

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE

**INTÉRÊT DU CIBLAGE DE MEMBRES DE LA FAMILLE DES IAPs EN
CANCÉROLOGIE: IMPLICATIONS DE XIAP DANS LA SURVIE
CELLULAIRE ET DE LA SURVIVINE DANS LES DOMMAGES À L'ADN**

THÈSE DE DOCTORAT

École Doctorale BIOLOGIE-SANTÉ

Discipline : Aspects Moléculaire et Cellulaires de la Biologie

Spécialité : Oncologie

Présentée

et soutenue publiquement par

DESPLANQUES Grégoire

Le 26 Octobre 2009, devant le jury ci-dessous

Président M.R. BATAILLE Professeur, Université Nantes

Rapporteurs M. C. PRIGENT Directeur de Recherche, CNRS UMR6061, Rennes

M. F. ROSSELLI Directeur de Recherche, CNRS FRE 3909, Villejuif

Directrice de thèse Mme S. BARILLÉ-NION

Co-directeur de thèse M. N. GIULIANI

Sommaire

INTRODUCTION.....	7
LES CANCERS.....	7
I. GENERALITES ET ORIGINES	7
II. LES CELLULES CANCEREUSES	7
II.1. Les proto-oncogènes	8
II.2. Les gènes suppresseurs de tumeurs.....	10
II.3. Les gènes de réparation de l'ADN.....	12
III. DEUX MODELES D'ETUDES	13
III.1. Le Myélome Multiple.....	13
III.2. Le cancer du sein.....	20
LE CYCLE CELLULAIRE.....	29
I. INTRODUCTION.....	29
II. LES PHASES DU CYCLE.....	29
II.1. La phase G1.....	32
II.2. La transition G1/S.....	33
II.3. La phase S.....	36
II.4. La transition G2/M et la mitose	36
III. CYCLE CELLULAIRE ET SURVEILLANCE	37
III.1. Le point de contrôle du dommage à l'ADN.....	38
III.2. Le point de contrôle de la transition G1/S.....	50
III.3. Le point de contrôle de la transition G2/M	53
III.4. Le point de contrôle de la phase S.....	55
III.5. Le point de contrôle dépendant des Topoisomérases	57
III.6. Le point de contrôle du fuseau mitotique.....	59
IV. DEREGULATION DU CYCLE CELLULAIRE DANS LES CANCERS :	65
L'APOPTOSE	68
I. INTRODUCTION.....	68
II. LES CASPASES	71
III. LES VOIES D'APOPTOSE.....	74
III.1. La voie extrinsèque des récepteurs de mort.....	74
III.2. La mitochondrie : élément central de la voie intrinsèque.....	77
IV. MECANISMES DE REGULATION DE L'APOPTOSE	82
IV.1. La famille Bcl-2	82
IV.2. La famille des IAPs.....	89
V. DEREGULATION DE L'APOPTOSE DANS LES CANCERS	97
LA PROTÉINE XIAP.....	100
I. INTRODUCTION.....	100
II. STRUCTURE PROTEIQUE DE XIAP	101
III. REGULATION DE L'EXPRESSION.....	103
III.1. Régulation traductionnelle par séquence IRES	103
III.2. Régulations post-traductionnelles	104
IV. FONCTIONS CELLULAIRES	106
IV.1. Inhibition de l'apoptose et antagonistes	106
IV.2. Rôle de XIAP dans la prolifération cellulaire.....	109
V. LES INHIBITEURS ENDOGENES DE XIAP.....	111
V.1 L'inhibiteur Smac/DIABLO.....	112
V.2 L'inhibiteur HtrA2/Omi	112

V.3. L'inhibiteur XAF1	113
VI. LES INHIBITEURS SYNTHETIQUES DE XIAP	114
LA PROTEINE SURVIVINE	115
I. INTRODUCTION.....	115
II. LA STRUCTURE PROTEIQUE	116
III. REGULATION DE L'EXPRESSION.....	117
III.1. Regulation transcriptionnelle	117
III.2. Régulations post-traductionnelles	121
IV. FONCTIONS CELLULAIRES	122
IV.1. Cycle cellulaire	123
IV.2. Apoptose	125
V. IMPLICATIONS EN CANCEROLOGIE.....	129
V.1. Pronostic	130
V.2. Cible thérapeutique	130
RÉSULTATS	132
ARTICLE 1:	133
"IMPACT DE LA PROTEINE XIAP DANS LA SURVIE DES CELLULES DE MYELOME"	133
ARTICLE 2:	143
"LA DEPLETION EN SURVIVINE INDUIT DU DOMMAGE A L'ADN DANS LES CELLULES DE CANCER DU SEIN ET CONDUIT A UNE AUGMENTATION DE LA SENSIBILITE AUX AGENTS ENDOMMAGEANTS DE L'ADN"	143
DISCUSSION	169
ANNEXE.....	189
"L'INHIBITION DE LA VOIE CANONIQUE D'NFκB BLOQUE LA CROISSANCE DES CELLULES DE MYELOME ET INDUIT L'APOPTOSE EN FORTE SYNERGIE AVEC TRAIL"	190
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	203

Liste des abréviations :

A

AAD : « ATR activation domain »
ADN : « Acide désoxyribonucléique »
AIF : « Apoptosis inducing factor »
AIP : « Aryl hydrocarbon receptor interacting protein »
ANT : « Adenin nucleotide translocator »
Apaf-1 : « Apoptotic peptidase activating factor-1 »
APC/C : « Anaphase-promoting complex / cyclosome »
ARN : « Acide ribonucléique »
ATM : « Ataxia telangiectesia mutated »
ATPase : « Adénosine triphosphatase »
ATR : « ATM related »
ATRIP : « ATR interacting protein »

B

Bax : « Bcl-2 associated protein »
Bcl-2 : « B-cell lymphoma -2 »
BER : « Base-excision repair »
BH : « Bcl-2 homology domain »
BIR : « Baculovirus IAP Repeat »
BIRC5 : « Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat containing 5 »
BLM : « Bloom syndrome »
BRCA1 : « Breast Cancer 1 »
BRUCE : « BIR containing ubiquitin conjugating enzyme »
Bub1 : « Budding uninhibited by benzimidazole »

C

CARD : « Caspase recruitment domain »
CD : « Cluster of differentiation »
CDC25 : « Cell division cycle 25 »
CDE : « Cell cycle-dependant element »
CDKi : « CDK inhibitors »
CDKs : « Cyclin-dependent kinases »
ced-4 : « C. elegans death »
ChIP : « Chromatin immunoprecipitation »
CHK : « Checkpoint kinase »
CHR : « Cell cycle homology region »
c-IAP1 : « Cellular-IAP1 »
CIN : Instabilité chromosomique
CKBD : « CHK1-binding domain »
CPC : « Chromosomal passenger complex »
CPP : « Chromosomal passenger protein »
CSC : Cellules souches cancéreuse

D

DD : « Death domain »
DED : « Death effector domain »
DIABLO : « Direct IAP binding protein with low PI »
DISC : « Death inducing signaling complex »
DNA-PK : « DNA protein kinase »
DSB : « Double-strand break »

E

EGF : « Epithelial growth factor »
eIF : « Eukaryotik translation initiator factor »
EPR-1 : « Effector cell protease receptor-1 »
ERK : « Extracellular signal regulated kinase »

F

FADD : « Fas-associated protein with death domain »

G

GFP : « Green fluorescent protein »
GGR, « Global Genome Repair »
GSK-3 : « Glycogen synthase kinase -3 »
GSPT1 : « G1 to S phase transition 1 »

H

H2AX : « H2A histone family, member X »
HAT : Histone acétyltransférases
HDAC : « Histones deacetylases »
HEC1 : « Highly expressed in cancer – 1 »
HER2 /ERBB2 : « Human epidermal growth factor receptor 2 »
hnRNPA1 : « Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 »
HtrA2/Omi : « High-temperature requirement A2 »
HVEM : « Herpes virus entry mediatory »

I

IAPs : « Inhibitors of apoptosis proteins »
IBM : « IAP binding domain »
IGF1 : « Insulin like growth factor »
IGF1R : « IGF1 receptor »
IgG : Immunoglobuline G
IKK : « I κ B kinase »
IKK2 : « I κ B kinase kinase 2 »
IL-6 : Interleukine 6
INCENP : « Inner centromere protein »
INF β : Interféron β
ITAFs : « IRES *trans*-acting factor »
IRES : « Internal ribosome entry site »
IRIF : « Ionizing radiation-induced foci »

J

JNK : « Jun N-terminal kinase »

K

KNL-1 : « Kinetochore nuL – 1 »

M

MAD : « Mitotic arrest deficient »

MCAK : « Mitotic centromere-associated kinesin »

MCC : « Mitotic checkpoint complex »

Mcl-1 : « Myeloid cell leukemia-1 »

MCM : « Mini-chromosome maintenance »

MgcRacGAP : « Rac GTPase activating protein -1 »

MGUS : « Monoclonal gammopathy of unknown significance »

MKLP2 : « Mitotic kinesin-like protein-2 »

MLS : Séquence d'adressage mitochondriale

MM : Myélome Multiple

MMR : « Mismatch repair »

MPF : « Mitosis promoting factor »

N

NBD : « Nucleotide-binding domain »

NER : « Nucleotide-excision repair »

NES : « Nuclear export sequence »

NF- κ B : « Nuclear factor-kappaB »

NHEJ : Jonction d'extrémités non homologues

NIAP : « Neural IAP »

O

ORC : « Origin recognition complex »

OPG : « Osteoprotegerin »

P

PARP-1 : « Poly ADP-ribose polymérase-1 »

PKA : « Cyclic AMP-dependent protein kinase A »

PKB : « Protein kinase B »

PI3K : « Phosphoinositide-3 Kinase »

PIKK : « Phosphoinositide 3-kinase-like kinase »

Plk : « Polo like kinase »

PNK : « Polynucleotide kinase »

Pré-RC : Complexe pré-répliatif

PTPC : « Permeability transition pore complex »

R

Rb : « Retinoblastoma protein »

RE : Reticulum endoplasmique

RH : Recombinaison homologue
RING : « Really interesting new gene »
RIP1 : « Receptor interacting protein »
RNP : « RNA protein »
ROS : « Reactive oxygene species »
RPA : « Replicating protein A »
RTK : Récepteurs à activité tyrosine kinase

S

SAC : « Spindle-assembly checkpoint »
Smac : « Second mitochondrial activator of caspase »
SP1 : « Specificity protein-1 »
SSBR : « Single strand break repair »

T

TAB : « TAK1 binding »
TAK1 : « TGF β -activating kinase 1 »
TCR : « Transcription-Coupled Repair »
TGF : « Tumor growth factor »
TIM : « TRAF interacting motif »
TNFR : « Tumor necrosis factor receptor »
TRADD : « TNFRSF1A-associated via death domain »
TRAIL : « TNF-related-apoptosis-inducing-ligand »
TRAIL-R1 : « TRAIL-receptor 1 »
Ts-IAP : « Testis specific-IAP »

U

UBC : « Ubiquitin conjugating domain »
UBC E2 : « E2 Ubiquitin-conjugated enzyme »
UPR : « Unfold protein response »
UV : Ultraviolets

V

VDAC : « Voltage dependent anion channel »

X

XAF1 : « XIAP-associated factor 1 »
XIAP : « X-linked IAP »

INTRODUCTION

LES CANCERS

I. Généralités et origines

Bien que l'incidence des cancers augmente régulièrement au cours des années (Tratner 2003), il convient de rappeler que les cancers sont des maladies connues depuis l'Antiquité. De nos jours, le terme de cancer est attribué à un grand nombre de maladies différentes avec une étiologie et des manifestations très variées impliquant des soins et des traitements différents. L'évolution des techniques d'étude des cancers a permis d'établir que la transformation cancéreuse était caractérisée par un ensemble complexe de changements génétiques conduisant à la multiplication de cellules de l'organisme, qui perdent le contrôle de leur prolifération, deviennent immortelles, échappent aux mécanismes normaux de différenciation et se développent de manière anarchique dans l'organisme.

II. Les cellules cancéreuses

Malgré la grande diversité des cancers, les cellules cancéreuses partagent des caractéristiques qui permettent de les identifier. Ces caractéristiques sont :

- l'indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération,
- l'insensibilité aux signaux antiprolifératifs,
- l'échappement à la mort cellulaire programmée ou apoptose,
- une capacité proliférative illimitée,
- la capacité d'induire l'angiogénèse,
- l'acquisition d'un pouvoir invasif,
- un échappement à la surveillance immunitaire,
- ainsi qu'une résistance aux dommages à l'ADN (« Acide désoxyribonucléique »), au stress oxydatif, mitotique, ou encore métabolique (Kroemer & Pouyssegur 2008) (Luo et al. 2009).

Ces particularités, propres aux cellules cancéreuses, sont la conséquence de l'altération du matériel génétique. Bien que toutes ces altérations (mutations, translocations, amplifications, délétions, ...) ne soient toutefois pas susceptibles d'entraîner la formation d'un cancer, les gènes considérés comme ayant une implication significative dans la mise en place du processus tumoral sont les proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes de réparation de l'ADN (Weinberg 1994) (Hanahan & Weinberg 2000) (Vogelstein & Kinzler 2004).

Les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur coordonnent l'ensemble des réactions biochimiques du cycle cellulaire, du développement, de la prolifération et de la division des cellules; les proto-oncogènes stimulent la croissance, tandis que les gènes suppresseurs inhibent ce processus (Weinberg 1994). La combinaison de l'activation d'oncogènes, l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur ainsi que la dérégulation des gènes de réparation de l'ADN est responsable, entre autre, de la prolifération cellulaire incontrôlée ainsi que d'un échappement à l'apoptose qui sont à l'origine des cancers.

II.1. Les proto-oncogènes

Les oncogènes sont des gènes susceptibles de conférer le phénotype tumoral à une cellule eucaryote normale. Ils sont dérivés de gènes cellulaires appelés proto-oncogènes ayant subi une ou plusieurs altérations.

Les proto-oncogènes possèdent généralement des fonctions dans le contrôle de la prolifération cellulaire, de la différenciation et/ou de la survie cellulaire (Weinberg 1994). La transformation des proto-oncogènes en oncogènes se fait par des événements génétiques tels que des mutations, des translocations chromosomiques ou des amplifications géniques qui induisent des gains de fonction du gène par rapport à sa forme inactive dans les cellules normales. Le gain de fonction résulte, en général, soit d'une production d'une forme hyperactive de la protéine oncogénique (par une modification du site catalytique ou encore par un blocage de l'inhibition) soit d'une quantité excessive de forme normale de la protéine.

La dénomination de proto-oncogènes regroupe des gènes qui codent pour des facteurs de croissance, des récepteurs aux facteurs de croissance, des molécules intervenant dans la transduction des signaux mitotiques, des protéines kinases, des phosphatases, des molécules anti-apoptotiques ou des facteurs de transcription.

L'activation de ces oncogènes est un mécanisme dominant qui conduit à favoriser un état permissif pour la prolifération, à permettre la production par la cellule cancéreuse des facteurs de croissance dont elle a besoin ou à modifier un récepteur de telle sorte qu'il se comporte comme s'il était stimulé en permanence, entre autres. Dans tous les cas, la cellule devient indépendante de son environnement.

Les deux proto-oncogènes les plus décrits dans la littérature sont c-myc, notamment dans le lymphome de Burkitt où il y a une translocation t(8,14), et Bcl-2, surexprimé quant à lui dans le lymphome folliculaire où il y a la présence d'une translocation t(14,18). La surexpression de c-myc stimule la prolifération des cellules mais augmente également la mort cellulaire en diminuant les voies de survie. La surexpression de Bcl-2, quant à elle, induit un échappement à l'apoptose et donc favorise la survie. Leur association, que ce soit

au niveau d'un modèle animal ou dans un lymphome à double translocation (Beverly & Varmus 2009), entraîne donc une synergie oncogénique conduisant à une augmentation de la prolifération et une diminution de l'apoptose qui sont nécessaires à la formation de cancer. Ces cancers ainsi formés, notamment le lymphome à double translocation, sont des cancers très agressifs.

II.2. Les gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeurs codent pour des protéines inhibitrices de la division cellulaire, ou régulant la différenciation et l'orientation irréversible vers la voie de mort cellulaire. La mutation et/ou délétion de ces gènes, liée cette fois à une perte de fonction, entraîne l'arrêt du contrôle du cycle cellulaire.

Les anti-oncogènes p53 et pRb (« Retinoblastoma protein ») sont des gènes très fréquemment altérés dans de nombreux cas de cancers. Le gène *p53* code pour une phosphoprotéine, p53, qui s'accumule dans le noyau en réponse à différents stress en particulier les dommages à l'ADN. La protéine p53 agit comme un régulateur de la transcription, augmentant ou diminuant l'expression de nombreux gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, dans l'induction de l'apoptose, dans la réparation de l'ADN et dans le contrôle de la différenciation cellulaire. Les mutations somatiques de p53 représentent l'altération moléculaire la plus fréquemment observée dans les tumeurs solides et les mutations constitutionnelles de ce gène représentent la base moléculaire du syndrome de Li-Fraumeni, syndrome prédisposant à un très large spectre de tumeurs incluant en particulier des sarcomes des tissus mous, des ostéosarcomes, des tumeurs du système nerveux central, des cancers du sein et des corticosurrénales (Khayat & Johnston 2004) (Lang et al. 2004). Le gène *Rb* code pour une protéine qui se lie à des facteurs de transcription essentiels à la progression du cycle cellulaire et les inactive. L'inactivation constitutionnelle de l'anti-oncogène pRb est à l'origine des formes héréditaires de rétinoblastomes et représente également un risque génétique pour le développement d'ostéosarcomes (Issing et al. 1993) (Iida et al. 2003).

Le gène codant pour Bim a été décrit comme étant un gène pro-apoptotique. En effet, il appartient à la famille des gènes *Bcl-2*, qui comporte aussi bien des membres aux propriétés anti-apoptotiques (donc des oncogènes) que des membres aux propriétés pro-apoptotiques (donc des suppresseurs de tumeur) et dont les protéines pour lesquelles ils encodent interagissent entre elles. *Bim* est muté dans de nombreux cancers ce qui confère aux cellules une résistance à l'apoptose, et les cellules qui ne sont plus éliminées, prolifèrent. Leur fournir la version non mutée de *Bim*, sous forme du génique ou protéique, pourrait permettre de lutter contre la perte de contrôle de leur activité mitotique. L'équipe d'Hawkins a utilisé le virus du SIDA comme agent de transfection pour un peptide chimère : TAT-Bim portant le domaine BH3 de la protéine Bim non mutée (Kashiwagi et al. 2007). Le travail a été mené *in vitro* sur des lignées de cellules tumorales dérivées de lymphome, de mélanome et de cancer pancréatique; et *in vivo* sur des souris rendues cancéreuses par implantation sous cutanée de deux de ces lignées, issues de cancer pancréatique ou de mélanome. *In vitro*, la transfection du plasmide TAT-Bim permet de relancer l'apoptose notamment en déclenchant l'activation de la caspase 3 en synergie avec les radiothérapies. *In vivo*, 80% des souris infectées avec le plasmide TAT-Bim survivent contre 20% seulement pour les souris infectées avec le plasmide contrôle. De plus, pour les souris ayant reçues le plasmide TAT-Bim, les tumeurs sont plus sensibles aux radiothérapies.

XAF1 (« XIAP associated factor 1 ») a également été décrit comme un gène suppresseur de tumeur. C'est un inhibiteur de XIAP (« X-linked-inhibitor of apoptosis protein » ; un inhibiteur de l'apoptose), c'est pourquoi, la diminution voire la perte de son expression permet un échappement de la cellule à l'apoptose. Une étude a mis en évidence, dans un panel de lignée, une perte de l'hétérozygotie pour XAF1 et a démontré que la perte de l'expression de XAF1 qui en résulte était importante dans le développement des tumeurs (Fong et al. 2000) (Liston et al. 2001). De plus, l'expression de ce gène suppresseur de tumeur est réprimée dans les cellules tumorales du fait d'une régulation épigénétique du gène par hyperméthylation.

II.3. Les gènes de réparation de l'ADN

Les gènes de réparation de l'ADN, lorsqu'ils sont mutés, participent à la tumorigénèse d'une façon complètement différente des oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeur. En effet, cette troisième classe de gène comprend les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, lors de la réplication normale de l'ADN ou suite à une exposition à un agent mutagène, tels que les gènes impliqués dans la réparation des mésappariements de l'ADN (MMR, « Mismatch repair »), des excisions de nucléotides (NER, « Nucleotide-excision repair ») ou encore des excisions de base (BER, « Base-excision repair »). La mutation de ces gènes est responsable d'une forte augmentation de la probabilité de recombinaison durant la mitose et d'une mauvaise ségrégation des chromosomes, c'est notamment le cas lors de mutations de gènes tels que *BRCA1* (« breast cancer 1 »), *BLM* (« Bloom syndrome ») et *ATM* (« Ataxia telangiectasia mutated ») (Vogelstein & Kinzler 2004).

Tous les gènes peuvent potentiellement être affectés par une augmentation du taux de mutation mais seules les mutations ayant lieu au niveau de proto-oncogènes (mutations activatrices) ou de gènes suppresseur de tumeurs (mutations inactivatrices) affecteront la croissance cellulaire globale et, de ce fait, peuvent prodiguer un avantage sélectif au niveau de la croissance de la cellule mutée. Ainsi, les cellules ayant un matériel génétique modifié auront la capacité d'échapper à la mort cellulaire programmée et se diviseront de façon anarchique et indépendante de l'organisme. De plus, les cellules possédant un défaut dans les voies de réparation acquièrent une certaine instabilité génétique pouvant conduire également à une sélection des cellules mutées.

L'instabilité chromosomique des cellules cancéreuses à l'origine de leur malignité peut se retourner contre elles. En effet, la survenue de tumeur nécessite à la fois un défaut d'apoptose et une augmentation de la prolifération résultant tous deux d'une instabilité génétique. De ce fait, la cellule tumorale maintient une certaine instabilité génétique afin de s'adapter à son environnement et ainsi résister à la pression de sélection, on parle alors d'addiction oncogénique ou de dépendance à une voie oncogénique. Cependant une trop forte instabilité génétique ne sera plus supportée par la cellule tumorale et induira par

conséquent son élimination par le processus apoptotique. C'est pourquoi, certaines thérapies actuelles visent à augmenter cette instabilité (Luo et al. 2009) (Weinstein & Joe 2008). Cependant, un changement de voie oncogénique peut subvenir lorsque la voie dont dépend la lignée est bloquée de façon définitive. Un exemple de ce « switch oncogénique » est retrouvé au niveau de la lignée BT474 où la Survivine est sous la dépendance de la voie Her2 mais passe sous celle de la voie hormono-dépendante (ER/PR) lors du blocage de la première voie.

Il est à noter que selon le type de cancer, le nombre de mutations nécessaires pour développer une tumeur maligne est différent. Effectivement, trois mutations semblent nécessaires pour une tumeur solide alors qu'une ou deux mutations suffiraient pour une tumeur dite liquide (Nowell 2002) (Komarova et al. 2003). La caractéristique clé des hémopathies malignes est leur fort pouvoir invasif lié à la mobilité intrinsèque des cellules. *A contrario*, les tumeurs solides doivent développer ce pouvoir invasif. Il est donc possible que ce soit cette caractéristique qui soit à l'origine de cette différence dans le nombre de mutations nécessaires à la malignité de la cellule.

III. Deux modèles d'études

III.1. Le Myélome Multiple

Le Myélome Multiple (MM), ou maladie de Kahler, est une hémopathie maligne des lymphocytes B. Elle est caractérisée par : (i) l'accumulation de plasmocytes tumoraux dans la moelle osseuse, (ii) l'hypersécrétion d'immunoglobuline monoclonale (généralement Immunoglobuline G (IgG), IgA ou uniquement les chaînes légères kappa ou lambda), (iii) des lésions ostéolytiques et (iv) une immunodéficience (Kyle & Rajkumar 2004).

Le MM représente approximativement 10% des cancers hématologiques et 1% de l'ensemble des cancers. L'incidence de cette affection, en France, est de 4000 cas/an et l'âge moyen des patients au diagnostic est de 65 à 70 ans. Le pronostic pour les patients atteint

d'un MM est toujours pauvre, car l'issue est irrémédiablement fatale avec une survie moyenne d'environ 5 ans après une chimiothérapie conventionnelle. Néanmoins, l'intensification de la chimiothérapie associée à une autogreffe a permis d'améliorer significativement le taux de rémission complète (25%) et la médiane de survie avec de nouveaux traitements.

La physiopathologie du MM

À la base des données géniques et cliniques, il a été montré que la plupart des cas de MM émergent d'un stade pré-malin asymptomatique caractérisé par la prolifération dans la moelle osseuse de cellules plasmocytaires monoclonales dérivées des cellules B des centres post-germinatifs. Dans ce cas, on parle de MGUS (« Monoclonal gammopathy of unknown significance »), le taux de conversion de MGUS en MM est de 1% par an. Pour donner un modèle général d'évolution du MM, le stade MGUS progresse en un MM asymptomatique, puis en MM intra-médullaire symptomatique pour aboutir à un MM extra-médullaire symptomatique et en leucémie à cellules plasmocytaires (Rajkumar 2005). Les stades précoces de la maladie sont très difficiles à mettre en évidence de par leur nature asymptomatique. Il est à noter que les MM issus d'un MGUS ont une évolution généralement plus lente et sont de meilleur pronostic que les MM *de novo*.

- Le rôle de l'environnement médullaire

Dans la moelle osseuse, les cellules communiquent entre-elles *via* des interactions cellulaires et également par la libération de cytokines et facteurs de croissance. Les plasmocytes malins vont tirer avantage du microenvironnement mais vont également l'influencer dans l'objectif d'améliorer leur survie et prolifération (Uchiyama et al. 1993).

Les interactions avec le microenvironnement de la moelle osseuse vont avoir pour effet l'activation de voies de signalisations induisant l'expansion des clones malins et stimulant la néo-angiogénèse (Tricot 2000). De plus, les ostéoblastes et ostéoclastes sont importants dans le développement de la maladie. En effet, les ostéoclastes soutiennent la

croissance et la survie des cellules myélomateuses ; alors que les cellules de MM vont bloquer l'activité et la différenciation des ostéoblastes, ce qui a pour effet la destruction du tissu osseux (Abe et al. 2004) (Yaccoby et al. 2004). Il a noté que nous sommes en présence d'un cercle vicieux car la destruction de l'os favorise le développement tumoral qui à son tour favorise la différenciation des ostéoclastes induisant une augmentation de la destruction osseuse (Giuliani et al. 2001)

L'interleukine 6 (IL-6) a longtemps été considérée comme le facteur de croissance central. Dorénavant, les connaissances actuelles ont démontré que de nombreuses cytokines, chemokines et interactions cellulaires intervenaient dans la survie et la prolifération des cellules de MM activant des voies de signalisation majeures tels que l'IL-6R/STAT3, Ras/MAPK, PI3K/Akt, Notch, WNT et NFκB (Bommert et al. 2006). En plus des interactions avec le microenvironnement, de nombreuses altérations géniques sont impliquées dans la survie des cellules de MM.

- Dérégulation de l'homéostasie cellulaire

Le MM est décrit comme étant peu proliférant. En effet, son index de prolifération est faible : inférieur à 0,5% dans le stade MGUS, il passe à 1% dans le MM précoce et atteint rarement 5-10% dans le stade extra-médullaire de la maladie. La tumeur semble être composée de deux populations distinctes. La première serait constituée de cellules moins différenciées qui conserveraient leur propriété proliférative à la base du renouvellement cellulaire de la tumeur. La seconde serait constituée de plasmocytes malins différenciés dont l'accumulation serait à l'origine de la masse tumorale. Cette dérégulation de l'homéostasie cellulaire est liée à une dérégulation du cycle cellulaire et de l'apoptose.

- Dérégulation du cycle cellulaire

Il y a très peu de cellules proliférantes dans le MM. En effet, cette fraction représente 1% de la tumeur au diagnostic et augmente avec les rechutes pouvant aller jusqu'à 83%. Cela montre que le taux de croissance de la tumeur est fonction de la taille de la fraction

proliférante ainsi que du taux d'apoptose, alors que le temps de génération des cellules proliférantes varie peu (Drewinko et al. 1981). Il existe une corrélation inverse entre l'index de prolifération et la survie des patients ce qui en fait un puissant facteur pronostic.

Cette perturbation du cycle cellulaire peut s'expliquer par la dérégulation des Cyclines de type D, qui est observée dans 95% des MM (Bergsagel & Kuehl 2005) ; par une perturbation des inhibiteurs de CDKs (« Cyclin-dépendant kinases ») (Sarasquete et al. 2006) (Filipits et al. 2003) ; mais également par des translocations ou anomalies, plus tardives, entraînant la dérégulation des gènes impliqués dans la prolifération tel que c-myc, K-Ras et N-Ras (Rasmussen et al. 2005) (Chappell et al. 2000) (Avet-Loiseau et al. 2001). Le rôle des centrosomes est essentiel dans la ségrégation correcte des chromosomes et la cytodierèse. L'amplification des centrosomes semble être un événement précoce de la maladie car elle a été détectée dans de nombreux cancers dont le MM et les stades MGUS (Maxwell et al. 2005) (Chng et al. 2006).

- Dérégulation de l'apoptose

Comme toutes les tumeurs, le MM se caractérise par un index de prolifération élevé accompagné d'un faible taux apoptotique (Witzig et al. 1999). La dérégulation de l'apoptose dans le MM se traduit par une surexpression de protéines anti-apoptotiques mais aussi par une diminution de l'expression de Bax (Oancea et al. 2004). Parmi les membres anti-apoptotiques, la dérégulation de Mcl-1 est essentielle à la survie des cellules de MM (Derenne et al. 2002) et corrèle avec la progression de la maladie ainsi qu'avec le pronostic des patients (Wuillème-Toumi et al. 2005).

Les membres de la famille des IAPs jouent également un rôle prépondérant dans l'apoptose. En effet, une étude a montré une augmentation significative des IAPs (c-IAP1, c-IAP2, XIAP et Survivine) dans des biopsies de patients après traitements, dans le groupe de patients de mauvais pronostic (Nakagawa et al. 2006). De plus, leur forte expression dans une lignée de MM corrèle avec une résistance à la Doxorubicine (Abe et al. 2007). Ces protéines sont également impliquées dans la réponse aux agents chimiothérapeutiques. En

effet, une diminution de l'expression de c-IAP1, c-IAP2, XIAP et de Survivine est observée lors de la sensibilisation des lignées à la Dexaméthasone par la Rapamycine (Strömberg et al. 2004) (Yan et al. 2006), de l'effet anti-tumoral du Resveratrol (Bhardwaj et al. 2007) ou encore de la Fludarabine (Meng et al. 2007).

- Anomalies génétiques

De récentes avancées technologiques ont révélé la présence d'anomalies génétiques chez la plupart des patients atteints de MM. Cette maladie est actuellement caractérisée par des changements génétiques constants, comme des gains/pertes de chromosomes ou encore de translocations spécifiques affectant en premier lieu les chaînes lourdes d'Ig (« Immunoglobuline ») (14q32.3) combinées à une forte induction de différents gènes qui participent à la dérégulation de l'expression des Ig (Kuehl & Bergsagel 2005) (Avet-Loiseau et al. 2002). Certaines de ces modifications chromosomiques représentent des facteurs pronostiques importants. L'hyperdiploïdie (augmentation du nombre de chromosomes) est associée à un bon pronostic. La délétion du chromosome 17p13 (10% des patients) et les translocations impliquant le chromosome 14q32.3, le chromosome 4p16.3 (15%) ou le chromosome 16q23 (5%) sont associées à un mauvais pronostic (Chng et al. 2007). De nombreuses modifications géniques ont lieu à des stades tardifs de la maladie comme la mutation d'oncogènes (dont les membres de la famille RAS), des translocations secondaires dans le gène de MYC, et l'inactivation du gène suppresseur de tumeur p53 (Chng et al. 2007) (Hideshima et al. 2007) (Hideshima et al. 2004).

Les marqueurs membranaires du MM et leurs valeurs pronostics

Les plasmocytes qu'ils soient malins, ou sains, expriment à leur surface des antigènes nommés CD (« Cluster of differentiation »). Ces antigènes sont propres aux types cellulaires et éventuellement à leurs fonctions. Le phénotypage de ces CDs est une approche très sensible et puissante utilisée pour le diagnostic et la surveillance clinique et permet également de différencier le phénotype du MM des cellules plasmocytaires saines (Bataille et al. 2006).

- Le marqueur universel des plasmocytes : CD138

Le CD138 intervient dans l'adhésion cellule-cellule et joue un rôle de co-récepteur pour un grand nombre de facteurs de croissance (De Vos et al. 2006). C'est aussi un marqueur de différenciation car il n'est exprimé qu'après le stade de plasmablaste (Jego et al. 1999) (Jego et al. 2001). Chez les patients atteints de MM, le CD138 soluble (dans le plasma) est un facteur de pronostic reflétant la masse tumorale et l'index apoptotique (Seidel et al. 2000) (Lovell et al. 2005).

- Différence entre plasmocytes sains et cellules de MM : CD56, CD28, CD19, CD27

Le CD56 est souvent surexprimé dans le MM et permet l'interaction entre les cellules de MM ou avec les ostéoblastes. Dans les rares cas, l'expression du CD56 est perdue, les lésions osseuses sont alors moindres, mais le pronostic est plus sombre.

Le CD28 est un marqueur spécifique des cellules T qui est exprimé de façon aberrante dans 48% des cellules primaires de MM (Robillard et al. 1998). Le ciblage du CD28 induit la sécrétion de cytokines (Shapiro et al. 2001). Son expression augmente avec la progression de la maladie.

La perte du CD19 est observée dans 98% des patients, c'est un marqueur des cellules plasmocytaires malignes. Son rôle dans la maladie n'a pas encore été élucidé.

Le CD27 et son ligand CD70 font partis de la famille TNF/CD40/TRAILR. Ce marqueur de bon pronostic est perdu lors de l'évolution du MM (Zhan et al. 2002).

- Les marqueurs de sévérité de la pathologie : CD45 et CD221

La perte du CD45 ou la surexpression du CD221 (IGF1R ; « IGF1 receptor »), sont des marqueurs de mauvais pronostic (Moreau et al. 2004). La perte du CD45 induit une réponse à l'IGF1 (« Insulin like growth factor 1 »), dont le récepteur CD221 est surexprimé dans les cellules de MM, et est souvent associée avec à un mauvais pronostic (Bataille et al. 2005) (Pellat-Deceunynck & Bataille 2004). Comme le CD45 est un régulateur négatif de la voie de

l'IGF1 et un régulateur positif de la voie de l'IL-6, il joue un rôle essentiel dans la croissance et dans la biologie du MM.

Le traitement du MM

Le MM est relativement résistant aux agents de chimiothérapie conventionnelle. Les agents alkylants et les corticostéroïdes sont les traitements conventionnels les plus efficaces contre cette maladie.

- L'agent alkylant : Melphalan

Le Melphalan est un alkylant qui agit sur l'ADN des cellules en division, inhibant la multiplication cellulaire. Il est utilisé en première ligne dans le traitement du MM en association à la Prednisone chez les sujets de plus de 65 ans, ou à forte dose en chimiothérapie intensive chez les patients plus jeunes.

- Les corticoïdes : Prednisone et Dexaméthasone

Les corticoïdes ou stéroïdes sont des substances anti-inflammatoires qui ont également une propriété anti-tumorale. Généralement utilisés au sein d'associations de chimiothérapies, ils peuvent être prescrits seuls pour leur effet anti-tumoral. C'est le cas de la Dexaméthasone qui a déjà été utilisée dans certaines indications avec de bons résultats.

- Les agents anti-angiogénique : Thalidomide, Lénalidomide (Revlimid)

Le Thalidomide a en plus de sa propriété anti-angiogénique une action inhibitrice des cellules du stroma médullaire, qui faciliterait voire augmenterait l'action des chimiothérapies. Associé au schéma de traitement Melphalan-Prednisone en première ligne, il permet de prolonger très significativement la survie chez les malades de plus de 65 ans. Il peut également être utilisé lors des rechutes en association avec d'autres molécules.

Le Lénalidomide est un analogue du Thalidomide. Il est moins toxique sur le plan neurologique et donne moins d'effets secondaires. De nombreuses études sont en cours

dans le traitement du MM en association avec d'autre médicament et en raison de sa faible neurotoxicité, il pourrait être le candidat idéal du traitement d'entretien du MM.

- L'inhibiteur du protéasome : Bortézomib (Velcade)

Le Bortézomib est un médicament récent, d'une nouvelle classe thérapeutique : les inhibiteurs du protéasome. Le concept d'inhibition du protéasome a apporté une grande avancée dans le domaine des thérapies ciblées anticancéreuses, notamment du MM. Le Bortézomib est le premier inhibiteur sélectif du protéasome à avoir démontré une activité anti-tumorale en agissant sur les mécanismes de régulation de la croissance des cellules.

Malgré ces avancées thérapeutiques, tous les patients développent des résistances aux traitements caractérisées par une diminution de l'induction de l'apoptose. C'est pourquoi une meilleure compréhension des mécanismes d'échappement à l'apoptose est nécessaire.

III.2. Le cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez la femme aux Etats-Unis et en Europe. En France, il représente plus d'un tiers des nouveaux cancers diagnostiqués chez la femme. C'est une pathologie complexe et hétérogène. L'hétérogénéité de la pathologie a été découverte, dans un premier temps, par l'analyse des tumeurs en histopathologie ce qui a permis la distinction des sous-groupes hormono-dépendant (ER/PR) et surexprimant le récepteur Her2 puis, plus récemment, au niveau moléculaire. La mise en évidence de variations génétiques et protéiques n'est toujours pas la base de la classification actuelle mais commence néanmoins à servir de base dans de nouvelles études notamment aux Etats-Unis (Charafe-Jauffret et al. 2007).

La physiologie du sein normal :

Le sein est une glande exocrine qui se développe au cours de la vie de la femme. La glande mammaire est constituée de deux compartiments cellulaires : le compartiment

mésenchymateux (adipocytes, cellules stromales, fibroblastes, ...), perfusé par les vaisseaux sanguins et les nerfs, et le compartiment épithélial qui s'articule autour d'un réseau de canaux galactophores et de lobules renfermant les alvéoles (Rudland et al. 1995) (Figure 1).

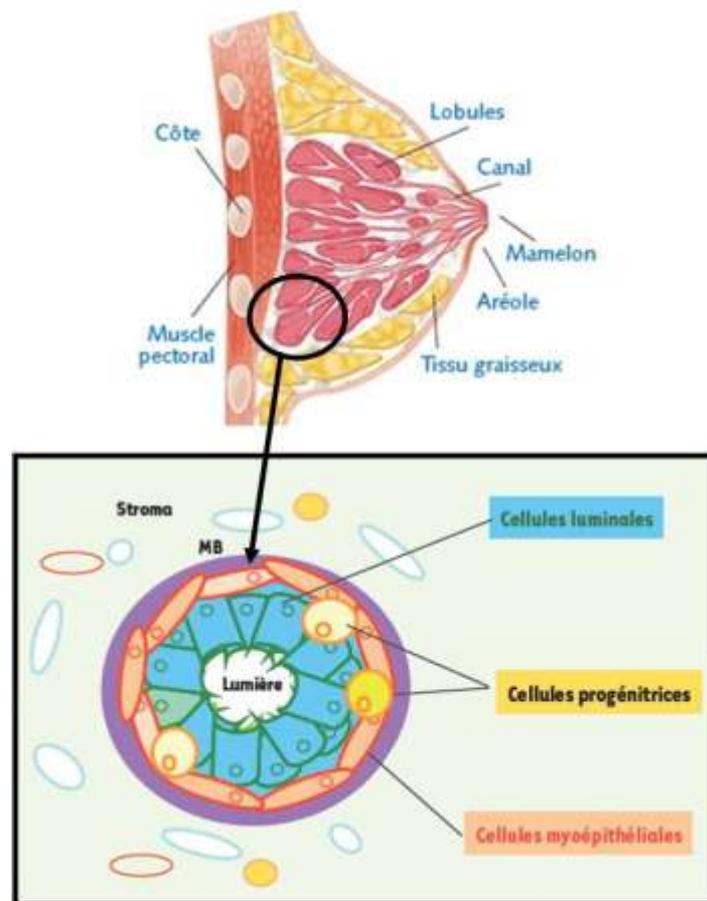


Figure 1 : Organisation tissulaire de la glande mammaire.

D'après Charafe-Jauffret *et al.*, *Medecine/Science*, 2007.

Une coopération permanente existe entre ces deux compartiments au cours du développement de la glande mammaire. Cette architecture se construit tout au long de la vie, du stade fœtal à la ménopause, sous l'influence des hormones sexuelles (œstrogène et progestérone) et d'un certain nombre de facteurs de croissance.

Le sein est composé de différents types de cellules épithéliales qui sont tous issus des cellules souches de la glande mammaire. Ces cellules ont la capacité d'auto-renouvellement et la particularité d'être indifférenciées. Sous certains signaux, les cellules souches vont se différencier pour donner naissance à des cellules dites « progénitrices », qui à leur tour

donneront des cellules différenciées épithéliales, ou cellules luminales, et les cellules myoépithéliales. Les cellules luminales correspondent aux cellules sécrétrices du lait maternel (Villadsen et al. 2007).

La tumorigénèse du cancer du sein

La glande mammaire est un organe en évolution permanente, sous l'influence des hormones et des facteurs de croissance. Ceci en fait un organe à part du point de vue du nombre de cellules en croissance et en différenciation, mais le rend aussi plus susceptible aux transformations cancéreuses (Olsson 2000).

Le processus oncogénique pouvant atteindre les cellules souches, et former des cellules souches cancéreuses (CSC). En effet, de part leur capacité d'auto-renouvellement et leur capacité de différenciation, les cellules souches ayant subies des transformations malignes participent au développement de la maladie. Cibler ces CSC permettrait alors de guérir le cancer. Cependant, toute la difficulté réside dans la caractérisation et l'isolement de ces CSC. Actuellement, il est essentiel de définir si les tumeurs solides sont issues d'une seule CSC et de comprendre leur hétérogénéité. Effectivement, l'utilisation d'agent qui ciblerait spécifiquement les CSC est un réel défi dont la mise au point nécessite encore de nombreuses recherches (Charafe-Jauffret et al. 2009).

Lorsque la tumeur atteint 1 à 3 mm³, elle a besoin d'un apport plus important en oxygène, dans le cas contraire, elle entrerait en nécrose (Folkman 1995). Pour cela, la tumeur va mettre en place un processus de néo-angiogénèse qui a pour but la création de nouveaux vaisseaux sanguins. L'angiogénèse tumorale répond à trois principes d'activation mis en jeu par les cellules tumorales en hypoxie : la libération directe de facteurs pro-angiogéniques, la dégradation de la membrane basale, provoquant la libération de facteurs de croissance et pro-angiogéniques, ce qui entraîne l'activation des macrophages et l'amplification du phénomène (Miller 2002).

Les facteurs pro-angiogéniques agissent sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins existants qui vont entrer en cycle, se diviser et former un nouveau vaisseau vers la source émettrice de facteurs angiogéniques : la tumeur. De plus, les cellules tumorales en développement vont induire une rupture de la membrane basale, grâce à la protéine MMP2 dans le MM par exemple, et migrer dans les vaisseaux sanguins (André et al. 1998) (Boudreau & Myers 2003). Ces cellules ont alors acquises des propriétés invasives et migratoires accompagnées de changements morphologiques caractéristiques, tels que la dépolarisation de la membrane et l'acquisition d'une indépendance vis-à-vis des interactions cellulaires, notamment la sécrétion de facteurs de transcription tel SNAIL, ce phénomène est appelé : la transition épithélio-mésenchymateuse. Une fois dans la circulation, ces cellules tumorales se disséminent dans tout l'organisme et forment des foyers tumoraux à distance grâce à leur plasticité cellulaire leur permettant une transition mésenchymato-épithéliale. La maladie atteint alors un stade critique accompagné généralement d'une perte de l'efficacité de la chimiothérapie et de l'hormonothérapie. La maladie est en stade final, dit d'échappement thérapeutique.

Sur la base de l'expression transcriptionnelle d'un millier de gène, 5 sous-types de cancer du sein ont été identifiés : luminale A, luminale B, basale, ERBB2/HER2 (« Human epidermal growth factor receptor 2 ») et « normale » regroupant ainsi 80% des cancers du sein (Sorlie et al. 2003).

Le groupe « luminale A » est caractérisé par une tumeur de bas grade de bon pronostic. Il exprime les récepteurs hormonaux à la progestérone et à l'oestrogène. Le sous groupe luminale B est constitué de cellules moins différenciées que le groupe luminale A et est plus prolifératif. Les cancers basaux autrement nommé triple négatifs n'expriment ni les récepteurs hormonaux (récepteurs à l'oestrogène et à la progestérone) ni ERBB2, c'est un cancer de haut grade, très proliférant et donc de mauvais pronostic. Ils semblent être composés de cellules épithéliales lumineales et myoépithéliales ce qui suggère que les transformations oncogéniques ont eu lieu dans les cellules souches. Ce sous-type présente une mutation de p53. Le dernier sous-groupe, ERBB2 (HER2) est nommé ainsi car les cellules présentent une amplification du gène d'ERBB2 qui est un récepteur tyrosine kinase de la

famille du récepteur à l'EGF (« Epithelial growth factor ») (Figure 2) (Vargo-Gogola & Rosen 2007).

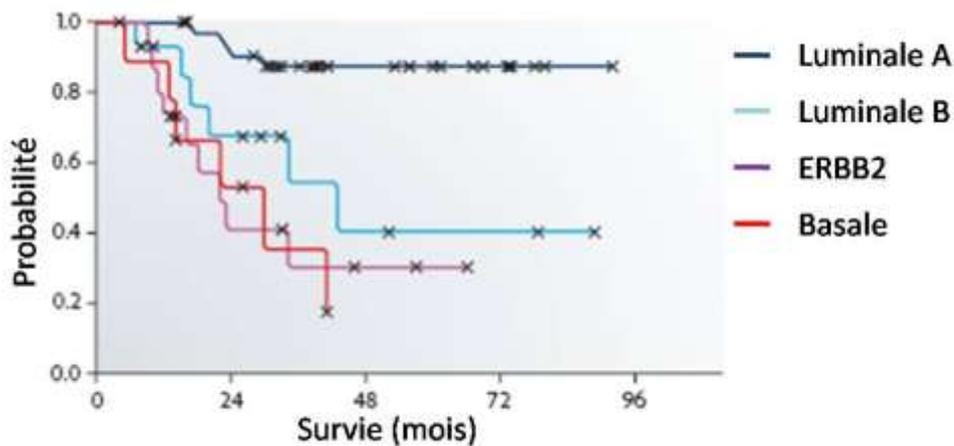


Figure 2: Courbes de survie en fonction du type de cancer du sein.

D'après Vargo-Gogola *et al.*, *Nat Rev Cancer*, 2007.

Ces tumeurs peuvent aussi être divisées en deux groupes selon le niveau de différenciation des cellules qui la compose. Ainsi, les tumeurs à cellules peu différenciées exhibent, en moyenne, plus d'aberrations génétiques. Cela suggère que ces deux types de tumeurs représentent deux voies de progression tumorale distinctes (Buerger *et al.* 1999).

Les facteurs de risques et de pronostic du cancer du sein

- Les facteurs de risque :

Les facteurs de risque du cancer du sein sont nombreux, mais ils peuvent être classés en trois catégories : génétiques, hormonaux et environnementaux.

Les facteurs génétiques sont responsables de 5 à 10% des cancers du sein. Il s'agit d'une transmission héréditaire d'une anomalie génétique impliquée dans la tumorigénèse telle que BRCA1, BRCA2 (« Breast cancer 1-2 ») ou p53. En effet, la perte d'hétérozygotie pour la

protéine BRCA1 induit un défaut dans les voies de réparation ainsi qu'une mauvaise ségrégation des chromosomes lors de la mitose.

Les hormones sont très impliquées dans le développement de la glande mammaire et, de ce fait, jouent un rôle important en tant que facteur de risque du cancer du sein. L'apparition précoce des règles (avant 12 ans), une ménopause tardive (après 55 ans) ainsi que l'absence de grossesse avant 30 ans sont autant de facteurs favorisant l'apparition d'une tumeur mammaire. De plus, il existe un risque accru de cancer du sein chez les femmes utilisant un traitement hormonal de la ménopause estro-progestatif.

L'exposition à de fortes radiations est reconnue comme impliquée dans l'apparition des cancers du sein. D'autres facteurs environnementaux comme le tabac et l'alcool jouent un rôle dans le développement tumoral alors que le rôle d'une alimentation trop riche en graisse animal n'a pas encore été démontré comme facteur de risque.

Et enfin, les femmes qui ont déjà présenté un cancer du sein ont plus de risque de développer un second cancer.

- Les facteurs pronostiques

Les facteurs intervenant dans l'établissement d'un pronostic de survie sont nombreux. Le premier, le sexe est un facteur important. En effet, même si le cancer du sein touche fondamentalement les femmes, 1 cas sur 200 survient chez l'homme. Un cancer du sein, chez la femme est de meilleur pronostic que chez l'homme (72% contre 65% de survie à 5 ans). L'âge joue également un rôle très important : un cancer du sein survenant chez une femme âgée de moins de 35ans sera plus agressif que chez une femme entre 35 et 65 ans et donc la survie à 5ans sera inférieure chez une femme de moins de 35 ans. La taille de la tumeur est également en relation avec l'évolution de la maladie, qui est d'autant plus sévère que la tumeur est volumineuse. La présence de récepteurs hormonaux est aussi un facteur pronostic car elle présage la sensibilité de la tumeur à l'hormonothérapie.

Les traitements du cancer du sein

Les traitements mis en place varient en fonction du stade de la maladie (masse tumorale, localisation dans le sein, nature histologique, la présence de ganglions, métastases, état de santé général de la patiente).

La chirurgie est l'acte principal qui permet l'ablation de la tumeur. Si le stade est avancé, une mastectomie est malheureusement nécessaire. Il existe des cancers dits opérables d'emblée. Pour d'autres cas, la chirurgie est précédée d'une cure de chimiothérapie ou d'hormonothérapie, voire une combinaison de ces deux traitements. La chimiothérapie a pour but d'éliminer les cellules cancéreuses résiduelles et diminuer le risque métastatique. Les protocoles de chimiothérapie sont variés car il existe de nombreux agents anticancéreux et les associations, les posologies, le rythme et la fréquence sont dépendants du type de tumeur, du degré d'évolution et de la patiente elle-même. Les médicaments utilisés en chimiothérapie ont pour cible l'ADN ou les protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN. Selon leur mode d'action, ils peuvent être classés en quatre familles :

- Les antimitotiques : Ils ont pour effet d'inhiber la polymérisation de la Tubuline, ce qui induit l'apoptose (exemple : Vinorelbine). Les taxanes (Paclitaxel ou Docetaxel) sont aussi des antimitotiques qui bloquent les cellules en métaphase par inhibition de la dépolymérisation de la Tubuline.
- Les agents alkylants sont des molécules qui se lient à l'ADN de façon covalente ce qui provoque une inhibition de la progression de l'ADN polymérase (exemple : Cyclophosphamide).
- Les antimétabolites perturbent la synthèse de l'ADN en bloquant les enzymes nécessaires à la synthèse des nucléotides (exemple : 5-Fluorouracile et le Méthotrexate).

- Les inhibiteurs de la Topoisomérase II inhibent la religation des deux brins d'ADN après le relâchement des contraintes de torsion nécessaire au processus de réplication (exemple : Adriamycine, Epirubicine).

La radiothérapie post-opératoire est réalisée environ 1 mois après l'intervention chirurgicale. Ce traitement permet de détruire cellules malignes résiduelles sur le site de la tumeur dans le but de limiter le nombre de récurrence locale. Si la radiothérapie est accompagnée d'une chimiothérapie, l'irradiation est réalisée en milieu de traitement ou après la chimiothérapie. La radiothérapie n'est jamais utilisée seule ou en pré-opératoire.

L'efficacité d'une hormonothérapie dépend de la présence de récepteur aux œstrogènes et à la progestérone sur les cellules tumorales. Il y a trois types d'hormonothérapie :

- L'hormonothérapie compétitive avec anti-œstrogènes. Ces agents bloquent l'action des œstrogènes en se fixant sur les récepteurs œstrogéniques des cellules tumorales (exemple : Tamoxifène).

- L'hormonothérapie additive avec progestatifs de synthèse. A forte dose, ils se comportent comme des anti-œstrogènes.

- L'hormonothérapie inhibitrice avec les anti-aromatases. Cela consiste en une surrénalectomie chimique, qui se traduit par une inhibition de l'activité aromatase responsable de la conversion des stéroïdes surrénaliens en œstrogènes.

De nouvelles voies de traitement se développent vers une thérapie ciblée c'est-à-dire en essayant d'apporter une spécificité en fonction des caractéristiques de la tumeur. C'est par exemple le cas des antagonistes des récepteurs de facteur de croissance. Le Trastuzumab est un anticorps dirigé contre la protéine ERBB2, et l'Herceptine, un anticorps dirigé contre le récepteur d'ERBB2. Cette protéine qui est surexprimée dans un quart des tumeurs du sein et est responsable d'une prolifération incontrôlée. Les inhibiteurs de tyrosine kinases (Lapatinib) peuvent être aussi utilisés dans le traitement de ce sous-groupe car ils bloquent la voie de signalisation en aval du récepteur.

Récemment, une étude de Turner et ses collaborateurs a montré que l'utilisation d'un inhibiteur de PARP-1 induit la mort de cellules déficientes en BRCA1 et BRCA2 ou d'autres membres de la voie de réparation par recombinaison homologue. Il s'agit de létalité synthétique qui, ici, correspond au blocage d'une seconde voie de réparation de l'ADN à l'aide d'inhibiteurs synthétiques en plus de celle qui n'est plus fonctionnelle, dans le but d'induire spécifiquement la mort des cellules tumorales (Turner et al. 2008). Ce concept repose sur un ciblage des cellules cancéreuses grâce à une caractéristique que ne possède pas les cellules normales. Dans ce cas, les cellules normales sont hétérozygotes pour le gène *BRCA1* alors que les cellules cancéreuses ont perdu cette hétérozygotie. Il y a donc un espoir d'amélioration des traitements et de diminution des effets secondaires.

Les grandes avancées en termes de compréhension des mécanismes de prolifération tumorale ont permis la mise en place de traitements plus efficaces avec notamment les thérapies ciblées qui tendent à diminuer la toxicité et s'appuient sur le principe d'addiction oncogénique. Cependant, le stade de développement de la maladie reste un facteur très important dans la prise en charge thérapeutique d'où l'importance d'une prévention accrue afin de permettre un dépistage précoce qui renforce les chances d'efficacité des traitements. C'est pourquoi, il est primordial de mieux connaître ces pathologies afin de mieux les combattre notamment *via* le développement des nouvelles molécules ciblant la prolifération incontrôlée des cellules tumorales et/ou déclenchant une mort de ces cellules cancéreuses.

LE CYCLE CELLULAIRE

I. Introduction

Le cycle cellulaire est le processus fondamental par lequel une cellule-mère donne deux cellules-filles. Le cycle cellulaire est rythmé par deux temps forts, l'interphase, pendant laquelle a lieu la réplication des chromosomes, et la mitose, au cours de laquelle les chromosomes répliqués se séparent et se répartissent entre les deux cellules-filles. Le cycle de division cellulaire est un processus vital tant au niveau embryonnaire qu'une fois à l'âge adulte.

Le mécanisme de division cellulaire est extrêmement complexe et est régulé par un grand nombre de protéines. Ces protéines interviennent très transitoirement et dans un ordre précis, permettant ainsi la succession définie des différentes phases du cycle cellulaire et la correction des erreurs potentiellement survenues au cours de leur exécution. Une perte de la précision de cette régulation peut être à l'origine d'anomalies lors de la division. L'anomalie ainsi générée peut se transmettre dans les cellules-filles et, par conséquent, augmenter l'instabilité génétique, qui est un facteur d'apparition de cancers. Les gènes, impliqués dans le cycle cellulaire et/ou dans la régulation de ce dernier, ont la particularité d'avoir été hautement conservés tout au long de l'évolution. Ainsi, l'identification et la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués ont été facilitées par la possibilité d'études croisées, notamment dans des modèles tels que la levure et le xénope (Nurse 2000).

II. Les phases du cycle

En absence de division, les cellules sont dites en quiescence ou en phase G0 (avec « G » pour « gap », intervalle), et ce, jusqu'à l'apparition de signaux mitogènes qui les conduiront à entamer un cycle de division.

Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases : G1, S (synthèse), G2, M (mitose) (Figure 3). Une fois entrées en phase G1, les cellules qui franchissent le point de restriction ne sont plus sous l'influence des signaux mitogènes mais sont irrémédiablement engagées dans le cycle de division. Dans cette phase G1, la cellule synthétise les protéines et les ARN (« Acide ribonucléique ») qui lui seront nécessaires à la réplication de son ADN durant la phase S. La phase G2 précède la mitose où a lieu la séparation des chromosomes, préalablement répliqués, et leur répartition dans les deux futures cellules-filles. Les deux cellules-filles n'apparaissent de façon proprement dite qu'à la fin de la mitose avec la cytotédièrese. Les cellules-filles peuvent alors entamer à leur tour un nouveau cycle de division cellulaire ou retourner en phase de quiescence.

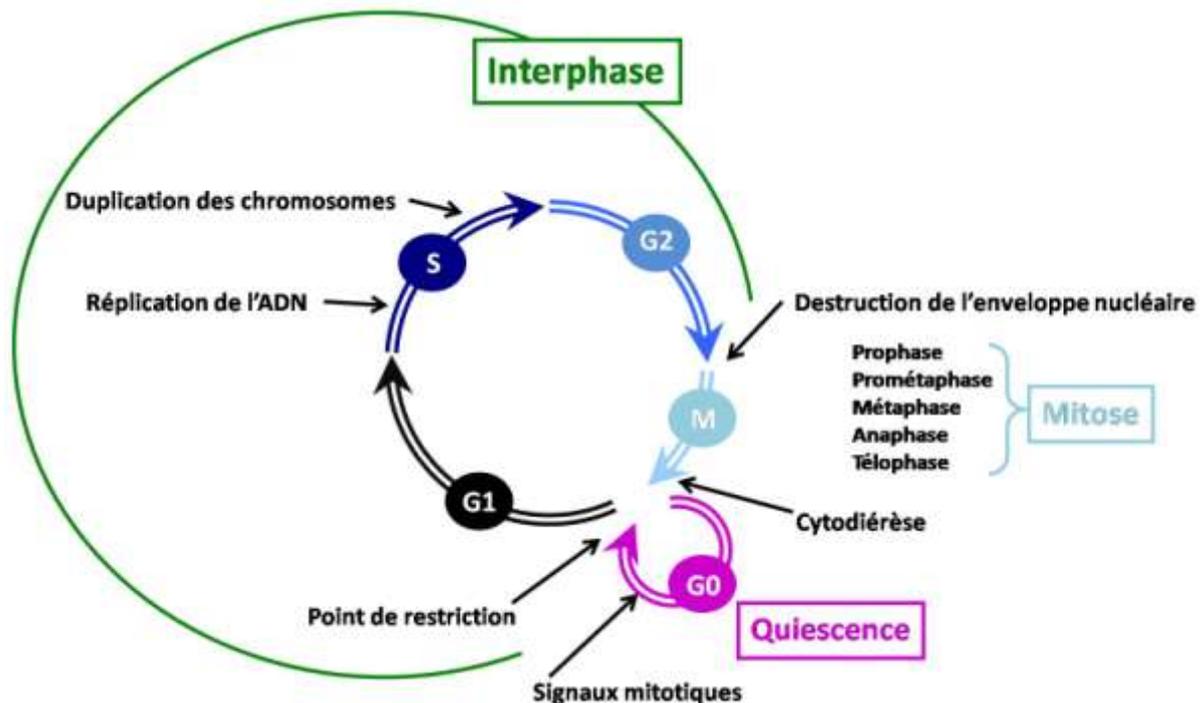


Figure 3: Schéma du déroulement du cycle cellulaire.

G0 = phase de quiescence, G1 & G2 = intervalles de préparation, S = phase de réplication de l'ADN, M = mitose comprenant prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et téléphase.

Le cycle cellulaire est orchestré (Figure 4) par une famille de protéines hétérodimériques à activité sérine/thréonine kinase. Les membres de cette famille sont

composés d'une sous-unité catalytique, les kinases Cyclines-dépendantes (« Cyclin-dependant kinases », CDKs), qui est active uniquement si elle est complexée avec la sous-unité régulatrice, les Cyclines. L'harmonie de cette régulation réside dans la nature transitoire de ces complexes due à (i) une durée de vie courte des Cyclines par synthèse et dégradation à chaque cycle, (ii) des modifications post-traductionnelles, particulièrement des phosphorylations/déphosphorylations (notamment par les phosphatases CDC25 (« Cell division cycle 25 »)), (iii) la localisation cellulaire des Cyclines et (iv) des associations transitoires avec des inhibiteurs, regroupés sous le terme de CDKi (« CDK inhibitors »). Ces CDKis regroupent deux familles de protéines : la famille CIP/KIP (p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}) dont les membres se fixent directement aux complexes Cyclines/CDK pour les inhiber (Coqueret 2003) et la famille INK4 (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D}) qui bloquent la fixation de la Cycline D sur la CDK (Sherr & Roberts 1999).

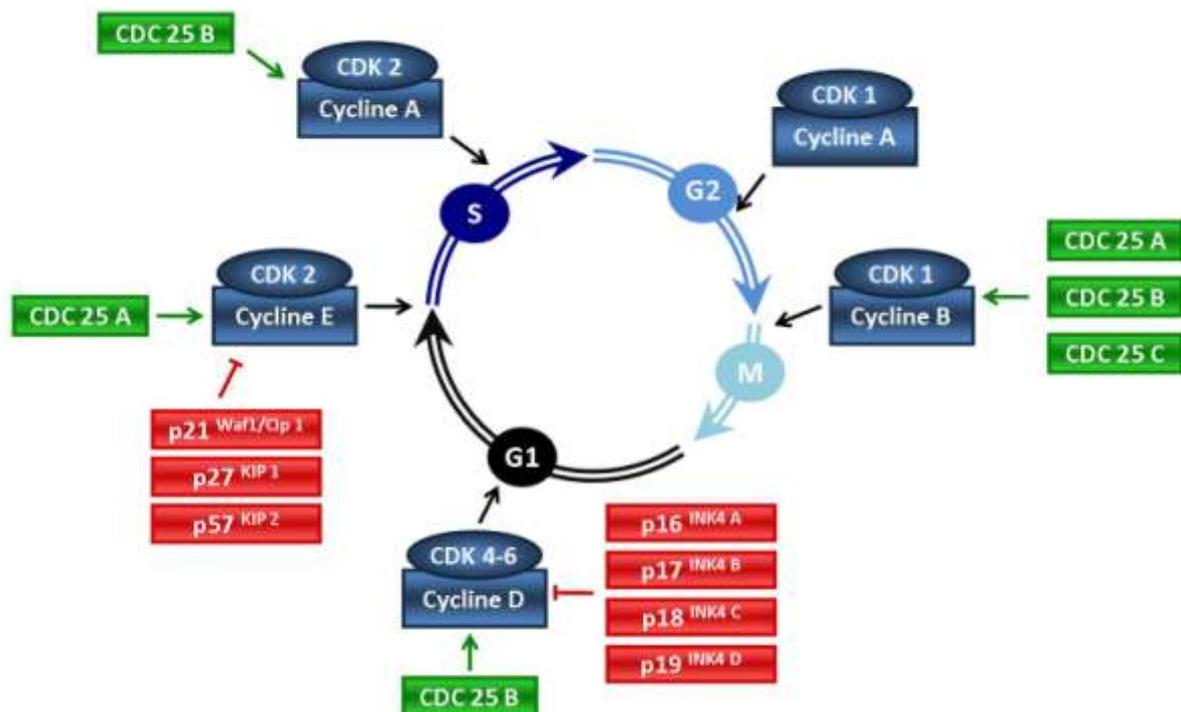


Figure 4: Orchestration du cycle cellulaire par les complexes Cyclines/CDK.

D'après Meijer, *Oncologie*, 2003.

II.1. La phase G1

Le point de restriction et la phase G1 sont sous le contrôle de la voie pRb-E2F dont les anomalies sont fréquentes dans les cancers. Les protéines de la famille pRb (« Retinoblastoma protein », p130 et p107) se fixent aux protéines de la famille E2F et bloquent leur activité transcriptionnelle dans les cellules quiescentes ou en début de phase G1 (Cobrinik 2005). Cette inhibition de la transcription est renforcée par le recrutement de protéine ayant une activité de désacétylation des histones, HDAC (« Histones deacetylases »). Ces HDACs sont recrutées par pRb, provoquant un compactage de la chromatine, ce qui va avoir pour conséquence de la rendre inaccessible aux facteurs de transcription, notamment E2F et DP. Au cours de la phase G1, p21^{CIP1} et p27^{KIP1} vont se fixer sur CDK4 pour former le complexe Cycline D/CDK4 (et inhiber la formation du complexe Cycline E/CDK2) et sa translocation dans le noyau. Le complexe Cycline D/CDK4-6 va phosphoryler pRb, induire une dissociation partielle du complexe E2F/DP/pRb (où DP est un des membres de la famille E2F) et donc rendre E2F/DP actifs et ainsi avoir un début d'activité transcriptionnelle. Cependant, une seconde phosphorylation de pRb est nécessaire afin d'obtenir une dissociation complète du complexe. Cette dernière est réalisée par le complexe Cycline E/CDK2 (Figure 5). Il est à noter que p27^{KIP1}, bien qu'inhibiteur du complexe Cycline E/CDK2, est également un substrat de ces derniers. En effet, p27^{KIP1} est phosphorylé par ce complexe, phosphorylation qui stimule son ubiquitinylation par Skp1/Skp2, induisant sa dégradation.

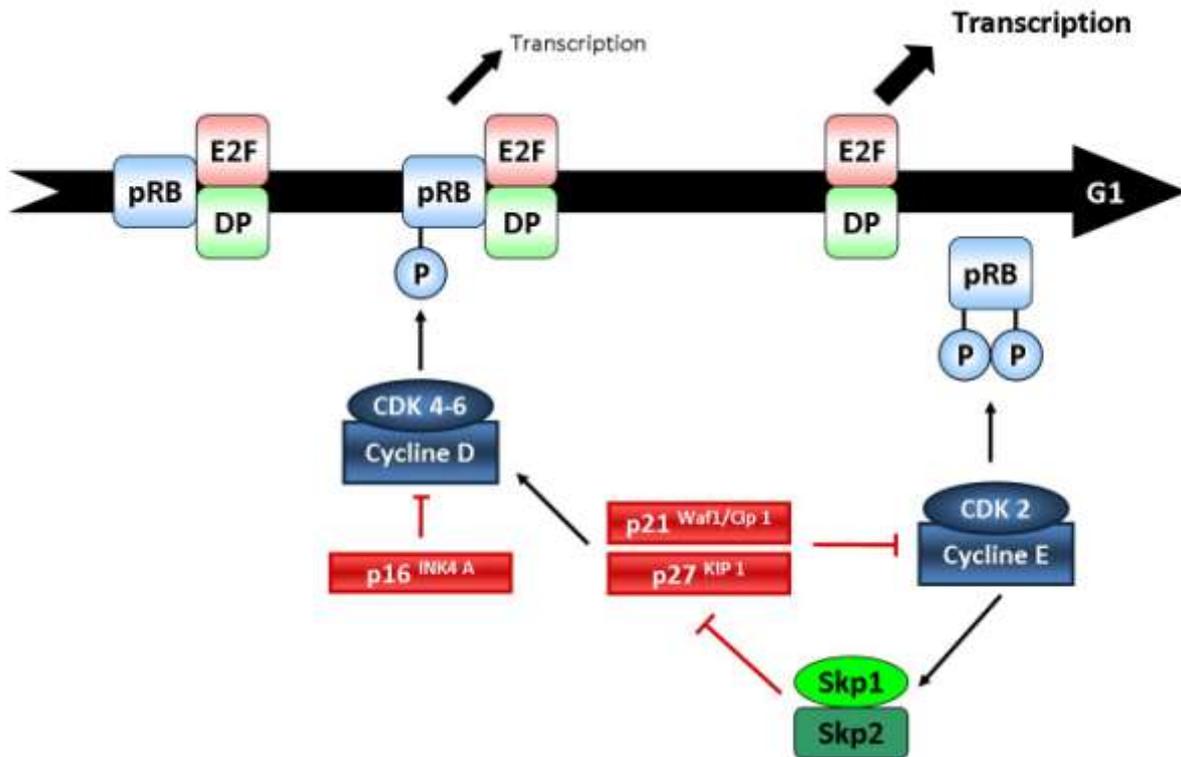


Figure 5: Schéma de la progression de la phase G1.

D'après Meijer, *Oncologie*, 2003.

II.2. La transition G1/S

La transition G1/S se prépare avant la fin de la phase G1 avec l'assemblage d'un complexe pré-répliatif (pré-RC). Ce complexe est composé de l'ORC (« Origin recognition complex ») et de six protéines du complexe MCM (« Mini-chromosome maintenance »), MCM2-7. Les six protéines, MCM2-7, sont complexées à l'ORC par l'intermédiaire d'une ATPase (« adénosine triphosphatase »), CDC6, et d'un facteur de transcription, cdt1. Il est important qu'il n'y ait pas plusieurs mécanismes répliatifs à se succéder en phase S, G2 et M. C'est pourquoi, la formation d'autres complexes pré-répliatifs est inhibée par la phosphorylation de CDC6, MCM et ORC par les CDK. De plus, cdt1 est, quant à lui, inhibé par la gémimine dès le début de la phase S et ce jusqu'à la fin de la phase M (Figure 6).

Afin que la synthèse d'ADN puisse s'initier, plusieurs complexes protéiques doivent s'associer au complexe pré-RC. La première protéine à se fixer est MCM10. Le complexe ORC/MCM2-7/MCM10 est activé grâce à la phosphorylation des protéines MCM2-7 (notamment MCM2) par CDC7 en fin de phase G1. Ensuite, le complexe Cycline E/CDK2 intervient afin de permettre l'association de CDC45 avec le complexe pré-RC actif (Figure 6). CDC45 est un acteur crucial de l'accrochage de l'ADN polymérase sur la chromatine et l'activation de l'ADN hélicase au niveau des fourches de réplifications.

La phase S est la phase de duplication de l'ADN. Durant toute cette phase, CDK2 est active sous forme de complexes avec les Cyclines de type A qui ont été synthétisées suite à la forte inactivation de pRb. Le complexe Cycline A/CDK2 permet l'avancée dans la phase S et sa sortie.

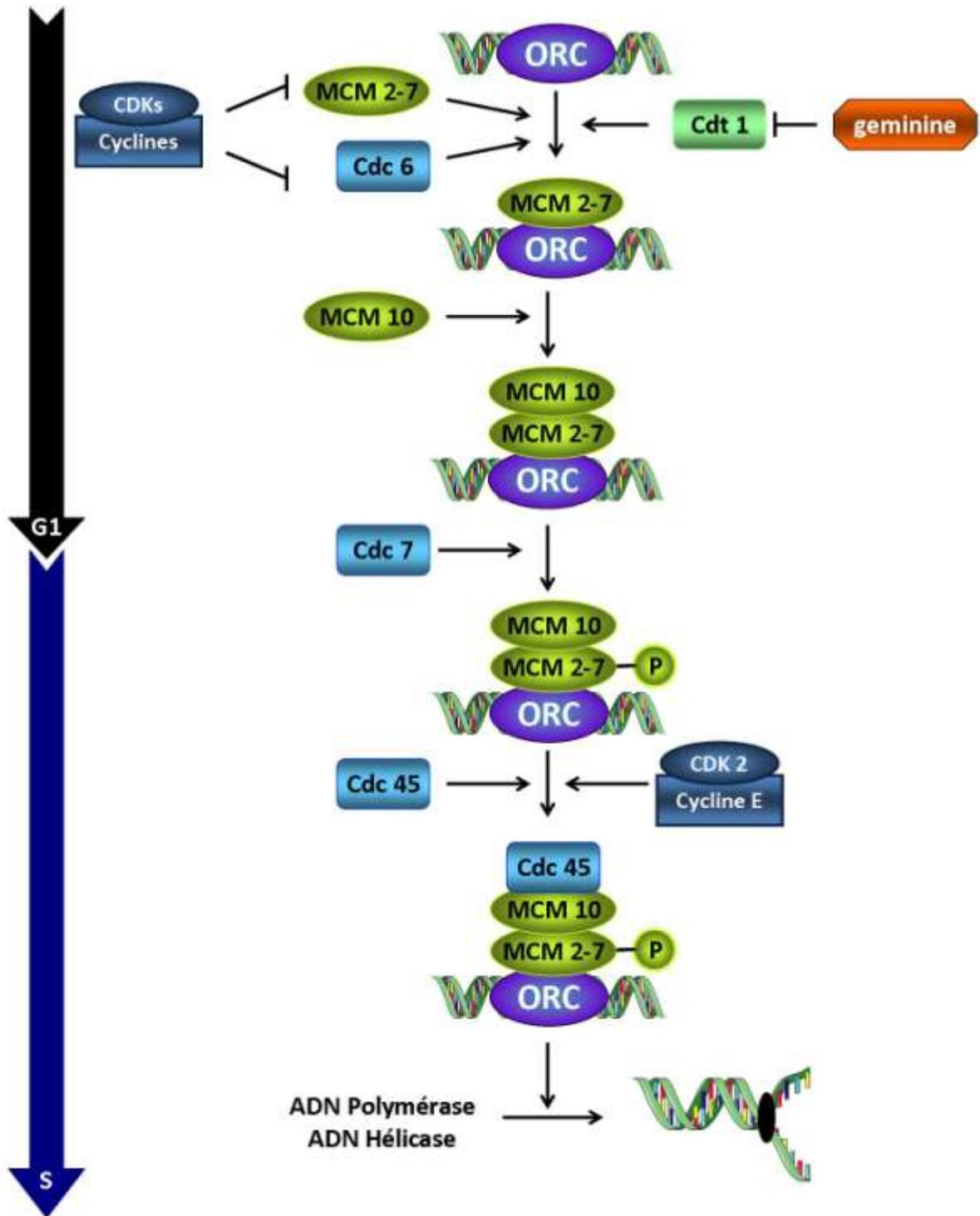


Figure 6: Schéma de la transition G1/S.

II.3. La phase S

La réplication de l'ADN est catalysée par l'ADN polymérase, une enzyme qui utilise un brin d'ADN comme base de synthèse de l'autre brin par additions successives, sur l'extrémité 3', de nucléotides complémentaires fournis par les dATP, dTTP, dGTP et dCTP. L'élongation de la chaîne d'ADN se fait donc dans le sens 5' vers 3'. Dans la cellule, la réplication de la molécule d'ADN double brin se fait dans une structure en forme de « Y », la fourche de réplication. Celle-ci progresse graduellement le long de la double hélice de parentale, générant deux doubles hélices filles derrière elle, formant les deux bras du « Y ». Chacune avance dans une direction chimique différente, 3' vers 5' et 5' vers 3'. L'ADN polymérase ne fonctionne que sur un des brins, dans le sens 5' vers 3' (le brin avancé). La synthèse de l'ADN sur l'autre brin, de 3' vers 5' sur le brin retard, fait donc appel à un autre mécanisme. En effet, sur ce brin, l'ADN polymérase produit de longues séries de fragments d'Okazaki qui sont ensuite reliés les uns aux autres par une ADN ligase. De nombreuses protéines interviennent dans ce processus de réplication, il y a notamment la participation de 27 protéines au niveau de la fourche de réplication. Il est important de noter la présence de l'ADN hélicase, qui déploie la double hélice et de l'ADN primase qui, quant à elle, produit les amorces pour les fragments d'Okazaki.

II.4. La transition G2/M et la mitose

À la fin de la phase S, les complexes Cycline A/CDK2 vont être graduellement remplacés par des complexes Cycline A/CDK1. Il est à noter que ces complexes possèdent de nombreux substrats en commun. Dès le début de la phase G2, la Cycline A est dégradée par protéolyse après ubiquitinylation alors que la Cycline B, quant à elle, est fortement synthétisée. CDK1 se fixe à la Cycline B, association essentielle au déclenchement de la mitose. CDK1 s'associe préférentiellement avec les Cyclines B1 et B2, le rôle de l'isoforme B3 n'étant pas encore bien déterminé. Le complexe Cycline B/CDK1, également nommé MPF (« Mitosis promoting factor »), régule de nombreux événements durant la transition G2/M et la mitose (Nigg 2001). D'un point de vue moléculaire, le complexe MPF est inactif au

moment de sa formation du fait de phosphorylations inhibitrices de CDK1 sur les thréonines 14 et 15 par Wee 1 et Myt1. Lors de l'activation du complexe MPF, ces phosphorylations de CDK1 sont levées par les phosphatases CDC25, les protéines Wee1 et Myt1 sont, quant à elles, inactivées par les kinases AKT/PKB (« Protein kinase B ») et p90^{RSK} permettant la migration vers le noyau du complexe. En effet, le complexe MPF s'associe avec les centrosomes durant la prophase où il déclenche la séparation de ces derniers en phosphorylant Eg5, une kinésine impliquée dans la bipolarisation du fuseau mitotique. De plus, le MPF participe également à la condensation des chromosomes, la fragmentation du réseau Golgien ou la destruction de la Lamine nucléaire (Malumbres & Barbacid 2005). Enfin, la sortie de mitose n'est possible qu'une fois le MPF inactivé. Cette inactivation réside en la dégradation de la Cycline B, par ubiquitinylation, grâce au complexe APC/C (« Anaphase promoting-complex / cyclosome ») (Figure 7) (Harper et al. 2002).

