.-Y., Nie, Y.-Q., Zuo, W.-G., and Du, Y.-L. (2013). Expression of survivin and its four splice variants in colorectal cancer and its clinical significances. *Med. Oncol.* 30, 1–8.

Ghosh, J.C., Dohi, T., Raskett, C.M., Kowalik, T.F., and Altieri, D.C. (2006). Activated checkpoint kinase 2 provides a survival signal for tumor cells. *Cancer Res.* 66, 11576–11579.

Glaros, T.G., Stockwin, L.H., Mullendore, M.E., Smith, B., Morrison, B.L., and Newton, D.L. (2012). The “survivin suppressants” NSC 80467 and YM155 induce a DNA damage response. *Cancer Chemother. Pharmacol.*

Gluz, O., Liedtke, C., Gottschalk, N., Pusztai, L., Nitz, U., and Harbeck, N. (2009). Triple-negative breast cancer—current status and future directions. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 20, 1913–1927.

González-Polo, R.-A., Boya, P., Pauleau, A.-L., Jalil, A., Larochette, N., Souquère, S., Eskelinen, E.-L., Pierron, G., Saftig, P., and Kroemer, G. (2005). The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J. Cell Sci.* 118, 3091–3102.

Grabarz, A., Barascu, A., Guirouilh-Barbat, J., and Lopez, B.S. (2012). Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. *Am. J. Cancer Res.* 2, 249–268.

Griessinger, E., Imbert, V., Lagadec, P., Gonthier, N., Dubreuil, P., Romanelli, A., Dreano, M., and Peyron, J.-F. (2007). AS602868, a dual inhibitor of IKK2 and FLT3 to target AML cells. *Leukemia* 21, 877–885.

Groner, B., and Weiss, A. (2014a). Targeting survivin in cancer: novel drug development approaches. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* 28, 27–39.

Groner, B., and Weiss, A. (2014b). Targeting survivin in cancer: novel drug development approaches. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* 28, 27–39.

Guan, D., Altan-Bonnet, N., Parrott, A.M., Arrigo, C.J., Li, Q., Khaleduzzaman, M., Li, H., Lee, C.-G., Pe'ery, T., and Mathews, M.B. (2008). Nuclear Factor 45 (NF45) Is a Regulatory Subunit of Complexes with NF90/110 Involved in Mitotic Control. *Mol. Cell. Biol.* 28, 4629–4641.

Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., Bertrand, P., Pirzio, L., Desmaze, C., Sabatier, L., and Lopez, B.S. (2004). Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol. Cell* 14, 611–623.

Guo, Y., Xu, F., Lu, T., Duan, Z., and Zhang, Z. (2012). Interleukin-6 signaling pathway in

targeted therapy for cancer. *Cancer Treat. Rev.* 38, 904–910.

Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G., and Bartek, J. (2008). An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* 319, 1352–1355.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.

Hansen, J.B., Fisker, N., Westergaard, M., Kjaerulff, L.S., Hansen, H.F., Thru, C.A., Rosenbohm, C., Wissenbach, M., Orum, H., and Koch, T. (2008). SPC3042: a proapoptotic survivin inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* 7, 2736–2745.

Hervouet, E., Vallette, F.M., and Cartron, P.-F. (2010). Impact of the DNA methyltransferases expression on the methylation status of apoptosis-associated genes in glioblastoma multiforme. *Cell Death Dis.* 1, e8.

Hoeijmakers, J.H.J. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N. Engl. J. Med.* 361, 1475–1485.

Hoffman, W.H., Biade, S., Zilfou, J.T., Chen, J., and Murphy, M. (2002). Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J. Biol. Chem.* 277, 3247–3257.

Hu, Q., Lu, Y.-Y., Noh, H., Hong, S., Dong, Z., Ding, H.-F., Su, S.-B., and Huang, S. (2013). Interleukin enhancer-binding factor 3 promotes breast tumor progression by regulating sustained urokinase-type plasminogen activator expression. *Oncogene* 32, 3933–3943.

Huang, B., Warner, M., and Gustafsson, J.-A. (2014). Estrogen receptors in breast carcinogenesis and endocrine therapy. *Mol. Cell. Endocrinol.*

Huertas, P. (2010). DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 11–16.

Jane, E.P., Premkumar, D.R., DiDomenico, J.D., Hu, B., Cheng, S.-Y., and Pollack, I.F. (2013). YM-155 potentiates the effect of ABT-737 in malignant human glioma cells via survivin and Mcl-1 downregulation in an EGFR-dependent context. *Mol. Cancer Ther.*

Jeyaprakash, A.A., Klein, U.R., Lindner, D., Ebert, J., Nigg, E.A., and Conti, E. (2007). Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together. *Cell* 131, 271–285.

Jeyaprakash, A.A., Basquin, C., Jayachandran, U., and Conti, E. (2011). Structural Basis for the Recognition of Phosphorylated Histone H3 by the Survivin Subunit of the Chromosomal Passenger Complex. *Structure* 19, 1625–1634.

Jha, K., Shukla, M., and Pandey, M. (2012). Survivin expression and targeting in breast cancer. *Surg. Oncol.* 21, 125–131.

Jia, L., Kim, S., and Yu, H. (2013). Tracking spindle checkpoint signals from kinetochores to APC/C. *Trends Biochem. Sci.* 38, 302–311.

Karow, J.K., Constantinou, A., Li, J.L., West, S.C., and Hickson, I.D. (2000). The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of holliday junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6504–6508.