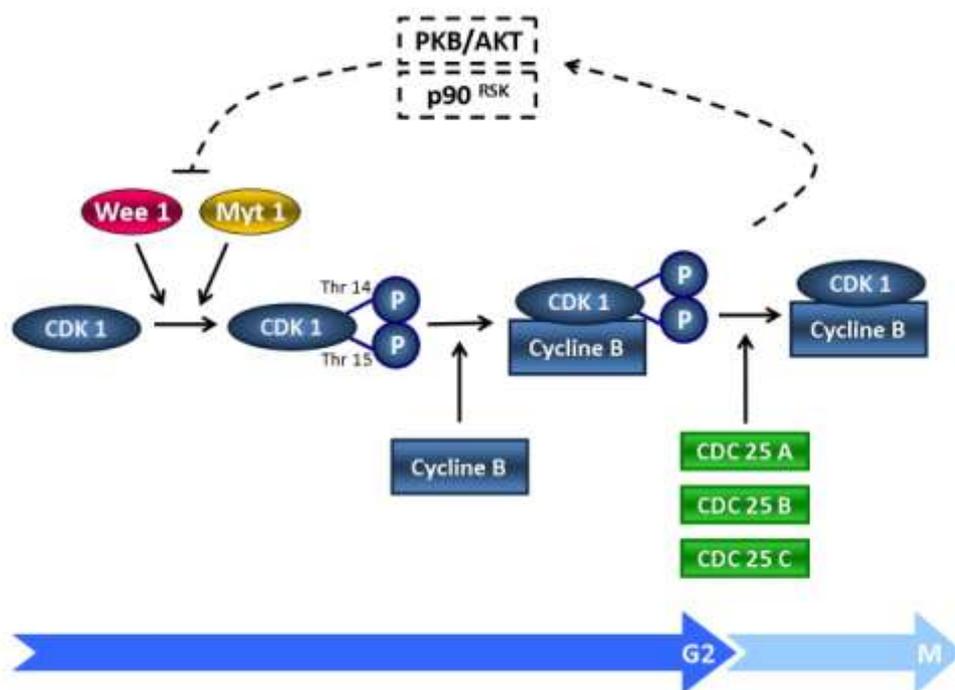


Figure 7 : Schéma de la transition G2/M

III. Cycle cellulaire et surveillance

Les points de contrôle du cycle cellulaire assurent la surveillance de la qualité du cycle en cours et, notamment, la fidélité de la duplication du matériel génétique. En cas

d'anomalies, que ce soit au niveau de la réplication de l'ADN, de la ségrégation des chromosomes ou encore de l'endommagement de l'ADN, ces points de contrôle arrêtent la progression du cycle cellulaire et enclenchent des processus de réparation ou de mort cellulaire par apoptose.

III.1. Le point de contrôle du dommage à l'ADN

Le dommage à l'ADN est un événement commun de la vie d'une cellule, commun mais non sans risque puisqu'il peut provoquer la mort de cette dernière voire la mort de l'organisme dont la cellule fait partie. Le dommage à l'ADN provient de deux origines distinctes. La première est une origine endogène métabolique. En effet, la cellule, du fait de son fonctionnement aérobie, provoque la génération de ROS (« Reactive oxygen species »). Ces ROS peuvent être responsables de lésions oxydatives de bases ou de sucres de part leur nature radicalaire. La seconde origine est exogène. Les agents exogènes pouvant induire des dommages à l'ADN peuvent être classés en deux catégories : (i) les agents physiques, tels que les radiations ionisantes ou les ultraviolets (UV) et (ii) les agents chimiques parmi lesquels on va retrouver de nombreux agents anti-tumoraux, notamment des radiomimétiques (calichéamicine, bléomicine), des poisons des Topoisomérases (irinotecan, étoposide) et des agents alkylants (melphalan).

Que ce soit suite à un dommage à l'ADN ou à un stress réplicatif, la cellule va activer une voie de transduction de signal dépendante d'une cascade d'activation de kinases. Cette voie a deux buts principaux : la réparation des lésions de l'ADN et la facilitation de la réplication de ce dernier. Ayant pour mission la protection du génome, le point de contrôle des dommages de l'ADN se doit de détecter l'ensemble des altérations structurelles de l'ADN, qui comprend, entre autres, les trous, les cassures doubles brins et les altérations de la réplication.

Les principaux acteurs de cette réponse sont trois membres de la famille des PIKK (« Phosphoinositide 3-kinase-like kinase ») : ATM (« Ataxia telangiectesia mutated », plus

spécialisée dans la réponse aux cassures doubles brins causées par les radiations ionisantes, ATR (« ATM related »), quant à elle, fait face aux dommages induits par les UV (Abraham 2001) et leurs principaux substrats respectifs CHK2 et CHK1 (« Checkpoint kinase 1 et 2 ») (Figure 8) ainsi que DNA-PK (« DNA dependent kinase ») spécialisée dans la réponse aux radiations ionisantes hors de la phase S du cycle cellulaire.

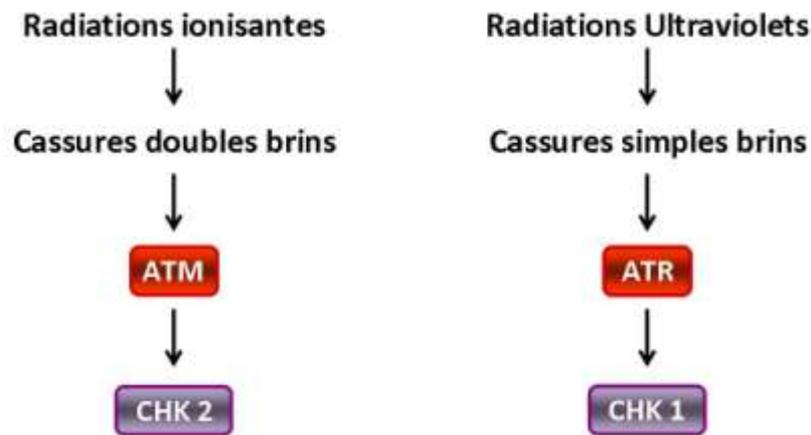


Figure 8 : Point de départ des voies de réponses aux dommages à l'ADN.

En ce qui concerne ATM, cette protéine est activée en réponse aux cassures doubles brins de l'ADN. Lee a montré en 2004 que lors d'une cassure double brin, le complexe MRN, constitué des trois protéines Mre11, Rad50 et Nbs1, se fixe rapidement au niveau de la cassure. ATM va ensuite être recrutée par ce complexe *via* une interaction avec Nbs1 (Lee & Paull 2004). ATM est sous une forme dimérique inactive à l'état basal. Cette protéine va s'autophosphoryler sur la sérine 1981 lorsqu'elle est recrutée sur le site de la cassure pour aboutir à une forme monomérique active : P-ATM (Bakkenist & Kastan 2003). ATM ainsi recrutée par le complexe MRN *via* Nbs1 va s'activer et changer de conformation ce qui va stabiliser les interactions avec ses substrats. C'est pourquoi une phosphorylation accrue de CHK2 est retrouvée (Lee & Paull 2004) (Figure 9).

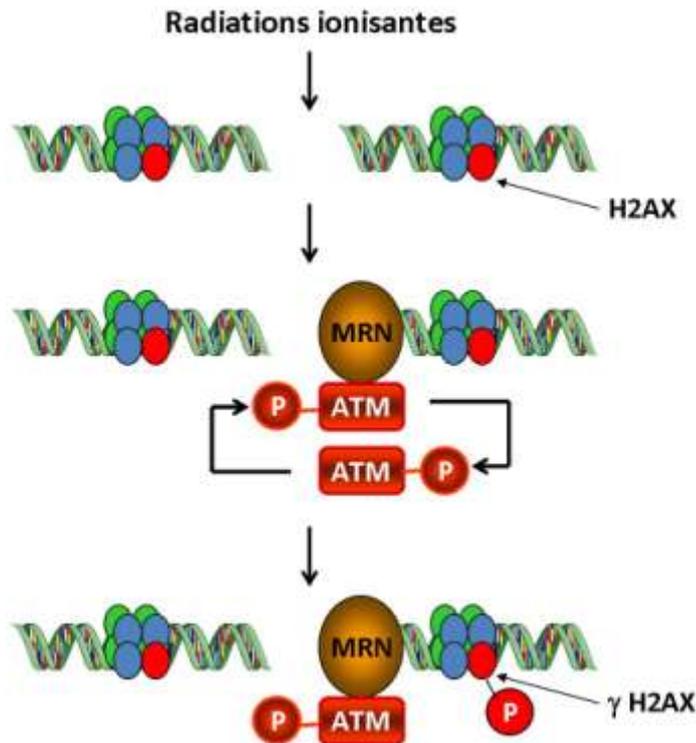


Figure 9 : Activation d'ATM suite à des cassures doubles brins.

D'après Harper *et al.*, *Molecular Cell*, 2007.

Ces mêmes auteurs montrent que des modifications de la structure de la chromatine pourraient avoir un rôle dans l'activation d'ATM. En effet, le remodelage de la chromatine passe par les modifications post-traductionnelles des histones comme des méthylations, phosphorylations ou acétylations. Il a été montré que l'histone acétyltransférases (HAT), Tip60 acétyle rapidement ATM en réponse à l'apparition de dommages et que cette acétylation constitue une étape nécessaire à son activation (Sun et al. 2005).

Une fois activée, ATM va induire différentes cascades de signalisation qui vont provoquer différentes réponses telles que l'arrêt du cycle du cycle cellulaire en G1/S et en G2/M, la réparation de l'ADN mais également la mort cellulaire.

Lorsqu'une ADN polymérase se bloque au niveau d'une fourche de réplication, notamment après exposition à des radiations UV, l'ADN hélicase continue à dérouler l'ADN ce qui génère de l'apparition de fragments simples brins de l'ADN. Ces fragments simples

brins vont être recouverts de protéine RPA (« Replicating protein A ») (Byun et al. 2005) ce qui induit, d'une part, la fixation de la protéine ATRIP (« ATR interacting protein ») puis le recrutement sous-jacent de la protéine ATR et, d'autre part, la fixation de la protéine Rad17, qui quant à elle induit le recrutement du complexe 9-1-1 composé des protéines Rad9, Rad1 et Hus1. La protéine TopBP1 se fixe, ensuite, sur l'extrémité C-terminale constitutivement phosphorylée de Rad9 par l'intermédiaire de sa première répétition BRCT. ATR phosphoryle alors Rad17, TopBP1 et le complexe 9-1-1 (Burrows & Elledge 2008). Une fois phosphorylée la protéine TopBP1 interagit avec la protéine ATR grâce à son domaine AAD (« ATR activation domain ») induisant l'activation du complexe ATR-ATRIP (Kumagai et al. 2006).

L'activation de la protéine effectrice d'ATR, CHK1, en réponse à un dommage à l'ADN se fait par l'intermédiaire de la Clapsine, une protéine qui interagit directement avec CHK1. L'interaction de la Clapsine avec CHK1 nécessite la phosphorylation de deux résidus de la Clapsine, la thréonine 916 et la sérine 945. La phosphorylation de ces résidus induit la formation du motif de liaison du domaine de fixation à CHK1, le domaine CKBD (« CHK1-binding domain »). Cette phosphorylation de la Clapsine est dépendante d'ATR mais ne semble pas être catalysée directement par ATR (Bennett et al. 2008). La Clapsine est naturellement absente des cellules en G1, possède un pic d'expression en S-G2 et est rapidement dégradée en mitose par le protéasome après ubiquitinylation. Cette dégradation en mitose est due à la phosphorylation de sites en position N-terminale de la Clapsine par Plk1 (« Polo-like kinase 1 ») (Mailand et al. 2006).

La réponse aux dommages à l'ADN nécessite la présence des protéines qui sont en lien direct avec ATM et ATR en tant que substrats et qui peuvent, cependant, agir soit, en tant que recruteurs d'autres substrats soit en tant que base à la formation de complexes. Ces protéines peuvent être considérées comme des médiateurs de cette réponse et les plus connues sont Mdc1, 53BP1, le complexe MRN, la Clapsine, H2AX et BRCA1. Il est à noter que BRCA1 peut subir une perte d'hétérozygotie dans certaines lignées de cancer du sein et de ce fait être inactivée.

À proximité du site de dommages à l'ADN induits par irradiation, l'histone H2AX (« H2A histone family, member X ») va être phosphorylée sur sa sérine 139 (résidu c-4 de la séquence SQEY) par ATM, ATR et DNA-PK (Rogakou et al. 1998) (Bonner et al. 2008). La phosphorylation d'H2AX va conduire au recrutement direct de la protéine Mdc1 constitutivement phosphorylée. Le recrutement de cette protéine permet une amplification et une propagation de la phosphorylation d'H2AX par inhibition de la déphosphorylation de cette dernière par la phosphatase Pph3 (Stucki & Jackson 2006). De nombreux facteurs vont ensuite être mis en jeu au niveau du site de dommage ce qui induit la formation d'un IRIF (« Ionizing Radiation-Induced Foci »). Mdc1 induit une polyubiquitynilation d'H2AX au niveau du site de la cassure double brins induisant de ce fait la formation d'IRIF plus loin sur la chromatine. En effet, la phosphorylation de Mdc1 par ATM recrute une E3 ligase, Ubc13-Rnf8, responsable de l'ubiquitynilation d'H2AX. Cette ubiquitynilation mène au rapprochement de 53BP1, de BRCA1 et de Rap80 de l'IRIF (Figure 10).

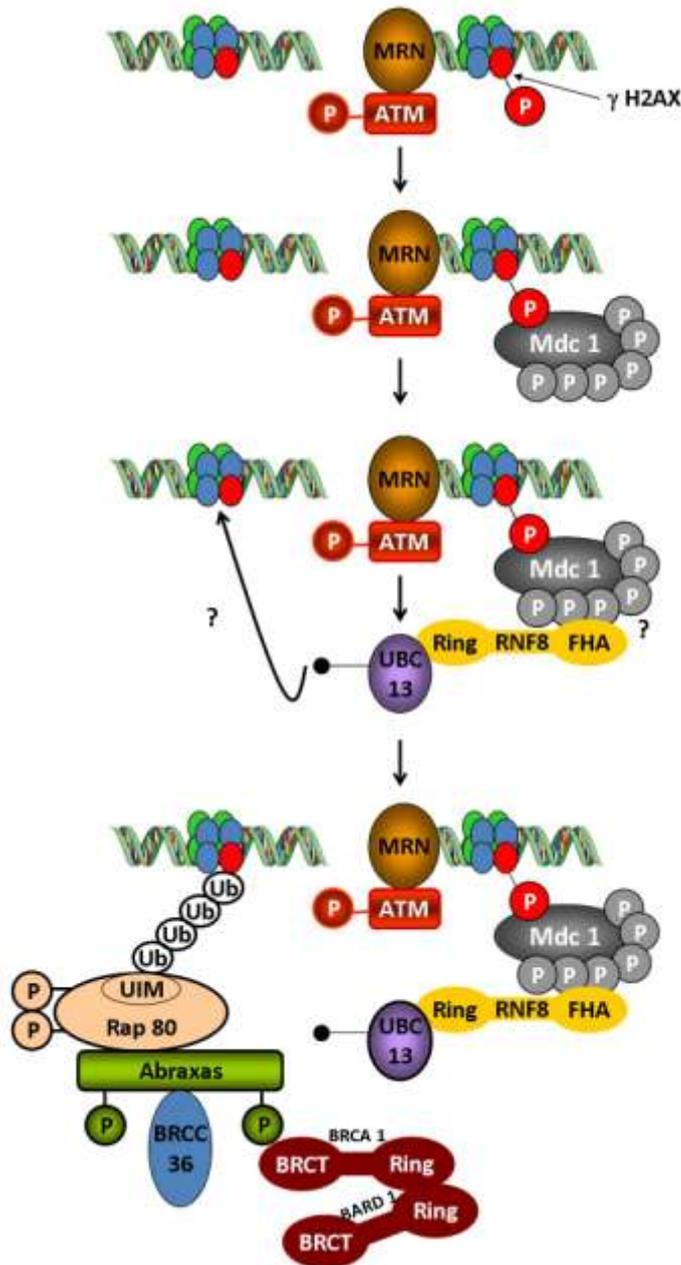


Figure 10 : Schéma de la formation d'un IRIF lors de dommages à l'ADN.

D'après Harper *et al.*, *Molecular Cell*, 2007.

Pour réparer les cassures de l'ADN, notamment les cassures doubles brins, la cellule dispose de différents mécanismes. En effet, lorsque la chromatide sœur est présente, donc en phase G2/M, la cellule va préférentiellement l'utiliser comme matrice afin de réparer le brin endommagé. Ceci correspond au mécanisme de recombinaison homologue (RH). Un second mécanisme, appelé jonction d'extrémités non homologues (NHEJ), permet quant à lui la ligation directe des brins d'ADN qu'il manque ou non des morceaux de séquence.

La Recombinaison Homologue (RH)

La RH est un processus basé sur un échange d'informations génétiques entre deux séquences d'ADN possédant une longue séquence d'homologie et dont l'une est porteuse de dommages (Figure 11) (Branzei & Foiani 2008). Pour ce faire, une fois le complexe MRN chargé au niveau de la cassure, son activité exonucléase va engendrer un long fragment simple brin. C'est ce dernier qui va servir pour recruter la machinerie de réparation. Tout d'abord, RPA se fixe sur l'ADN simple brin afin de faciliter la formation du filament Rad51 en position 3'. La chromatide sœur va servir, par homologie, de matrice et il y a formation d'une jonction de HOLLIDAY. Une des extrémités libre va s'immiscer au sein de l'hélice d'ADN intacte et ainsi permettre l'échange de brins. L'extrémité 3' libre va, quant à elle, s'hybrider au niveau de la matrice et l'ADN polymérase va synthétiser le nouveau brin. Une fois la polymérisation du nouveau brin finie, la jonction se referme et le nouveau brin est ligué à l'ADN ligase I (Hoeijmakers 2001a) (Valerie & Povirk 2003). Les protéines BRCA1 et 2 activées par ATM participent à la RH. En effet, ces protéines interagissent avec Rad51 et semble stimuler la RH de part l'aide au recrutement de Rad51 qu'apporte BRCA2. BRCA1 pourrait servir de fil conducteur à la RH (Valerie & Povirk 2003). La RH est un processus très conservateur et est qualifiée d' « error-free » car permettant une réparation sans aucune perte de l'information génétique.

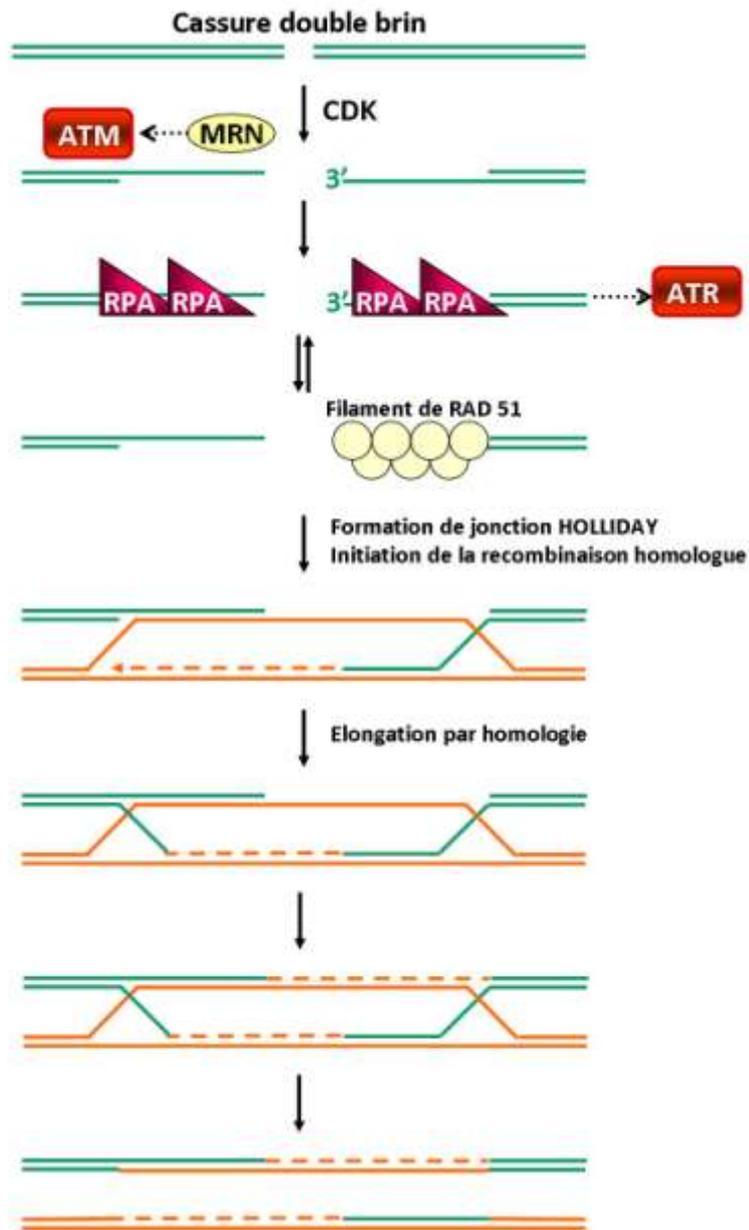


Figure 11 : Schéma de la recombinaison homologue.

D'après Branzei *et al.*, *Molecular Cell Biology*, 2008.

La Jonction d'Extrémités Non Homologue (NHEJ)

La seconde grande voie de réparation est la NHEJ. Cette dernière utilise plusieurs enzymes qui reconnaissent les extrémités de l'ADN et les maintiennent proches grâce à un complexe synaptique (Figure 12). Cette voie de réparation ne nécessite pas d'homologie de séquences ce qui lui permet d'être efficace tout au long du cycle cellulaire. Le point de

départ de la voie de réparation NHEJ est la fixation de l'hétérodimère Ku, composé des sous-unités Ku70 et Ku80, aux extrémités libres de l'ADN. Ku forme ensuite le complexe DNA-PK en recrutant la sous-unité catalytique DNA-PKcs (Uematsu et al. 2007). La sous-unité catalytique conduit tout d'abord l'alignement des extrémités libres et la formation de la synapse. Ensuite, DNA-PKcs s'autophosphoryle afin de permettre la réparation proprement dite par le recrutement de protéines de maturation telles que Artemis ou PNK (« Polynucleotide kinase »). Enfin, un second complexe, composé de la ligase IV et de XRCC4, est recruté par le complexe Ku/DNA-PK/ADN afin de permettre la ligature des deux brins d'ADN (Figure 12) (Costantini et al. 2007).

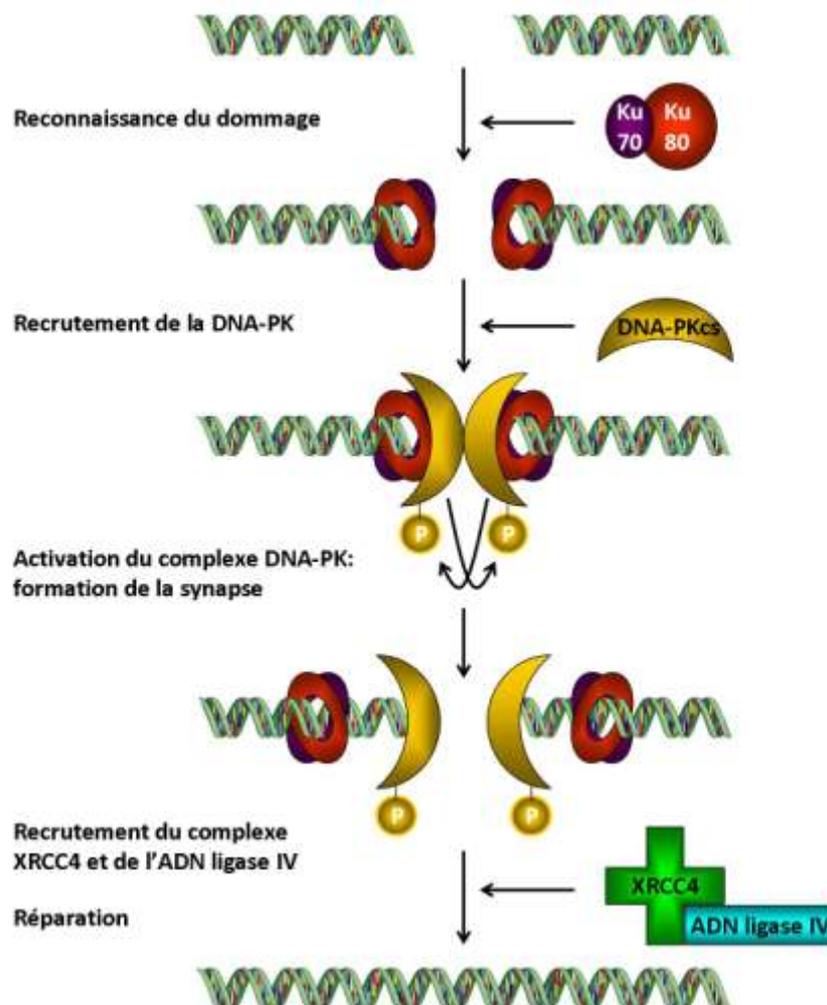


Figure 12 : Schéma de la voie NHEJ.

Les DSBs sont les lésions les plus cytotoxiques pour la cellule, cependant la présence de lésions sur un des brins de l'ADN peut avoir des conséquences aussi dangereuses que celle des DSBs. Les dommages touchant un seul brin d'ADN sont de plusieurs natures et peuvent être des modifications de bases (oxydation, méthylation) ou des ponts intra-brins par exemple. L'origine de ces dommages peut être soit endogène, comme un défaut d'appariement de base, mais également exogène, comme les ultraviolets, le cisplatine ou la fumée de cigarettes. Comme pour les DSBs, des systèmes de réparation spécifiques ont été mis en place : la réparation par excision de nucléotides (NER, « Nucleotide Excision Repair »), la réparation par excision de base (BER, « Base Excision Repair ») et la réparation des mésappariements (MMR, « Mismatch Repair »).

La réparation par excision de nucléotide

Le NER est le système le plus polyvalent en terme de diversité de lésions reconnues. En effet, il prendra en charge aussi bien les lésions induites par les UV que les lésions induites par de nombreux agents cancérigènes tels que les dérivés du cisplatine. Cependant, dans les cellules humaines, la fonction première du NER est sans doute d'éliminer les dommages induits par les UV-B (Friedberg 2001).

Il existe deux voies de NER : la réparation globale (GGR, « Global Genome Repair ») qui, comme son nom l'indique, opère sur la totalité de du génome, et la séparation couplée à la transcription (TCR, « Transcription-Coupled Repair ») qui est spécifique des dommages présents sur les brins transcrits. Seule l'étape de reconnaissance du dommage diffère entre ces deux voies.

- La voie de réparation globale

Le mécanisme de réparation de NER peut être divisé en quatre étapes : la reconnaissance du dommage, l'ouverture de l'ADN de part et d'autre de la lésion, l'incision du brin d'ADN contenant la lésion et, finalement, la re-synthèse d'ADN et la ligation afin de remplacer l'oligonucléotide excisé. Bien que les bases structurales qui permettent la

reconnaissance d'une lésion par le système NER ne soient pas complètement élucidées, on admet généralement que, pour être bien reconnue, une lésion doit « déformer » suffisamment la structure régulière de la double hélice. Bien que plusieurs protéines impliquées dans le NER reconnaissent de façon préférentielle l'ADN endommagé à de l'ADN non endommagé, il a été clairement établi que le complexe XPC/hHR23B/cetrin2 est le facteur essentiel dans la reconnaissance initiale de la distorsion. XPC agit comme le senseur de la distorsion du brin d'ADN et va permettre l'initiation du processus. Puis le complexe TFIIH est recruté rapidement ainsi que la protéine RPA qui supporte l'activité de TFIIH (Leibeling et al. 2006). Une structure ouverte et déroulée se forme alors autour de la lésion. La formation de cet intermédiaire « ouvert » nécessite essentiellement l'action de deux protéines du complexe TFIIH, XPB et XPD, toutes deux pourvues d'une activité hélicase de polarité opposée. La reconnaissance du brin endommagé entraîne l'arrêt mitotique des activités de translocation de ces hélicases. Un oligonucléotide, de taille comprise entre 24 et 32 nucléotides, est alors libéré et la brèche est remplie par la machinerie de réplication et scellée par l'ADN ligase I.

- La voie de réparation couplée à la transcription

Les lésions présentes dans le brin transcrit des gènes actifs sont corrigées cinq à dix fois plus rapidement que celles du brin non transcrit. Dans la voie de réparation couplée à la transcription, hormis le complexe XPC/hHR23B, spécifiquement impliqué dans l'étape de reconnaissance de la lésion, tous les autres facteurs utilisés pour la réparation NER globale du génome sont également utilisés dans la voie TCR. Le signal de recrutement de la machinerie de réparation dans la voie TCR est directement lié à l'arrêt de la progression de l'ARN pol II au niveau de la lésion sur le brin transcrit. Ce type de recrutement alternatif implique les protéines CSA et CSB qui servent à coupler l'arrêt de la transcription à la réparation (Fousteri et al. 2006) (Venema et al. 1990). La suite du mécanisme de réparation est commun avec la voie de réparation GGR du NER.

La réparation par excision de base

Le BER est le principal gardien de l'intégrité du génome contre les dommages dus au métabolisme cellulaire, c'est-à-dire les dommages créés par les espèces réactives de l'oxygène, la méthylation, la déamination et l'hydroxylation au niveau des bases (Sung & Dimple 2006). Lors d'une modification de base, c'est une ADN glycosylase spécifique qui va permettre l'élimination de la base endommagée en hydrolysant la liaison entre la base et le résidu désoxyribose formant ainsi un site abasique. Ce dernier est reconnu par une endonucléase apurinique, APE1, qui hydrolyse le lien 5' phosphodiester pour générer une cassure simple brin. Puis, deux voies de synthèse existent dans le mécanisme du BER (Hoeijmakers 2001):

- « short patch BER » ou BER de type à « brèche courte » : c'est la voie majoritaire. Elle consiste simplement à remplacer le nucléotide manquant *via* l'ADN polymérase β en association avec XRCC1. Puis le recrutement de la ligase I permet de refermer le brin.

- « Long patch BER » ou BER de type « brèche longue » : c'est la voie annexe. Cette voie fait appel à l'ADN polymérase ϵ ou δ et à PCNA qui vont permettre la resynthèse du fragment (de 2 à 10 nucléotides) portant le dommage. Puis FEN1, une endonucléase, permet l'incision du brin endommagé et l'ADN ligase I permet la ligature du nouveau brin.

Parmi les lésions modifiant seulement un seul des deux brins, il y a la CSB. Pour réparer ce type de dommage, il existe une voie appelée le SSBR (Single Strand Break Repair) qui peut être considérée comme une variante du BER. L'étape de reconnaissance du dommage est différente du BER car elle utilise les facteurs XRCC1 et PARP. Ces deux facteurs permettent la reconnaissance du dommage et activent la voie de réparation. Ils recrutent aussi la polynucléotide kinase (PNK) qui va phosphoryler l'extrémité 5' et déphosphoryler l'extrémité 3', qui s'avère être une étape nécessaire pour la suite du mécanisme (Hoeijmakers 2001), puis la voie de synthèse est identique à celle du BER.

La réparation des mésappariements

Le système de réparation des mésappariements élimine les bases mal appariées qui apparaissent avec une fréquence faible (10^{-7}) au cours de la réplication normale du génome. Ce système corrige également les boucles d'insertion ou de délétion (IDL, « Insertion/Deletion Loops ») qui résultent du glissement de la machinerie de réplication au niveau des séquences répétées (Jiricny & Nyström-Lahti 2000).

Le mécanisme de MMR peut être subdivisé en quatre étapes : la reconnaissance du mésappariements, le recrutement de facteurs accessoires, la recherche d'un signal permettant de différencier les deux brins (reconnaissance du brin néosynthétisé contenant l'erreur par rapport à la matrice contenant l'information originale) suivie par la dégradation du brin contenant l'erreur et resynthèse (Kolodner & Marsischky 1999). L'étape de reconnaissance du mésappariements ou de l'IDL est accomplie par hMutS, un hétérodimère de protéines homologues à la protéine MutS d'*E. coli*. Msh2 et Msh6 forment l'hétérodimère MutS α qui reconnaît un mésappariement et les IDL d'une base (Pierce et al. 2001). Par ailleurs, l'hétérodimère MutS β , formé par Msh2 et Msh3 ne reconnaît spécifiquement que les IDL de taille supérieure à 1. Un changement de conformation convertit alors l'hétérodimère en un anneau glissant qui va quitter le site de mésappariement et se déplacer le long de l'ADN. Les étapes suivantes comprennent la dégradation du brin néosynthétisé qui contient le mésappariement par des exonucléases, puis la synthèse d'un nouveau médiée par la machinerie réplivative.

III.2. Le point de contrôle de la transition G1/S

Le point de contrôle de la transition G1/S, activé en cas d'atteinte de l'intégrité de l'ADN, peut se décomposer en 2 parties, une rapide qui correspond à une cascade de kinases et une seconde plus lente qui fait intervenir l'activation de la protéine p53 et des gènes qu'elle régule.

Le premier mécanisme qui intervient pour réguler la phase G1 du cycle cellulaire débute avec l'activation de la protéine ATM. En effet, ATM va activer CHK2 en le phosphorylant sur la thréonine 68. P-CHK2 va, à son tour, permettre la phosphorylation de CDC25A sur la sérine 123. La phosphorylation de ce membre de la famille CDC25 va induire son ubiquitinylation par l'ubiquitine ligase $ScF^{\beta-TRCP}$ et sa rapide dégradation par le protéasome (Guardavaccaro & Pagano 2006). En l'absence de la protéine CDC25A, CDK2 ne pourra pas être phosphorylée et ne pourra donc pas se complexer avec la Cycline E ce qui va provoquer l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Lim et al. 2009) (Figure 13).

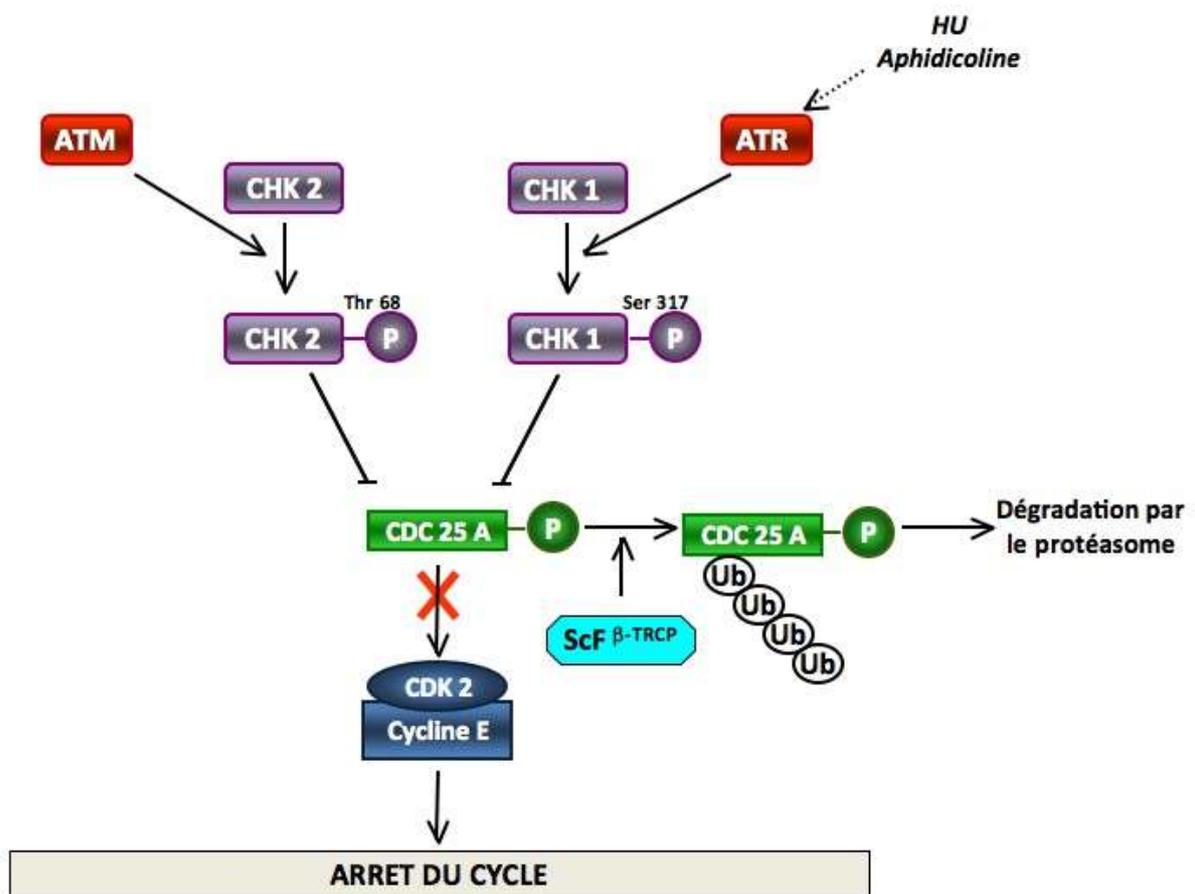


Figure 13 : Schéma de la partie rapide du point de contrôle G1/S.

Le second mécanisme, plus lent car faisant intervenir des gènes régulés par p53, débute également avec l'activation de la protéine ATM. Cette voie indépendante de CDC25A fait intervenir l'activation de p53. L'activation d'ATM induit la phosphorylation de p53 soit directement sur la sérine 15, soit indirectement par CHK2 sur la sérine 20. Ces

phosphorylations de p53 mènent à l'activation et l'accumulation de cette dernière par réduction de sa fixation sur Mdm2, une E3 ligase (Hdm2 chez l'homme). Lorsque p53 est fixé à Mdm2, elle est ubiquitinylée et dégradée par le protéasome. L'inhibition de cette interaction participe grandement à l'accumulation de p53. De plus, il est à noter que la protéine p14^{ARF} peut également s'associer à Mdm2 de façon à provoquer la dégradation de Mdm2 par le protéasome d'une façon indépendante de la surveillance de l'intégrité génomique (Daujat et al. 2001). Tous ces mécanismes induisent l'accumulation de p53 pendant la phase G1 du cycle cellulaire. Cette accumulation de p53, qui a en conditions normales une demi-vie courte, permet l'induction d'une part de p21^{Waf1/Cip1} (inhibiteur du complexe CDK2/Cycline E) qui va s'accompagner d'un arrêt du cycle cellulaire et d'autre part de protéines pro-apoptotiques telles que Bax, DR5, Fas, Noxa, PUMA (Figure 14).

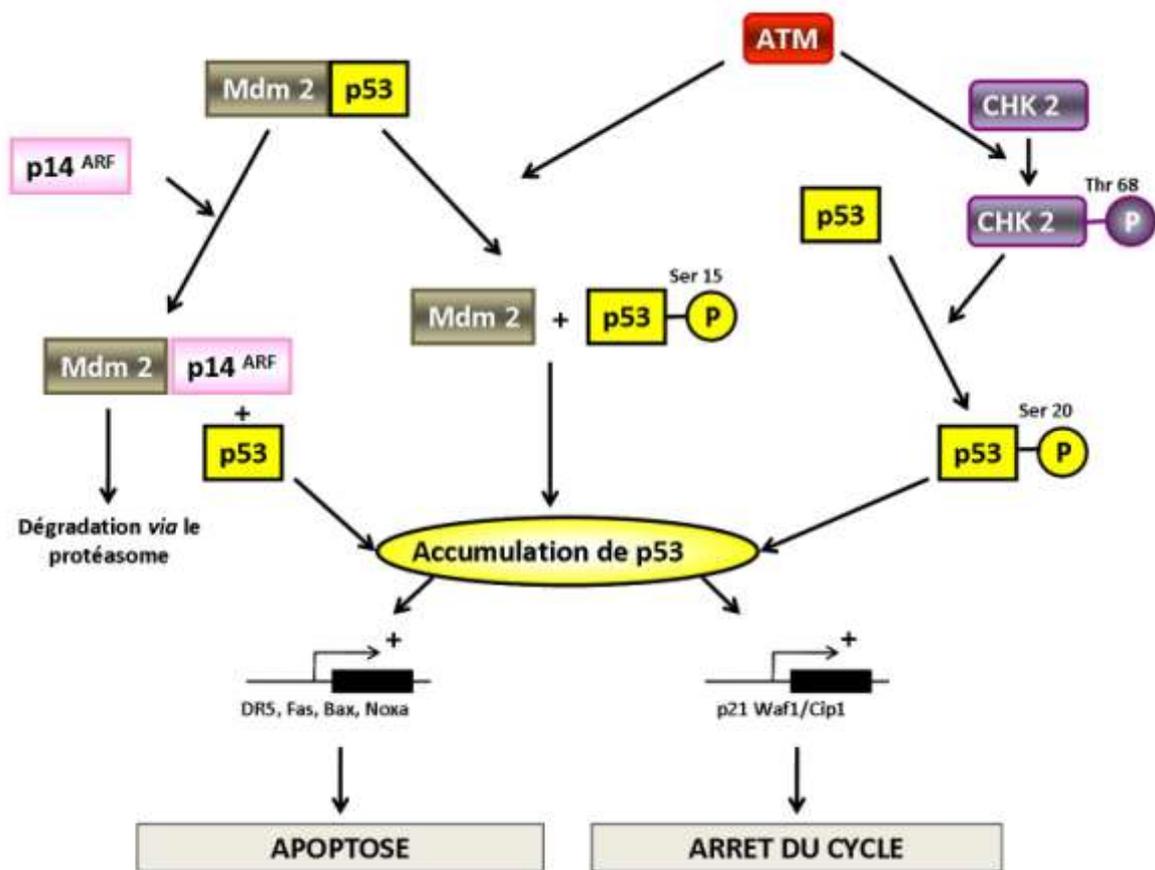


Figure 14 : Schéma de la partie lente du point de contrôle G1/S.

III.3. Le point de contrôle de la transition G2/M

Le point de contrôle de la transition G2/M est très similaire à celui de la transition G1/S et est également déclenché par une atteinte de l'intégrité de l'ADN. En effet, il est décomposable lui aussi en deux parties, une rapide correspondant à une cascade de phosphorylation et une lente impliquant un contrôle transcriptionnel.

La présence de radiations ionisantes, de radiations dans l'ultraviolet ou de stress oxydatif vont activer les protéines ATM, ATR et Plk3 respectivement. ATM et ATR vont à leur tour activer leur kinase effectrice CHK2 et CHK1 en les phosphorylant respectivement sur les résidus thréonine 68 et sérine 345. CHK1, CHK2 et Plk3 vont alors phosphoryler CDC25C sur la sérine 216 (Xie et al. 2001). Cette phosphorylation va avoir pour effet de créer un site de fixation pour la protéine 14-3-3 σ et ainsi permettre la séquestration de CDC25C dans le cytoplasme. Une fois CDC25C bloqué dans le cytoplasme, il lui sera impossible d'interagir avec son substrat, CDK1, nucléaire et de le déphosphoryler afin de permettre l'entrée en mitose. Il est à noter qu'une étude de « Knock Out » a montré que CHK1 jouerait plus un rôle d'inducteur de l'arrêt en G2 et que CHK2, quant à lui, interviendrait plus dans le maintien de ce blocage (Bartek & Lukas 2003) (Figure 15).

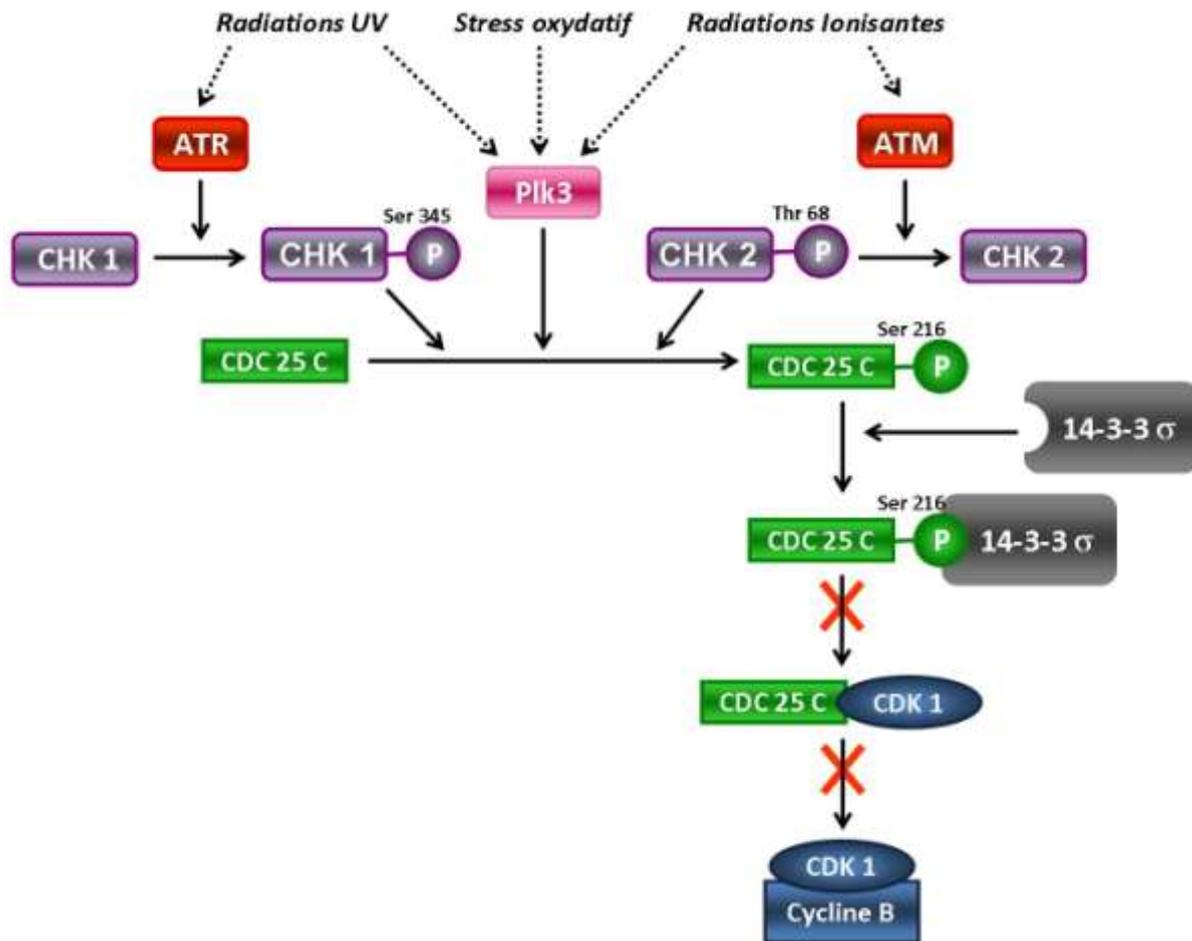


Figure 15 : Schéma de la partie rapide du point de contrôle G2/M.

Tout comme dans le point de contrôle de la transition G1/S, la partie plus lente de ce point de contrôle fait intervenir p53. En effet, p53 va être phosphorylée, s'accumuler et permettre l'induction des protéines p21^{Waf1/Cip1}, Gadd45 et 14-3-3σ. L'induction de Gadd45 va inhiber l'activation de CDK1 en bloquant la phosphorylation de sa thréonine 161. La protéine 14-3-3σ provoque, quant à elle, la séquestration de CDK1, de la Cycline B et de CDC25C au niveau du cytoplasme. p53 peut également inhiber l'expression de CDK1 et de la Cycline B directement car ces dernières possèdent des sites de fixation pour p53 au niveau de leur région promotrice (Lukas et al. 2004) (Figure 16).

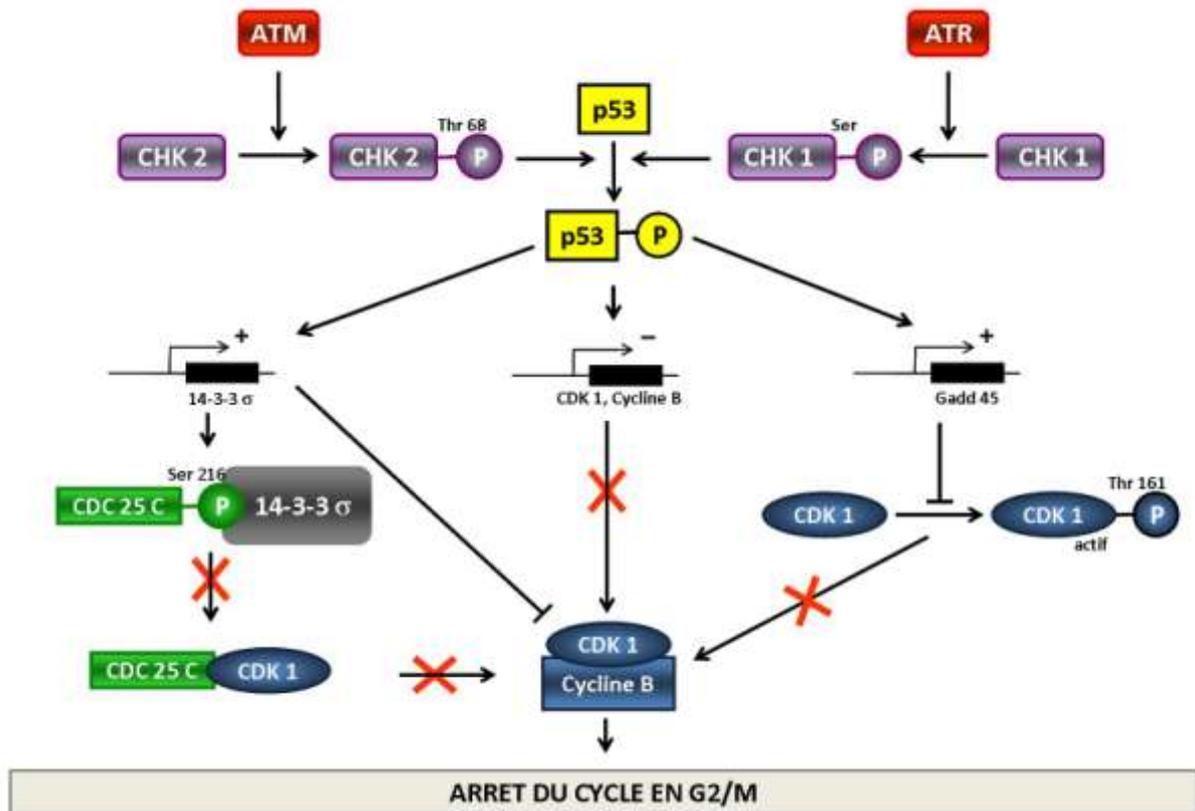


Figure 16 : Schéma de la partie lente du point de contrôle G2/M.

III.4. Le point de contrôle de la phase S

Le point de contrôle de la phase S s'assure que le déclenchement de la mitose ne se fasse qu'une fois la réplication de l'ADN finie afin d'éviter l'obtention de cellules aneuploïdes, qui sont non viables (Smith et al. 2002). Pour ce faire, ce point de contrôle s'assure de la régulation du déclenchement des différentes origines de réplication ainsi que la progression de la fourche de réplication.

Il a été montré que la cellule a besoin d'initier la réplication de son ADN afin de pouvoir obtenir, grâce à des senseurs localisés au niveau de la fourche de réplication, un signal activant le point de contrôle de la phase S (Michael et al. 2000). Il semblerait que la kinase ATR seule soit requise pour l'activation de ce point de contrôle. En effet, dans des œufs de xénope, lors du blocage de la réplication par un traitement à l'Aphidicoline, une déplétion en ATR induit une activation prématurée du complexe CDK2/Cycline B et l'entrée

en mitose (Hekmat-Nejad et al. 2000). En outre, l'immunodéplétion de CHK1, dans le même modèle d'œufs de xénope, induit une incapacité à retarder la progression du cycle cellulaire en réponse à un blocage de la réplication (évoqué plus bas). Les mêmes effets sont retrouvés lors de l'immunodéplétion en ATR car l'activité de CHK1 dépend de sa phosphorylation par ATR lors de la présence d'ADN non répliqué (Guo et al. 2000).

Deux voies de signalisation se rejoignent pour l'inhibition du déclenchement de nouvelles origines de réplifications. En effet, lors d'une réplication non perturbée, le recrutement d'ATR sur ATRIP et son activation mène à l'activation de CHK1 par phosphorylation des sérines 317 et 345 (Zhao & Piwnica-Worms 2001). CHK1 ainsi phosphorylé se décroche de la chromatine et se diffuse rapidement dans l'ensemble du noyau. CHK1 activé phosphoryle à son tour les CDC A et B ce qui bloque la formation du complexe CDK2/Cycline E-A bloquant ainsi le déclenchement de nouvelles origines de réplication (Figure 17).

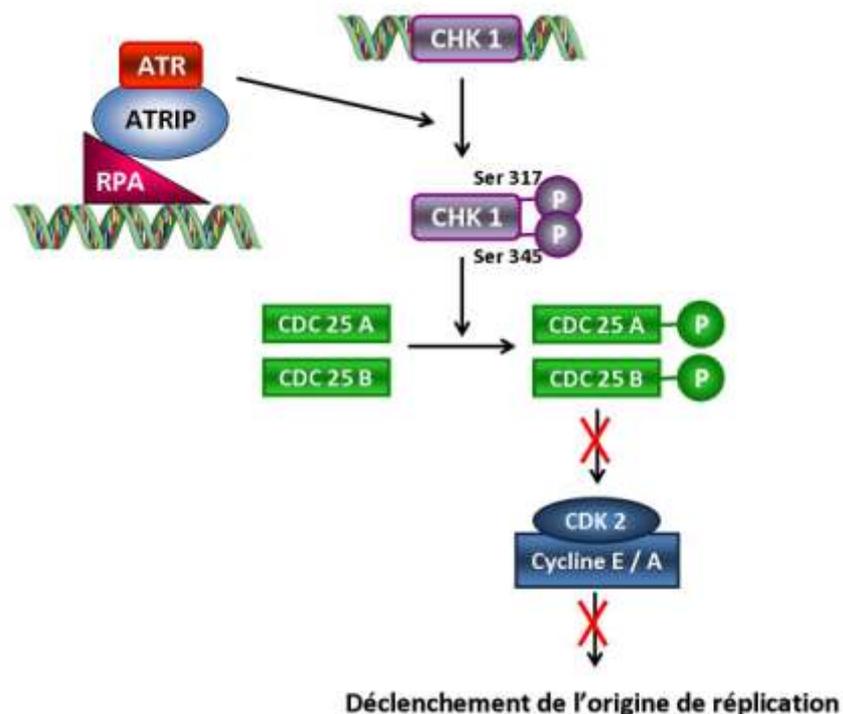


Figure 17 : Inhibition du déclenchement de nouvelles origines de réplication.

En présence de radiations ionisantes, une seconde voie de signalisation se déclenche à partir d'ATM et se conjugue à celle issue d'ATR pour inhiber le déclenchement de nouvelles origines de réplication. ATM active CHK2, comme nous l'avons vu précédemment, et CHK2 actif inhibe l'accrochage de CDC45 sur les protéines MCM au niveau des origines de réplication. Pour les origines où la protéine CDC45 est déjà fixée sur MCM, ATM phosphoryle le complexe MRN qui se fixe alors sur la protéine RPA. Ce complexe MRM phosphorylé/RPA s'ancre au niveau des protéines CDC45 et bloque la réplication de ces origines de réplication (Figure 18).

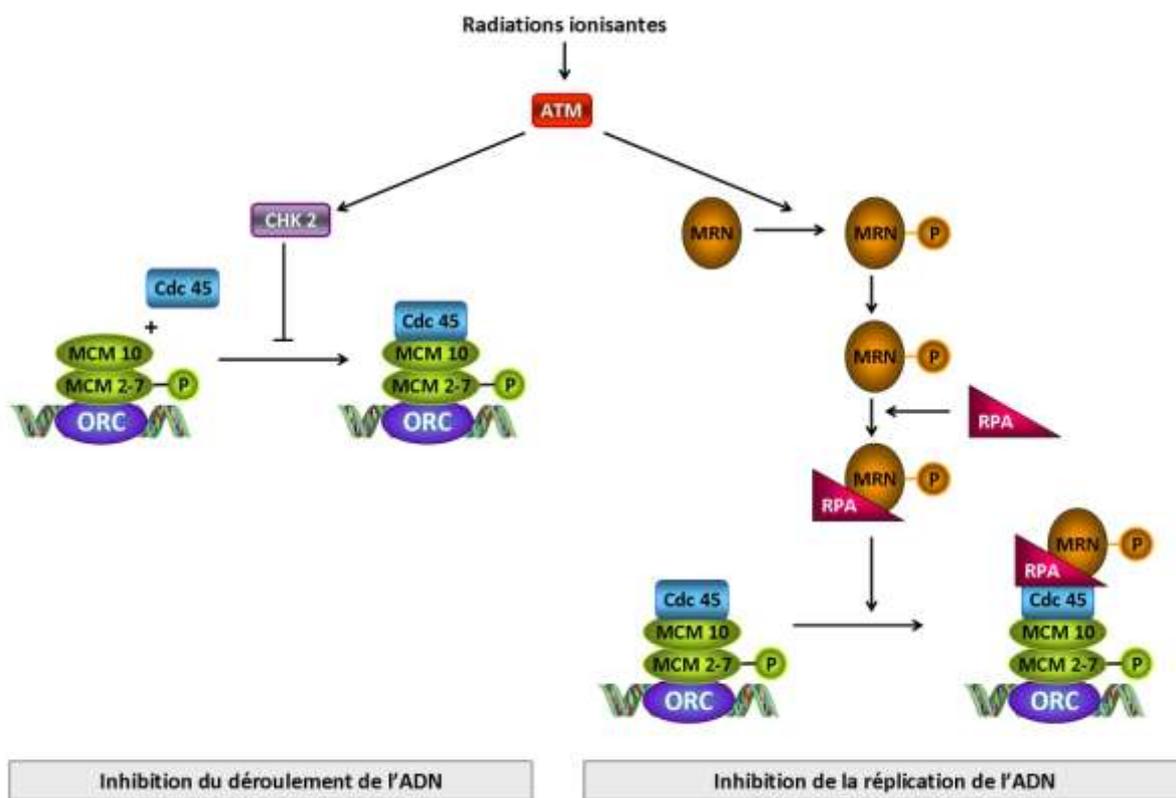


Figure 18 : Schéma de l'inhibition du déclenchement d'origines de réplication en présence de radiations ionisantes.

III.5. Le point de contrôle dépendant des Topoisomérases

Le point de contrôle des Topoisomérases intervient lors de la phase S. Les ADN Topoisomérases sont des enzymes essentielles au contrôle de l'expression et de la structure

du génome, régulant les contraintes mécaniques et topologiques de l'ADN (régulation du sous- et sur-enroulement, suppression des nœuds et des caténations) afin de permettre la condensation et la ségrégation des chromosomes chez les eucaryotes. Les Topoisomérases maintiennent l'intégrité génomique en créant des cassures transitoires du squelette sucre phosphate par l'intermédiaire de la formation de complexes dits « clivables » et en les refermant. Il existe deux types de Topoisomérases qui se différencient par leur activité catalytique. En effet, les Topoisomérases de type I créent des coupures simples brins de l'ADN et modifient le nombre d'enlacement d'un pas de un. Les Topoisomérases de type II, quant à elles, provoquent des cassures doubles brins pouvant ainsi modifier le nombre d'enlacement d'un pas de deux (Wang 2002). Une stabilisation du complexe clivable par (i) de l'indolocarbazole ou de la camptothécine pour la Topoisomérase I (Pommier et al. 2003) ou par (ii) de l'étoposide, de la mitoxantrone ou de la doxorubicine pour la Topoisomérase II (McClendon & Osheroff 2007) induit une augmentation de la probabilité de rencontre avec la fourche de réplication transformant ainsi la cassure transitoire en cassure double-brin (« double-strand break » ou DSB) permanente (Figure 19).

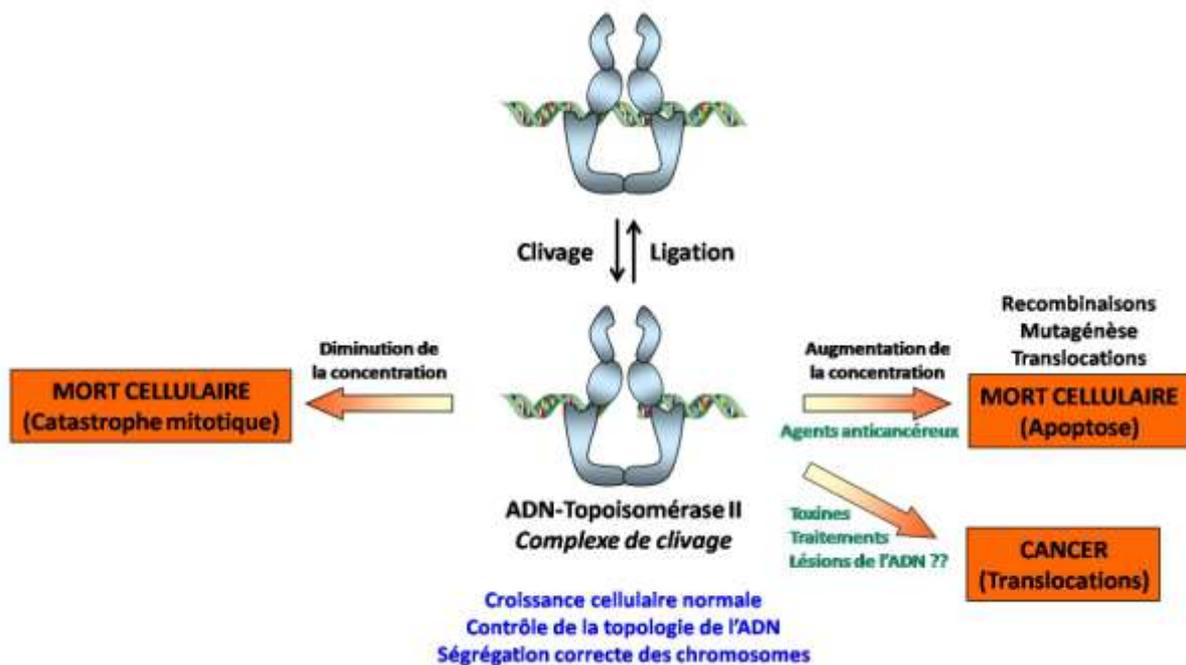


Figure 19 : Schéma du fonctionnement de la Topoisomérase II.

D'après McClendon, *Mutat. Res.*, 2007.

III.6. Le point de contrôle du fuseau mitotique

Chez les eucaryotes, le point de contrôle du fuseau mitotique assure la fidélité de la ségrégation des chromosomes pendant la mitose. En 1991, deux criblages indépendants identifient plusieurs gènes dont la mutation permet à *S. cerevisiae* de contourner l'arrêt en mitose en présence de poisons du fuseau. Les gènes identifiés incluent les gènes *MAD* (« Mitotic arrest deficient ») : *MAD1*, *MAD2* et *MAD3* (qui correspond au gène *Bub1* chez l'humain) et le gène *bub1* (« Budding uninhibited by benzimidazole ») (Hoyt et al. 1991) (Li & Murray 1991). Ces gènes sont conservés chez tous les eucaryotes et sont tous impliqués dans une voie signalisation active en prométaphase qui empêche la séparation des chromatides sœurs. Cette voie constitue le point de contrôle du fuseau mitotique et est noté SAC (« Spindle-assembly checkpoint »).

Les acteurs du SAC

Le SAC cible CDC20, un cofacteur de l'ubiquitine ligase APC/C. Le SAC régule négativement et de façon spécifique la capacité de CDC20 à activer l'ubiquitylation induite par APC/C de la Sécurine et de la Cycline B et donc empêche leur dégradation par le protéasome 26S. La Sécurine est un inhibiteur de la protéase Séparase. La Séparase est nécessaire au clivage des complexes de cohésine, qui lient les deux chromatides sœurs, pendant l'exécution de l'anaphase (Peters 2006). En réprimant l'activité de CDC20, le SAC prolonge la prométaphase tant que tous les chromosomes n'ont pas une bonne configuration bipolaire, ou amphitélisque, au niveau de la plaque métaphasique. Le blocage de l'activité de CDC20 qu'exerce le SAC est en grande partie médié par le complexe MCC (« Mitotic checkpoint complex ») composé de trois protéines MAD2, BUB1 et BUB3. En effet, le complexe MCC se lie à l'APC/C et le rend incapable d'exercer son activité d'ubiquitine ligase sur la Sécurine et la Cycline B (Sudakin et al. 2001). Au-delà du complexe MCC, qui est la partie effectrice du SAC, quatre protéines composent le corps de ce dernier. Ces protéines sont MAD1, BUB1, MPS1 et Aurora-B et servent à amplifier le signal du SAC et à rythmer la formation du complexe MCC (Morrow et al. 2005).

L'activation/inactivation du SAC

Au cours de la prométaphase, CDC20 ainsi que toutes les protéines du SAC sont concentrées au niveau des kinétochores. Le kinétochore correspond à un large assemblage protéique localisé au niveau des centromères (Figure 20) (Musacchio & Salmon 2007). Le kinétochore est formé des plusieurs parties. La partie la plus proximale du centromère est la plaque interne où se rassemble des variants d'histones, notamment CENP-A. La seconde est la plaque externe, est constituée des protéines Spc105, MIS12, HEC1 et MCM21, et va former le point d'ancrage des microtubules du kinétochores (Cheeseman et al. 2006). Enfin le SAC et les protéines motrices, la Dynéine entre autre, vont se fixer sur la région distale du kinétochore nommée couronne fibreuse (Figure 20).

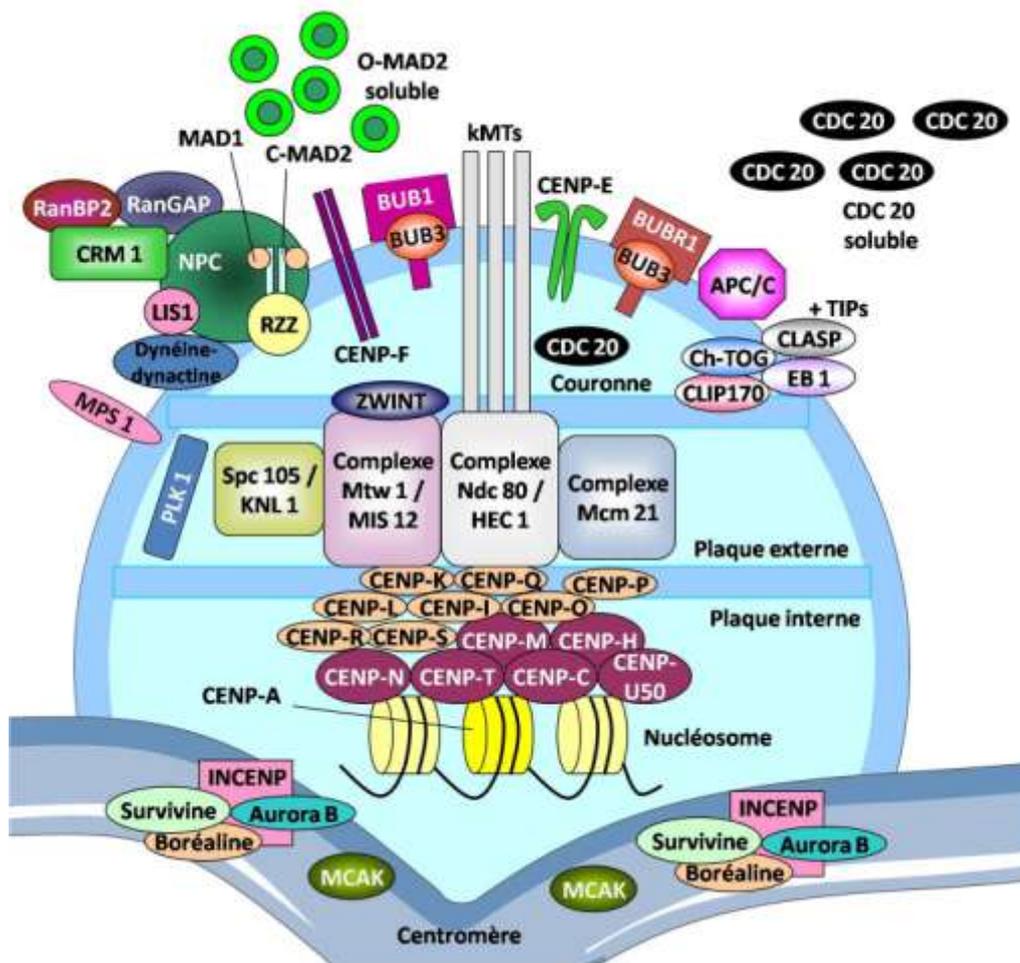


Figure 20 : Représentation de l'organisation d'un kinétochore.

D'après Musacchio et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007.

Cette localisation, des protéines du SAC, au niveau des kinétochores est dynamique et assure la catalyse de la formation du complexe MCC. Plusieurs études ont montré que des mutations dans l'ADN centromérique ou un blocage fonctionnel du kinétochore activaient le SAC chez *S. cerevisiae*, indiquant que le SAC ne surveille qu'un aspect du fuseau, à savoir l'attachement au kinétochore de l'extrémité positive des microtubules. De plus, les protéines du SAC se concentrent au niveau des kinétochores non attachés et sont absentes de ceux liés aux microtubules et des chromosomes amphétéliques (Taylor & McKeon 1997).

Chaque kinétochore non correctement attaché au fuseau envoie un signal inhibiteur bloquant l'activation d'APC-CDC20. Ce signal généré par le kinétochore non attaché se fait *via* la protéine Mad2 (« Mitotic arrest deficient 2 ») : un seul kinétochore mal attaché a pour conséquence la liaison de Mad2 sur le complexe APC-CDC20, et ainsi son inhibition. Une fois que tous les kinétochores sont attachés, Mad2 n'est plus active et APC-CDC20 devient actif, ce qui permet la destruction de la Sécurine et la séparation des chromatides pour leur ascension polaire opposée.

En plus de l'attachement des microtubules aux kinétochores, la tension exercée pour la séparation des chromatides sœurs et l'orientation de cette tension sont primordiales pour une inactivation du SAC. En effet, la tension appliquée au niveau des kinétochores doit dépasser un certain seuil en dessous duquel les microtubules se désolidarisent des kinétochores. Ce seuil, au niveau de la tension, ne peut être atteint que si les microtubules se fixant sur deux kinétochores sœurs proviennent des deux pôles, attachement amphitélique (Figure 21) ce qui est surveillé par les protéines Aurora B et Survivine (Pinsky & Biggins 2005). Lorsque le SAC est actif, la protéine Mad2 séquestre CDC20 mais, lorsque le SAC n'est pas activé ou défaillant, CDC 20 est libre et peut venir inhiber APC/C déclenchant ainsi la ségrégation des chromosomes (Brito & Rieder 2006).

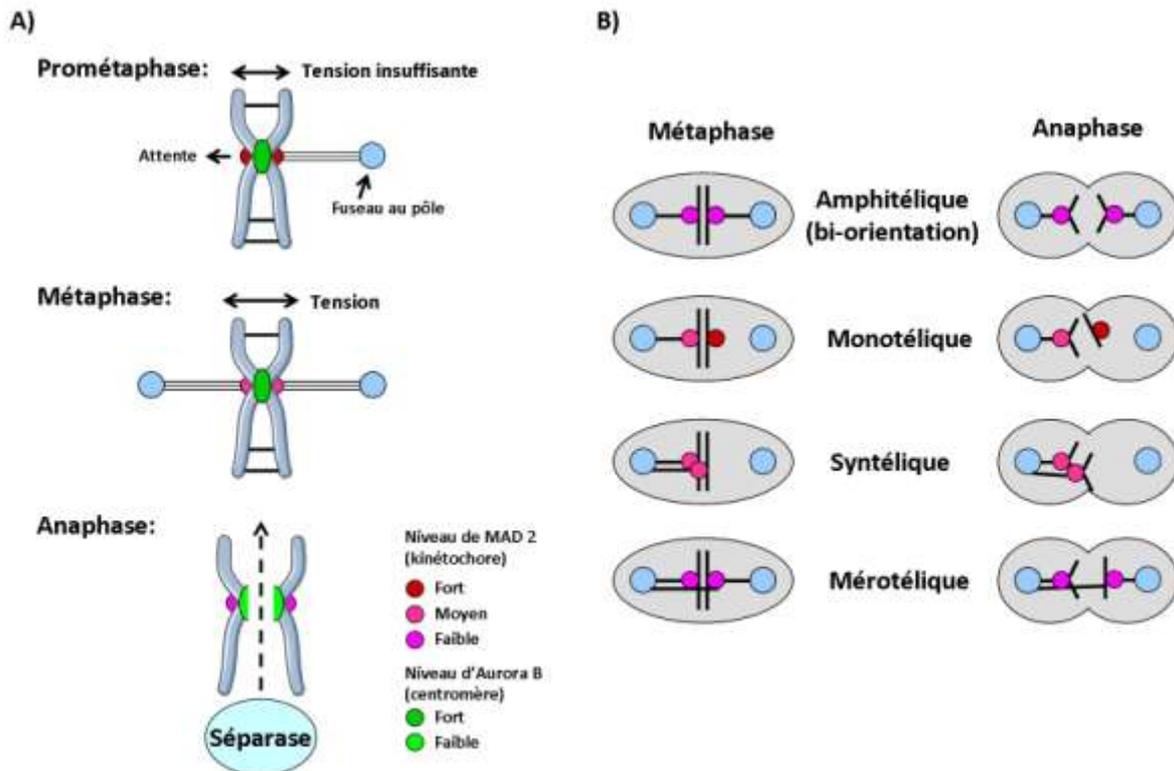


Figure 21: Régulation de la séparation des chromatides sœurs.

D'après Musacchio *et al.*, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007.

La régulation du SAC par le complexe CPC

La protéine Aurora B participe donc à la régulation du SAC. Cette kinase fait partie du complexe CPC (« Chromosomal passenger complex ») avec trois autres protéines non enzymatiques : INCENP (« Inner centromere protein »), Survivine et Boréoline. Ces trois protéines contrôlent la localisation, l'activité enzymatique et la stabilité d'Aurora-B (Lens *et al.* 2006). La diminution d'expression, par ARN interférence de l'un des membres de ce complexe provoque la délocalisation, l'arrêt de la progression en mitose et peut provoquer la déstabilisation d'une ou plusieurs des autres sous-unités (Honda *et al.* 2003). La protéine INCENP semble servir d'échafaudage pour la construction de ce complexe car elle interagit avec les trois autres protéines. De plus, l'extrémité C-terminale de la protéine INCENP est impliquée dans la fixation et la régulation d'Aurora-B. Aurora-B se fixe au niveau des résidus 822-900 d'INCENP, partie constituant la « IN box » d'INCENP. Cette fixation active l'activité

sérine/thréonine kinase d'Aurora-B dans tous les organismes, de la levure aux mammifères (Honda et al. 2003) par une boucle d'amplification après qu'Aurora-B ait phosphorylé INCENP.

Le complexe CPC régule de nombreux aspects de la mitose. Les fonctions de ce complexe s'étendent de la régulation de la structure des chromosomes et des fuseaux, la régulation des erreurs d'interaction kinétochores–microtubules jusqu'à l'accomplissement de la cytotélerèse. Cette multiple régulation exercée par le CPC est reflétée par sa localisation tout au long de la mitose : sur la chromatine en prophase, au niveau des centromères durant la métaphase puis sur le cortex et les fuseaux équatoriaux en anaphase et enfin au niveau du sillon de clivage en télophase (Figure 22) (Ruchaud et al. 2007a).

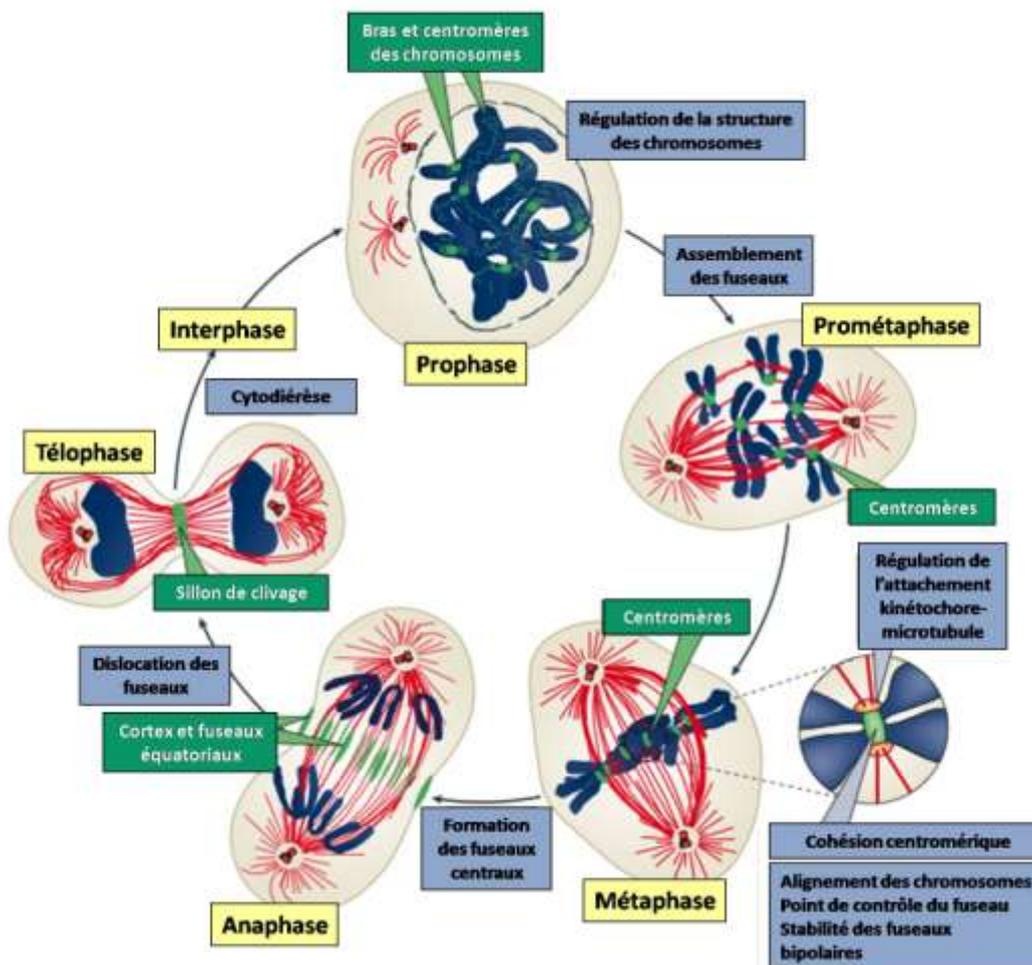


Figure 22 : Localisations et fonctions du complexe CPC au cours de la mitose.

D'après Ruchaud *et al.*, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007.

Le complexe CPC est tout d'abord, durant la prophase, sur le bras des chromosomes puis migre au niveau des centromères lors de la prométaphase et de la métaphase. Un des rôle de la Survivine au sein du CPC serait d'adresser la protéine INCENP au niveau des centrosomes. En effet, dans des cellules déplétées en Survivine, la protéine INCENP ne peut cibler les centromères (Vader et al. 2006) ce qui est levé avec une protéine de fusion entre la Survivine et les résidus 478-918 d'INCENP. En ce qui concerne la Boréoline, son rôle serait de stabiliser l'interaction Survivine-INCENP car la Survivine ne peut se fixer à INCENP dans des cellules déplétées en Boréoline.

Le complexe CPC est essentiel pour l'assemblage et la stabilité des fuseaux mitotiques bipolaires. En effet, dans des cellules déplétées en Boréoline, il y a formation des fuseaux bipolaires mais ces derniers ne se démêlent pas lors de la métaphase ce qui induit la formation de pôles ectopiques qui vont faire échouer la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse. De plus, la microtubule dépolymérase MCAK (« Mitotic centromere-associated kinesin ») est également impliquée dans la formation des fuseaux bipolaires. Le recrutement du complexe CPC sur la chromatine permet l'inhibition de la protéine MCAK (Cheeseman et al. 2006). Ceci a été démontré par la stabilisation des microtubules lors de l'extinction de l'expression de MCAK dans des cellules préalablement déplétées en CPC.

Le complexe CPC est un élément clé de la détection de mauvais attachements entre les microtubules et les centrosomes notamment lors d'un défaut de tension. Aurora B est requise pour permettre la déstabilisation des microtubules depuis les kinétochores dans ce cas par phosphorylation de l'extrémité N-terminale de la protéine HEC1 (« Highly expressed in cancer-1 »). La protéine HEC1, Ndc80 chez la levure, est un membre du complexe KMN, composé en plus de la protéine KNL-1 (« Kinetochore nuL – 1 ») et du complexe Mis12, qui est essentiel pour la fixation du microtubule au kinétochore (Cheeseman et al. 2006). Cependant le complexe CPC est requis pour un arrêt temporaire du cycle en cas de perte de tension intra-kinétochores (en présence de taxol par exemple) et non pas lors en réponse à des agents qui désassemblent les microtubules (cas du nocodazole) (Pinsky & Biggins 2005). Aurora-B coopère avec la kinase BUB1, grâce à INCENP et Survivine, de façon à maintenir le

point de contrôle du fuseau actif par le déclenchement de l'association de BUBR1 avec le complexe APC/C (Ana Carvalho et al. 2003) (Morrow et al. 2005).

Enfin, le complexe CPC est indispensable au bon déroulement de la cytokinèse. INCENP se concentre au niveau du futur sillon de clivage avant même la Myosine II. Bien que la localisation normale du CPC ne soit pas requise pour l'initiation de la formation du sillon, des études ont montré son rôle primordial dans l'achèvement de la cytokinèse. Le transfert d'INCENP au niveau du fuseau central requiert des membres de la superfamille des kinésines. MKLP2 (« Mitotic kinesin-like protein-2 ») peut se fixer à la fois sur Aurora-B et sur CDC14, une phosphatase activée par la Séparase, est nécessaire à la localisation du CPC au niveau de la zone médiane du fuseau lors de l'anaphase. Aurora-B phosphoryle également la protéine Vimentine pour déclencher la formation du sillon de clivage. Aurora-B phosphoryle également MKLP1 qui va aller former un complexe avec la protéine MgcRacGAP (« Rac GTPase activating Protein -1 ») et permettre ainsi à Aurora B de pouvoir phosphoryler à son tour MgcRacGAP, condition requise pour la finalisation de la cytokinèse (Ruchaud et al. 2007b).

IV. Dérégulation du cycle cellulaire dans les cancers :

Un des mécanismes fondamentaux de la carcinogénèse est la prolifération incontrôlée des cellules tumorales. Cette dernière provient, notamment, de deux phénomènes liés au cycle cellulaire, une autosuffisance en facteurs de croissance et une insensibilité aux signaux anti-mitotiques (cyclines inactivées, Rb non phosphorylable ou surexprimé par exemple) provoquant une avancée dans le cycle. En effet, contrairement aux cellules normales les cellules tumorales acquièrent la capacité de produire leurs propres signaux de croissance du fait d'un mimétisme entre les oncogènes activés et ces signaux (Hanahan & Weinberg 2000). C'est notamment le cas du TGF α (« Tumor growth factor α ») dans les sarcomes où une boucle autocrine est mise en place par synthèse du facteur de croissance auquel ces mêmes cellules répondent. Cette sensibilité accrue aux facteurs de croissance peut également résulter d'un accroissement du nombre de récepteurs pour ces

facteurs. Par exemple, dans les cancers du sein, une sous-classe tumorale surexprime le récepteur HER2 ce qui conduit à la prolifération anormale.

Des défauts au niveau du cycle cellulaire ou dans la capacité à répondre et réparer les dommages à l'ADN peuvent être des sources d'insensibilité aux signaux anti-mitotiques. Dans les tissus sains, de nombreux signaux antiprolifératifs opèrent afin de maintenir les cellules en état de quiescence ou tout le moins le tissu dans un état homéostatique. Les cellules peuvent donc être forcées de sortir d'un cycle en cours pour retourner à l'état de quiescence ou tout simplement être empêchées de déclencher un nouveau cycle cellulaire. Dans les cas de cancers, les cellules échappent donc à ces signaux et peuvent prospérer. Au niveau moléculaire, l'inactivation ou les mutations de pRb sont oncogéniques. La dégradation de pRb, par exemple par la protéine E7 du virus du papillome humain (HPV), libère E2Fs et permet la prolifération cellulaire. Dans de nombreux cancers humains, les Cyclines D et leurs kinases associées (CDK4 et CDK6) sont directement ou indirectement activées par l'intermédiaire d'un défaut en CDKis (Malumbres & Barbacid 2001). Les changements dus aux tumeurs dans ces régulateurs proviennent souvent d'altérations chromosomiques (amplification de la Cycline D1 ou de CDK4, translocations de CDK6 ou délétion des protéines INK4 ou pRb) ou d'une inactivation épigénétique (méthylation des promoteurs d'INK4 ou de pRb). Par exemple, la Cycline d1 est surexprimée dans 70% des lymphomes du manteau du fait d'une translocation t(11;14). L'oncogène c-Myc est fréquemment amplifié dans les cancers (Felsher & Bishop 1999). En fait c-Myc s'oppose à l'activité antiproliférative de TGF β en se liant aux complexes transcriptionnels Smad/Sp1 ainsi que par une répression directe des promoteurs des gènes p15^{INK4b} et p21^{WAF1/Cip1} (Coller et al. 2000).

Le gène p53 est muté dans environ 50% des cancers. Les anomalies de la voie p53 sont fréquentes même en absence de mutations de la protéine p53 elle-même. C'est le cas des amplifications de Mdm2, ce qui augmente la dégradation de p53 dans les ostéosarcomes par exemple. De même, des patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni possèdent des mutations de la protéine CHK2 et possèdent une p53 normale, CHK2 phosphorylant p53 sur la sérine 20 (S B Lee et al. 2001) (Ahn et al. 2004). De plus, le gène p53 est sous le contrôle

direct de la protéine ATM comme nous avons pu le voir précédemment et des mutations de cette protéine sont à l'origine des syndromes d'ataxie-télangiectasie qui prédisposent aux lymphomes et aux leucémies lymphoïdes chroniques. Des mutations peuvent également survenir au niveau de la protéine BRCA1 et prédisposent aux cancers de l'ovaire et du sein (Wang et al. 2000).

L'APOPTOSE

I. Introduction

En 1842, Vogt décrit pour la première fois un phénomène de mort physiologique dans lequel des cellules avaient la capacité de s'autodétruire (Vogt 1842). Cependant, ce n'est qu'à partir de 1972 que le terme « apoptose » est utilisé par Kerr, Wyllie et Currie afin de définir un phénomène de mort programmée (Kerr et al. 1972). Cette définition de mort repose, à ce moment, uniquement sur des bases morphologiques et biochimiques à savoir une condensation chromatinienne et cytoplasmique, une fragmentation de l'ADN et un bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique. Il a ensuite été déduit de l'étude du nématode *C. elegans* que l'apoptose était un processus actif grâce à un programme génétique de mort cellulaire programmé et hautement régulé (Hengartner & Horvitz 1994).

L'apoptose est définie, à l'heure actuelle, comme étant un processus actif de mort cellulaire programmé permettant la régulation quantitative et qualitative des populations cellulaires tant au niveau du développement embryonnaire qu'à celui de l'homéostasie tissulaire.

Dès le développement embryonnaire, l'apoptose et la prolifération cellulaire sont deux éléments complémentaires et pourtant totalement opposés en terme de croissance tissulaire. Cependant, ces deux processus sont identiques sur un point, l'importance de leur régulation. Nous avons pu voir dans la partie précédente à quel point la régulation du cycle cellulaire se devait d'être précise et bien réglée. Il en va de même pour celle de l'apoptose. En effet, une dérégulation du taux d'apoptose peut provoquer en cas d'excès des maladies neuro-dégénératives telles qu'Alzheimer ou Parkinson. *A contrario*, un défaut de ce mécanisme de mort cellulaire participe à l'origine du phénomène de carcinogénèse (Thompson 1995) (Elmore 2007).

De plus, il est de la plus haute importance que le processus d'apoptose d'une cellule n'affecte pas les cellules environnantes. De ce fait, lors de l'apoptose d'une cellule, cette dernière va s'isoler des cellules qui l'entourent, dégrader son ADN en fragments de 200 paires de bases, externaliser des phosphatidylsérines habituellement localisées au niveau de la face interne de la membrane plasmique. Les corps apoptotiques ainsi formés renfermant le contenu cytoplasmique et nucléaire seront reconnus par les phagocytes qui recycleront rapidement leurs contenus. Ce processus sera alors terminé sans avoir déclenché de réponse inflammatoire. Cette absence de réaction inflammatoire est un des aspects qui différencient l'apoptose d'une autre grande voie de mort cellulaire, la nécrose. En effet, la nécrose se caractérise par un gonflement de la cellule, une dégradation aléatoire de l'ADN (Bicknell & Cohen 1995) et une désintégration totale des organites qui aboutit à un éclatement cellulaire total. Le relargage du contenu cellulaire dans l'espace extracellulaire déclenche une réaction inflammatoire (Kerr et al. 1972) (Figure 23) (Van Cruchten & Van Den Broeck 2002). La nécrose est également observée suite à une apoptose lors de culture *in vitro* du fait de l'impossibilité de phagocytose.

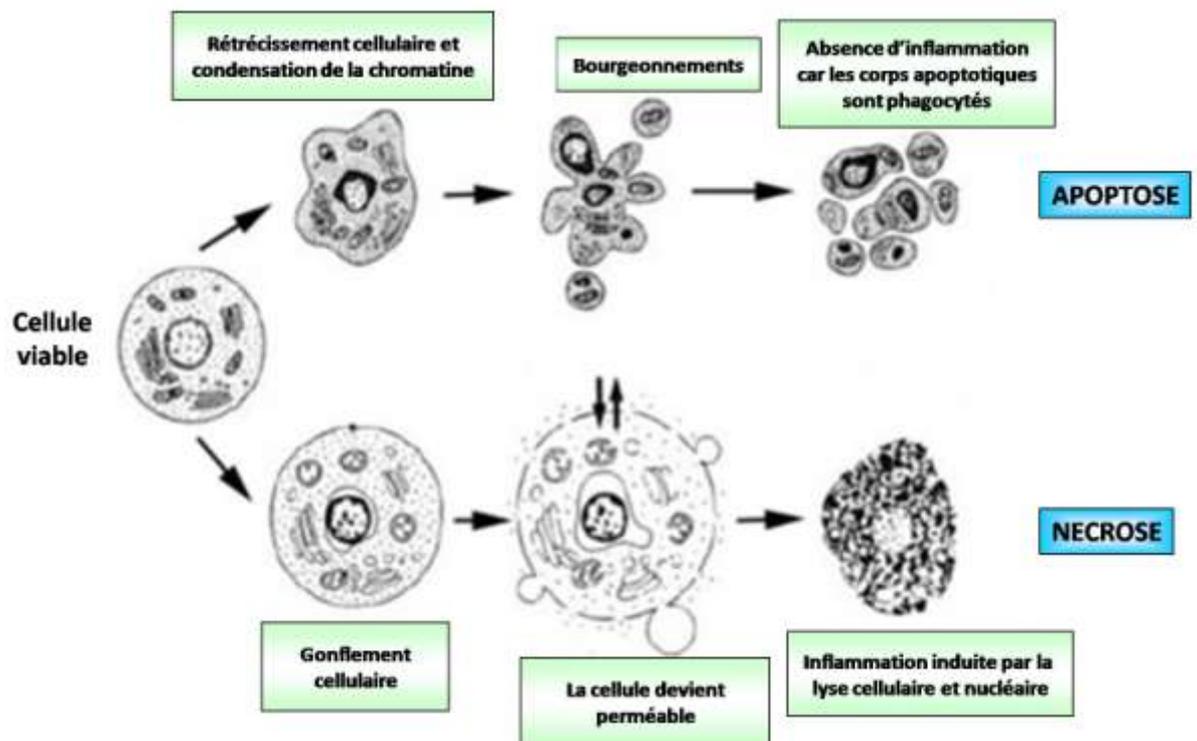


Figure 23 : Différences morphologiques entre apoptose et nécrose.

D'après Van Cruchten *et al.*, *Anat. Histol. Embryol.*, 2002.

L'apoptose est également en lien avec deux autres mécanismes de mort cellulaire que sont la sénescence et l'autophagie.

- La sénescence

La culture de cellules primaires ne pourra pas se faire indéfiniment contrairement à celle de lignées cellulaires qui ont été immortalisées. Ce nombre fini de passage que peuvent effectuer les cellules primaires *in vitro* se caractérise par un arrêt du cycle cellulaire, une absence de réponse aux facteurs de croissance et une entrée en phase de quiescence. Cet état est nommé sénescence réplivative. Cette mort cellulaire est due à l'érosion progressive des télomères au fur à mesure des cycles de réplifications de l'ADN par une mauvaise précision de la télomérase.

- L'autophagie

L'autophagie, quant à elle, possède un rôle important dans le développement et les réponses cellulaires à la privation de nutriments. Cette voie de mort cellulaire est un processus d'auto-digestion où des amas de composés cytoplasmiques et d'organelles intracellulaires sont séquestrés à l'intérieur de vésicules nommés phagosomes. Une fois arrivés à maturation, les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes afin de former les autophagolysosomes où leur contenu sera dégradé grâce à des protéases lysosomiales. (Eisenberg-Lerner et al. 2009). L'autophagie a tout d'abord été décrite comme étant un mécanisme de survie cellulaire lors de conditions de privation de nutriments. En effet, dans des conditions précises, l'activité catabolique de l'autophagie permet aux cellules de retrouver assez d'énergie afin de leur permettre de survivre. L'autophagie est un processus essentiel lors du développement de par sa capacité à fournir une source alternative d'énergie. De plus, l'autophagie permet la régulation de l'homéostasie tissulaire en permettant le renouvellement des organelles et des protéines à longue durée de vie. Cependant, l'autophagie peut entraîner la mort cellulaire ceci peut s'expliquer par une intense activation du processus autophagique qui résulte en une désintégration des

principaux systèmes cellulaires menant à un point de non retour au delà duquel la cellule ne pourra récupérer.

L'apoptose est un processus de mort qui est conservé tout au long de l'évolution. De ce fait, les premières études réalisées chez le nématode *C. elegans* ont permis une meilleure compréhension de ce processus. En effet, chez ce vers, lors du développement une partie des cellules qui le composent initialement (131 sur 1090) meurent par apoptose. Les travaux d'Horvitz et d'Hergartner ont mis en évidence que l'inactivation des gènes *ced3*, *ced-4* (*C. elegans* death ») et *egl-1* induisait une inhibition de cette mort par apoptose, alors que celle du gène *ced-9* la stimulait provoquant la mort du vers (Horvitz 1982) (Hergartner & Horvitz 1994). D'un point de vue moléculaire, la protéine CED-3 est synthétisée sous forme inactive et ce n'est qu'une fois complexée avec la protéine CED-4 qu'elle devient active. Cependant, CED-4 est habituellement retenue au niveau de la membrane mitochondriale par CED-9 afin de l'empêcher d'interagir avec CED-3. Dans la fraction cellulaire déclenchant l'apoptose, CED-4 est relarguée de la mitochondrie par l'interaction de CED-9 avec EGL-1. Quelques années plus tard, il a été montré que la protéine CED-3 était l'homologue de la protéine caspase-3 (Azim et al. 2001) appartenant à une famille de protéases qui assurent l'exécution de ce processus de mort après formation d'un complexe protéique avec la protéine CED-4, homologue de Apaf-1 (« Apoptotic peptidase activating factor-1 »). L'inhibition de ce processus par CED-9 est également retrouvée par l'homologue humain de cette protéine, Bcl-2 (« B cell lymphoma-2 »).

II. Les caspases

La structure et classification des caspases

Les caspases sont des endoprotéases à cystéine possédant une spécificité stricte de clivage de leur substrat après un résidu d'acide aspartique. Les caspases sont synthétisées sous forme zymogène inactive. Les zymogènes des caspases possèdent une structure, très conservée au cours de l'évolution, à trois domaines (Figure 24) :

- une petite sous-unité de 10 à 14kDa en position C-terminale,
- une grande sous-unité de 17 à 21kDa portant le site catalytique à résidu cystéine dans un motif conservé (QACxG)
- un pro-domaine en position N-terminale.

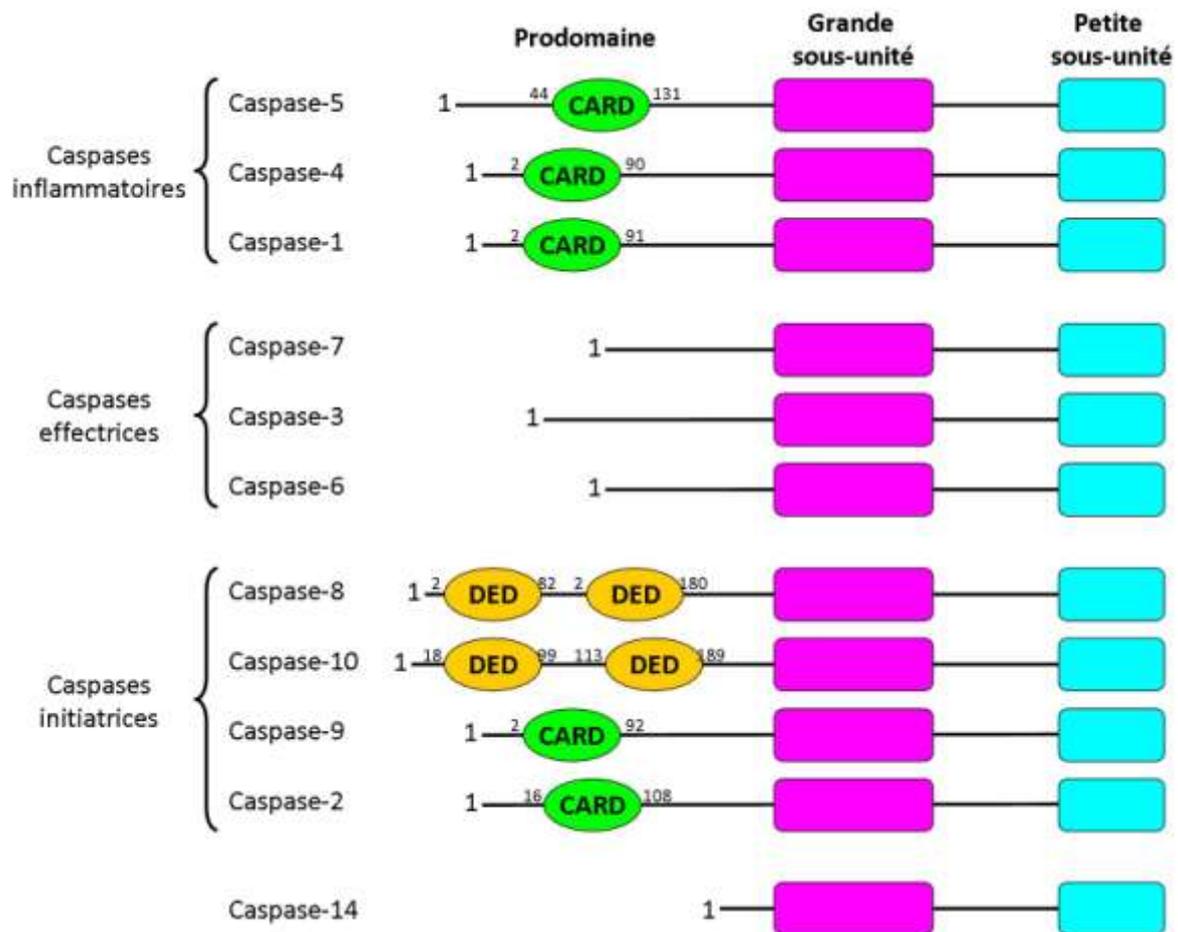


Figure 24 : Structure et classification des caspases.

À ce jour, 14 caspases ont été identifiées, suite à un criblage de bibliothèques, chez les mammifères. Parmi elles, 11 sont exprimées chez l'Homme. Certaines caspases sont plus spécifiquement impliquées dans le système immunitaire notamment dans l'expression et la maturation de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 et l'IL-18. Néanmoins, au moins 7 membres de cette famille de protéases contribuent au processus apoptotique (Chang & Yang 2000). La taille du pro-domaine des caspases permet de différencier ces protéases. En effet, les caspases 3, 6 et 7 possèdent un pro-domaine de petite taille et correspondent aux

caspases effectrices, alors que les caspases 2, 8, 9 et 10 possèdent un pro-domaine de grande taille et sont identifiées en tant que caspases initiatrices. De plus, la structure du pro-domaine complète cette différence entre ces deux groupes. Les caspases 8 et 10 contiennent des domaines DED (« Death effector domain ») permettant l'accrochage de ces protéines aux molécules adaptatrices FADD (« Fas-associated protein with death domain ») ou TRADD (« TNFRSF1A-associated *via* death domain »). Enfin, les caspases 1, 2, 4, 5 et 9 possèdent un domaine CARD (« Caspase recruitment domain ») intervenant dans l'interaction directe entre les caspases ou entre caspases et des molécules régulatrices.

L'activation des caspases

En réponse à un stimulus de mort cellulaire, les caspases sont activées par une protéolyse qui peut venir soit d'autres caspases soit d'elles-mêmes grâce à une activité auto-catalytique. L'activation des caspases en réponse à ces stimuli de mort fait intervenir deux événements de clivage successifs. Les sites de clivage sont dus à la présence de plusieurs résidus aspartate entre la petite et la grande sous-unité et d'un autre en la grande sous-unité et le pro-domaine. Ces clivages vont permettre la libération du pro-domaine et l'association des deux sous-unités afin de former le site actif de l'enzyme. La forme active de l'enzyme correspond à un tétramère constitué de l'association de deux petites sous-unités et de deux grandes.

Les caspases effectrices ne possédant pas de domaines CARD ou DED du fait de la moindre longueur de leur pro-domaine ne peuvent pas être recrutées ou oligomérisées. Ces dernières sont dites activées en cascade par d'autres caspases possédant ces éléments (Shi 2004). L'activation des caspases initiatrices est induite par deux voies de signalisation de mort cellulaire :

- la voie extrinsèque des récepteurs de mort,
- la voie intrinsèque mitochondriale.

III. Les voies d'apoptose

III.1. La voie extrinsèque des récepteurs de mort

Les signaux responsables de la prolifération, de la différenciation, de la mort cellulaire, donc l'ensemble de l'homéostasie tissulaire se transmettent par des phénomènes d'interaction directe cellule-cellule ou bien par l'intermédiaire de facteurs solubles dans le milieu extracellulaire et capable de se fixer sur des récepteurs membranaires spécifiques. Il existe une famille de récepteurs membranaires spécialisés dans l'activation de l'apoptose : les récepteurs de mort. Cette voie d'activation est notamment importante dans le cadre de l'immunité.

Cette famille spécialisée dans l'induction de l'apoptose est la famille des récepteurs au facteur de nécrose tumorale ou TNFR (« Tumor necrosis factor receptor »). Ces derniers peuvent être classés en trois sous-groupes en se basant sur la structure de leur partie cytoplasmique et les voies de signalisations qu'ils engendrent (Dempsey et al. 2003).

Le premier sous-groupe est constitué des couples récepteur/ligand suivants : Fas(CD95)/FasL, TNFR1/TNF (Lymphotoxin- α), DR3 (Death Receptor 3)/Apo3, DR4 (TRAIL-R1 « TNF Related Apoptosis Inducing Ligand-Receptor 1) et DR5 (TRAIL-R2)/ TRAIL (Apo2L) et enfin DR6 dont le ligand reste encore inconnu à ce jour.

Le modèle classique de ce sous-groupe est le couple Fas/FasL. En effet, la liaison de FasL avec son récepteur induit la trimérisation de ce dernier. Le récepteur Fas possédant un domaine de mort DD (« Death domain ») dans sa partie intracytoplasmique, ce changement de conformation provoque le rapprochement de trois domaines DD. La molécule adaptatrice FADD/MORT1 est recrutée au niveau de la partie intracellulaire du récepteur par son propre domaine DD. La protéine FADD possède également un domaine DED grâce auquel la procaspase-8, qui en possède un également, est recrutée. Cet ensemble protéique constitue le DISC (« Death inducing signaling complex »). L'augmentation de la concentration locale en procaspase 8, due à l'activation du récepteur Fas, induit une activité autoprotéolytique

(comme décrit précédemment dans la partie caspase) et la libération dans le cytoplasme des formes actives de la caspase 8. La caspase 8 peut, alors, à son tour activer les caspases effectrices 7 et 3. Cependant, la caspase 8 peut également provoquer le clivage de la protéine Bid, membre de la famille Bcl2. Le clivage de Bid déclenche la voie mitochondriale de l'apoptose.

Les récepteurs DR4 et DR5, quant à eux, semblent fonctionner uniquement par déclenchement de la voie mitochondriale subséquent au clivage de la protéine Bid (Kischkel et al. 2000) (Figure 25) (Danial & Korsmeyer 2004).

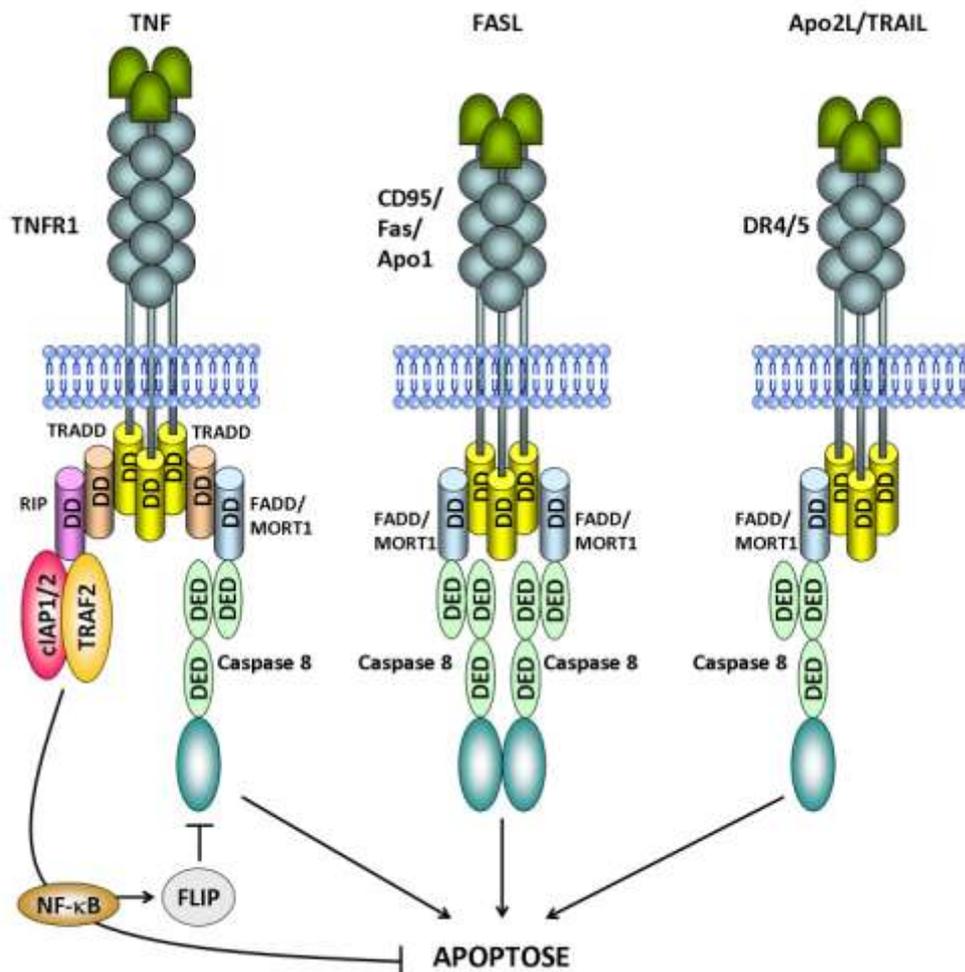


Figure 25 : Schéma des récepteurs de la superfamille du TNF.

D'après Danial *et al.*, *Cell*. 2004.

D'autres membres de ce sous-groupe, tels que TNFR1, DR3 et DR6 déclenchent, dans certaines conditions, une signalisation de survie aussi paradoxal que cela puisse être. En effet, ces récepteurs une fois activés recrutent en premier lieu les protéines adaptatrices TRADD. Ces dernières, contenant un domaine DD, fixent la kinase RIP1 (« Receptor interacting protein ») qui permet l'accrochage des protéines TRAF2, c-IAP1/2 et la formation du complexe I. Le complexe I entraîne le recrutement de la protéine IKK (« IκB kinase ») et l'activation de la voie NF-κB (« Nuclear factor-kappaB ») et donc la survie cellulaire. Dans un second temps, les protéines adaptatrices TRADD vont se dissocier des récepteurs et se sont les protéines FADD qui seront recrutées afin d'induire l'apoptose *via* la caspase 8.

Le second sous-groupe comprend les récepteurs TNFR2, CD27 ; CD30, CD40, LTβR, OX40, 4-1BB, BAFFR, BCMA, TACI, RANK, p75NGFR, HVEM (« Herpes virus entry mediatory »), TNFRSF18, TROY, EDAR, XEDAR, RELT et Fn14. Ces récepteurs contiennent un ou plusieurs domaines TIM (« TRAF interacting motif ») dans leur partie cytoplasmique. L'activation de ces domaines TIMs entraîne le recrutement de membres de la famille TRAF et l'activation de plusieurs voies de signalisation telles que NF-κB, JNK (« Jun N-terminal kinase »), p38, ERK (« Extracellular signal regulated kinase ») et PI3K (« Phosphoinositide-3 kinase ») (Darnay et al. 1999). Le troisième sous-groupe inclut les récepteurs TRAIL-R3, TRAIL-R4, Decoy-R3 et OPG (« Osteoprotegerin »). Ces derniers ne contiennent pas de domaines ou de motifs intracellulaires fonctionnels. Bien que ce sous-groupe de récepteurs ne peut déclencher de voie de signalisation, les récepteurs le constituant rentrent directement en compétition avec les membres des deux sous-groupes précédents pour leurs ligands respectifs. Ces récepteurs sont donc appelés des récepteurs « leurres » et ont pour fonction de moduler les effets des deux autres sous-groupes de récepteurs de mort (Gibson et al. 2000).

La caspase 8 et les protéines adaptatrices FADD semblent être des éléments indispensables de la voie d'apoptose déclenchée par les récepteurs de mort. Ceci a été confirmé dans des fibroblastes embryonnaires pour la caspase 8 et dans des fibroblastes murins pour la protéine adaptatrice FADD où une déficience dans l'une de ces deux

protéines confère une résistance aux effets cytotoxiques de FasL, TNF et TRAIL (Creagh & Martin 2003) (Piccini et al. 2004).

La régulation de la voie extrinsèque de l'apoptose réside principalement dans sa capacité à déclencher elle-même des voies de signalisation de survie, de prolifération ou de différenciation. Tout d'abord, la balance qui existe entre les membres des complexes I et II induira le déclenchement de l'apoptose seulement en cas d'insuffisance de l'activation de la voie NF- κ B. En cas contraire, cFLIP est exprimée pour inhiber la caspase 8. De plus, d'un point de vue plus général, c'est la sommation des signaux perçus par les trois sous-groupes et donc la nature même des signaux et, de ce fait, la voie de signalisation prépondérante qui va s'en dégager qui va déterminer si oui ou non l'activation des récepteurs de mort induira la survie ou l'apoptose.

III.2. La mitochondrie : élément central de la voie intrinsèque.

Le rôle de la mitochondrie

La mitochondrie est un organe intracellulaire composé d'une matrice entourée d'une membrane interne et d'une membrane externe formant un espace intermembranaire. Elle est depuis longtemps identifiée comme l'organe indispensable à la production d'ATP et n'a été que récemment impliquée dans la régulation des mécanismes de mort cellulaire lorsqu'il a été montré que le cytoplasme dépourvu de mitochondrie n'était pas capable d'induire l'apoptose *in vitro*.

La mitochondrie joue donc un rôle central dans l'intégration et la propagation des signaux de mort provenant de l'intérieur de la cellule comme le dommage à l'ADN, le stress oxydatif, la privation de sérum ou de facteurs de croissance, l'hypoxie ou ceux induits par les agents chimiothérapeutiques (Kaufmann & Earnshaw 2000) (Wang 2001). De telles conditions de stress perturbent l'intégrité de la mitochondrie en modifiant son potentiel transmembranaire ($\Delta\Psi$) et la perméabilité de sa membrane interne, plus communément appelée la transition de perméabilité (PT). Cela se caractérise par une brusque augmentation

de la perméabilité de la membrane interne de la mitochondrie vis-à-vis de molécules inférieures à 1,5kDa et la formation de pores dans la membrane notés PTPC (« Permeability transition pore complex »). ANT (« Adenin nucleotide translocator ») est la protéine la plus abondante au niveau de la surface interne de la mitochondrie et est également une protéine transmembranaire « tunnel » permettant l'export d'ATP en échange d'ADP. La surexpression de la protéine ANT-1 dans les lignées de cancers humains est dominante et induit l'apoptose alors que la surexpression de son homologue ANT2 en est incapable (Bauer et al. 1999). La protéine VDAC (« Voltage dependent anion channel »), également nommée « porine » et est, quant à elle, la protéine prépondérante au niveau de la membrane externe. Les PTPC formés au niveau de la membrane sont issus de l'interaction directe des protéines ANT et VDAC (Kroemer et al. 2007). La formation de ces pores, en réponses à des stimuli intracellulaires de mort, provoque le relargage de protéines pro-apoptotiques depuis l'espace intermembranaire de la mitochondrie dans le cytoplasme (Bernardi 1999). Les protéines relarguées dans le cytoplasme comprennent :

- le cytochrome c qui active l'apoptosome et de ce fait la cascade des caspases,
- AIF (« Apoptosis-inducing factor ») et l'endonucléase EndoG qui, une fois transloqués au noyau, entraînent la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine de manière indépendante des caspases,
- Smac/DIABLO et HtrA2/Omi qui bloquent l'effet des inhibiteurs de l'apoptose, les protéines de la famille des IAPs (« Inhibitor of apoptosis proteins ») (Kroemer et al. 2007) (Figure 26).

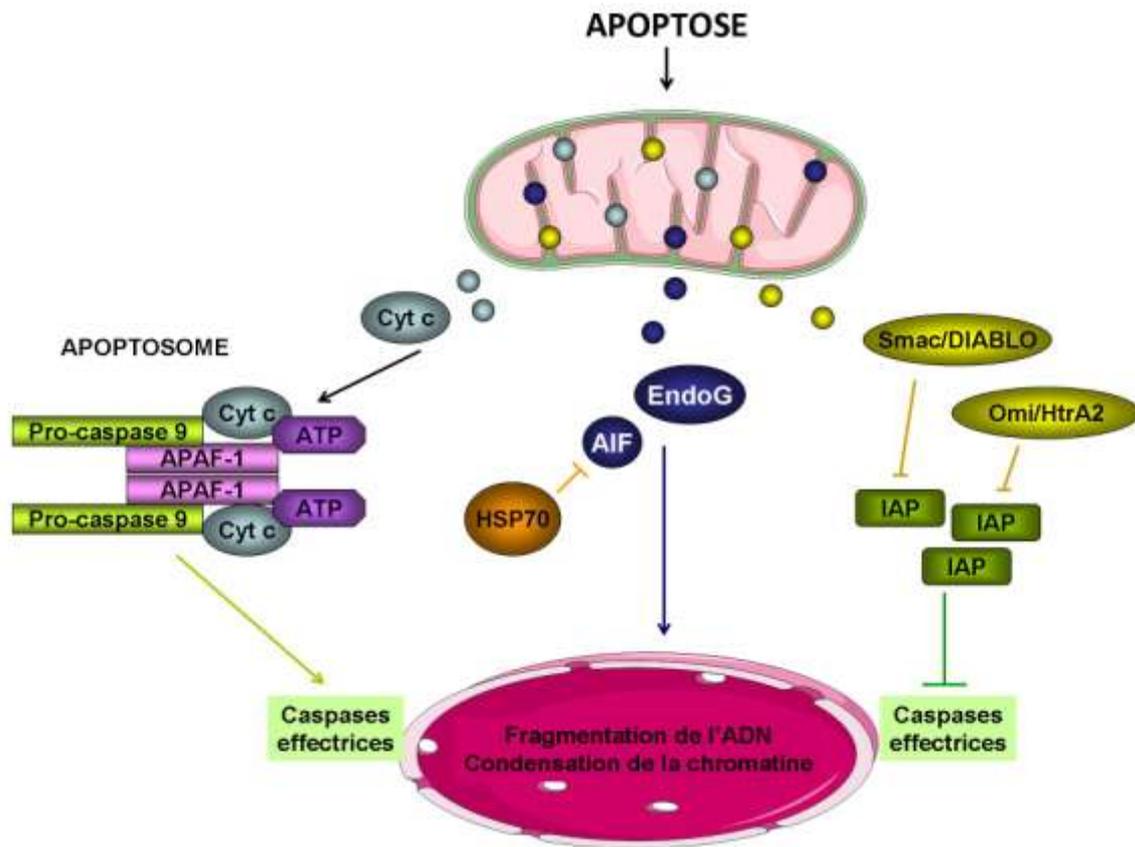


Figure 26 : Schéma du relargage des protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial.

D'après Kroemer, *Physiol Rev*, 2007.

Mode d'action de la voie mitochondriale

La libération du cytochrome c est considérée comme étant le déclencheur de la voie mitochondriale de l'apoptose. Le cytochrome c est un composant essentiel de la chaîne de transport des électrons lors de la phosphorylation oxydative et de la production d'ATP par la mitochondrie. Cette protéine est synthétisée dans le cytoplasme sous la forme d'un précurseur, l'apocytochrome c. Ce n'est qu'une fois, dans l'espace intermembranaire, que le cytochrome c devient apoptogénique grâce à une maturation et la liaison avec un noyau hème (Saelens et al. 2004). La protéine Apaf-1, identique à CED-4 de *C. elegans*, est une protéine cytosolique composée d'un domaine CARD dans sa partie N-terminale et un domaine NBD (« Nucleotide-binding domain ») dans sa partie centrale ainsi qu'un domaine WD40 en position C-terminale. Le domaine NBD d'Apaf-1 lui confère la capacité de lier l'ATP

après un changement conformationnel induit par sa liaison avec le cytochrome c grâce à son domaine WD40, une fois ce dernier relargué dans le cytoplasme. Ce changement de conformation permet également à la protéine Apaf-1 de s'oligodimériser, *via* son domaine NBD, et de fixer la procaspase 9 grâce à la présence de son domaine CARD. Le complexe heptamérique ainsi formé Apaf-1/Cytochrome c/Pro-caspase 9 est nommé apoptosome (Figure 27) (Wang 2001).

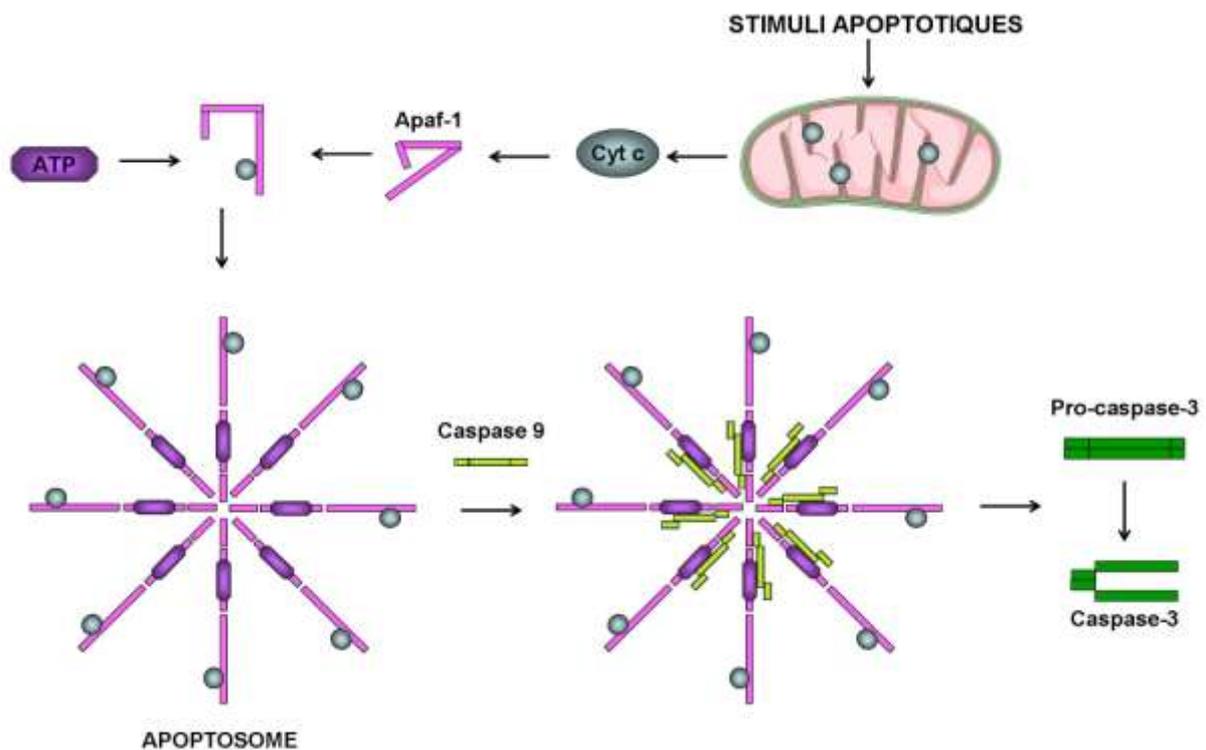


Figure 27 : Schéma de la structure de l'apoptosome.

D'après Wang X *et al.*, *Genes Dev*, 2001.

La pro-caspase 9, grâce à sa forte concentration locale au sein de l'apoptosome, peut s'activer de manière auto-protéolytique et entraîner, en tant que caspase initiatrice, l'activation des caspases effectrices 3 et 7. Les cellules déficientes en caspase 9 ou en Apaf-1 sont résistantes à l'apoptose induite par la voie mitochondriale (Green 2000).

Comme il a été mentionné précédemment, d'autres protéines sont également libérées dans le cytoplasme en même temps que le cytochrome c. Ces dernières servent à la consolidation et à l'amplification du signal apoptotique. Cependant, la voie mitochondriale

de l'apoptose est régulée de façon très étroite par de nombreuses protéines. En effet, en amont de la mitochondrie, les protéines de la famille Bcl-2 semblent contrôler la perméabilité de la membrane externe mitochondriale et l'activation des caspases (Adams & Cory 2007). De plus, la régulation de cette voie de signalisation est également contrôlée en aval de la mitochondrie par les membres de la famille des IAPs qui inhibent les caspases de façon directe ou indirecte.

Une autre voie d'activation de l'apoptose

Le réticulum endoplasmique (RE) est le principal lieu de stockage intracellulaire du calcium où il est utilisé pour la synthèse protéique. Le RE est constitué d'un réseau membranaire étendu qui sépare lumière du réticulum et cytosol. Le RE constitue ainsi un compartiment isolé du cytosol ce qui lui permet de maintenir des conditions pro-oxydantes ainsi qu'une forte concentration en calcium, environnement requis pour ses nombreuses fonctions. En effet, outre le stock du calcium le RE sert avant tout à la synthèse de macromolécules, le transfert de substances vers l'appareil de Golgi et la modification des protéines. Les enzymes qui synthétisent les composants lipidiques des lipoprotéines sont, par exemple, localisées dans la membrane du RE lisse qui contient également celles qui catalysent les réactions de détoxification. Enfin, le RE est l'organite essentiel pour le bon repliement des protéines avant leur acheminement vers l'appareil de Golgi.

Lorsque la cellule est confrontée à des modifications survenant dans son environnement comme des infections virales, une perturbation du métabolisme glucidique, des mutations géniques, une surcharge protéique, une dérégulation de l'homéostasie calcique ou encore la présence d'inducteurs pharmacologiques, cela peut se répercuter au niveau du RE sur la synthèse protéique et, par conséquent, sur le repliement des polypeptides assuré par les chaperonnes. Ce phénomène est connu sous le nom de stress du Reticulum Endoplasmique et mène, par l'intermédiaire d'une machinerie de signalisation de stress nommée UPR (« Unfold protein response »), à l'accumulation de protéines immatures dans la lumière du RE. L'activation de cette voie de signalisation peut aboutir à la mort par apoptose. En effet, en réponse à un stress du RE, les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak

s'oligomérisent au niveau de la membrane du RE et créent un pore de déplétion en calcium (Scorrano et al. 2003) qui active les calpaïnes intracytosoliques, qui à leur tour clivent leurs substrats, dont la pro-caspase 12, associée à TRAF2 (Nakagawa & Yuan 2000). Le relargage de Ca^{2+} , depuis le RE est suivi, de sa captation par la mitochondrie au niveau des zones de contact entre mitochondrie et RE, ce qui induit la libération du cytochrome c puis l'activation en aval des caspases (Momoi 2004). Des souris déficientes pour Bax et Bak sont complètement résistantes à une apoptose provoquée par un stress du RE (Wei et al. 2001), suggérant un rôle d'exécuteur de l'apoptose pour ces protéines. L'implication des membres de la famille Bcl-2 rejoint ici le modèle intrinsèque de l'apoptose.

IV. Mécanismes de régulation de l'apoptose

En règle générale, l'activation de l'apoptose n'est censée avoir lieu que lorsque les cellules sont la cible de signaux de mort, tant extracellulaires qu'intracellulaires. De ce fait, les voies de signalisation déclenchant l'apoptose se doivent d'être inactives en conditions normales et activées uniquement en réponse à des stimuli de mort. Cependant, il est à noter que même en conditions normales, les composants des voies de signalisations apoptotiques sont présents et fonctionnels. De ce fait, la mort cellulaire doit être continuellement réprimée par la présence de signaux de survie tels que les facteurs de croissance, les nutriments, les hormones. Ces signaux de survie déclenchent l'expression et/ou l'activation de protéines régulatrices anti-apoptotiques qui contrôlent le déclenchement des facteurs pro-apoptotiques.

IV.1. La famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 ont un rôle crucial dans la régulation de l'apoptose grâce à leur capacité à réguler la perméabilisation mitochondriale et le relargage du cytochrome c (Taylor et al. 2008).

Découverte de la famille Bcl-2

Le premier membre de cette famille à avoir été découvert fut le proto-oncogène Bcl-2 (« B-cell lymphoma -2 »). *Bcl-2* qui, dans les lymphomes folliculaires est fréquemment lié au locus des immunoglobulines par la translocation t(14 ;18), est le premier exemple d'oncogène à avoir été décrit comme inhibant la mort cellulaire plutôt que favorisant la prolifération cellulaire. Les cellules B transfectées avec *Bcl-2* deviennent résistantes à l'apoptose déclenchée par une privation en IL-3, ce qui à montrer pour la première fois que la voie déclenchant la tumorigénèse ne dépend pas seulement de la capacité à échapper au contrôle de la prolifération cellulaire mais également de la capacité à prévenir l'apoptose (Vaux et al. 1988).

Structure des membres de la famille Bcl-2

Lorsque les homologues de Bcl-2 ont été identifiés, il est apparu que l'on pouvait définir une « famille Bcl-2 » du fait de la présence d'une séquence d'homologie conservée connue sous le nom de domaine BH (« Bcl-2 homology domain ») participant à la formation de l'hélice α . Chez les mammifères, la famille Bcl-2 comprend plus de 20 membres possédant de un à quatre domaines BH, notés BH1 à BH4 (Figure 28). Cette famille de protéine possède la particularité de renfermer en son sein à la fois des membres pro-apoptotiques et des membres anti-apoptotiques (Borner 2003).

En plus de Bcl-2 lui même, les autres membres anti-apoptotiques, c'est à dire Bcl-X_L, Bcl-W, Bcl-B, Bcl-2A1 et Mcl-1 (« Myeloid cell leukemia-1 ») possèdent tous les domaines BH1, BH2, BH3 et BH4. Les membres pro-apoptotiques peuvent, quant à eux, être subdivisés en deux sous-groupes :

- la sous-famille Bax comprenant Bax (« Bcl-2 associated protein »), Bak et Bok et possédant les domaines BH1, BH2 et BH3,
- et le sous-groupe des membres dits « BH3-seul » dont les membres sont Bid, Bim, Bik, Bad, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, Puma, Blk, BNIP3 et Spike et qui ne possèdent que le

domaine BH3, domaine court mais néanmoins nécessaire et suffisant à leur activité de mort (Youle & Strasser 2008).

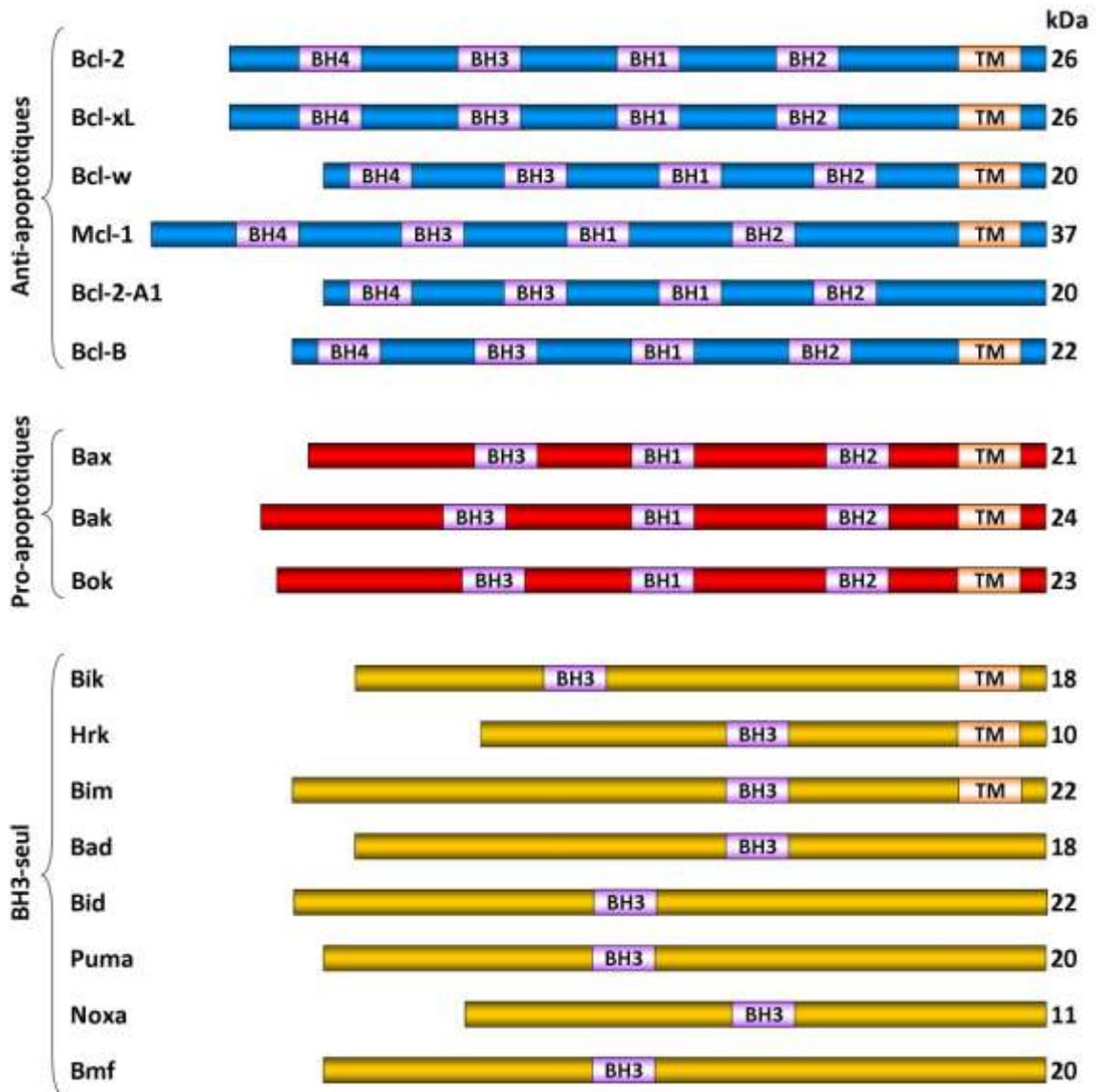


Figure 28 : Classification et structure des membres de la famille Bcl-2.

D'après Taylor, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008.

L'analyse de la structure en solution de Bcl-2 et Bcl-X_L a révélé que ces protéines présentent une structure globulaire constituée d'hélices α hydrophobes et d'hélices α amphiphiles (Petros et al. 2001). Les domaines BH1, BH2 et BH3 de ces protéines sont regroupés et forment une poche hydrophobe alors que le domaine BH4, quant à lui, intervient dans la stabilisation de ces dernières en réprimant l'exposition de certains résidus.

La poche hydrophobe des membres anti-apoptotiques constitue la partie active de ces protéines de par sa capacité à lier le domaine BH3 des membres pro-apoptotiques. Il est à noter que la boucle se situant entre les domaines BH3 et BH4 est la cible de diverses modifications post-traductionnelles permettant une régulation des membres anti-apoptotiques (Youle & Strasser 2008).

Relation entre perméabilité mitochondriale et membres pro-apoptotiques

Le rôle central, chez les mammifères, des membres de la famille Bcl-2 est de veiller à l'intégrité de la mitochondrie et de contrôler le relargage des protéines mitochondriales dans le cytoplasme (Cory & Adams 2002). De quelle façon les membres de la famille Bcl-2 affectent-ils l'intégrité mitochondriale ? Le point central de cette question réside dans deux membres de cette famille, à savoir les protéines Bax et Bak, bien que l'inactivation du gène de *Bax* seule n'a que peu d'effet sur le déclenchement de l'apoptose et que celle de *Bak* n'en a pas. Cependant, la double déficience *Bak / Bax* provoque une diminution drastique de l'apoptose lors du développement du système hématopoïétique ou au niveau cérébral. De plus, les cellules dérivées de souris *Bax*^{-/-} *Bak*^{-/-} sont résistantes à des traitements à l'étoposide ou aux irradiations ionisantes (Wei et al. 2001).

Bax est une protéine monomérique sous forme soluble dans le cytoplasme et qui change de conformation sous l'influence de stimuli apoptotiques. Ce changement de conformation permet à la protéine Bax de s'intégrer à la membrane externe de la mitochondrie et de s'oligodimériser (Nechushtan et al. 2001) (Annis et al. 2005). Bak est, quant à elle, une protéine résidante de la mitochondrie, de ce fait, les monomères de Bak sont déjà intégrés dans la membrane externe de la mitochondrie avant le déclenchement de l'apoptose.

L'homodimérisation de ces protéines dans la membrane mitochondriale provoque leur activation et la formation de pores (Antonsson et al. 2000). Ces pores permettent sont essentiels à la perméabilisation de membrane mitochondriale et donc au relargage du cytochrome c. Du fait de la présence de Bak dans la membrane externe, et ce en l'absence

de stimuli apoptotiques, la formation des dimères de Bak est inhibée soit par son interaction avec VDAC, une autre protéine de la membrane mitochondriale externe, soit avec Mcl-1 ou Bcl-X_L, deux membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Tsujimoto & Shimizu 2000) (Danial 2007). Il semble que Bax et Bak ne soient pas redondants mais prépondérants selon le type cellulaire.

Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 séquestrent les membres pro-apoptotiques en se fixant à leur domaine BH3 et de ce fait préviennent l'activation et l'oligomérisation de Bax/Bak et donc inhibent les événements pro-apoptotiques. La surexpression de Bcl-2 ou de Bcl-X_L participe à l'inhibition du déclenchement de l'apoptose en réponse à des agents cytotoxiques en prévenant notamment la génération de ROS, en stabilisant le $\Delta\Psi$, en évitant la perméabilité membranaire et donc le relargage du cytochrome c.

Mécanismes d'activation de Bax et de Bak

Bien que Bax et Bak représentent le noyau central de la machinerie apoptotique liée à la famille Bcl-2 et régulée par les membres anti-apoptotiques, cette dernière requière la présence des membres du sous-groupe « BH3-seul » pour pouvoir activer ces protéines centrales (Häcker & Weber 2007) (Figure 29). Les membres « BH3-seul » agissent en amont de Bax et Bak car, comme nous l'avons déjà vu, des cellules déficientes à la fois en Bax et en Bak ne pourront déclencher d'apoptose (Wei et al. 2001). Le rôle des « BH3-seul » est restreint selon le tissu et le signal de stress, ces protéines sont sous le contrôle de modifications transcriptionnelles et post-traductionnelles. *Noxa* et *Puma* sont des gènes transcrits par p53 en réponse à un dommage à l'ADN, les ARNm de *Hrk* et *Bim* sont augmentés lors de privation de facteurs de croissance. La protéine Bim est séquestrée au niveau des microtubules en interagissant avec la Dynéine et Bmf est activée par relocalisation cellulaire lors d'anoïkis alors que Bad est régulée par phosphorylation. À chaque type de signal de stress arrivant au niveau de la mitochondrie (dommage à l'ADN, privation de facteurs de croissance, hypoxie, mauvaise conformation) va être associé le recrutement d'un membre précis parmi les « BH3-seul ». Le nombre important de membres

du sous-groupe « BH3-seul » s'explique par une spécificité de chaque membre et non une redondance (Danial 2007).

Les protéines à domaine « BH3-seul » sont actives lorsque la face hydrophobe de leur hélice α est exposée et donc qu'elles peuvent interagir avec la poche hydrophobe formée par les membres à multidomains. Deux modèles principaux ont été proposés pour expliquer comment les protéines à domaine « BH3-seul » conduisent à l'activation des protéines Bax et Bak : les modèles d'activation directe et indirecte (Danial 2007) (Adams & Cory 2007) (Figure 29). Ces modèles ne semblent pas être exclusifs au sein d'une cellule mais plutôt cohabiter.

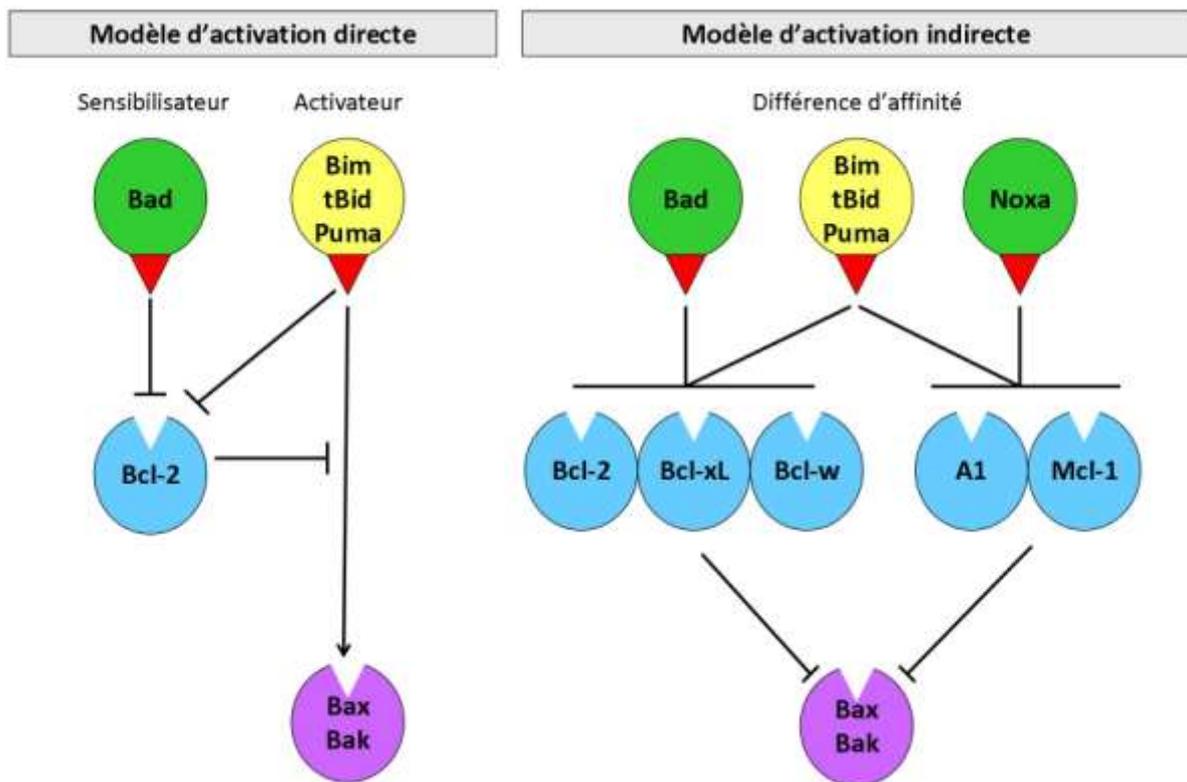


Figure 29 : Schémas des deux modèles d'activation de Bax et Bak par les « BH3-seul ».

D'après Adams & Cory, *Curr Opin Immunol*, 2007.

Le modèle d'activation directe, réside sur la capacité des protéines à domaine « BH3-seul » à induire directement l'activation de Bax et Bak. De cette classification, deux groupes se dégagent : les activateurs avec Bim, Bid et Puma et les sensibilisateurs dont Bad et Noxa

font partie (Letai et al. 2002). Dans ce modèle, les « BH3-seul » activateurs ont la capacité d'interagir avec tous les membres à multidomaines qu'ils soient pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques et d'induire par interaction directe l'activation de Bax et Bak (Kuwana et al. 2005). Les membres anti-apoptotiques séquestrent les « BH3-seul » activateurs et c'est grâce à la fixation des « BH3-seul » sensibilisateurs au niveau des membres anti-apoptotiques que les activateurs seront libérés.

Le modèle de l'activation indirecte, quant à lui, repose sur un rôle antagoniste des protéines à domaine « BH3-seul » vis-à-vis des membres anti-apoptotiques afin de libérer les protéines Bax et Bak dans le but de leur permettre d'exercer leur activité cytotoxique (S. N. Willis et al. 2007). Ce modèle se base donc sur un ensemble d'interactions inhibitrices et sur l'observation que les domaines BH3 des différentes protéines à domaine « BH3-seul » ont des affinités différentes pour les protéines anti-apoptotiques. Cette différence d'affinité serait ainsi à l'origine de deux groupes où dans l'un Bid, Bim et Puma peuvent lier toutes les protéines anti-apoptotiques alors que dans l'autre Bad ne peut se lier qu'à Bcl-2, Bcl-X_L et Bcl-W et Noxa qu'à Mcl-1 et Bcl-2A1 (Chen et al. 2005). Dans ce modèle, l'initiation du processus apoptotique nécessite une inhibition totale de toutes les protéines anti-apoptotiques fonctionnelles de la cellule. De plus, l'activation de Puma, Bim et Bid serait alors suffisante pour déclencher l'apoptose alors que celle de Bad ne permettrait qu'une inhibition partielle des anti-apoptotiques et nécessiterait donc un stimulus apoptotique supplémentaire (Willis & Adams 2005).

Une fois libérés, les activateurs pourront interagir directement avec les protéines Bax et Bak afin de déclencher l'apoptose. Cette interaction entre Bax/Bak et les membres activateurs est très transitoire et relève du mode d'action « hit and run ». Ce modèle d'action directe introduit donc une hiérarchisation au sein des membres « BH3-seul » où les activateurs seuls sont capables d'induire l'apoptose. Il est à noter que le rôle de Puma en tant qu'activateur ou sensibilisateur n'est pas clairement défini et que cette protéine pourrait jouer les deux rôles suivant le contexte cellulaire (Cartron et al. 2004) (Certo et al. 2006) (Gallenne et al. 2009).

Un aspect de la famille Bcl-2 qui est moins souvent mis en avant par rapport à son rôle dans l'apoptose est son implication dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, certains membres de la famille Bcl-2 sont impliqués dans la régulation de la progression du cycle cellulaire, notamment Bcl-2 (Bonney-Berard et al. 2004). En effet, Bonney-Berard et ses collaborateurs ont montré que la surexpression de Bcl-2 inhibait la transition G1/S du cycle cellulaire par l'intermédiaire de p130 et de p27. De plus, ces mêmes auteurs indiquent qu'une phosphorylation de Bcl-2 induirait l'inhibition de la transition G2/M. Ces mécanismes de régulation de la progression du cycle cellulaire pourraient être une des raisons du faible pouvoir prolifératif retrouvé dans les lymphomes non Hodgkiniens. Il semblerait, également, qu'une forte expression de la protéine Bcl-2 soit un facteur de bon pronostic dans le cancer du sein (Lipponen et al. 1995).

IV.2. La famille des IAPs

La famille des IAPs (« Inhibitor of apoptosis protein ») est la seconde famille de protéines permettant la régulation de l'apoptose. En effet, les IAPs sont les seules protéines endogènes à pouvoir réguler, à ce jour, tant les caspases initiateuses que les effectrices.

Découverte de la famille des IAPs

Les premiers membres de la famille des IAP furent découverts en 1993, par l'équipe de Lois Miller (Crook et al. 1993) (Birnbaum et al. 1994) lors de l'identification des régulateurs de l'apoptose déclenchée par une cellule hôte en réponse à l'infection par le baculovirus. En effet, chez le baculovirus, ces protéines permettent d'inhiber les caspases grâce à leur capacité à compenser une délétion de l'inhibiteur principal, p35. Cette découverte fut à l'origine de l'identification d'orthologues de ces protéines dans des espèces aussi diverses que la levure, les oiseaux ou l'humain.

Structure des membres de la famille des IAPs

L'appartenance à la famille des IAPs passe par la possession d'un domaine structurel BIR (« Baculovirus IAP repeat »). Ce domaine BIR contient environ 70 acides aminés, très riches en cystéine et histidine, et organisés en 4-5 hélices α et un feuillet plissé β à 3 épaisseurs permettant la fixation et chélation d'un atome de zinc. C'est la présence d'un ou plusieurs (jusqu'à 3) domaines BIR dans la structure d'une protéine qui détermine l'appartenance de cette dernière à la famille des IAPs. À ce jour, la famille des IAPs contient 8 membres (Hunter et al. 2007) : NIAP (« Neural IAP »)/BIRC1 (« BIR Containing gene 1 »), c-IAP1 (« cellular-IAP1 »)/BIRC2, c-IAP2 (BIRC3), XIAP (« X-linked IAP »)/BIRC4, Survivine /BIRC5, BRUCE (« BIR containing ubiquitin conjugating enzyme »)/Apollon/BIRC6, Livine/BIRC7 et Ts-IAP (« Testis specific-IAP »)/BIRC8 (Figure 30).

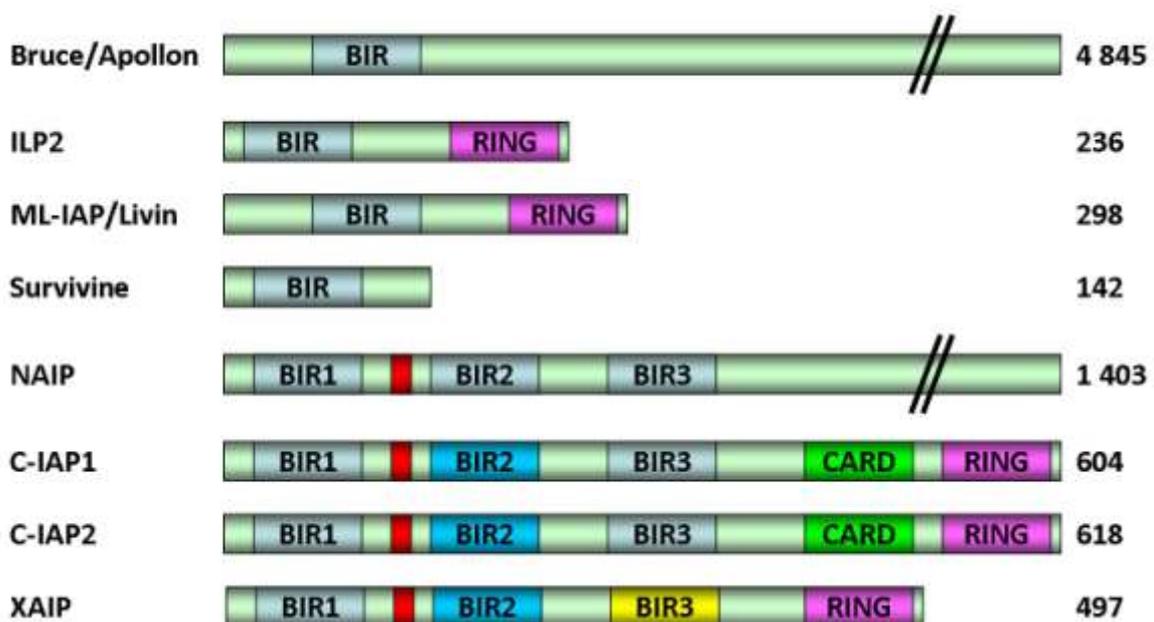


Figure 30 : Structure des membres de la famille des IAPs.

Il est à noter que bien que tous les membres de la famille des IAPs possèdent au moins un domaine BIR, la présence de ce dernier n'implique pas *de facto* la participation de ce membre à l'inhibition directe de l'apoptose (Uren et al. 1998). De façon générale, le domaine agit comme un domaine d'interaction protéine/protéine et ce n'est que dans

certain cas, notamment celui de XIAP, où ce domaine sert à l'interaction directe avec les caspases.

Certains membres des IAPs présentent d'autres domaines en plus du domaine BIR. c-IAP1 et c-IAP2 possèdent chacun un domaine CARD leur permettant de recruter les caspases comme nous avons pu le voir pour la protéine adaptatrice Apaf-1 notamment (Clem et al. 2001). Un membre des IAPs, la protéine Bruce, possède quant à elle, un domaine UBC (« Ubiquitin conjugating domain ») lui conférant une activité ubiquitine de conjugaison (E2 ou « Ubiquitin conjugating enzyme ») servant à apporter l'ubiquitine activée à son substrat spécifique (Vaux & Silke 2005). Enfin un dernier domaine est décrit chez certains membres de la famille des IAPs, il s'agit du domaine RING (« Really interesting new gene ») qui est également un domaine de fixation et de chélation du zinc. Ce domaine RING est retrouvé de façon systématique en position C-terminale des protéines qui le portent. Ce domaine possède une activité ubiquitine ligase (E3) régulant directement l'ubiquitylation des membres la possédant et donc de leur propre dégradation ainsi que celle d'autres protéines telles que les caspases 3,7 et 9, TRAF1 et 2, Smac/DIABLO (Joazeiro & Weissman 2000), en s'accrochant à la fois sur l'enzyme E2 et sur le substrat et en transférant l'ubiquitine depuis l'E2 sur le substrat.

Fonctions des IAPs : l'inhibition des caspases n'est pas la seule fonction

Bien que le premier niveau de régulation des caspases se fasse en contrôlant l'activation des zymogènes, le second niveau de régulation de ces protéines, et tout aussi important, se déroule après l'activation de ces protéases. Devereaux et son équipe furent les premiers à identifier la façon dont les IAPs inhibent les caspases. En effet, ils ont pu montrer au travers de leurs études que XIAP empêchait non pas l'activation de la caspase 3 par la caspase 8 mais sa maturation par homodimérisation (Devereaux et al. 1997). Ils ont donc montré que la voie extrinsèque, elle-même, n'était pas touchée car la caspase 8 peut toujours être activée par la fixation des ligands sur leur récepteurs de mort respectifs, mais que l'inhibition atteignait plutôt les caspases effectrices. La suite de leurs travaux a complété le mode d'action de XIAP, c-IAP1 et c-IAP2. Ils ont montré que ces trois protéines

permettaient un blocage de l'activation de la pro-caspase 9 induite par libération du cytochrome c et de ce fait un blocage de l'activation subséquente des pro-caspases 3, 6 et 7 (Deveraux et al. 1998) (Salvesen & Duckett 2002).

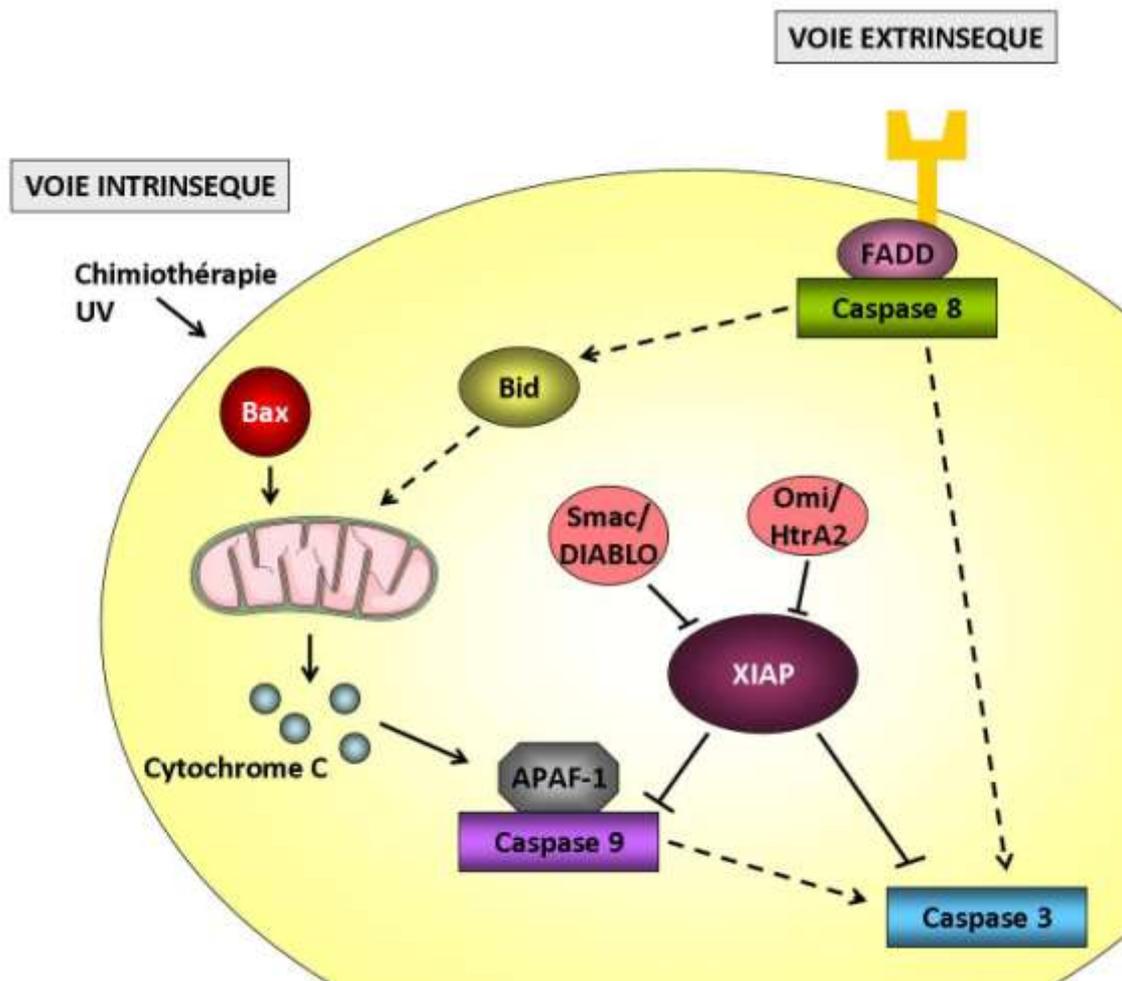


Figure 31 : Inhibition des caspases par la protéine XIAP.