Kelly, A.E., Ghenoiu, C., Xue, J.Z., Zierhut, C., Kimura, H., and Funabiki, H. (2010). Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B. *Science* 330, 235–239.

Kelly, R.J., Thomas, A., Rajan, A., Chun, G., Lopez-Chavez, A., Szabo, E., Spencer, S., Carter, C.A., Guha, U., Khozin, S., et al. (2013). A phase I/II study of sepantronium bromide (YM155, survivin suppressor) with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 24, 2601–2606.

Kenney, D.M., Geschwindt, R.D., Kary, M.R., Linic, J.M., Sardesai, N.Y., and Li, Z.-Q.

(2007). Detection of newly diagnosed bladder cancer, bladder cancer recurrence and bladder cancer in patients with hematuria using quantitative rt-PCR of urinary survivin. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 28, 57–62.

Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J.A., et al. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445–544.

Knauer, S.K., Krämer, O.H., Knösel, T., Engels, K., Rödel, F., Kovács, A.F., Dietmaier, W., Klein-Hitpass, L., Habtemichael, N., Schweitzer, A., et al. (2007). Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of survivin. *FASEB J.* 21, 207–216.

Konopleva, M., Contractor, R., Tsao, T., Samudio, I., Ruvolo, P.P., Kitada, S., Deng, X., Zhai, D., Shi, Y.-X., Sneed, T., et al. (2006). Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 10, 375–388.

Kostrouchova, M., Kostrouch, Z., Saudek, V., Piatigorsky, J., and Rall, J.E. (2003). BIR-1, a *Caenorhabditis elegans* homologue of Survivin, regulates transcription and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5240–5245.

Kotwaliwale, C., and Biggins, S. (2006). Microtubule capture: a concerted effort. *Cell* 127, 1105–1108.

Krämer, O.H., Baus, D., Knauer, S.K., Stein, S., Jäger, E., Stauber, R.H., Grez, M., Pfitzner, E., and Heinzl, T. (2006). Acetylation of Stat1 modulates NF- $\kappa$ B activity. *Genes Dev.* 20, 473–485.

Krysko, O., De Ridder, L., and Cornelissen, M. (2004). Phosphatidylserine exposure during early primary necrosis (oncosis) in JB6 cells as evidenced by immunogold labeling technique. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 9, 495–500.

Kucharczak, J., Simmons, M.J., Fan, Y., and Gélinas, C. (2003). To be, or not to be: NF- $\kappa$ B is the answer – role of Rel/NF- $\kappa$ B in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 22, 8961–8982.

Lachenmayer, A., Toffanin, S., Cabellos, L., Alsinet, C., Hoshida, Y., Villanueva, A., Minguéz, B., Tsai, H.-W., Ward, S.C., Thung, S., et al. (2012). Combination therapy for hepatocellular carcinoma: additive preclinical efficacy of the HDAC inhibitor panobinostat with sorafenib. *J. Hepatol.* 56, 1343–1350.

Lampson, M.A., Renduchitala, K., Khodjakov, A., and Kapoor, T.M. (2004). Correcting improper chromosome-spindle attachments during cell division. *Nat. Cell Biol.* 6, 232–237.

Larsen, M.J., Thomassen, M., Gerdes, A.-M., and Kruse, T.A. (2014). Hereditary breast cancer: clinical, pathological and molecular characteristics. *Breast Cancer Basic Clin. Res.* 8, 145–155.

Laulier, C., Barascu, A., Guirouilh-Barbat, J., Pennarun, G., Chalony, C.L., Chevalier, F., Palierne, G., Bertrand, P., Verbavatz, J.M., and Lopez, B.S. (2011). Bcl-2 Inhibits Nuclear Homologous Recombination by Localizing BRCA1 to the Endomembranes. *Cancer Res.* 71, 3590–3602.

Lavin, M.F., and Gueven, N. (2006). The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ.* 13, 941–950.

Lavin, M.F., and Kozlov, S. (2007). ATM activation and DNA damage response. *Cell Cycle Georget. Tex* 6, 931–942.

Lechler, P., Schaumburger, J., Köck, F.X., Balakrishnan, S., Doukas, S., Prantl, L., and Grifka, J. (2011a). The oncofetal gene survivin promotes cell proliferation and survival in primary human osteoblastic cells. *Calcif. Tissue Int.* 89, 211–220.

Lechler, P., Balakrishnan, S., Schaumburger, J., Grässel, S., Baier, C., Grifka, J., Straub, R.H., and Renkawitz, T. (2011b). The oncofetal gene survivin is re-expressed in osteoarthritis and is

required for chondrocyte proliferation in vitro. *BMC Musculoskelet. Disord.* *12*, 150.

Lee, J.-H., and Paull, T.T. (2007). Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* *26*, 7741–7748.

Lens, S.M.A., and Medema, R.H. (2003). The survivin/Aurora B complex: its role in coordinating tension and attachment. *Cell Cycle Georget. Tex* *2*, 507–510.

Lens, S.M., Vader, G., and Medema, R.H. (2006). The case for Survivin as mitotic regulator. *Curr. Opin. Cell Biol.* *18*, 616–622.

Lens, S.M.A., Wolthuis, R.M.F., Klompaker, R., Kauw, J., Agami, R., Brummelkamp, T., Kops, G., and Medema, R.H. (2003). Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *EMBO J.* *22*, 2934–2947.