D'après Salvesen & Duckett, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2002.

Des données récentes tendraient à suggérer que seul XIAP serait un véritable inhibiteur direct des caspases. Les autres IAPs pourraient se lier aux caspases mais avec des constantes d'inhibition trop faibles pour bloquer seuls l'activité des caspases (Eckelman et al. 2006), par exemple la Livine possède une constante d'inhibition près de 300 fois inférieure à celle de XIAP pour les caspases. D'après ces travaux, l'interaction décelée entre c-IAP1/c-IAP2 et les caspases serait bien effective mais l'inhibition détectée ne serait, quant à elle, due qu'à un artéfact de la construction de la protéine de fusion.

Cependant, l'activité anti-apoptotique des autres IAP n'est pas pour autant remise en cause mais cette activité se ferait de façon indirecte en piégeant leurs antagonistes afin de permettre une action maximale de XIAP. De ce fait, il a été décrit que la Livine interagissait avec Smac/DIABLO afin d'empêcher ce dernier de séquestrer XIAP (Chang & Schimmer 2007). Il en va de même pour la protéine Bruce pour qui cependant interagit également avec la caspase 9 et mène ces deux protéines au protéasome pour dégradation (Hao et al. 2004). De plus, des travaux ont montré que la participation de c-IAP1 à l'inhibition de l'apoptose se ferait, comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, par interaction avec la voie de signalisation activée par le récepteur au TNF (Dubrez-Daloz et al. 2008). En effet, c-IAP1 s'associe avec TRAF1 une protéine intervenant dans la formation des complexes I et II activés lors de la voie extrinsèque de l'apoptose (Shu et al. 1996). La stimulation du récepteur TNFR1 induit la formation des complexes I et II et à l'activation de l'activité d'ubiquitine ligase de c-IAP1 et donc à la dégradation de TRAF2 par ubiquitinylation. Cette activation de c-IAP1 bloque l'activation de la voie NF- κ B et donc la sécrétion autocrine de TNF α capable d'activer la caspase 8 et d'induire la mort des cellules (Vince et al. 2007) (Figure 32).

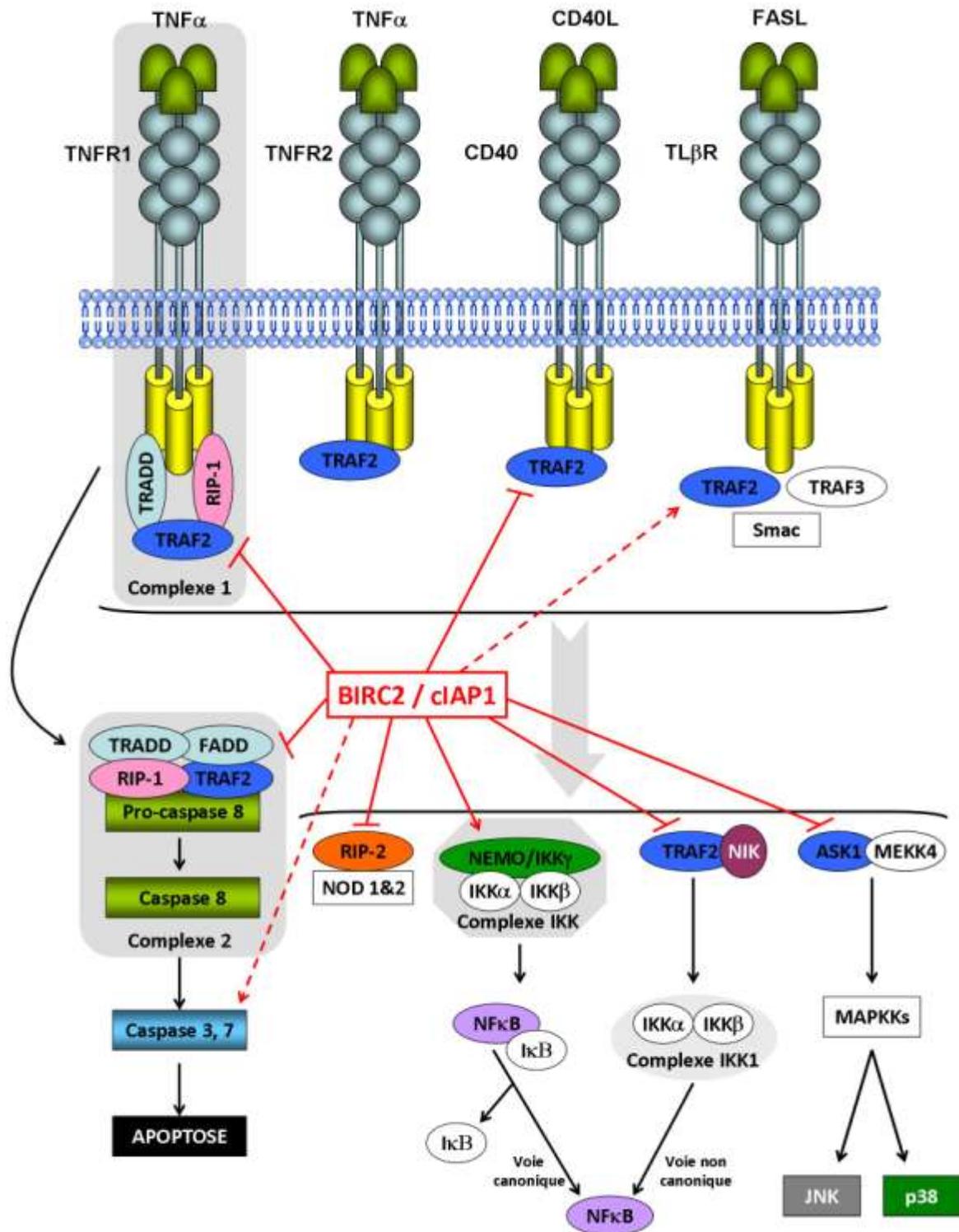


Figure 32 : Implication de c-IAP1 dans la voie de signalisation des TNF récepteurs.

D'après Dubrez-Daloz, *Cell Cycle*, 2008.

Régulation protéique des IAPs

- *Les antagonistes endogènes des IAPs*

Il n'existe qu'un point commun entre tous les antagonistes des IAPs qui réside dans leur façon de se lier au domaine BIR des différents membres des IAPs afin de les empêcher d'interagir avec les caspases. Ce motif de liaison aux IAPs, ou IBM (« IAP binding domain ») est défini par la présence d'une séquence consensus en position N-terminale de la protéine. C'est notamment le cas pour Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, GPST1/erF3 (Hunter et al. 2007).

Smac et Omi sont toutes les deux synthétisées sous forme de précurseurs avec une extrémité N-terminale portant une séquence de signalisation mitochondriale. Sous l'effet d'un stimulus apoptotique intracellulaire, Smac est libéré dans le cytosol depuis l'espace intermembranaire de la mitochondrie en même temps que le cytochrome c. Il a été montré, effectivement, que ces deux protéines suivaient une même cinétique de relargage depuis la mitochondrie (Madash et al. 2002). Smac et Omi, une fois relarguées dans le cytoplasme, possèdent toutes les deux la capacité d'interagir avec les IAPs afin de bloquer leur activité antiapoptotique d'ubiquitine ligase envers les caspases (Du et al. 2000) (Hegde et al. 2002). Cependant, Omi permet, contrairement à Smac, l'activation des caspases par dégradation des IAPs lors d'un traitement à l'étoposide ou avec TRAIL où l'augmentation de la concentration cytoplasmique d'Omi induit l'augmentation de la dégradation de XIAP et de c-IAP1 (Srinivasula et al. 2003).

D'autres antagonistes des IAPs contenant des motifs IBM ont été identifiés et, parmi eux, un ressort pour être localisé dans le réticulum endoplasmique. En effet, la protéine GSPT1 (« G1 to S phase transition 1 »)/erF3 est localisée dans le RE où, suite à un signal apoptotique, elle subit une maturation correspondant à la perte d'un fragment de 69 acides aminés afin de pouvoir exposer une séquence AKPF constituant à son motif IBM. GSPT1, une fois maturée, peut se lier avec les IAPs afin d'induire leur ubiquitylation, et donc leur dégradation protéosomale, ainsi que l'activation des caspases (Hegde et al. 2003).

Enfin il existe d'autres inhibiteurs des IAPs plus spécifiques de la protéine XIAP et qui seront développés dans la partie concernant l'étude de XIAP.

- Ubiquitylation et dégradation

L'ubiquitylation des IAPs et leur dégradation subséquentes par le protéasome est une des clés majeures de la régulation de l'apoptose. Le domaine RING des protéines de la famille des IAPs est décrit pour induire l'ubiquitylation et la dégradation de ces membres ainsi que celles de leurs substrats (Vaux & Silke 2005).

L'ubiquitylation correspond à l'ajout d'un peptide de 76 acides aminés sur une protéine substrat et nécessite une cascade de trois enzymes connues sous le nom de E1, E2 et E3. Dans la plupart des organismes, une enzyme E1 se lie de manière covalente à une ubiquitine libre *via* le résidu glycine présent à l'extrémité C-terminale de cette dernière et avec consommation d'un ATP. L'ubiquitine ainsi activée va être transférée sur un résidu cystéine d'une UBC E2 (« E2 Ubiquitin-conjugated enzyme ») chargée d'amener le résidu ubiquitine jusqu'à son substrat. Enfin les enzymes de ligation E3, possédant une structure en doigt de zinc, vont transférer le résidu ubiquitine sur le substrat cible. Les protéines mono-, multi-ubiquitylées ne seront pas dégradées par le protéasome. Seuls les substrats poly-ubiquitylés seront dégradés. Pour les autres, l'ubiquitylation entraîne des modifications dans leur état d'activation ou bien dans leur localisation cellulaire.

Suite à des stimuli apoptotiques, notamment intracellulaires, les domaines RING des protéines XIAP et c-IAP1/2 permettent leur ubiquitylation et leur dégradation par le protéasome. D'autres études montrent que XIAP et c-IAP1 peuvent entraîner la dégradation protéosomale, après ubiquitylation, des caspases 3 et 7 augmentant ainsi leurs propriétés anti-apoptotiques.

Cette modification post-traductionnelles est donc à la fois bénéfique et néfaste pour les membres de la famille des IAPs. En effet, en cas de stimulus apoptotiques faibles, le domaine RING des IAPs va leur permettre d'ubiquityler leurs principaux antagonistes à

savoir les caspases 3 et 7. Cependant, en présence d'un fort stimulus apoptotique, ce sont les protéines XIAP et cIAPs1 qui seront dégradées par le protéasome après ubiquitinylation (Hunter et al. 2007).

Il est à noter que la Survivine, semblerait protéger XIAP de la dégradation par ubiquitinylation quand ces deux protéines forment un complexe avec un inhibiteur de XIAP que ce soit Smac/DIABLO ou XAF1. Or, l'interaction de XIAP simplement avec la Survivine semblerait favoriser la dégradation de la Survivine. Cependant, aucun modèle fixe d'interaction n'a encore été élaboré.

V. Dérégulation de l'apoptose dans les cancers

Dans les organismes multicellulaires, la régulation du nombre total de cellules réside dans un équilibre entre la division cellulaire et l'apoptose. Une dérégulation de cet équilibre délicat conduit au développement des cancers. En 1972, la revue de Kerr, Wyllie et Currie a mis en évidence le lien entre l'apoptose et la biologie du cancer (Kerr et al. 1972), lien qui définit l'échappement de la cellule à l'apoptose comme un phénomène oncogénique à part entière participant au processus de tumorigénèse. En effet, une telle désobéissance aux règles d'homéostasie conduit irrémédiablement au chaos.

La dérégulation de l'apoptose peut être initiée par la dérégulation d'une des trois classes protéique qui composent le processus physiologique: les senseurs, les régulateurs et les effecteurs. Une erreur dans l'une de ces classes peut alors avoir des conséquences désastreuses pour la cellule.

Les senseurs:

Ce groupe protéique a pour rôle d'être à l'écoute des facteurs environnementaux intra- et extracellulaires qui ordonnent à la cellule de vivre ou de mourir. Ces senseurs incluent les récepteurs membranaires de survie ou de mort. Des mutations ponctuelles, des délétions dans le récepteur, une amplification génique voire des réarrangements chromosomiques sont autant de causes pouvant être à l'origine d'une transformation

oncogénique. Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) sont souvent touchés et ces altérations peuvent être activatrices et aboutir soit à une activité kinase augmentée soit à une activité kinase constitutive (Blume-Jensen & Hunter 2001). La surexpression des RTK aboutit à l'activation constitutive de la kinase en augmentant la concentration des dimères. Un exemple très décrit dans la littérature est celui d'ERBB2 qui est fréquemment surexprimé dans les cancers du sein, de l'estomac et du poumon (Slamon et al. 1987) (Yarden 2001).

Les régulateurs:

Ce groupe englobe toutes les protéines membre de la famille de Bcl-2 et des IAPs précédemment décrites. La première aberration cellulaire amenant un défaut d'apoptose a été décrite en 1992, date de la découverte de la surexpression de l'oncogène Bcl-2 *via* la translocation chromosomique t(8,14) dans le lymphome folliculaire (Korsmeyer 1992). Cette surexpression masque tous signaux apoptotiques qui seront alors perdus.

Les protéines membre de la famille des IAPs jouent également un rôle central dans la régulation de l'apoptose. L'étude de l'impact de leur niveau d'expression dans le développement et la maintenance des cancers est très étudiée. La fonction oncogénique des IAPs est montrée dans plusieurs études génomiques. Il a été observé dans les glioblastomes, les médulloblastomes ainsi que dans les carcinomes rénaux et pulmonaires, une amplification d'une région chromosomique englobant les gènes c-IAP1 et c-IAP2 (Hunter et al. 2007).

Les effecteurs:

Les effecteurs majeurs de l'apoptose sont les caspases telle que la caspase 3. Même si les caspases sont rarement mutées dans les cancers, ces effecteurs ont des implications cruciales dans la mort cellulaire. En effet, la caspase 3 activée intervient dans l'épissage de l'ARN, la réparation de l'ADN, l'apoptose, ainsi que dans la régulation de certains facteurs de transcriptions (Rb, BRCA1,...). Le gène de la caspase 3 permet deux transcrits: la caspase 3 et la caspase 3s qui est un variant résultant le l'épissage alternatif de l'exon 6. Le variant perd le site catalytique qui conduit à la perte de sa fonction ainsi que le site de clivage entre les deux sous unités. Il a été montré que, contrairement à la caspase 3, la caspase 3s

diminue le clivage de la PARP-1 (« Poly ADP-ribose polymérase-1 »). Des expériences de transfections montrent également que son activité apoptotique est fortement diminuée au profit d'une fonction anti-apoptotique. Il semblerait donc que le variant caspase 3s puisse avoir une fonction antagoniste à la caspase 3 (Huang et al. 2001). Néanmoins, dans les tumeurs du sein, il semblerait qu'une forte expression de caspase 3 s'accompagne d'une faible expression de caspase 3s et inversement. Les patientes à fort taux de caspase 3 et/ou faible taux de caspase 3s répondraient plus favorablement aux traitements à base d'anthracyclines (Vegran et al. 2005).

LA PROTÉINE XIAP

I. Introduction

XIAP est une protéine de la famille des IAPs. Cette protéine est également connue sous le nom de : API3, ILP1, MIMA, XLP2, HILP ou encore BIRC4. Le gène codant pour cette protéine est localisé sur le chromosome X en Xq25 (Lagacé et al. 2001). Chez l'homme, XIAP est exprimée de façon ubiquitaire dans les tissus adultes et fœtaux. En fait, XIAP semble constituer le membre des IAPs qui fournit une protection constante vis-à-vis de l'apoptose dans les cellules saines. Son expression apparaît augmentée dans de nombreuses lignées tumorales, ce qui renforce l'idée que le niveau d'expression de XIAP puisse contrôler le seuil apoptotique des cellules (Liston et al. 1996).

XIAP est le principal inhibiteur des caspases 3,7 et 9 acteur effecteurs majeurs du processus apoptotique. De part sa fonction, une dérégulation de l'expression de cette protéine pourra favoriser une survie cellulaire et, de ce fait, déclencher l'apparition de cancers et/ou participer au développement de ces derniers. En effet, sa surexpression a été montré dans de nombreux cancer tels que le cancer du pancréas (Karikari et al. 2007), dans les carcinomes hépatiques (Shiraki et al. 2003), le mésothéliome (Kleinberg et al. 2007) et le mélanome (Emanuel et al. 2008). XIAP est également décrit comme un marqueur de pronostic indépendant dans les carcinomes rénaux (RCC) avec une corrélation inverse entre le niveau d'expression de XIAP et l'agressivité de la tumeur (Ramp et al. 2004). C'est également le cas dans les leucémies myéloïdes (Tamm et al. 2004a) (Tamm et al. 2004b).

Son rôle dans les cancers est d'autant plus important qu'il induit une résistance aux agents utilisés en chimiothérapie tel que le cisplatine pour le cancer ovarien, ou encore à la gemcitabine pour le cancer du pancréas (Mansouri et al. 2003) (Shrikhande et al. 2006). Sa forte expression dans les cancers et son rôle majeur dans régulation de la survie cellulaire en fait une cible thérapeutique intéressante.

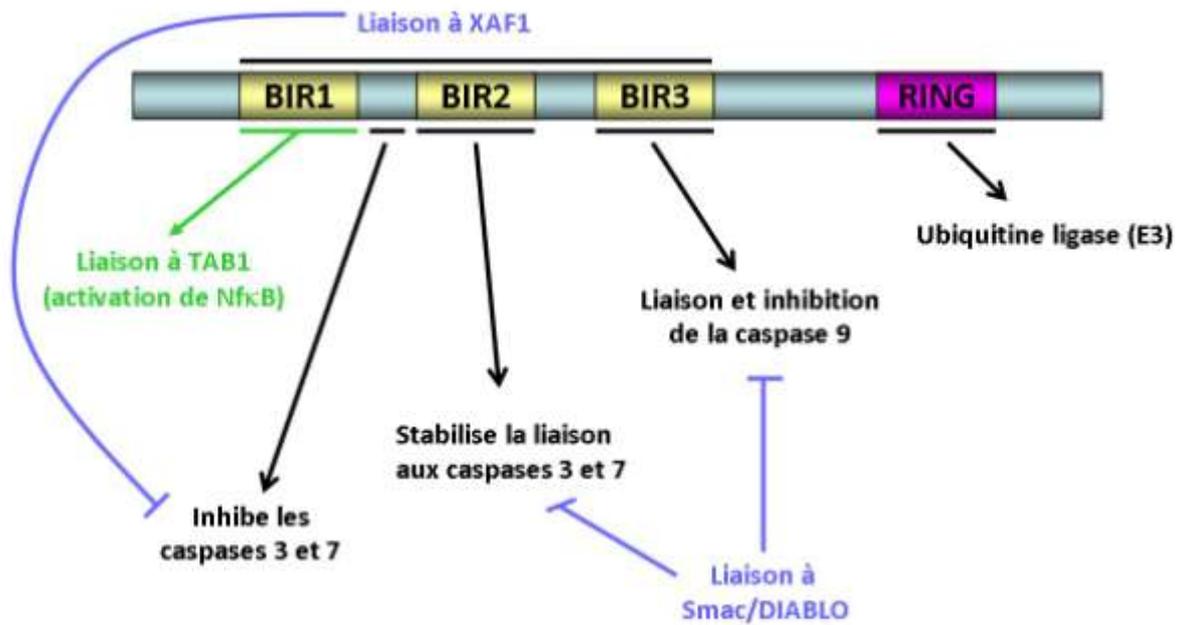
Une mutation de XIAP a été découverte dans le syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X (XLP). Cette mutation induit une diminution du taux de XIAP et ainsi une sensibilité accrue des cellules à la mort apoptotique. Les lymphocytes entrent alors en apoptose sous l'influence de différents stimuli tels que des traitements avec TRAIL ou FasL. Les patients atteints de cette maladie possèdent peu de lymphocytes T « natural killer » (NK) montrant ainsi que XIAP joue également un rôle physiologique important notamment dans la survie des NK (Rigaud et al. 2006)

II. Structure protéique de XIAP

XIAP est une protéine de 54,6kDa (497 acides aminés) qui possède trois domaines BIR et un domaine RING. De plus, XIAP possède un unique site de phosphorylation sur sa sérine 87.

Les domaines BIR de XIAP sont situés en dans la moitié N-terminale de la protéine et sont chacun constitués d'environ 80 acides aminés. Le cœur de chaque domaine BIR est constitué d'une séquence très conservée dans tous les membres des IAPs et riche en histidine et cystéine : $Cx_2Cx_6Wx_3Dx_5Hx_6C$. Ces domaines BIR de XIAP sont indispensables à la réalisation de sa fonction anti-apoptotique du fait qu'ils sont le point de fixation et d'inhibition des caspases (Deveraux et al. 1997). L'analyse par résonance magnétique nucléaire des domaines BIR2 et 3 de XIAP a pu déterminer qu'ils étaient constitués d'un cœur hydrophobe, accueillant un atome de zinc, et flanqués par 4 ou 5 hélices α respectivement ainsi que de 3 feuillets plissés β antiparallèles (Sun et al. 1999) (Figure 33) (Holcik et al. 2001).

XIAP, comme plusieurs autres membres des IAPs, possède un domaine RING à son extrémité carboxy-terminale, impliqué dans la dégradation protéosomale. Le domaine RING est défini par 7 histidines et une cystéine qui coordonnent deux atomes de zinc (Borden 2000). XIAP, par contre, ne possède pas de domaine CARD dans sa structure protéique (Figure 33).



```

1 mtfnsfegsk tcvpadinke eefveefnrl ktfanfpgs pvsastlara gflytgegdt
61 vrcfschaav drwqygdsav grhrkvspnc rfingfylen satqstnsqi qnggykveny
121 lgsrdhfald rpsethady1 lrtgqvvd1s dtiypnrpam yseearlksf qnwpdyahlt
181 prelasagly ytqigdqvc fcogglknw epcdrawseh rrhfpncffv lgrnlirse
241 sdavssdrnf pntnlprnp smadyearif tfgtwiysvn keqlaragfy algedkvkc
301 fhcgggltdw kpsedpweqh akwypgckyl leqkgqeyin nihlthslee clvrttektp
361 sltrriddti fqnpmvqgai rmgfsfkdik kimeekiqis gsnykslevl vadlvnaqkd
421 smqdessqts lqkeisteeq lrllqeeklc kicmdrniai vfvpcghlvt ckqcaeavdk
481 cpmcytvitf kqkifms

```

<p>Domaine BIR-1 (aa 26-93)</p> <p>Domaine BIR-2 (aa 163-230)</p> <p>Domaine BIR-3 (265-330)</p> <p>Domaine RING Zinc Finger (aa 450-485)</p>

Figure 33 : Schémas des domaines structurels de XIAP et leur localisation dans la séquence protéique.

D'après Holcik *et al.*, *Apoptosis*, 2001.

III. Régulation de l'expression

III.1. Régulation traductionnelle par séquence IRES

L'analyse de l'organisation génomique des loci de XIAP, à la fois murin et humain, a été l'instrument de la compréhension de la régulation traductionnelle de l'expression de XIAP. En effet, le gène *XIAP* humain contient une inhabituelle grande, environ 1,7kb, séquence non traduite à son extrémité 5' (« 5' UTR ») qui contient non seulement de nombreux codons d'initiation « hors cadre de lecture » mais également de courtes ouvertures de cadre de lecture (Lagacé et al. 2001). Le gène murin possède une organisation génomique semblable mais avec une région 5'UTR beaucoup plus grande (environ 5,5kb). C'est la comparaison d'homologie de séquence entre les deux espèces qui a permis de trouver la séquence de régulation de *XIAP*. En effet, XIAP est exprimée de façon ubiquitaire dans de nombreux tissus tumoraux alors que sa longue région 5'UTR ainsi que la structure secondaire complexe de sa région promotrice ne favorise pas une traduction classique (Holcik & Sonenberg 2005).

En effet, le mécanisme classique de traduction, avec une entrée du ribosome au niveau de la guanosine, méthylée en position N7, de la coiffe de l'extrémité 5' de l'ARNm grâce aux protéines de la famille eIF (« Eukaryotik translation initiator factor ») est perturbé par une longue région 5'UTR et de nombreux codons initiateurs. Cependant, il existe un mécanisme qui se joue de ces contraintes, il s'agit d'une traduction médiée par un site interne d'entrée du ribosome au sein de la région 5'UTR : la séquence IRES (« Internal ribosome entry site ») (Hellen & Sarnow 2001) (Figure 34). Ce mode de traduction est notamment déclenché lors de conditions de stress cellulaires de courte durée et de faible ampleur. Cela sera notamment le cas lors de privation de sérum pour des cultures ou lors de choc osmotique.



Figure 34 : Schéma des initiations de traduction dépendante et indépendantes de la coiffe.

D'après Holcik, *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2005.

L'ARNm de XIAP possède une séquence IRES fonctionnelle qui débute en position 162 de sa région 5'UTR. Le complexe protéique RNP (« RNA protein ») vient s'accrocher spécifiquement sur le nucléotide en position -162 de la séquence IRES. L'étude par antisens des différents membres possibles de ce complexe a pu mettre en évidence que deux des quatre principaux ITAFs (« IRES *trans*-acting factor ») intervenaient dans la régulation de la traduction indépendante de la coiffe de XIAP. Les ITAFs en question sont l'auto-antigène La et la protéine hnRNPA1 (« Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 ») (Holcik & Korneluk 2000). Ces deux ITAFs interagissent avec la séquence IRES de XIAP à la fois *in vitro* et *in vivo*. Cependant, ces derniers possèdent des rôles antinomiques sur l'ARNm de XIAP. En effet, l'auto-antigène La favorise la traduction IRES de XIAP en favorisant le recrutement du ribosome au niveau de la séquence IRES (Holcik & Korneluk 2000) alors qu'hnRNPA1 inhibe ce mode de traduction lorsqu'il s'accumule dans le cytoplasme (Lewis et al. 2007).

III.2. Régulations post-traductionnelles

Ubiquitinylation de XIAP

La protéine XIAP, comme quatre autres membres de la famille des IAPs, possède un domaine RING dans son extrémité C-terminale. Ce domaine RING a été montré comme

intervenant dans la voie d'ubiquitinylation/dégradation protéosomale (Joazeiro & Weissman 2000).

La découverte de la dégradation protéosomale de XIAP est due aux travaux Yang et de ces collègues où ils ont montré que des thymocytes orientés sur la voie de l'apoptose suite à un traitement avec de la Dexaméthasone pouvaient être sauvés grâce à l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome (Yang et al. 2000). Cette dégradation protéosomale de XIAP est une polyubiquitinylation de type K48, il a noté que des ubiquitinylation de XIAP de type monomérique ont été décrites apparaissant au niveau neuronal à la suite d'un traumatisme crânien (Lotocki et al. 2003).

Yang et ses collègues ont tout d'abord montré, dans un système acellulaire, que XIAP pouvait fonctionner comme une E3 ubiquitine ligase en catalysant son auto-ubiquitinylation (Yang et al. 2000). L'auto-ubiquitinylation de XIAP semble être due aux changements conformationnels qu'induirait la fixation des antagonistes de XIAP possédant un motif IBM (Verhagen et al. 2007). Cependant, d'autres études décrivent le domaine RING de XIAP comme étant nécessaire à son oligomérisation (Silke et al. 2005) et à son interaction avec c-IAP1. De ce fait, il semblerait donc difficile que XIAP puisse s'auto-ubiquitinyler *in vitro*. Il s'agirait donc que la dégradation de XIAP par le protéasome soit plutôt due au recrutement d'une autre E3 ligase telle que c-IAP1 par XIAP.

Phosphorylation de XIAP

L'apoptose est négativement régulée en partie par Akt que ce soit en pré-mitochondrial ou en post-mitochondrial. En effet, en amont de la mitochondrie Akt phosphoryle des protéines telles que Bad ou GSK-3 (Glycogen synthase kinase -3 »). XIAP est phosphorylée sur son résidu sérine 87 (S87) entre les domaines BIR2 et BIR3 par Akt. La phosphorylation des cibles d'Akt a lieu au niveau de la séquence consensus suivante : R-x-R-x-x-S/T). La phosphorylation de Bad par exemple, sur sa sérine 136, induit l'interaction de cette dernière avec la protéine 14-3-3 au niveau cytosolique et inhiber la fonction pro-apoptotique de ce membre de la famille Bcl-2 (Datta et al. 1999).

L'activation de la voie NFκB induit une augmentation du niveau d'ARNm de XIAP (Deveraux & Reed 1999). Du fait de son activité E3 d'ubiquitine ligase, XIAP peut soit s'auto ubiquitinyler soit être ubiquitinylée par des protéines telle que la sérine protéase HtrA2/Omi. Cette ubiquitinylation de XIAP, et donc sa dégradation, est régulée par les 2 isoformes d'Akt, Akt1 et Akt2. En effet, ces 2 isoformes d'Akt phosphorylent de façon directe XIAP sur sa sérine 87 inhibant ainsi l'activité d'ubiquitinylation de XIAP (Dan et al. 2004). La phosphorylation de XIAP permet une stabilisation de cette protéine et un renforcement de l'inhibition de l'activité des caspases et ce même en présence d'agents génotoxiques tel que le cisplatine (Dan et al. 2004).

IV. Fonctions cellulaires

IV.1. Inhibition de l'apoptose et antagonistes

Tous les signaux apoptotiques convergent vers les caspases faisant de ces protéases les effecteurs ultimes de la mort cellulaire programmée. Il est absolument indispensable que tout au long de la vie d'un organisme, aussi bien lors de son développement qu'au niveau de son homéostasie tissulaire, les caspases soient finement régulées. Les IAPs suppriment effectivement l'apoptose induite par une grande variété de stimuli depuis l'activation des récepteurs de mort en passant par la carence en facteur de croissance et le dommage à l'ADN. La protéine XIAP, quant a elle été décrite pour inhibée un large panel d'inducteurs d'apoptose comprenant les radiations ultraviolets, le TNFα, le FasL ou bien l'étoposide par exemple. Le point central de cette capacité de XIAP réside dans ses domaines BIR qui ont été décrits comme interagissant directement avec les caspases initiatrices ou effectrices.

Inhibition des caspases 3 et 7

La protéine XIAP inhibe les caspases effectrices 3 et 7 par une interaction directe entre ses acides aminés 124-240 et une poche hydrophobe de ces protéases. Le domaine

BIR2 de XIAP ne comprenant que les résidus 155 à 325, l'interaction protéique entre XIAP et ces caspases effectrices nécessite plus que le domaine BIR2 proprement dit. En effet, les acides aminés en position N-terminale précédant le domaine BIR2 forment un « linker » permettant l'accrochage de XIAP dans une poche hydrophobe formée à la surface des caspases 3 et 7 (Figure 35)(Shiozaki & Shi 2004) (Riedl et al. 2001).

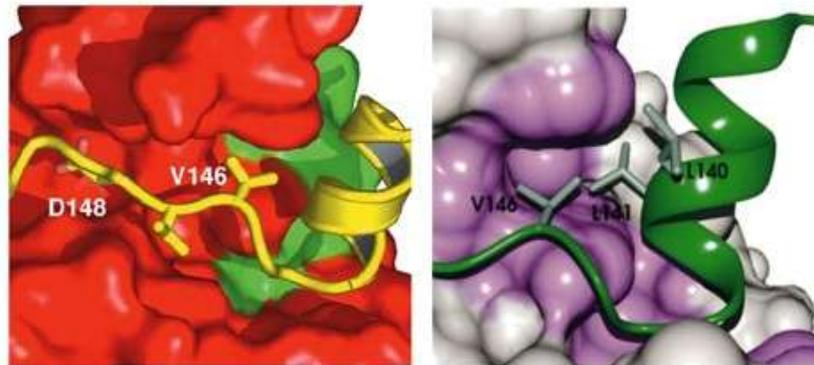


Figure 35 : Modélisation des interactions entre le « crochet » de XIAP et les sillons des caspases 3 et 7.

D'après Shiozaki *et al*, *Trends Biochem Sci*, 2004 et Riedl *et al*, *Cell*, 2001.

En effet, l'interaction de XIAP avec les caspases 3 et 7 suit le même principe, il s'agit d'inhiber le site actif de la protéase. Les sites actifs de ces protéases sont des sites conservés entre ces deux protéases et forment des sillons à la surface des caspases constitués des acides aminés suivant : L290, Y338, W340 et F381 pour la caspase 3 et L191, Y230, W231 et F282 en ce qui concerne la caspase 7. Deux acides aminés du « linker » précédant le domaine BIR2 de XIAP sont importants pour l'interaction avec les caspases 3 et 7 et forment un crochet à la surface de la protéine. Il s'agit des acides aminés suivant : L141 et V146. La mutation de l'un de ces deux acides aminés inhibe totalement l'interaction XIAP/Caspase3-7 (Riedl et al. 2001) (Chai et al. 2001).

Dans ces interactions entre XIAP et les caspases 3 et 7, le domaine BIR2 n'intervient pas donc pas à proprement parler dans l'inhibition des caspases. Cependant, la présence du domaine BIR2 est indispensable pour la réalisation et la stabilisation de ces interactions. En

effet, l'utilisation d'un peptide dont le BIR2 a été enlevé pour ne laisser que le « linker » est incapable de se fixer et donc d'inhiber les caspases (Chai et al. 2001).

Inhibition de la caspase 9 et interaction avec les antagonistes

Les interactions de XIAP au niveau de son domaine BIR3 se font par liaison avec des protéines portant un motif IBM. Ce motif est présent en position N-terminale et le premier résidu exposé de ce motif est invariablement une alanine. Cette exposition est obtenue soit par un clivage post-traductionnel soit par l'élimination de la méthionine initiatrice. Ce résidu alanine est compris dans un motif consensus de 4 résidus : A(K/T/V/I)(P/A/E)(F/E/S/Y).

Ce motif est retrouvé dans le principal inhibiteur de XIAP, Smac, par la séquence AVPI. Il est également présent chez Omi sous la forme AVPS. Il est à noter que ce motif IBM est également présent dans les caspases et, en ce qui concerne la caspase 9, le motif IBM est constitué des acides aminés ATPF mais ce motif n'est exposé qu'après activation de la forme zymogène de la caspase 9 (Shiozaki & Shi 2004). Les séquences de Smac et d'Omi sont exposées après leur import au niveau de la mitochondrie suite au clivage de leur séquence d'adressage vers cet organite cellulaire. Lorsqu'une cellule s'engage sur la voie de l'apoptose, ces molécules matures sont relarguées depuis l'espace intermembranaire vers le cytosol où elles vont se fixer au niveau des domaines BIR2 et BIR3 de XIAP *via* son motif de liaison IBM. La liaison au domaine BIR3 de XIAP par l'intermédiaire d'un motif IBM a été décrite par Srinivasula et Shiozaki de façon biochimique et structurale (Srinivasula et al. 2000) (Shiozaki & Shi 2004). Le premier résidu, l'alanine, du motif IBM vient s'insérer dans la poche hydrophobe, de la surface du domaine BIR3 de XIAP, formée par les acides aminés G314, W323, P325, G326, L344 et H343 et y former des liaisons hydrogènes. L'étude structurale a permis de déterminer que seul un résidu alanine libre pouvait former cette interaction stable. En effet, le remplacement de l'alanine de la séquence AVPI de SMAC par une méthionine ou une glycine empêche toute interaction avec le domaine BIR.

Il est important de préciser que ce même sillon que forme la poche hydrophobe à la surface du domaine BIR3 de XIAP est également le site d'interaction avec le motif IBM

d'autres protéines telles qu'Omi ou les caspases. L'interaction entre un motif IBM et un domaine BIR est exclusive. De ce fait, l'interaction de la protéine Smac mature ou d'un peptide ne contenant que le domaine IBM de Smac avec le domaine BIR3 de XIAP sera suffisante pour bloquer l'interaction de la caspase 9 avec XIAP et ainsi libérer le site d'homodimérisation de la caspase (Srinivasula et al. 2001) (Figure 36). De plus, la protéine Smac existant sous forme de dimère en solution dans le cytosol, deux molécules de Smac pourront donc inhiber une molécule XIAP en se fixant sur le domaine BIR2, et le linker adjacent, ainsi que sur le domaine BIR3. Cette double interaction de Smac avec XIAP permet la formation d'un complexe stable ayant avec une affinité environ mille fois supérieure à celles que pourraient fournir des interactions IBM/BIR2 et IBM/BIR3 séparées.

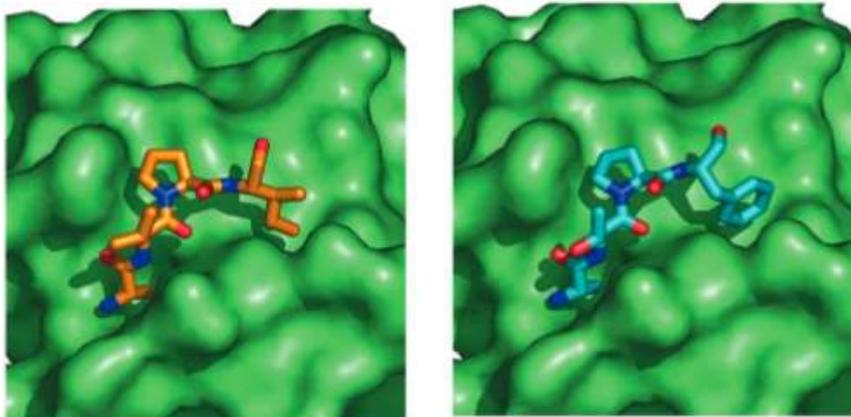


Figure 36 : Modélisation des interactions du domaine BIR3 de XIAP et des motifs IBM de Smac et de la caspase 9 respectivement.

D'après Shiozaki *et al*, *Trends Biochem Sci*, 2004.

IV.2. Rôle de XIAP dans la prolifération cellulaire

Le domaine BIR1 de XIAP, quant à lui, n'est pas impliqué dans des interactions avec des molécules directement impliquées dans l'exécution du programme apoptotique. En effet, le domaine BIR1 de XIAP ne fixe pas les protéines possédant un motif IBM.

Par l'intermédiaire de son domaine BIR1, XIAP prend part à la régulation de la voie du TGF- β . La voie de signalisation du TGF- β génère des signaux régulant les voies de

prolifération, de différenciation et de morphogénèse. Cette voie de signalisation a pour point de départ deux types de récepteurs : I et II (Figure 37).

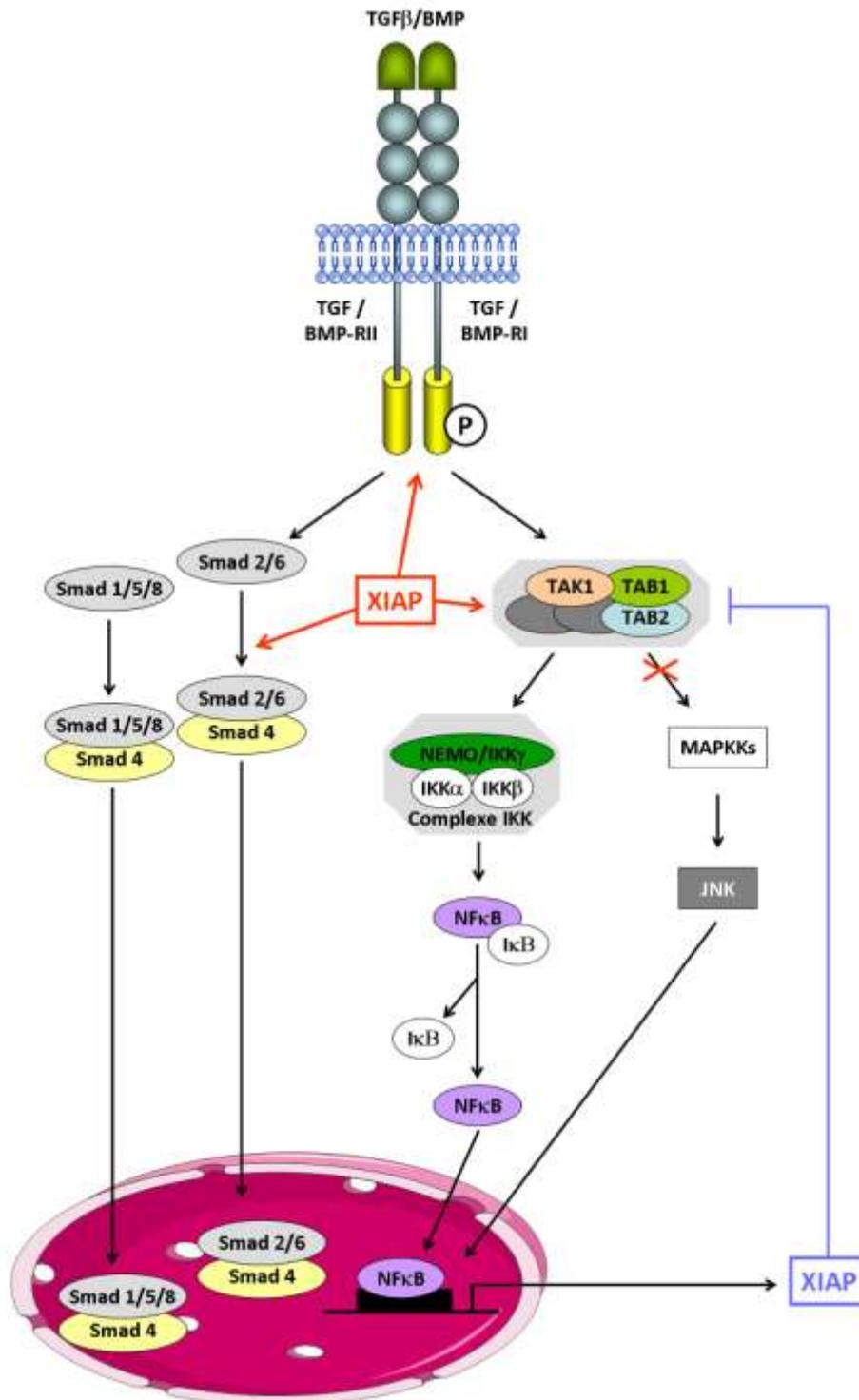


Figure 37 : Schéma de la régulation de la voie du TGFβ par XIAP.

D'après Dubrez-Daloz *et al.*, *Cell Cycle*, 2008.

La fixation du ligand induit la formation d'un complexe hétérodimérique où le récepteur de type II active son partenaire de type I par phosphorylation et de ce fait initie la cascade de la voie de signalisation. La partie intracellulaire de cette voie de signalisation se sépare en deux branches. La première partie implique les protéines de la famille Smad. XIAP a été décrite comme interagissant avec le récepteur TGF- β R1 par l'intermédiaire de son domaine BIR. Après stimulation, les récepteurs au TGF- β recrutent et phosphorylent les protéines Smad qui vont s'hétérodimériser avec la protéine Smad4 pour pouvoir migrer dans le noyau où elles participeront à des complexes de transcription. XIAP permet l'activation du promoteur 3TP-Lux par l'intermédiaire de Smad4 (Birkey Reffey et al. 2001).

L'autre partie de la voie implique directement la protéine NF κ B. L'activation de la voie NF κ B comme décrit précédemment mène à l'établissement de boucles régulatrices négatives et positives. En effet, la transcription de *NF κ B* induit l'activation de la protéine TAK1 (« TGF β -activating kinase 1 ») qui, une fois complexée à ses partenaires TAB1 et 2 (« TAK1 binding 1/2 »), active en IKK2 (« I κ B kinase kinase 2 ») qui va phosphoryler I κ B α , un inhibiteur direct de NF κ B, et donc induire la libération de NF κ B. XIAP, grâce à son domaine BIR1, interagit avec la protéine TAB1 ce qui induit l'activation de la voie de signalisation NF κ B (Lu et al. 2007) (Hofer-Warbinek et al. 2000). La transcription du gène *NF κ B* ainsi induite va augmenter l'expression de XIAP qui, dans une boucle de régulation négative cette fois, ubiquitinye TAK1 et favorise sa dégradation par le protéasome conduisant ainsi à l'inhibition de la voie JNK induite par le TGF β .

V. Les inhibiteurs endogènes de XIAP

Plusieurs protéines jouent un rôle crucial en maintenant un équilibre au niveau de la balance entre trop et pas assez d'apoptose. Afin de maintenir cette balance à l'équilibre, des protéines agissent en tant qu'inhibiteurs des IAPs et notamment XIAP.

V.1 L'inhibiteur Smac/DIABLO

Smac/DIABLO (« Second mitochondrial activator of caspase »)/(« Direct IAP binding protein with low PI ») est une protéine mitochondrial de 25kDa qui permet le déclenchement de l'apoptose en prévenant l'inhibition des caspases, notamment par XIAP (Verhagen et al. 2000).

Smac subit, tout d'abord, une maturation dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie par clivage d'une séquence de 55 acides aminés en position N-terminale. Cette maturation permet le relargage de Smac, en réponse à un signal apoptotique, dans le cytosol par le biais des pores formés par Bax et Bak. Une fois dans le cytoplasme, Smac interagit avec les domaines BIR2 et BIR3 de XIAP *via* son motif IBM, comme détaillé précédemment. La fixation de Smac au niveau des domaines BIR de XIAP empêche cette dernière de pouvoir s'accrocher sur les caspases 3, 7 et 9. Cependant, la fixation de Smac permet également l'inhibition de l'activité d'auto-ubiquitylation de XIAP ainsi que de son activité d'ubiquitine ligase envers ces caspases (Creagh et al. 2004).

De nombreuses études sont en cours à l'heure actuelle pour la synthèse de composés chimiques dit « Smac mimétiques » afin de permettre relancer l'induction d'apoptose dans des cellules tumorales exprimant une très forte quantité de XIAP (Sun et al. 2008).

V.2 L'inhibiteur HtrA2/Omi

HtrA2/Omi (« High-temperature requirement A2 ») est une protéine de 49kDa présente dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Une faible fraction d'Omi est cependant détectée à l'état basal dans le noyau de cellules saines. La séquence d'ancrage membranaire que possède Omi à la suite de la séquence d'adressage mitochondriale (MLS) lui permet de se fixer dans la membrane interne de la mitochondrie afin de subir une étape de maturation. Cette maturation, qui a lieu dans l'espace intermembranaire, permet le retrait des 133 premiers acides aminés de la protéine, ce qui englobe la séquence d'adressage mitochondrial afin d'exposer le motif IBM d'Omi. Il semblerait que cette étape

de maturation soit réalisée par la protéine HtrA2 elle-même grâce à une activité d'autocatalyse (Seong et al. 2004).

Le dommage à l'ADN ou l'activation des récepteurs de mort, par exemple, sont responsables du déclenchement du relargage d'HtrA2 dans le cytosol où il contribue au déclenchement de l'apoptose grâce à des mécanismes à la fois dépendants et indépendants des caspases. HtrA2 permet le retour de l'activité des caspases en libérant les caspases 3, 7 et 9 de leur séquestration par XIAP en dégradant cette dernière grâce à son activité protéase (Srinivasula et al. 2003).

V.3. L'inhibiteur XAF1

XAF1 (« XIAP-associated factor 1 ») est une protéine de 33,1kDa possédant cinq doigts de zinc sur sa partie N-terminale et qui a été identifiée lors d'une étude de doubles hybrides chez la levure par sa capacité à se lier à XIAP et à antagoniser sa capacité d'inhibiteur d'activité caspase *in vitro* (Holcik et al. 2001). XAF1 dont la localisation basale est nucléaire permet une relocalisation de XIAP du cytoplasme vers le noyau afin de l'empêcher d'inhiber les caspase (Liston et al. 2001).

La protéine XAF1 est exprimée de façon ubiquitaire dans l'ensemble des tissus normaux mais n'est présent qu'en concentration très faible voire indétectable, dans de nombreuses lignées tumorales (Liston et al. 2001). Cette faible expression de XAF1 dans les cancers est expliquée par le fait que le promoteur du gène même de *xaf1* est hyperméthylé dans des régions CpG en conditions basales dans les lignées tumorales et un traitement avec de la 5-azadeoxycytidine (un agent déméthylant) permet de récupérer un niveau d'expression comparable à celui des tissus sains (Lee et al. 2006). Le gène de *xaf1* est, de plus, situé en 17p13.2, une région souvent associée à une perte d'hétérozygotie dans les cancers ce qui confère une sensibilité à l'apoptose médiée par Fas (Lareef et al. 2004).

XAF1 se lie avec la protéine XIAP par l'interaction de ces doigts de zinc avec le domaine BIR2 de cette dernière et ne possède pas de motif IBM. La fonction d'inhibition de

XIAP par XAF1 ne semble donc pas redondante avec celle de Smac ou d'HtrA2 mais plutôt coopérative. XAF1 a été décrit comme étant induit par l'interféron β (« INF β ») et cela semble contribuer à sensibiliser les cellules aux effets pro-apoptotiques de TRAIL (« TNF-related-apoptosis-inducing-ligand ») (Leaman et al. 2002). Enfin, une étude récente indique qu'il semblerait y avoir une interaction entre CHK1 et XAF1 lors de la phase G2/M du cycle cellulaire induisant l'inactivation de CDC25C et donc celle du complexe CDC2/CyclineB. Une surexpression de XAF1, d'après les auteurs de l'étude, conduirait à un arrêt en G2/M suivi d'une catastrophe mitotique (Wang et al. 2009).

VI. les inhibiteurs synthétiques de XIAP

Une des approches possibles dans le ré-établissement du processus apoptotique dans les cellules tumorales réside dans de petites molécules chimiques désignées pour mimer l'activité anti-apoptotique de Smac envers des membres de la famille des IAPs tels que XIAP, cIAP1 et cIAP2. En effet, ces petites molécules mimétiques de synthèse ont été développées afin de mimer la séquence AVPI de la protéine Smac mature ce qui leur permet, bien que leurs structures chimiques soient différentes de pouvoir, tout comme Smac, interagir avec le domaine BIR de ces membres de la famille des IAPs. De façon surprenante, la mort observée suite à l'utilisation de ces inhibiteurs synthétiques de XIAP ne dépend pas de la caspase 9 mais de la caspase 8 (Petersen et al.2007) (Varfolomeev et al.2007). L'utilisation de siRNA dirigés contre les différents récepteurs de mort a mis en évidence que seule la déplétion en TNFR1 était capable de prévenir la survenue de l'apoptose lors de l'utilisation de ces Smac mimétiques (Petersen et al.2007)(Varfolomeev et al.2007)(Vince et al.2007). De plus, il a été constaté par ces trois mêmes équipes que ces inhibiteurs synthétiques, en plus d'inhiber XIAP afin de lever l'inhibition de la caspase 9, ciblaient cIAP-1 et cIAP-2 afin de stimuler leur auto-ubiquitylation et, de ce fait, induire leur dégradation par le protéasome et provoquer l'activation de NF κ B et la sécrétion de TNF α . Cette sécrétion de TNF α conduit, quant à elle, à l'activation de la caspase 8 et à la mort cellulaire.

La protéine Survivine

I. Introduction

Découverte en 1997, la Survivine, aussi nommée BIRC5 (« Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat containing 5 ») est un membre de la famille des IAPs. Chez l'Homme, le gène de la Survivine est localisé en 17q25. Elle a été découverte lors du criblage d'une banque génomique humaine avec une sonde correspondant à l'ADNc du gène *EPR-1* (« Effector cell protease receptor-1 ») (Ambrosini et al. 1997). Bien que le rôle de la relation entre les gènes *Survivine* et *EPR-1* reste encore un mystère, il est possible que ces deux gènes puissent se réguler l'un l'autre. Même si peu d'études ont été menées sur ce sujet, il semblerait que la Survivine soit l'antisens naturel de *EPR-1* et inversement (Ambrosini et al. 1998).

L'expression tissulaire de la Survivine est atypique (Ambrosini et al. 1997). En effet, fortement exprimée lors de l'embryogénèse et de la vie fœtale, elle est absente des cellules quiescentes et des cellules différenciées chez l'adulte à l'exception de certains types cellulaires ayant un fort potentiel de renouvellement cellulaire (thymocytes, cellules CD34+, cellules basales du colon,...). Dans les cellules proliférantes, l'expression de la Survivine varie en fonction des phases du cycle. Ainsi, l'expression de la Survivine est indétectable durant la phase G1, très faible lors de la phase S et présente une forte expression en G2/M (Li et al. 1998).

Initialement décrite comme un acteur de la survie des cellules cancéreuses, ce qui est à l'origine de son nom, la Survivine se trouve au carrefour de la régulation de processus cellulaires essentiels tels que le cycle et la mort cellulaire. Son rôle dans le développement embryonnaire et fœtal est également crucial. En effet, les souris déficientes pour cette protéine ne survivent pas au-delà du 5^{ème} jour embryonnaire (Uren et al. 2000). En revanche, la Survivine est retrouvée peu voire pas exprimée dans les tissus différenciés adultes. Une forte expression de la Survivine est cependant observée dans les cellules transformées ainsi

que dans la plupart des cancers humains qu'ils soient solides ou d'origine hématopoïétiques. Des études génomiques ont montré que le gène de la Survivine est le quatrième le plus fréquemment et le plus abondamment exprimé dans les tumeurs (Velculescu et al. 1999). La surexpression de cette protéine dans les tumeurs est actuellement largement étudiée. D'ailleurs, son intérêt pronostique est validé dans plusieurs types de cancers, et le ciblage thérapeutique de la Survivine est actuellement en cours d'évaluation clinique.

De part ses multiples fonctions, la Survivine, est au centre d'un réseau fonctionnel pro-tumoral qui fait d'elle une cible thérapeutique particulièrement pertinente dans le cancer (Altieri 2008). La Survivine est maintenant considérée comme un antigène tumoral universel et pourrait être une bonne candidate pour l'immunothérapie (Andersen et al. 2007).

II. La structure protéique

La Survivine est une petite protéine de 16.5kDa constituée de 142 acides aminés. Elle est composée de 3 domaines principaux : un domaine BIR en N-terminal (16-88), une séquence NES (« Nuclear Export Sequence ») et une extrémité C-terminale en hélice α (100-142). Le domaine BIR est à l'origine de l'homodimérisation de la Survivine ainsi que des interactions protéiques, l'hélice α est responsable de sa localisation et de son interaction avec les microtubules et enfin, la séquence NES permet l'exportation de la protéine hors du noyau (Li et al. 1998) (Colnaghi et al. 2006). Hormis ces domaines, la Survivine ne possède aucun d'autre domaine commun aux membres de la famille des IAPs que peuvent être les domaines RING, impliqué dans la dégradation protéosomale ou le domaine CARD qui permet certaines interactions protéiques. Cette protéine n'est pas membranaire car elle est dépourvue de séquences d'insertion membranaire (Ambrosini et al. 1997).

L'analyse de la structure tridimensionnelle de la Survivine murine et humaine ont été menées par cristallographie (Muchmore et al. 2000) (Verdecia et al. 2000) (Chantalat et al. 2000). Ces études ont montré que le domaine BIR de la Survivine ressemble au domaine BIR 2 de XIAP qui est impliqué dans l'inhibition directe de la caspase 3 (Sun et al. 1999).

Néanmoins, la Survivine ne possède pas les quelques acides aminés en amont du domaine BIR qui sont nécessaires pour l'interaction directe avec la caspase 3.

III. Régulation de l'expression

III.1. Régulation transcriptionnelle

Le promoteur du gène Survivine

- Régulation dépendante du cycle cellulaire

Les études menées sur le promoteur du gène de la Survivine ont permis de comprendre une partie de la régulation de ce gène, notamment les raisons de son expression restreinte aux cellules proliférantes. Le promoteur du gène de la Survivine comporte de nombreux sites de fixation pour les facteurs de transcription SP1 (« Specificity protein-1 ») dont deux semblent indispensables pour une transcription basale du gène. Ce promoteur est également composé de trois régions CDE (« Cell cycle-dependant element ») et d'une région CHR (« Cell cycle homology region ») (Li & Altieri 1999). La présence de ces dernières explique la dépendance de l'expression de la Survivine au cycle cellulaire. D'ailleurs, l'expression de la Survivine peut être abolie par la mutation de ses régions CDE (Li et al. 1998) (Figure 38) (Romagnoli et al. 2008).

La dépendance au cycle cellulaire est renforcée par la contribution des voies p53 et Rb/E2F dans la régulation transcriptionnelle de ce gène. De façon directe, p53 peut se fixer sur le promoteur du gène Survivine et ainsi bloquer sa transcription (Hoffman et al. 2002). De façon indirecte, p53 peut *via* p21 inhiber certaines CDKs et par conséquent empêcher la phosphorylation de Rb (Löhr et al. 2003). Rb hypophosphorylé peut alors se fixer sur le promoteur du gène de la Survivine accompagné de ses co-represseurs (E2F5, E2F6) et en bloquant les activateurs E2F1, E2F2 et E2F3, ce qui a pour effet de bloquer la transcription du gène de la Survivine (Jiang et al. 2004) (Figure 38).

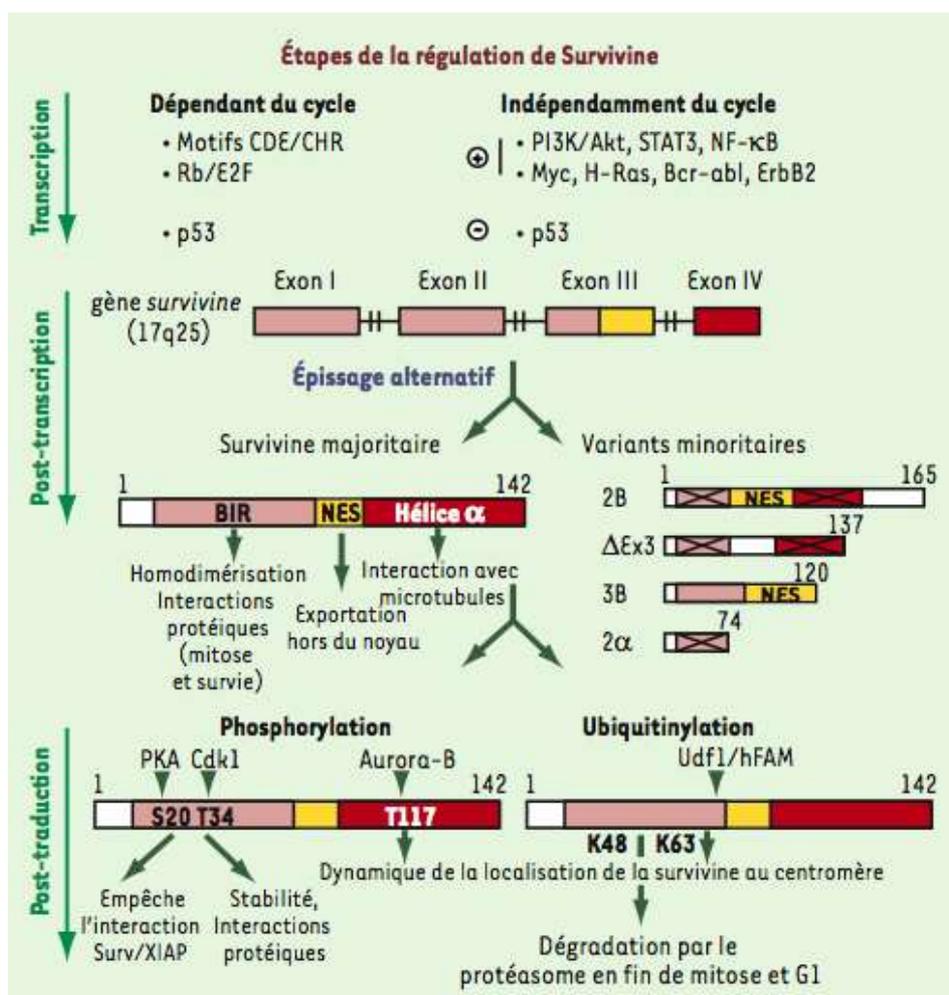


Figure 38 : Différents niveaux de régulation de l'expression et de l'activité de la Survivine.

D'après Romagnoli *et al.*, *Medecine/Sciences*, 2008.

- Régulation indépendante du cycle cellulaire

Dans les cellules tumorales, la Survivine est exprimée de façon aberrante et indépendamment du cycle cellulaire. En effet, des souris transgéniques « knock-in » exprimant le gène *da* la GFP (« Green fluorescent protein ») sous le contrôle du promoteur proximal de la Survivine (dépendant du cycle cellulaire) expriment la GFP dans les cellules en mitose, permettant ainsi de différencier une induction d'expression de la Survivine dépendante ou non du cycle cellulaire (Xia & Altieri 2006). Les résultats ont montré que l'expression de la Survivine dans les cellules embryonnaires est indépendante du cycle et que la Survivine est absente des cellules murines adultes conformément à la littérature. Lorsque ces souris développent un adénome intestinal, les cellules tumorales expriment

fortement la Survivine sans marquage GFP, démontrant ainsi que la dérégulation de l'expression de la Survivine dans les tumeurs est indépendante du cycle cellulaire. Cette étude, comme d'autres, souligne l'augmentation aberrante de la transcription du gène de la Survivine (jusqu'à 400 fois) dans les cellules tumorales *in vivo* et *in vitro* (Bao et al. 2002) (Yang et al. 2004) (Xia & Altieri 2006).

Dans les tumeurs, la perte de fonctionnalité des protéines p53 et Rb a été mise en cause dans l'augmentation de la transcription du gène de la Survivine (Hoffman et al. 2002) (Mirza et al. 2002) (Jiang et al. 2004) (Xia & Altieri 2006) (Végran et al. 2007). D'ailleurs, les études menées par CHIP (« Chromatin immunoprecipitation ») et mutagenèse dirigée ont montré un chevauchement des sites de p53 et E2F1 dans le promoteur Survivine. De ce fait, p53 pourrait prévenir l'expression de la Survivine en empêchant la fixation d'E2F1 (Hoffman et al. 2002).

Dans les cancers, l'activation de nombreuses voies de signalisation et l'expression anormale de certains oncogènes sont impliquées dans la régulation de l'expression de la Survivine. En effet, sa transcription peut être induite directement par plusieurs facteurs tels que : STAT3 (Gritsko et al. 2006), HIF-1 α (Peng et al. 2006), c-myc (Cosgrave et al. 2006), E2F1 (Dasgupta et al. 2006), DEC (Li et al. 2006), KLF5 (Zhu et al. 2006), sous l'effet de l'activation des voies : JAK2/STAT3, PI3K/Akt, MAPK, NF κ B. De plus, les oncogènes Bcr/Abl (Wang et al. 2005), H-Ras (Sommer et al. 2007), K-Ras (Sarthy et al. 2007) et ERBB2 (Xia et al. 2006) ont été décrit comme étant impliqués dans la chimiorésistance en partie via la dérégulation de l'expression de la Survivine.

Par conséquent, l'expression de la Survivine est induite par de nombreuses voies de signalisation, de nombreux oncogènes et est réprimée par de nombreux suppresseurs de tumeurs. Dans les cancers, les oncogènes sont souvent dérégulés et les suppresseurs de tumeurs inhibés, ceci conduisant à une dérégulation inévitable du gène de la Survivine.

Les variants d'épissage de la Survivine

Le gène de la Survivine est composé de 4 exons et de 3 introns (Ambrosini et al. 1997). L'épissage alternatif de ce gène permet l'obtention de 4 variants (2B, DEx3, 3B et 2a) en plus de la forme originelle de la Survivine. Ces variants sont exprimés à des niveaux nettement inférieurs à ceux de la forme majoritaire.

La Survivine-2B (165 acides aminés) possède un domaine BIR non fonctionnel. Cette protéine est majoritairement cytoplasmique et semble pouvoir se fixer aux microtubules. De part sa localisation (identique à celle de la forme majoritaire), la Survivine-2B pourrait constituer un dominant négatif naturel de la Survivine (Mahotka et al. 2002) (Li 2005). De plus, il a été récemment montré que ce variant aurait des propriétés pro-apoptotique et anti-mitotique (Ling et al. 2007).

La Survivine-DEx3, de part la perte de l'exon 3, possède un domaine BIR non fonctionnel ainsi qu'un décalage de l'ORF qui altère la séquence NES et l'hélice α . Le rôle de ce variant est controversé (Knauer, Bier et al. 2007).

Le variant 3B de la Survivine est issu de l'insertion d'un exon (3B) entre ses exons 3 et 4 qui produit un codon stop. La protéine qui en résulte est tronquée et a perdu l'hélice α . Son domaine BIR et sa séquence NES sont fonctionnels. Cette protéine cytoplasmique conserve les mêmes fonctions que la Survivine majoritaire *via* son domaine BIR (Knauer, Bier et al. 2007).

La Survivine-2a possède les deux premiers exons ainsi qu'une partie de l'intron 2 qui introduit un codon stop et entraîne la traduction d'une protéine tronquée. Ce variant est localisé à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Même si cette protéine ne possède ni domaine BIR, ni séquence NES, ni hélice α , une étude a montré une interaction avec la Survivine majoritaire responsable d'une diminution de l'activité de cette dernière (Caldas et al. 2005).

Une étude fonctionnelle comparative a montré que seul le variant 3B possède des propriétés biologiques, à la fois mitotiques et anti-apoptotique proches de celles de la Survivine, probablement lié au fait que ce variant conserve une localisation et une fonction similaires à la Survivine majoritaire (Knauer, Bier et al. 2007).

III.2. Régulations post-traductionnelles

Phosphorylation

Le domaine BIR de la Survivine est phosphorylé sur la thréonine 34 par CDK 1 avec laquelle elle interagit uniquement lors de la phase G2/M. Cette phosphorylation stabilise la Survivine uniquement pendant la mitose. Une mutation ponctuelle de la Survivine en T34A (non phosphorylable) a pour effet d'induire la mort des cellules tumorale (O'Connor et al. 2000). En effet, il a été montré récemment que ces mutants non phosphorylables T34A provoquaient une augmentation de la prolifération et une induction de l'apoptose alors que des mutants phosphomimétiques T34E retardaient la croissance cellulaire et déclenchaient la survie cellulaire (Barrett et al. 2009).

La Survivine peut également être phosphorylée durant la mitose par Aurora B sur son résidu thréonine 117 (C terminal) (Wheatley et al. 2004). Cette phosphorylation affecte la localisation de la Survivine au niveau des centromères des chromosomes (Wheatley et al. 2007) (Delacour-Larose et al. 2007). Effectivement, l'utilisation de mutant T117A (non phosphorylable) et T117E (mimant la phosphorylation) montre que cette phosphorylation est indispensable au décrochage de la Survivine du centromère en métaphase.

Enfin, récemment, un troisième site de phosphorylation a été identifié dans le domaine BIR. Le résidu sérine 20 est alors phosphorylé par la PKA (« Cyclic AMP-dependent protein kinase A ») ce qui interfère sa capacité d'interaction protéique *via* le domaine BIR. En effet, la phosphorylation de la sérine 20 empêche l'interaction Survivine-XIAP (Dohi et al. 2007).

Ubiquitylation

L'ubiquitylation est un événement post-traductionnel important pour la dégradation protéique par la protéasome, mais ce n'est pas son unique rôle. Ainsi, certains types d'ubiquitylation peuvent aussi intervenir dans la modulation de l'activité des protéines. La Survivine possède un temps de $\frac{1}{2}$ vie courte (30 minutes) et le protéasome intervient dans sa dégradation protéique durant la phase G1 du cycle cellulaire.

La Survivine semble être poly-ubiquitylée sur plusieurs de ses résidus lysines *via* des ubiquitylation de type K48 (Zhao et al. 2000). L'interaction de la Survivine avec Smac/DIABLO favorise son ubiquitylation et sa dégradation par le protéasome (McNeish et al. 2005).

La poly-ubiquitylation de la Survivine à travers des liaisons K63 des protéines d'ubiquitine est impliquée dans les processus d'alignement des chromosomes et de leur ségrégation au cours de la mitose (Vong et al. 2005). En effet, cette poly-ubiquitylation par Ufd1 est nécessaire à son association aux centromères alors que sa dé-ubiquitylation par hFAM est requise pour la dissociation de ces structures. Ce type d'ubiquitylation n'affecte pas le rôle de la Survivine dans le processus de cytodierèse. Contrairement à l'ubiquitylation de type K48, la stabilité de la Survivine n'est pas modifiée par l'ubiquitylation de type K63 qui interfère plutôt dans la capacité d'interaction et de localisation pendant la mitose.

IV. Fonctions cellulaires

De très nombreuses publications ont montré que la Survivine protège les cellules normales et transformées de l'apoptose par l'utilisation de différentes approches expérimentales (Altieri 2006b). Cependant, le rôle de la Survivine ne se restreint pas à son rôle dans l'inhibition de l'apoptose. En effet, la première analyse fonctionnelle de la Survivine par transfection de cette protéine dans une lignée pré-B dont la croissance est dépendante de l'IL-3 a mis en évidence que, bien que moins efficace que Bcl-2, la Survivine

prolonge significativement la croissance ainsi que la viabilité des transfectants stables privés d'IL-3 (Ambrosini et al. 1997). La Survivine joue donc un rôle cellulaire au niveau de l'inhibition de l'apoptose et au niveau de la croissance cellulaire.

IV.1. Cycle cellulaire

Membre du complexe CPC

De part sa localisation cellulaire particulière lors de la mitose, la Survivine est définie comme une CPP (« Chromosomal passenger protein ») (Temme et al. 2003). En effet, la Survivine est localisée au niveau des chromosomes en prophase, des centromères en métaphase, des cortex et fuseaux équatoriaux en anaphase, et enfin, au niveau du sillon de clivage en télophase (Fortugno et al. 2002). Le phénotype et la localisation de la Survivine, variable en fonction de la phase du cycle cellulaire, est identique à ceux de la protéine INCENP (« Inner Centromere protein ») (Uren et al. 2000). C'est une année plus tard que l'interaction physique et fonctionnelle de la Survivine, Aurora-B et INCENP a été mise en évidence (Wheatley et al. 2001). En fait, la Survivine, la Boréoline et INCENP sont trois protéines régulatrices de l'activité et de la localisation de l'enzyme du complexe CPC : la protéine kinase Aurora-B.

Le domaine BIR ainsi que l'extrémité C-terminale de la Survivine sont essentiels pour la localisation correcte du CPC (Lens et al. 2006). En effet, la phosphorylation de la Survivine sur la thréonine 117 (extrémité C-terminale) par Aurora-B pendant la mitose est essentielle au bon déroulement de cette phase (Delacour-Larose et al. 2007) (Wheatley et al. 2007). De plus, les cycles d'ubiquitylation de la Survivine par Ufd 1 et de dé-ubiquitylation par hFAM sur la Lysine 63 (domaine BIR) est nécessaire à l'association/dissociation de la Survivine avec les centromères (Vong et al. 2005).

Récemment, la structure cristalline du corps régulateur du complexe CPC révèle que la Boréoline ainsi que INCENP s'associent à l'extrémité C-terminale de la Survivine (Jeyaprakash et al. 2007). Bien que le domaine BIR de la Survivine reste libre au sein du

complexe, la Survivine ne peut former de dimère car le domaine permettant cette dimérisation (présente entre le domaine BIR et l'extrémité C-terminale) est masquée par la Boréoline (Ruchaud et al. 2007a).

Protéines associées aux microtubules

La localisation de la Survivine a été longtemps controversée. En fait, il existerait deux fractions de Survivine aux localisations subcellulaires distinctes dans une cellule en mitose : une fraction associée au CPC, et une fraction associée aux microtubules (Fortugno et al. 2002). La localisation microtubulaire de la Survivine a été mise en évidence par Li et ses collaborateurs puis confirmé par l'identification d'un domaine de liaison à la tubuline dans l'extrémité C-terminale de la Survivine (Li et al. 1998) (Verdecia et al. 2000). Ces deux localisations de la Survivine sont très probablement le reflet de modifications post-traductionnelles distinctes telle que la phosphorylation en T34 qui n'est retrouvée que dans la fraction microtubulaire (Fortugno et al. 2002).

La Survivine semble favoriser la stabilité des microtubules en bloquant leur dynamique, la réduction de leur nucléation au niveau des centrosomes et leur enrichissement en tubuline acétylée. Ce mécanisme est indépendant d'Aurora-B et augmente la résistance des microtubules à leur dépolymérisation par le Nocodazole (Rosa et al. 2006). Grâce à son association avec CDK1, la Survivine liée aux microtubules est phosphorylée en T34 par le complexe CDK1/Cycline B1. Comme la perte de cette phosphorylation induit la dissociation du complexe Survivine/Caspase 9, la phosphorylation en T34 semble, par conséquent, nécessaire au maintien de la viabilité cellulaire au cours de la mitose (O'Connor et al. 2000).

Promotion de la transition G1/S

La Survivine joue également un rôle dans l'entrée de la cellule dans le cycle cellulaire et dans la transition G1/S des cellules normales telles que les précurseurs hématopoïétiques (Song et al. 2005). Sous l'effet de facteurs de croissance, l'expression de la Survivine est

induite très précocement (G0) dans les cellules CD34+ adultes et est requise pour la progression en phase G1 (Fukuda & Pelus 2002). L'entrée dans le cycle cellulaire serait induite par la translocation nucléaire du complexe Survivine/CDK4 par compétition avec p16INK4a, permettant ainsi l'activation du complexe Cycline E/CDK2 et la phosphorylation de Rb (Suzuki et al. 2000).

IV.2. Apoptose

Une protéine de la famille des IAPs

La capacité de la Survivine à inhiber l'apoptose a été confirmée par un grand nombre de publications. Cependant le mécanisme moléculaire par lequel la Survivine inhibe l'apoptose par inhibition directe des caspases 9, 7, et 3 était sujet à controverse (Altieri 2006b). Des expériences d'interaction protéique en système acellulaire avaient montré l'existence du complexe Survivine/caspase 3. Cependant, il a été montré par la suite que dans un contexte cellulaire, on observait préférentiellement une interaction Survivine/CDK4 plutôt que Survivine/caspase3 et de ce fait, une inhibition indirecte de l'apoptose (Suzuki, et al. 2000). En effet, le domaine BIR de la Survivine n'est pas précédé des quelques acides aminés absolument nécessaires à la liaison directe de XIAP avec les caspases (Sun et al. 1999). XIAP est probablement le seul véritable inhibiteur direct des caspases (Eckelman et al. 2006). Néanmoins, la Survivine inhiberait les caspases de façon indirecte avec l'aide d'autres partenaires. Pour exemple, la Survivine bloquerait la mort cellulaire indépendante des caspases notamment par inhibition de la libération du facteur mitochondrial pro-apoptotique AIF (« Apoptosis inducing factor ») (Liu et al. 2004).

La Survivine recèlerait donc de multiples stratagèmes pour protéger la cellule de l'apoptose dont la compilation en un modèle fédérateur paraît parfois difficile. Il est maintenant clair que ses modifications post-traductionnelles, sa localisation subcellulaire, ainsi que ses interactions moléculaires avec d'autres acteurs de l'apoptose interviennent dans la régulation de la survie cellulaire par la Survivine.

Blocage de l'apoptose dans les cellules en interphase

- Compartimentation de la Survivine

L'importance de la compartimentation de la Survivine n'est vraie que pour les cellules en interphase car la membrane nucléaire disparaît en début de mitose. La localisation cytoplasmique de la Survivine est essentielle à sa fonction anti-apoptotique dans les cellules tumorales (Colnaghi et al. 2006) (Knauer et al. 2007) (Connell et al. 2008). En effet, au noyau, la Survivine est beaucoup moins stable et ne peut former que des hétérodimères avec INCENP et la Boréoline (Connell et al. 2008) (Ruchaud et al. 2007b). Alors que cytoplasmique, la Survivine est a même de former des homodimères qui sont indispensables pour les interactions avec des partenaires protéiques tels que Smac/DIABLO et XIAP (Figure 39).

Dans les cellules tumorales, la Survivine est aussi retrouvée à la mitochondrie où elle constitue une réserve protéique rapidement disponible pour bloquer l'apoptose (Dohi et al. 2004). Bien que la Survivine ne soit pas directement adressée à la mitochondrie, son association avec Hsp90 et/ou AIP (« Aryl hydrocarbon receptor interacting protein ») lui permettrait d'entrer dans ce compartiment cellulaire (Fortugno et al. 2003) (Kang & Altieri 2006). Ce passage par la mitochondrie renforcerait la capacité de la Survivine à bloquer l'apoptose *via* des modifications post-traductionnelles (Dohi et al. 2007) (Figure 39).

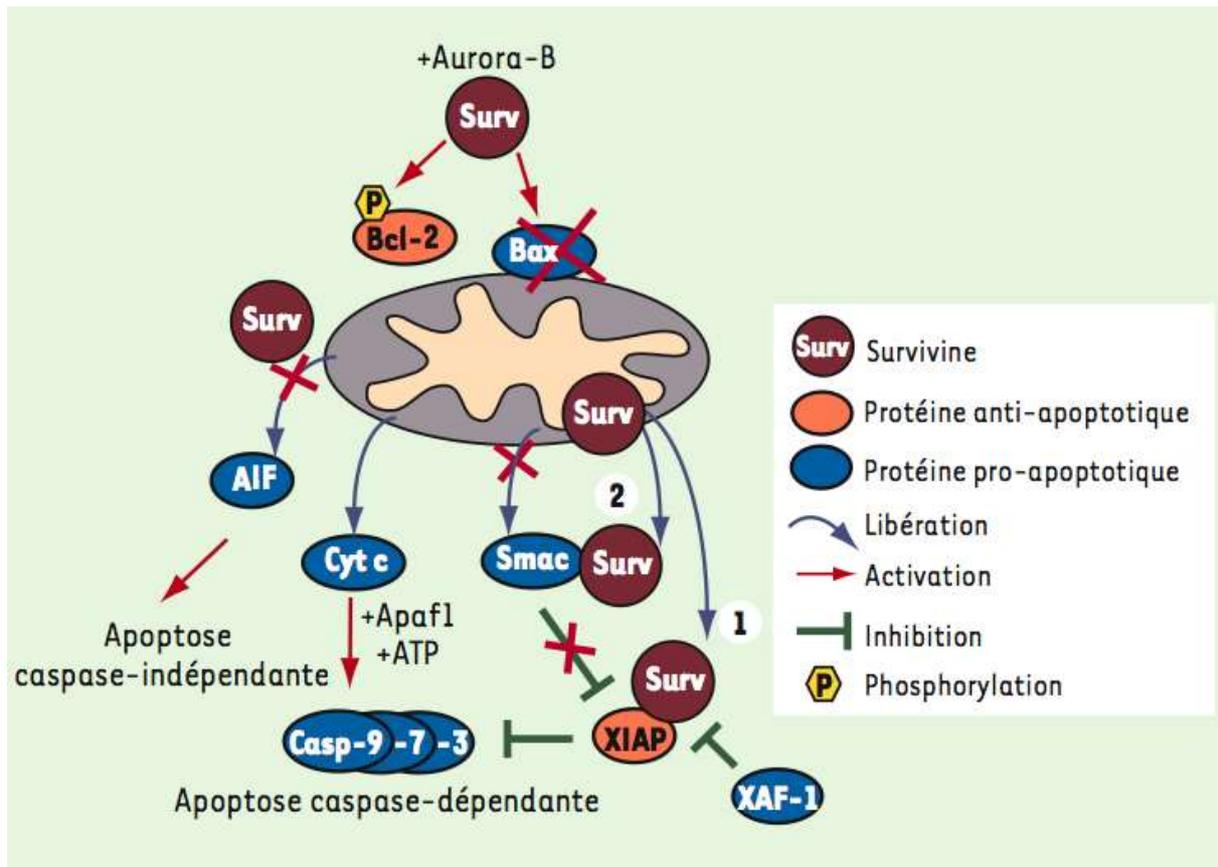


Figure 39 : Les rôles anti-apoptotiques de la Survivine.

D'après Romagnoli *et al*, *Medecine/Sciences* , 2008.

- Coopération moléculaire

La Survivine est incapable d'interagir directement avec les caspases, c'est pourquoi, une coopération moléculaire est nécessaire. En effet, la Survivine peut bloquer indirectement les caspases *via* deux mécanismes de potentialisation de l'activité de XIAP indépendamment du cycle cellulaire.

Le premier mécanisme fait intervenir la fraction mitochondriale de la Survivine. En effet, sous un stress apoptotique cette fraction va être libérée dans le cytoplasme et ainsi permettre une stabilisation de XIAP (Dohi, Beltrami *et al*. 2004). La Survivine va directement interagir avec XIAP empêchant sa dégradation par le protéasome (Dohi, Okada *et al*. 2004). *A contrario*, la fraction cytoplasmique de la Survivine ne peut jouer son rôle car elle est

phosphorylée en S20 par la PKA et ne peut former de complexe avec XIAP (Dohi et al. 2007). Il est à noter que l'inhibition de la caspase 9 et 3 est plus efficace en présence de la Survivine.

Le second mécanisme fait intervenir Smac/DIABLO. Smac/DIABLO est une protéine inhibitrice de XIAP qui est libérée de la mitochondrie au cours de l'apoptose. La Survivine peut interagir avec Smac/DIABLO dans le cytoplasme dans le but de libérer XIAP (Song et al. 2003) (Song et al. 2004). La Survivine mitochondriale peut même séquestrer Smac/DIABLO dans la mitochondrie afin d'éviter toute inhibition de XIAP une fois libérée dans le cytoplasme (Ceballos-Cancino et al. 2007).

Blocage de la catastrophe mitotique

- Phosphorylation par CDK1

Lors des phases G2/M, la Survivine se complexe avec CDK1 au niveau des microtubules. La Survivine va alors être phosphorylée en T34 (domaine BIR) et bloquer l'apoptose lors de la mitose (Li et al. 1998). La phosphorylation en T34 a pour effet de stabiliser la Survivine et favoriser les interactions protéiques avec son domaine BIR (Verdecia et al. 2000) (O'Connor et al. 2000). Par conséquent, CDK1 soutient l'activité anti-apoptotique de la Survivine lors de la mitose et permet ainsi la séquestration de la caspase 9 au cytosquelette de façon indirecte. Cette phosphorylation est essentielle car des études utilisant des mutants non phosphorylables de la Survivine (T34A) induit l'apoptose des cellules en mitose *in vitro* (O'Connor et al. 2000) ainsi que l'inhibition de la croissance tumorale *in vivo* (Grossman et al. 2001).

- Coopération avec Aurora-B

Dans les cellules tumorales, le complexe réunissant la Survivine avec la kinase Aurora-B semble primordiale dans le blocage de la catastrophe mitotique. En effet, lors de l'activation du point de contrôle mitotique en métaphase, la protéine Mad 2, alors activée va induire un signal de mort. C'est à ce moment là que le complexe Survivine/Aurora-B

interviendrait. En effet, ce complexe semble être impliqué dans la phosphorylation stabilisatrice de Bcl-2 et l'inactivation de Bax contrebalançant ainsi le message de mort (Vogel et al. 2007).

V. Implications en cancérologie

La dérégulation de l'expression de la Survivine semble être impliquée dans de nombreuses pathologies mais elle est majoritairement impliquée dans les cancers (Fukuda & Pelus 2006). Ainsi, la Survivine est exprimée de façon aberrante dans les cancers et ce quel que soit la phase du cycle (Xia et al. 2006). La Survivine semble entrer dans le concept d'addiction oncogénique des tumeurs qui correspond à la dépendance des cellules tumorales aux mutations oncogéniques leur conférant un avantage sélectif en termes de prolifération et de survie (Jonkers & Berns 2004). La Survivine est maintenant considérée comme un antigène tumoral universel (Andersen et al. 2007). Ainsi, la Survivine pourrait représenter une cible majeure en clinique humaine car son inhibition constituerait une réelle faiblesse de la cellule cancéreuse.

En effet, notre équipe a montré que la Survivine participait à l'oncogénèse du MM du fait d'une corrélation entre son expression, l'évolution de la maladie et le pronostic des patients (Romagnoli et al. 2009). De plus, notre équipe a mis en évidence l'influence qu'exerçait la Survivine dans l'efficacité des traitements utilisés dans le MM (Romagnoli et al. 2007). Enfin, nous avons émis l'hypothèse d'une dérégulation de la balance Survivine/Bim dans les cellules myélomateuses notamment lors de leur dissémination vers des sites extramédullaires (Romagnoli et al. 2009).

Dans le cancer du sein, la surexpression de la Survivine, a été décrite, en histopathologie, comme intervenant dans les formes agressives de ce cancer. Cette surexpression de la Survivine, notamment due à la perte d'expression de BRCA1 semble induire conduire à une baisse de la sensibilité chimique au paclitaxel (Promkan et al. 2009). L'implication de la Survivine a été démontré dans les différents sous-types de cancer du sein et ressort au niveau des signatures pronostiques (Paik et al. 2004). De plus, il a été décrit

qu'une signature fonctionnelle Nox-1/Survivine était une marque de survenue de cancer du sein de type « basal » et que cela pouvait contribuer à la pathogénicité de la maladie (Lee et al. 2008). Enfin, une déplétion en Survivine à l'aide de siRNA a été montrée comme provoquant une augmentation de l'apoptose en association avec des traitements utilisés en clinique pour le sous-type Her2 de cancer du sein, notamment le Lapatinib, le Trastuzumab et le Gefitinib (Foster et al. 2009).

V.1. Pronostic

La surexpression de la Survivine dans les cancers humains a fait l'objet de plusieurs études qui ont montrées une corrélation avec la progression de la maladie et un pronostic défavorable (Fukuda & Pelus 2006).

Son étude en tant que marqueur prédictif de l'efficacité des thérapies anticancéreuses a également été étudiée (Pennati et al. 2007), mettant ainsi en évidence que la Survivine est fortement exprimée dans des lignées cellulaires radio- ou chimio-résistantes *in vitro*. La chimiorésistance des cellules qui expriment la Survivine de façon aberrante est aussi confirmée chez les patients. C'est le cas pour le taxol pour les carcinomes ovariens, le cisplatine pour les cancers de l'estomac et de la vessie, ainsi que les traitements hormonaux pour les cancers du sein et de la prostate. De plus, l'expression de la Survivine est induite par certains traitements anticancéreux tel que le cisplatine.

En plus de son intérêt pronostique, la Survivine semble également être utilisable en clinique en tant que biomarqueur urinaire dans le cancer de la vessie et en tant qu'indicateur de rechute dans le cancer du sein (Kenney et al. 2007) (Yie et al. 2006).

V.2. Cible thérapeutique

L'expression aberrante de la Survivine dans les tissus tumoraux en fait une cible thérapeutique potentielle particulièrement pertinente. De plus, la Survivine est exprimée

dans les cellules endothéliales lors de l'angiogénèse cela permettrait de cibler et le tissu tumoral et la néo-angiogénèse induite (Mesri et al. 2001).

Plusieurs antagonistes de la Survivine ciblant sa transcription (YM155), sa traduction (ASO), ses fonctions (T34A) ou même ses interactions (avec HSP90 comme la Shepherdine) sont actuellement en cours de développement clinique (Altieri 2006a). Une association des inhibiteurs de la Survivine avec des traitements anticancéreux conventionnels permettrait d'améliorer les protocoles existants. Actuellement, la Survivine est aussi la cible de thérapies géniques et cellulaires innovantes (Pennati et al. 2007).

Par son domaine BIR, la Survivine peut interagir avec HSP90 qui la protège de la dégradation par le protéasome (Fortugno et al. 2003). De ce fait, le 17-AAG, une molécule désignée pour rompre les interactions d'HSP90 avec ces différents partenaires, peut servir d'inhibiteur non spécifique de la Survivine. Des essais cliniques sont en cours de réalisation avec le 17-AAG dans les tumeurs malignes de la peau, du sein, et contre les cancers multiples.

Enfin, il existe un autre inhibiteur synthétique de la Survivine, la shepherdine, en cours de développement qui est basé sur l'inhibition de l'interaction physique entre HSP90 et la Survivine. Bien que cet inhibiteur soit sensé être plus sélectif que le 17-AAG, une étude menée par Plescia et ses collaborateurs semble indiquer que, malgré un design basé sur une grande affinité de l'interaction Hsp90/Survivine, cet inhibiteur agirait comme un inhibiteur plus global de l'activité chaperonne d'HSP90 (Plescia et al. 2005). Les auteurs tirent cette conclusion de l'analyse structure-fonction de la shepherdine où *in-vivo* cette molécule met en jeu la poche chaperonne de l'ATP d'HSP90 et déstabilise de nombreuses autres interactions d'Hsp90 en plus de celle avec la Survivine. Cependant, les études concernant cette molécule sont peu nombreuses de par son absence d'utilisation en clinique et de son indisponibilité pour la recherche fondamentale.

RÉSULTATS

Article 1:

"Impact de la protéine XIAP dans la survie des cellules de myélome"

Haematologica, 2009 Jan;94(1):87-93.

Malgré les récentes avancées thérapeutiques, le MM reste un cancer incurable et la recherche de nouveaux agents ainsi que de nouvelles stratégies efficaces pour lutter contre cette pathologie est une réelle priorité. XIAP (« X-linked inhibitor of apoptosis protein ») est l'inhibiteur des caspases le plus puissant et le mieux caractérisé, c'est pourquoi, il est considéré comme étant un régulateur physiologique clé de la mort cellulaire (Salvesen & Duckett 2002) (Srinivasula & Ashwell 2008). Une surexpression de XIAP a été observée dans de nombreux cancers et confère aux cellules une résistance à la mort induite par les agents anticancéreux (Schimmer et al. 2006). Deux classes d'inhibiteurs de XIAP sont actuellement en cours de développement (Schimmer & Dalili 2005): les inhibiteurs du domaine BIR3 ou des mimétiques de Smac qui bloquent l'activité de la caspase 9 et les inhibiteurs du domaine BIR2 qui se lient aux caspases 3 et 7. Les inhibiteurs de BIR3 ont été décrits comme pouvant induire l'apoptose en agents simples contrairement aux inhibiteurs de BIR2. Des données parcellaires ont montré que le niveau de XIAP variait dans les lignées cellulaires de MM lors de traitements par des cytokines ou des agents anticancéreux (Mitsiades et al. 2002) (Mitsiades et al. 2002). C'est pourquoi, nous avons étudié la fonction et la régulation de XIAP dans le MM et les conséquences de sa déplétion induite par ARN interférence.

Étude de l'expression protéique et de la régulation de XIAP dans des lignées cellulaires humaines de Myélome Multiple

Nous avons regardé le niveau d'expression de XIAP dans 13 lignées cellulaires de MM ainsi que dans des cellules primaires de 9 patients atteints de MM par western blot. Toutes les lignées étudiées expriment un fort niveau de XIAP. Les cellules primaires présentent tous des niveaux détectables de XIAP, mais avec variations notables. Cependant, notre panel d'échantillons ne nous a pas permis de mettre en évidence de corrélation entre le niveau de

XIAP et le stade de la maladie. Le traitement des lignées par des facteurs de survie importants dans le MM, tels que l'IL-6 et l'IGF-1, induit une forte induction de l'expression de XIAP.

Lors de stress passagers ou de faible intensité, les protéines possédant une séquence d'accrochage des ribosomes à l'intérieur de leur extrémité 5'UTR peuvent maintenir un niveau de traduction alors que la traduction dépendante de la coiffe est inhibée. Afin de savoir si la séquence IRES de XIAP est également fonctionnelle dans les cellules de MM, nous avons traité ces cellules avec un inhibiteur de mTOR, la Rapamycine. Cet agent va avoir pour effet d'inhiber toute traduction d'ARNm ne possédant pas de séquence IRES. Les résultats montrent alors que l'ARNm de XIAP possède bien une séquence IRES fonctionnelle pour sa traduction, car l'expression protéique de XIAP est induite tout comme celle de p27, une autre protéine connue pour la présence d'une séquence IRES dans la région 5' non traduite de son ARNm.

De plus, le niveau d'expression de XIAP est régulé notamment lors du processus apoptotique induit par le Bortézomib, un inhibiteur du protéasome qui induit de l'apoptose dans les cellules de MM. En effet, l'apparition du fragment clivé à 29kDa est visualisée par western blot dès 8 heures de traitement. Ce fragment résulte d'un clivage par les caspases car ce phénomène est complètement inhibé par une pré-incubation avec du z-VADfmk, un inhibiteur à large spectre des caspases. La disparition de la forme longue (55kDa) de XIAP à 24h est associée avec une augmentation de l'apoptose dans ces mêmes cellules. Ces résultats mettent donc en évidence une étroite corrélation entre la disparition de XIAP et l'apoptose dans les cellules de MM.

En accord avec ce qui a déjà été décrit, les cellules myélomateuses expriment Smac/DIABLO et HtrA2/Omi au niveau de la mitochondrie alors que XIAP est cytoplasmique. Pour la première fois, nous montrons que les lignées cellulaires de myélome, tout comme les cellules primaires, expriment des niveaux détectables de XAF-1 et que cette protéine a une localisation à la fois nucléaire et cytoplasmique. *XAF-1* est un gène suppresseur de tumeur

qui antagonise l'activité de XIAP. Par co-immunoprécipitation, nous mettons en évidence une interaction entre XIAP et XAF-1 suggérant que XAF-1 régule l'activité de XIAP.

La diminution de l'expression de XIAP induit une sensibilité aux agents anticancéreux ainsi qu'une diminution de la tumorigénicité des cellules de MM

Dans le but de déterminer l'importance de XIAP dans le contrôle de l'apoptose des cellules myélomateuses, nous avons, dans un premier temps, réalisé des extinctions de XIAP par siRNA dans la lignée U266. La diminution de l'expression protéique de XIAP est visible en western blot dès 24h après transfection du siXIAP et est maintenue à 72h. L'extinction de XIAP n'influence pas l'expression des autres protéines des IAPs et n'a pas de répercussion sur la prolifération. La diminution de l'expression de XIAP dans U266 induit une sensibilité de cette lignée à différents agents anticancéreux tels que le Bortézomib (inhibiteur du protéasome), la Dexaméthasone (hormone glucocorticoïde de synthèse qui a un rôle anti-inflammatoire et immunosuppresseur), le Melphalan (agent alkylant), TRAIL (inducteur d'apoptose par la voie extrinsèque) et l'AS602868 (inhibiteur de la voie NFκB). Afin d'étendre ces résultats à d'autres lignées myélomateuses, l'extinction de XIAP par shRNA, délivrés par lentivirus, a été réalisée dans les lignées NCI-H929 et MM1-S. L'extinction de XIAP induit une forte sensibilisation de ces deux lignées en réponse aux agents anticancéreux cités.

De plus, l'extinction prolongée de XIAP obtenue par shRNA, délivrés par lentivirus, dans la lignée NCI-H929 nous a permis de tester l'impact de la suppression de XIAP dans la formation de tumeurs *in vivo*. L'extinction de XIAP diminue de façon drastique la capacité des cellules NCI-H929 à former des tumeurs dans un modèle de xénogreffe sur des souris NOD/SCID. En effet, les souris greffées avec les cellules NCI-H929 transduites par le shContrôle développent des tumeurs mesurables dès 14 jours qui grossissent de façon exponentielle jusqu'au sacrifice de l'animal. *A contrario*, les souris greffées avec des cellules NCI-H929 shXIAP développent des tumeurs faiblement détectables et qui ne grossissent pas pendant la durée de l'expérience. La différence entre les tumeurs ainsi induites est

fortement significative à J20 prouvant ainsi l'importance de XIAP dans la tumorigénèse des cellules myélomateuses.

Nos résultats montrent que la forte expression de XIAP est régulée à la fois par des signaux de survie tels que l'IL-6 et l'IGF-1, une séquence IRES lors de stress passagers et un clivage induit par les caspases en réponse à un stress apoptotique. Nous avons également démontré que XIAP et XAF-1 colocalisent dans le cytoplasme des cellules myélomateuses et forment des complexes qui pourraient neutraliser l'activité inhibitrice des caspases de XIAP. De plus, la forte expression de XIAP dans les lignées myélomateuses suggère que l'expression de XIAP pourrait être rapportée au degré de malignité des tumeurs. Même si nous ne pouvons exclure d'autres mécanismes cellulaires, nos résultats suggèrent, également, que XIAP pourrait participer *via* sa séquence IRES à la protection des cellules de MM de la mort consécutive à un blocage de la traduction dépendante de la coiffe tel qu'induit par un traitement à la Rapamycine ou au cours de la mitose. De plus, l'extinction prolongée de XIAP dans les cellules de MM induit une diminution drastique du développement tumoral dans un modèle de xénogreffe de souris NOD/SCID suggérant ainsi qu'un fort niveau basal de XIAP est nécessaire à la croissance tumorale *in vivo*.

L'ensemble de nos résultats suggèrent donc que la diminution du niveau de XIAP dans les cellules myélomateuses modifie la balance en faveur de l'apoptose et renforce nettement l'intérêt du ciblage de XIAP par des inhibiteurs, déjà disponibles, dans le traitement du MM.

Impact of XIAP protein levels on the survival of myeloma cells

Grégoire Desplanques,^{1,2,3} Nicola Giuliani,³ Roberto Delsignore,⁴ Vittorio Rizzoli,³ Régis Bataille,^{1,2} and Sophie Barillé-Nion^{1,2}

¹INSERM, UMR 892, Nantes, France; ²Nantes Atlantique Universités, Nantes, Cedex, France; ³Hematology and ⁴Internal Medicine, Department of Internal Medicine and Biomedical Science, Università degli Studi di Parma, Parma, Italy

Funding: this work has been supported by La Ligue Nationale Contre le Cancer (équipe labélisée 2005) and La Région des Pays de la Loire. Grégoire Desplanques is supported by the French-Italian University (UFI, Grenoble, France).

Manuscript received June 11, 2008. Revised version arrived September 17, 2008. Manuscript accepted September 18, 2008.

Correspondence: Sophie Barillé-Nion, UMR 892, 9 quai Moncoussu, Nantes F-44093, France. E-mail: sbarille@nantes.inserm.fr

ABSTRACT

Background

XIAP is the best characterized and the most potent direct endogenous caspase inhibitor and is considered a key actor in the control of apoptotic threshold in cancer cells. In this report, we specifically addressed XIAP regulation and function in myeloma cells.

Design and Methods

XIAP and its endogenous inhibitor XAF-1 protein levels and their regulation were assessed by immunoblot analysis in myeloma cell lines or primary myeloma cells. XIAP knock-down by RNA interference was used to evaluate XIAP impact on *in vitro* drug sensitivity and *in vivo* tumor growth.

Results

Our results indicate that myeloma cells expressed high levels of XIAP protein that were tightly regulated during growth factor stimulation or stress condition. Of note, an increased XIAP level was evidenced during the blockade of the canonical cap-dependent translation by the mTOR inhibitor rapamycin, supporting the hypothesis of a functional IRES sequence in XIAP mRNA. In addition, caspase-mediated XIAP cleavage correlated to an apoptotic process occurring upon cell treatment with the proteasome inhibitor bortezomib. Importantly, XIAP knockdown using RNA interference enhanced drug sensitivity and decreased tumor formation in NOD/SCID mice. Finally, myeloma cells also expressed the XIAP inhibitor XAF-1 that interacted with XIAP in viable myeloma cells.

Conclusions

Altogether, our data argue for a delicate control of XIAP function in myeloma cells and stimulate interest in targeting XIAP in myeloma treatment.

Key words: XIAP, myeloma, apoptosis.

Citation: Desplanques G, Giuliani N, Delsignore R, Rizzoli V, Bataille R, and Barillé-Nion S. Impact of XIAP protein levels on the survival of myeloma cells. Haematologica 2009; 94:87-93. doi: 10.3324/haematol.13483

©2009 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper.

Introduction

Cancer occurs or progresses because the malignant cells fail to die in response to chemotherapy, irradiation or immune response. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is the best characterized and the most potent direct endogenous inhibitor of caspases and is thus considered to be a key physiological regulator of cell death.^{1,2} Indeed XIAP inhibits the upstream caspase-9 that binds to its BIR3 domain, and the downstream caspase-3 and -7 that bind to its BIR2 domain. XIAP expression appears elevated in many cancer cells often conferring resistance to chemotherapy-induced cell death. Therefore, defining mechanisms involved in the regulation of XIAP in cancer cells is of particular interest. Regulation of XIAP expression occurs at multiple levels. Various signaling pathways, including NF- κ B, PI3K and MAPK, mediate *Xiap* gene transcription. Moreover, XIAP mRNA harbors a putative internal ribosome entry site (IRES) sequence within its 5' untranslated region that may allow an alternative translation process during cell stresses compromising canonical cap-dependent translation leading to apoptosis.³ Finally, XIAP protein that can be processed by proteosomal degradation is highly regulated by its interaction with at least 3 specific endogenous inhibitors: (i) SMAC/Diablo and Omi/HtrA2, both localized in the mitochondria in viable cells and released in the cytoplasm during apoptosis where they neutralize XIAP anti-caspase activity,^{4,5} and (ii) the tumor suppressor gene XAF-1 that antagonizes XIAP activity in non-apoptotic cells.⁶

Despite recent progress, multiple myeloma (MM) is still an incurable cancer and the search for new agents and effective strategies against this disease remains a high priority.⁷ Two classes of XIAP inhibitors are currently under development in cancer therapy:⁸ (i) BIR3 inhibitors or Smac-mimetics that block the activity of the caspase-9, and (ii) BIR-2 inhibitors that bind to caspase-3 and -7 that were reported to induce apoptosis as single agents in a broad range of cancer cell lines in contrast to BIR3 inhibitors. Previous data have reported that XIAP levels were modulated in myeloma cell lines during *in vitro* drug or cytokine treatment.^{9,10} However, to our knowledge, the impact of XIAP on MM biology has not yet been specifically addressed in this cancer. Therefore, we concentrated our attention on this attractive anti-cancer target in MM. Our results indicate that myeloma cells display high levels of XIAP protein whose level is tightly controlled by myeloma growth factors, an IRES sequence and drug treatment in correlation with the apoptotic process. Moreover, XIAP extinction by RNA interference led to *in vitro* increased drug sensitivity and *in vivo* decreased tumor formation. Finally, our data revealed that XAF-1 interferes with XIAP in viable myeloma cells modulating its activity in myeloma cells. Thus, XIAP emerges as a relevant target in MM and our results argue for the use of XIAP inhibitors in MM treatment.

Design and Methods

Cell lines and culture conditions

The XG1, XG6, NAN1, NAN2, NAN3, NAN4, NAN6 human myeloma cell lines (HMCLs) had been previously established in our laboratory.¹¹ U266, OPM2, KMS12PE, KMS18 and NCI-H929 HMCLs were available commercially. MM1-S was a gift from Dr ST Rosen (Chicago, IL, USA). These cell lines were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 5% FCS, 2 mM glutamine and 5.10^{-5} M β mercapto ethanol supplemented with recombinant IL6 or not.¹¹

Primary cells

Primary myeloma cells were purified from bone marrow, blood or pleural effusion samples of patients with MM using CD138 immunomagnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) as previously described.¹² Informed consent was provided according to the Helsinki Declaration of the World Medical Association, and the University Hospital of Nantes review board approved these studies.

Reagents and antibodies

IL6, IGF-1 and TRAIL were from R&D Systems (Minneapolis, USA), and melphalan and dexamethasone from Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA). The mTOR inhibitor was purchased by Alexis Biochemicals. The proteasome inhibitor bortezomib was kindly provided by OrthoBiotech and the NF κ B inhibitor AS602868 by Merck Serono International SA. Anti-XIAP antibody was purchased from BD Biosciences and from Abcam (for immunoprecipitation), anti-XAF1 from Abcam, anti-survivin and anti-HtrA2/Omi from R&D Systems, anti-p27 KIP-1 from BD Pharmingen, anti-PARP-1 (Ab2) from Calbiochem, anti-cox IV (3E11) from Cell Signaling, anti-tubulin from Amersham, anti-phospho-4EBP1 (Thr 37/46) from Ozyme, anti-Smac/DIABLO from Alexis and anti-actin from Chemicon International.

RNA interference by siRNA or shRNA

For transient RNA interference experiments, 10 μ M of siRNA XIAP or control siRNAs from Ambion were mixed with 5.10^6 U266 cells in buffer R and electroporated using the protocol T-01 of the Amaxa Nucleofector™ apparatus (Amaxa, Cologne, Germany). For stable RNA interference experiments using lentiviral delivery, short hairpin (sh)RNA corresponding to the targeted sequence of XIAP mRNA¹³ 5' AAG TGT CCC ATG TGC TAC ACA 3' or to the bacterial LacZ were cloned and lentiviral particules were prepared as previously described.¹⁴

Immunoblot analysis

Samples for western blot analysis were prepared as described.¹⁴ Fifty micrograms of proteins were loaded for each lane and separated by 10% or 12.5% SDS-PAGE, then electrotransferred to PVDF membranes. Western blot analysis was performed by standard techniques with ECL detection (Pierce) for XIAP, p27,

XAF1, HtrA2/Omi, Smac/DIABLO, P-4EBP1, PARP-1, tubulin, COX IV and actin. Protein loading was checked with anti-actin antibody.

Subcellular fractionation

For the mitochondrial and cytoplasm fractions, cells were washed once with ice-cold PBS, then incubated in hypotonic buffer (5 mM HEPES pH 7.4, 25 mM sucrose, 2 mM EDTA, 2 mM aprotinin, 5 mM leupeptin, 0.4 mM Pefabloc) for 30 min on ice. Cells were disrupted with a dounce homogenizer for 15 min on ice. Immediately after homogenization, the lysate was centrifuged at 500 g for 10 min to eliminate the nuclear pellet and unbroken cells. The collected supernatant was centrifuged at 10,000 g for 15 min to obtain the mitochondrial pellet and the cytoplasmic supernatant. The mitochondrial pellet was further lysed on lysis buffer. The nuclear fraction was prepared using NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents based on the manufacturer's instructions (Pierce, Rockford, IL, USA).

Immunoprecipitation

Cells (25×10^6) were lysed in 1% CHAPS-containing lysis buffer. Whole-cell lysates were obtained, pre-cleared with Protein A-Sepharose, and incubated overnight with 7 μ g of XIAP antibody. The immunocomplexes were captured with protein A. Beads were pelleted, washed three times, and boiled in SDS sample buffer. The presence of immunocomplexes was determined by immunoblotting analysis.

Cell viability and proliferation analysis

Cell viability and proliferation were assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. After 48 h of incubation with AS602868 (10 μ M), dexamethasone (1 μ M), melphalan (1 μ M) or TRAIL (10 ng/mL), cells were incubated with 50 μ L of 2.5 mg/mL MTT (Sigma-Aldrich) for 3 h 30 min. Absorption at 570 nm wavelength was measured after total solubilization of formazan crystals by 100 μ L of lysis solution. The inhibition of cell growth induced by drugs was expressed as a percentage compared to untreated corresponding cells.

Subcutaneous xenograft model in NOD/SCID mice

Four to eight week old non-obese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mice were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) and were housed and monitored at the core facility of the INSERM UMR892. This facility is approved by the French Association for Accreditation of Laboratory Animal Care and is maintained in accordance with the regulations and standards of the INSERM institute and the French Department of Agriculture. Mice (n=18) were inoculated subcutaneously (s.c.) into the right flank with 2×10^7 cells in 100 μ L of NCI-H929. Caliper measurements of the longest perpendicular tumor diameters were taken 4 times (days 0, 9, 14 and 20) to estimate the tumor volume, using the following formula:

$$4\pi/3 \times (\text{width}/2)^2 \times (\text{length}/2)$$

representing the three dimensional volume of an ellipse. Animals were sacrificed when their tumors reached 2 cm or when the mice became moribund. Tumors were then frozen and kept for immunoblot analysis.

Statistics analysis

The two-way ANOVA test was used for statistical analysis.

Results

Study of XIAP protein expression in human myeloma cells and its regulation

A panel of HMCLs was first screened for XIAP expression using immunoblot analysis. As shown in Figure 1A for representative cell lines, all HMCLs expressed similar high levels of XIAP protein (Figure 1A, top panel). Secondly, purified primary myeloma cells obtained from patients with MM also displayed detectable XIAP but at variable levels from barely detectable (P2-3) to levels close to those detected in HMCLs (P5) (Figure 1A, bottom panel). However, no correlation between XIAP level and disease status could be evidenced in our series of samples. Interestingly, a significant induction of XIAP expression could be detected in myeloma cells treated by both main MM survival factors, i.e. IL6 and IGF-1, as shown in Figure 1B for the HMCL XG6. Moreover, in an attempt to evaluate whether the IRES sequence previously reported in 5'UTR XIAP mRNA was indeed functional in myeloma cells, cells were treated by the mTOR inhibitor rapamycin that inhibits the cap-dependent protein translation requiring the mTOR substrate 4EBP1 phosphorylation, then XIAP levels were assessed by immunoblot in rapamycin treated cells in comparison with untreated cells. Figure 1C indicates that efficient inhibition of cap-dependent protein translation evidenced by dramatic inhibition of 4EBP1 phosphorylation, potently induced XIAP expression in myeloma cells compared to control cells. This effect was also observed for the expression of the CDK inhibitor p27, whose mRNA also contains an IRES sequence. This cap-independent maintenance of XIAP level during rapamycin treatment suggests a functional IRES in XIAP mRNA in myeloma cells. Furthermore, XIAP regulation was determined during the apoptotic process induced by the proteasome inhibitor bortezomib. After as little as eight hours of drug-treatment, detection of a 29 kDa XIAP product was observed by immunoblot analysis (Figure 1D). The 29 kDa XIAP product resulted from a caspase-dependent XIAP cleavage during apoptosis since it was completely inhibited by the incubation of cells with the pancaspase inhibitor z-VADfmk prior to bortezomib treatment (Figure 1E). XIAP cleavage further increased at 16 h after drug treatment leading to the disappearance of the 55 kDa full length XIAP protein at 24 h. Importantly, the kinetic decrease of full length XIAP associated with the kinetic increase in apoptotic cell number (Figure 1D). These results indicate a close correlation between intact XIAP protein disappearance and apoptosis in myeloma cells.

XIAP knockdown enhanced drug resistance in myeloma cells

To further delineate the role of XIAP in myeloma cell apoptosis control, XIAP knockdown was performed by RNA interference strategy. As U266 was the most efficiently transfected cell line among HMCLs, XIAP was first knocked down in these cells using siRNA. XIAP expression in U266 cells was decreased as soon as day 1 post-transfection and up to day 3, as detected by immunoblot analysis (Figure 2A, top panel) with no impact on other IAP (*data not shown*). Of interest, specific XIAP knockdown, that had no impact on the proliferation of untreated cells, significantly enhanced U266 sensitivity to both conventional drugs used in MM treatment, i.e. dexamethasone and melphalan and new targets previously defined in MM, such as TRAIL¹⁵ (an inducer of apoptosis through the extrinsic pathway) or the NF- κ B inhibitor AS602868¹⁶ (Figure 2A, bottom panel). In order to extend these results to other HMCLs, RNA interference experiments using short hairpin RNA (shRNA) delivered by lentiviral particules were also performed on both hard-to-transfect HMCLs NCI-H929 and MM1-S. Decreased XIAP expression in shXIAP-transduced cells (shXIAP) compared to control-transduced cells (shCt) was determined in both HMCLs by

immunoblot analysis depicted for NCI-H929 at day 7 in Figure 2B (top panel). Efficient XIAP knockdown in NCI-H929 cells also led to enhanced drug sensitivity (Figure 2B, bottom panel). The same results were obtained in MM1-S cell line (*data not shown*).

XIAP knockdown decreased myeloma cell tumorigenicity

In addition, prolonged XIAP knockdown obtained in shXIAP-transduced NCI-H929 cells (up to three weeks) allowed us to test the impact of XIAP extinction on tumor formation in *in vivo* experiments. Of major importance, XIAP knockdown potently restrained NCI-H929 cell capacity to form tumor in the subcutaneous xenograft model using NOD/SCID mice compared control cells (Figure 3A). Indeed, mice engrafted with shCt-transduced NCI-H929 cells developed measurable tumors at day 14 that exponentially grew until their sacrifice. In contrast, shXIAP-transduced cells led to slightly detectable tumors that did not grow any further during the experiments. Difference in tumor size between shXIAP- versus shCt-transduced cells was highly significant at day 20. Immunoblot analysis (Figure 3B) indicated that XIAP expression was still knocked down at the end of the experiment.

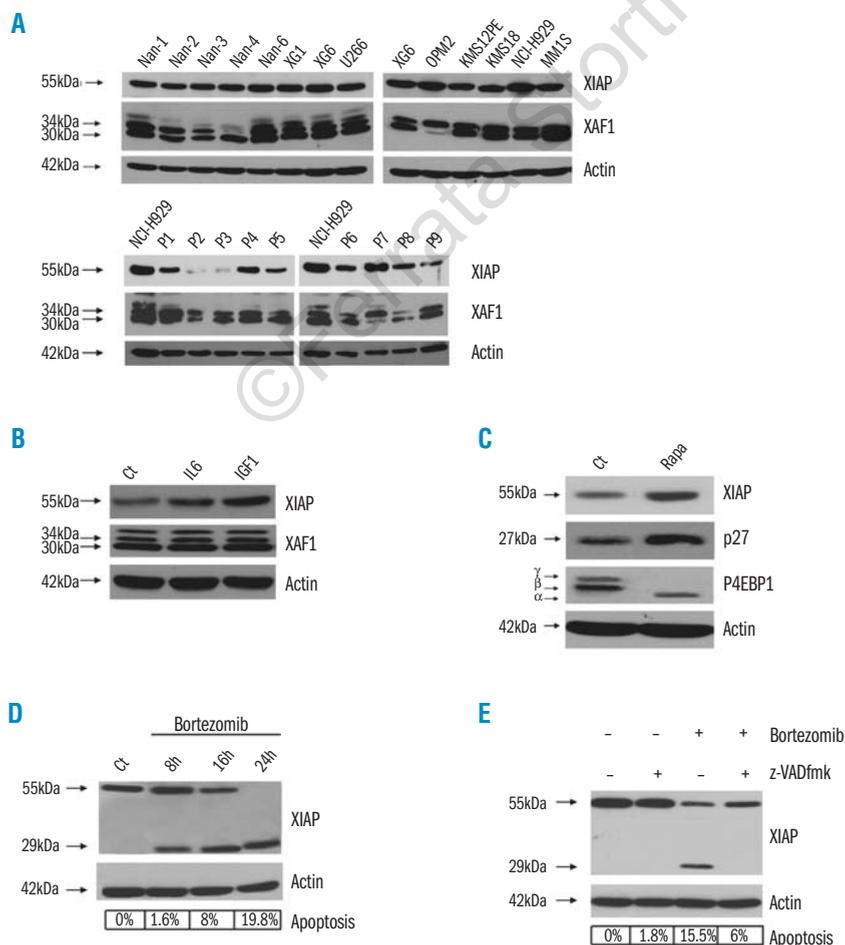


Figure 1. XIAP and XAF-1 expression in myeloma cells. (A) XIAP expression was assessed by immunoblot analysis in HMCLs (top panel) and in a series of primary myeloma cells (P1-P9) (bottom panel). XAF-1 expression evaluated as indicated. Protein loading was controlled with anti-actin mAb. (B) XIAP and XAF-1 protein expression in the XG6 HMCL after culture in presence of IL6 (10 ng/mL corresponding to 385 nmol/mL) or IGF-1 (100 ng/mL corresponding to 13.1 μ mol/mL) for 48h. (C) XIAP, p27 and p4EBP1 protein expression in untreated XG6 cells (Ct) or after rapamycin (Rapa) treatment (100 nM) for 24h. 3 isoforms of P4EBP1 were detected (a: hypophosphorylated isoform, b and g: Thr 37, 46- and 37, 46, 65, 70-phosphorylated isoforms respectively). (D) XIAP protein expression during bortezomib 10 nM treatment for 8, 16 and 24h. Specific apoptosis was evaluated in each condition by Apo2.7 immunostaining. (E) XIAP protein expression during bortezomib treatment in presence of the pancaspase inhibitor z-VADfmk (50 μ M added one hour prior to bortezomib treatment) or not. Specific apoptosis was evaluated in each condition by Apo2.7 immunostaining.

XIAP and its inhibitor XAF-1 interacted in the cytoplasm in myeloma cells

As previously described, viable myeloma cells express SMAC and Omi/HtrA2 and as expected, these inhibitors were detected in the mitochondria fraction in viable myeloma cells in contrast to XIAP that was mainly detected in the cytoplasmic fraction (Figure 4A). Interestingly, we pointed out for the first time that HMCLs as well as primary myeloma cells also expressed XAF-1 (Figure 1A). Levels of XAF-1 varied among our

panel of HMCLs or primary myeloma cells. Interestingly, neither IL6 nor IGF-1 could induce XAF-1 expression in myeloma cells in contrast to XIAP (Figure 1B). Furthermore, we demonstrated that XAF-1 could be detected in cytoplasmic as well as in nuclear enriched fractions in myeloma cells (Figure 4A). Therefore, XIAP and XAF-1 colocalized in cytoplasm in myeloma cells and we further demonstrated that they physically interacted as proved by co-immunoprecipitation experiments (Figure 4B).

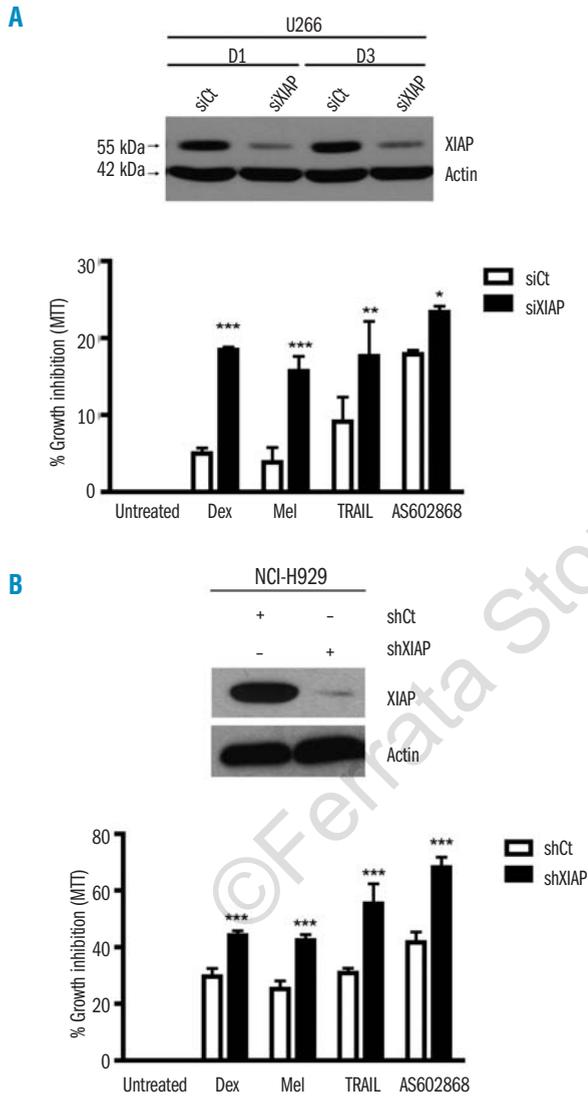


Figure 2. XIAP knockdown increased drug sensitivity. XIAP knockdown was performed by RNA interference in both HMCLs U266 transduced by siRNA (A) and NCI-H929 transduced by shRNA (B) and evaluated by immunoblot analysis at day 1 (D1) and D3 in U266 (siXIAP) and at D7 in NCI-H929 (shXIAP) compared to control transduced cells (siCt or shCt). Myeloma cell growth was quantified by MTT test after treatment with dexamethasone (Dex) 10⁻⁶M, melphalan (Mel) 1 μM, TRAIL 10 ng/mL or AS602868 10 μM (columns, mean; bars, SD; n=3 and n=6 respectively for siRNA and shRNA experiments) and related to cell growth in corresponding untreated cells. Results were then expressed in % of cell growth inhibition compared to untreated cells. The two-way ANOVA test was used for statistical analysis (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

Discussion

In this report, we demonstrate that myeloma cells express high levels of XIAP regulated by (i) IL6 and IGF-1, (ii) the mTOR and cap-dependent translation inhibitor rapamycin, and (iii) a caspase-mediated cleavage during drug treatment. Moreover, specific XIAP knockdown sensitized these cells to apoptosis and strongly decreased tumor formation. Finally, myeloma cells also express the novel XIAP inhibitor XAF-1 that may interfere with the caspase inhibitor function of XIAP.

Even though HMCLs display significant genetic heterogeneity (including IgH translocations, chromosome deletions or ploidy abnormalities),¹⁷ XIAP levels were found to be high and stable among HMCLs, as observed in many cancer cell lines. This suggests that strong XIAP

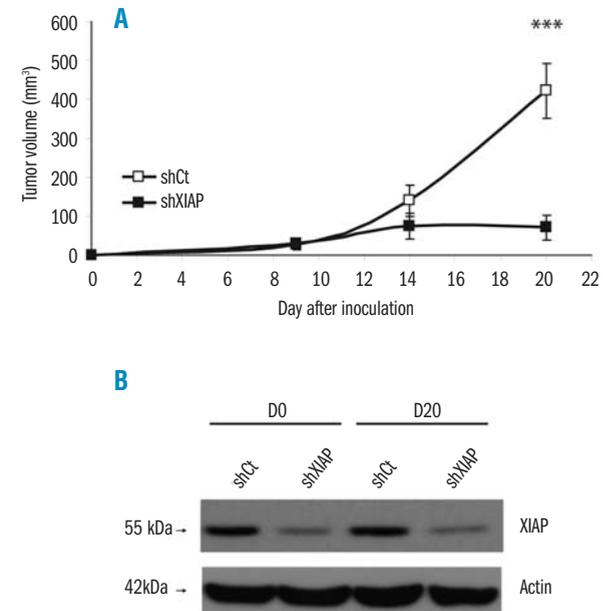


Figure 3. XIAP knockdown decreased NCI-H929 tumorigenicity. NCI-H929 transduced with shRNA control (shCt) or XIAP shRNA (shXIAP) were inoculated subcutaneously in NOD/SCID mice. (A) Tumor formation and measurement were assessed for 20 days (columns, mean; bars, SD; n=18). The two-way ANOVA test was used for statistical analysis (*** = p<0.001). (B) XIAP expression in tumors at the beginning (D0) and the end point (D20) of the experiment using immunoblot analysis.

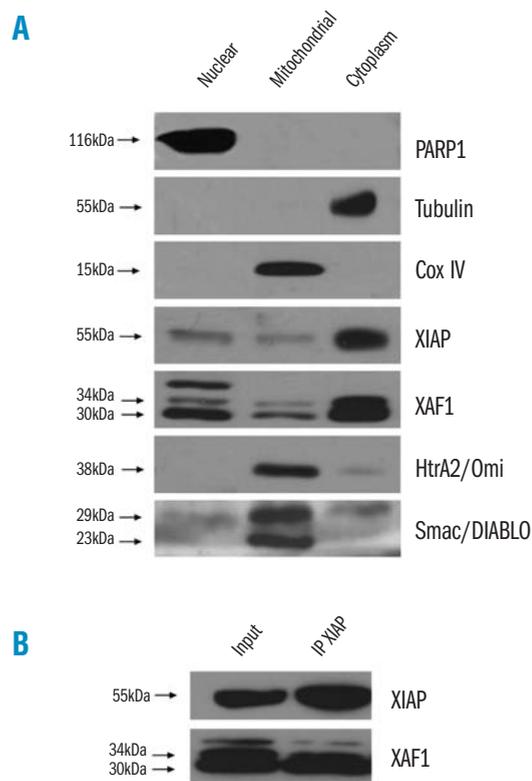


Figure 4. XIAP and XAF-1 colocalized in the cytosolic fraction and were co-immunoprecipitated. (A) XIAP and XAF-1 localizations were evaluated by immunoblot analysis after subcellular fractionation of NCI-H929 cells. Enrichment of fractions was verified by expression of PARP1, COX IV and tubulin for nuclear, mitochondrial and cytoplasmic fraction respectively. (B) XIAP and XAF-1 co-immunoprecipitation in NCI-H929 cells. First lane (Input) corresponds to the cell lysate used for immunoprecipitation (IP) and second lane (IP XIAP) corresponds to the lysate obtained after IP.

expression may be related to a high degree of malignancy. In contrast, XIAP protein level varied among patients but a larger series of samples should be evaluated to evidence a bioclinical impact of XIAP protein level in patients. XIAP expression was increased by both myeloma growth factors IL6 and IGF-1 that activate Jak/STAT, MAPK, PI3K or NF κ B signaling pathways by either direct or indirect mechanisms in myeloma cells.¹⁸ The IGF-1-induced XIAP expression, observed in leukemic cells,¹⁹ has also been reported in the MM1-S HMCL in which PI3K, NF κ B and MAPK pathways have been implicated.⁹ Moreover, XIAP expression decreased during treatment by the proteasome inhibitor bortezomib, as previously observed,¹⁰ and underwent a rapid caspase-mediated cleavage, leading to both fragments corresponding to BIR1-BIR2 and BIR3-RING domains that are less efficient caspase-inhibitors.²⁰ Importantly, this decrease in intact XIAP correlated with apoptosis induction. Finally, we show that inhibition of the canonical cap-dependent translation by the mTOR inhibitor rapamycin, was associated with increased levels of XIAP as well as CDK inhibitor p27^{Cip/Kip} that both

contain an IRES sequence in their 5'UTR mRNA.^{3,21} Thus, even though we cannot exclude other molecular mechanisms, our results suggest that XIAP may participate through its IRES sequence in myeloma cell protection under conditions of compromised cap-dependent translation such as rapamycin treatment. As rapamycin appeared to be an agent of potential therapeutic interest in MM, inducing G1 cell cycle arrest but no cell death,²² our data raise the possibility that the increase in XIAP level observed upon rapamycin treatment could limit its own antimyeloma effect and even counteract the action of antimyeloma treatments. Recent publications also reported negative feedback loops in cancer cells treated by mTOR inhibitors involving the activation of AKT or MAPK signaling pathways that may be detrimental to rapamycin in cancer therapy.^{23,24} We further demonstrate in this report that specific XIAP knockdown in 3 HMCLs significantly increased cell sensitivity to various antimyeloma drugs suggesting that XIAP indeed participates in the drug resistance observed in MM. In line with this hypothesis, Nakagawa *et al.* reported that XIAP might play a role in worsening the prognosis of MM patients because of drug resistance.²⁵ Of particular interest, prolonged XIAP knockdown in myeloma cells also led to a dramatic decrease in tumor development in the subcutaneous xenograft NOD-SCID model. These data indicate that high basal XIAP level was necessary to allow *in vivo* tumor growth. Altogether our results corroborate those from Chauhan *et al.* who have recently reported that targeting SMAC with the SMAC mimetic LBW242, considered as potent XIAP inhibitor, increased cell death in MM.²⁶ Finally, we show for the first time that myeloma cells express the XIAP inhibitor XAF-1. Indeed, we demonstrate that XIAP and XAF-1 colocalized in the cytoplasmic fraction of myeloma cells and formed complexes that may neutralize caspase-inhibitory activity of XIAP. Of note, *XAF-1* gene mapped on 17p13 as *p53* gene and 11% of patients with MM harbor the genetic aberration del(17p) that was powerful and independent predictor of survival.²⁷ Even though several studies have focused on the *p53* gene, formal demonstrations of its deregulation are currently lacking, and involvement of other genes like *XAF-1* cannot be excluded and should be investigated.

Altogether, our data demonstrate that a decrease in XIAP level in myeloma cells shifts the balance toward apoptosis and strongly stimulate interest in targeting XIAP by already available XIAP inhibitors in MM treatment.

Authorship and Disclosures

GD: carried out experiments; NG: designed the experiments and participated in writing the manuscript; RdS, VR: discussed data; RB: provided primary myeloma cells and analyzed data; SB-N: designed the experiments, analyzed data and wrote the manuscript. The authors reported no potential conflicts of interest.

References

- Salvesen GS, Suckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2002;3:401-10.
- Srinivasula SM, Ashwell JD. IAPs: what's in a name? *Mol Cell* 2008;30:123-35.
- Holcik M, Sonenberg N. Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:318-27.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102:33-42.
- Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 2001;8:613-21.
- Liston P, Fong WG, Kelly NL, Toji S, Miyazaki T, Conte D, et al. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol* 2001;3:128-33.
- Richardson P, Mitsiades C, Schlossman R, Ghobrial I, Hideshima T, Chauhan D, et al. The treatment of relapsed and refractory multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007;317-23.
- Schimmer AD, Dalili S. Targeting the IAP Family of Caspase Inhibitors as an Emerging Therapeutic Strategy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005;215-9.
- Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, Schlossman R, Akiyama M, Chauhan D, et al. Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene* 2002;21:5673-83.
- Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, et al. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:14374-9.
- Bataille R, Jégo G, Robillard N, Barillé-Nion S, Harousseau JL, Moreau P, et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 2006;91:1234-40.
- Barillé S, Bataille R, Rapp MJ, Harousseau JL, Amiot M. Production of metalloproteinase-7 (matrilysin) by human myeloma cells and its potential involvement in metalloproteinase-2 activation. *J Immunol* 1999;163:5723-8.
- McManus DC, Lefebvre CA, Cherton-Horvat G, St-Jean M, Kandimalla ER, Agrawal S, et al. Loss of XIAP protein expression by RNAi and antisense approaches sensitizes cancer cells to functionally diverse chemotherapeutics. *Oncogene* 2004;23:8105-17.
- Romagnoli M, Trichet V, David C, Clément M, Moreau P, Bataille R, et al. Significant impact of survivin on myeloma cell growth. *Leukemia* 2007;21:1070-8.
- Menoret E, Gomez-Bougie P, Geffroy-Luseau A, Daniels S, Moreau P, Le Gouill S, et al. Mcl-1L cleavage is involved in TRAIL-R1- and TRAIL-R2-mediated apoptosis induced by HGS-ETR1 and HGS-ETR2 human mAbs in myeloma cells. *Blood* 2006;108:1346-52.
- Romagnoli M, Desplanques G, Maïga S, Legouill S, Dreano M, Bataille R, et al. Canonical nuclear factor kappaB pathway inhibition blocks myeloma cell growth and induces apoptosis in strong synergy with TRAIL. *Clin Cancer Res* 2007;13:6010-8.
- Magrangeas F, Lodé L, Wuilleme S, Minvielle S, Avet-Loiseau H. Genetic heterogeneity in multiple myeloma. *Leukemia* 2005;19:191-4.
- Mitsiades CS, Mitsiades NS, Richardson PG, Munshi NC, Anderson KC. Multiple myeloma: a prototypic disease model for the characterization and therapeutic targeting of interactions between tumor cells and their local microenvironment. *J Cell Biochem* 2007;101:950-68.
- Carter BZ, Milella M, Tsao T, McQueen T, Schober WD, Hu W, et al. Regulation and targeting of anti-apoptotic XIAP in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2003;17:2081-9.
- Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J* 1999;18:5242-51.
- Liu Z, Dong Z, Han B, Yang Y, Liu Y, Zhang JT. Regulation of expression by promoters versus internal ribosome entry site in the 5'-untranslated sequence of the human cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1. *Nucleic Acids Res* 2005;33:3763-71.
- O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* 2006;66:1500-8.
- Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, et al. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest* 2008;118:3065-74.
- Yamagiwa Y, Marienfeld C, Meng F, Holcik M, Patel T. Translational regulation of x-linked inhibitor of apoptosis protein by interleukin-6: a novel mechanism of tumor cell survival. *Cancer Res* 2004;64:1293-8.
- Nakagawa Y, Abe S, Kurata M, Hasegawa M, Yamamoto K, Inoue M, et al. IAP family protein expression correlates with poor outcome of multiple myeloma patients in association with chemotherapy-induced overexpression of multidrug resistance genes. *Am J Hematol* 2006;81:824-31.
- Chauhan D, Neri P, Velankar M, Podar K, Hideshima T, Fulciniti M, et al. Targeting mitochondrial factor Smac/DIABLO as therapy for multiple myeloma (MM). *Blood* 2007;109:1220-7.
- Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood* 2007;109:3489-95.

Article 2:

"La déplétion en Survivine induit du dommage à l'ADN dans les cellules de cancer du sein et conduit à une augmentation de la sensibilité aux agents endommageants de l'ADN"

Manuscrit en préparation.

Les cassures doubles brins (DSBs) de l'ADN sont fréquemment retrouvées dans les cellules cancéreuses et peuvent induire un arrêt du cycle cellulaire et le déclenchement du processus apoptotique. Ces cassures contribuent également à une instabilité génétique en fonction de l'ampleur de la lésion de l'ADN et de la capacité de la cellule à réparer ces dommages (Fillingham et al. 2006). Les cassures doubles brins sont des lésions particulièrement toxiques pour la cellule et une partie des traitements anti-cancéreux actuels reposent sur l'utilisation de la radio- ou chimiothérapie afin de provoquer une très forte induction de cassures doubles brins au niveau des cellules tumorales. Cependant, les cassures doubles brins sont également une source d'instabilité chromosomique (CIN) génératrice d'évènements oncogéniques (Geigl et al. 2008) et d'évolution pour les cellules tumorales déjà existantes (Weaver et al. 2007) si ces dernières arrivent à en maîtriser l'étendue. De nombreuses sources aussi bien endogènes (espèces réactives oxygénées par exemple) qu'exogènes (notamment les radiations ionisantes) peuvent provoquer la génération de DSBs et consécutivement le déclenchement des voies de réparation du dommage à l'ADN.

Une des caractéristiques premières des cellules cancéreuses est leur capacité à proliférer de façon incontrôlée provoquant un stress mitotique (Luo et al. 2009). Le point de contrôle du fuseau mitotique retarde le déclenchement de l'anaphase afin qu'une bonne ségrégation des chromosomes soit assurée. Un relâchement dans ce point de contrôle est fréquemment observé dans les cellules cancéreuses (Hanks et al. 2004). Cette défaillance du point de contrôle peut mener à instabilité chromosomique ainsi qu'à une résistance envers les agents chimiothérapeutiques couramment utilisés. Les cellules cancéreuses ayant quand même besoin d'un point de contrôle un minimum fonctionnel, elles devraient être sensibles

à l'abrogation de ce point de contrôle. En effet, des souris KO pour les protéines Mad2 et BubR1 sont non viables.

Découverte il y a dix ans, la Survivine, du fait de son rôle dans la régulation à la fois de la division cellulaire et de l'apoptose deux mécanismes impliqués dans le développement tumoral a rapidement été une cible privilégiée dans l'établissement de thérapies anti-cancéreuses (Altieri 2008). La Survivine en association avec la kinase Aurora-B, INCENP et la Boréoline constitue le complexe CPC (« Chromosomal passenger complex ») et permet l'adressage de ce dernier et l'activation d'Aurora-B (Lens et al. 2006). La Survivine est également un senseur de l'attachement des microtubules au niveau des kinétochores et participe donc, à ce titre au point de contrôle de la mitose qui est activé lors d'un défaut de tension des microtubules (Lens et al. 2006).

Dans le cancer du sein, les patients atteints du sous-type surexprimant les récepteurs Her2 ainsi que celui hormono-dépendant bénéficient d'une thérapie ciblée alors que les autres sous-types, notamment celui des tumeurs triple négatives (ER-/PR-/Her2-) ne bénéficient pas de thérapies efficaces à ce jour. Il a été montré que les cancers du sein arboraient souvent une instabilité chromosomique dont les mécanismes restent cependant méconnus. Il a été, en outre, observé une corrélation, dans le cancer du sein, entre la présence d'instabilité chromosomique et la résistance au taxol, un inhibiteur des microtubules (Swanton et al. 2009).

Nous nous sommes donc attachés à savoir si la déplétion en Survivine, surexprimée dans les lignées du cancer du sein, ne pourrait pas induire un stress endommageant de l'ADN qui pourrait déclencher, en combinaison avec des agents endommageant de l'ADN ou des agents anti-mitotiques, une accumulation de stress toxique pour ces cellules.

La déplétion en Survivine induit l'apparition des marqueurs du dommage à l'ADN dans des cellules cancéreuses mammaires.

Nous avons pu constater que la diminution de l'expression de la Survivine, par siARN, dans les lignées de cancer du sein induisait un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. De plus, cette même déplétion en Survivine induit l'augmentation du niveau d'expression de la forme phosphorylé (ser 139) d'H2AX, et ce, en absence de source exogène de dommages à l'ADN. Cette augmentation de l'expression de phospho-H2AX s'accompagne de la formation de foci nucléaires associés à la chromatine de cette même protéine. Cette formation de foci nucléaires diffus dans le noyau est un marquage typiquement associé à un déclenchement de réponse à des dommages à l'ADN tel que l'on pourrait l'obtenir avec un traitement avec du cisplatine ou une irradiation γ . Pour s'assurer de la présence de dommages à l'ADN dans les cellules déplétées en Survivine, nous avons réalisé des expériences d'analyse cellule à cellule grâce au test des comètes. Ces tests ont été réalisés en milieu alcalin afin de détecter la présence des DSBs. Nous avons pu constater que l'ADN des cellules déplétées en Survivine formait de comètes au même titre que les cellules ayant subies une irradiation γ indiquant par la même la présence de DSBs. Il est à noter qu'un pré-traitement avec un inhibiteur à large spectre des caspases ne parvient pas à contrecarrer de façon significative l'apparition de ces DSBs. Tout ceci nous indiquant que la déplétion en Survivine induit des DSBs, dans le cancer du sein, de façon indépendante de l'apoptose.

La diminution d'expression de la Survivine n'altère pas la réponse aux dommages à l'ADN induits par une irradiation γ

Afin de mieux caractériser l'apparition de ces DSBs lors de la déplétion des cellules de cancer du sein en Survivine, nous avons examiné si ces dernières étaient dues à un processus d'induction ou d'accumulation. Une étude cinétique des réparations induites par irradiation indique que les dommages induits par irradiation sont réparés aussi efficacement en présence ou non de Survivine. De plus, la déplétion en Survivine sensibilise aux dommages à l'ADN induit par irradiation dans la lignée Cal 51. Ces données indiquent que l'augmentation de foci H2AX observée lors de la déplétion de Survivine serait due à un accroissement de

l'activation d' γ H2AX (augmentation du nombre de foci γ H2AX) plutôt que liée à une persistance de foci pré-existants. De plus la voie de réponse aux dommages à l'ADN ne semble pas perturbée comme l'indique la colocalisation des foci de membres du complexe MRN avec ceux de γ H2AX en condition siSurvivine.

Le blocage du cycle cellulaire coïncide avec l'apparition des DSBs

Nous nous sommes ensuite interrogés sur une éventuelle corrélation entre l'apparition des DSBs en condition siSurvivine et le rôle de cette protéine dans le cycle cellulaire. En effet, la déplétion en Survivine conduit à un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M comme nous avons pu l'observer dans nos lignées de cancers du sein. Le taxol, un inhibiteur des microtubules, induit un même blocage G2/M ainsi que la formation de DSBs dans nos lignées cancéreuses mammaires. Nous avons, en outre, constaté un effet additif dans la combinaison de la déplétion en Survivine et d'un traitement au taxol. Ces données suggèrent qu'un blocage de la mitose, par un complexe CPC déficient ou la présence d'un poison des microtubules, déclenche des DSBs dans les cellules de cancer du sein.

La déplétion en Survivine sensibilise les cellules de cancer du sein aux agents génotoxiques et aux poisons des microtubules

Enfin nous avons évalué que la déplétion en Survivine des cellules de cancer du sein induisait une inhibition de croissance de ces dernières lors d'un traitement avec du cisplatine, un agent génotoxique. De plus, cette même déplétion combinée à un traitement au taxol accroît l'apoptose dans ces cellules.

Nous donnés suggèrent donc que l'inhibition de la Survivine augmenterait le stress mitotique dans les cellules tumorales mammaires déclenchant ainsi une surcharge de stress qui pourrait être exploitée au niveau thérapeutique dans la lutte contre les cancers.

Survivin downregulation triggers DNA damage in breast cancer cells and leads to enhanced sensitivity to DNA-damaging agents

Grégoire Desplanques¹, Philippe Hulin², Philippe Juin¹, Sophie Barillé-Nion¹

¹INSERM, CRCNA U892, IRT1, BP70721 Nantes 44007 cedex 1, France

²INSERM, IFR26, IRT1, BP70721 Nantes 44007 cedex 1, France

Corresponding author : Sophie Barillé-Nion, PharmD, PhD
INSERM, CRCNA U892, IRT1
BP70721
Nantes 44007 cedex 1
France
e-mail : sophie.barille@inserm.fr
Phone : 33 2 28 08 02 93
Fax : 33 2 28 08 02 04

ABSTRACT

DNA double strand breaks (DSB) are the most challenging DNA lesions for tumor cells. Indeed, they may either cause cell-cycle arrest and cell death or contribute to genetic instability such as aneuploidy, depending on their extent and on the cell capacity to repair them. Since DSB can arise during mitosis, we first evaluated whether the major mitotic regulator survivin whose overexpression is frequently found in cancer cells, interfered with spontaneous DSB occurrence in breast cancer. We point out for the first time that survivin depletion triggered DSB in breast cancer cells despite an intact DNA-damage repair capacity. Moreover, we show evidence that combining survivin depletion with DNA damaging agents, such as the direct genotoxic agent cisplatin or microtubules inhibitors resulted in synergic effect on breast cancer cell growth. These data strengthen the hypothesis that a DNA damage stress overload during mitosis promotes toxicity in cancer cell and argue for the therapeutic interest to associate survivin inhibitors to direct or indirect DNA damaging agents in breast cancer therapy.

INTRODUCTION

In addition to the hallmarks initially proposed by Hanahan and Weinberg (Hanahan and Weinberg 2000), cancer cells exhibit a set of hallmarks that depict the stress phenotypes of cancer cells, including metabolic stress, proteotoxic stress, mitotic stress, oxydative stress and DNA damage stress (Luo *et al*, 2009). Genetic analyses of solid tumors clearly indicate that tumors pass through stages of extreme genomic instability that result in the accumulation of point mutations, deletions chromosomal rearrangements and extensive aneuploidy. In normal cells, DNA damage signals to halt proliferation, induce cellular senescence or elicit apoptosis. In contrast, cancer cells have evolved to overcome the antiproliferative effects of DNA damage, continuing to replicate in the presence of damage. Of note, tumor cell fate mostly depends on the extent of DNA lesions and on the cell capacity to repair them (Fillingham *et al.*, 2006). DNA double strand breaks (DSB) are the most challenging DNA lesions for cells. Various events either endogenous or exogenous, can generate DSB in cells, including byproducts of metabolism, cell division, or exogenous agents such as chemicals, ultraviolet radiation, and ionizing radiation (IR). Immediately following the generation of a DSB, a highly conserved DNA damage response pathway is activated to halt cell-cycle progression and repair the lesion. The molecular response to DNA damage begins with the recognition of the DSB followed by the activation of phosphatidyl inositol-3-kinase-like kinase family members ATM, ATR, and DNA-PK. Once activated, these kinases phosphorylate a number of effector molecules that regulate cell-cycle progression, DNA damage repair, and apoptosis. DSB probably coupled with errors in mitosis, favors chromosome instability (CIN) leading to genetic instability, a key process in oncogenesis (Vogelstein *et al*, 2004 and Geigl *et al*, 2007). Many tumors indeed display increased rates of chromosome mis-segregation that result from defects in pathways involved in mitosis. As proposed by Luo *et al* , highly proliferating cancer cells undergo a major mitotic stress that is mainly controlled by mitotic checkpoint (Luo *et al*, 2009). The mitotic checkpoint ensures an accurate segregation of chromosomes during mitosis by delaying the onset of anaphase until all chromosomes are properly attached to a bipolar mitotic spindle. While complete loss of this checkpoint is lethal in vertebrates, a weakened mitotic checkpoint is frequently seen in cancer cells and it may contribute to tumorigenesis, as observed in inherited mutations in BUB1B resulting in chromosomal segregation defects and increased tumor incidence in humans (Hanks *et al*, 2004). Importantly, a compromised mitotic checkpoint may promote resistance to commonly used chemotherapeutic agents and treatment of tumors with a weakened mitotic checkpoint represents a challenge. However a minimum function of the mitotic checkpoint is indeed essential for the viability of proliferating cancer cells, therefore these cells may be particularly susceptible to the suppression of the mitotic checkpoint.

In the last decade, survivin has attracted considerable attention as a therapeutic target for anticancer strategies because of its dual role in regulating cell division and apoptosis, which are both involved in tumor development (Altieri 2008). Survivin is a mitotic protein that associates with Aurora B kinase, INCENP and borealin to form chromosomal passenger complex, dictating the localization of the complex and the activation of Aurora B kinase (Ruchaud *et al*, 2007). Survivin also plays an important role in mitotic checkpoint as a sensor of kinetochore-microtubule attachment, a component of the mitotic checkpoint that is activated by a lack of microtubule tension (Lens *et al*, 2003). Moreover, survivin promotes cell survival, especially cancer cell survival through various not yet unified molecular networks involving major regulators of apoptosis such as caspases, XIAP and its endogenous inhibitor SMAC (Dohi *et al*, 2007 and Song *et al*, 2003). Of major interest, survivin has been consistently identified as a risk-associated gene in various malignancies, carrying unfavorable implications for cancer prognosis, disease recurrence and abbreviated survival (Altieri 2008).

Of note, survivin overexpression has been identified in breast cancer cells (Brennan *et al*, 2008) and together with other gene signatures, this information is now being used in the clinic for the risk assessment of breast cancer patients (Paik *et al*, 2004). Moreover, survivin may play a particular role in oncogenetic processes involved in the subset of breast cancers defined by the absence of expression of both receptors estrogen/progesteron and tyrosine kinase ErbB2 (Wang *et al*, 2008 and Lee *et al*, 2008) and poor diagnostic related to their aggressive phenotype and the absence of targeted therapies. Finally, survivin overexpression in breast cancer cells also contributes to resistance to chemotherapy such as microtubule inhibitors through mitotic deregulation (Lu *et al*, 2009). Interestingly, Swanton and colleagues reported a correlation between CIN and resistance to the microtubule inhibitors in breast cancer cells (Swanton *et al*, 2008).

Since DSB may occur during mitotic arrest (Quignon *et al*, 2007 and Dalton *et al*, 2007), we evaluated whether survivin depletion in breast cancer cells could induced a DNA damage stress defined by DSB occurrence that might trigger in combination with DNA damaging agents or antimetabolic agents, an overload stress toxic for these cells. We first observed that survivin depletion generated significant DSB in breast cancer cells independently of apoptosis induction. This effect was not related to DDR inhibition since breast cancer cells did efficiently repair their DNA upon ionizing irradiation (IR) even in the absence of survivin. Finally, we pointed out that DSB accumulation obtained by combination of survivin depletion and DNA-damage inducing agents, such as the genotoxic molecule cisplatin or the microtubule inhibitor taxol, led to increased cytotoxicity, suggesting the interest to combine potent DSB inducers in breast cancer treatment.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture

The MCF7, MCF10A, SKBR3 AND MDA-MB 231 cell lines were purchased from ATCC (Manassas, Virginia, USA) and Cal51 cell line from DMSZ (Braunschweig, Germany). MCF7, Cal51 and SKBR3 were maintained in RPMI-1640 medium, MDA-MB 231 in DMEM medium all supplemented with 10% FCS, 2mM L-glutamine, 100U.ml⁻¹ penicillin and 0.1 mg.ml⁻¹ streptomycin. MCF10A were maintained in DMEM-F12 medium supplemented with 2µg.ml⁻¹ BPE, 500ng.mL⁻¹ hydrocortisone, 20µg.ml⁻¹ hEGF, 10µg.mL⁻¹ insulin, 100ng.ml⁻¹ cholera toxin, 5% horse serum, 1% HEPES, 100U.ml⁻¹ penicillin and 0.1mg.ml⁻¹ streptomycin. All the products were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA) except for RPMI-1640, DMEM and DMEM-F12 medium which were purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Irradiation of cells was performed with a Faxitron X-Ray apparatus from Edimex (Le Plessis Grammorie, France). Cells were used 30 min after 1, 2 or 5 Gy irradiation.

Reagents and Antibodies

zVAD-fmk was purchased from Promega (Fitchburg, Wisconsin, USA). Taxol was from Mayne Pharma France (Asnières, France) and Cisplatin from Hotel-Dieu Hospital (Nantes, France). Anti-Survivin antibody was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), anti-gH2AX from Upstate (Hampshire, UK), anti-Actin from Chemicon International (Billerica, MA, USA) and goat anti-mouse Alexafluor antibody from Molecular Probes (Paisley, UK).

Cell growth assay (MTT)

Cell growth assay was assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. After 24H of transfection, drugs were added for 18H and cells were incubated with 50µl of 2.5mg.ml⁻¹ MTT (Sigma-Aldrich) for 3h 30min. Absorption at 570nm wavelength was measured after total solubilization of formazan crystals by 100µl of lysis solution. Each test was done in triplicates. The inhibition of cell growth induced by drugs was expressed as a percentage compared to untreated corresponding cells.

Cell cycle analysis

Cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and the cell cycle was assessed by flow cytometry analysis after digitonin (Sigma-Aldrich) permeabilization and 7-Amino-Actinomycin D (7AAD) staining (Merck Chemicals, Nottingham, UK). Flow cytometry analysis was performed on a FACSCalibur using the CellQuest software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Immunoblot analysis

A total of 3.10⁵ cells were resuspended in lysis buffer (1% SDS ; 10mM EDTA ; 50mM Tris-Hcl pH8,1 ; 1mM PMSF ; 10µg.ml⁻¹ aprotinine ; 10µg.mL⁻¹ leupeptine ; 10µg.mL⁻¹ pepstatine ; 1mM Na3VO4 and 50mM NaF) and sonicated with Bioruptor apparatus from Diagenode. Protein concentration was measured using bicinchoninic acid (BCA protein assay, Pierce, Rockford, IL, USA). Seventy micrograms of proteins were loaded on each lane. Proteins were separated by a 15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), then electrotransferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Western blot analysis was performed by standard techniques, with ECL detection (Pierce) for gH2AX and actin, or with SuperSignal detection (West Dura Extended Duration Substrate,

Pierce) for Survivin. Protein loading was checked with anti-actin monoclonal antibody (mAb).

Immunohistochemistry (IHC)

Thirty thousand cells were seeded onto coverslips and incubated 24h. Cells were then transfected and incubated for 48h more before staining. Coverslips were washed in PBS then fixed in PBS-formaldehyde-picric acid at room temperature for 30 min. Coverslips were rinsed in three changes of PBS. Cells were permeabilized with a solution of PBS-1% SDS for 10 min at room temperature and washed once in PBS. Coverslips were placed in blocking solution (PBS-5% gelatin) for 30 min at 37°C and washed once in PBS. Cells were incubated for 1h30 at 37°C with a 1/1000^e mouse anti-gH2AX antibody, washed three times in PBS and incubated for 1h30 with a 1/400^e goat anti-mouse Alexafluor antibody at 37°C in the dark. Coverslips were washed three times in PBS before being mounted onto microscope slides using ProLong® Gold antifade reagent with DAPI from Invitrogen. The edges of coverslips were sealed with clear nail varnish. Once dried, slides were visualized using an ApoTome fluorescence microscope attached to a AxioCam MRm Zeiss camera. Images were acquired in 4x4 mosaic by a x20 objective with AxioVision software purchased from Zeiss (Le Pecq, France). Images were imported into MetaMorph software from Molecular Devices (Dowington, PA, USA). All the field was scored from top to bottom until a mean of 1000 nuclei were scored per treatment to remove bias of nuclei selection. The scoring was done on the base of a nucleus recognition by dapi staining. The score was expressed on gH2AX threshold area percentage of three distinct experiments (mean +/- S.E.).

RNA interference

For transient RNA interference experiments, siRNA Survivin or Control siRNAs from Applied Biosystems (Courtaboeuf, France) were transfected in breast cancer cell lines using HiPerfect transfection reagent as recommended by the manufacturer (Qiagen, Courtaboeuf, France). For stable RNA interference experiments using lentiviral delivery, short hairpin (sh)RNA Survivin and Control were prepared as previously used by Romagnoli *et al* (Romagnoli *et al*, 2007). A multiplicity of infection of 2 (MOI 2) was used to transduce breast cancer cell lines. Transduction efficacy was evaluated by green fluorescent protein detection. shRNA-transduced cells were used for experiments 5 days after transduction. For the experiments evaluating apoptotic process, 50µM of the pancaspase inhibitor zVAD-fmk were added to cells 1h prior transfection and maintained during the experiment.

Comet assay

The single cell electrophoresis assay, or comet assay, was performed in alkaline buffer. Fifteen thousand cells were added to 40°C low melting agarose (LMA) and 50µL were immediately pipetted onto two well CometSlide™. The LMA was still on 40°C water bath until each loading was done. Slides were placed at 4°C in the dark for 30 min before being immersed in prechilled lysis buffer for 30min at 4°C. Slides were then immersed in freshly prepared alkaline solution for 20 min at room temperature in the dark. The alkaline electrophoresis was performed on an ice surrounded vessel to maintain constant 21V and 300mA for 30 min. After electrophoresis, slides were gently rinsed in H₂O several times before being immersed in 70% ethanol for 5 min. Slides were air dried before adding 100µL of a 1/10 000 diluted SYBR Green I solution. Slides were visualised using a DMI 6000B fluorescence Leica microscope attached to a CoolSNAP HQ 2 camera, from Sutter Instrument Company (Novato, CA, USA), and images were acquired in a 12x12 mosaic by a long distance x10 objective with MetaMorph software. Images were transferred and analyzed into Comet Assay

IV software (Perceptive instruments, Suffolk, UK). The score was expressed on tail moment with arbitrary units. The 10 pH lysis buffer was prepared with 2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM TRIS, 1% N-lauryl sarcosin and the alkaline buffer with 300mM NaOH and 1mM EDTA. Two chambers slides were purchased from Trevigen (Gaithersburg, MD, USA) and buffer compounds from Sigma-Aldrich.

RESULTS

Survivin depletion induced DNA damage hallmarks in breast cancer cells.

We first evaluated the impact of survivin depletion on DNA damage occurrence. Acute depletion of survivin was obtained using siRNA transfection in human breast cancer cell lines, as shown in Cal51 in Figure 1A. As expected, survivin depletion associated to G2/M cell cycle blockade (Figure 4A). Interestingly, survivin depletion also associated to increased levels of phosphorylated (serine 139) H2AX (γ H2AX) in the absence of exogenous DNA damage, in comparison with control cells transfected with control siRNA (siControl) as detected by immunoblot (Fig 1A). The genotoxic agent cisplatin triggering DNA damage and DDR, was used as positive control. Moreover, IHC analysis clearly indicated that increased γ H2AX staining in survivin-depleted cells localized in nuclear foci typical of chromatin-associated foci observed in cellular DNA damage response (DDR), as observed in cisplatin-treated or γ irradiated cells (Fig 1C). γ H2AX activation was also observed in cells transfected with a second survivin siRNA targeting a second sequence in *survivin* RNA (data not shown). Prolonged survivin depletion using shRNA interference by lentiviral delivery also induced γ H2AX activation arguing against non specific effect related to transfection (Fig 1C). To directly assess DNA breaks, survivin-depleted cells were further analysed in a single cell gel electrophoresis comet assay in comparison with siControl cells. As shown in figure 2A survivin depletion as well as γ irradiation induced comet formation in alkaline assay, demonstrating that DNA double-strand breaks (DSB) occurred. Moreover, quantification of comet parameters clearly indicated that survivin depletion induced a significant increase of the tail moment, as high as 1 Gy- γ irradiation. Importantly, even though survivin depletion triggered low if any apoptosis in conditions used in the experiments, DSB occurrence was evaluated in presence of the pancaspase inhibitor zVAD-fmk. Indeed this treatment could not significantly prevent DSB formation and argue against caspase dependent DSB (supplemental data 1). Moreover, γ H2AX staining did not lead to a marginal and confluent ring staining as previously described in apoptotic cells by Solier *et al* (Solier *et al*, 2009). Overall, our data indicate that survivin depletion triggered DSB in breast cancer cells independently of an apoptotic process.