Li, F., and Altieri, D.C. (1999a). The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. *Cancer Res.* *59*, 3143–3151.

Li, F., and Altieri, D.C. (1999b). Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *Biochem. J.* *344 Pt 2*, 305–311.

Li, F., and Sethi, G. (2010). Targeting transcription factor NF- $\kappa$ B to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* *1805*, 167–180.

Li, F., Ambrosini, G., Chu, E.Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P.C., and Altieri, D.C. (1998). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* *396*, 580–584.

Li, F., Ackermann, E.J., Bennett, C.F., Rothermel, A.L., Plescia, J., Tognin, S., Villa, A., Marchisio, P.C., and Altieri, D.C. (1999). Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat. Cell Biol.* *1*, 461–466.

Lieber, M.R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 181–211.

Ling, X., Cao, S., Cheng, Q., Keefe, J.T., Rustum, Y.M., and Li, F. (2012). A novel small molecule FL118 that selectively inhibits survivin, Mcl-1, XIAP and cIAP2 in a p53-independent manner, shows superior antitumor activity. *PloS One* *7*, e45571.

Linkermann, A., and Green, D.R. (2014). Necroptosis. *N. Engl. J. Med.* *370*, 455–465.

Lippai, M., nika, L&#x151, W, P., and ter (2014). The Role of the Selective Adaptor p62 and Ubiquitin-Like Proteins in Autophagy. *BioMed Res. Int.* *2014*, e832704.

Liu, P., Carvalho, C.M.B., Hastings, P.J., and Lupski, J.R. (2012). Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *22*, 211–220.

Liu, T., Brouha, B., and Grossman, D. (2004). Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells. *Oncogene* *23*, 39–48.

Lladser, A., Sanhueza, C., Kiessling, R., and Quest, A.F.G. (2011). Is survivin the potential Achilles' heel of cancer? *Adv. Cancer Res.* *111*, 1–37.

Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H., and Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol. Ther.* *10*, 955–960.

Maréchal, A., and Zou, L. (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*.

Melloni, E., and Pontremoli, S. (1989). The calpains. *Trends Neurosci.* *12*, 438–444.

Michalet, X., Ekong, R., Fougerousse, F., Rousseaux, S., Schurra, C., Hornigold, N., Slegtenhorst, M. van, Wolfe, J., Povey, S., Beckmann, J.S., et al. (1997). Dynamic Molecular Combing: Stretching the Whole Human Genome for High-Resolution Studies. *Science* *277*, 1518–

1523.

Mita, A.C., Mita, M.M., Nawrocki, S.T., and Giles, F.J. (2008). Survivin: Key Regulator of Mitosis and Apoptosis and Novel Target for Cancer Therapeutics. *Clin. Cancer Res.* *14*, 5000–5005.

Mizushima, N., and Yoshimori, T. (2007). How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy* *3*, 542–545.

Moore, N.M., and Nagahara, L.A. (2014). Physical Biology in Cancer. 1. Cellular physics of cancer metastasis. *AJP Cell Physiol.* *306*, C78–C79.

Moscat, J., and Diaz-Meco, M.T. (2009). p62 at the Crossroads of Autophagy, Apoptosis, and Cancer. *Cell* *137*, 1001–1004.

Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 379–393.

Nagahara, Y., Tanaka, M., and Shinomiya, T. (2007). Mechanism of mitochondrial 7A6 antigen exposure triggered by distinct apoptotic pathways: involvement of caspases. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* *71*, 232–241.

Naim, V., Wilhelm, T., Debatisse, M., and Rosselli, F. (2013). ERCC1 and MUS81-EME1 promote sister chromatid separation by processing late replication intermediates at common fragile sites during mitosis. *Nat. Cell Biol.* *15*, 1008–1015.

Nakahara, T., Takeuchi, M., Kinoyama, I., Minematsu, T., Shirasuna, K., Matsuhisa, A., Kita, A., Tominaga, F., Yamanaka, K., Kudoh, M., et al. (2007). YM155, a Novel Small-Molecule Survivin Suppressant, Induces Regression of Established Human Hormone-Refractory Prostate Tumor Xenografts. *Cancer Res.* *67*, 8014–8021.

Nakahara, T., Kita, A., Yamanaka, K., Mori, M., Amino, N., Takeuchi, M., Tominaga, F., Kinoyama, I., Matsuhisa, A., Kudoh, M., et al. (2011). Broad spectrum and potent antitumor activities of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in a wide variety of human cancer cell lines and xenograft models. *Cancer Sci.* *102*, 614–621.

Nakamura, N., Yamauchi, T., Hiramoto, M., Yuri, M., Naito, M., Takeuchi, M., Yamanaka, K., Kita, A., Nakahara, T., Kinoyama, I., et al. (2012). ILF3/NF110 is a target of YM155, a suppressant of survivin. *Mol. Cell. Proteomics MCP.*

Necochea-Campion, R. de, Chen, C.-S., Mirshahidi, S., Howard, F.D., and Wall, N.R. (2013). Clinico-pathologic relevance of Survivin splice variant expression in cancer. *Cancer Lett.* *339*, 167–174.

Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.-P., Tong, F., et al. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* *10*, 515–527.

Nicholson, A.G., Detterbeck, F.C., Marino, M., Kim, J., Stratton, K., Giroux, D., Asamura, H., Crowley, J., Falkson, C., Filosso, P.L., et al. (2014). The IASLC/ITMIG Thymic Epithelial Tumors Staging Project: Proposals for the T component for the Forthcoming (8th) Edition of the TNM Classification of Malignant Tumors. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* *9*, S73–S80.