Survivin knockdown did not alter DNA damage response to γ -irradiation

To gain insight in the occurrence of DSB by survivin depletion, we examined whether the increase of γ H2AX related to either induction or persistence of γ H2AX foci. While the basal level of γ H2AX foci was increased in survivin-depleted cells, the resolution of IR-induced foci was similar to the one observed in siControl cells (Figure 3A). This suggested that the increase in γ H2AX foci following survivin silencing was rather due to increased activation of γ H2AX than persistence of preexisting foci. Moreover, both actors of the MRN complex involved in DDR, Nbs1 or Mre11, colocalized with γ H2AX foci induced by survivin depletion as observed by confocal analysis (data not shown) arguing for an intact DDR in absence of survivin. Survivin silencing, therefore, induced formation of DSB but had no major impact in DDR since DNA repair markers did localize on DSB.

Altered mitotic progress correlated with DSB occurrence

We further ask whether DSB induced by survivin depletion could be related to mitotic arrest. We first observed that breast cancer cells accumulated in 4N chromosomes population arguing for efficient mitotic arrest upon survivin depletion compared to siControl cells (Fig 4A), as assessed by flow cytometry after 7AAD staining. Moreover, the microtubule inhibitor taxol that potently blocked mitotic progress, also induced significant DSB in breast cancer

cells. Interestingly, combination of survivin depletion and taxol led to increased formation of tail moment in a comet assay (Fig 4B), thus demonstrating additive genotoxic effect of survivin depletion and taxol on breast cancer cells. In addition, depletion of aurora-B kinase, member of the CPC as survivin, also induced DSB (data not shown). Altogether these results suggest that delayed mitosis obtained either by CPC defect or microtubules inhibitors triggered DSB in breast cancer cells.

Survivin depletion sensitized breast cancer cells to genotoxic agents and microtubules inhibitors.

We further evaluated whether survivin knockdown may modify breast cancer cells sensitivity to DNA damaging agents such as the genotoxic drug cisplatin and the microtubule inhibitor taxol. Combining survivin depletion and cisplatin treatment led to significantly increased growth inhibition of breast cancer cells, in contrast to survivin overexpression that protected cells from growth inhibition, as shown in Figure 5A. In addition, survivin depletion combined to taxol treatment increased dramatic apoptosis in these cells (Figure 5B).

DISCUSSION

Overall our data indicate that survivin depletion in breast cancer cells potently induced DSB accumulation that (1) did not relate to apoptotic process and (2) were due to increased formation of DSB rather than decreased repair of existing DSB. Interestingly, even though survivin depletion alone induce limited cell death in these cells, combining it with potent DSB-inducers agents, such as cisplatin or taxol, led to cell growth inhibition and apoptosis induction.

Indeed, we reported for the first time, that survivin depletion in cancer cells generated DSB. These DSB were first characterized by activation of the key component of DSB detection γ H2AX. Of note, survivin has just been reported among a genome-wide siRNA screen to cause γ H2AX activation in Hela cells (Paulsen *et al*, 2009). However, H2AX ser 139 phosphorylation may occur spontaneously in cancer cells specially during mitosis (Ichijima *et al*, 2005), and survivin depletion potently blocks mitotic progress. We thus tested whether γ H2AX foci associated to DSB in survivin depleted cells. The alkaline comet assay allowed us to point out that DSB did occur at single cell level. Therefore, γ H2AX activation did correlate to DSB formation upon survivin depletion in breast cancer cells. Importantly, DSB could also be detected when survivin depletion was induced by shRNA lentiviral delivery and the specificity of survivin targeting was strengthened by the use of a second sequence survivin siRNA. As survivin contributes to survival in cancer cells, we further explored whether DSB eventually related to apoptotic process that did generate DSB during DNA fragmentation (Solier *et al*, 2009). However, neither the apoptotic specific γ H2AX staining could be detected, nor cell treatment with a pancaspase inhibitor before survivin depletion could prevent DSB formation, arguing against caspase-dependent DSB occurrence. As DSB accumulation could result from new DSB generation or decreased DNA repair, we studied DNA damage response repair at both molecular and cellular levels. First, at molecular level, both actors of the MRN complex Mre11 and Nbs1, were recruited on nascent DSB sites targeted by γ H2AX (Bonner *et al*, 2008). Second, at cellular level, DNA repair following IR-induced DSB was as efficient in survivin depleted cells as in control cells. Of note, DSB formation upon survivin depletion occurred in cells independently of their p53 status (MDAMB-231 displays p53 mutation, in contrast to Cal-51 that harbors wild-type p53). Thus survivin depletion rather relates to increased spontaneous DSB formation than DNA repair defect in breast cancer cells. Increased DSB, frequently occurred in cancer cells compared to normal cells, due to various stresses undergone by these cells (Luo, 2009), such as oxydative stress, mainly enhanced in cancer cells. However, we did not detect increased ROS production in survivin-depleted cells compared to control cells (data not shown). In contrast, survivin depletion could induce a mitotic stress in cancer cells due to its major role in mitosis progression. Since, spontaneous DSB may occur during mitotic arrest (Quignon *et al*, 2007 and Dalton *et al*, 2007), we propose that mitosis delaying induced by survivin depletion contributes to DSB occurrence in breast cancer cells. This hypothesis was further supported by the observation that DSB formation was also triggered upon mitotic blockade by taxol treatment. Our results showing DSB generation by microtubule inhibitor treatment corroborate those of Quignon and colleagues and strongly suggest that aberrant mitosis creates chromosomal breakage. This point is currently under investigation in our laboratory.

As mentioned above, tumor cells are subjected to various cellular stresses not experienced by normal cells and therefore they are more dependent on stress support pathways for their survival. This dependency could be exploited to disrupt the balance of pro- and anti-survival signaling to the detriment of tumor cells and selectively kill tumor cells (Luo, 2009). In this line, the therapeutic strategy of stress overload, aims to exacerbate existing oncogenic stress in order to overwhelm the stress support pathway in the tumor cell, leading to growth arrest or

cell death. Our results suggest that combining survivin depletion to DSB-inducing agents such as taxol or cisplatin in breast cancer cells, did overwhelm cell capacity to efficiently repair DNA-damage and that DSB accumulation upon combined treatment became toxic for breast cancer cells. This observation argue for the interest to cause stress overload, specially during mitotic stress in cancer cells that specifically present greater reliance on stress support pathways for proper chromosome segregation and therefore are more sensitive to catastrophic genomic instability caused by stress overload as proposed by Weaver and colleagues (Weaver *et al*, 2005). Finally, our results suggest that survivin inhibition increased mitotic stress, particularly in breast cancer cells, promoting stress overload that could be exploited in cancer treatment. Interestingly, survivin inhibitors such as YM155, are currently in clinical trials in cancer therapy and phase I clinical trials gave promising results. Of note, YM155 could sensitize non small lung cancer cells to IR (Iwasa *et al*, 2007). In the same line, survivin ectopic expression in primary glioblastoma cells enhanced their IR resistance (Chakravarti *et al*, 2004). Eventhough the authors argued that ectopic survivin increased DNA repair, they could not preclude the fact that survivin overexpression might help cells to override the IR-induced mitotic arrest, thus limiting DSB mitotic occurrence. One major concern regarding mitotic arrest as a therapeutical strategy in cancer is that cancer cells often harbor a weakened mitotic checkpoint that promotes escape to mitotic arrest, a process known as mitotic slippage. Whether antimitotic drugs induce toxicity in cancer cells arrested in mitosis or after mitotic slippage, is still unclear (Tao *et al*, 2005 and Gascoigne *et al*, 2008). This point is of major importance in the development of drugs designed to cause a mitotic arrest such as survivin inhibitors, since promoting mitotic slippage might limit apoptosis occurring during mitosis in favoring mitotic exit. Further analysis are needed to precisely define cell death process during mitotic arrest and this point is under investigation upon survivin depletion in breast cancer cells.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1

Survivin knockdown induced γ H2AX activation in BCCL.

DNA damage response was evaluated in breast cancer cells after survivin depletion either by siRNA (A-B) or shRNA(C) using serine c-4 phospho-H2AX staining by immunoblot (A), IHC (B-C). (A) γ H2AX and Survivin immunoblot analysis of Cal51 cells treated by Cisplatin (5 μ g/ml) for 18H (lane 2) or not (lane 1), transfected with siRNA control (siControl) (lane 3) or siSurvivin (lane 4). (B) γ H2AX staining by IHC was obtained in siControl or siSurvivin-transfected MDAMB231 cells. Cisplatin treated cells and 5Gy irradiated cells were used as positive control. Cell nuclear were by Dapi Staining. (C) γ H2AX staining by IHC in shsurvivin or shcontrol infected breast cancer cells.

Figure 2

Survivin knockdown induced double strand DNA breaks in BCCL.

Single cell gel electrophoresis in alkaline buffer was performed on untreated or γ irradiated (5Gy) cells, and siControl or siSurvivin transfected MDAMB231 cells. (A) A representative image (x10) of each is shown (n=5). Corresponding quantitative comet parameters were calculated using the comet assay software and comet tail moment was shown in B.

Figure 3

Survivin silencing did not modify the DNA damage response to ionizing irradiation.

γ H2AX staining was assessed in MDAMB231 infected by shControl or shSurvivin at 2, 4, 10h and 24h after γ irradiation (5Gy). Quantification of γ H2AX IHC staining (n=4) was performed using MetaMorph software.

Figure 4

Cell cycle blockade in G2/M by survivin depletion or taxol treatment correlated with DSB formation.

Survivin depletion, as well as taxol treatment in MDAMB231, induced G2/M blockade observed by flow cytometry after 7AAD staining (A) and increased tail moment in comet assay (B).

Figure 5

Combination of survivin depletion and genotoxic agents on breast cancer cell growth.

Cell growth was quantified after treatment by cisplatin 5 μ g.ml⁻¹ (A) or taxol 700 nM (B) for 48H by MTT assay (A) or apoptosis assay (B) in comparison with untreated cells. One representative experiment was shown (n=3).

SUPPLEMENTAL DATA

Figure 1

DSB in survivin-depleted cells were caspase-independent.

MDAMB231 cells were incubated with zVAD-fmk (25 μ M) for 1h before transfection with siControl or siSurvivin. Then apoptosis was assessed by Apo2.7 staining (A) and comet assay was performed as previously. Representative images were shown in B, and corresponding tail moments were quantified and illustrated in (C), n= 3.

REFERENCES

- Altieri DC. New wirings in the survivin networks. *Oncogene*. 2008 Oct 20;27(48):6276-84.
- Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer*. 2008 Jan;8(1):61-70.
- Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S and Pommier Y. *Nat Rev Cancer*. 2008 (8): 957–967.
- Brennan DJ, Rexhepaj E, O'Brien SL, McSherry E, O'Connor DP, Fagan A, Culhane AC, Higgins DG, Jirstrom K, Millikan RC, Landberg G, Duffy MJ, Hewitt SM, Gallagher WM. Altered cytoplasmic-to-nuclear ratio of survivin is a prognostic indicator in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 May 1;14(9):2681-9.
- Chakravarti A, Zhai GG, Zhang M, Malhotra R, Latham DE, Delaney MA, Robe P, Nestler U, Song Q, Loeffler J. Survivin enhances radiation resistance in primary human glioblastoma cells via caspase-independent mechanisms. *Oncogene*. 2004 Sep 30;23(45):7494-506
- Dalton WB, Nandan MO, Moore RT, Yang VW. Human cancer cells commonly acquire DNA damage during mitotic arrest. *Cancer Res*. 2007 Dec 15;67(24):11487-92.
- Dohi T, Xia F, Altieri DC. Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection. *Mol Cell*. 2007 Jul 6;27(1):17-28.
- Fillingham J, Keogh MC, Krogan NJ. GammaH2AX and its role in DNA double-strand break repair. *Biochem Cell Biol*. 2006 Aug;84(4):568-77.
- Gascoigne KE, Taylor SS. Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimitotic drugs. *Cancer Cell*. 2008 Aug 12;14(2):111-22.
- Geigl JB, Obenauf AC, Schwarzbraun T, Speicher MR. Defining 'chromosomal instability'. *Trends Genet*. 2008 Feb;24(2):64-9.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 (100):57-70.
- Hanks S, Coleman K, Reid S, Plaja A, Firth H, Fitzpatrick D, Kidd A, Méhes K, Nash R, Robin N, Shannon N, Tolmie J, Swansbury J, Irrthum A, Douglas J, Rahman N. Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nat Genet*. 2004 Nov;36(11):1159-61.
- Ichijima Y, Sakasai R, Okita N, Asahina K, Mizutani S, Teraoka H. Phosphorylation of histone H2AX at M phase in human cells without DNA damage response. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Oct 28;336(3):807-12.
- Iwasa T, Okamoto I, Suzuki M, Nakahara T, Yamanaka K, Hatashita E, Yamada Y, Fukuoka M, Ono K, Nakagawa K. Radiosensitizing effect of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res*. 15;14(20):6496-504.

Lee CW, Raskett CM, Prudovsky I, Altieri DC. Molecular dependence of estrogen receptor-negative breast cancer on a notch-survivin signaling axis. *Cancer Res.* 2008 Jul 1;68(13):5273-81.

Lens SM, Wolthuis RM, Klompaker R, Kauw J, Agami R, Brummelkamp T, Kops G, Medema RH. Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *EMBO J.* 2003 Jun 16;22(12):2934-47.

Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell.* 2009 Mar 6;136(5):823-37.

Nakahara T, Takeuchi M, Kinoyama I, Minematsu T, Shirasuna K, Matsuhisa A, Kita A, Tominaga F, Yamanaka K, Kudoh M, Sasamata M. YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. *Cancer Res.* 2007 Sep 1;67(17):8014-21.

Quignon F, Rozier L, Lachages AM, Bieth A, Simili M, Debatisse M. Sustained mitotic block elicits DNA breaks: one-step alteration of ploidy and chromosome integrity in mammalian cells. *Oncogene.* 2007 Jan 11;26(2):165-72.

Romagnoli M, Trichet V, David C, Clément M, Moreau P, Bataille R, Barillé-Nion S. Significant impact of survivin on myeloma cell growth. *Leukemia.* 2007 May;21(5):1070-8.

Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Oct;8(10):798-812

Solier S, Pommier Y. The apoptotic ring: a novel entity with phosphorylated histones H2AX and H2B and activated DNA damage response kinases. *Cell Cycle.* 2009 Jun 15;8(12):1853-9.

Song Z, Yao X, Wu M. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2003 Jun 20;278(25):23130-40.

Swanton C, Nicke B, Schuett M, Eklund AC, Ng C, Li Q, Hardcastle T, Lee A, Roy R, East P, Kschischo M, Endesfelder D, Wylie P, Kim SN, Chen JG, Howell M, Ried T, Habermann JK, Auer G, Brenton JD, Szallasi Z, Downward J. Chromosomal instability determines taxane response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 May 26;106(21):8671-6.

Tao W, South VJ, Zhang Y, Davide JP, Farrell L, Kohl NE, Sepp-Lorenzino L, Lobell RB. Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage. *Cancer Cell.* 2005 Jul;8(1):49-59.

Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 2004 Aug;10(8):789-99.

Wang RH, Zheng Y, Kim HS, Xu X, Cao L, Luhasen T, Lee MH, Xiao C, Vassilopoulos A, Chen W, Gardner K, Man YG, Hung MC, Finkel T, Deng CX. Interplay among BRCA1, SIRT1, and Survivin during BRCA1-associated tumorigenesis. *Mol Cell.* 2008 Oct 10;32(1):11-20.

Weaver BA, Cleveland DW. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell*. 2005 Jul;8(1):7-12.

Weaver BA, Silk AD, Montagna C, Verdier-Pinard P, Cleveland DW. Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor. *Cancer Cell*. 2007 Jan;11(1):25-36.

Figure 1

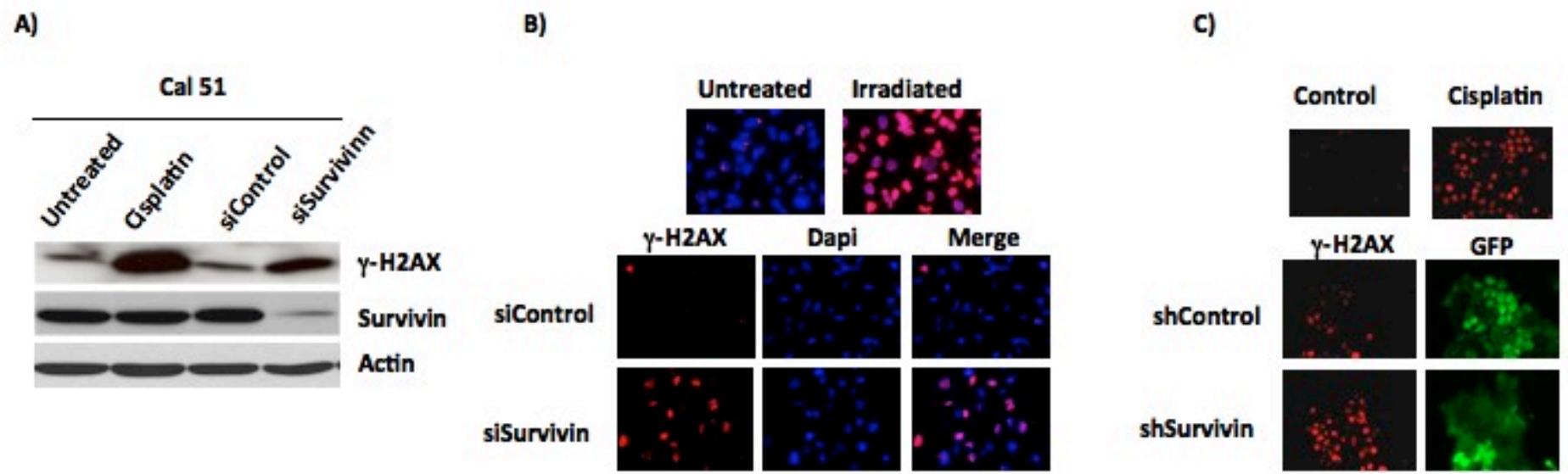
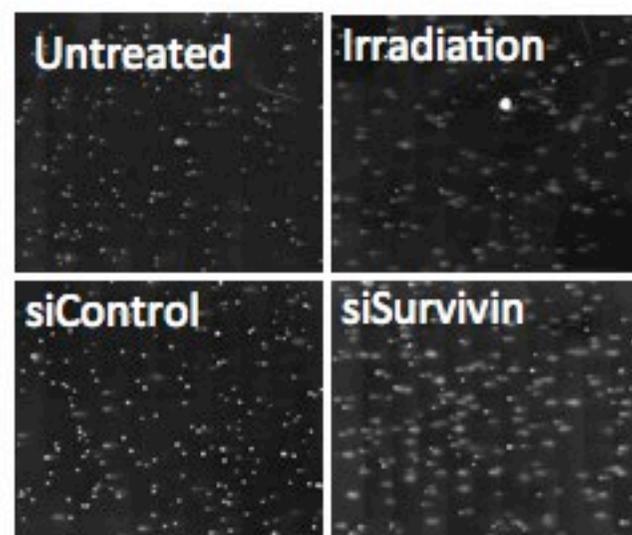


Figure 2

A)



B)

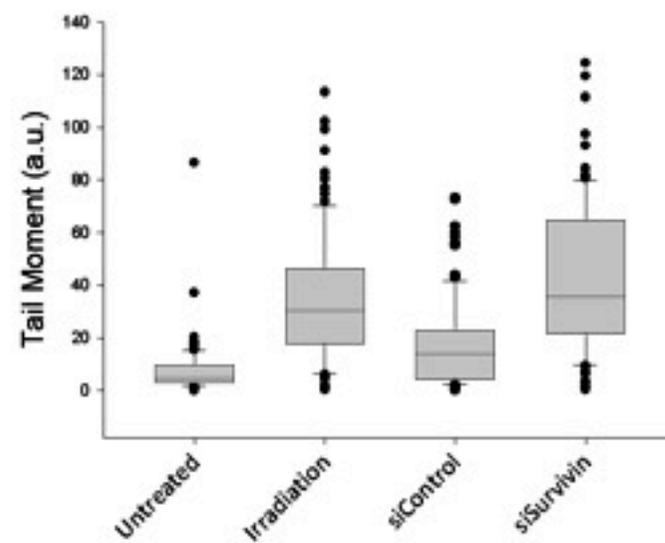


Figure 3

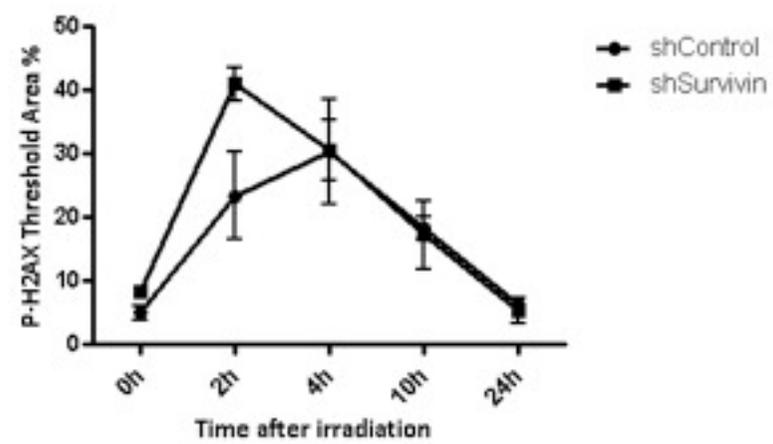


Figure 4

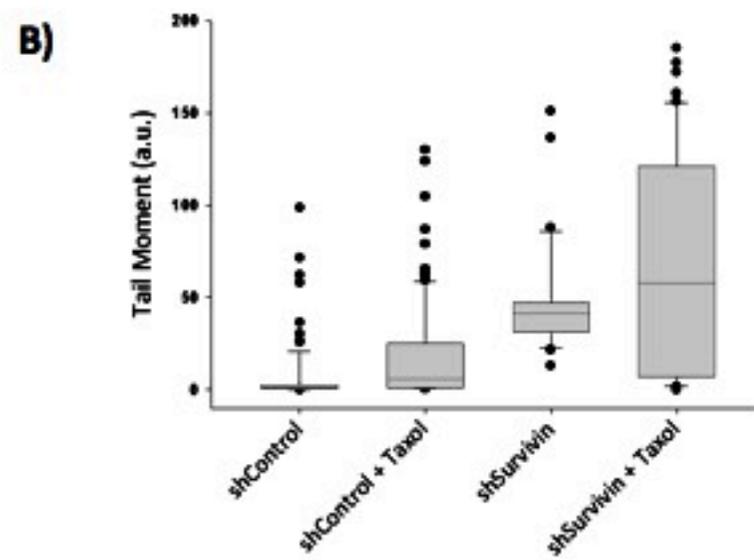
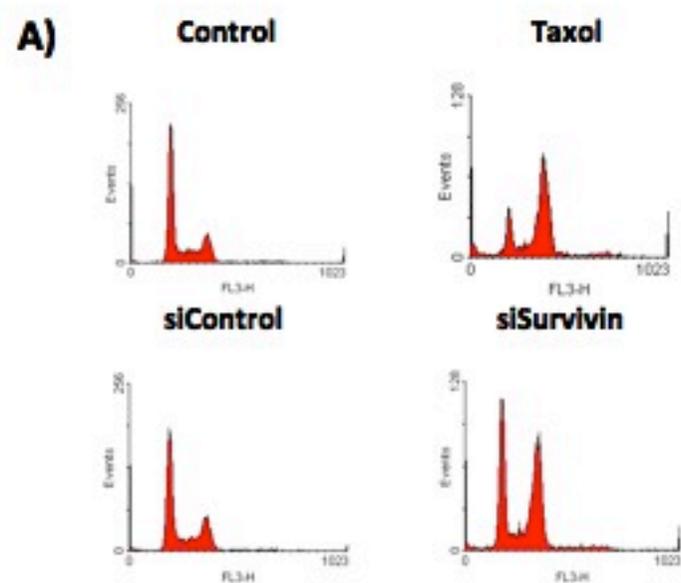
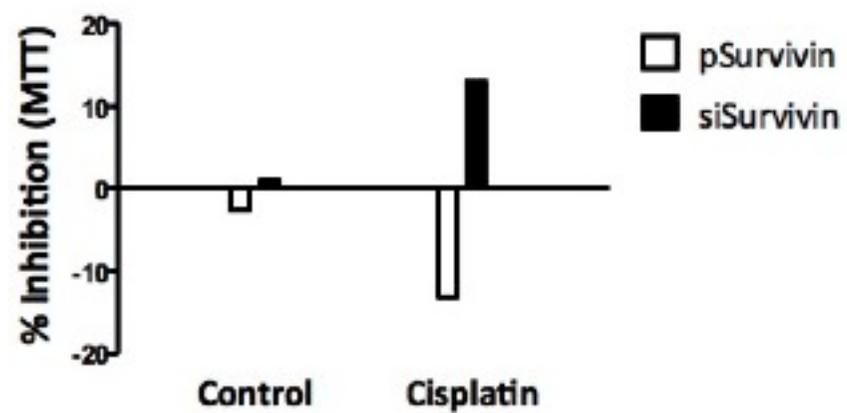
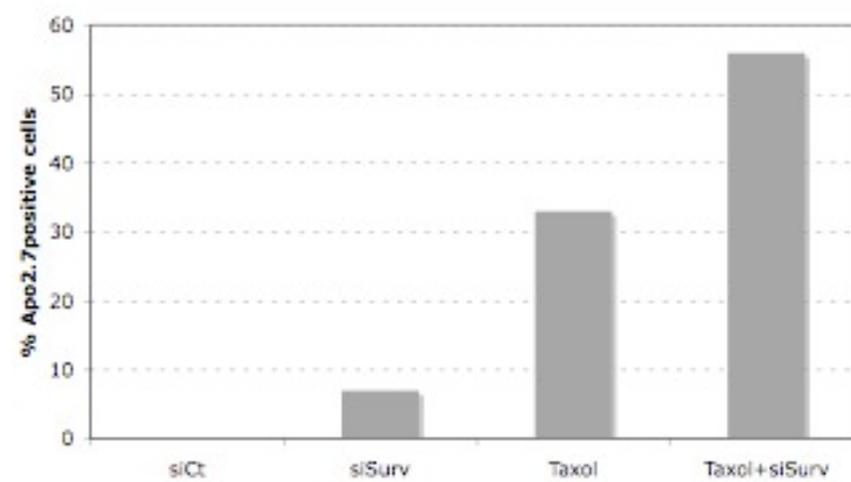


Figure 5

A)

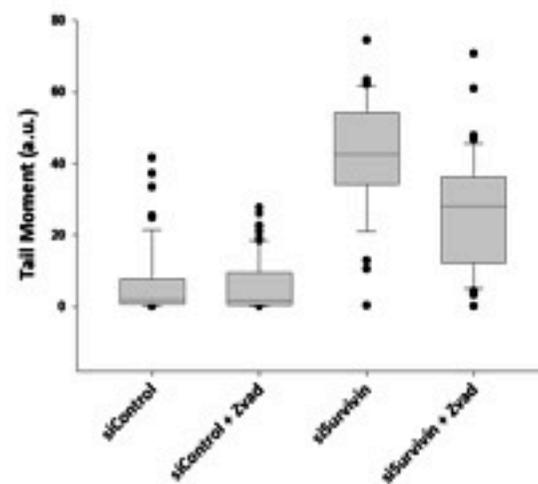
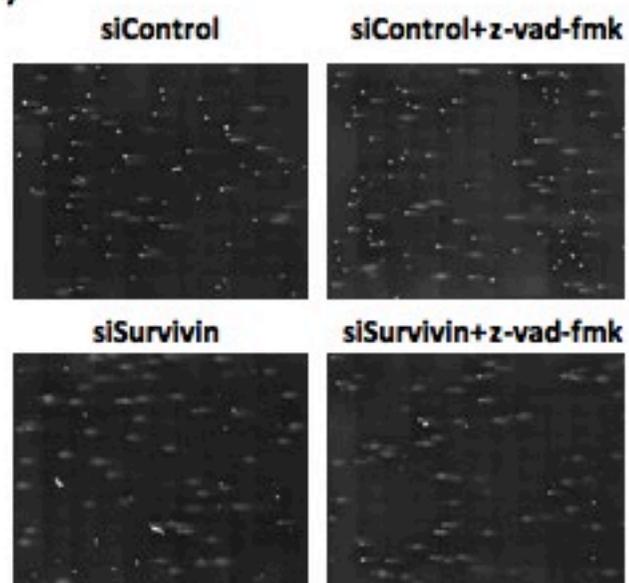


B)

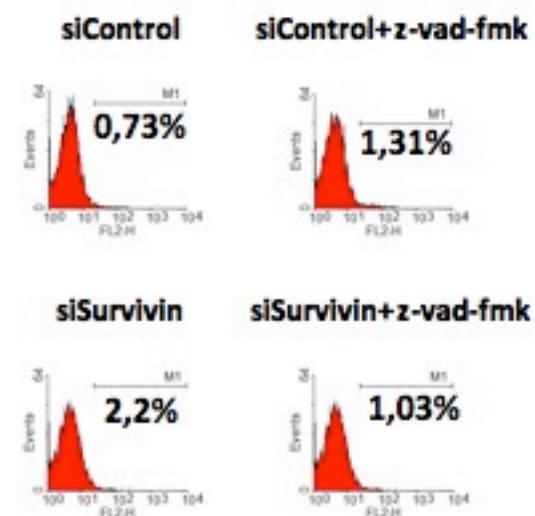


Supplemental Figure 1

A)



B)



DISCUSSION

Impact de l'expression de XIAP sur la survie des cellules de MM

Nous avons montré l'importance de cibler XIAP au niveau protéique dans le MM car la diminution d'expression de XIAP sensibilise aux drogues actuellement utilisées dans cette pathologie et à de nouveaux agents thérapeutiques en cours de développement. De plus, nous avons mis en évidence que la diminution prolongée de l'expression de XIAP permet d'empêcher le développement de tumeurs myélomateuses dans des souris NOD/SCID. De ce fait, nous avons montré que XIAP était une cible thérapeutique intéressante dans le MM.

Dans le modèle de cancer du sein, l'expression de XIAP est corrélée à des formes agressives de la maladie. Il a été montré que XIAP possédait une activité tant au niveau de la survie cellulaire qu'au niveau de voies de signalisation oncogéniques dans le cancer du sein. En effet, il a été mis en évidence que des Smac mimétiques étaient efficaces à réduire la croissance cellulaires ainsi qu'à déclencher une apoptose médiée par l'activation de la caspase 3 en association avec TRAIL ou de l'étoposide (Bockbrader et al. 2005) dans un modèle de cancer du sein. De plus, il a été décrit par Neil et ses collaborateurs que la protéine XIAP jouait un rôle essentiel pour l'obtention d'une stimulation efficace de NF κ B par le TGF β dans des cellules métastatiques de cancer du sein (4T1) (Neil et al. 2009). En effet, bien que le TGF β supprime l'activité NF κ B dans des cellules épithéliales mammaires saines, en cas de surexpression de XIAP dans ces lignées, l'activation de TGF β induit à l'inverse une activation de NF κ B. De plus les auteurs montrent qu'une augmentation d'expression de XIAP déclenche les activités transcriptionnelles de Smad2/3 et de NF κ B même en absence de stimulation par le TGF β . *A contrario*, une déplétion en XIAP induit une diminution du couplage du TGF β avec Smad 2/3 et abroge la formation de complexe TAB1/I κ B β dans la lignée 4T1 ce qui entraîne une diminution de l'activité NF κ B ainsi que de l'expression de gènes de survie. Enfin, ces auteurs émettent l'hypothèse que cette activité de XIAP serait due à l'activité E3 ligase de cette protéine car l'inhibition de cette activité bloque l'activation de NF κ B.

Des inhibiteurs de XIAP sont en cours de développement. Comme il a été décrit en introduction, les Smac mimétiques semblent avoir une action inhibitrice envers les protéines

c-IAP1 et c-IAP2 en plus de celle envers XIAP. Ces molécules synthétiques permettent donc la dégradation de XIAP soit en exacerbant son activité E3 ligase d'auto-ubiquitinylation soit en favorisant son clivage par les caspases lors de conditions apoptotiques comme nous avons pu le montrer par un traitement au bortezomib en présence ou non d'un inhibiteur large spectre des caspases, le z-VAD-fmk. De plus ces molécules permettent également le déclenchement d'une autocrinie pour le TNF α ce qui a pour effet d'augmenter la mort et de diminuer la survie médiée par la voie NF κ B. Enfin, ces inhibiteurs synthétiques de XIAP viennent d'être décrits comme pouvant déclencher une apoptose et diminuer la clonogénicité dans des glioblastomes suite à une irradiation γ (Vellanki et al. 2009).

La déplétion en Survivine induit des cassures doubles brins

L'intégrité génomique d'une cellule est très finement surveillée par des mécanismes qui détectent et réparent les cassures doubles brins mais qui arrêtent également la progression du cycle cellulaire tant que la réparation n'est pas totale. Des défauts dans ces mécanismes sont une source de prédisposition à la survenue de cancer. Un des composants clés de la réparation de l'ADN réside dans la protéine histone H2AX. Cette protéine est phosphorylée, sur sa sérine c-4 ou « sérine 139 » en position carboxy-terminale, par 3 membres de la famille des PIKK : ATM, ATR, ATX et DNA-PK, dans les 30 minutes après un endommagement de l'ADN. Cette phosphorylation induit la formation de foci de γ H2AX au niveau des cassures doubles brins nouvellement générées.

Nos résultats indiquent qu'une déplétion en Survivine induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et une augmentation de la phosphorylation de l'histone H2AX sur son résidu sérine 139 dans les cellules de cancer de sein.

Ichijima et ses collègues ont montré en 2005 que dans la lignée Hela, des cellules du cancer du col de l'utérus, la phosphorylation de la protéine H2AX sur son résidu sérine 139 présente un pic en phase M du cycle cellulaire (Ichijima et al. 2005). Dans leur étude, la survenue de la phosphorylation de la protéine H2AX est observée en conditions normales de culture à savoir en absence de dommages à l'ADN exogènes et que cette phosphorylation

n'est pas accompagnée de cassures de l'ADN. En effet, ils n'observent ni formation de comètes ni noyaux positifs en essai TUNEL. Les auteurs émettent l'hypothèse que cette phosphorylation pourrait être nécessaire à une condensation correcte de la chromatine comme l'est celle de l'histone H3. La phosphorylation de l'histone H3 sur sa sérine 10 est indispensable à la bonne condensation de la chromatine et à la bonne ségrégation des chromosomes comme à pu le montrer l'étude de Wei et de ses collaborateurs en 1999 dans un modèle de mutants non phosphorylable de l'histone H3 dans *Tetrahymena*, des protozoaires ciliés (Wei et al. 1999). Paulsen et ses collaborateurs ont montré qu'une déplétion en Survivine induisait également augmentation du marquage γ H2AX dans la lignée Hela (Paulsen et al. 2009). Cependant, là où la phosphorylation d'H2AX constatée par l'équipe d'Ichijima n'est pas accompagnée de dommages à l'ADN, dans notre modèle, cette même phosphorylation corrèle avec la présence de cassures doubles brins de l'ADN. Ceci est attesté par la formation de comètes et l'augmentation du moment de la queue des comètes lors de la déplétion en Survivine. Nous avons donc pu écarter une phosphorylation mitotique de la protéine H2AX et déterminer que cette phosphorylation résulte d'une activation liée aux DSBs. Il serait cependant intéressant de regarder à quel moment du cycle ces DSBs surviennent et pour ce faire une mise au point d'analyse en cytométrie en flux est en cours de réalisation grâce à une combinaison de marquages intracellulaires tels que γ H2AX/7-AAD ou γ H2AX/MPM2.

L'apoptose n'est pas à l'origine des DSBs

La protéine H2AX peut également être phosphorylée au niveau de sa sérine 139 au cours du processus apoptotique. En effet, Rogakou et ses collaborateurs ont mis en évidence en 2000 que dans des cellules de leucémies (Jurkatt et HL60) et dans cellules de cancer du sein (MCF7 et NCI/ADR-RES), H2AX était phosphorylée sur sa sérine 139 dans les premiers stades de modification de l'ADN au cours de l'apoptose (Rogakou et al. 2000). Dans cette étude, il a été montré que la formation des foci d'H2AX avait lieu, après déclenchement de l'apoptose par un traitement avec des exogènes tels que de l'étoposide, de la staurosporine ou de l'anti-Fas. La phosphorylation d'H2AX est décrite comme survenant de façon concomitante avec celle de fragments d'ADN de fort poids moléculaire mais, cependant,

avant celle de l'externalisation des phosphatidylsérines au niveau du feuillet externe de la membrane.

Nous avons observé que, dans nos conditions expérimentales, la déplétion en Survivine induisait une apoptose de façon dépendante des lignées étudiées. En effet, dans les lignées MCF7 et MDA-MB231, la déplétion en Survivine n'induit pas de marquage Apo 2.7 positif à l'analyse en cytométrie en flux contrairement à ce que nous avons pu observer dans les lignées Cal51 ou Hela pour lesquelles le blocage mitotique induit par la déplétion en Survivine induit de l'apoptose (données non montrées). Cependant, quelle que soit la lignée étudiée, nous avons observé un marquage de la protéine H2AX en foyer lors de la déplétion en Survivine par ARN interférence et non sous la forme d'un anneau comme décrit par Solier et ses collaborateurs dans les cellules en apoptose (Solier & Pommier 2009). De plus, nous avons pu montrer qu'un pré-traitement avec un inhibiteur non sélectif des caspases, le z-VADfmk, n'empêchait pas la survenue de cassures doubles-brins en condition de déplétion en Survivine. Les DSBs ainsi observées ne sont donc pas dues à une induction d'apoptose. De plus, p53 jouant un rôle important dans la détection de dommages à l'ADN, nous nous sommes posés la question de son implication dans la survenue des DSBs. Nous observons des DSBs lors de la déplétion en Survivine, et ce, quel que soit le statut p53 de la lignée. En effet, la lignée Hela possède une protéine p53 inactive, la lignée MDA-MB 231 une protéine p53 mutée et Cal51 une protéine p53 de phénotype sauvage ; or nous observons que la déplétion en Survivine induit des DSBs dans ces trois lignées. Cependant, la réponse p53 lors de la déplétion en Survivine est en cours d'étude dans la lignée Cal51.

L'utilisation d'une seconde séquence de siRNA dirigée contre la Survivine nous a permis d'écarter un effet éventuellement hors cible dû à la séquence. En effet, nous retrouvons la formation de foci H2AX avec cette séquence de siSurvivine (données non montrées). Nous sommes donc en présence d'une formation de foci d'H2AX et de DSBs spécifiquement dues à la déplétion en Survivine.

Les cassures de l'ADN observées ne sont pas liées à une défaillance des voies de réparation des dommages à l'ADN

Nous avons voulu évaluer si l'accumulation de DSBs lors de la déplétion en Survivine provenait de défauts dans les voies de réparation ou la génération de nouvelles DSBs. La cinétique de réparation des cassures induites par irradiation en présence ou non de Survivine que nous avons effectuée nous permet d'affirmer que dans notre modèle d'étude, les voies de réparations activées suite aux dommages à l'ADN sont fonctionnelles. En effet, nous retrouvons, 24h après irradiation, un niveau équivalent de marquage γ H2AX dans les cellules déplétées en Survivine comme les cellules transfectées avec le siControl indiquant que les cellules siSurvivine ont réparé aussi efficacement leurs DSBs qu'en condition de siControl. Qui plus est, la cinétique de réparation nous indique que la déplétion en Survivine dans des cellules Cal 51 irradiées augmente d'environ un facteur 2 le taux maximal de foci H2AX formés 2h après irradiation, ce qui nous indique que la déplétion en Survivine sensibilise aux dommages à l'ADN induit par irradiation. Chakravarti et ses collaborateurs ont montré que dans des glioblastomes qu'une surexpression de la Survivine augmentait la résistance aux irradiations de façon indépendante des caspases et que cela s'accompagnait d'une augmentation de la réparation des dommages à l'ADN (Chakravarti et al. 2004). Une étude menée par Jiang, parue cette année, tendrait à mettre en avant la voie NHEJ lors de la réparation des dommages induits suite à une irradiation en présence d'une surexpression de Survivine (Jiang et al. 2009). En effet, dans cette étude, la surexpression de la Survivine augmente l'expression de Ku70 en immunoblot et protège des dommages induits par irradiation. Il est à noter que seule cette protéine montre une variation d'expression d'après les auteurs.

Cependant, bien que nous ayons pu déterminer que la déplétion en Survivine n'affectait pas les voies de réparation des dommages à l'ADN, nous ne n'avons pas encore déterminé qu'elles étaient les voies impliquées dans la réparation consécutive à une déplétion en Survivine. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire sembleraient indiquer l'implication de la voie de recombinaison homologue dans nos lignées. En effet, nous constatons la présence et la colocalisation de foci Mre11 et H2AX aussi bien dans les

conditions de déplétion en Survivine que d'irradiation dans la lignée MDA-MB 231 (Figure S1). Cependant, l'étude d'un panel de protéines impliquées préférentiellement dans l'une ou l'autre des voies de réparation est en cours d'expertise afin de déterminer quelle voie de signalisation est engagée. Nous utilisons, pour ce faire, des inhibiteurs des kinases CHK1, CHK2, ATM/ATR et DNAPK que nous conjuguons avec une déplétion en Survivine et nous observons les profils des niveaux d'expression des protéines phospho-CHK1/2, Ku70 par western blot ainsi que l'expression nucléaire de phospho ATM/ATR par immunocytochimie.

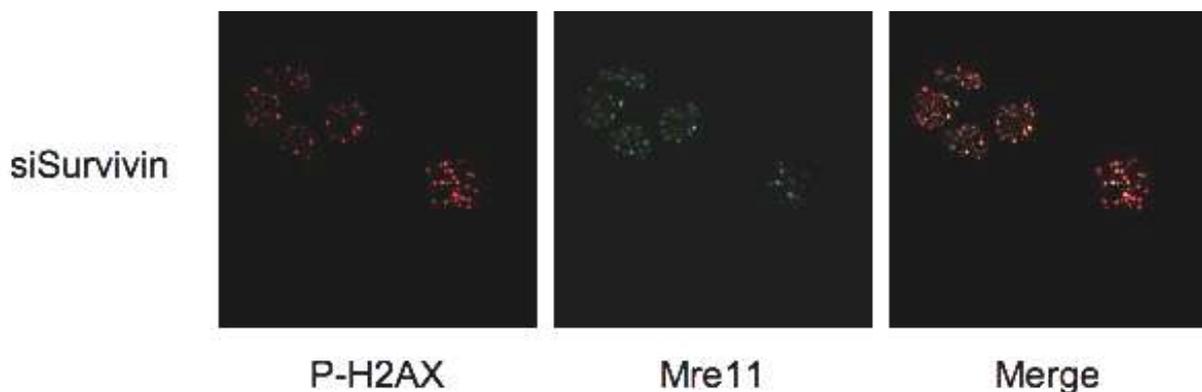


Figure S1 : Colocalisation des foci γ H2AX et Mre11 en condition siSurvivine.

Les cellules MDA-MB 231 ont été transfectées avec un siRNA dirigé contre la Survivine et incubées pendant 48h. Par immunocytochimie, on observe une colocalisation des foci de γ H2AX et de Mre11. La même colocalisation est retrouvée lors d'un marquage 30 min après une irradiation de 2Gy. Lors d'une transfection avec le siControl, aucun foyer n'est observé, que ce soit en γ H2AX ou en Mre11.

Une autre approche de la déplétion en survivine réside dans l'utilisation de composés chimiques. Le YM155 est un composé chimique qui a été découvert lors de l'étude de banques de produits chimiques sur leur capacité à inhiber l'activité du promoteur du gène de la Survivine. Le YM155 est actuellement testé en clinique humaine sur des tumeurs solides et ne semble pas provoquer de toxicité significative en agent simple (Nakagawa et al 2007). En 2008, Iwasa et ses collaborateurs ont montré une synergie entre l'YM155 et une irradiation γ dans les lignées NCI-H460 et Calu6 de cancer du poumon non à petites cellules (Iwasa et al. 2008) dans la diminution de clonogénicité. De plus, ils décrivent que cette combinaison s'accompagne, dans leur modèle, d'un retard dans le déclenchement des voies

de réparation en réponse à un dommage à l'ADN. Ils décrivent que cette combinaison déclenche de l'apoptose par détection d'une activité caspase. Les auteurs se sont basés sur la persistance du marquage immunocytochimique pour la protéine H2AX 24h après un traitement combinant une irradiation et le YM155. Cependant, la spécificité de cette molécule pour le promoteur de la Survivine n'a pas encore été démontrée. On ne peut donc pas exclure un effet autre que l'inhibition de la Survivine dans les effets observés quant aux voies de réparation des dommages à l'ADN. Il est donc nécessaire d'étudier les voies de réparations impliquées.

Nous avons utilisé un inhibiteur d'HSP 90, le 17-AAG, en tant qu'inhibiteur non spécifique de la Survivine du fait de sa capacité à rompre les interactions existantes en la protéine HSP 90 et ces différents partenaires. De plus, l'inhibition de la protéine Survivine par le 17-AAG induit une dégradation de cette dernière par le protéasome (Fortugno et al. 2003). Des résultats préliminaires montrent que l'incubation de nos lignées avec du 17-AAG induit des cassures doubles brins de l'ADN visibles en essai comète (données non montrées). Ces résultats corroborent ceux que nous avons obtenus avec l'utilisation du siRNA dirigé contre la Survivine mais avec une spécificité moindre du fait des nombreuses protéines clientes d'HSP90. En effet, l'inhibition de cette protéine aura une répercussion sur de nombreuses protéines et pas seulement sur la Survivine.

Origine des ces nouvelles DSBs

Nous avons pu voir précédemment que nous ne pouvions pas imputer ces DSBs à un déclenchement de l'apoptose ou à celui d'une activité caspase. Le stress oxydatif étant capable de générer des DSBs, nous avons regardé l'impact d'une déplétion en Survivine sur le stress oxydatif et nous avons pu constater que cette déplétion n'induisait pas la production de ROS. Nous avons donc exploré l'impact de la fonction mitotique de la Survivine dans la survenue de ces nouvelles DSBs. Pour ce faire, nous avons utilisé un siRNA dirigé contre Aurora B, la kinase effectrice du complexe CPC. En effet, au niveau du complexe CPC, le complexe INCENP-Survivine joue un rôle important dans la détection de la tension au niveau des kinétochores alors qu'Aurora B, quant à elle, est essentielle pour la déstabilisation des attachements incorrects, notamment mérotéliques. Les résultats que

nous avons pu obtenir semblent indiquer que la déplétion en Aurora B augmente également le marquage γ H2AX dans la lignée MDA-MB 231 (Figure S2).

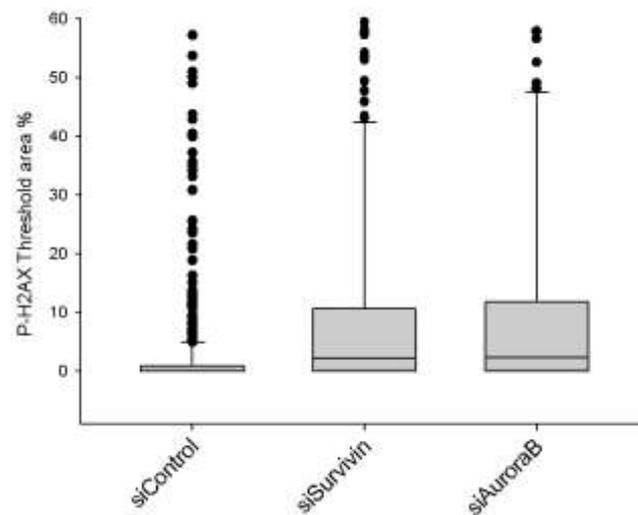


Figure S2 : La déplétion en AuroraB induit une activation de γ H2AX dans la lignée MDA-MB231.

Les cellules MDA-MB231 ont été marquées avec un anticorps anti- γ H2AX 48 après transfection avec des siRNAs dirigés soit contre la Survivine soit contre la protéine AuroraB. La quantification de la formation des foci de γ H2AX a été réalisée avec le logiciel MetaMorph et nous montrons une représentation du pourcentage d'aire seuillée pour cet anticorps par rapport au marquage du noyau réalisé avec un contre marquage au Dapi.

L'augmentation apparente du marquage γ H2AX après transfection avec le siAurora B nous conforte dans l'implication du rôle mitotique de la Survivine dans l'apparition des nouvelles DSBs. En effet, Aurora B participe au SAC et au complexe CPC (Musacchio & Salmon 2007). Afin de confirmer ces résultats d'autres expériences devront être réalisées. Il semblerait judicieux de réaliser notamment un siINCENP, un autre membre du complexe CPC afin de confirmer l'implication de ce complexe ou à défaut de quels membres, en particulier, sont impliqués dans ce phénomène.

Une étude récente a montré une interaction directe entre la Polo-like kinase 1 (Plk1) et la Survivine dans un modèle de cancer de l'œsophage (Feng et al. 2009). La protéine Plk1 permet le déclenchement de l'entrée en mitose en favorisant la formation du complexe

CDK1/Cycline B. En effet, Plk1 régule positivement la phosphatase CDC25C en la phosphorylant sur sa sérine 216. De ce fait, cette dernière permet la déphosphorylation de CDK1 afin de l'activer et de mener à la formation du complexe CDK1/Cycline B. Plk1 inhibe également les kinases responsables de la phosphorylation de CDK1 soit de façon directe avec MYT1 soit indirecte en phosphorylant Wee1 afin d'induire sa dégradation par le protéasome (Archambault & Glover 2009). Dans cette étude, les auteurs montrent que dans ce modèle où Plk1 est fortement exprimée, sa déplétion induit également celle de la Survivine du fait d'une interaction physique entre ces deux protéines. De plus l'homologue de Plk1 chez *Xenopus laevis*, Plx1, a été montré récemment comme permettant l'activation d'Aurora B de façon indirecte par l'inhibition de ses kinases inhibitrices (Rosasco-Nitcher et al. 2008). De ce fait, un défaut en Plk1, consécutif à un dommage à l'ADN en phase G2 (Smits et al. 2000) induirait une inhibition de l'activation d'Aurora B et pourrait donc être à l'origine de l'augmentation du marquage H2AX comme nous l'observons en condition siAurora B dans la lignée MDA-MB 231. Il est donc également envisageable que la déplétion en Plk1 pourrait être un point de départ aux effets observés à la fois lors de la déplétion en Survivine et en Aurora B. Cependant, bien que dans notre modèle, ce ne soit pas l'effet de la déplétion en Plk1 qui nous intéresse, nous ne perdrons pas de vue la présence de cette protéine en amont de la Survivine dans son implication au niveau du complexe CPC. De ce fait, pour vérifier cette hypothèse, l'utilisation d'un siRNA dirigé contre Plk1 pourrait être envisagé bien que nous risquerions de rencontrer une forte apoptose due au déclenchement de la voie intrinsèque mitochondriale comme ont pu le constater Feng et ses collaborateurs (Feng et al. 2009).

Différence de sensibilité aux poisons des microtubules

Les études réalisées par Quignon et Dalton en 2007 ont mis en évidence une augmentation de la formation de DSBs lors d'un arrêt mitotique (Quignon et al. 2007) (Dalton et al. 2007). Nous avons effectivement pu montrer qu'un arrêt mitotique dû à une déplétion en Survivine produisait une augmentation de la formation de DSBs. Cependant, Nous observons également une augmentation de la formation de DSBs lors du blocage de la mitose par l'intermédiaire de taxol. En effet, les expériences qui ont été menées en présence

de taxol, un inhibiteur des microtubules, montrent que ce dernier bloque le cycle cellulaire en phase G2/M et qu'il induit la formation de comètes dans les cellules de cancer du sein. Cette formation de DSBs pourrait être indirecte du fait que le taxol n'est pas à proprement parler décrit comme étant un agent endommageant de l'ADN.

De plus, de façon surprenante une incubation de nos cellules avec du nocodazole, un autre inhibiteur des microtubules, n'induit pas de DSBs à des doses classiquement utilisées (moyenne de 200ng.mL⁻¹) (Figure S3). Il nous faudra donc vérifier que nos cellules sont bien bloquées en phase G2/M avec la concentration de nocodazole utilisée afin de s'assurer de son efficacité.

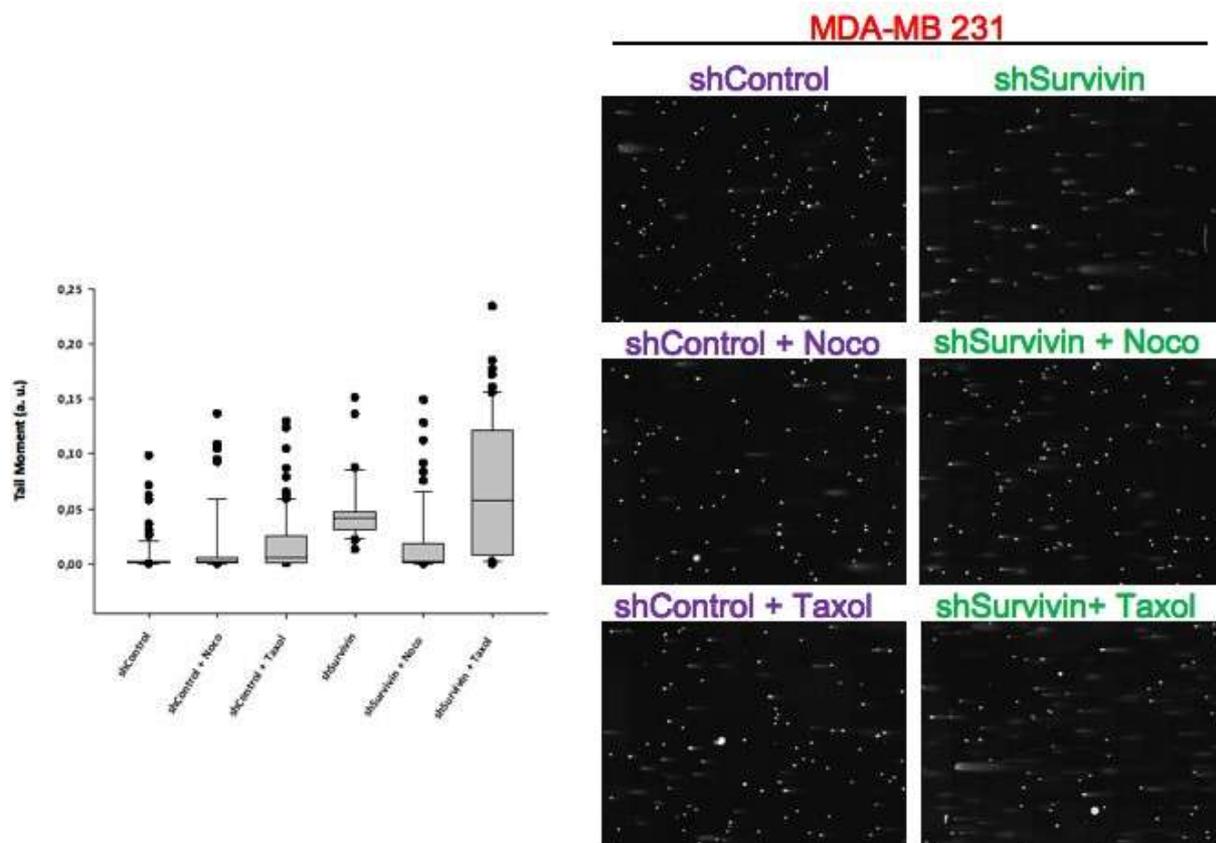


Figure S3 : Différence Taxol/Nocodazole sur l'apparition de DSBs.

Des cellules MDA-MB 231 ont été analysées par essai comète après traitement par du taxol ou du nocodazole en présence ou non de Survivine (déplétion réalisée par transfection d'un shRNA dirigé contre la Survivine). Les dommages à l'ADN ont été quantifiés par le logiciel Comet Assay IV et les résultats présentés correspondent à une représentation en boîte à moustache de l'ensemble des valeurs d'une expérience représentative.

De plus, la combinaison d'un traitement au taxol avec la déplétion en Survivine devrait provoquer, d'après la littérature (Lens et al. 2003), un arrêt mitotique moins efficace or nous constatons la présence de plus de DSBs dans cette condition que lors de l'association de nocodazole avec une déplétion en Survivine (Figure S3).

Ces deux poisons des microtubules que sont le taxol et le nocodazole ne possèdent pas le même principe d'action au niveau des microtubules. En effet, le nocodazole agit en dépolymérisant les microtubules alors que le taxol intervient en stabilisant ces derniers et donc en créant un défaut de tension au niveau des kinétochores. Deux études sont parues en 2003 et montraient qu'une déplétion en Survivine bloquait les cellules en prométaphase du cycle cellulaire du fait d'un mauvais alignement des chromosomes (Lens et al. 2003) (Carvalho et al. 2003). Ces études décrivent également que la déplétion en Survivine provoque un défaut de localisation des protéines INCENP et Aurora B au niveau des centromères. Il est également mis en avant qu'un arrêt en mitose induit par un traitement au nocodazole est indépendant de la Survivine, alors qu'un traitement avec du taxol nécessitera l'expression de la Survivine pour maintenir un arrêt en mitose. Il en est donc déduit que la Survivine est nécessaire pour le maintien du point de contrôle lors de l'activation de ce dernier par un défaut de tension au niveau des microtubules induit par le taxol. Cette différence semblerait provenir de la localisation des protéines Mad2 et BubR1.

Ces protéines Mad2 et BubR1 sont recrutées au niveau des kinétochores non attachés afin d'inhiber l'activation du complexe APC/C (Shah & Cleveland 2000). Lens et ses collègues ont montré que lors de la déplétion en Survivine, l'entrée en mitose s'effectuait de façon normale qu'il y avait un arrêt en prométaphase qui était dépendant des protéines Mad2 et BubR1 (Lens et al. 2003). De plus, l'équipe de Carvalho ont mis en avant que la différence entre un traitement avec du taxol ou du nocodazole en absence de Survivine résidait dans le maintien de la protéine Mad2 au niveau des kinétochores (Carvalho et al. 2003). En effet, la Survivine est un senseur de la tension des microtubules. Lors d'un traitement au taxol, les microtubules sont stabilisés et donc la tension au niveau des kinétochores reste effective entraînant un relargage de Mad2. *A contrario*, lors d'un

traitement au nocodazole, les microtubules ne peuvent pas être polymérisés d'où une absence de tension au niveau des kinétochores et donc la protéine ne peut être relarguée. De ce fait, la Survivine serait donc requise pour le point de contrôle du fuseau en réponse à un traitement au taxol contrairement au nocodazole. Il serait donc intéressant de regarder la localisation subcellulaire des protéines Mad2 et BubR1 dans notre modèle de cancer du sein afin de savoir si la régulation de leur localisation au cours de l'arrêt mitotique induit par les inhibiteurs des microtubules varie en fonction des inhibiteurs utilisés.

Il est à noter que Mad2 et BubR1 possèdent toutes deux également une activité pro-apoptotique une fois relarguées des kinétochores (Vogel et al. 2007) (Shin et al. 2003). De ce fait, il serait important de déterminer le moment de survenue, en mitose ou lors d'un échappement mitotique, de la mort dans ces cellules, pour ce faire, une étude par timelapse est en cours de mise au point. En effet, l'association de taxol avec une déplétion en Survivine provoque une forte induction de DSBs dans les cellules de cancer de sein que nous avons étudiées, il serait donc intéressant de déterminer ce qu'il en est pour l'association nocodazole avec une déplétion en Survivine. Suivant les études qui ont été menées, les avis divergent quant aux devenir des cellules qui possèdent un point de contrôle mitotique défectueux. En effet, Dai et Michel ont mis en avant l'importance que possède un point de contrôle défaillant dans la tumorigénèse (Dai et al. 2004) (Michel et al. 2001) alors que l'absence de ce point de contrôle est létal (Dobles et al. 2000) (Baker et al. 2004). L'utilisation d'un inhibiteur de KSP, une kinésine mitotique nécessaire à la bonne séparation des centrosomes et à la formation du fuseau bipolaire, permet une activation du point de contrôle mitotique suivi par un échappement mitotique. D'après les auteurs, ce n'est qu'après cette sortie de mitose que peut avoir lieu l'activation de Bax et donc le déclenchement de l'apoptose (Tao 2005).

Cependant, Blagosklonny a montré, quant à lui, que l'inhibition de la transcription pendant la mitose pouvait mener à plusieurs devenirs suivant la lignée cellulaire. Lors d'un arrêt mitotique, les protéines à demies-vies courtes sont dégradées ce qui inclut des protéines anti-apoptotiques telles que Mcl-1 ou certains membres de la famille des IAPs. De plus, cet arrêt mitotique peut s'accompagner d'une dégradation de la cycline B favorisant

ainsi l'échappement mitotique ou de la dégradation de Mdm2 conduisant à une accumulation de p53 (Blagosklonny 2007). Donc suivant les lignées cellulaires surviennent une apoptose mitotique, un échappement mitotique ou une apoptose post-mitotique. Cette accumulation de p53 durant la mitose ne pourra avoir une répercussion qu'en sortie de cette dernière quand les cibles transcriptionnelles de cette protéine pourront être traduites. Un élément cependant est à rajouter à ce modèle, il s'agit des protéines possédant une séquence IRES. En effet, pendant un arrêt mitotique, les seules protéines à pouvoir être traduites seront celles possédant une séquence IRES. L'étude des niveaux d'expression de telles protéines, notamment XIAP dont nous avons pu montrer qu'elle possédait une séquence IRES fonctionnelle dans le MM, est cruciale car pouvant déterminer le devenir des cellules. La forte expression de XIAP dans les cellules cancéreuses peut permettre à ces cellules de pouvoir résister à un allongement de la durée de la mitose et ainsi contrecarrer une éventuelle déplétion en protéines comme Survivine ou Mcl-1 qui conduirait à une apoptose mitotique. Au contraire, Gascoigne a décrit que lors de l'utilisation de poisons des microtubules les cellules pouvaient arriver à une mort mitotique lors du franchissement des seuils de cyclines B, induisant une sortie de mitose, et d'apoptose (dont on sait pas encore l'origine moléculaire) (Gascoigne & Taylor 2009). De ce fait, améliorer la compréhension et la prédiction du devenir de ces cellules tumorales est un d'un intérêt primordial en clinique. En effet, si comme nous l'avons déjà mentionné, la déplétion de la Survivine s'accompagne, lors d'une combinaison avec du taxol, d'un échappement à l'arrêt mitotique alors il nous faudrait savoir le devenir de ces cellules. Nos résultats indiquent que l'association taxol/déplétion en Survivine induit une augmentation de la mort mais que cette dernière n'est pas totale. De ce fait, cette question est d'autant plus importante que des cellules ayant subi un tel traitement auraient accumulées une grande instabilité génétique qui pourrait se révéler désastreuse si ces cellules échappaient à une apoptose mitotique puis post-mitotique.

Implication de la famille Bcl2 dans le dommage à l'ADN

Des résultats préliminaires obtenus en transfectant les lignées de cancer du sein avec un siRNA dirigé contre la protéine Bcl-xL semblent indiquer que la déplétion de ce membre

de la famille Bcl2 induirait également la formation de foci H2AX. Nous retrouvons les mêmes résultats en éteignant de façon stable la protéine Bcl-xL par l'intermédiaire d'un shRNA transfecté par lentivirus (Figure S4).

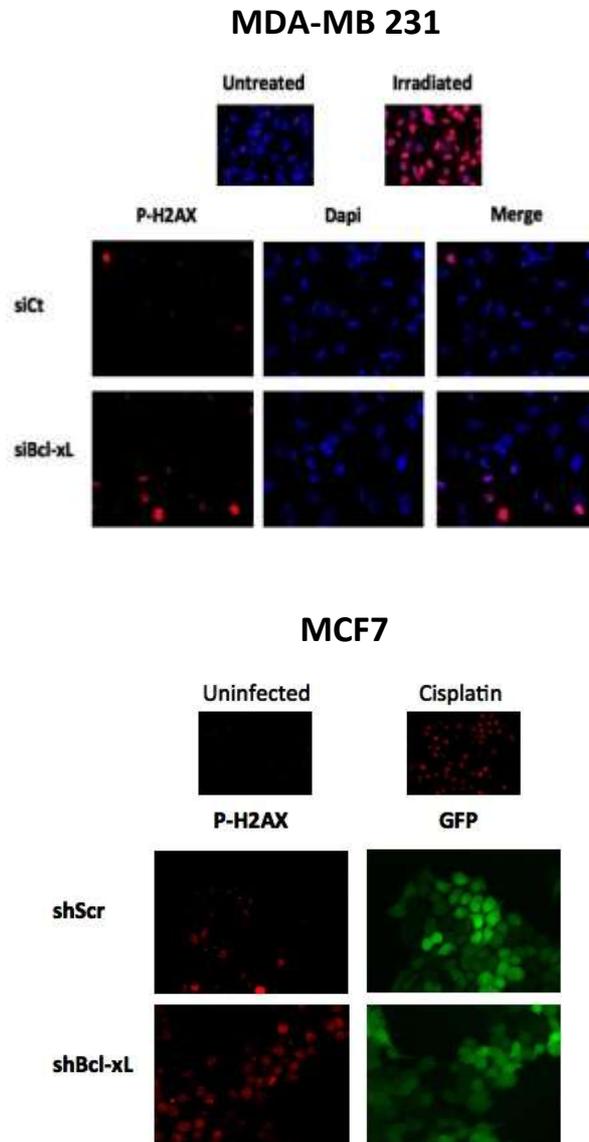


Figure S4 : Formation de foci de γ H2AX lors de la déplétion en Bcl-xL observée par immunocytochimie.

Les cellules MDA-MB 231 et MCF7 ont été marquées avec un anticorps anti- γ H2AX après transfection soit par des siRNA ou des shRNA respectivement dirigés contre la protéine Bcl-xL.

Nous obtenons également la formation de cassures doubles-brins lors de la déplétion en Bcl-xL ou Bcl-2 dans nos lignées de cancers du sein (Figure S5).

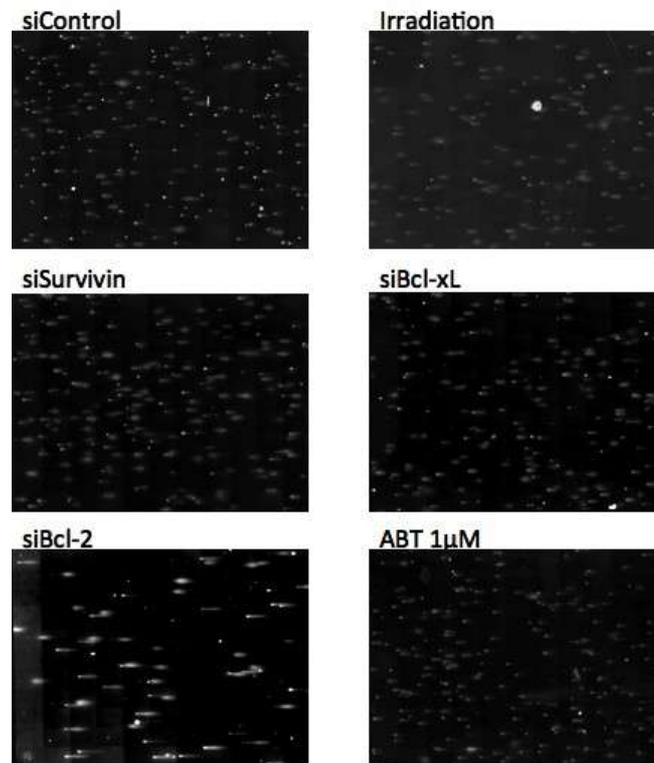


Figure S5 : DSBs formées par la déplétion en Bcl-xL et détectées par essai comète.

Des cellules MDA-MB 231 ont été analysées par essai comète soit après déplétion par siRNA des protéines Survivine, Bcl-xL ou Bcl-2 ou par traitement avec 1µM d'ABT-737. Les dommages à l'ADN illustrés sont issus d'une expérience représentative. Une irradiation de 2 Gy à servit de contrôle positif dans cette expérience.

Les résultats que nous avons observé dans les lignées lors de déplétion en Bcl-xL ou par son inhibition avec l'ABT-737, un composé chimique inhibiteur de Bcl-xL mais également par déplétion de Bcl-2, sont à priori en contradiction avec la littérature. En effet, il a été montré en 2008 par Wang et ses collaborateurs que Bcl-2 régulait négativement la recombinaison d'extrémités non-homologue (Hongyan Wang et al. 2008). Dans un modèle de cancer du poumon à grandes cellules (H460) ou à non petites cellules (H1299), la surexpression de Bcl-2 induit une persistance des foci γ H2AX lors de l'exposition de ces lignées à une irradiation. Les auteurs montrent que ce maintien des foci est dû une diminution de l'activité des protéines Ku70 et Ku86 lors de surexpression de Bcl-2. En effet,

ils mettent en avant l'augmentation de l'interaction directe entre les motifs BH1 et BH4 de Bcl-2 et les protéines Ku induisant une diminution de la fixation de ces dernières sur l'ADN et par conséquent de la réparation des cassures doubles brins. Les auteurs mentionnent également que la déplétion en Bcl-2 par ARN interférence relance l'activité de liaison à l'ADN des protéines Ku permettant de la formation de complexes Ku/DNA-PKcs et une reprise de la réparation de l'ADN.

Cependant, une autre étude réalisée dans plusieurs types tumoraux différents (leucémie monocyttaire, cancer colo-rectal, cancer du sein) en 2003 montrait que la protéine Rad9, intervenant dans la voie de recombinaison homologue lors de dommages à l'ADN survenant pendant la phase S du cycle cellulaire, était clivée lors de dommages à l'ADN ou une induction d'apoptose (Lee et al. 2003). Ce clivage nucléaire de la protéine Rad9 permettrait la libération d'un domaine BH3 dans la partie N-terminale tronquée de cette protéine. Cette partie tronquée interagirait avec Bcl-xL au niveau cytosolique ce qui permettrait de favoriser l'apoptose en inhibant directement Bcl-xL. De plus ce clivage de la protéine Rad9 conduirait à désorganisation du complexe Rad9-Rad1-Hus1 nécessaire au point de contrôle du dommage à l'ADN. Si l'on considère que les cellules tumorales subissent un stress oxydatif lié au métabolisme aérobie de notre organisme, ce que des premiers résultats de déplétion en Bcl-xL semblent indiquer au laboratoire (données non montrées) ; de ce fait, des conditions dites normales de culture pour ces cellules peuvent induire la formation excessive de ROS menant à l'apparition de dommages à l'ADN. Il semblerait donc possible que l'inhibition de Bcl-xL, par une interaction avec Rad9, ou sa déplétion, par siRNA, puisse mener à un engagement de la cellule dans la voie apoptotique et de ce fait créer des DSBs lors de la fragmentation de l'ADN. Cependant, les premiers résultats ne montrent que peu de cellules caspases 3 positives en condition siBcl-xL alors que nous pouvons observer une franche apparition de foci de γ H2AX. Des études devront donc être menées plus avant afin d'améliorer notre compréhension de ce phénomène.

Un autre membre des IAPs impliqué dans le dommage à l'ADN ?

Nous avons pu remarquer qu'un siRNA dirigé contre la protéine XIAP, dans lignée de cancer du sein MDA-MB231, induisait une augmentation du moment de la queue en essai comète. Or le seul lien qui semble y avoir à première vue entre la déplétion de XIAP et l'apparition de cassures doubles brins de l'ADN soit le déclenchement d'un processus apoptotique. Or, en conditions normales de culture, la déplétion en XIAP dans cette même lignée n'induit pas de mort (données non montrées). Cependant, il serait intéressant de savoir si cela ne déclencherait pas une activation de la caspase 3, cependant pas assez forte pour induire une apoptose détectable par cytométrie en flux.

Il est intéressant de noter que nous avons pu mettre en évidence que XIAP et Survivine formaient un complexe aussi bien dans des lignées de cancer du sein (MCF7, SKBR3, MDA-MB 231) que dans des lignées de Myélome Multiple (XG1 et MM1S) (Figure S6).

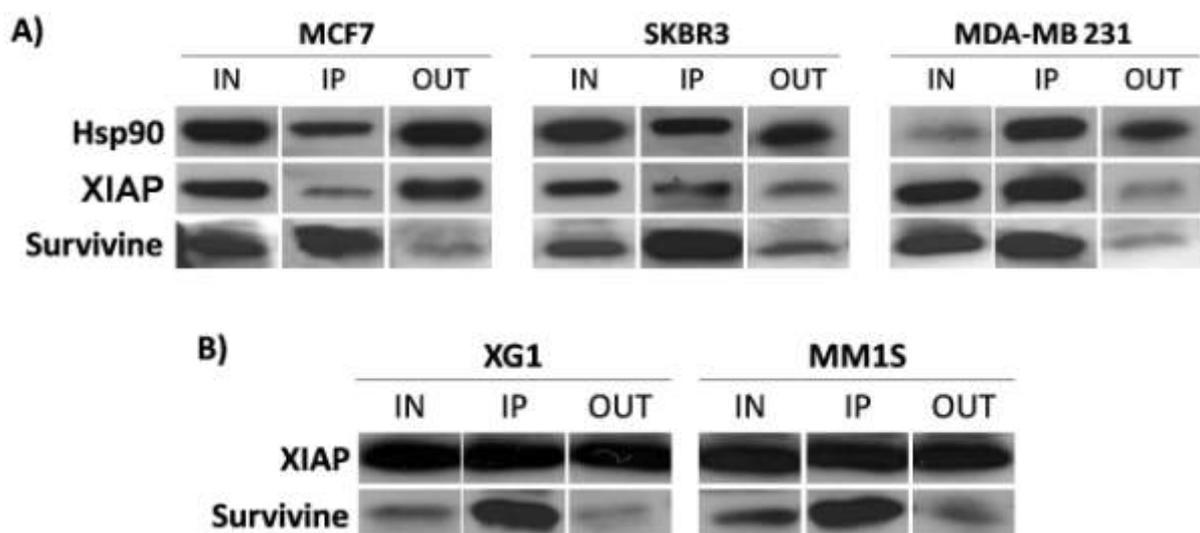


Figure S6 : Co-immunoprécipitation de la Survivine avec XIAP ou Hsp90 dans A) des lignées de cancer du sein ou B) de MM.

Dans la littérature, l'impact de ce complexe sur le devenir de ses membres est assez contradictoire suivant les études. En effet, le rôle des associations de XIAP dépend des différents partenaires avec lesquels cette protéine est associée. De ce fait, une association

de XIAP avec la Survivine peut aboutir à la stabilisation de XIAP et empêcher cette dernière d'être dégradée par le protéasome (Dohi et al. 2004); alors que si XAF1 devient un des membres de cette interaction, alors nous pouvons observer une dégradation de la Survivine par XIAP (Aurora et al. 2007). Nous voyons donc que l'étude des interactions protéines-protéines des partenaires de XIAP dans notre modèle de cancer du sein est un élément clé dans la compréhension des mécanismes intervenants lors d'un arrêt mitotique prolongé ou d'un stimulus apoptotique.

Nous nous sommes intéressés à la protéine Ube2C dans l'endommagement de l'ADN du fait de son rôle en tant que partenaire d'APC/C. En effet, la déplétion en Ube2C pourrait rendre moins fonctionnel le complexe APC/C et donc provoquer un arrêt mitotique et l'apparition de DSBs comme pour la siSurvivine ou le taxol, voir de la mort. La déplétion efficace d'Ube2C, par siRNA, que nous avons obtenue n'a pas mis en évidence d'effets cellulaires majeurs. Cependant, cette absence de DSBs est peut-être due à une extinction certes efficace d'Ube2C mais pas totale ce qui pourrait rendre le point de contrôle défaillant mais toujours présent et donc expliquer cette absence de létalité. Une explication à cette absence de DSBs pourrait être la présence d'autres E2 ligase au niveau du point de contrôle mitotique qu'Ube2C, nous aurions donc un phénomène de compensation possible qui pourrait être déclenché lors de déplétion en Ube2C. Nous avons également pu mettre en évidence, grâce à l'absence de DSBs lors de la déplétion en Ube2C par ARN interférence, que les effets que nous observions avec les autres séquences de siRNA n'étaient pas dus au ciblage de protéine par ces siRNAs.

Nous avons donc montré, l'importance de d'un membre de la famille des IAP, XIAP, dans l'oncogénèse du MM. En effet, XIAP possède une expression forte dans le MM et sa déplétion induit une sensibilité à des drogues utilisées en thérapeutique. Nous avons également montré l'importance de XIAP dans le déclenchement de la tumorigénèse dans un modèle de souris NOD/SCID. Nous avons également mis en évidence l'importance de l'étude de la Survivine dans le développement de thérapies basées sur des inhibiteurs des microtubules dans le cancer du sein. Nous avons donc pu démontrer l'importance de ces

deux protéines dans l'élaboration de thérapies ciblées à la fois dans le MM et dans le cancer du sein. En effet, ces inhibiteurs de microtubules étant fréquemment utilisés en traitement dans ce cancer, la compréhension des mécanismes déclenchés par les variations du niveau d'expression de la Survivine est donc cruciale dans la mise en place de thérapies ciblées à base de ces inhibiteurs.

ANNEXE

Annexe

"L'inhibition de la voie canonique d'NFκB bloque la croissance des cellules de Myélome et induit l'apoptose en forte synergie avec TRAIL"

Clinical Cancer Research, 2007 Oct 15; 13(20):6010-8.