Niedzialkowska, E., Wang, F., Porebski, P.J., Minor, W., Higgins, J.M.G., and Stukenberg, P.T. (2012). Molecular basis for phosphospecific recognition of histone H3 tails by Survivin paralogues at inner centromeres. *Mol. Biol. Cell* *23*, 1457–1466.

Nimonkar, A.V., Ozsoy, A.Z., Genschel, J., Modrich, P., and Kowalczykowski, S.C. (2008). Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 16906–16911.

Noton, E.A., Colnaghi, R., Tate, S., Starck, C., Carvalho, A., Ko Ferrigno, P., and Wheatley, S.P. (2006). Molecular analysis of survivin isoforms: evidence that alternatively spliced variants do

not play a role in mitosis. *J. Biol. Chem.* *281*, 1286–1295.

Nwabo Kamdje, A.H., Seke Etet, P.F., Vecchio, L., Muller, J.M., Krampera, M., and Lukong, K.E. (2014). Signaling pathways in breast cancer: Therapeutic targeting of the microenvironment. *Cell. Signal.* *26*, 2843–2856.

O'Connor, D.S., Grossman, D., Plescia, J., Li, F., Zhang, H., Villa, A., Tognin, S., Marchisio, P.C., and Altieri, D.C. (2000). Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 13103–13107.

Pal-Bhadra, M., Ramaiah, M.J., Reddy, T.L., Krishnan, A., Pushpavalli, S.N.C.V.L., Babu, K.S., Tiwari, A.K., Rao, J.M., Yadav, J.S., and Bhadra, U. (2012). Plant HDAC inhibitor chrysin arrest cell growth and induce p21WAF1 by altering chromatin of STAT response element in A375 cells. *BMC Cancer* *12*, 180.

Panier, S., and Boulton, S.J. (2014). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 7–18.

Papanikolaou, V., Iliopoulos, D., Dimou, I., Dubos, S., Kappas, C., Kitsiou-Tzeli, S., and Tsezou, A. (2011). Survivin regulation by HER2 through NF- $\kappa$ B and c-myc in irradiated breast cancer cells. *J. Cell. Mol. Med.* *15*, 1542–1550.

Pavlidou, A., Dalamaga, M., Kroupis, C., Konstantoudakis, G., Belimezi, M., Athanasas, G., and Dimas, K. (2011). Survivin isoforms and clinicopathological characteristics in colorectal adenocarcinomas using real-time qPCR. *World J. Gastroenterol.* *WJG* *17*, 1614–1621.

Pavlyukov, M.S., Antipova, N.V., Balashova, M.V., Vinogradova, T.V., Kopantzev, E.P., and Shakhparonov, M.I. (2011). Survivin monomer plays an essential role in apoptosis regulation. *J. Biol. Chem.* *286*, 23296–23307.

Pennati, M., Folini, M., and Zaffaroni, N. (2007). Targeting survivin in cancer therapy: fulfilled promises and open questions. *Carcinogenesis* *28*, 1133–1139.

Pennati, M., Sbarra, S., De Cesare, M., Lopergolo, A., Locatelli, S.L., Campi, E., Daidone, M.G., Carlo-Stella, C., Gianni, A.M., and Zaffaroni, N. (2014). YM155 sensitizes triple-negative breast cancer to membrane-bound TRAIL through p38 MAPK- and CHOP-mediated DR5 upregulation. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer.*

Pepe, A., and West, S.C. (2014). MUS81-EME2 promotes replication fork restart. *Cell Rep.* *7*, 1048–1055.

Pierce, A.J., Johnson, R.D., Thompson, L.H., and Jasin, M. (1999). XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes Dev.* *13*, 2633–2638.

Plo, I., Laulier, C., Gauthier, L., Lebrun, F., Calvo, F., and Lopez, B.S. (2008). AKT1 inhibits homologous recombination by inducing cytoplasmic retention of BRCA1 and RAD51. *Cancer Res.* *68*, 9404–9412.

Prat, A., Adamo, B., Cheang, M.C.U., Anders, C.K., Carey, L.A., and Perou, C.M. (2013). Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *The Oncologist* *18*, 123–133.

Promkan, M., Liu, G., Patmasiriwat, P., and Chakrabarty, S. (2009). BRCA1 modulates malignant cell behavior, the expression of survivin and chemosensitivity in human breast cancer cells. *Int. J. Cancer* *125*, 2820–2828.

Promkan, M., Liu, G., Patmasiriwat, P., and Chakrabarty, S. (2011). BRCA1 suppresses the expression of survivin and promotes sensitivity to paclitaxel through the calcium sensing receptor (CaSR) in human breast cancer cells. *Cell Calcium* *49*, 79–88.

Rass, E., Grabarz, A., Bertrand, P., and Lopez, B.-S. (2012). Réparation des cassures double-brin de l'ADN, un mécanisme peut en cacher un autre : la ligature d'extrémités non homologues alternative. *Cancer/Radiothérapie* *16*, 1–10.