La voie NFκB est constitutivement active dans plus de 80% des tumeurs myélomateuses dès le diagnostic. Cette activation est induite soit par le soutien du stroma médullaire, soit par des mutations pouvant affecter différents effecteurs et régulateurs de cette voie dans les plasmocytes malins (Annunziata et al. 2007) (Keats et al. 2007). De plus, la voie NFκB est impliquée dans la croissance cellulaire et la chimiorésistance du MM (Hideshima et al. 2002) (Hideshima et al. 2006) (Sanda et al. 2005). L'activité transcriptionnelle des protéines de la famille NFκB est régulée par deux principales. La première, plus connue sous le nom de voie canonique de NFκB, implique la rétention des dimères RelA/p50 dans le cytoplasme par leur interaction avec les protéines inhibitrices IκB. La seconde voie d'activation, appelée voie alternative, repose sur la protéolyse induite de la protéine p100, l'inhibiteur principal de RelB, et aboutit à la libération, la translocation nucléaire et la liaison à l'ADN des dimères RelB/p50 et RelB/p52. Les voies canonique et alternative semblent toutes deux moduler la réponse aux traitements des patients de MM (Gilmore 2007). La recherche et l'expertise d'inhibiteurs spécifiques de ces voies sont donc nécessaires pour améliorer l'efficacité des traitements actuels, notamment par leur utilisation en association.

L'AS602868 bloque l'activation de la voie canonique d'NFκB et la croissance cellulaire dans le MM

L'AS602868 est un inhibiteur pharmacologique de la kinase IKK2 développé par *Merck Serono International SA*. Précédemment, la spécificité de cet inhibiteur avait été démontrée (Frelin et al. 2003) et son potentiel apoptotique révélé dans la leucémie myéloïde aigue (Frelin et al. 2005).

Nous avons testé l'efficacité de cet inhibiteur sur des lignées de MM. Par ELISA, nous avons montré que la translocation nucléaire de la sous-unité p50 du facteur de transcription NF κ B sous l'effet du TNF α est efficacement inhibée par l'AS602868. L'induction de l'expression de la molécule de surface ICAM-1 par le TNF α est également bloquée par cet inhibiteur. L'AS602868 permet donc d'inhiber la voie NF κ B induite par le TNF α et révèle, de plus, une forte apoptose en association avec le TNF α sur plusieurs lignées de MM. La croissance cellulaire de plus de 15 lignées de MM testées et de cellules primaires myélomateuses est réduite par l'AS602868. En effet, le blocage de la prolifération cellulaire et l'induction de l'apoptose par l'AS602868 explique cette observation. Nous avons également montré que l'inhibiteur de la voie NF κ B entraîne une activation de la voie mitochondriale de l'apoptose, comme le démontre le marquage de la forme active de Bax en cytométrie de flux. Ceci conduit à l'activation de la caspase 3 ainsi qu'au clivage de la protéine PARP-1 (visibles en western blot). En coculture *in vitro* avec des cellules stromales médullaires, la lignée MM1S stimule la sécrétion paracrine d'IL-6, le facteur de croissance majeur dans le MM. L'ajout de l'AS602868 permet de bloquer efficacement cette sécrétion. *In vivo*, l'ingestion de l'AS602868 par le gavage de souris immunodéprimées NOD-SCID porteuses d'une tumeur myélomateuse (xénogreffe sous-cutanée d'une lignée de MM), permet de réduire significativement la croissance tumorale. Ainsi, nous avons démontré l'efficacité *in vitro* et *in vivo* de l'AS602868 en agent simple sur l'inhibition de la croissance de la tumeur myélomateuse.

L'AS602868 révèle un effet synergique sur l'apoptose induite par TRAIL dans le MM

TRAIL, par l'induction de mort qu'il induit dans les cellules de MM, semble très attractif pour le traitement du MM (Gazitt 1999). Son potentiel anti-apoptotique agit notamment à travers le ciblage de la protéine Mcl-1 (Menoret et al. 2006), une protéine cruciale pour la croissance myélomateuse (Derenne et al. 2002). Néanmoins, des phénomènes de résistance à TRAIL ont été observés dans les cellules de MM. Son association avec d'autres agents thérapeutiques a été largement étudié, dans le but d'inhiber les mécanismes de résistance à TRAIL. Une meilleure efficacité a été obtenue par l'association de TRAIL avec le Bortézomib (inhibiteur du protéasome), le SN50 (inhibiteur de

la voie NF κ B) (Mitsiades et al. 2001) ou même des antisens ciblant c-FLIP (Mitsiades et al. 2002). La voie NF κ B pourrait donc participer à la résistance à TRAIL comme cela a été montré pour d'autres récepteurs de mort de la famille du TNF. Nous avons considéré cette hypothèse et pour la première fois dans le MM, nous avons démontré que TRAIL lui-même induit l'activation de la voie NF κ B. En effet, dans les cellules traitées à TRAIL nous observons une très forte induction de la phosphorylation de I κ B α (visible par western blot) entraînant la translocation nucléaire de la sous-unité p65 de NF κ B (par immunofluorescence). Cette translocation de p65 peut alors contrecarrer la voie apoptotique engagée en parallèle, en partie en activant la transcription de plusieurs molécules anti-apoptotiques et prolifératives comme c-FLIP_L, c-myc et plusieurs protéines de la famille des IAPs (c-IAP1 et 2). Récemment, l'implication de l'expression de c-FLIP_L dans la résistance à TRAIL a été démontrée dans le MM (Fandy et al. 2007) ainsi que dans le lymphome du manteau (Roué et al. 2007). Ainsi, nous expliquons la synergie observée par l'association de l'AS602868 avec TRAIL, sur l'induction de l'apoptose dans les lignées de MM et les cellules primaires issus de prélèvements médullaires de patients atteint de MM parfois réfractaires aux différentes thérapies conventionnelles. En ce qui concerne les cellules primaires, le prélèvement médullaire est traité dans sa globalité en présence d'IL-6 afin de réduire l'apoptose spontanée caractéristiques des cellules primaires de MM *ex vivo*. En cytométrie de flux, l'évaluation de l'expression de différents marqueurs membranaires (CD138, CD38, CD45) semble montrer que l'apoptose induite par l'association de ces deux agents anticancéreux est spécifique des cellules malignes du prélèvement. Une étude plus approfondie devra évaluer la toxicité de l'AS602868 sur les précurseurs hématopoïétiques.

L'ensemble de nos résultats montrent que la voie NF κ B soutient la croissance de la tumeur myélomateuse et constitue un des mécanismes de chimiorésistance au traitement par TRAIL. L'efficacité anti-tumorale de l'AS602868 chez la souris immunodéprimée et son importante synergie en association avec TRAIL soulignent la nécessité de son étude en clinique humaine. De plus, l'induction de la voie NF κ B par d'autres traitements conventionnels du MM a été démontrée, notamment par le Melphalan et la Doxorubicine (Baumann et al. 2007). Cette voie pourrait participer à un mécanisme plus global de

chimiorésistance chez les patients de MM, et son inhibition pourrait donc considérablement améliorer l'efficacité des traitements actuels.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, M., Hiura, K., Wilde, J., Shioyasono, A., Moriyama, K., Hashimoto, T., Kido, S., Oshima, T., Shibata, H., Ozaki, S., Inoue, D. et Matsumoto, T. (2004). Osteoclasts enhance myeloma cell growth and survival via cell-cell contact: a vicious cycle between bone destruction and myeloma expansion. *Blood*, *104*, 2484-2491.
- Abe, S., Hasegawa, M., Yamamoto, K., Kurata, M., Nakagawa, Y., Suzuki, K., Takizawa, T. et Kitagawa, M. (2007). Rapid induction of IAP family proteins and Smac/DIABLO expression after proapoptotic stimulation with doxorubicin in RPMI 8226 multiple myeloma cells. *Experimental and molecular pathology*, *83*, 405-412.
- Abraham, R. T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & development*, *15*, 2177-2196.
- Adams, J. M. et Cory, S. (2007). Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Current opinion in immunology*, *19*, 488-496.
- Ahn, J., Urist, M. et Prives, C. (2004). The Chk2 protein kinase. *DNA repair*, *3*, 1039-1047.
- Altieri, D. C. (2006). The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Current opinion in cell biology*, *18*, 609-615.
- Altieri, D. C. (2006). Targeted therapy by disabling crossroad signaling networks: the survivin paradigm. *Molecular cancer therapeutics*, *5*, 478-482.
- Altieri, D. C. (2008). Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nature reviews. Cancer*, *8*, 61-70.
- Altieri, D. C. (2008). New wirings in the survivin networks. *Oncogene*, *27*, 6276-6284.
- Ambrosini, G., Adida, C. et Altieri, D.C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature medicine*, *3*, 917-921.
- Ambrosini, G., Adida, C., Sirugo, G. et Altieri, D.C. (1998). Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *The Journal of biological chemistry*, *273*, 11177-11182.
- Andersen, M. H., Svane, I. M., Becker, J. C. et Straten, P.T. (2007). The universal character of the tumor-associated antigen survivin. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *13*, 5991-5994.
- Andre, T., Chastre, E., Kotelevets, L., Vaillant, J. C., Louvet, C., Balosso, J., Le Gall, E., Prevot, S. et Gespach, C. (1998). [Tumoral angiogenesis: physiopathology, prognostic value and therapeutic perspectives]. *La Revue de medecine interne / fondee ... par la Societe nationale francaise de medecine interne*, *19*, 904-913.
- Annis, M. G., Soucie, E. L., Dlugosz, P. J., Cruz-Aguado, J. A., Penn, L. Z., Leber, B. et Andrews, D.W. (2005). Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *The EMBO journal*, *24*, 2096-2103.
- Annunziata, C. M., Davis, R. E., Demchenko, Y., Bellamy, W., Gabrea, A., Zhan, F., Lenz, G., Hanamura, I., Wright, G., Xiao, W., Dave, S., Hurt, E. M., Tan, B., Zhao, H., Stephens, O., Santra, M., Williams, D. R., Dang, L., Barlogie, B., Shaughnessy, J. D., Kuehl, W. M. et Staudt, L.M. (2007). Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer cell*, *12*, 115-130.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R. et Martinou, J.C. (2000). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *The Biochemical journal*, *345 Pt 2*, 271-278.
- Archambault, V. et Glover, D.M. (2009). Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *10*, 265-275.

- Arora, V., Cheung, H. H., Plenchette, S., Micali, O. C., Liston, P. et Korneluk, R.G. (2007). Degradation of survivin by the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-XAF1 complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 26202-26209.
- Avet-Loiseau, H., Facon, T., Grosbois, B., Magrangeas, F., Rapp, M., Harousseau, J., Minvielle, S. et Bataille, R. (2002). Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood*, 99, 2185-2191.
- Avet-Loiseau, H., Gerson, F., Magrangeas, F., Minvielle, S., Harousseau, J. L. et Bataille, R. (2001). Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood*, 98, 3082-3086.
- Azim, M. K., Grossmann, J. G. et Zaidi, Z.H. (2001). Homology modeling of nematode *Caenorhabditis elegans* CED3 protein-inhibitor complex. *Biochemical and biophysical research communications*, 281, 115-121.
- Baker, D. J., Jeganathan, K. B., Cameron, J. D., Thompson, M., Juneja, S., Kopecka, A., Kumar, R., Jenkins, R. B., de Groen, P. C., Roche, P. et van Deursen, J.M. (2004). BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nature genetics*, 36, 744-749.
- Bakkenist, C. J. et Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421, 499-506.
- Bao, R., Connolly, D. C., Murphy, M., Green, J., Weinstein, J. K., Pisarcik, D. A. et Hamilton, T.C. (2002). Activation of cancer-specific gene expression by the survivin promoter. *Journal of the National Cancer Institute*, 94, 522-528.
- Barrett, R. M. A., Osborne, T. P. et Wheatley, S.P. (2009). Phosphorylation of survivin at threonine 34 inhibits its mitotic function and enhances its cytoprotective activity. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8, 278-283.
- Bartek, J. et Lukas, J. (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Current opinion in cell biology*, 13, 738-747.
- Bartek, J. et Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer cell*, 3, 421-429.
- Bataille, R., Jegou, G., Robillard, N., Barille-Nion, S., Harousseau, J., Moreau, P., Amiot, M. et Pellat-Deceunynck, C. (2006). The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica*, 91, 1234-1240.
- Bataille, R., Robillard, N., Avet-Loiseau, H., Harousseau, J. et Moreau, P. (2005). CD221 (IGF-1R) is aberrantly expressed in multiple myeloma, in relation to disease severity. *Haematologica*, 90, 706-707.
- Bauer, M. K., Schubert, A., Rocks, O. et Grimm, S. (1999). Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *The Journal of cell biology*, 147, 1493-1502.
- Baumann, P., Mandl-Weber, S., Emmerich, B., Straka, C. et Schmidmaier, R. (2007). Inhibition of adenosine monophosphate-activated protein kinase induces apoptosis in multiple myeloma cells. *Anti-cancer drugs*, 18, 405-410.
- Baumann, P., Mandl-Weber, S., Oduncu, F. et Schmidmaier, R. (2008). Alkylating agents induce activation of NFkappaB in multiple myeloma cells. *Leukemia research*, 32, 1144-1147.

- Bennett, L. N., Larkin, C., Gillespie, D. A. et Clarke, P.R. (2008). Claspin is phosphorylated in the Chk1-binding domain by a kinase distinct from Chk1. *Biochemical and biophysical research communications*, 369, 973-976.
- Bergsagel, P. L. et Kuehl, W.M. (2005). Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23, 6333-6338.
- Bernardi, P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiological reviews*, 79, 1127-1155.
- Beverly, L. J. et Varmus, H.E. (2009). MYC-induced myeloid leukemogenesis is accelerated by all six members of the antiapoptotic BCL family. *Oncogene*, 28, 1274-1279.
- Bhardwaj, A., Sethi, G., Vadhan-Raj, S., Bueso-Ramos, C., Takada, Y., Gaur, U., Nair, A. S., Shishodia, S. et Aggarwal, B.B. (2007). Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through down-regulation of STAT3 and nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells. *Blood*, 109, 2293-2302.
- Bicknell, G. R. et Cohen, G.M. (1995). Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 207, 40-47.
- Birkey Reffey, S., Wurthner, J. U., Parks, W. T., Roberts, A. B. et Duckett, C.S. (2001). X-linked inhibitor of apoptosis protein functions as a cofactor in transforming growth factor-beta signaling. *The Journal of biological chemistry*, 276, 26542-26549.
- Birnbaum, M. J., Clem, R. J. et Miller, L.K. (1994). An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *Journal of virology*, 68, 2521-2528.
- Blagosklonny, M. V. (2007). Mitotic arrest and cell fate: why and how mitotic inhibition of transcription drives mutually exclusive events. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 6, 70-74.
- Blume-Jensen, P. et Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411, 355-365.
- Bockbrader, K. M., Tan, M. et Sun, Y. (2005). A small molecule Smac-mimic compound induces apoptosis and sensitizes TRAIL- and etoposide-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*, 24, 7381-7388.
- Bommert, K., Bargou, R. C. et Stahmer, T. (2006). Signalling and survival pathways in multiple myeloma. *European journal of cancer*, 42, 1574-1580.
- Bonnefoy-Berard, N., Aouacheria, A., Verschelde, C., Quemeneur, L., MarÃ§ais, A. et Marvel, J. (2004). Control of proliferation by Bcl-2 family members. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1644, 159-168.
- Bonner, W. M., Redon, C. E., Dickey, J. S., Nakamura, A. J., Sedelnikova, O. A., Solier, S. et Pommier, Y. (2008). GammaH2AX and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 8, 957-967.
- Borden, K. L. (2000). RING domains: master builders of molecular scaffolds?. *Journal of molecular biology*, 295, 1103-1112.
- Borner, C. (2003). The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular immunology*, 39, 615-647.
- Boudreau, N. et Myers, C. (2003). Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast cancer research : BCR*, 5, 140-146.
- Branzei, D. et Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9, 297-308.

- Brito, D. A. et Rieder, C.L. (2006). Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Current biology : CB*, *16*, 1194-1200.
- Buerger, H., Otterbach, F., Simon, R., Poremba, C., Diallo, R., Decker, T., Riethdorf, L., Brinkschmidt, C., Dockhorn-Dworniczak, B. et Boecker, W. (1999). Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast-evidence of multiple genetic pathways. *The Journal of pathology*, *187*, 396-402.
- Burrows, A. E. et Elledge, S.J. (2008). How ATR turns on: TopBP1 goes on ATRIP with ATR. *Genes & development*, *22*, 1416-1421.
- Byun, T. S., Pacek, M., Yee, M., Walter, J. C. et Cimprich, K.A. (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes & development*, *19*, 1040-1052.
- Caldas, H., Honsey, L. E. et Altura, R.A. (2005). Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Molecular cancer*, *4*, 11-11.
- Cartron, P., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F. M. et Juin, P. (2004). The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Molecular cell*, *16*, 807-818.
- Carvalho, A., Carmena, M., Sambade, C., Earnshaw, W. C. et Wheatley, S.P. (2003). Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *Journal of cell science*, *116*, 2987-2998.
- Ceballos-Cancino, G., Espinosa, M., Maldonado, V. et Melendez-Zajgla, J. (2007). Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin. *Oncogene*, *26*, 7569-7575.
- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S. A. et Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer cell*, *9*, 351-365.
- Chai, J., Shiozaki, E., Srinivasula, S. M., Wu, Q., Datta, P., Alnemri, E. S., Shi, Y. et Dataa, P. (2001). Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell*, *104*, 769-780.
- Chakravarti, A., Zhai, G. G., Zhang, M., Malhotra, R., Latham, D. E., Delaney, M. A., Robe, P., Nestler, U., Song, Q. et Loeffler, J. (2004). Survivin enhances radiation resistance in primary human glioblastoma cells via caspase-independent mechanisms. *Oncogene*, *23*, 7494-7506.
- Chang, H. Y. et Yang, X. (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, *64*, 821-846.
- Chang, H. et Schimmer, A.D. (2007). Livin/melanoma inhibitor of apoptosis protein as a potential therapeutic target for the treatment of malignancy. *Molecular cancer therapeutics*, *6*, 24-30.
- Chantalat, L., Skoufias, D. A., Kleman, J. P., Jung, B., Dideberg, O. et Margolis, R.L. (2000). Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions. *Molecular cell*, *6*, 183-189.
- Chappell, S. A., LeQuesne, J. P., Paulin, F. E., deSchoolmeester, M. L., Stoneley, M., Soutar, R. L., Ralston, S. H., Helfrich, M. H. et Willis, A.E. (2000). A mutation in the c-myc-IRES leads to enhanced internal ribosome entry in multiple myeloma: a novel mechanism of oncogene de-regulation. *Oncogene*, *19*, 4437-4440.
- Charafe-Jauffret, E., Chaffanet, M., Bertucci, F., Ginestier, C., Jacquemier, J., deLapeyri re, O. et Birnbaum, D. (2007). [Towards an integrated cellular and molecular: definition of breast cancers]. *Medecine sciences : M/S*, *23*, 626-632.

- Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C. et Birnbaum, D. (2009). Breast cancer stem cells: tools and models to rely on. *BMC cancer*, *9*, 202-202.
- Chawla-Sarkar, M., Leaman, D. W., Jacobs, B. S. et Borden, E.C. (2002). IFN-beta pretreatment sensitizes human melanoma cells to TRAIL/Apo2 ligand-induced apoptosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *169*, 847-855.
- Cheeseman, I. M., Chappie, J. S., Wilson-Kubalek, E. M. et Desai, A. (2006). The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell*, *127*, 983-997.
- Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., Colman, P. M., Day, C. L., Adams, J. M. et Huang, D.C.S. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular cell*, *17*, 393-403.
- Chng, W. J., Ahmann, G. J., Henderson, K., Santana-Davila, R., Greipp, P. R., Gertz, M. A., Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., Kumar, S., Rajkumar, S. V., Lust, J. A., Kyle, R. A., Zeldenrust, S. R., Hayman, S. R. et Fonseca, R. (2006). Clinical implication of centrosome amplification in plasma cell neoplasm. *Blood*, *107*, 3669-3675.
- Chng, W. J., Glebov, O., Bergsagel, P. L. et Kuehl, W.M. (2007). Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best practice & research. Clinical haematology*, *20*, 571-596.
- Clem, R. J., Sheu, T. T., Richter, B. W., He, W. W., Thornberry, N. A., Duckett, C. S. et Hardwick, J.M. (2001). c-IAP1 is cleaved by caspases to produce a proapoptotic C-terminal fragment. *The Journal of biological chemistry*, *276*, 7602-7608.
- Cobrinik, D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene*, *24*, 2796-2809.
- Coller, H. A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E. S., Eisenman, R. N. et Golub, T.R. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. , *97*, 3260-3265.
- Colnaghi, R., Connell, C. M., Barrett, R. M. A. et Wheatley, S.P. (2006). Separating the anti-apoptotic and mitotic roles of survivin. *The Journal of biological chemistry*, *281*, 33450-33456.
- Connell, C. M., Wheatley, S. P. et McNeish, I.A. (2008). Nuclear survivin abrogates multiple cell cycle checkpoints and enhances viral oncolysis. *Cancer research*, *68*, 7923-7931.
- Coqueret, O. (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment?. *Trends in cell biology*, *13*, 65-70.
- Cory, S. et Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews. Cancer*, *2*, 647-656.
- Cosgrave, N., Hill, A. D. K. et Young, L.S. (2006). Growth factor-dependent regulation of survivin by c-myc in human breast cancer. *Journal of molecular endocrinology*, *37*, 377-390.
- Costantini, S., Woodbine, L., Andreoli, L., Jeggo, P. A. et Vindigni, A. (2007). Interaction of the Ku heterodimer with the DNA ligase IV/Xrcc4 complex and its regulation by DNA-PK. *DNA repair*, *6*, 712-722.
- Creagh, E. M. et Martin, S.J. (2003). Cell stress-associated caspase activation: intrinsically complex?. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, *2003*, pe11-pe11.
- Creagh, E. M., Murphy, B. M., Duriez, P. J., Duckett, C. S. et Martin, S.J. (2004). Smac/Diablo antagonizes ubiquitin ligase activity of inhibitor of apoptosis proteins. *The Journal of biological chemistry*, *279*, 26906-26914.

- Crook, N. E., Clem, R. J. et Miller, L.K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *Journal of virology*, *67*, 2168-2174.
- Dai, W., Wang, Q., Liu, T., Swamy, M., Fang, Y., Xie, S., Mahmood, R., Yang, Y., Xu, M. et Rao, C.V. (2004). Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency. *Cancer research*, *64*, 440-445.
- Dalton, W. B., Nandan, M. O., Moore, R. T. et Yang, V.W. (2007). Human cancer cells commonly acquire DNA damage during mitotic arrest. *Cancer research*, *67*, 11487-11492.
- Dan, H. C., Sun, M., Kaneko, S., Feldman, R. I., Nicosia, S. V., Wang, H., Tsang, B. K. et Cheng, J.Q. (2004). Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *The Journal of biological chemistry*, *279*, 5405-5412.
- Danial, N. N. (2007). BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *13*, 7254-7263.
- Danial, N. N. et Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, *116*, 205-219.
- Darnay, B. G., Ni, J., Moore, P. A. et Aggarwal, B.B. (1999). Activation of NF-kappaB by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF-kappaB-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif. *The Journal of biological chemistry*, *274*, 7724-7731.
- Dasgupta, P., Kinkade, R., Joshi, B., Decook, C., Haura, E. et Chellappan, S. (2006). Nicotine inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic drugs by up-regulating XIAP and survivin. *Cell*, *103*, 6332-6337.
- Datta, S. R., Brunet, A. et Greenberg, M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Acts. *Genes & development*, *13*, 2905-2927.
- Daujat, S., Neel, H. et Piette, J. (2001). MDM2: life without p53. *Trends in genetics : TIG*, *17*, 459-464.
- De Vos, J., Hose, D., R me, T., Tarte, K., Moreaux, J., Mahtouk, K., Jourdan, M., Goldschmidt, H., Rossi, J., Cremer, F. W. et Klein, B. (2006). Microarray-based understanding of normal and malignant plasma cells. *Immunological reviews*, *210*, 86-104.
- Delacour-Larose, M., Thi, M. H., Dimitrov, S. et Molla, A. (2007). Role of survivin phosphorylation by aurora B in mitosis. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *6*, 1878-1885.
- Dempsey, P. W., Doyle, S. E., He, J. Q. et Cheng, G. (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine & growth factor reviews*, *14*, 193-209.
- Derenne, S., Monia, B., Dean, N. M., Taylor, J. K., Rapp, M., Harousseau, J., Bataille, R. et Amiot, M. (2002). Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood*, *100*, 194-199.
- Deveraux, Q. L. et Reed, J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes & development*, *13*, 239-252.
- Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S. et Reed, J.C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *The EMBO journal*, *17*, 2215-2223.
- Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. et Reed, J.C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, *388*, 300-304.
- Di Cosimo, S. et Baselga, J. (2008). Targeted therapies in breast cancer: where are we now?. *European journal of cancer*, *44*, 2781-2790.

- Dobles, M., Liberal, V., Scott, M. L., Benezra, R. et Sorger, P.K. (2000). Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. *Cell*, *101*, 635-645.
- Dohi, T., Beltrami, E., Wall, N. R., Plescia, J. et Altieri, D.C. (2004). Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *The Journal of clinical investigation*, *114*, 1117-1127.
- Dohi, T., Okada, K., Xia, F., Wilford, C. E., Samuel, T., Welsh, K., Marusawa, H., Zou, H., Armstrong, R., Matsuzawa, S., Salvesen, G. S., Reed, J. C. et Altieri, D.C. (2004). An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, *279*, 34087-34090.
- Dohi, T., Xia, F. et Altieri, D.C. (2007). Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection. *Molecular cell*, *27*, 17-28.
- Drewinko, B., Alexanian, R., Boyer, H., Barlogie, B. et Rubinow, S.I. (1981). The growth fraction of human myeloma cells. *Blood*, *57*, 333-338.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. et Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, *102*, 33-42.
- Dubrez-Daloz, L., Dupoux, A. et Cartier, J. (2008). IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *7*, 1036-1046.
- Eckelman, B. P., Salvesen, G. S. et Scott, F.L. (2006). Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO reports*, *7*, 988-994.
- Eisenberg-Lerner, A. et Kimchi, A. (2009). The paradox of autophagy and its implication in cancer etiology and therapy. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, *14*, 376-391.
- Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H. et Kimchi, A. (2009). Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell death and differentiation*, *16*, 966-975.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, *35*, 495-516.
- Emanuel, P. O. M., Phelps, R. G., Mudgil, A., Shafir, M. et Burstein, D.E. (2008). Immunohistochemical detection of XIAP in melanoma. *Journal of cutaneous pathology*, *35*, 292-7.
- Fandy, T. E., Ross, D. D., Gore, S. D. et Srivastava, R.K. (2007). Flavopiridol synergizes TRAIL cytotoxicity by downregulation of FLIPL. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, *60*, 313-319.
- Felsher, D. W. et Bishop, J.M. (1999). Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Molecular cell*, *4*, 199-207.
- Feng, Y., Lin, D., Shi, Z., Wang, X., Shen, X., Zhang, Y., Du, X., Luo, M., Xu, X., Han, Y., Cai, Y., Zhang, Z., Zhan, Q. et Wang, M. (2009). Overexpression of PLK1 is associated with poor survival by inhibiting apoptosis via enhancement of survivin level in esophageal squamous cell carcinoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, *124*, 578-588.
- Filipits, M., Puhalla, H. et Wrba, F. (2003). Low p27Kip1 expression is an independent prognostic factor in gallbladder carcinoma. *Anticancer research*, *23*, 675-679.
- Fillingham, J., Keogh, M. et Krogan, N.J. (2006). GammaH2AX and its role in DNA double-strand break repair. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, *84*, 568-577.

- Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature medicine*, *1*, 27-31.
- Fong, W. G., Liston, P., Rajcan-Separovic, E., St Jean, M., Craig, C. et Korneluk, R.G. (2000). Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. *Genomics*, *70*, 113-122.
- Fortugno, P., Beltrami, E., Plescia, J., Fontana, J., Pradhan, D., Marchisio, P. C., Sessa, W. C. et Altieri, D.C. (2003). Regulation of survivin function by Hsp90. , *100*, 13791-13796.
- Fortugno, P., Wall, N. R., Giodini, A., O'Connor, D. S., Plescia, J., Padgett, K. M., Tognin, S., Marchisio, P. C. et Altieri, D.C. (2002). Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *Journal of cell science*, *115*, 575-585.
- Foster, F. M., Owens, T. W., Tanianis-Hughes, J., Clarke, R. B., Brennan, K., Bundred, N. J. et Streuli, C.H. (2009). Targeting inhibitor of apoptosis proteins in combination with ErbB antagonists in breast cancer. *Breast cancer research : BCR*, *11*, R41-R41.
- Fousteri, M., Vermeulen, W., van Zeeland, A. A. et Mullenders, L.H.F. (2006). Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. *Molecular cell*, *23*, 471-482.
- Frelin, C., Imbert, V., Griessinger, E., Loubat, A., Dreano, M. et Peyron, J. (2003). AS602868, a pharmacological inhibitor of IKK2, reveals the apoptotic potential of TNF-alpha in Jurkat leukemic cells. *Oncogene*, *22*, 8187-8194.
- Frelin, C., Imbert, V., Griessinger, E., Peyron, A., Rochet, N., Philip, P., Dageville, C., Sirvent, A., Hummelsberger, M., Berard, E., Dreano, M., Sirvent, N. et Peyron, J. (2005). Targeting NF-kappaB activation via pharmacologic inhibition of IKK2-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Blood*, *105*, 804-811.
- Friedberg, E. C. (2001). How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nature reviews. Cancer*, *1*, 22-33.
- Fukuda, S. et Pelus, L.M. (2002). Elevation of Survivin levels by hematopoietic growth factors occurs in quiescent CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells before cell cycle entry. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *1*, 322-326.
- Fukuda, S. et Pelus, L.M. (2006). Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Molecular cancer therapeutics*, *5*, 1087-1098.
- Gallenne, T., Gautier, F., Oliver, L., Hervouet, E., NoË«l, B., Hickman, J. A., Geneste, O., Cartron, P., Vallette, F. M., Manon, S. et Juin, P. (2009). Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *The Journal of cell biology*, *185*, 279-290.
- Gascoigne, K. E. et Taylor, S.S. (2009). How do anti-mitotic drugs kill cancer cells?. *Journal of cell science*, *122*, 2579-2585.
- Gazitt, Y. (1999). TRAIL is a potent inducer of apoptosis in myeloma cells derived from multiple myeloma patients and is not cytotoxic to hematopoietic stem cells. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, *13*, 1817-1824.
- Geigl, J. B., Obenauf, A. C., Schwarzbraun, T. et Speicher, M.R. (2008). Defining 'chromosomal instability'. *Trends in genetics : TIG*, *24*, 64-69.
- Gibson, S. B., Oyer, R., Spalding, A. C., Anderson, S. M. et Johnson, G.L. (2000). Increased expression of death receptors 4 and 5 synergizes the apoptosis response to combined treatment with etoposide and TRAIL. *Molecular and cellular biology*, *20*, 205-212.
- Gilmore, T. D. (2007). Multiple myeloma: lusting for NF-kappaB. *Cancer cell*, *12*, 95-97.

- Giuliani, N., Bataille, R., Mancini, C., Lazzaretti, M. et Barille, S. (2001). Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood*, *98*, 3527-3533.
- Grallert, B. et Boye, E. (2008). The multiple facets of the intra-S checkpoint. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *7*, 2315-2320.
- Green, D. R. (2000). Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell*, *102*, 1-4.
- Gritsko, T., Williams, A., Turkson, J., Kaneko, S., Bowman, T., Huang, M., Nam, S., Eweis, I., Diaz, N., Sullivan, D., Yoder, S., Enkemann, S., Eschrich, S., Lee, J., Beam, C. A., Cheng, J., Minton, S., Muro-Cacho, C. A. et Jove, R. (2006). Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *12*, 11-19.
- Gross, A., McDonnell, J. M. et Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development*, *13*, 1899-1911.
- Grossman, D., Kim, P. J., Schechner, J. S. et Altieri, D.C. (2001). Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting. , *98*, 635-640.
- Guardavaccaro, D. et Pagano, M. (2006). Stabilizers and destabilizers controlling cell cycle oscillators. *Molecular cell*, *22*, 1-4.
- Guo, Z., Kumagai, A., Wang, S. X. et Dunphy, W.G. (2000). Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in Xenopus egg extracts. *Genes & development*, *14*, 2745-2756.
- Hacker, G. et Weber, A. (2007). BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how?. *Archives of biochemistry and biophysics*, *462*, 150-155.
- Hanahan, D. et Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*, 57-70.
- Hanks, S., Coleman, K., Reid, S., Plaja, A., Firth, H., Fitzpatrick, D., Kidd, A., Mehes, K., Nash, R., Robin, N., Shannon, N., Tolmie, J., Swansbury, J., Irrthum, A., Douglas, J. et Rahman, N. (2004). Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nature genetics*, *36*, 1159-1161.
- Hao, Y., Sekine, K., Kawabata, A., Nakamura, H., Ishioka, T., Ohata, H., Katayama, R., Hashimoto, C., Zhang, X., Noda, T., Tsuruo, T. et Naito, M. (2004). Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function. *Nature cell biology*, *6*, 849-860.
- Harper, J. W. et Elledge, S.J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Molecular cell*, *28*, 739-745.
- Harper, J. W., Burton, J. L. et Solomon, M.J. (2002). The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes & development*, *16*, 2179-2206.
- Hegde, R., Srinivasula, S. M., Datta, P., Madesh, M., Wassell, R., Zhang, Z., Cheong, N., Nejme, J., Fernandes-Alnemri, T., Hoshino, S. et Alnemri, E.S. (2003). The polypeptide chain-releasing factor GSPT1/eRF3 is proteolytically processed into an IAP-binding protein. *The Journal of biological chemistry*, *278*, 38699-38706.
- Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A. S., Fernandes-Alnemri, T. et Alnemri, E.S. (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *The Journal of biological chemistry*, *277*, 432-438.

- Hekmat-Nejad, M., You, Z., Yee, M. C., Newport, J. W. et Cimprich, K.A. (2000). Xenopus ATR is a replication-dependent chromatin-binding protein required for the DNA replication checkpoint. *Current biology : CB*, *10*, 1565-1573.
- Hellen, C. U. et Sarnow, P. (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes & development*, *15*, 1593-1612.
- Hengartner, M. O. et Horvitz, H.R. (1994). Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Current opinion in genetics & development*, *4*, 581-586.
- Hideshima, T., Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M. et Anderson, K.C. (2004). Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood*, *104*, 607-618.
- Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Hayashi, T., Munshi, N., Dang, L., Castro, A., Palombella, V., Adams, J. et Anderson, K.C. (2002). NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *The Journal of biological chemistry*, *277*, 16639-16647.
- Hideshima, T., Mitsiades, C., Tonon, G., Richardson, P. G. et Anderson, K.C. (2007). Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nature reviews. Cancer*, *7*, 585-598.
- Hideshima, T., Neri, P., Tassone, P., Yasui, H., Ishitsuka, K., Raje, N., Chauhan, D., Podar, K., Mitsiades, C., Dang, L., Munshi, N., Richardson, P., Schenkein, D. et Anderson, K.C. (2006). MLN120B, a novel IkappaB kinase beta inhibitor, blocks multiple myeloma cell growth in vitro and in vivo. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *12*, 5887-5894.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, *411*, 366-374.
- Hofer-Warbinek, R., Schmid, J. A., Stehlik, C., Binder, B. R., Lipp, J. et de Martin, R. (2000). Activation of NF-kappa B by XIAP, the X chromosome-linked inhibitor of apoptosis, in endothelial cells involves TAK1. *The Journal of biological chemistry*, *275*, 22064-22068.
- Hoffman, W. H., Biade, S., Zilfou, J. T., Chen, J. et Murphy, M. (2002). Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *The Journal of biological chemistry*, *277*, 3247-3257.
- Holcik, M. (2003). Translational upregulation of the X-linked inhibitor of apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1010*, 249-258.
- Holcik, M. et Korneluk, R.G. (2000). Functional characterization of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) internal ribosome entry site element: role of La autoantigen in XIAP translation. *Molecular and cellular biology*, *20*, 4648-4657.
- Holcik, M. et Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *6*, 318-327.
- Holcik, M., Gibson, H. et Korneluk, R.G. (2001). XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, *6*, 253-261.
- Honda, R., Korner, R. et Nigg, E.A. (2003). Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Molecular biology of the cell*, *14*, 3325-3341.
- Hoyt, M. A., Totis, L. et Roberts, B.T. (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell*, *66*, 507-517.
- Huang, Y., Park, Y. C., Rich, R. L., Segal, D., Myszka, D. G. et Wu, H. (2001). Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell*, *104*, 781-790.

- Huang, Y., Shin, N. H., Sun, Y. et Wang, K.K. (2001). Molecular cloning and characterization of a novel caspase-3 variant that attenuates apoptosis induced by proteasome inhibition. *Biochemical and biophysical research communications*, 283, 762-769.
- Hunter, A. M., LaCasse, E. C. et Korneluk, R.G. (2007). The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 12, 1543-1568.
- Ichijima, Y., Sakasai, R., Okita, N., Asahina, K., Mizutani, S. et Teraoka, H. (2005). Phosphorylation of histone H2AX at M phase in human cells without DNA damage response. *Biochemical and biophysical research communications*, 336, 807-812.
- Iida, K., Nobori, T., Matsumine, A., Isaka, A., Seto, M., Shiraishi, T. et Uchida, A. (2003). Effect of retinoblastoma tumor suppressor gene expression on chemosensitivity of human osteosarcoma cell lines. *Oncology reports*, 10, 1961-1965.
- Issing, W. J., Wustrow, T. P., Oeckler, R., Mezger, J. et Nerlich, A. (1993). An association of the RB gene with osteosarcoma: molecular genetic evaluation of a case of hereditary retinoblastoma. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 250, 277-280.
- Iwasa, T., Okamoto, I., Suzuki, M., Nakahara, T., Yamanaka, K., Hatashita, E., Yamada, Y., Fukuoka, M., Ono, K. et Nakagawa, K. (2008). Radiosensitizing effect of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in non-small cell lung cancer cell lines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14, 6496-6504.
- Jego, G., Bataille, R. et Pellat-Deceunynck, C. (2001). Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood*, 97, 1817-1822.
- Jego, G., Robillard, N., Puthier, D., Amiot, M., Accard, F., Pineau, D., Harousseau, J. L., Bataille, R. et Pellat-Deceunynck, C. (1999). Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood*, 94, 701-712.
- Jeyaparakash, A. A., Klein, U. R., Lindner, D., Ebert, J., Nigg, E. A. et Conti, E. (2007). Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together. *Cell*, 131, 271-285.
- Jiang, G., Ren, B., Xu, L., Song, S., Zhu, C. et Ye, F. (2009). Survivin may enhance DNA double-strand break repair capability by up-regulating Ku70 in human KB cells. *Anticancer research*, 29, 223-228.
- Jiang, Y., Saavedra, H. I., Holloway, M. P., Leone, G. et Altura, R.A. (2004). Aberrant regulation of survivin by the RB/E2F family of proteins. *The Journal of biological chemistry*, 279, 40511-40520.
- Jiricny, J. et Nystrom-Lahti, M. (2000). Mismatch repair defects in cancer. *Current opinion in genetics & development*, 10, 157-161.
- Joazeiro, C. A. et Weissman, A.M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*, 102, 549-552.
- Jonkers, J. et Berns, A. (2004). Oncogene addiction: sometimes a temporary slavery. *Cancer cell*, 6, 535-538.
- Kang, B. H. et Altieri, D.C. (2006). Regulation of survivin stability by the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein. *The Journal of biological chemistry*, 281, 24721-24727.
- Karikari, C. A., Roy, I., Tryggestad, E., Feldmann, G., Pinilla, C., Welsh, K., Reed, J. C., Armour, E. P., Wong, J., Herman, J., Rakheja, D. et Maitra, A. (2007). Targeting the apoptotic

- machinery in pancreatic cancers using small-molecule antagonists of the X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Molecular cancer therapeutics*, 6, 957-66.
- Kashiwagi, H., McDunn, J. E., Goedegebuure, P. S., Gaffney, M. C., Chang, K., Trinkaus, K., Piwnica-Worms, D., Hotchkiss, R. S. et Hawkins, W.G. (2007). TAT-Bim induces extensive apoptosis in cancer cells. *Annals of surgical oncology : the official journal of the Society of Surgical Oncology*, 14, 1763-1771.
- Kaufmann, S. H. et Earnshaw, W.C. (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental cell research*, 256, 42-49.
- Keats, J. J., Fonseca, R., Chesi, M., Schop, R., Baker, A., Chng, W., Van Wier, S., Tiedemann, R., Shi, C., Sebag, M., Braggio, E., Henry, T., Zhu, Y., Fogle, H., Price-Troska, T., Ahmann, G., Mancini, C., Brents, L. A., Kumar, S., Greipp, P., Dispenzieri, A., Bryant, B., Mulligan, G., Bruhn, L., Barrett, M., Valdez, R., Trent, J., Stewart, A. K., Carpten, J. et Bergsagel, P.L. (2007). Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer cell*, 12, 131-144.
- Kenney, D. M., Geschwindt, R. D., Kary, M. R., Linic, J. M., Sardesai, N. Y. et Li, Z. (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 biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 28, 57-62.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. et Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26, 239-257.
- Khayat, C. M. et Johnston, D.L. (2004). Rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, and adrenocortical carcinoma in a child with a germline p53 mutation. *Pediatric blood & cancer*, 43, 683-686.
- Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K. J. et Ashkenazi, A. (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*, 12, 611-620.
- Kleinberg, L., Lie, A. K., Flørenes, V. A., Nesland, J. M. et Davidson, B. (2007). Expression of inhibitor-of-apoptosis protein family members in malignant mesothelioma. *Human pathology*, 38, 986-994.
- Knauer, S. K., Bier, C., Schlag, P., Fritzmann, J., Dietmaier, W., Rodel, F., Klein-Hitpass, L., Kovacs, A. N. F., Doring, C., Hansmann, M., Hofmann, W., Kunkel, M., Brochhausen, C., Engels, K., Lippert, B. M., Mann, W. et Stauber, R.H. (2007). The survivin isoform survivin-3B is cytoprotective and can function as a chromosomal passenger complex protein. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 6, 1502-1509.
- Knauer, S. K., Kramer, O. H., Knosel, T., Engels, K., Rodel, F., Kovacs, A. F., Dietmaier, W., Klein-Hitpass, L., Habtemichael, N., Schweitzer, A., Brieger, J., Rodel, C., Mann, W., Petersen, I., Heinzl, T. et Stauber, R.H. (2007). Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of survivin. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21, 207-216.
- Kolodner, R. D. et Marsischky, G.T. (1999). Eukaryotic DNA mismatch repair. *Current opinion in genetics & development*, 9, 89-96.
- Komarova, N. L., Sengupta, A. et Nowak, M.A. (2003). Mutation-selection networks of cancer initiation: tumor suppressor genes and chromosomal instability. *Journal of theoretical biology*, 223, 433-450.
- Korsmeyer, S. J. (1992). Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. *Annual review of immunology*, 10, 785-807.

- Kroemer, G. et Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer cell*, *13*, 472-482.
- Kroemer, G., Galluzzi, L. et Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews*, *87*, 99-163.
- Kuehl, W. M. et Bergsagel, P.L. (2005). Early genetic events provide the basis for a clinical classification of multiple myeloma. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, *346-352*.
- Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H. Y. et Dunphy, W.G. (2006). TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell*, *124*, 943-955.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J. E., Bonzon, C., Sullivan, B. A., Green, D. R. et Newmeyer, D.D. (2005). BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular cell*, *17*, 525-535.
- Kyle, R. A. et Rajkumar, S.V. (2004). Multiple myeloma. *The New England journal of medicine*, *351*, 1860-1873.
- Lagacé, M., Xuan, J. Y., Young, S. S., McRoberts, C., Maier, J., Rajcan-Separovic, E. et Korneluk, R.G. (2001). Genomic organization of the X-linked inhibitor of apoptosis and identification of a novel testis-specific transcript. *Genomics*, *77*, 181-8.
- Lang, G. A., Iwakuma, T., Suh, Y., Liu, G., Rao, V. A., Parant, J. M., Valentin-Vega, Y. A., Terzian, T., Caldwell, L. C., Strong, L. C., El-Naggar, A. K. et Lozano, G. (2004). Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell*, *119*, 861-872.
- Lareef, M. H., Tahin, Q., Song, J., Russo, I. H., Mihaila, D., Slater, C. M., Balsara, B., Testa, J. R., Broccoli, D., Grobelny, J. V., Mor, G., Cuthbert, A. et Russo, J. (2004). Chromosome 17p13.2 transfer reverts transformation phenotypes and Fas-mediated apoptosis in breast epithelial cells. *Molecular carcinogenesis*, *39*, 234-246.
- Leaman, D. W., Chawla-Sarkar, M., Vyas, K., Reheman, M., Tamai, K., Toji, S. et Borden, E.C. (2002). Identification of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 as an interferon-stimulated gene that augments TRAIL Apo2L-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, *277*, 28504-28511.
- Lee, C. H. et Chung, J.H. (2001). The hCds1 (Chk2)-FHA domain is essential for a chain of phosphorylation events on hCds1 that is induced by ionizing radiation. *The Journal of biological chemistry*, *276*, 30537-30541.
- Lee, C. W., Simin, K., Liu, Q., Plescia, J., Guha, M., Khan, A., Hsieh, C. et Altieri, D.C. (2008). A functional Notch-survivin gene signature in basal breast cancer. *Breast cancer research : BCR*, *10*, R97-R97.
- Lee, J. et Paull, T.T. (2004). Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science*, *304*, 93-96.
- Lee, M. W., Hirai, I. et Wang, H. (2003). Caspase-3-mediated cleavage of Rad9 during apoptosis. *Oncogene*, *22*, 6340-6346.
- Lee, M., Huh, J., Chung, S., Lee, J., Byun, D., Ryu, B., Kang, M., Chae, K., Lee, S., Lee, C., Kim, J. I., Chang, S. et Chi, S. (2006). Promoter CpG hypermethylation and downregulation of XAF1 expression in human urogenital malignancies: implication for attenuated p53 response to apoptotic stresses. *Oncogene*, *25*, 5807-5822.
- Lee, S. B., Kim, S. H., Bell, D. W., Wahrer, D. C., Schiripo, T. A., Jorczak, M. M., Sgroi, D. C., Garber, J. E., Li, F. P., Nichols, K. E., Varley, J. M., Godwin, A. K., Shannon, K. M., Harlow,

- E. et Haber, D.A. (2001). Destabilization of CHK2 by a missense mutation associated with Li-Fraumeni Syndrome. *Cancer research*, *61*, 8062-8067.
- Leibeling, D., Laspe, P. et Emmert, S. (2006). Nucleotide excision repair and cancer. *Journal of molecular histology*, *37*, 225-238.
- Lens, S. M. A., Rodriguez, J. A., Vader, G., Span, S. W., Giaccone, G. et Medema, R.H. (2006). Uncoupling the central spindle-associated function of the chromosomal passenger complex from its role at centromeres. *Molecular biology of the cell*, *17*, 1897-1909.
- Lens, S. M. A., Wolthuis, R. M. F., Klompaker, R., Kauw, J., Agami, R., Brummelkamp, T., Kops, G. et Medema, R.H. (2003). Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *The EMBO journal*, *22*, 2934-2947.
- Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S. et Korsmeyer, S.J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer cell*, *2*, 183-192.
- Lewis, S. M., Veyrier, A., Hosszu Ungureanu, N., Bonnal, S., Vagner, S. et Holcik, M. (2007). Subcellular relocalization of a trans-acting factor regulates XIAP IRES-dependent translation. *Molecular biology of the cell*, *18*, 1302-1311.
- Li, F. (2005). Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *British journal of cancer*, *92*, 212-216.
- Li, F. et Altieri, D.C. (1999). The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. *Cancer research*, *59*, 3143-3151.
- Li, F., Ambrosini, G., Chu, E. Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P. C. et Altieri, D.C. (1998). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, *396*, 580-584.
- Li, R. et Murray, A.W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell*, *66*, 519-531.
- Li, Y., Xie, M., Yang, J., Yang, D., Deng, R., Wan, Y. et Yan, B. (2006). The expression of antiapoptotic protein survivin is transcriptionally upregulated by DEC1 primarily through multiple sp1 binding sites in the proximal promoter. *Oncogene*, *25*, 3296-3306.
- Lim, D., Jocelyn, K. M., Yip, G. W. et Bay, B. (2009). Silencing the Metallothionein-2A gene inhibits cell cycle progression from G1- to S-phase involving ATM and cdc25A signaling in breast cancer cells. *Cancer letters*, *276*, 109-117.
- Ling, X., Cheng, Q., Black, J. D. et Li, F. (2007). Forced expression of survivin-2B abrogates mitotic cells and induces mitochondria-dependent apoptosis by blockade of tubulin polymerization and modulation of Bcl-2, Bax, and survivin. *The Journal of biological chemistry*, *282*, 27204-27214.
- Lipponen, P., Pietiläinen, T., Kosma, V. M., Aaltomaa, S., Eskelinen, M. et Syrjänen, K. (1995). Apoptosis suppressing protein bcl-2 is expressed in well-differentiated breast carcinomas with favourable prognosis. *The Journal of Pathology*, *177*, 49-55.
- Liston, P., Fong, W. G., Kelly, N. L., Toji, S., Miyazaki, T., Conte, D., Tamai, K., Craig, C. G., McBurney, M. W. et Korneluk, R.G. (2001). Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nature cell biology*, *3*, 128-133.
- Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J. E., MacKenzie, A. et Korneluk, R.G. (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*, *379*, 349-53.
- Liu, T., Brouha, B. et Grossman, D. (2004). Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells. *Oncogene*, *23*, 39-48.

- Lohr, K., Moritz, C., Contente, A. et Dobbelstein, M. (2003). p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53. *The Journal of biological chemistry*, *278*, 32507-32516.
- Lotocki, G., Alonso, O. F., Frydel, B., Dietrich, W. D. et Keane, R.W. (2003). Monoubiquitination and cellular distribution of XIAP in neurons after traumatic brain injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *23*, 1129-1136.
- Loussouarn, D., Campion, L., Leclair, F., Campone, M., Charbonnel, C., Ricolleau, G., Gouraud, W., Bataille, R. et Jezequel, P. (2009). Validation of UBE2C protein as a prognostic marker in node-positive breast cancer. *British journal of cancer*, *101*, 166-173.
- Lovell, R., Dunn, J. A., Begum, G., Barth, N. J., Plant, T., Moss, P. A., Drayson, M. T. et Pratt, G. (2005). Soluble syndecan-1 level at diagnosis is an independent prognostic factor in multiple myeloma and the extent of fall from diagnosis to plateau predicts for overall survival. *British journal of haematology*, *130*, 542-548.
- Lu, M., Lin, S., Huang, Y., Kang, Y. J., Rich, R., Lo, Y., Myszk, D., Han, J. et Wu, H. (2007). XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization. *Molecular cell*, *26*, 689-702.
- Lukas, J., Lukas, C. et Bartek, J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA repair*, *3*, 997-1007.
- Luo, J., Solimini, N. L. et Elledge, S.J. (2009). Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*, *136*, 823-837.
- Madesh, M., Antonsson, B., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S. et Hajnoczky, G. (2002). Rapid kinetics of tBid-induced cytochrome c and Smac/DIABLO release and mitochondrial depolarization. *The Journal of biological chemistry*, *277*, 5651-5659.
- Mahotka, C., Liebmann, J., Wenzel, M., Suschek, C. V., Schmitt, M., Gabbert, H. E. et Gerharz, C.D. (2002). Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. *Cell death and differentiation*, *9*, 1334-1342.
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Bartek, J. et Lukas, J. (2006). Destruction of Claspin by SCFbetaTrCP restrains Chk1 activation and facilitates recovery from genotoxic stress. *Molecular cell*, *23*, 307-318.
- Malumbres, M. et Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature reviews. Cancer*, *1*, 222-231.
- Malumbres, M. et Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences*, *30*, 630-641.
- Malumbres, M. et Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews. Cancer*, *9*, 153-166.
- Mansouri, A., Zhang, Q., Ridgway, L. D., Tian, L. et Claret, F. (2003). Cisplatin resistance in an ovarian carcinoma is associated with a defect in programmed cell death control through XIAP regulation. *Oncology research*, *13*, 399-404.
- Maxwell, C. A., Keats, J. J., Belch, A. R., Pilarski, L. M. et Reiman, T. (2005). Receptor for hyaluronan-mediated motility correlates with centrosome abnormalities in multiple myeloma and maintains mitotic integrity. *Cancer research*, *65*, 850-860.
- McClendon, A. K. et Oshero, N. (2007). DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutation research*, *623*, 83-97.
- McNeish, I. A., Lopes, R., Bell, S. J., McKay, T. R., Fernandez, M., Lockley, M., Wheatley, S. P. et Lemoine, N.R. (2005). Survivin interacts with Smac/DIABLO in ovarian carcinoma

- cells but is redundant in Smac-mediated apoptosis. *Experimental cell research*, *302*, 69-82.
- Meng, H., Yang, C., Ni, W., Ding, W., Yang, X. et Qian, W. (2007). Antitumor activity of fludarabine against human multiple myeloma in vitro and in vivo. *European journal of haematology*, *79*, 486-493.
- Menoret, E., Gomez-Bougie, P., Geffroy-Luseau, A., Daniels, S., Moreau, P., Le Gouill, S., Harousseau, J., Bataille, R., Amiot, M. et Pellat-Deceunynck, C. (2006). Mcl-1L cleavage is involved in TRAIL-R1- and TRAIL-R2-mediated apoptosis induced by HGS-ETR1 and HGS-ETR2 human mAbs in myeloma cells. *Blood*, *108*, 1346-1352.
- Mesri, M., Morales-Ruiz, M., Ackermann, E. J., Bennett, C. F., Pober, J. S., Sessa, W. C. et Altieri, D.C. (2001). Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting. *The American journal of pathology*, *158*, 1757-1765.
- Michael, W. M., Ott, R., Fanning, E. et Newport, J. (2000). Activation of the DNA replication checkpoint through RNA synthesis by primase. *Science*, *289*, 2133-2137.
- Michel, L. S., Liberal, V., Chatterjee, A., Kirchwegger, R., Pasche, B., Gerald, W., Dobles, M., Sorger, P. K., Murty, V. V. et Benezra, R. (2001). MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature*, *409*, 355-359.
- Miller, K. D. (2002). Issues and challenges for antiangiogenic therapies. *Breast cancer research and treatment*, *75 Suppl 1*, S45-50; discussion S57.
- Mirza, A., McQuirk, M., Hockenberry, T. N., Wu, Q., Ashar, H., Black, S., Wen, S. F., Wang, L., Kirschmeier, P., Bishop, W. R., Nielsen, L. L., Pickett, C. B. et Liu, S. (2002). Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*, *21*, 2613-2622.
- Mitsiades, C. S., Mitsiades, N., Poulaki, V., Schlossman, R., Akiyama, M., Chauhan, D., Hideshima, T., Treon, S. P., Munshi, N. C., Richardson, P. G. et Anderson, K.C. (2002). Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene*, *21*, 5673-5683.
- Mitsiades, C. S., Treon, S. P., Mitsiades, N., Shima, Y., Richardson, P., Schlossman, R., Hideshima, T. et Anderson, K.C. (2001). TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood*, *98*, 795-804.
- Mitsiades, N., Mitsiades, C. S., Poulaki, V., Chauhan, D., Richardson, P. G., Hideshima, T., Munshi, N., Treon, S. P. et Anderson, K.C. (2002). Biologic sequelae of nuclear factor-kappaB blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood*, *99*, 4079-4086.
- Momoi, T. (2004). Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *Journal of chemical neuroanatomy*, *28*, 101-105.
- Moreau, P., Robillard, N., Avet-Loiseau, H., Pineau, D., Morineau, N., Milpied, N., Harousseau, J. et Bataille, R. (2004). Patients with CD45 negative multiple myeloma receiving high-dose therapy have a shorter survival than those with CD45 positive multiple myeloma. *Haematologica*, *89*, 547-551.
- Morrow, C. J., Tighe, A., Johnson, V. L., Scott, M. I. F., Ditchfield, C. et Taylor, S.S. (2005). Bub1 and aurora B cooperate to maintain BubR1-mediated inhibition of APC/CCdc20. *Journal of cell science*, *118*, 3639-3652.

- Muchmore, S. W., Chen, J., Jakob, C., Zakula, D., Matayoshi, E. D., Wu, W., Zhang, H., Li, F., Ng, S. C. et Altieri, D.C. (2000). Crystal structure and mutagenic analysis of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin. *Molecular cell*, *6*, 173-182.
- Musacchio, A. et Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *8*, 379-393.
- Nakagawa, T. et Yuan, J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *The Journal of cell biology*, *150*, 887-894.
- Nakagawa, Y., Abe, S., Kurata, M., Hasegawa, M., Yamamoto, K., Inoue, M., Takemura, T., Suzuki, K. et Kitagawa, M. (2006). IAP family protein expression correlates with poor outcome of multiple myeloma patients in association with chemotherapy-induced overexpression of multidrug resistance genes. *American journal of hematology*, *81*, 824-831.
- Nechushtan, A., Smith, C. L., Lamensdorf, I., Yoon, S. H. et Youle, R.J. (2001). Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *The Journal of cell biology*, *153*, 1265-1276.
- Neil, J. R., Tian, M. et Schiemann, W.P. (2009). X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein and Its E3 Ligase Activity Promote Transforming Growth Factor- β -mediated Nuclear Factor- κ B Activation during Breast Cancer Progression. *The Journal of biological chemistry*, *284*, 21209-21217.
- Nigg, E. A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *2*, 21-32.
- Nowell, P. C. (2002). Tumor progression: a brief historical perspective. *Seminars in cancer biology*, *12*, 261-266.
- Nurse, P. (2000). A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell*, *100*, 71-78.
- O'Connor, D. S., Grossman, D., Plescia, J., Li, F., Zhang, H., Villa, A., Tognin, S., Marchisio, P. C. et Altieri, D.C. (2000). Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Cell*, *97*, 13103-13107.
- Oancea, M., Mani, A., Hussein, M. A. et Almasan, A. (2004). Apoptosis of multiple myeloma. *International journal of hematology*, *80*, 224-231.
- Olsson, H. (2000). Tumour biology of a breast cancer at least partly reflects the biology of the tissue/epithelial cell of origin at the time of initiation - a hypothesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *74*, 345-350.
- Paik, S., Shak, S., Tang, G., Kim, C., Baker, J., Cronin, M., Baehner, F. L., Walker, M. G., Watson, D., Park, T., Hiller, W., Fisher, E. R., Wickerham, D. L., Bryant, J. et Wolmark, N. (2004). A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, *351*, 2817-2826.
- Paulsen, R. D., Soni, D. V., Wollman, R., Hahn, A. T., Yee, M., Guan, A., Hesley, J. A., Miller, S. C., Cromwell, E. F., Solow-Cordero, D. E., Meyer, T. et Cimprich, K.A. (2009). A genome-wide siRNA screen reveals diverse cellular processes and pathways that mediate genome stability. *Molecular cell*, *35*, 228-239.
- Pellat-Deceunynck, C. et Bataille, R. (2004). Normal and malignant human plasma cells: proliferation, differentiation, and expansions in relation to CD45 expression. *Blood cells, molecules & diseases*, *32*, 293-301.
- Peng, X., Karna, P., Cao, Z., Jiang, B., Zhou, M. et Yang, L. (2006). Cross-talk between epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-1 α signal pathways

- increases resistance to apoptosis by up-regulating survivin gene expression. *The Journal of biological chemistry*, 281, 25903-25914.
- Pennati, M., Folini, M. et Zaffaroni, N. (2007). Targeting survivin in cancer therapy: fulfilled promises and open questions. *Carcinogenesis*, 28, 1133-1139.
- Peters, J. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7, 644-656.
- Petersen, S. L., Wang, L., Yalcin-Chin, A., Li, L., Peyton, M., Minna, J., Harran, P. et Wang, X. (2007). Autocrine TNFalpha signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis. *Cancer cell*, 12, 445-456.
- Petros, A. M., Medek, A., Nettekheim, D. G., Kim, D. H., Yoon, H. S., Swift, K., Matayoshi, E. D., Oltersdorf, T. et Fesik, S.W. (2001). Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. , 98, 3012-3017.
- Piccini, A., Fassio, A., Pasqualetto, E., Vitali, A., Borghi, R., Palmieri, D., Nacmias, B., Sorbi, S., Sitia, R. et Tabaton, M. (2004). Fibroblasts from FAD-linked presenilin 1 mutations display a normal unfolded protein response but overproduce Abeta42 in response to tunicamycin. *Neurobiology of disease*, 15, 380-386.
- Pierce, A. J., Stark, J. M., Araujo, F. D., Moynahan, M. E., Berwick, M. et Jasin, M. (2001). Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends in Cell Biology*, 11, S52-59-S52-59.
- Pinsky, B. A. et Biggins, S. (2005). The spindle checkpoint: tension versus attachment. *Trends in cell biology*, 15, 486-493.
- Plescica, J., Salz, W., Xia, F., Pennati, M., Zaffaroni, N., Daidone, M. G., Meli, M., Dohi, T., Fortugno, P., Nefedova, Y., Gabilovich, D. I., Colombo, G. et Altieri, D.C. (2005). Rational design of shepherdin, a novel anticancer agent. *Cancer cell*, 7, 457-468.
- Pommier, Y., Redon, C., Rao, V. A., Seiler, J. A., Sordet, O., Takemura, H., Antony, S., Meng, L., Liao, Z., Kohlhagen, G., Zhang, H. et Kohn, K.W. (2003). Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutation research*, 532, 173-203.
- Promkan, M., Liu, G., Patmasiriwat, P. et Chakrabarty, S. (2009). BRCA1 modulates malignant cell behavior, the expression of survivin and chemosensitivity in human breast cancer cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, , .
- Quignon, F., Rozier, L., Lachages, A., Bieth, A., Simili, M. et Debatisse, M. (2007). Sustained mitotic block elicits DNA breaks: one-step alteration of ploidy and chromosome integrity in mammalian cells. *Oncogene*, 26, 165-172.
- Rajkumar, S. V. (2005). MGUS and Smoldering Multiple Myeloma: Update on Pathogenesis, Natural History, and Management. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, , 340-345.
- Ramp, U., Krieg, T., Caliskan, E., Mahotka, C., Ebert, T., Willers, R., Gabbert, H. E. et Gerharz, C.D. (2004). XIAP expression is an independent prognostic marker in clear-cell renal carcinomas. *Human pathology*, 35, 1022-8.
- Rasmussen, T., Kuehl, M., Lodahl, M., Johnsen, H. E. et Dahl, I.M.S. (2005). Possible roles for activating RAS mutations in the MGUS to MM transition and in the intramedullary to extramedullary transition in some plasma cell tumors. *Blood*, 105, 317-323.
- Riedl, S. J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S. W., Liddington, R. C. et Salvesen, G.S. (2001). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell*, 104, 791-800.
- Rigaud, S., Fondanèche, M., Lambert, N., Pasquier, B., Mateo, V., Soulas, P., Galicier, L., Le Deist, F., Rieux-Laucat, F., Revy, P., Fischer, A., de Saint Basile, G. et Latour, S. (2006).

- XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature*, 444, 110-4.
- Robillard, N., Jegou, G., Pellat-Deceunynck, C., Pineau, D., Puthier, D., Mellerin, M. P., Barille, S., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., Amiot, M. et Bataille, R. (1998). CD28, a marker associated with tumoral expansion in multiple myeloma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 4, 1521-1526.
- Rogakou, E. P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y. et Bonner, W.M. (2000). Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *The Journal of biological chemistry*, 275, 9390-9395.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. et Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry*, 273, 5858-5868.
- Romagnoli, M., Seveno, C., Bataille, R. et Barille-Nion, S. (2008). [Survivin in cancerology : molecular aspects and therapeutic applications]. *Medecine sciences : M/S*, 24, 821-827.
- Romagnoli, M., Seveno, C., Wulleme-Toumi, S., Amiot, M., Bataille, R., Minvielle, S. et Barille-Nion, S. (2009). The imbalance between Survivin and Bim mediates tumour growth and correlates with poor survival in patients with multiple myeloma. *British journal of haematology*, 145, 180-189.
- Romagnoli, M., Trichet, V., David, C., Clement, M., Moreau, P., Bataille, R. et Barille-Nion, S. (2007). Significant impact of survivin on myeloma cell growth. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 21, 1070-1078.
- Rosa, J., Canovas, P., Islam, A., Altieri, D. C. et Doxsey, S.J. (2006). Survivin modulates microtubule dynamics and nucleation throughout the cell cycle. *Molecular biology of the cell*, 17, 1483-1493.
- Rosasco-Nitcher, S. E., Lan, W., Khorasanizadeh, S. et Stukenberg, P.T. (2008). Centromeric Aurora-B activation requires TD-60, microtubules, and substrate priming phosphorylation. *Science*, 319, 469-472.
- Roue, G., Perez-Galan, P., Lopez-Guerra, M., Villamor, N., Campo, E. et Colomer, D. (2007). Selective inhibition of I κ B kinase sensitizes mantle cell lymphoma B cells to TRAIL by decreasing cellular FLIP level. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178, 1923-1930.
- Ruchaud, S., Carmena, M. et Earnshaw, W.C. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8, 798-812.
- Ruchaud, S., Carmena, M. et Earnshaw, W.C. (2007). The chromosomal passenger complex: one for all and all for one. *Cell*, 131, 230-231.
- Rudland, P. S., Fernig, D. G. et Smith, J.A. (1995). Growth factors and their receptors in neoplastic mammary glands. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 49, 389-399.
- Ryan, B. M., O'Donovan, N. et Duffy, M.J. (2009). Survivin: A new target for anti-cancer therapy. *Cancer treatment reviews*, , .
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G. et Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23, 2861-2874.
- Salvesen, G. S. et Duckett, C.S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3, 401-410.

- Sanda, T., Iida, S., Ogura, H., Asamitsu, K., Murata, T., Bacon, K. B., Ueda, R. et Okamoto, T. (2005). Growth inhibition of multiple myeloma cells by a novel I κ B kinase inhibitor. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *11*, 1974-1982.
- Sarasquete, M. E., Garcia-Sanz, R., Armellini, A., Fuertes, M., Martin-Jimenez, P., Sierra, M., Del Carmen Chillón, M., Alcoceba, M., Balanzategui, A., Ortega, F., Hernandez, J. M., Sureda, A., Palomera, L., Gonzalez, M. et San Miguel, J.F. (2006). The association of increased p14ARF/p16INK4a and p15INK4a gene expression with proliferative activity and the clinical course of multiple myeloma. *Haematologica*, *91*, 1551-1554.
- Sarthy, A. V., Morgan-Lappe, S. E., Zakula, D., Verneti, L., Schurdak, M., Packer, J. C. L., Anderson, M. G., Shirasawa, S., Sasazuki, T. et Fesik, S.W. (2007). Survivin depletion preferentially reduces the survival of activated K-Ras-transformed cells. *Molecular cancer therapeutics*, *6*, 269-276.
- Schimmer, A. D. et Dalili, S. (2005). Targeting the IAP Family of Caspase Inhibitors as an Emerging Therapeutic Strategy. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, , 215-219.
- Schimmer, A. D., Dalili, S., Batey, R. A. et Riedl, S.J. (2006). Targeting XIAP for the treatment of malignancy. *Cell death and differentiation*, *13*, 179-188.
- Scorrano, L., Oakes, S. A., Opferman, J. T., Cheng, E. H., Sorcinelli, M. D., Pozzan, T. et Korsmeyer, S.J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science*, *300*, 135-139.
- Seidel, C., Sundan, A., Hjorth, M., Turesson, I., Dahl, I. M., Abildgaard, N., Waage, A. et Borset, M. (2000). Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood*, *95*, 388-392.
- Seong, Y., Choi, J., Park, H., Kim, K., Ahn, S., Seong, G., Kim, I., Kang, S. et Rhim, H. (2004). Autocatalytic processing of HtrA2/Omi is essential for induction of caspase-dependent cell death through antagonizing XIAP. *The Journal of biological chemistry*, *279*, 37588-37596.
- Shah, J. V. et Cleveland, D.W. (2000). Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint. *Cell*, *103*, 997-1000.
- Shapiro, V. S., Mollenauer, M. N. et Weiss, A. (2001). Endogenous CD28 expressed on myeloma cells up-regulates interleukin-8 production: implications for multiple myeloma progression. *Blood*, *98*, 187-193.
- Sherr, C. J. et Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development*, *13*, 1501-1512.
- Shi, Y. (2004). Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein science : a publication of the Protein Society*, *13*, 1979-1987.
- Shin, H. J., Baek, K. H., Jeon, A. H., Park, M. T., Lee, S. J., Kang, C. M., Lee, H. S., Yoo, S. H., Chung, D. H., Sung, Y. C., McKeon, F. et Lee, C.W. (2003). Dual roles of human BubR1, a mitotic checkpoint kinase, in the monitoring of chromosomal instability. *Cancer cell*, *4*, 483-497.
- Shiozaki, E. N. et Shi, Y. (2004). Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends in biochemical sciences*, *29*, 486-494.
- Shiraki, K., Sugimoto, K., Yamanaka, Y., Yamaguchi, Y., Saitou, Y., Ito, K., Yamamoto, N., Yamanaka, T., Fujikawa, K., Murata, K. et Nakano, T. (2003). Overexpression of X-linked

- inhibitor of apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *International journal of molecular medicine*, *12*, 705-8.
- Shrikhande, S. V., Kleeff, J., Kayed, H., Keleg, S., Reiser, C., Giese, T., Büchler, M. W., Esposito, I. et Friess, H. (2006). Silencing of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) decreases gemcitabine resistance of pancreatic cancer cells. *Anticancer research*, *26*, 3265-73.
- Shu, H. B., Takeuchi, M. et Goeddel, D.V. (1996). The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex. , *93*, 13973-13978.
- Silke, J., Kratina, T., Chu, D., Ekert, P. G., Day, C. L., Pakusch, M., Huang, D. C. S. et Vaux, D.L. (2005). Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance. , *102*, 16182-16187.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A. et McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, *235*, 177-182.
- Smith, A. P. L., Gimenez-Abian, J. F. et Clarke, D.J. (2002). DNA-damage-independent checkpoints: yeast and higher eukaryotes. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *1*, 16-33.
- Smits, V. A., Klompaker, R., Arnaud, L., Rijksen, G., Nigg, E. A. et Medema, R.H. (2000). Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nature cell biology*, *2*, 672-676.
- Solier, S. et Pommier, Y. (2009). The apoptotic ring: a novel entity with phosphorylated histones H2AX and H2B and activated DNA damage response kinases. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *8*, 1853-1859.
- Sommer, K. W., Rodgarkia-Dara, C. J., Schreiner, C., Holzmann, K., Krupitza, G. et Cerni, C. (2007). Oncogenic c-H-ras deregulates survivin expression: an improvement for survival. *FEBS letters*, *581*, 4921-4926.
- Song, J., So, T., Cheng, M., Tang, X. et Croft, M. (2005). Sustained survivin expression from OX40 costimulatory signals drives T cell clonal expansion. *Immunity*, *22*, 621-631.
- Song, Z., Liu, S., He, H., Hoti, N., Wang, Y., Feng, S. et Wu, M. (2004). A single amino acid change (Asp 53 --> Ala53) converts Survivin from anti-apoptotic to pro-apoptotic. *Molecular biology of the cell*, *15*, 1287-1296.
- Song, Z., Yao, X. et Wu, M. (2003). Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, *278*, 23130-23140.
- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C. M., Lonning, P. E., Brown, P. O., Borresen-Dale, A. et Botstein, D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. , *100*, 8418-8423.
- Srinivasula, S. M. et Ashwell, J.D. (2008). IAPs: what's in a name?. *Molecular cell*, *30*, 123-135.
- Srinivasula, S. M., Datta, P., Fan, X. J., Fernandes-Alnemri, T., Huang, Z. et Alnemri, E.S. (2000). Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *The Journal of biological chemistry*, *275*, 36152-36157.
- Srinivasula, S. M., Gupta, S., Datta, P., Zhang, Z., Hegde, R., Cheong, N., Fernandes-Alnemri, T. et Alnemri, E.S. (2003). Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2. *The Journal of biological chemistry*, *278*, 31469-31472.

- Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R. A., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y. et Alnemri, E.S. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, *410*, 112-116.
- Stromberg, T., Dimberg, A., Hammarberg, A., Carlson, K., Osterborg, A., Nilsson, K. et Jernberg-Wiklund, H. (2004). Rapamycin sensitizes multiple myeloma cells to apoptosis induced by dexamethasone. *Blood*, *103*, 3138-3147.
- Stucki, M. et Jackson, S.P. (2006). gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA repair*, *5*, 534-543.
- Sudakin, V., Chan, G. K. et Yen, T.J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *The Journal of cell biology*, *154*, 925-936.
- Sun, C., Cai, M., Gunasekera, A. H., Meadows, R. P., Wang, H., Chen, J., Zhang, H., Wu, W., Xu, N., Ng, S. C. et Fesik, S.W. (1999). NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature*, *401*, 818-822.
- Sun, H., Nikolovska-Coleska, Z., Yang, C., Qian, D., Lu, J., Qiu, S., Bai, L., Peng, Y., Cai, Q. et Wang, S. (2008). Design of small-molecule peptidic and nonpeptidic Smac mimetics. *Accounts of chemical research*, *41*, 1264-1277.
- Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N. et Price, B.D. (2005). A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. , *102*, 13182-13187.
- Sung, J. et Demple, B. (2006). Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA. *The FEBS journal*, *273*, 1620-1629.
- Suzuki, A., Ito, T., Kawano, H., Hayashida, M., Hayasaki, Y., Tsutomi, Y., Akahane, K., Nakano, T., Miura, M. et Shiraki, K. (2000). Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death. *Oncogene*, *19*, 1346-1353.
- Swanton, C., Nicke, B., Schuett, M., Eklund, A. C., Ng, C., Li, Q., Hardcastle, T., Lee, A., Roy, R., East, P., Kschischo, M., Endesfelder, D., Wylie, P., Kim, S. N., Chen, J., Howell, M., Ried, T., Habermann, J. K., Auer, G., Brenton, J. D., Szallasi, Z. et Downward, J. (2009). Chromosomal instability determines taxane response. , *106*, 8671-8676.
- Tamm, I., Richter, S., Oltersdorf, D., Creutzig, U., Harbott, J., Scholz, F., Karawajew, L., Ludwig, W. et Wuchter, C. (2004). High expression levels of x-linked inhibitor of apoptosis protein and survivin correlate with poor overall survival in childhood de novo acute myeloid leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *10*, 3737-44.
- Tamm, I., Richter, S., Scholz, F., Schmelz, K., Oltersdorf, D., Karawajew, L., Schoch, C., Haferlach, T., Ludwig, W. et Wuchter, C. (2004). XIAP expression correlates with monocytic differentiation in adult de novo AML: impact on prognosis. *The hematology journal : the official journal of the European Haematology Association / EHA*, *5*, 489-95.
- Tao, W. (2005). The mitotic checkpoint in cancer therapy. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *4*, 1495-1499.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P. et Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *9*, 231-241.
- Taylor, S. S. et McKeon, F. (1997). Kinetochores localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell*, *89*, 727-735.
- Temme, A., Rieger, M., Reber, F., Lindemann, D., Weigle, B., Diestelkoetter-Bachert, P., Ehninger, G., Tatsuka, M., Terada, Y. et Rieber, E.P. (2003). Localization, dynamics, and

- function of survivin revealed by expression of functional survivinDsRed fusion proteins in the living cell. *Molecular biology of the cell*, *14*, 78-92.
- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, *267*, 1456-1462.
- Tratner, I. (2003). [The efficacy of the politics of prevention and screening in the fight against cancer]. *Medecine sciences : M/S*, *19*, 368-370.
- Tricot, G. (2000). New insights into role of microenvironment in multiple myeloma. *Lancet*, *355*, 248-250.
- Tsujimoto, Y. et Shimizu, S. (2000). VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell death and differentiation*, *7*, 1174-1181.
- Turner, N. C., Lord, C. J., Iorns, E., Brough, R., Swift, S., Elliott, R., Rayter, S., Tutt, A. N. et Ashworth, A. (2008). A synthetic lethal siRNA screen identifying genes mediating sensitivity to a PARP inhibitor. *The EMBO journal*, *27*, 1368-1377.
- Ubersax, J. A., Woodbury, E. L., Quang, P. N., Paraz, M., Blethrow, J. D., Shah, K., Shokat, K. M. et Morgan, D.O. (2003). Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature*, *425*, 859-864.
- Uchiyama, H., Barut, B. A., Mohrbacher, A. F., Chauhan, D. et Anderson, K.C. (1993). Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood*, *82*, 3712-3720.
- Uematsu, N., Weterings, E., Yano, K., Morotomi-Yano, K., Jakob, B., Taucher-Scholz, G., Mari, P., van Gent, D. C., Chen, B. P. C. et Chen, D.J. (2007). Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *The Journal of cell biology*, *177*, 219-229.
- Uren, A. G., Coulson, E. J. et Vaux, D.L. (1998). Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts. *Trends in biochemical sciences*, *23*, 159-162.
- Uren, A. G., Wong, L., Pakusch, M., Fowler, K. J., Burrows, F. J., Vaux, D. L. et Choo, K.H. (2000). Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Current biology : CB*, *10*, 1319-1328.
- Vader, G., Kauw, J. J. W., Medema, R. H. et Lens, S.M.A. (2006). Survivin mediates targeting of the chromosomal passenger complex to the centromere and midbody. *EMBO reports*, *7*, 85-92.
- Valerie, K. et Povirk, L.F. (2003). Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene*, *22*, 5792-5812.
- Van Cruchten, S. et Van Den Broeck, W. (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia, histologia, embryologia*, *31*, 214-223.
- Vande Walle, L., Lamkanfi, M. et Vandenabeele, P. (2008). The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell death and differentiation*, *15*, 453-460.
- Vargo-Gogola, T. et Rosen, J.M. (2007). Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature reviews. Cancer*, *7*, 659-672.
- Vaux, D. L. et Silke, J. (2005). IAPs--the ubiquitin connection. *Cell death and differentiation*, *12*, 1205-1207.
- Vaux, D. L., Cory, S. et Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, *335*, 440-442.
- Vegran, F., Boidot, R., Oudin, C., Defrain, C., Rebutti, M. et Lizard-Nacol, S. (2007). Association of p53 gene alterations with the expression of antiapoptotic survivin splice variants in breast cancer. *Oncogene*, *26*, 290-297.

- Vegran, F., Boidot, R., Oudin, C., Riedinger, J. et Lizard-Nacol, S. (2005). [Implication of alternative splice transcripts of caspase-3 and survivin in chemoresistance]. *Bulletin du cancer*, *92*, 219-226.
- 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., Cook, B. P., Dufault, M. R., Ferguson, A. T., Gao, Y., He, T. C., Hermeking, H., Hiraldo, S. K., Hwang, P. M., Lopez, M. A., Luderer, H. F., Mathews, B., Petroziello, J. M., Polyak, K., Zawel, L. et Kinzler, K.W. (1999). Analysis of human transcriptomes. *Nature genetics*, *23*, 387-388.
- Vellanki, S. H. K., Grabrucker, A., Liebau, S., Proepper, C., Eramo, A., Braun, V., Boeckers, T., Debatin, K. et Fulda, S. (2009). Small-molecule XIAP inhibitors enhance gamma-irradiation-induced apoptosis in glioblastoma. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *11*, 743-752.
- Venema, J., Mullenders, L. H., Natarajan, A. T., van Zeeland, A. A. et Mayne, L.V. (1990). The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*, 4707-4711.
- Venema, J., Mullenders, L. H., Natarajan, A. T., van Zeeland, A. A. et Mayne, L.V. (1990). The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA. , *87*, 4707-4711.
- Verdecia, M. A., Huang, H., Dutil, E., Kaiser, D. A., Hunter, T. et Noel, J.P. (2000). Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nature structural biology*, *7*, 602-608.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J. et Vaux, D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, *102*, 43-53.
- Verhagen, A. M., Kratina, T. K., Hawkins, C. J., Silke, J., Ekert, P. G. et Vaux, D.L. (2007). Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via N-terminal IAP binding motifs. *Cell death and differentiation*, *14*, 348-357.
- Vermeulen, W., van Zeeland, A. A. et Mullenders, L.H.F. (2006). Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. *Molecular cell*, *23*, 471-482.
- Villadsen, R., Fridriksdottir, A. J., Ronnov-Jessen, L., Gudjonsson, T., Rank, F., LaBarge, M. A., Bissell, M. J. et Petersen, O.W. (2007). Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. *The Journal of cell biology*, *177*, 87-101.
- Vince, J. E., Wong, W. W., Khan, N., Feltham, R., Chau, D., Ahmed, A. U., Benetatos, C. A., Chunduru, S. K., Condon, S. M., McKinlay, M., Brink, R., Leverkus, M., Tergaonkar, V., Schneider, P., Callus, B. A., Koentgen, F., Vaux, D. L. et Silke, J. (2007). IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell*, *131*, 682-693.
- Vogel, C., Hager, C. et Bastians, H. (2007). Mechanisms of mitotic cell death induced by chemotherapy-mediated G2 checkpoint abrogation. *Cancer research*, *67*, 339-345.
- Vogelstein, B. et Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine*, *10*, 789-799.
- Vong, Q. P., Cao, K., Li, H. Y., Iglesias, P. A. et Zheng, Y. (2005). Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin. *Science*, *310*, 1499-1504.
- Wang, B., Matsuoka, S., Ballif, B. A., Zhang, D., Smogorzewska, A., Gygi, S. P. et Elledge, S.J. (2007). Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science*, *316*, 1194-1198.

- Wang, H., Wang, X., Zhang, P. et Wang, Y. (2008). The Ku-dependent non-homologous end-joining but not other repair pathway is inhibited by high linear energy transfer ionizing radiation. *DNA repair*, 7, 725-733.
- Wang, J. C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3, 430-440.
- Wang, J. Y. (2000). Cancer. New link in a web of human genes. *Nature*, 405, 404-405.
- Wang, J., Gu, Q., Li, M., Zhang, W., Yang, M., Zou, B., Chan, S., Liang, Q., Jiang, B., Tu, S., Ma, J., Hung, I. F., Lan, H. et Wong, B.C.Y. (2009). Identification of XAF1 as a novel cell cycle regulator through modulating G2/M checkpoint and interaction with checkpoint kinase 1 in gastrointestinal cancer. *Carcinogenesis*, , .
- Wang, Q., Zhang, H., Fishel, R. et Greene, M.I. (2000). BRCA1 and cell signaling. *Oncogene*, 19, 6152-6158.
- Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & development*, 15, 2922-2933.
- Wang, Z., Sampath, J., Fukuda, S. et Pelus, L.M. (2005). Disruption of the inhibitor of apoptosis protein survivin sensitizes Bcr-abl-positive cells to STI571-induced apoptosis. *Cancer research*, 65, 8224-8232.
- Weaver, B. A. A., Silk, A. D., Montagna, C., Verdier-Pinard, P. et Cleveland, D.W. (2007). Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor. *Cancer cell*, 11, 25-36.
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B. et Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 292, 727-730.
- Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M. A. et Allis, C.D. (1999). Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*, 97, 99-109.
- Weinberg, R. A. (1994). Oncogenes and tumor suppressor genes. *CA: a cancer journal for clinicians*, 44, 160-170.
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81, 323-330.
- Weinstein, I. B. et Joe, A. (2008). Oncogene addiction. *Cancer research*, 68, 3077-3080; discussion 3080.
- Wheatley, S. P., Barrett, R. M., Andrews, P. D., Medema, R. H., Morley, S. J., Swedlow, J. R. et Lens, S.M.A. (2007). Phosphorylation by aurora-B negatively regulates survivin function during mitosis. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 6, 1220-1230.
- Wheatley, S. P., Carvalho, A., Vagnarelli, P. et Earnshaw, W.C. (2001). INCENP is required for proper targeting of Survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Current biology : CB*, 11, 886-890.
- Wheatley, S. P., Henzing, A. J., Dodson, H., Khaled, W. et Earnshaw, W.C. (2004). Aurora-B phosphorylation in vitro identifies a residue of survivin that is essential for its localization and binding to inner centromere protein (INCENP) in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 279, 5655-5660.
- Willis, S. N. et Adams, J.M. (2005). Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Current opinion in cell biology*, 17, 617-625.
- Willis, S. N., Fletcher, J. I., Kaufmann, T., van Delft, M. F., Chen, L., Czabotar, P. E., Ierino, H., Lee, E. F., Fairlie, W. D., Bouillet, P., Strasser, A., Kluck, R. M., Adams, J. M. et Huang, D.C.S. (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science*, 315, 856-859.

- Witzig, T. E., Timm, M., Larson, D., Therneau, T. et Greipp, P.R. (1999). Measurement of apoptosis and proliferation of bone marrow plasma cells in patients with plasma cell proliferative disorders. *British journal of haematology*, 104, 131-137.
- Wuilleme-Toumi, S., Robillard, N., Gomez, P., Moreau, P., Le Gouill, S., Avet-Loiseau, H., Harousseau, J., Amiot, M. et Bataille, R. (2005). Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 19, 1248-1252.
- Xia, F. et Altieri, D.C. (2006). Mitosis-independent survivin gene expression in vivo and regulation by p53. *Cancer research*, 66, 3392-3395.
- Xia, W., Bisi, J., Strum, J., Liu, L., Carrick, K., Graham, K. M., Treece, A. L., Hardwicke, M. A., Dush, M., Liao, Q., Westlund, R. E., Zhao, S., Bacus, S. et Spector, N.L. (2006). Regulation of survivin by ErbB2 signaling: therapeutic implications for ErbB2-overexpressing breast cancers. *Cancer research*, 66, 1640-1647.
- Xie, S., Wu, H., Wang, Q., Cogswell, J. P., Husain, I., Conn, C., Stambrook, P., Jhanwar-Uniyal, M. et Dai, W. (2001). Plk3 functionally links DNA damage to cell cycle arrest and apoptosis at least in part via the p53 pathway. *The Journal of biological chemistry*, 276, 43305-43312.
- Yaccoby, S., Wezeman, M. J., Henderson, A., Cottler-Fox, M., Yi, Q., Barlogie, B. et Epstein, J. (2004). Cancer and the microenvironment: myeloma-osteoclast interactions as a model. *Cancer research*, 64, 2016-2023.
- Yan, H., Frost, P., Shi, Y., Hoang, B., Sharma, S., Fisher, M., Gera, J. et Lichtenstein, A. (2006). Mechanism by which mammalian target of rapamycin inhibitors sensitize multiple myeloma cells to dexamethasone-induced apoptosis. *Cancer research*, 66, 2305-2313.
- Yang, D., Welm, A. et Bishop, J.M. (2004). Cell division and cell survival in the absence of survivin. , 101, 15100-15105.
- Yang, Y., Fang, S., Jensen, J. P., Weissman, A. M. et Ashwell, J.D. (2000). Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science*, 288, 874-877.
- Yarden, Y. (2001). Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology*, 61 Suppl 2, 1-13.
- Yie, S., Luo, B., Ye, N., Xie, K. et Ye, S. (2006). Detection of Survivin-expressing circulating cancer cells in the peripheral blood of breast cancer patients by a RT-PCR ELISA. *Clinical & experimental metastasis*, 23, 279-289.
- Youle, R. J. et Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9, 47-59.
- Zhan, F., Hardin, J., Kordsmeier, B., Bumm, K., Zheng, M., Tian, E., Sanderson, R., Yang, Y., Wilson, C., Zangari, M., Anaissie, E., Morris, C., Muwalla, F., van Rhee, F., Fassas, A., Crowley, J., Tricot, G., Barlogie, B. et Shaughnessy, J. (2002). Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood*, 99, 1745-1757.
- Zhao, H. et Piwnicka-Worms, H. (2001). ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Molecular and cellular biology*, 21, 4129-4139.
- Zhao, J., Tenev, T., Martins, L. M., Downward, J. et Lemoine, N.R. (2000). The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *Journal of cell science*, 113 Pt 23, 4363-4371.

Zhu, N., Gu, L., Findley, H. W., Chen, C., Dong, J., Yang, L. et Zhou, M. (2006). KLF5 Interacts with p53 in regulating survivin expression in acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of biological chemistry*, 281, 14711-14718.

Table des illustrations

Figure 1 : Organisation tissulaire de la glande mammaire.....	21
Figure 2: Courbes de survie en fonction du type de cancer du sein.	24
Figure 3: Schéma du déroulement du cycle cellulaire.	30
Figure 4: Orchestration du cycle cellulaire par les complexes Cyclines/CDK.	31
Figure 5: Schéma de la progression de la phase G1.....	33
Figure 6: Schéma de la transition G1/S.....	35
Figure 7 : Schéma de la transition G2/M.....	37
Figure 8 : Point de départ des voies de réponses aux dommages à l'ADN.	39
Figure 9 : Activation d'ATM suite à des cassures doubles brins.	40
Figure 10 : Schéma de la formation d'un IRIF lors de dommages à l'ADN.	43
Figure 11 : Schéma de la recombinaison homologue.	45
Figure 12 : Schéma de la voie NHEJ.....	46
Figure 13 : Schéma de la partie rapide du point de contrôle G1/S.	51
Figure 14 : Schéma de la partie lente du point de contrôle G1/S.	52
Figure 15 : Schéma de la partie rapide du point de contrôle G2/M.	54
Figure 16 : Schéma de la partie lente du point de contrôle G2/M.	55
Figure 17 : Inhibition du déclenchement de nouvelles origines de réplication.	56
Figure 18 : Schéma de l'inhibition du déclenchement d'origines de réplication en présence de radiations ionisantes.....	57
Figure 19 : Schéma du fonctionnement de la Topoisomérase II.....	58
Figure 20 : Représentation de l'organisation d'un kinétochore.	60
Figure 21: Régulation de la séparation des chromatides sœurs.	62
Figure 22 : Localisations et fonctions du complexe CPC au cours de la mitose.	63
Figure 23 : Différences morphologiques entre apoptose et nécrose.	69
Figure 24 : Structure et classification des caspases.	72
Figure 25 : Schéma des récepteurs de la superfamille du TNF.	75
Figure 26 : Schéma du relargage des protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial.	79
Figure 27 : Schéma de la structure de l'apoptosome.	80
Figure 28 : Classification et structure des membres de la famille Bcl-2.....	84
Figure 29 : Schémas des deux modèles d'activation de Bax et Bak par les « BH3-seul ».	87
Figure 30 : Structure des membres de la famille des IAPs.	90
Figure 31 : Inhibition des caspases par la protéine XIAP.	92
Figure 32 : Implication de c-IAP1 dans la voie de signalisation des TNF récepteurs.....	94
Figure 33 : Schémas des domaines structuraux de XIAP et leur localisation dans la séquence protéique.	102
Figure 34 : Schéma des initiations de traduction dépendante et indépendantes de la coiffe.	104
Figure 35 : Modélisation des interactions entre le « crochet » de XIAP et les sillons des caspases 3 et 7.	107
Figure 36 : Modélisation des interactions du domaine BIR3 de XIAP et des motifs IBM de Smac et de la caspase 9 respectivement.	109
Figure 37 : Schéma de la régulation de la voie du TGFb par XIAP.....	110
Figure 38 : Différents niveaux de régulation de l'expression et de l'activité de la Survivine.....	118
Figure 39 : Les rôles anti-apoptotiques de la Survivine.	127

Canonical Nuclear Factor κ B Pathway Inhibition Blocks Myeloma Cell Growth and Induces Apoptosis in Strong Synergy with TRAIL

Mathilde Romagnoli,^{1,2} Grégoire Desplanques,^{1,2} Sophie Maïga,^{1,4} Steven Legouill,^{1,3} Michel Dreano,⁵ Régis Bataille,^{1,2,4} and Sophie Barillé-Nion^{1,2}

Abstract Purpose: Intrinsic activation of nuclear factor κ B (NF- κ B) characterizes various hematologic malignancies. In this study, we specifically address the role of NF- κ B blockade in mediated anti-myeloma activity using the I κ B kinase-2 pharmacologic inhibitor, AS602868.

Experimental Design: Human myeloma cell lines ($n = 16$) and primary myeloma cells ($n = 10$) were tested for their sensitivity to AS602868 in terms of proliferation and apoptosis. Both *in vitro* and *in vivo* experiments were conducted. Functional mechanisms regarding the apoptotic pathways triggered by AS602868 were studied. The potential proapoptotic synergy between AS602868 and tumor necrosis factor – related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) was also evaluated.

Results: Our results show that AS602868 efficiently targeted the canonical NF- κ B pathway in myeloma cells and potently inhibited their growth in inducing apoptosis through Bax and caspase-3 activation. AS602868 also induced apoptosis in primary myeloma cells even in the presence of bone marrow mononuclear cells. Moreover, the I κ B kinase-2 inhibitor targeted the paracrine effect on the bone marrow environment. Indeed, it decreased the intrinsic and myeloma-induced secretion of interleukin-6 from bone marrow stromal cells. In addition, AS602868 inhibited myeloma cell growth in the MM.1S xenograft myeloma model. Of particular interest, AS602868 strongly increased myeloma sensitivity to TRAIL in blocking TRAIL-induced NF- κ B activation and in decreasing the expression of antiapoptotic proteins such as cFLIP and cIAP-1/2.

Conclusions: Taken together, our data point out the interest to inhibit the canonical NF- κ B pathway in myeloma and clearly encourage clinical evaluation of novel therapies based on targeting NF- κ B, especially in combination with TRAIL.

The nuclear factor κ B (NF- κ B) transcription factors are assembled through the dimerization of five members of the Rel protein family, of which p50-p65 is the most common. In resting cells, NF- κ B dimers are retained in the cytoplasm in a latent, inactive form by I κ B family inhibitors, which bind to the rel-homology domain and interfere with the nuclear localization sequence of NF- κ B (1, 2). Various stimuli activate the NF- κ B signaling pathways leading to translocation of NF- κ B dimers from the cytoplasm to the nucleus. In the canonical pathway, proinflammatory cytokines such as the tumor necrosis factor α (TNF α), working through different receptors belonging to the TNF-receptor family, activate the

I κ B kinase (IKK) complex consisting of the IKK1 (or IKK α) and IKK2 (or IKK β) catalytic subunits and the IKK γ regulatory subunit (or NEMO). This complex predominantly acting through IKK2 (IKK β) catalyzes the phosphorylation of I κ Bs (at sites equivalent to Ser³² and Ser³⁶ of I κ B α), their polyubiquitination and subsequent degradation by the 26S proteasome. The released NF- κ B dimers, typically heterodimers of p50 and p65 subunits, translocate to the nucleus where it binds to specific DNA sequences in the promoters of target genes and modulates their transcription. Recently, an alternative NF- κ B pathway, strictly dependent on IKK1 was described. This pathway, based on processing of the NF- κ B2/p100 precursor, is activated in response to either the engagement of LT β and BAFF receptors or CD40 and may play a central role in the development and maintenance of secondary lymphoid organs (2).

Constitutive activation of NF- κ B was reported for various solid and hematologic tumors (3, 4). Actually, NF- κ B promotes cell survival through the expression of genes coding for antiapoptotic proteins, i.e., c-FLIP, members of the Bcl-2 family, or the inhibitor of apoptosis proteins (IAP) and stimulates cell proliferation via the induction of growth factors, i.e., c-myc or cell cycle regulators (5, 6). Importantly, most actual anticancer drugs activate the NF- κ B pathway, an event that interferes with their efficiency and participates in

Authors' Affiliations: ¹INSERM, UMR 601, ²Université de Nantes, Faculté de Médecine, ³Department of Clinical Hematology, CHR Nantes, Nantes, France; ⁴Centre de Lutte contre le Cancer Rene Gauducheau, Saint Herblain, France; and ⁵Merck Serono International SA, Geneva, Switzerland
Received 1/18/07; revised 6/7/07; accepted 7/20/07.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Requests for reprints: Sophie Barillé-Nion, UMR 601, 9 quai Moncoussu, Nantes F-44093, France. Phone: 33-24008-4766; Fax: 33-24008-4778; E-mail: sbarille@nantes.inserm.fr.

©2007 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0140

chemoresistance (7). Therefore, it has been proposed that inhibition of NF- κ B could be an adjuvant therapy for cancer.

Among hematologic malignancies, constitutive activation of the NF- κ B pathway was observed in acute myeloid leukemia (8), and in a subgroup of lymphomas with diffuse large and primary mediastinal B-cell lymphomas (9). NF- κ B activation also contributes to malignant transformation of myelodysplastic syndromes (10). Interestingly, Endo et al. recently showed that inhibition of the canonical NF- κ B pathway in B-CLL cells induced cell death in contrast to inhibition of the alternative pathway activated by the TNF superfamily member, BAFF (11). Regarding multiple myeloma (MM), several studies revealed the expression of constitutively active NF- κ B in bone marrow aspirates from patients (12–14). However, the underlying mechanisms for expression of intrinsically activated NF- κ B in MM are poorly understood. NF- κ B could be activated in an autocrine or paracrine manner because several NF- κ B-inducing cytokines including TNF α , lymphotoxin, BAFF/APRIL, interleukin-1, and RANKL are produced either by MM cells or by the bone marrow environment. Indeed, the principal site of tumor growth and propagation of MM is the bone marrow compartment, in which cells from the environment are thought to supply growth and survival factors and to provide contact-mediated drug resistance. Chauhan et al. previously reported that MM cell adhesion to bone marrow stromal cells (BMSC) induced NF- κ B-dependent up-regulation of transcription of interleukin-6 (IL-6), a major growth and antiapoptotic factor in MM (15). They further showed that blocking NF- κ B activation in MM cells overcame the growth and survival advantage conferred by tumor cell binding to BMSC (13). Despite the successful clinical development of immunomodulatory derivatives of thalidomide and proteasome inhibitors acting partially through NF- κ B inhibition, such as bortezomib, the search for additional new agents and effective strategies against myeloma that is still an incurable cancer, remains a high priority. The TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) emerges as a very attractive death ligand in targeted MM therapy because it is able to induce apoptosis in myeloma cells through caspase-8 activation (16, 17). However, TRAIL resistance has also been observed in myeloma cells but mechanisms underlying this resistance remain elusive (18, 19).

Therefore, for its potential use in the treatment of MM, we investigated the pharmacologic inhibitor of the canonical NF- κ B pathway, AS602868, which has the ability to block IKK2. We describe here that AS602868 decreased *in vitro* myeloma cell growth related to cell cycle blockade and induction of apoptosis through the classical apoptotic pathway, targeted the paracrine effects of the bone marrow environment, inhibited the *in vivo* myeloma tumor progression, and sensitized cells to TRAIL-induced cell death in preventing TRAIL-induced NF- κ B activation. Therefore, specific blockade of NF- κ B signaling may represent a novel potent therapeutic approach in the treatment of MM, particularly in combination with TRAIL-targeted therapy.

Materials and Methods

Characteristics of AS602868. AS602868 is an anilinopyrimidine derivative and an ATP competitor that has been optimized through chemical modification after the *in vitro* screening of compounds for their inhibitory effect on IKK2EE, a constitutive form of IKK2. This

compound was developed by Merck Serono International SA and is covered by patent application no. PCT WO 02/46171. AS602868 has an *in vitro* inhibitory concentration of 50% (IC₅₀) of 60 nmol/L toward purified IKK2EE and has limited or no effect on IKK1 or on a panel of recombinant kinases. In a series of tests on different cell lines, AS602868 was shown to block the phosphorylation of I κ B and subsequent NF- κ B activation (20).

Myeloma cells and BMSC culture. The human myeloma cell lines (HMCL) XG1, XG2, XG5, XG6, XG7, NAN1, NAN3, NAN6, MDN, and SBN have been previously established in our laboratory and were cultured in the presence of 3 ng/mL of recombinant human IL-6 (rhIL6; Novartis; ref. 21). U266, LP1, L363, RPMI 8226, and NCI-H929 HMCLs are commercially available. MM.1S was a gift from Dr. S.T. Rosen (Northwestern University, Chicago, IL). Cell lines were maintained in RPMI 1640 supplemented with 5% FCS, 2 mmol/L of glutamine, and 5×10^{-5} mol/L of 2- β -mercaptoethanol.

Primary myeloma cells were obtained from bone marrow aspirates or peripheral blood samples and BMSC from bone marrow samples from patients with MM following Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. For 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay, myeloma cells were further purified using CD138 immunomagnetic beads (Miltenyi Biotec) as previously described (22). BMSC were derived from confluent adherent cell monolayer obtained from total bone marrow cells after two passages using trypsin/EDTA solution. Informed consent was provided according to the Helsinki Declaration of the World Medical Association. The University Hospital of Nantes Review Board approved these studies.

Tritiated [³H]thymidine incorporation assay. HMCLs (10^4 cells/well) were cultured in triplicate in 96-well plates in the presence or absence of AS602868 for 72 h. Cells were pulsed with 1 μ Ci of [³H]thymidine during the last 8 h of culture, harvested onto glass filters with an automatic cell harvester (Perkin-Elmer), and the uptake of [³H]thymidine was monitored using a 1450 Microbeta Jet beta counter (Perkin-Elmer). The IC₅₀ for [³H]thymidine incorporation was calculated for each HMCL. These experiments were done thrice and a mean \pm SD of inhibition was presented.

Cell viability assay. Viability was assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. After 48 h of treatment with 3×10^4 primary purified myeloma cells with increasing (5, 10, and 20 μ mol/L) AS602868 concentrations, cells were incubated with 50 μ L of 2.5 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma-Aldrich) for 210 min. Absorption at the 570 nm wavelength was measured after total solubilization of formazan crystals by 100 μ L of lysis solution. The inhibition of cell viability induced by the drug was tested in triplicate and expressed as a percentage compared with the untreated corresponding cells.

Apoptosis assay. The percentages of apoptosis were assessed by flow cytometry analysis of Apo2.7-PE staining (FACScalibur, Beckman Coulter) after 48 h of treatment. AS602868 treatment was done at a concentration of 10 μ mol/L. In the experiments using the pancaspase inhibitor z-VAD-fmk (Promega), cells were incubated with the caspase inhibitor (50 μ mol/L) for 1 h, then AS602868 was added for 24 h. In TRAIL experiments, HMCLs or primary myeloma cells were incubated for 48 h with 5 μ mol/L of AS602868 and/or recombinant TRAIL (R&D Systems) at 100 ng/mL for XG6, LP1, U266, MM.1S, and L363, or at 10 ng/mL for more sensitive cell lines NCI-H929, RPMI 8226, XG7, NAN1, and NAN3. Total bone marrow cells from patients with MM were cultured with RPMI 1640 complemented with 5% FCS and 3 ng/mL of rhIL6, and after 48 h of incubation with or without TRAIL (100 ng/mL) in the presence or absence of 10 μ mol/L of AS602868, cells were stained with anti-CD38-APC, CD138-PC5, CD45-FITC, and Apo2.7-PE monoclonal antibodies (Becton Dickinson) before flow cytometry analysis, as previously described (23).

Binding activity of nuclear p50 NF- κ B subunit by ELISA. NF- κ B activation was determined with a Trans-AM NF- κ B p50 transcription factor assay kit (Panomics) according to the manufacturer's instructions. This ELISA used a 96-well plate coated with an oligonucleotide

containing the NF- κ B consensus binding site (5'-GGGACTTCC-3'). Cells were treated for 18 h with 10 μ mol/L of AS602868, then nuclear extracts were prepared with Panomics nuclear extraction kit and added to the ELISA plate. NF- κ B binding to the target oligonucleotide was detected by incubation with primary antibodies specific for the activated form of the p50 subunit, visualized by anti-IgG horseradish peroxidase conjugate, and quantified at 450 nm. Each condition was run in triplicate.

Subcellular p65 NF- κ B subunit localization by immunofluorescence. HMCLs were treated with or without AS602868 at 10 μ mol/L for 3 h, then spotted on a glass slide, air-dried 15 min at room temperature, fixed with PBS + 4% formaldehyde, and permeabilized with PBS + 0.05% Tween 20 + 0.05% Triton 100. After saturation in PBS/3% bovine serum albumin for 30 min, slides were incubated for 1 h with anti-human p65 antibody (1:100; Santa Cruz Biotechnology Inc.), then cells were washed and incubated for 30 min with an FITC-conjugated anti-rabbit antibody (1:200; Becton Dickinson). Images were collected using a Leica TCS NT microscope with a 63 \times 1.3 NA Fluotar objective (Leica).

Intercellular adhesion molecule-1 expression. HMCLs were cultured with recombinant TNF α (5 ng/mL; R&D Systems) in the presence or absence of AS602868 (10 μ mol/L) for 48 h. Cells were then stained with mouse IgG isotype control or FITC-conjugated anti-human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) antibody. ICAM-1 expression was determined using FACScalibur (Becton Dickinson).

Bax activation. For the detection of activated Bax, 5×10^5 cells treated with 10 μ mol/L of AS602868 for 48 h and controls, were washed in PBS and fixed using Intra Prep Permeabilization Reagent Kit (R&D Systems) following the recommendations of the manufacturer. Then, cells were incubated with anti-Bax (clone 6A7) antibody or IgG₁ isotype control for 20 min. After washing in PBS, cells were incubated with FITC-conjugated anti-mouse antibody (R&D Systems) for 20 min, and resuspended in PBS + 1% formaldehyde. Flow cytometry analysis was done as above.

Immunoblot analysis. Cells (5×10^6) were resuspended in lysis buffer [10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6), 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 2 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% Triton X-100, and 2 μ g/mL aprotinin]. Antiphosphatases were added for phosphorylated protein detection. After 40 min on ice, lysates were cleared by centrifugation at 12,000 \times g for 30 min at 4°C. Protein concentration was

measured using bicinchoninic acid (BCA Protein Assay). Fifty micrograms of proteins were loaded for each lane. The proteins were separated by SDS-PAGE and then electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes. Western blot analysis was done by standard techniques with enhanced chemiluminescence detection (Pierce) using anti-caspase-3 (E-8), anti-c-myc (A-14), and anti-Mcl-1 (S-19) from Santa Cruz Biotechnology Inc.; anti-PARP-1 (Ab-2) from Calbiochem; anti-phosphorylated-I κ B α (Ser^{32/36}; 5A5) and anti-I κ B α from Cell Signaling Technology; anti-c-FLIP (NF6) from Alexis Biochemicals; anti-XIAP, anti-cIAP-1, anti-cIAP-2, and anti-Bcl-x_L from BD Biosciences; anti-Bcl-2 from Dako; and anti-actin from Chemicon International. Protein loading was controlled with anti-actin.

Determination of IL-6 production. BMSC (10^4) and MM.1S (5×10^5) cells were cultured separately or together (coculture) and were incubated for 48 h in the presence or absence of AS602868 (10 μ mol/L). Then culture supernatants were harvested and tested by ELISA (Sanquin).

In vivo antitumor activity of AS602868. Six- to 8-week-old non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency mice (Charles River Laboratories) were s.c. inoculated in the right flank with 10^6 MM.1S cells in 100 μ L of RPMI 1640. Three to 4 weeks later, when palpable tumors developed, mice ($n = 6$) were treated with 100 mg/kg of AS602868 in 0.5% carboxymethylcellulose/0.25% Tween 20 (g/100 mL) in distilled water, every day (6 days a week) by oral gavage. Control mice ($n = 6$) received equal amounts of control vehicle administered the same way at the same schedule. Tumor size was measured every 3 days in two dimensions using a caliper, and tumor volume (mm³) was calculated as $4 \pi/3 \times (\text{tumor width}/2)^2 \times (\text{tumor length}/2)$. Mice were humanely sacrificed when moribund or when subcutaneous tumors reached a diameter of 25 mm.

Statistical analysis. The Wilcoxon signed rank test was used to calculate the statistical significance between treated and control samples from patients and the Mann-Whitney test was used to compare treated and control mice groups in *in vivo* experiments. For all other experiments, the results are shown as mean \pm SD.

Results

AS602868 inhibits the canonical NF- κ B pathway in myeloma cells. To confirm that the pharmacologic IKK2 inhibitor

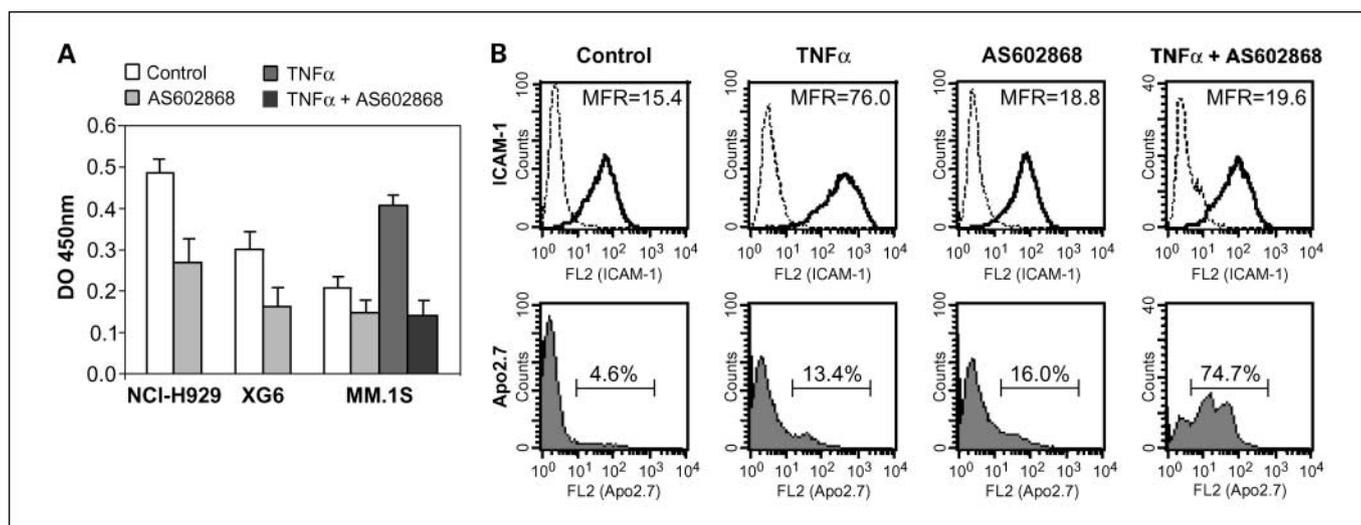


Fig. 1. AS602868 inhibits the NF- κ B pathway in myeloma cells. **A**, p50 NF- κ B binding activity was evaluated by ELISA in nuclear extracts of NCI-H929, XG6, and MM.1S cells treated with or without AS602868 at 10 μ mol/L for 18 h. MM.1S cells were also pretreated for 30 min with or without AS602868 before stimulation with TNF α at 5 ng/mL for 30 min (columns, means; bars, SD; $n = 3$). **B**, MM.1S cells were evaluated for their ICAM-1 (CD54) expression (top) and apoptotic index with Apo2.7 staining (bottom) by flow cytometry analysis after the following culture conditions were established for 48 h: control, TNF α (5 ng/mL), AS602868 (10 μ mol/L), and AS602868 + TNF α (10 μ mol/L + 5 ng/mL). Results are from a representative experiment ($n = 3$).

AS602868 inhibited the canonical NF- κ B pathway in myeloma cells, we first evaluated the NF- κ B binding activity of the p50 NF- κ B subunit in nuclear extracts from AS602868-treated cells and control cells using ELISA. As shown in Fig. 1A, 10 μ mol/L of AS602868 decreased nuclear p50-binding activity by 44.7%, 46.7%, and 30% in NCI-H929, XG6, and MM1.S cells, respectively. As expected, the positive control TNF α enhanced p50-binding activity in MM1.S cells and AS602868 was able to prevent this effect. These results clearly indicate that AS602868 prevented the translocation of the p50 NF- κ B subunit to the nucleus but promoted its cytosolic retention by interaction with nonphosphorylated I κ B α protein, limiting NF- κ B binding activity in myeloma cells. To further show the potent activity of AS602868 on the NF- κ B pathway in myeloma cells, we evaluated its effect on TNF α -induced targets. We first focused on ICAM-1 (CD54) expression. ICAM-1 expression detected by flow cytometry was induced in HMCLs after a 48-h incubation with TNF α , as shown in Fig. 1B (top) for MM.1S cells. Treatment with AS602868 had no significant effect on ICAM-1 basal levels but it abolished TNF α -induced ICAM-1 expression. The same results were obtained in XG6 and NCI-H929 cells (data not shown). In addition, TNF α alone induced a weak apoptosis in MM.1S cells but its apoptotic potential was strongly revealed by AS602868 cotreatment: 70.1% of specific apoptotic cells in AS602868 + TNF α -treated cells versus 8.8% in TNF α -stimulated cells (Fig. 1B, bottom). These results indicate that AS602868 blocked the NF- κ B pathway induced by TNF α in myeloma cells. Altogether, these data strongly argue for the potent activity of AS602868 on the canonical NF- κ B pathway in myeloma cells.

AS602868 inhibits *in vitro* myeloma cell growth. We then asked whether the pharmacologic IKK2 inhibitor AS602868 affected the growth of HMCLs. Sixteen HMCLs were incubated with increasing AS602868 doses and were evaluated by [3 H]thymidine incorporation. Then, the IC₅₀ of each HMCL proliferation rate was calculated. As presented in Fig. 2A, AS602868 efficiently decreased HMCL growth with IC₅₀'s ranging from 1.2 \pm 0.8 μ mol/L (NAN3) to 9.2 \pm 0.9 μ mol/L (RPMI 8226; mean = 3.7 \pm 1.75 μ mol/L; *n* = 16). The AS602868-induced inhibition of proliferation was confirmed by cell cycle analysis using propidium iodide staining. Indeed, AS602868 treatment led to the decrease of cell numbers in S phase (data not shown). We further evaluated whether growth inhibition resulted from the induction of apoptosis. Drug-induced apoptosis was evaluated by Apo2.7 staining after treatment with 10 μ mol/L of AS602868 for 48 h. We showed that the IKK2 inhibitor induced a specific apoptosis in HMCLs (mean = 30.4 \pm 14.3%; *n* = 15) ranging from 8 \pm 3.2% (MM.1S) to 53.6 \pm 10.6% (NAN3; Fig. 2B). These results clearly show that myeloma cell growth inhibition induced by AS602868 resulted from both inhibition of cell cycle progression and apoptosis induction.

Cell growth inhibition induced by the IKK2 inhibitor was further assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay on CD138⁺-purified primary myeloma cells from patients with MM. As shown in Fig. 2C, increasing concentrations of AS602868 inhibited myeloma cell viability in samples from three patients (two at diagnosis and one on relapse). Cell viability inhibition displayed a dose-response effect, arguing for a drug-specific effect. Moreover, apoptosis analysis of total bone marrow mononuclear cells from patients with MM indicated that AS602868 at 10 μ mol/L induced

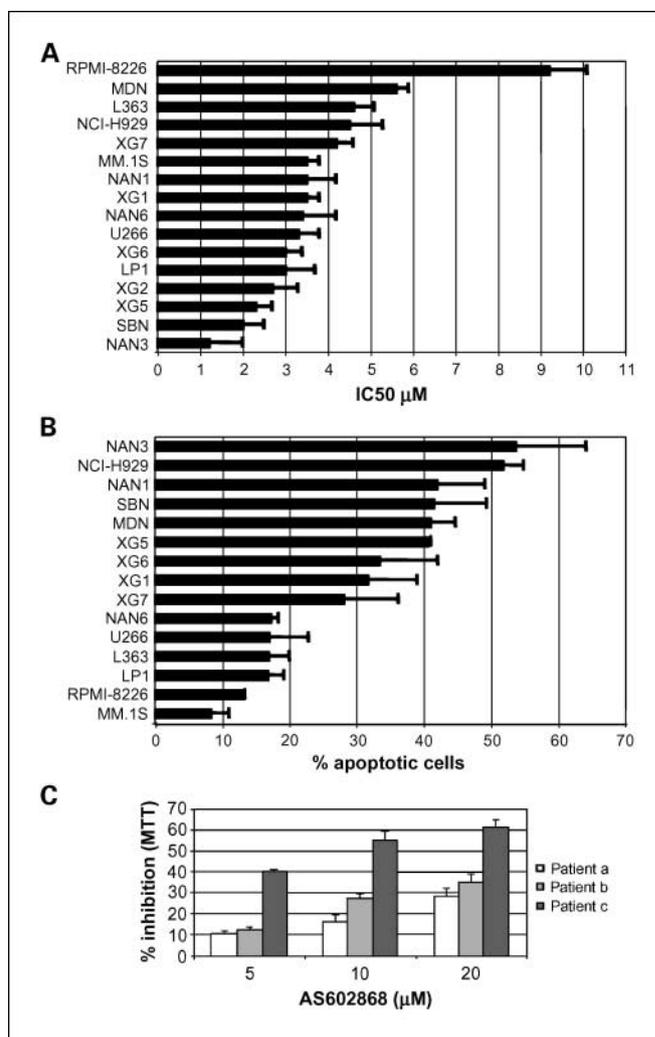


Fig. 2. AS602868 inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloma cells. **A**, IC₅₀ was calculated for each HMCL as the concentration inhibiting 50% of [3 H]thymidine incorporation after 72 h of incubation with increasing concentrations of AS602868 (columns, means; bars, SD; *n* = 3). **B**, HMCLs were incubated with AS602868 at 10 μ mol/L for 48 h, then apoptosis was evaluated by Apo2.7 staining and analyzed by flow cytometry. Specific drug-induced apoptosis for each HMCL was defined as the percentage of Apo2.7-positive cells in treated versus nontreated conditions (columns, means; bars, SD; *n* = 3). **C**, the effect of AS602868 at 5, 10, and 20 μ mol/L on CD138⁺-purified primary myeloma cell viabilities were evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. Triplicates of CD138⁺ purified primary myeloma cells from three patients (a, b, and c) were presented (columns, means; bars, SD).

specific apoptosis in a series of myeloma samples (*n* = 10), five patients at diagnosis and five patients at relapse (median = 18%; range, 6-53; *P* < 0.01), as assessed by flow cytometry analysis (Table 1). Interestingly, four out of five cases of MM relapse showed AS602868 sensitivity. It should be noted that these experiments were done in the presence of rhIL6 to limit spontaneous *in vitro* apoptosis of primary myeloma cells (median = 5%).

AS602868 induces apoptosis in myeloma cells. To gain insight into the apoptotic pathways activated by AS602868 in myeloma cells, we first sought to establish Bax activation. We found that in HMCLs, the IKK2 inhibitor induced the exposure of an occluded NH₂-terminal sequence of Bax, reflecting the conformational change which occurs during its activation. The

Table 1. AS602868 induced apoptosis in primary myeloma cells

Patient no.	Status	Sample	CD138+ cells (%)	Spontaneous apoptosis in control (%)	Specific apoptosis after AS602868 treatment (%)
1	R	BM	16	1	10
2	R	BM	10	2	37
3	D	BM	5	4	18
4	D	BM	35	38	30
5	D	BM	28.5	7	53
6	R	PB	12	4	36
7	R	BM	24	1.5	18
8	R	BM	15	6	6
9	D	BM	73	12	18
10	D	BM	5	5	6.5

NOTE: Total cells from either bone marrow (BM) or peripheral blood (PB) samples from patients at diagnosis (D) or on relapse (R) were cultured in RPMI 1640 containing 5% FCS with 3 ng/mL of rhIL6 for 48 h in the presence or absence of AS602868 (10 μ mol/L). The proportion of apoptotic myeloma cells was evaluated by fluorescence-activated cell sorting analysis. The percentage of apoptotic cells in controls and percentage of apoptotic cells specifically related to AS602868 are indicated.

activation of Bax was detected in XG6 cells as depicted in one representative experiment in Fig. 3A, as well as in the other HMCLs tested. We further assessed caspase-3 cleavage by immunoblot analysis in AS602868-treated HMCLs. As shown in Fig. 3B, cleaved caspase-3 was detected in XG6 treated by AS602868 for 48 h. Caspase-3 cleavage could be detected as soon as 6 h after treatment with AS602868 (data not shown). In addition, the cleavage of the caspase-3 substrate PARP-1 was also detected in treated cells in contrast to control cells. Finally, the pancaspase inhibitor z-VAD-fmk efficiently abrogated both caspase-3 and PARP-1 cleavage as well as cell death induced by AS602868 (Fig. 3B). These results show that the IKK2 inhibitor, AS602868, activated a caspase-dependent cell death pathway in myeloma cells.

AS602868 decreases paracrine IL-6 production in the bone marrow environment. Because IL-6 is a major paracrine growth factor in MM, we next sought to establish the effect of AS602868 on IL-6 production by BMSC either alone or in coculture with MM.1S cells. We observed that AS602868 significantly decreased the constitutive production of IL-6 proteins by BMSC (decrease of 23.9% and 38.8% in the two representative experiments shown in Fig. 3C). Interestingly, the IKK2 inhibitor also strongly inhibited IL-6 production in BMSC/MM.1S coculture experiments (decrease of 51.8% and 90.5% in the two representative experiments shown in Fig. 3C).

AS602868 inhibits in vivo myeloma cell growth. Finally, the effect of the IKK2 inhibitor was evaluated *in vivo* on an established MM xenograft model (MM.1S) in nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice. Both groups of mice (control and AS602868-treated groups) were monitored over a period of 24 days and mean tumor size values were reported in Fig. 3D. AS602868 administered by oral gavage was well tolerated in mice at a dose of 100 mg/kg. Importantly, AS602868 significantly decreased myeloma tumor size from days 18 to 24 of treatment ($P < 0.05$ at day 18 and $P < 0.01$ at days 21 and 24).

AS602868 synergizes with TRAIL to induce apoptosis in myeloma cells. Although TRAIL is considered as an attractive target in MM therapy, MM cells are inequally sensitive to TRAIL-induced apoptosis. Then, we tested whether the IKK2 inhibitor, AS602868, might sensitize them to TRAIL's apoptotic effect.

HMCLs were incubated with recombinant TRAIL (100 or 10 ng/mL, depending on the TRAIL sensitivity of each HMCL) for 48 h in the presence or absence of AS602868 at the sub-optimal dose of 5 μ mol/L. Apoptotic cells were then assessed by Apo2.7 immunostaining and flow cytometry analysis. As shown in Fig. 4A, in all HMCLs tested ($n = 10$), AS602868 strongly increased HMCL response to TRAIL-induced apoptosis (mean = $19.3 \pm 16.6\%$ of apoptotic cells in TRAIL-treated HMCLs versus $47.4 \pm 17.2\%$ in TRAIL + AS602868-treated HMCLs, whereas AS602868 induced $9 \pm 4.2\%$ of apoptotic cells in this panel).

Interestingly, as presented for four patients in Fig. 4B, AS602868 also synergized with TRAIL to specifically induce apoptosis in primary myeloma cells incubated with total bone marrow cells. Dot plots obtained by flow cytometry analysis for patient 2 illustrated specific apoptosis triggered by drugs in Fig. 4C.

Moreover, caspase-3 cleavage detectable in AS602868-treated XG6 cells but not in TRAIL-treated cells, was strongly enhanced in TRAIL + AS602868-treated cells (Fig. 5B). These results show that TRAIL and the IKK2 inhibitor strongly synergize to induce myeloma cell death.

To better understand the mechanisms involved in the apoptotic synergy between TRAIL and AS602868, we evaluated the ability of TRAIL to induce NF- κ B activation in MM cells. In TRAIL- and/or AS602868-treated cells, we also assessed p65 localization, the phosphorylation levels of I κ B α protein (P-I κ B α), and the expression levels of various NF- κ B-regulated proteins which play a role in cell proliferation (c-myc) or in tumor survival, and chemoresistance or radioresistance (c-FLIP_L, XIAP, cIAP-1, cIAP-2, Mcl-1, Bcl-x_L, and Bcl-2). Confocal microscopy analysis first indicated intrinsic NF- κ B activation because p65 was found in the nucleus as well as in the cytoplasm of control cells. Second, this experiment suggested that TRAIL promoted p65 nuclear localization and that AS602868 abrogated both basal and TRAIL-induced p65 translocation (Fig. 5A). Moreover, immunoblot analysis showed that TRAIL treatment strongly enhanced P-I κ B α protein levels in MM cells, as shown in XG6 cells, indicating that TRAIL was indeed able to activate NF- κ B pathway in MM cells (Fig. 5B). Importantly, AS602868, which alone decreased P-I κ B α level,

completely abrogated the induction of TRAIL-dependent P-I κ B α levels. Interestingly, AS602868 also significantly decreased the NF- κ B-regulated proteins c-myc, c-FLIP_L, and cIAP-1/2 in these cells, as well as slightly decreasing Mcl-1 and XIAP levels, at least by cleavage of the full-length protein (asterisks on Fig. 5B). TRAIL and AS602868 combination strongly decreased the expression of c-myc and of the antiapoptotic proteins c-FLIP_L, XIAP, cIAP-1/2, Mcl-1, and Bcl-x_L but not Bcl-2. Similar results were obtained in other HMCLs. These results argue for the potent synergy of the TRAIL/AS602868 combination for the extinction of antiapoptotic and proliferative proteins.

Discussion

Constitutive activation of NF- κ B has been described in many hematologic malignancies leading to the proposition that targeting the NF- κ B pathway may provide benefits in therapeutic strategies, particularly in oncohematology. In the present study, we show that the IKK2 inhibitor AS602868 decreases myeloma cell growth both *in vitro* and *in vivo*, targets the

paracrine effects of the bone marrow environment, and sensitizes myeloma cells to TRAIL proapoptotic effects. These results strongly argue for further studies to suppress NF- κ B activity as a MM therapeutic strategy.

We first show the ability of AS602868 to interfere with NF- κ B activation in myeloma cells. Indeed, this inhibitor decreased either NF- κ B-binding activity or nuclear translocation of both NF- κ B subunits p50 and p65, respectively. It also decreased constitutive phospho-I κ B α levels. These data corroborate those of Frelin et al. (8) who showed the decrease of NF- κ B activation in acute myeloid leukemia cells treated with AS602868, and by electrophoretic mobility shift assay in parallel with the inhibition of IKK2 phosphorylation. In addition, AS602868 completely blocked TNF α -induced expression of ICAM-1 on myeloma cells, a well-known target of NF- κ B (24). Moreover, the apoptotic effect of TNF α on myeloma cells was revealed by AS602868 treatment as previously observed in Jurkat cells (20). These results underscore the effect of TNF α in both caspase-8-dependent proapoptotic and NF- κ B-dependent survival pathways in myeloma cells and that the NF- κ B inhibitor tilts the balance towards apoptosis. Taken together, these results

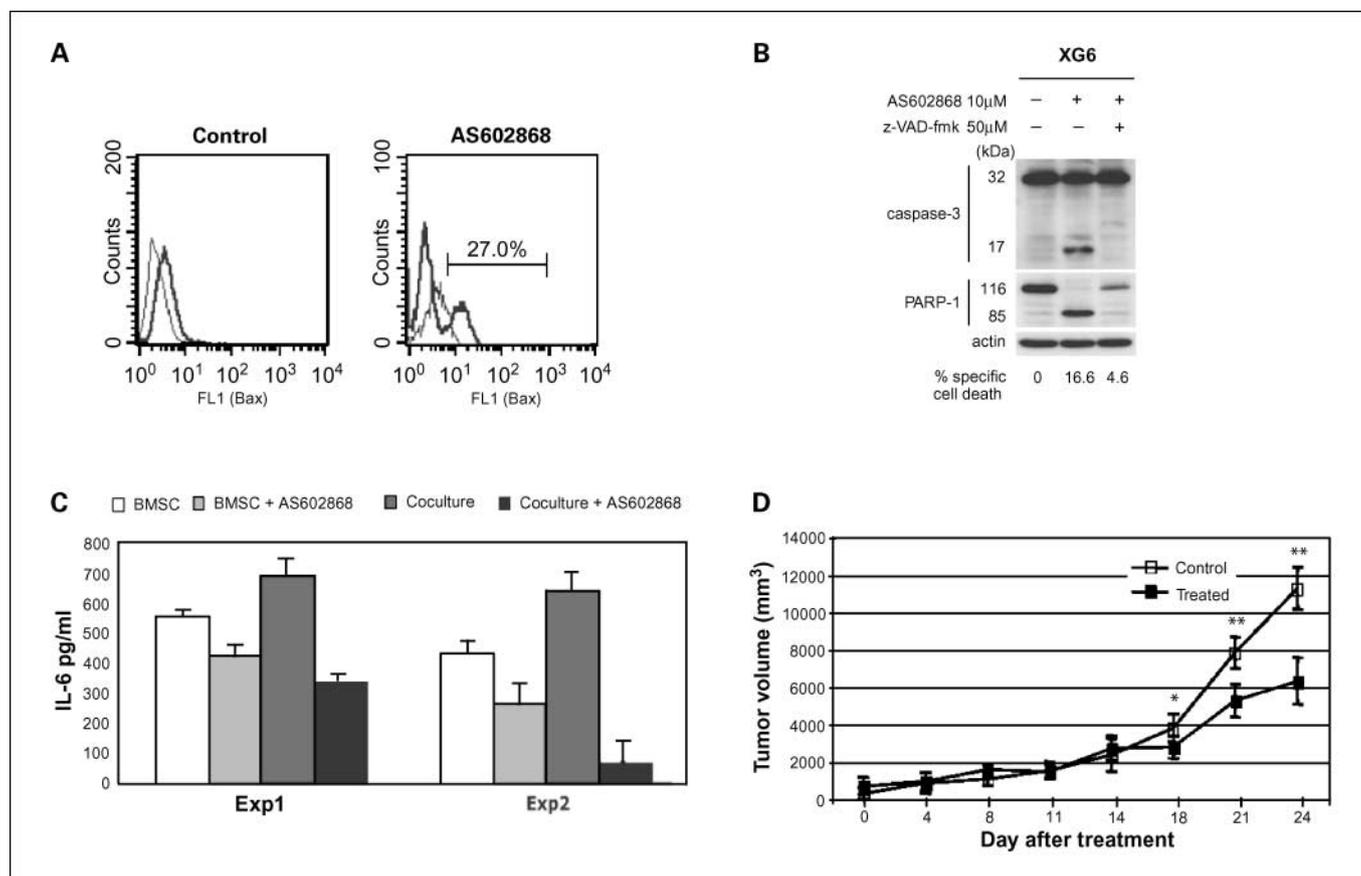


Fig. 3. AS602868 induces apoptosis through Bax activation, targets the bone environment, and inhibits tumorigenesis. *A*, Bax activation was assessed in XG6 cells by flow cytometry analysis using the 6A7 clone monoclonal antibody specifically recognizing the activated form of Bax. Cells were treated for 48 h with or without AS602868 at 10 μ M/L. The percentage of Bax-positive cells is indicated. Thin lines, IgG₁ isotypic control; thick lines, conformationally active Bax. *B*, caspase-3 and PARP-1 cleavages were determined by immunoblot analysis in XG6 cells treated by AS602868 (10 μ M/L) for 48 h, preincubated or not for 1 h with the pancaspase inhibitor z-VAD-fmk (50 μ M/L), in comparison to nontreated control cells. Actin was used as the quantitative control of loaded proteins. The percentage of specific cell death is indicated in both conditions compared with control condition. *C*, IL-6 production was measured by ELISA in supernatants of BMSC culture and BMSC + MM.1S coculture in the presence or absence of AS602868 at 10 μ M/L for 48 h. Two independent experiments were done in triplicate (columns, means; bars, SD). *D*, myeloma (MM.1S) bearing nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice were treated for 24 d as indicated in the Materials and Methods. Two groups of mice received either the IKK2 inhibitor ($n = 6$) or the corresponding vehicle ($n = 6$). Tumor size was measured in two dimensions using a caliper, and tumor volume (mm³) was calculated. Tumor sizes were calculated in each group at each time point (points, means; bars, SD). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

strongly argue for potent blockade of the canonical NF- κ B pathway by AS602868 in myeloma cells.

Interestingly, AS602868 seemed to have an important inhibiting activity on myeloma cell growth, in a range of concentrations close to those determined in acute myeloid leukemia cells (0.6-14 μ mol/L; ref. 8). Importantly, AS602868 also inhibited the cell growth of primary myeloma cells even in the presence of exogenous IL-6 or in patients in relapse. Thus, the canonical NF- κ B pathway clearly takes part in myeloma cell growth as recently described in B-CLL (11). In addition, in our study, AS602868 specifically induced apoptosis in primary myeloma cells among total bone marrow mononuclear cells, suggesting that this molecule may selectively target myeloma cells. Nevertheless, further experiments would be necessary to precisely define the sensibility of CD34+ hematopoietic stem cells. Actually, in an abstract presented at the 2006 American Society of Hematology meeting, Jourdan et al. noticed that the IKK2 inhibitor induced growth inhibition in myeloma cells but also altered the survival of CD34+ cells among bone marrow cells (25). However, this potential cytotoxic effect of AS602868 was not reported by Frelin et al. in acute myeloid leukemias (8).

Decreased cell growth observed in myeloma cells was associated with the induction of apoptosis. To define the molecular apoptotic mechanisms triggered by AS602868, we studied Bax and caspase-3 activation and we showed that both mecha-

nisms were induced. In addition, the pancaspase inhibitor z-VAD-fmk protected myeloma cells from AS602868-induced cell death as well as caspase-3 and PARP-1 cleavage. Moreover, AS602868 efficiently decreased the expression of endogenous inhibitors of caspases cIAP-1/2 and promoted cleavage in inactive fragments of both XIAP and Mcl-1, the most potent endogenous caspase inhibitor and the major regulator of mitochondrial proapoptotic activity in MM cells, respectively (26). It also inhibited the expression of c-FLIP_L, which is an important NF- κ B-regulated antiapoptogenic protein involved in TRAIL resistance through the suppression of either recruitment of procaspase-8 by FADD or autocatalytic activation of caspase-8. Altogether, these data indicate that inhibition of NF- κ B in myeloma cells activated the mitochondrial cell death pathway leading to caspase cascade activation and caspase-dependent cell death and may promote an extrinsic caspase-8-dependent apoptotic pathway. In acute myeloid leukemia blasts, AS602868 also induced a strong apoptotic response related to mitochondrial potential failure and activation of caspases (8). Finally, the proliferative c-myc protein level was also down-regulated and might favor cell growth inhibition by AS602868. In addition, we observe that AS602868 targeted the bone marrow environment in decreasing paracrine IL-6 production by BMSC which supports myeloma cell growth. Importantly, we show that AS602868, by itself, inhibits tumor size in a xenograft model of MM.1S

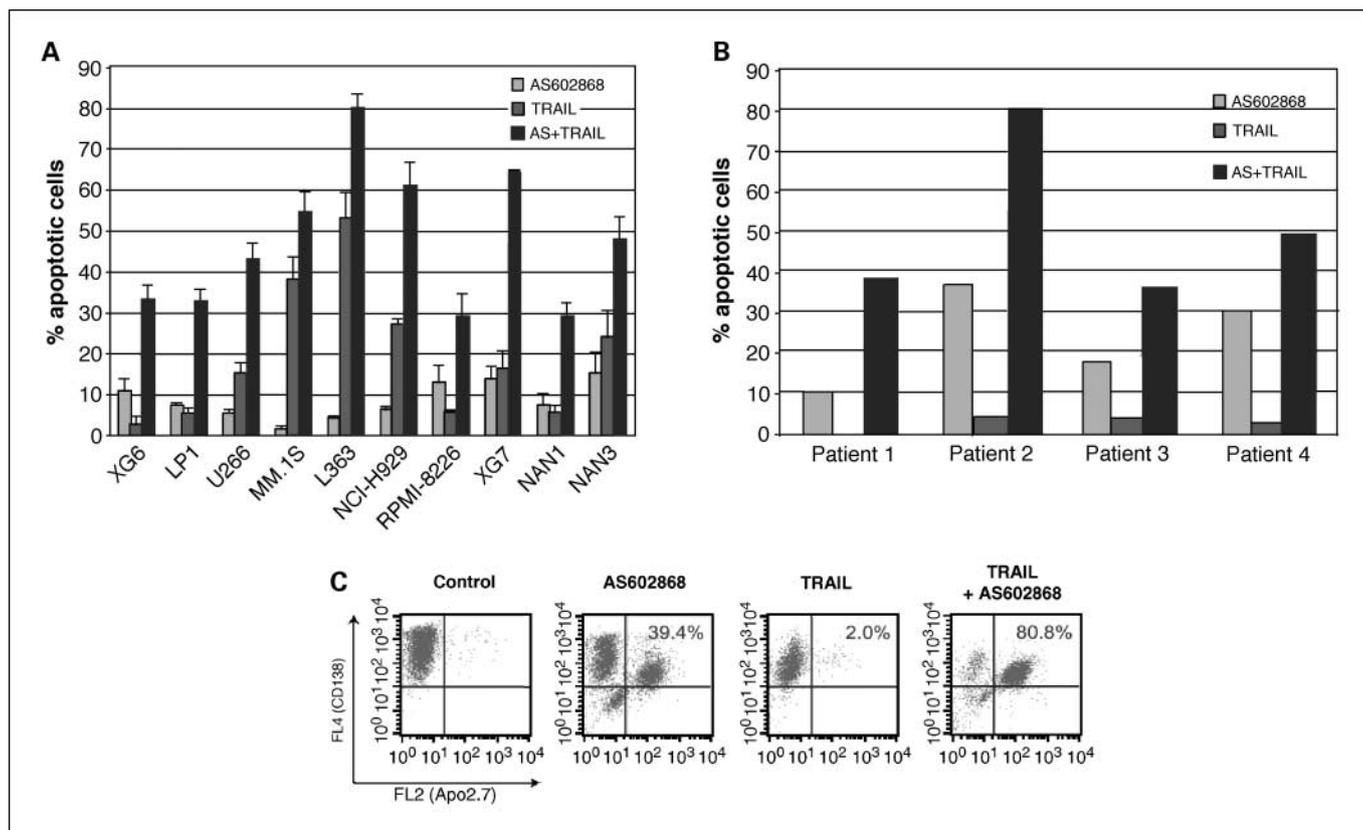
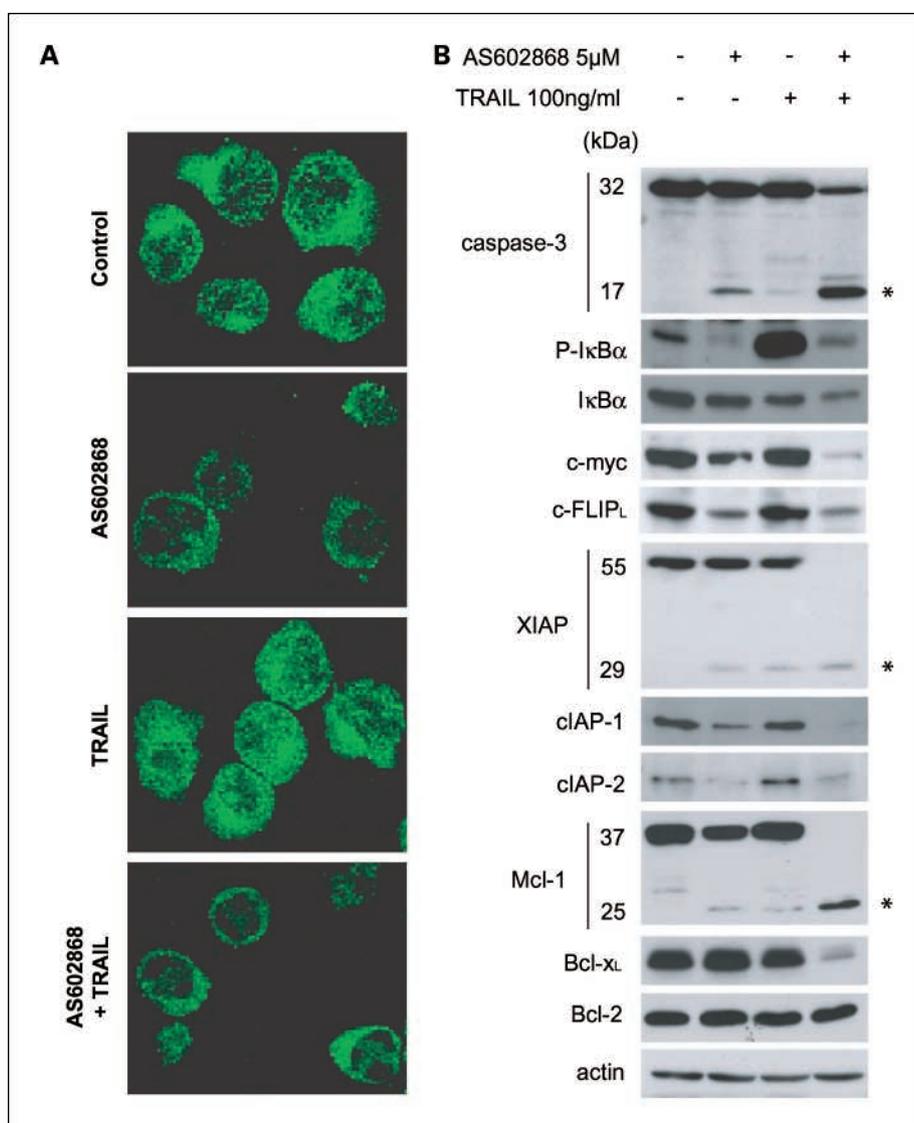


Fig. 4. AS602868 synergizes with TRAIL to induce cell death in myeloma cells. **A**, HMCLs were incubated with recombinant TRAIL (100 ng/mL for XG6, LP1, U266, MM.1S, and L363 or 10 ng/mL for NCI-H929, RPMI 8226, XG7, NAN1, and NAN3) in combination or not with AS602868 (5 μ mol/L) for 48 h. After flow cytometry analysis, the percentage of Apo2.7-positive cells was calculated for each treated HMCL compared with nontreated control cells (columns, means; bars, SD; $n = 3$). **B** and **C**, total bone marrow mononuclear cells from four patients with MM were incubated with or without AS602868 (10 μ mol/L) in the presence or absence of TRAIL (100 ng/mL) for 48 h. Then the proportion of apoptotic myeloma cells was measured by specific coexpression of CD38- and CD138-targeting myeloma cells and Apo2.7 as analyzed by flow cytometry. Four different samples from patients (patients 1-4) with MM were presented in the histogram (**B**) and one patient (patient 2) in the dot plot (**C**). AS, AS602868.

Fig. 5. AS602868 promotes TRAIL-induced apoptosis through inhibition of TRAIL-induced NF- κ B activation and decrease of NF- κ B regulated protein expression. **A**, subcellular localization of p65 NF- κ B subunits was evaluated by immunofluorostaining and monitored by confocal microscopy. XG6 cells were treated with or without AS602868 at 10 μ mol/L for 18 h before the addition or not of TRAIL at 100 ng/mL for 1 h. Results from a representative experiment ($n = 3$) are shown. **B**, level of NF- κ B activation (*P-I κ B α*) and expression of the proliferative protein (*c-myc*) and proapoptotic molecules (caspase-3, cFLIP_L, XIAP, cIAP-1/2, Mcl-1, Bcl-x_L, and Bcl-2) were determined by immunoblot analysis in XG6 cells treated with or without AS602868 (5 μ mol/L), TRAIL (100 ng/mL), or the combination of AS602868 + TRAIL for 48 h. Results from a representative experiment ($n = 3$) are shown. *, cleaved form of caspase-3, XIAP, and Mcl-1.



myeloma cells when orally administrated, without apparent toxicity.

TRAIL can selectively induce apoptosis in cancer cells and emerges as an attractive targeted therapy in MM. However, heterogenous TRAIL sensitivity has been previously observed in HMCLs (16, 18, 19, 27), but the mechanisms underlying TRAIL resistance have not been resolved. In addition to inducing apoptosis by caspase-8 recruitment through FADD, TRAIL binding to its receptors might also lead to NF- κ B activation through TRADD (28, 29). We then wondered whether the combination of TRAIL and AS602868 might induce synergy in death response in MM cells. We indeed show that interrupting the NF- κ B pathway with AS602868 strongly sensitized myeloma cells to lethal action of TRAIL in HMCLs and in primary myeloma cells, and even overcame TRAIL resistance. These effects were also observed when using the agonist monoclonal antibody HGS-ETR1 or HGS-ETR2, targeting the TRAIL receptors DR4 and DR5, respectively, in combination with AS602868 (data not shown). Interestingly, we point out for the first time that TRAIL potently activated the NF- κ B pathway in MM cells. Indeed, NF- κ B activation was detectable as early as 1 hour after

TRAIL treatment (data not shown). Importantly, NF- κ B inhibitor completely prevented cells from TRAIL-induced NF- κ B activation. Therefore, inhibition of TRAIL-induced NF- κ B activation by AS602868 associates with high increase of TRAIL proapoptotic capacity. Strongly decreased expression of the antiapoptotic proteins c-FLIP_L, XIAP, cIAP-1/2, Mcl-1, and Bcl-x_L was detected in MM cells when treated by the drug combination. XIAP and Mcl-1 decrease resulted from the cleavage of the full-length corresponding proteins, as previously observed for Mcl-1 (19). Of note, it has been recently shown that silencing c-FLIP_L sensitized myeloma cells to TRAIL (30). Moreover c-FLIP_L levels also regulate TRAIL sensitivity in mantle cell lymphoma B cells and the decrease of c-FLIP_L by IKK inhibition sensitized these cells to TRAIL (31). Such an effect may occur in myeloma cells treated with AS602868, which decreased c-FLIP_L expression, promoting caspase-8-dependent apoptotic pathways induced by TRAIL. In contrast to the proteasome inhibitor bortezomib that up-regulates DR5 expression (32), expression of the TRAIL receptors DR4 and DR5 was not modulated by the NF- κ B inhibitor (data not shown). Altogether, these results point out that TRAIL resistance occurs

at least through the activation of the canonical NF- κ B pathway in myeloma cells, and suggests that AS602868 enhanced TRAIL's apoptotic effect in myeloma cells at least through c-FLIP_L down-regulation. In addition, some reports showed interest in inhibiting NF- κ B in order to increase drug sensitivity in myeloma cells. Indeed, Dai et al. previously reported that the pharmacologic NF- κ B inhibitor Bay-11-7082 increased the sensitivity of myeloma cells to the checkpoint inhibitor UCN-01 (33). Bharti et al. also showed that curcumin (diferuloylmethane) inactivated NF- κ B and potentiated the cytotoxic effects of chemotherapeutic agents (34), and Mitsiades et al. reported that the NF- κ B inhibitory peptide SN50 enhanced doxorubicine's effect on myeloma cells (35). These effects might be related to the NF- κ B activation frequently induced by drugs in treated cells.

Altogether, our data underscore the central role for NF- κ B in MM. Indeed, NF- κ B participated in (a) myeloma cell survival, (b) tumorigenesis, (c) resistance to TRAIL-induced apoptosis, and (d) in protumoral activation of the bone marrow environment. These findings suggest that a strategy combining anti-MM drugs with NF- κ B inhibitors warrants attention in the treatment of MM and may constitute an additional approach to the oncologist's armamentarium.

Acknowledgments

We thank Viviane Dubrulle for providing bone marrow samples from patients with MM, Céline Seveno for her help in confocal analysis, and GEFLUC for financial support.

References

- Bonizzi G, Karin M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004;25:280–8.
- Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- κ B. *Genes Dev* 2004;18:2195–224.
- Yemelyanov A, Gasparian A, Lindholm P, et al. Effects of IKK inhibitor PS1145 on NF- κ B function, proliferation, apoptosis and invasion activity in prostate carcinoma cells. *Oncogene* 2006;25:387–98.
- Braun T, Carvalho G, Fabre C, Grosjean J, Fenaux P, Kroemer G. Targeting NF- κ B in hematologic malignancies. *Cell Death Differ* 2006;13:748–58.
- Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002;2:301–10.
- Karin M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature* 2006;441:431–6.
- Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor- κ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2005;5:297–309.
- Frelin C, Imbert V, Griessinger E, et al. Targeting NF- κ B activation via pharmacologic inhibition of IKK2-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Blood* 2005;105:804–11.
- Lam LT, Davis RE, Pierce J, et al. Small molecule inhibitors of I κ B kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 2005;11:28–40.
- Braun T, Carvalho G, Coquelle A, et al. NF- κ B constitutes a potential therapeutic target in high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood* 2006;107:1156–65.
- Endo T, Nishio M, Enzler T, et al. BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF- κ B pathway. *Blood* 2007;109:703–10.
- Ni H, Ergin M, Huang Q, et al. Analysis of expression of nuclear factor kappa B (NF- κ B) in multiple myeloma: downregulation of NF- κ B induces apoptosis. *Br J Haematol* 2001;115:279–86.
- Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, et al. NF- κ B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem* 2002;277:16639–47.
- Bharti AC, Donato N, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells. *J Immunol* 2003;171:3863–71.
- Chauhan D, Uchiyama H, Akbarali Y, et al. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF- κ B. *Blood* 1996;87:1104–12.
- Mitsiades CS, Treon SP, Mitsiades N, et al. TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 2001;98:795–804.
- Gazitt Y. TRAIL is a potent inducer of apoptosis in myeloma cells derived from multiple myeloma patients and is not cytotoxic to hematopoietic stem cells. *Leukemia* 1999;13:1817–24.
- Spencer A, Yeh SL, Koutrelvelis K, Baulch-Brown C. TRAIL-induced apoptosis of authentic myeloma cells does not correlate with the procaspase-8/cFLIP ratio. *Blood* 2002;100:3049–50.
- Menoret E, Gomez-Bougie P, Geffroy-Luseau A, et al. Mcl-1L cleavage is involved in TRAIL-R1- and TRAIL-R2-mediated apoptosis induced by HGS-ETR1 and HGS-ETR2 human mAbs in myeloma cells. *Blood* 2006;108:1346–52.
- Frelin C, Imbert V, Griessinger E, Loubat A, Dreano M, Peyron JF. AS602868, a pharmacological inhibitor of IKK2, reveals the apoptotic potential of TNF- α in Jurkat leukemic cells. *Oncogene* 2003;22:8187–94.
- Bataille R, Jego G, Robillard N, et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 2006;91:1234–40.
- Barille S, Bataille R, Rapp MJ, Harousseau JL, Amiot M. Production of metalloproteinase-7 (matrilysin) by human myeloma cells and its potential involvement in metalloproteinase-2 activation. *J Immunol* 1999;163:5723–8.
- Jego G, Robillard N, Puthier D, et al. Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood* 1999;94:701–12.
- Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Anderson KC. The role of tumor necrosis factor α in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene* 2001;20:4519–27.
- Jourdan M, Moreaux J, Hose D, et al. Inhibition of multiple myeloma cells growth by AS602868, a pharmacological inhibitor of IKK2 [abstract 3472]. *Blood* 2006;108.
- Derenne S, Monia B, Dean NM, et al. Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood* 2002;100:194–9.
- Mitsiades N, Mitsiades C, Anderson KC, Treon SP. Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is modulated by FLICE-inhibitory protein (FLIP) and procaspase-8 in multiple myeloma cells. *Blood* 2002;200:3049–51.
- Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF- κ B pathway. *Immunity* 1997;7:821–30.
- Ravi R, Bedi GC, Engstrom LW, et al. Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF- κ B. *Nat Cell Biol* 2001;3:409–16.
- Fandy TE, Ross DD, Gore SD, Srivastava RK. Flavopiridol synergizes TRAIL cytotoxicity by downregulation of FLIP(L). *Cancer Chemother Pharmacol* 2007;60:313–9.
- Roue G, Perez-Galan P, Lopez-Guerra M, Villamor N, Campo E, Colomer D. Selective inhibition of I κ B kinase sensitizes mantle cell lymphoma B cells to TRAIL by decreasing cellular FLIP level. *J Immunol* 2007;178:1923–30.
- Liu X, Yue P, Chen S, et al. The proteasome inhibitor PS-341 (Bortezomib) up-regulates DR5 expression leading to induction of apoptosis and enhancement of TRAIL-induced apoptosis despite up-regulation of c-FLIP and survivin expression in human NSCLC cells. *Cancer Res* 2007;67:4981–8.
- Dai Y, Pei XY, Rahmani M, Conrad DH, Dent P, Grant S. Interruption of the NF- κ B pathway by Bay 11-7082 promotes UCN-01-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in human multiple myeloma cells. *Blood* 2004;103:2761–70.
- Bharti AC, Donato N, Singh S, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor- κ B and I κ B α kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood* 2003;101:1053–62.
- Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, et al. Biologic sequelae of nuclear factor- κ B blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 2002;99:4079–86.

**INTÉRÊT DU CIBLAGE DE MEMBRES DE LA FAMILLE DES IAPs EN CANCÉROLOGIE:
IMPLICATIONS DE XIAP DANS LA SURVIVINE CELLULAIRE ET DE LA SURVIVINE DANS LES
DOMMAGES À L'ADN**

Les cancers sont des pathologies qui demeurent pour la majorité incurable de nos jours. De ce fait, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la tumorigénèse est cruciale notamment dans l'élaboration de thérapies ciblées. Les membres de la famille de la famille des IAPs (protéines inhibitrices de l'apoptose) sont fortement exprimés dans une grande majorité des cancers. L'étude de XIAP dans le Myélome Multiple, une lymphopathie B, a permis de mettre en évidence une régulation fine de l'expression de cette protéine, son rôle majeur dans la tumorigénèse et l'impact de sa déplétion dans la sensibilisation aux traitements actuels ou en cours de développement dans cette pathologie. Cependant, le rôle des IAPs ne se cantonne pas seulement à la régulation de l'apoptose. En effet, la survivine possède également la capacité de réguler le cycle cellulaire, mécanisme physiologique fortement perturbé dans les cellules cancéreuses. Cette perturbation du cycle est une des sources de l'apparition d'instabilité génétique, un processus clé de l'oncogénèse. Nous avons montré que la déplétion en survivine, dans le cancer du sein, induisait un arrêt mitotique et l'apparition de dommages à l'ADN. De plus nous avons mis en évidence que cette déplétion permettait une inhibition de croissance cellulaire dans ces cellules cancéreuses en combinaison avec des agents endommageants de l'ADN. Nos données suggèrent que XIAP et Survivine sont de bons candidats pour l'élaboration de thérapies ciblées dans ces deux cancers.

Mots-clés : cancer, XIAP, apoptose, Survivine, cycle cellulaire, dommage à l'ADN, arrêt mitotique, intérêt thérapeutique

INTEREST OF IAPs TARGETING IN ONCOLOGY : IMPACTS OF XIAP IN CELL SURVIVAL AND SURVIVIN IN DNA DAMAGE

Most of cancers are still incurable diseases. A better comprehension of tumorigenesis-related mechanisms is thus crucial in the development of new agents and target therapies. IAP (inhibitor of apoptosis protein) family members are highly expressed in a large majority of cancer. The study of XIAP in Multiple Myeloma, a B lymphopathy, has brought to light a closely regulation of this protein expression, its major role in tumorigenesis and its downregulation impact on increase sensibility to various antimyeloma treatments. The role of IAPs is not reduced to the apoptosis regulation. Indeed, survivin has also the ability to regulate the cell cycle, a physiological process highly disturbed in cancer cells. This cell cycle derangement is one of the source of genetic instability, a key process in oncogenesis. We observed that survivin depletion generated DNA damage and mitotic arrest in breast cancer cell lines. Furthermore, we pointed out that combination of survivin depletion and DNA-damage inducing agents led to inhibition of cell growth. These results demonstrate that XIAP and survivin are potent candidates for future targeted therapies in those two cancers.

Keywords : cancer, XIAP, apoptosis, survivin, cell cycle, DNA damage, mitotic arrest, therapeutic interest

DESPLANQUES Grégoire

12 rue Baboneau

44100 Nantes