- Rauch, A., Hennig, D., Schäfer, C., Wirth, M., Marx, C., Heinzl, T., Schneider, G., and Krämer, O.H. (2014). Survivin and YM155: How faithful is the liaison? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1845, 202–220.
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., and Bonner, W. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 162–169.
- Reichert, S., Rödel, C., Mirsch, J., Harter, P.N., Tomicic, M.T., Mittelbronn, M., Kaina, B., and Rödel, F. (2011). Survivin inhibition and DNA double-strand break repair: A molecular mechanism to overcome radioresistance in glioblastoma. *Radiother. Oncol.* 101, 51–58.
- Rigo, F., Hua, Y., Chun, S.J., Prakash, T.P., Krainer, A.R., and Bennett, C.F. (2012). Synthetic oligonucleotides recruit ILF2/3 to RNA transcripts to modulate splicing. *Nat. Chem. Biol.* 8, 555–561.
- Riolo, M.T., Cooper, Z.A., Holloway, M.P., Cheng, Y., Bianchi, C., Yakirevich, E., Ma, L., Chin, Y.E., and Altura, R.A. (2012). Histone deacetylase 6 (HDAC6) deacetylates survivin for its nuclear export in breast cancer. *J. Biol. Chem.* 287, 10885–10893.
- Romagnoli, M., Séveno, C., Bataille, R., and Barillé-Nion, S. (2008). Survivine en cancérologie: Aspects moléculaires et applications thérapeutiques. *Médecine/sciences* 24, 821–827.
- Rosa, J., Canovas, P., Islam, A., Altieri, D.C., and Doxsey, S.J. (2006). Survivin modulates microtubule dynamics and nucleation throughout the cell cycle. *Mol. Biol. Cell* 17, 1483–1493.
- Ruchaud, S., Carmena, M., and Earnshaw, W.C. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 798–812.
- Ryan, B.M., O'Donovan, N., and Duffy, M.J. (2009a). Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat. Rev.* 35, 553–562.
- Ryan, B.M., O'Donovan, N., and Duffy, M.J. (2009b). Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat. Rev.* 35, 553–562.
- Sah, N.K., Khan, Z., Khan, G.J., and Bisen, P.S. (2006). Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Lett.* 244, 164–171.
- Sarbajna, S., Davies, D., and West, S.C. (2014). Roles of SLX1-SLX4, MUS81-EME1, and GEN1 in avoiding genome instability and mitotic catastrophe. *Genes Dev.* 28, 1124–1136.
- Satoh, T., Okamoto, I., Miyazaki, M., Morinaga, R., Tsuya, A., Hasegawa, Y., Terashima, M., Ueda, S., Fukuoka, M., Ariyoshi, Y., et al. (2009). Phase I study of YM155, a novel survivin suppressant, in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 3872–3880.
- Schlacher, K., Christ, N., Siaud, N., Egashira, A., Wu, H., and Jasin, M. (2011). Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell* 145, 529–542.
- Schlacher, K., Wu, H., and Jasin, M. (2012). A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell* 22, 106–116.
- Schneider, G., and Krämer, O.H. (2011). NF $\kappa$ B/p53 crosstalk—a promising new therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta* 1815, 90–103.
- Schneider, G., Henrich, A., Greiner, G., Wolf, V., Lovas, A., Wiczorek, M., Wagner, T., Reichardt, S., Werder, A. von, Schmid, R.M., et al. (2010). Cross talk between stimulated NF-[kappa]B and the tumor suppressor p53. *Oncogene* 29, 2795–2806.
- Sedelnikova, O.A., Rogakou, E.P., Panyutin, I.G., and Bonner, W.M. (2002). Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat. Res.* 158, 486–492.
- Sengupta, S., and Harris, C.C. (2005). p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and

recombination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 44–55.

Séveno, C., Loussouarn, D., Bréchet, S., Campone, M., Juin, P., and Barillé-Nion, S. (2012).  $\gamma$ -Secretase inhibition promotes cell death, Noxa upregulation, and sensitization to BH3 mimetic ABT-737 in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 14, R96.

Shah, R., Rosso, K., and Nathanson, S.D. (2014). Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World J. Clin. Oncol.* 5, 283–298.

Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer* 3, 155–168.

Smallwood, A., Estève, P.-O., Pradhan, S., and Carey, M. (2007). Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes Dev.* 21, 1169–1178.

Smith, J., Mun Tho, L., Xu, N., and A. Gillespie, D. (2010). Chapter 3 - The ATM–Chk2 and ATR–Chk1 Pathways in DNA Damage Signaling and Cancer. In *Advances in Cancer Research*, George F. Vande Woude and George Klein, ed. (Academic Press), pp. 73–112.

Song, Z., Yao, X., and Wu, M. (2003). Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 23130–23140.

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.

Stephens, P.J., McBride, D.J., Lin, M.-L., Varela, I., Pleasance, E.D., Simpson, J.T., Stebbings, L.A., Leroy, C., Edkins, S., Mudie, L.J., et al. (2009). Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature* 462, 1005–1010.

Sui, X., Chen, R., Wang, Z., Huang, Z., Kong, N., Zhang, M., Han, W., Lou, F., Yang, J., Zhang, Q., et al. (2013). Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis.* 4, e838.

Sulli, G., Di Micco, R., and di Fagagna, F. d'Adda (2012). Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 12, 709–720.

Sung, P., Krejci, L., Komen, S.V., and Sehorn, M.G. (2003). Rad51 Recombinase and Recombination Mediators. *J. Biol. Chem.* 278, 42729–42732.

Suzuki, A., Hayashida, M., Ito, T., Kawano, H., Nakano, T., Miura, M., Akahane, K., and Shiraki, K. (2000). Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16(INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation. *Oncogene* 19, 3225–3234.

Talbot, D.C., Ranson, M., Davies, J., Lahn, M., Callies, S., André, V., Kadam, S., Burgess, M., Slapak, C., Olsen, A.L., et al. (2010). Tumor survivin is downregulated by the antisense oligonucleotide LY2181308: a proof-of-concept, first-in-human dose study. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 6150–6158.

Tang, H., Shao, H., Yu, C., and Hou, J. (2011). Mcl-1 downregulation by YM155 contributes to its synergistic anti-tumor activities with ABT-263. *Biochem. Pharmacol.* 82, 1066–1072.

Tang, L., Ling, X., Liu, W., Das, G.M., and Li, F. Transcriptional inhibition of p21WAF1/CIP1 gene (CDKN1) expression by survivin is at least partially p53-dependent: Evidence for survivin acting as a transcription factor or co-factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

Tao, Y.-F., Lu, J., Du, X.-J., Sun, L.-C., Zhao, X., Peng, L., Cao, L., Xiao, P.-F., Pang, L., and Wu, D. (2012). Survivin selective inhibitor YM155 induce apoptosis in SK-NEP-1 Wilms tumor cells. *BMC Cancer* 12, 619.

Terada, Y. (2001). Role of chromosomal passenger complex in chromosome segregation and cytokinesis. *Cell Struct. Funct.* 26, 653–657.

- Thomas, S., and Kaplan, K.B. (2007). A Bir1p Sli15p kinetochore passenger complex regulates septin organization during anaphase. *Mol. Biol. Cell* 18, 3820–3834.
- Thomas, J., Liu, T., Cotter, M.A., Florell, S.R., Robinette, K., Hanks, A.N., and Grossman, D. (2007). Melanocyte expression of survivin promotes development and metastasis of UV-induced melanoma in HGF-transgenic mice. *Cancer Res.* 67, 5172–5178.
- Tolcher, A.W., Mita, A., Lewis, L.D., Garrett, C.R., Till, E., Daud, A.I., Patnaik, A., Papadopoulos, K., Takimoto, C., Bartels, P., et al. (2008). Phase I and pharmacokinetic study of YM155, a small-molecule inhibitor of survivin. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 5198–5203.
- Trabulo, S., Cardoso, A.M., Santos-Ferreira, T., Cardoso, A.L., Simões, S., and Pedroso de Lima, M.C. (2011). Survivin silencing as a promising strategy to enhance the sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic agents. *Mol. Pharm.* 8, 1120–1131.
- Tracey, L., Pérez-Rosado, A., Artiga, M.J., Camacho, F.I., Rodríguez, A., Martínez, N., Ruiz-Ballesteros, E., Mollejo, M., Martínez, B., Cuadros, M., et al. (2005). Expression of the NF-kappaB targets BCL2 and BIRC5/Survivin characterizes small B-cell and aggressive B-cell lymphomas, respectively. *J. Pathol.* 206, 123–134.
- Trocoli, A., and Djavaheri-Mergny, M. (2011). The complex interplay between autophagy and NF- $\kappa$ B signaling pathways in cancer cells. *Am. J. Cancer Res.* 1, 629.
- Uren, A.G., Wong, L., Pakusch, M., Fowler, K.J., Burrows, F.J., Vaux, D.L., and Choo, K.H. (2000). Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr. Biol. CB* 10, 1319–1328.
- Valdiglesias, V., Giunta, S., Fenech, M., Neri, M., and Bonassi, S. (2013).  $\gamma$ H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutat. Res.* 753, 24–40.
- Végran, F., Boidot, R., Oudin, C., Defrain, C., Rebucci, M., and Lizard-Nacol, S. (2007). Association of p53 gene alterations with the expression of antiapoptotic survivin splice variants in breast cancer. *Oncogene* 26, 290–297.
- Végran, F., Boidot, R., Bonnetain, F., Cadouot, M., Chevrier, S., and Lizard-Nacol, S. (2011). Apoptosis gene signature of Survivin and its splice variant expression in breast carcinoma. *Endocr. Relat. Cancer* 18, 783–792.
- Velculescu, V.E., Madden, S.L., Zhang, L., Lash, A.E., Yu, J., Rago, C., Lal, A., Wang, C.J., Beaudry, G.A., Ciriello, K.M., et al. (1999). Analysis of human transcriptomes. *Nat. Genet.* 23, 387–388.
- Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Loo, G.V., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W., and Vandenaebale, P. (1998). Inhibition of Caspases Increases the Sensitivity of L929 Cells to Necrosis Mediated by Tumor Necrosis Factor. *J. Exp. Med.* 187, 1477–1485.
- Verdecia, M.A., Huang, H., Dutil, E., Kaiser, D.A., Hunter, T., and Noel, J.P. (2000). Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat. Struct. Biol.* 7, 602–608.
- Vogel, C., Hager, C., and Bastians, H. (2007). Mechanisms of mitotic cell death induced by chemotherapy-mediated G2 checkpoint abrogation. *Cancer Res.* 67, 339–345.
- Vong, Q.P., Cao, K., Li, H.Y., Iglesias, P.A., and Zheng, Y. (2005). Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin. *Science* 310, 1499–1504.
- Wall, N., Asumen, M.G., Ifeicho, T.V., Pfandl, C., and Cockerham, L. (2010). Dynamic changes to survivin subcellular localization are initiated by DNA damage. *OncoTargets Ther.* 129.
- Walsh, T., and King, M.-C. (2007). Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer Cell* 11, 103–105.

- Wang, H., Holloway, M.P., Ma, L., Cooper, Z.A., Riolo, M., Samkari, A., Elenitoba-Johnson, K.S.J., Chin, Y.E., and Altura, R.A. (2010). Acetylation directs survivin nuclear localization to repress STAT3 oncogenic activity. *J. Biol. Chem.* 285, 36129–36137.
- Wang, Q., Chen, Z., Diao, X., and Huang, S. (2011). Induction of autophagy-dependent apoptosis by the survivin suppressant YM155 in prostate cancer cells. *Cancer Lett.* 302, 29–36.
- Wang, Q., Wang, Y., Wang, X., Mo, X., Gu, J., Lu, Z., Pan, Z., and Zhu, Y. (2013). Survivin up-regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP) through attenuating the suppression of p53 on NF- $\kappa$ B expression in MCF-7/5-FU cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 2036–2044.
- Wang, R.-H., Zheng, Y., Kim, H.-S., Xu, X., Cao, L., Lahusen, T., Lee, M.-H., Xiao, C., Vassilopoulos, A., Chen, W., et al. (2008). Interplay among BRCA1, SIRT1, and Survivin during BRCA1-Associated Tumorigenesis. *Mol. Cell* 32, 11–20.
- Wang, Y.-F., Zhang, W., He, K.-F., Liu, B., Zhang, L., Zhang, W.-F., Kulkarni, A.B., Zhao, Y.-F., and Sun, Z.-J. (2014). Induction of autophagy-dependent cell death by the survivin suppressant YM155 in salivary adenoid cystic carcinoma. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 19, 748–758.
- Wang, Z., Fukuda, S., and Pelus, L.M. (2004). Survivin regulates the p53 tumor suppressor gene family. *Oncogene* 23, 8146–8153.
- Weng, Y., Fei, B., Chi, A.L., and Cai, M. (2013). Inhibition of gastric cancer cell growth in vivo by overexpression of adeno-associated virus-mediated survivin mutant C84A. *Oncol. Res.* 20, 411–417.
- Wheatley, S.P., Barrett, R.M., Andrews, P.D., Medema, R.H., Morley, S.J., Swedlow, J.R., and Lens, S.M.A. (2007). Phosphorylation by aurora-B negatively regulates survivin function during mitosis. *Cell Cycle Georget. Tex* 6, 1220–1230.
- Whitfield, J.F. (2009). Calcium, calcium-sensing receptor and colon cancer. *Cancer Lett.* 275, 9–16.
- Wiechno, P., Somer, B.G., Mellado, B., Chłosta, P.L., Cervera Grau, J.M., Castellano, D., Reuter, C., Stöckle, M., Kamradt, J., Pikiel, J., et al. (2014). A randomised phase 2 study combining LY2181308 sodium (survivin antisense oligonucleotide) with first-line docetaxel/prednisone in patients with castration-resistant prostate cancer. *Eur. Urol.* 65, 516–520.
- Wilhelm, T., Magdalou, I., Barascu, A., Técher, H., Debatisse, M., and Lopez, B.S. (2014). Spontaneous slow replication fork progression elicits mitosis alterations in homologous recombination-deficient mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 763–768.
- Williams, G.J., Lees-Miller, S.P., and Tainer, J.A. (2010). Mre11–Rad50–Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks. *DNA Repair* 9, 1299–1306.
- Winter, G.E., Radic, B., Mayor-Ruiz, C., Blomen, V.A., Trefzer, C., Kandasamy, R.K., Huber, K.V.M., Gridling, M., Chen, D., Klampfl, T., et al. (2014). The solute carrier SLC35F2 enables YM155-mediated DNA damage toxicity. *Nat. Chem. Biol.* 10, 768–773.
- Wu, Z.-H., and Miyamoto, S. (2008). Induction of a pro-apoptotic ATM-NF-kappaB pathway and its repression by ATR in response to replication stress. *EMBO J.* 27, 1963–1973.
- Wu, W.K.K., Coffelt, S.B., Cho, C.H., Wang, X.J., Lee, C.W., Chan, F.K.L., Yu, J., and Sung, J.J.Y. (2012). The autophagic paradox in cancer therapy. *Oncogene* 31, 939–953.
- Wyatt, H.D.M., Sarbajna, S., Matos, J., and West, S.C. (2013). Coordinated actions of SLX1-SLX4 and MUS81-EME1 for Holliday junction resolution in human cells. *Mol. Cell* 52, 234–247.
- Xia, F., and Altieri, D.C. (2006). Mitosis-independent survivin gene expression in vivo and regulation by p53. *Cancer Res.* 66, 3392–3395.

- Xiao, G. (2007). Autophagy and NF-kappaB: fight for fate. *Cytokine Growth Factor Rev.* *18*, 233–243.
- Xu, Y. (2003). Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death Differ.* *10*, 400–403.
- Xu, R., Zhang, P., Huang, J., Ge, S., Lu, J., and Qian, G. (2007). Sp1 and Sp3 regulate basal transcription of the survivin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *356*, 286–292.
- Yamamoto, H., Ngan, C.Y., and Monden, M. (2008). Cancer cells survive with survivin. *Cancer Sci.* *99*, 1709–1714.
- Yamanaka, K. (2011). YM155, a selective survivin suppressant, inhibits tumor spread and prolongs survival in a spontaneous metastatic model of human triple negative breast cancer. *Int. J. Oncol.*
- Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Manis, J.P., et al. (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* *449*, 478–482.
- Yecies, D., Carlson, N.E., Deng, J., and Letai, A. (2010). Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. *Blood* *115*, 3304–3313.
- Yie, S.-M., Luo, B., Ye, N.-Y., Xie, K., and Ye, S.-R. (2006). Detection of Survivin-expressing circulating cancer cells in the peripheral blood of breast cancer patients by a RT-PCR ELISA. *Clin. Exp. Metastasis* *23*, 279–289.
- Zgheib, O., Huyen, Y., DiTullio Jr, R.A., Snyder, A., Venere, M., Stavridi, E.S., and Halazonetis, T.D. (2005). ATM signaling and 53BP1. *Radiother. Oncol.* *76*, 119–122.
- Zhao, J., Tenev, T., Martins, L.M., Downward, J., and Lemoine, N.R. (2000). The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J. Cell Sci.* *113 Pt 23*, 4363–4371.
- Zheng, W.Y., Kang, Y.Y., Li, L.F., Xu, Y.X., and Ma, X.Y. (2011). Levels of effectiveness of gene therapies targeting survivin and its splice variants in human breast cancer cells. *Drug Discov. Ther.* *5*, 293–298.
- (1998). Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Publ. Online 02 Sept. 1998 Doi101038sjonc1202034 17*.
- (2000). Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16INK4a and Cdk2/Cyclin E complex activation. *Publ. Online 05 July 2000 Doi101038sjonc1203665 19*.

# Thèse de Doctorat

Éloïse VÉQUAUD

**Etude de la réponse des cellules cancéreuses mammaires au ciblage de la Survivine par ARN interférence et inhibition pharmacologique : mise en évidence d'une régulation de la recombinaison homologue par la Survivine**

**Study of mammary cancer cells response to silencing of Survivin by RNA interference or pharmacological targeting : highlighting of Homologous Recombination regulation by Survivin**

## Résumé

La Survivine joue un rôle sur la survie cellulaire et la régulation du cycle cellulaire. Sa fréquente surexpression dans les cancers est associée à un mauvais pronostic et à la résistance aux traitements génotoxiques, ce qui en fait une cible thérapeutique anticancéreuse intéressante. Nous avons étudié les conséquences fonctionnelles de la déplétion en Survivine par ARN interférence et par utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de son expression, le YM155. Nous avons mis en évidence, dans des lignées du cancer du sein déplétées en Survivine l'apparition de cassures double brin de l'ADN, ainsi qu'un défaut de division cellulaire et l'apparition de cellules polyploïdes. Nous avons également observé une altération fonctionnelle de la recombinaison homologue (RH). La déplétion en Survivine diminue en effet l'expression d'un panel de gènes impliqués dans la RH (e.g. BRCA1-2, RAD51) ainsi que l'expression protéique de RAD51 et MUS81. Fonctionnellement, cette déplétion sensibilise les cellules de cancer du sein à un inhibiteur de PARP-1. Nous avons constaté que le traitement par l'YM155 n'avait pas les mêmes effets cellulaires que la déplétion en Survivine, impliquant l'existence d'autres cibles biologiques. Néanmoins, nous avons observé une très bonne efficacité de cette molécule à induire la mort cellulaire, préférentiellement dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules non transformées. L'efficacité du YM155 est retrouvée sur des explants de tumeurs mammaires primaires cultivées ex vivo, confirmant son intérêt thérapeutique. De manière inattendue nous avons mis en évidence la contribution des voies de l'autophagie et de NF-κB à la mort déclenchée par le YM155.

## Mots clés :

Survivine, Cancer mammaire, Dommages à l'ADN, Recombinaison homologue, Cycle cellulaire, Mort cellulaire, YM155

## Abstract

Survivin has attracted considerable attention as a therapeutic target for anticancer strategies because of its dual role in regulating cell division and apoptosis. Survivin, overexpressed in many cancer, has been consistently identified carrying unfavorable implications for cancer prognosis and linked to aggressive tumor and to inhibition of cell death induced by DNA damaging agents. We thus analyzed functional consequences of Survivin depletion by RNA interference and by use of its expression pharmacological inhibitor, YM155. We first pointed out, in Survivin depleted mammary cancer cell lines, DNA damage occurring, cell division failure and polyploid cells accumulation. We also observed that Survivin depletion decreased the efficiency of DNA repair by Homologous Recombination (HR). We further evidenced that this depletion decreased the transcription of a set of genes involved in HR, (e.g. BRCA1-2, RAD51), in several breast cancer cell lines. Consistent with these results, we confirmed that the protein expression of RAD51 and MUS81 was greatly decreased upon Survivin depletion. Moreover, functionally this depletion sensitizes breast cancer cells to PARP-1 inhibitor. We noted that YM155 did not provide similar cellular effects compared to Survivin depletion, suggesting the existence of other targets. We indeed observed that YM155 induce a dramatic cell death, preferentially in breast cancer cells compared to untransformed cells. Induction of cell death by YM155 was also evidenced in ex vivo organotypic cultures of human primary breast tumors, attesting to its therapeutic interest. Finally, we found out autophagy and NF-κB pathways contribution to YM155 induced cell death.

## Key Words :

Survivin, Breast cancer, DNA damage, Homologous recombination, Cell cycle, Cell death, YM155